

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program
Anatomie, histologie a embryologie

**MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA ZMĚN VE
STRIATU PŘI NEURODEGENERATIVNÍM
PROCESU V MOZKU**

**„Morphological characteristics of alterations in the striatum induced by
neurodegenerative process in the brain“**

Mgr. Ivana Gunčová

Školitel: Doc. MUDr. Yvona Mazurová, CSc.

Hradec Králové, 2011

Obhajoba dne:

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 14. 6. 2011

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěla poděkovat Doc. MUDr. Yvoně Mazurové, CSc. za odborné vedení v průběhu mého doktorského studia, za její čas, pomoc a cenné rady při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z Ústavu histologie a embryologie LF-HK za vytvoření příjemných pracovních podmínek. Poděkování patří i MUDr. Ivanovi Látrovi z Neurochirurgické kliniky FN v Hradci Králové za provedení operačních zákroků na potkanech, pracovníkům Ústavu farmakologie LF-HK a Ústavu fyziologie LF-HK za pomoc při realizaci některých metodik a v neposlední řadě i pracovníkům Vivária LF-HK za jejich vynikající péči o experimentální zvířata.

Děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost.

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

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	9
1.1. BAZÁLNÍ GANGLIA.....	9
1.2. HUNTINGTONOVA CHOROBA.....	11
1.3. ASTROCYTY.....	14
1.3.1. <i>Reaktivní astrocyty a astroglióza</i>	16
1.3.2. <i>Intermediální filameta v astrocytech</i>	18
1.4. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL Y HUNTINGTONOVY CHOROBY	20
1.5. TRANSGENNÍ MODEL POTKANA PRO HUNTINGTONOVU CHOROB U	23
1.6. MITOCHONDRIÁLNÍ DYSFUNKCE.....	25
1.7. ERYTROP OETIN	26
2. CÍLE STUDIE	29
3. MATERIÁL A METODY	30
3.1. LABORATORN Ě PŘIPRAVOVANÁ FIXATIVA, ROZTOKY, PUFRY	30
3.2. LABORATORNÍ ZVÍŘATA	30
3.2.1. <i>Potkani pro QA lézi a kontroly</i>	30
3.2.2. <i>Potkani transgenní pro Huntingtonovu chorob u a kontroly</i>	31
3.3. OPERAČNÍ ZÁKROKY	31
3.3.1. <i>Anestézie</i>	31
3.3.2. <i>Neurotoxická a kontrolní léze</i>	31
3.3.3. <i>Aplikace bromodeoxyuridinu</i>	32
3.3.4. <i>Aplikace erytropoetinu</i>	32
3.3.5. <i>Odběr mozkové tkán ě</i>	33
3.4. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ PRO SVĚTELNOU MIKROSKOPII	33
3.4.1. <i>Parafínové řezy</i>	33
3.4.2. <i>Kryostatové řezy</i>	33
3.5. IMUNOHISTOCHEMIE A IMUNOFLUORESCENCE.....	33
3.5.1. <i>Použité primární protilátky</i>	35
3.5.1.1. <i>Monoklonální protilátky</i>	35
3.5.1.2. <i>Polyklonální protilátky</i>	35
3.5.2. <i>Použité sekundární protilátky</i>	36
3.6. FOTODOKUMENTACE	36
3.7. CYLINDR TEST	36
3.8. ODBĚR KRVE.....	37
3.9. WESTERN BLOT	37
3.10. MITOCHONDRIÁLNÍ RESPIRACE.....	37
3.11. STEREOLOGICKÁ ANALÝZA DIGITALIZOVAN ĚHO OBRAZ U.....	38
3.12. STATISTICKÉ HODNOCENÍ	39
4. VÝSLEDKY	40
4.1. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL Y HUNTINGTONOVY CHOROBY	40
4.1.1. <i>Neurotoxická (QA) léze</i>	40
4.1.1.1. <i>Akutní fáze neurodegenerativního procesu u QA léze</i>	41
4.1.1.1.1. <i>Záv ěry - akutní fáze NDP u QA léze</i>	48
4.1.1.2. <i>Chronická fáze neurodegenerativního procesu u QA léze</i>	49
4.1.1.2.1. <i>Záv ěry - chronická fáze NDP u QA léze</i>	53

4.2. GENETICKÝ MODEL – POTKANI TRANSGENNÍ PRO HUNTINGTONOVU CHOROBU.....	75
4.2.1. Morfologické hodnocení.....	75
4.2.2. Kvantitativní stereologická analýza	90
4.2.3. Kvantitativní hodnocení mitochondriální respirace.....	92
4.2.4. Závěry – rozvoj NDP ve striatu potkanů transgenních pro HD.....	95
4.3. VLIV ERYTROPOETINU NA ROZVOJ NERODEGENERATIVNÍHO PROCESU FENOTYPU HD – PILOTNÍ STUDIE.....	96
4.3.1. Morfologické hodnocení vlivu EPO	96
4.3.2. Western Blot analýza objemu GFAP ve striatu.....	103
4.3.3. Behaviorální testování - cylindr test.....	104
4.3.4. Závěry - vliv erythropoetinu na rozvoj NDP fenotypu HD – pilotní studie.....	105
5. DISKUSE.....	106
5.1. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL Y HUNTINGTONOVY CHOROBY – NEUROTOXICKÁ LÉZE ...	107
5.2. GENETICKÝ MODEL – POTKANI TRANSGENNÍ PRO HUNTINGTONOVU CHOROBU.....	111
5.3. VLIV ERYTROPOETINU NA ROZVOJ DEGENERATIVNÍHO PROCESU FENOTYPU HD – PILOTNÍ STUDIE.....	116
6. ZÁVĚRY	119
7. SOUHRN	122
8. SUMMARY	124
9. LITERATURA	126

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
AIF1	allograft inflammatory factor 1
ALS	amyotrofická laterální skleróza
APES	3-aminopropyltriethoxysilane
ATP	adenozintrifosfát
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BrdU	bromodeoxyuridin
CAG	cytozin-adenin-guanin
CNP-ase	2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase
CNS	centrální nervový systém
CNTF	ciliary neurotrophic factor
COX	cytochrom c-oxidáza
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DAB	tetrachlorid diaminobenzidinu
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRPLA	dentato-rubro-pallido-luysianská atrofie
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermal growth factor
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
EP	nucleus entopeduncular
EPO	erythropoetin
EPO-R	receptor pro erythropoetin
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GDNF	glia-derived neurotrophic factor
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein
GP	globus pallidus
GPi/GPe	globus pallidus pars externa/pars interna
HD	Huntingtonova choroba
H&E	hematoxylin a eosin

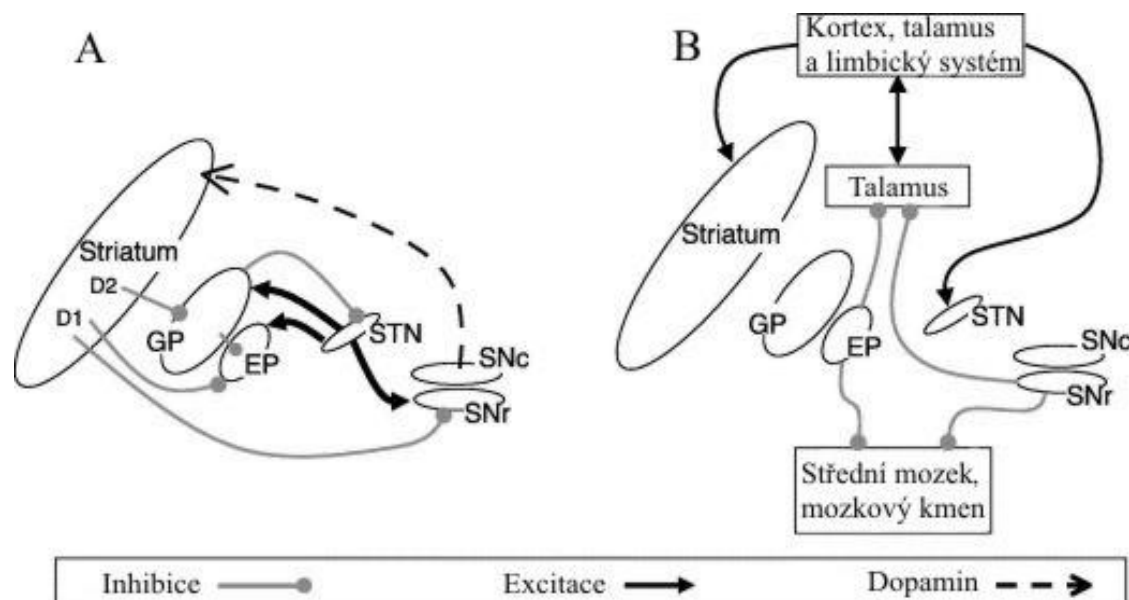
HEB	hemato-encefalická bariéra
HGF	hepatocyte growth factor
htt	huntingtin
i.m.	intramuskulární aplikace
i.p.	intraperitoneální aplikace
IA	ibotenová kyselina
IF	intermediální filamenta
IGF	insulin-like growth factor
IL	interleukin
IT 15	interesting transcript 15
JAK2	Janus family tyrosine kinase 2
KA	kainová kyselina
KV	kanál vpichu
MA	malonová kyselina
MAP2	microtubule-associated protein 2
mhtt	mutantní huntingtin
MLGP	membrana limitans gliae perivascularis
MLGS	membrana limitans gliae superficialis
MMP	matrixová metaloproteináza
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
nc	nucleus
NC	nucleus caudatus
NCAM	neural cell adhesion molecule
NDP	neurodegenerativní proces
NEST	nestin
NeuN	neuronal- specific nuclear protein
NGF	nerve growth factor
NKB/NPB	neurální kmenové/progenitorové buňky
NMDA	N-metyl-D-aspartátová kyselina
3-NP	3-nitropropionová kyselina

OPC	prekurzorové buňky oligodendrocytů
P	placebo
PBS	fyzilogický roztok puřrovaný fosforečnanem
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PD	Parkinsonova choroba
PNS	periferní nervový systém
poly-Q	polyglutamin
Pu	putamen
QA	chinolinová/chinolová/quolinová/quinolinová kyselina
rhEPO	rekombinantní lidský erythropoetin
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
SBMA	spinobulbární svalová atrofie
SCA	spinocerebelární ataxie
SD	Sprague-Dawley
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SN	substantia nigra
SNr/SNc	substantia nigra pars reticulata/pars compacta
STN	nucleus subthalamicus
tgHD	potkan transgenní pro Huntingtonovu chorobu
TMPD	tetramethylfenylendiamin
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
VIM	vimentin
vs	versus
WB	Western Blot
wt	wild-type
YAC	yeast artificial chromosome
+/-	pozitivní/negativní

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1. Bazální ganglia

Bazální ganglia (BG) tvoří systém subkortikálních jader telencefala, která se podílejí na řízení motorických funkcí, kognitivních funkcí a emocí. BG zahrnují nucleus (nc) caudatus (NC) a putamen (Pu), tzv. neostriatum (striatum), globus pallidus (GP: pars externa - GPe, a pars interna - GPi), nc. subthalamicus (STN), substantia nigra (SN: pars reticulata - SNr, a pars compacta - SNc), nc. accumbens a nc. lentiformis. NC a Pu jsou u člověka odděleny proužkem bílé hmoty – capsula interna. U potkana NC a Pu také představují hlavní struktury BG, ale tvoří jedno těleso, caudoputamen, které je stejně jako u člověka označováno jako striatum (neostriatum). (Neo)striatum, STN, GP, SN a nc. entopeduncular (EP), který je strukturou homologickou ke GPi (Prescott et al, 2006), jsou navzájem propojené a tvoří funkční podjednotku mozku (obr. 1A, B).



Obr. 1. Bazální ganglia potkana: (A) interní dráhy, (B) externí dráhy (převzato a upraveno z Prescott et al, 2006).

Poruchy BG se projevují abnormální motorickou činností a množstvím neuropsychiatrických poruch, např. degenerace neuronů ve striatu vede k rozvoji HD a příbuzných hyperkinetických poruch, u Parkinsonovy choroby (PD) a příbuzných parkinsonských onemocnění dochází k degeneraci dopaminergních neuronů v SNc (Afifi, 2003; Graybiel, 2000).

Striatové neurony jsou z 90% reprezentovány středně velkými neurony s trny. Zatímco ostatní striatové neurony využívají jako neurotransmiter GABA (γ -aminomáselná

kyselina), středně velké neurony s trny exprimují jiné neuropeptidy i jiný typ dopaminergních receptorů. Interneurony bez trnů představují 10% striatových neuronů a jsou rozděleny do 4 skupin: velké cholinergní neurony, malé GABA-ergní a parvalbumin obsahující neurony, somatostatin a neuropeptid Y exprimující neurony a neurony obsahující calretinin. Imunocytochemické metody prokázaly přítomnost dopaminergních interneuronů, které se ve striatu nacházejí jen v malém počtu a jejich počet se zvyšuje např. u Parkinsonovy choroby, kdy je přívod dopaminu do striata přerušeno (Prensa et al, 2000; Smith a Kieval, 2000). Striatové neurony obsahují 2 typy dopaminových receptorů: D1 a D2 receptory, které tvoří začátek striatopalidové dráhy (Afifi, 2003). Nejvyšší koncentrace dopaminu v mozku je právě ve striatu, kde pomáhá regulovat excitabilitu synapsí (Graybiel, 1990; Hornykiewicz, 2001).

Striatum je hlavní vstupní strukturou BG přijímající excitační podněty ze senzorio-motorických částí kortexu za účasti glutamátu jako neurotransmiteru (Graybiel, 1990; Selemon a Goldman-Rakic, 1985) a z talamických jader, kdy neurotransmiterem je glutamát nebo aspartát (Giménez-Amaya a Graybiel, 1990; Smith et al, 2004). Dopaminergní projekce ze SNc mají na neurony ve striatu excitační (při aktivaci D1 receptorů) nebo inhibiční účinky (aktivace D2 receptorů - McGeer et al, 1984). Další projekce do striata vedou z rafeálních jader (serotonergní), z nc. coeruleus (noradrenergní) a z GPe (GABA-ergní) (Afifi, 2003). Signály jsou přijímány zejména středně velkými GABA-ergními neurony s trny (např. Bolam et al, 2000). Výstupními jádry BG jsou GPi a SNr, které inhibují další cílové struktury – jádra v talamu. Výstupní dráhy se dělí na přímou a nepřímou cestu. Neurony zapojené do přímé cesty exprimují D1 receptory, koexprimují substanci P a dynorphin a představují monosynaptické inhibiční propojení s neurony GPi a SNr. Výsledkem aktivace přímé dráhy je odblokování talamu a zvýšení motoriky. Neurony nepřímé dráhy obsahují D2 receptory a enkefalin. Projekce pokračuje do GPe, které nepřímo přes STN excituje GPi a SNr. Při nepřímé cestě dochází k inhibici talamu a snížení pohybové aktivity (Alexander a Crutcher, 1990; Graybiel, 2000; Pollack, 2001). Zvýšená aktivita nepřímé dráhy je tedy odpovědná za snížení hybnosti u PD, naproti tomu zvýšená aktivita přímé dráhy má za následek nadbytečné pohyby u HD (De Long MR, 1990; Graybiel, 2000). Rovnováha propojení těchto dvou drah je rozhodující pro bezchybné ovládání motorických funkcí, stejně jako kognitivních a limbických pochodů (Graybiel, 2000).

1.2. Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (Huntington's disease, HD), poprvé popsaná Georgem Huntingtonem v roce 1872 (Huntington, 1872), je autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění s incidencí 3-10 nemocných na 100 000 obyvatel v západní Evropě a severní Americe (Ho et al, 2001; Vonsattel a DiFiglia, 1998). V Japonsku je to 0,5/100 000 obyvatel, v Asii a Africe je výskyt ještě nižší (Harper, 2002; Takano et al, 1998; Wright et al, 1981).

K typickým klinickým příznakům patří nejprve změny osobnosti, následně typické bezděčné choreatické pohyby jak v klidu, tak při aktivních pohybech a finálně i demence (Antal et al, 2003; Garron, 1973). První symptomy se objevují nejčastěji mezi 35. až 50. rokem života a onemocnění končí vždy letálně, obvykle v průběhu 10-15 (výjimečně 20) let od nástupu klinických příznaků. Onemocnění se může rozvinout i v dětském a adolescentním věku - až 6% pacientů trpí juvenilní formou HD (Foroud et al, 1999).

Prvním příznakem onemocnění bývá kognitivní dysfunkce a zpomalení intelektuálních procesů. Zhoršení kognitivních funkcí se může projevit i několik desítek let před nástupem motorického postižení a dále progreduje. Následně pacienti trpí změnami osobnosti (vznětivost, apatie, sexuální poruchy - Jensen et al, 1993), v pozdějších stadiích pak i těžkou demencí, případně přidruženými manio-depresivními stavy (Folstein et al, 1983). Charakteristickým příznakem HD, také označované jako Huntingtonova chorea (chorea – tanec, řec.), však je motorická porucha spojená se ztrátou vůlí ovládaných pohybů, která pomalu postupuje. Nejčastějšími symptomy u HD pacientů jsou bradykineze a rigidita (Garcia Ruiz et al, 2000; Sánchez-Pernaute et al, 2000; Thompson et al, 1988), zejména v pozdějších stadiích. Pacienti obvykle umírají na následky srdečního selhání nebo aspirační pneumonii (Chiu a Alexander, 1982). U juvenilních pacientů jsou symptomy odlišné, jsou charakterizovány bradykinezí, tremorem, rigiditou a dystonií, ale chorea se nemusí vůbec projevit. Postižené děti mohou trpět i epileptickými záchvaty (van Dijk et al, 1986). Většinu pacientů postihuje svalová atrofie a úbytek hmotnosti i navzdory dostatečnému kalorickému příjmu (Djousse et al, 2002; Kirkwood et al, 2001; Sanberg et al, 1981).

HD patří mezi systémové atrofie mozku, postihující především bazální mozková ganglia, zejména nc. caudatus a putamen. Z histopatologického hlediska je HD charakterizována předčasným zánikem především středně velkých (hlavně GABA-ergních) striatových neuronů obsahujících enkefalin, dynorphin a substanci P, které primárně inervují SNr a GP. Velké interneurony obsahující somatostatin, neuropeptid Y a NADPH, cholinergní

neurony a GABA-ergní neurony, obsahující parvalbumin, zůstávají většinou zachované (Ferrante et al, 1985; Reiner et al, 1988; Vonsattel 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 (Hedreen et al, 1991; 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 a DiFiglia, 1998). 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). Stupeň atrofie striata je v korelaci i s degenerací ostatních částí mozku - např. Kassubek a spol. (2004) udávají signifikantní atrofii hypotalamu. Následkem celkové atrofie se může hmotnost mozku snížit až o 40% (např. Gusella, 2001).

Míra postižení se hodnotí nejčastěji s použitím stupnice podle Vonsattela a spol. (1985), rozdělené do 5 stupňů (stupeň 0-4) ve vztahu k charakteru a rozsahu degenerace striata. Stupeň 0 zahrnuje méně než 1% pacientů s klinickými příznaky HD. Mozek pacientů se makroskopicky neodlišuje od zdravého, nicméně mikroskopicky je detekován úbytek 30-40% neuronů v hlavě NC, reaktivní glióza se zatím neobjevuje. Stupeň 1 (4% HD mozků) vykazuje atrofii ocasu a v některých případech i těla NC. Úbytek neuronů a astroglióza jsou evidentní zejména v hlavě (50%) a ocasu, méně pak v těle NC. Stupeň 2 (16% HD mozků) je spojený s již makroskopicky detekovatelnou atrofií striata, která je výraznější než u stupně 1. Konvexní tvar NC (tj. vyklenutí jeho mediálního povrchu do postranní komory) zůstává zachovaný. U stupně 3 (52% HD mozků) se, v důsledku atrofie striata, konvexita NC vyrovnává a ve stupni 4, kde je atrofie spojená se ztrátou více než 95% populace neuronů, má mediální povrch NC již konkávní tvar.

V roce 1983 byla objevena genetická mutace, která HD způsobuje, a to na krátkém raménku 4. chromozomu (Gusella et al, 1983). Až v roce 1993 byl izolován gen IT15 (interesting transcript 15), kódující nestabilní protein huntingtin (htt), složený z variabilního počtu opakujícího se trinukleotidu CAG (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Molekulární defekt vzniká v důsledku expanze tohoto tripletu kódujícího aminokyselinu glutamin. Proto můžeme HD přiřadit k dalším, nejméně osmi, polyglutaminovým (poly-Q) chorobám, mezi které patří dentato-rubro-pallido-luysianská atrofie (DRPLA), spinobulbární svalová atrofie (SBMA) a spinocerebelární ataxie (SCA) 1, 2, 3, 6, 7 a 17 (Zoghbi a Orr, 2000).

Anomální (mutantní) forma huntingtinu (mhtt) obsahuje 40 a více repeticí (adultní forma HD), ale riziko onemocnění vzniká už při 36-39 CAG repeticích (Kremer et al, 1994; Zühlke et al, 1993), při 55 a více repeticích se rozvíjí juvenilní forma onemocnění (Gárdián a Vécsei, 2004). Normální huntingtin je exprimován ve všech savčích buňkách - nejvyšší koncentrace je v mozku a varlatech, střední množství se nachází v játrech, srdci a v plicích (DiFiglia et al, 1995). V mozku jsou hlavními místy exprese neokortex, kůra mozečku, striatum a hipokampus. Lokalizace htt v mozku, a především ve striatu, ale nekoreluje se selektivním zánikem buněčných typů, specifických pro HD (Fusco et al, 1999). Jeho funkce není doposud plně objasněna. Různé studie však ukazují, že může mít klíčovou funkci v organizaci řady signálních proteinů a v intracelulárním transportu. Důkazem, podporujícím tuto teorii, je asociace htt s různými buněčnými organelami, jako jsou mitochondrie, Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum, synaptické vezikuly a také s některými částmi cytoskeletu; v menším množství je přítomen i v jádře. Byla prokázána i jeho interakce s mnoha proteiny, které jsou zahrnuty do intracelulárního transportu (Harjes a Wanker, 2003; Kegel et al, 2002; Landles a Bates, 2004; Li SH a Li XJ, 2004; Young, 2003). Významná úloha huntingtinu v průběhu embryonálního vývoje byla prokázána u HD knock-out myši, u nichž měl nedostatek htt za následek buněčnou degeneraci a smrt zárodků v embryonálním období (Duyao et al, 1995; Nasir et al, 1995; Zeitlin et al, 1995). Inaktivace genu v mozku dospělých knock-out myši vedla k jejich sterilitě, redukované délce života a k neurodegeneraci (Dragatsis et al, 2000). Tyto nálezy vedou k předpokladu, že htt je důležitý během celého života. Navíc různé studie ukázaly, že normální forma proteinu chrání před buněčnou smrtí, indukovanou mutantní formou htt *in vivo* a před neurodegenerací, která byla navozena ischemií (Cattaneo et al, 2001; Ho et al, 2001; Leavitt et al, 2001; Leavitt et al, 2006; Zhang et al, 2003). Některé *in vitro* studie naznačují i anti-apoptotický efekt htt - bylo zjištěno, že huntingtin chrání imortalizované striatové buňky před různými apoptotickými stimuly. Předpokládá se, že htt snižuje uvolňování mitochondriálního cytochromu c a brání tak tvorbě funkčního apoptozového komplexu a následné aktivaci kaspázy-9 (Rigamonti et al, 2001) a kaspázy-3 (Rigamonti et al, 2000). Navíc se prokázalo, že htt reaguje s aktivovanou formou kaspázy-3 a inhibuje tak její proteolytickou aktivitu (Zhang et al, 2006).

Expandovaný polyglutamin dává huntingtinu nové vlastnosti, které vedou k jeho cytotoxicitě. Mutantní protein narušuje více intracelulárních drah tím, že se naváže na klíčové části těchto cest a zaveze je do agregátů. Ztráta funkce normálního htt přispívá k narušení intracelulární homeostázy jak sníženou expresí, tak tvorbou agregátů. HD je

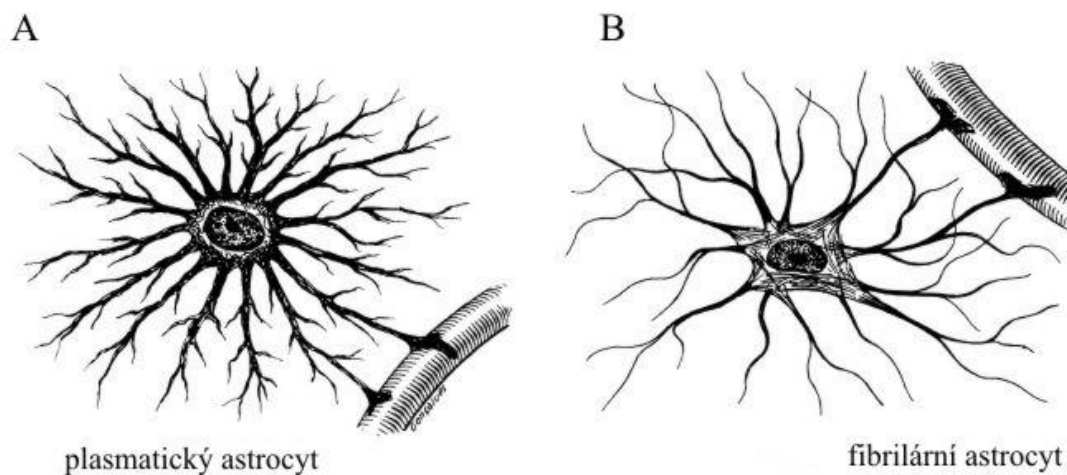
tedy charakterizována tvorbou intracelulárních, vysokomolekulárních agregátů a inkluzí mhtt a jejich akumulací v jádře, perinukleárním prostoru a v dystrofických axonech. Tyto agregáty se pravděpodobně významně podílejí na neurodegenerativním procesu (Davies et al, 1997; DiFiglia et al, 1997; Sapp et al, 1999).

Intracelulární dysfunkce, indukovaná mutantním htt, která vede k progresivní degeneraci důležitých neuronálních spojů, ke ztrátě buněk ve striatu, v některých korových vrstvách i v jiných oblastech v mozku, není jediným mechanismem zahrnutým v patogenezi HD. Excitotoxicita, metabolická a mitochondriální dysfunkce, oxidační a nitrační stres a apoptóza jsou molekulární mechanismy zapojené v genezi onemocnění (např. Beal, 1997; Coyle a Schwarcz, 1976; DiFiglia, 1990; Dragunow et al, 1995; Manfredi a Beal, 2000; Portera-Caillau et al, 1995; Tabrizi et al, 2000). Mnohé z těchto mechanismů se plně rozvíjí až v pozdějších stadiích nebo sekundárně.

1.3. Astrocyty

Astrocyty jsou nejpočetnější a největší ze skupiny buněk neuroglie v centrálním nervovém systému (CNS). Relativní počet astrocytů se ve vztahu k celkovému počtu mozkových buněk i k počtu neuronů zvyšuje společně s fylogeneticky narůstající komplexitou mozku. Například, typické ganglion pijavic je složeno z 25-30 neuronů a jen jediného astrocytu, u *Caernohabditis elegans* (*C. elegans*) se poměr mění na 6:1, u hlodavců (myš, potkan) je v kortexu poměr 3:1 a u člověka připadá na jeden neuron 1, 4 astrocytů (např. Nedergaard et al, 2003).

Astrocyty tvoří morfologicky heterogenní populaci buněk hvězdicovitého tvaru s početnými dlouhými výběžky, které obklopují všechny buněčné komponenty v CNS a obsahují intermediální filamenta (IF), tzv. gliofilamenta, zejména gliální vláknitý kyselý protein (GFAP). Rozlišujeme dva základní typy astrocytů podle lokalizace a morfologie: plasmatické astrocyty v šedé hmotě a fibrilární (vláknité) astrocyty v bílé hmotě (např. Verkhratsky a Butt, 2007).



Obr. 2. Základní typy astrocytů: (A) plasmatický astrocyt, (B) fibrilární astrocyt (převzato a upraveno z *Junqueira et al, 1999*).

Plasmatické astrocyty jsou keříčkovité buňky s četnými krátkými, vysoce rozvětvenými výběžky, které obklopují synapse. Fibrilární astrocyty mají tenké a dlouhé nerozvětvené výběžky, které především probíhají paralelně s myelinizovanými axony a obklopují je v místě Ranvierových zářezů. Specializované výběžky obou typů astrocytů, tzv. vaskulární nožky (obr. 2A, B), naléhají na stěnu cév a vytvářejí membrana limitans gliae perivascularis (MLGP), která je významnou součástí hemato-encefalické bariéry (HEB); obdobně pak na piálním povrchu tvoří membrana limitans gliae superficialis (MLGS). Kromě těchto dvou základních typů astrocytů se v CNS nacházejí i malé populace specializovaných astrogliových buněk, např. Müllerova glie v retině, Bergmannova glie v mozečku, pituicyty v neurohypofýze.

Astrocyty se vyvíjejí v prenatálním a časném postnatálním období z radiální glie, která přímo generuje i neurony pro kortikální ploténku (např. Mori et al, 2005) a dále slouží jako vodič pro migrující neurony a je důležitá pro správný vývoj architektiky CNS. Po ukončení produkce, resp. migrace neuronů podél radiálních vláken zkrátí buňky radiální glie v závěrečné fázi vývoje svoje apikální (radiální) výběžky a transformují se na hvězdicovité astrocyty (Schmechel a Rakic, 1979), příp. na Müllerovu nebo Bergmannovu glii (např. Rakic, 2003).

Astrocyty byly poměrně dlouho považovány za pasivní elementy mozku, které poskytují pouze strukturální a metabolickou podporu neuronům. Ukázalo se však, že astrocyty také podporují přežívání neuronů během vývoje a jejich maturaci, formování a funkci synapsí. Zcela nezastupitelnou funkci mají při regulaci mikroprostředí v mozku. Astrocyty exprimují K^+ a Na^+ kanály, udržují stabilní iontové složení a pH extracelulární tekutiny

(zejména ionty K^+ a Ca^{2+} - Nedergaard et al, 2003; Ruhl, 2005) a jsou hlavním zdrojem proteinů v extracelulární matrix (ECM) a producentem adhezních molekul v CNS - např. lamininu, N-cadherinu, NCAM (neural cell adhesion molecule) a fibronektinu (např. Chiu et al, 1991; Matthiessen et al, 1989; Neugebauer et al, 1988; Shea et al, 1992). Dále syntetizují a uvolňují proteolytické enzymy – zejména matrixové metaloproteinázy (MMPs), které mají důležitou úlohu v degradaci a remodelaci ECM (Muir et al, 2002; Wells et al, 1996). Astrocyty také produkují velké množství neurotrofických faktorů (De Keyser et al, 2008; Nedegaard et al, 2003), jako jsou NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), GDNF (glia-derived neurotrophic factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), glia-derived nexin (protease nexin-1), EGF (epidermal growth factor) a HGF (hepatocyte growth factor). Tyto faktory jsou esenciální pro proliferaci, přežívání a maturaci neuroblastů (Villegas et al, 2003). Jednou z hlavních funkcí astrocytů je i vychytávání neurotransmiterů uvolněných z nervových zakončení pomocí specializovaných membránových receptorů, čím se výrazně podílejí na přenosu vzruchů (Verkhratsky a Kirchhoff, 2007; Volterra a Meldolesi, 2005). Astrocyty produkují a také recyklují glutamát (Mazzanti et al, 2001) - jeho produkce se zdá být primárním mechanismem v modulaci synaptického přenosu (Kang et al, 1998) - a také kontrolují genezi, přežívání i zánik synapsí (Haydon, 2000; Ullian et al, 2001; Ullian et al, 2004). Astrocyty prostřednictvím svých výběžků, které jsou v kontaktu s cévami (vaskulární nožky) na jedné straně a s těly neuronů, axony (v místě Ranvierových zářezů) a synapsemi na straně druhé, zajišťují metabolické substráty pro neurony (Kasischke et al, 2004; Pellerin a Magistretti, 1994). A v neposlední řadě astrocyty ovlivňují vývoj a aktivitu neuronů na různých úrovních také prostřednictvím mezibuněčných kontaktů nebo humorální cestou (Környei et al, 2005). Je tedy zcela zjevné, že astrocyty představují stejně významnou a nezastupitelnou složku CNS jako neurony (Barres, 2003).

1.3.1. Reaktivní astrocyty a astroglióza

Rozsáhlé spektrum důležitých funkcí astrocytů ve zdravé nervové tkáni předurčuje jejich zapojení do reakcí vyvolaných patologickými podmínkami. V odpovědi na poškození CNS jakéhokoli typu (traumatické, ischemické, virové, nádorové, neurodegenerativní) se astrocyty stávají „reaktivní“ a dochází k rozvoji tzv. reaktivní gliózy. Spolu s aktivací astrocytů dochází obvykle i k aktivaci mikrogliie (reprezentující imunitní efektorové buňky v CNS), tedy k zánětlivé reakci v mozkové tkáni (např. Markiewicz a Lukomska, 2006).

Charakteristickým znakem reaktivních astrocytů je hypertrofie, zvýšená exprese GFAP a re-exprese nestinu a vimentinu (Clarke et al, 1994; Eliasson et al, 1999; Jing et al, 2007). Vizualizací protilátkou proti GFAP jsou výběžky reaktivních astrocytů mohutnější a početnější v porovnání s výběžky normálních astrocytů, zejména díky vytváření výrazných svazků GFAP-pozitivních gliofilament (např. Pekny a Pekna, 2004). Vzhledem k tomu, že zralé astrocyty se nedělí a v subpopulaci GFAP⁺ reaktivních astrocytů k dělení dochází (např. Sofroniew, 2005), lze předpokládat, že tyto dělící se astrocyty pocházejí z endogenních progenitorových buněk (Alonso, 2005; Buffo et al, 2005; Chen et al, 2002; Magnus et al, 2007). Avšak další studie (např. Buffo et al, 2008; Jabs et al, 1999; Miyake et al, 1992; Schiffer et al, 1993) přicházejí s hypotézou, že reaktivní astrocyty vznikají převážně transformací zralých astrocytů. Doposud se však nenašla jasná odpověď na otázku, jestli tyto reaktivní astrocyty vznikají z gliových prekursorových buněk nebo z existujících klidových („quiescent“) plasmatických astrocytů.

Z histopatologického hlediska byly v adultním CNS popsány dva typy reaktivní gliózy. Anizomorfní glióza, která se rozvíjí v bezprostřední blízkosti destruované tkáně, je tvořena gliovými elementy uspořádanými do sítě a má za následek kompletní reorganizaci postižené tkáně. Reaktivní astrocyty v této oblasti produkují chondroitin a keratin, které inhibují regeneraci axonů a tím zabraňují jejich pronikání do oblasti léze. Dále produkují i glykosaminoglykany, které se výrazně podílejí na formování gliové jizvy, která zde vzniká. Izomorfní glióza je sice spojena s progresivní demyelinizací a paralelním uspořádáním výběžků astrocytů, ale základní organizace tkáně zůstává zachována. Rozvíjí se ve větší vzdálenosti od primárně poškozené tkáně. Reaktivní astrocyty v izomorfní glióze produkují a uvolňují různé růstové faktory, např. NGF, EGF a cytokiny (např. interleukiny), které chrání neurony před smrtí. Dále syntetizují molekuly ECM a adhezivní molekuly, které podporují interakce neuron-astrocyt a napomáhají prodlužování axonů (Fawcett a Asher, 1999; Jabs et al, 1999; Ridet et al, 1997).

Reaktivní astroglióza je postupný nepřetržitý proces zahrnující progresivní změny v genové expresi i na buněčné úrovni. Vznik určitého typu gliózy i reakce astrocytů závisí především na typu a rozsahu poškození, tj. na charakteru následně aktivovaných signálních kaskád (Sofroniew, 2009). K primárním signálům, vycházejícím z poškozených buněk v centru léze, můžeme řadit neurotransmitery (glutamát, adenosintrifosfát - ATP), cytokiny, adhezivní molekuly, růstové faktory i krevní faktory (např. trombin). Rozvoj obou typů reaktivní gliózy tak závisí na aktuální kombinaci těchto signálů a jejich relativní koncentraci (Verkhatsky a Butt, 2007).

I když je již dlouho známo, že se reaktivní astrocyty objevují v odpovědi na poškození CNS různého původu, jejich funkce doposud není přesně objasněna. Přisuzují se jim však jak negativní, tak pozitivní vlastnosti. Pochopení těchto různých, někdy i protichůdných vlastností, může mimo jiné vést k novým terapeutickým strategiím u různých typů poškození CNS.

1.3.2. Intermediální filamenta v astrocytech

Cytoskelet eukaryotických buněk obsahuje 3 základní složky: aktinová filamenta, mikrotubuly a intermediální filamenta, které se podílejí na udržení tvaru buněk, lokomoci, intracelulární organizaci a transportu. IF jsou rozdělena do 6 tříd na základě homologie sekvencí a struktury genů a podle specifčnosti jejich exprese v různých typech buněk (Goldman et al, 1999). Nejpočetnější jsou cytokeratinová IF, která tvoří třídu I (kyselá IF) a II (neutrální a bazická IF) a jsou exprimována zejména v epitelových buňkách. Třída III zahrnuje vimentin, desmin, GFAP a peripherin; do třídy IV se řadí IF přítomná v nervovém systému a patří k nim neurofilamenta, nestin, α -internexin a synemin. I když se většina IF nachází v cytoplasmě, třídu V tvoří nukleární (jaderné) laminy. Do třídy VI jsou zařazena IF phakinin a filensin, která jsou exprimována výhradně v oční čočce (Eriksson et al, 2009; Merdes et al, 1993).

Všechna IF mají jednotnou strukturu, jsou tvořena centrální α -helikální doménou a nestálými C- a N- terminálními doménami, které se mohou lišit délkou i primární strukturou. Cytoskeletální IF jsou soustředěna v perinukleární oblasti, kde tvoří cytoplasmatickou síť a odtud se radiálně rozbíhají až k periférii buňky, kde jsou často ukotvena v místě mezibuněčných spojů (desmosomů a hemidesmosomů - Goldman et al, 1996; Green a Simpson, 2007; Herrmann et al, 2007; Steinert a Roop, 1988).

V nervovém systému jsou IF přítomna v neuronech a astrocytech, ale v oligodendrocytech, formujících myelinové pochvy v CNS, intermediální filamenta chybí.

Astrocyty mohou obsahovat 3 základní typy intermediálních filament: GFAP, vimentin a nestin. Jejich přítomnost/množství závisí na vývojovém stadiu astrocytů a na stupni jejich aktivace (Eliasson et al, 1999; Sultana et al, 2000). Nestin a vimentin nacházíme v gliálních prekurzorech a v nezralých astrocytech.

GFAP je jedním z hlavních IF astrocytů. Byl identifikován před čtyřiceti lety při analýze plaků pacientů s roztroušenou sklerózou (Eng et al, 1970). Velké množství tohoto proteinu v astrocytech obratlovců naznačuje jeho důležitou funkci v CNS. Výrazná exprese GFAP je charakteristická i pro radiální gliu u primátů (Levitt a Rakic, 1980) – ale ne např.

u hlodavců (Malatesta et al, 2003) – pro diferencující se astrocyty (Dahl, 1981) a reaktivní astrocyty (Eddleston a Mucke, 1993; Eng a Lee, 1995). Tyto vlastnosti podporují hypotézu, že GFAP určuje morfologii astrocytů, včetně jejich výběžků, které nasedají na stěnu krevních cév (vaskulární nožky tvořící MLGP), obklopují synapse a na piálním povrchu do sebe zapadají a tvoří MLGS. Novější studie navíc dokumentují expresi GFAP v adultních neurálních kmenových a progenitorových buňkách, i když jeho přesná funkce v těchto buňkách není zatím objasněna (např. Campbell a Götz, 2002; Doetsch et al, 1999; Malatesta et al, 2000; Noctor et al, 2001). Zájem o vlastnosti GFAP se zvýšil po odhalení, že mutace genu pro GFAP je spojená s rozvojem neurodegenerativního onemocnění – Alexandrovy choroby (např. Li et al, 2002).

Vimentin (VIM) je exprimován především v buňkách mezenchymového původu, a to v nezralých (i např. nádorových) buňkách i zralých elementech – fibroblastech/fibrocytech, buňkách hladké svaloviny stěny cév a endotelových buňkách (např. Franke et al, 1987). Byly popsány různé funkce tohoto cytoskeletálního proteinu, zejména jeho podíl na udržení stability buněčného skeletu. Exprese vimentinu v nediferencovaných buňkách během vývoje CNS a hladké svaloviny naznačuje, že může sloužit jako prvotní buněčná kostra, která je v pozdějších stádiích nahrazována specifitější sítí, např. GFAP v astrocytech, neurofilamenty v neuronech (Cochard a Paulin, 1984; Houle a Fedoroff, 1983), nebo desminem v buňkách hladké svaloviny (Fürst et al, 1989). Další studie odhalily zapojení vimentinu do mnoha důležitých buněčných procesů – např. účast na přenosu signálů, nitrobuněčném transportu, reakcích na stres, apoptóze a na regulaci pohyblivosti buněk (např. Capetanaki et al, 1989).

Nestin (NEST) byl identifikován v roce 1985 (Hockfield a McKay, 1985) a je přítomen v různých typech buněk - nejen v mitoticky aktivních progenitorových buňkách CNS a PNS, ze kterých se diferencují neurony i glie (Lendahl et al, 1990; Mujtaba et al, 1998), ale i v jiných proliferujících buňkách (aktivovaný endotel v placentě – Mokřý a Němeček, 1998), v myogenních prekurzorech kosterní a hladké svaloviny (Kachinsky et al, 1994; Mokřý a Němeček, 1998; Sejersen a Lendahl, 1993), ve vyvíjejících se zubních pupenech (Terling et al, 1995), varlatech (Fröjdman et al, 1997) a v progenitorových buňkách vlasových folikulů (Li et al, 2003; Mokřý a Němeček, 1998). Během diferenciac buněk se exprese nestinu snižuje (Lothian a Lendahl, 1997; Zimmerman et al, 1994). K jeho přechodné re-expresi dochází v reakci na poškození např. svalu, ale také CNS - detekce v reaktivních astrocytech a v ependymových buňkách (Krum a Rosenstein, 1999; Namiki a Tator, 1999; Vaitinen et al, 2001). Některé dospělé tkáně, jako CNS a kůže, navíc trvale

obsahují malé populace nestin pozitivních kmenových/progenitorových buněk (Johansson et al, 2002; Li et al, 2003). V současnosti je nestin jedním z nejčastěji používaných markerů kmenových a progenitorových buněk, které vykazují charakteristické vlastnosti jako multipotenci, schopnost sebeobnovy a regenerace. O jeho funkci však stále máme poměrně málo poznatků.

Zvýšená exprese GFAP, ale i vimentinu a nestinu je charakteristickým znakem reaktivních astrocytů. Proto pokusy s astrocyty ochuzenými o GFAP i o ostatní IF poskytují dobrou možnost studia fyziologických a patologických funkcí těchto buněk (Pekny, 2001). Řada studií, které se týkají IF v astrocytech, jim připisuje klíčovou roli při určování jejich funkčního stavu. Absence této složky cytoskeletu pravděpodobně snižuje schopnost astrocytů podílet se na akutní reakci v odpovědi na různá poškození CNS. Na druhé straně však astrocyty, které experimentálně neobsahují IF (zejména GFAP a vimentin), nebrání různým regeneračním procesům v CNS, například růstu axonů, obnově synapsí nebo dlouhodobé integraci neurálních transplantátů (Pekny a Pekna, 2004).

1.4. 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.

Nejčastěji studované zvířecí modely zahrnují kromě hlodavců a primátů i bezobratlé živočichy. Bezobratlí jako *C. elegans* a *Drosophila melanogaster* poskytují rychlé a vysoce účinné testování specifických hypotéz a nových terapeutických strategií. V nervovém systému *C. elegans* dochází k expresi CAG repeticí a k formování polyglutaminových agregátů ve svalových buňkách vyúsťující v celkové snížení motility (Brignull et al, 2006). U drosofil se poly-Q repetice exprimují v oku mouchy (Jackson et al, 1998) a i když se oko vyvíjí normálně, ve fotoreceptorech progresivně vznikají inkluze, které vedou k jejich degeneraci. Výhodou těchto modelů je krátký životní cyklus a jejich vysoká schopnost reprodukce. Avšak podrobnější studium onemocnění a vývoj terapeutických postupů vyžaduje modely komplexnější.

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 (Coyle a Schwarcz, 1976). Striatové neurony obsahují velké množství glutamátových receptorů, protože

kortikostriatální projekce využívají tyto excitační aminokyseliny jako primární neurotransmitery. Intrastriatální injekce selektivních a neselektivních glutamátových agonistů - kyseliny kainové (KA), ibotenové (IA) a chinolinové (chinolové/quolinové/quinolinové - QA) – simuluje excitotoxický proces vedoucí k buněčné smrti (Beal et al, 1986; Coyle a Schwarcz, 1976; Schwarcz et al, 1979b). 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; Brouillet et al, 1993).

Mezi nejčastěji používané neurotoxické kyseliny patří kyselina chinolinová. Přímé podání QA, endogenního agonisty NMDA (N-metyl-D-aspartátová kyselina) receptoru, vyvolá ve striatu potkana degeneraci zejména středně velkých neuronů s trny a reprodukuje některé behaviorální a biochemické vlastnosti HD. QA je endogenní metabolit vznikající v průběhu kynureninové kaskády degradace tryptofanu a její vliv na zánik neuronů je předmětem studií již dlouhou dobu. Postmortální analýza mozku pacientů s HD v počátečním stadiu onemocnění odhalila zvýšené hodnoty QA a jejího prekurzoru 3-hydroxy-kynureninu (Lafon-Cazal et al, 1993) a také oxygenázy kyseliny 3-hydroxy anthranilové (Schwarcz et al, 1988), která katalyzuje přeměnu kyseliny 3-hydroxy anthranilové na QA.

Neurotoxická léze striata replikuje i některé behaviorální projevy HD, zahrnující motorickou a kognitivní dysfunkci. Dlouhodobé změny chování byly poprvé popsány u potkanů po unilaterální i bilaterální lézi striata. U modelu unilaterální KA-léze byl zaznamenán spontánní rotační pohyb zvířat ve směru léze (ipsilaterální) již 1. den po lézi, ale 8. den po lézi se rotace obrátila ve směru kontralaterálním ke straně léze. Další abnormální (choreatické) pohyby ani dystonie se nerozvinuly (Dunnett a Iversen, 1982; Schwarcz et al, 1979a). Tento rotační pohyb potkanů byl zpočátku uváděn jako analogický k hyperkinetickému pohybu pacientů s HD. Naproti tomu, bilaterální neurotoxická striatová léze indukovala spontánní a přetrvávající noční lokomoční hyperaktivitu a kognitivní dysfunkci (Deckel et al, 1983; Isacson et al, 1984; Mason a Fibiger, 1979; Sanberg et al, 1978). Toto zjištění prokázalo, že při unilaterální lézi může intaktní strana kompenzovat některé nedostatky strany poškozené. Rozsáhlá histologická a neurochemická charakteristika QA léze ve striatu opic ve studii Ferranta a spol. (1993) potvrdila, že takto navozený neurodegenerativní proces (NDP) ve striatu dobře imituje

změny v mozku pacientů s HD, tj. zánik především středně velkých neuronů s trny a relativní zachování interneuronů a dopaminergních aferentních drah.

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 poly-Q expanzi. Druhá skupina transgenních myší exprimuje lidský htt gen s expandovaným poly-Q v plné délce. Všechny tyto modely však vykazují pouze některé rysy onemocnění shodné s nálezy u pacientů s HD. Vlastnosti transgenních myší popsali ve své práci Hickey a Chesselet (2003). První vytvořený transgenní model dostal označení R6 (Mangiarini et al, 1996). Tyto myši exprimují mutantní exon 1 lidského htt genu s délkou 141-157 CAG repeticí. Doposud bylo vytvořeno šest linií, ze kterých ale čtyři linie obsahují ještě vyšší počet CAG repeticí, než je obvyklé i u juvenilní formy HD, konkrétně R6/1 (CAG)₁₁₅, R6/2 (CAG)₁₄₅, R6/5 (CAG)₁₃₅₋₁₅₆ a R6/0 (CAG)₁₄₂ (Mangiarini et al, 1997). Další dvě linie HDex6 a HDex27 exprimují 18 CAG tripletů a slouží jako kontrola. K nástupu projevů onemocnění dochází ve věku 2 měsíců u R6/2 myši a 4-5 měsíců u linie R6/1. Nejčastěji studovaným modelem jsou R6/2 myši. Motorická dysfunkce nastupuje u těchto myší ve věku 5-6 týdnů. Dobře charakterizovaný progresivní fenotyp se projevuje snížením hmotnosti, rozvojem diabetu, třesem a křečemi. Hmotnost mozku je výrazně nižší, ale zánik neuronů je minimální a oproti nástupu behaviorálních symptomů opožděný (Davies et al, 1997; Hurlbert et al, 1999; Mangiarini et al, 1996).

Další transgenní model, N171-82Q myši, exprimuje prvních 171 aminokyselin N-terminálního fragmentu htt proteinu, nesoucího 82 CAG tripletů (Schilling et al, 1999). Behaviorální a anatomické příznaky se u tohoto modelu vyvíjejí později než u R6 myší. Vytváření YAC (yeast artificial chromosome) transgenních myší spočívá v klonování umělého kvasnicového vektoru, který vnese poly-Q repetici do myšího genomu. YAC kmeny exprimují 72 nebo 128 CAG repeticí. Oba kmeny vykazují úbytek neuronů převážně v laterálním striatu (Hodgson et al, 1999; Slow et al, 2003). YAC 72 myši mají v porovnání s wild-type (wt) kontrolami ve věku 12 měsíců nižší hmotnost o 50% a projevují výrazné krouživé pohyby i jiné pohybové abnormality, ataxii a svírání předních tlapek. YAC 128 myši vykazují ve věku 3 měsíců hyperkinetické pohyby, zatímco

po 6. měsíci se objevují náznaky hypokineze. Na podobném pozadí jako YAC kmeny vznikla i první linie transgenních potkanů (von Hörsten et al, 2003).

Knock-in myši exprimují mutantní htt gen vložený do genového lokusu kódujícího huntingtin pod kontrolou endogenního promotoru a mohou obsahovat repetici složenou ze 111, 92 (HdhQ111, HdhQ92 linie), 140 a 150 CAG tripletů (Ramaswamy et al, 2007). U těchto myší není pozorován výraznější váhový úbytek. Zvýšená motorická aktivita se objevuje u zvířat s 92 a 140 CAG triplety kolem druhého měsíce života, hypoaktivita ji vystřídá v průběhu čtvrtého měsíce v závislosti na délce repeticí. I když u knock-in myší nedochází k úbytku neuronů, ve striatu 14 měsíčních myší se 150 CAG repeticemi a 24 měsíčních zvířat se 111 CAG repeticemi byla popsána reaktivní glióza (Hickey a Chesselet, 2003; Lin et al, 2001; Menalled, 2005).

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

Nejnovější modely využívají virové vektory k přenesení lidského mhht genu do striata zdravých potkanů nebo primátů a umožňují tak inzerci mhht přímo do vybraných cílových buněk a studium efektu různého množství mhht proteinu. Vysoký počet CAG repeticí má za následek formování nukleárních a cytoplasmatických agregátů už 5 dní po injekci, což značí, že exprese samotného poly-Q je úzce propojená se vznikem inkluzí (de Almeida et al, 2002; Senut et al, 2000).

1.5. Transgenní model potkana pro Huntingtonovu chorobu

V současnosti jediný model transgenních potkanů pro HD (tgHD potkani) byl vytvořen v roce 2003 skupinou profesora von Hörstena (von Hörsten et al, 2003).

Tento model exprimuje N-terminální htt fragment s 51 CAG repeticemi. 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 (Zühlke et al, 1993).

V souladu s menší délkou CAG repeticí vykazují transgenní HD potkani z neurologického hlediska pomalu progredující fenotyp a také motorickou, kognitivní a afektivní dysfunkci (von Hörsten et al, 2003). Překvapivě, již v prvním měsíci života je pozorovatelná signifikantně snížená úzkostlivost tgHD zvířat v testu sociální interakce (Social Interaction Test), a proto v tomto věku vykazují zlepšení motorických funkcí v Accelerod Test-u. Tyto

časné změny v chování mohou ukazovat na to, že neuronální dysfunkce se patrně vyskytuje už v období jednoho měsíce po narození nebo i dříve. Významné je, že motorické funkce se postupně zhoršují a výkon významně klesá u 6 měsíčních homozygotních a 8 měsíčních heterozygotních tgHD zvířat (Nguyen et al, 2006). Tyto počáteční změny jsou ve shodě s pozorováním u transgenních myší. Redukovaná úzkostlivost byla u R6 myší pozorována již v prvním týdnu po narození (File et al, 1998; Naver et al, 2003). Podobně byl zaznamenán i průběh změn motorických funkcí u R6/2 myší (Luesse et al, 2001), HD knock-in myší (Menalled et al, 2002; Menalled et al, 2003) a YAC myší exprimujících mhht v plné délce (Hodgson et al, 1999; Slow et al, 2003). Všechny tyto modely v průběhu onemocnění vykazují přechod od hyperaktivity k hypoaktivitě, tedy změny ekvivalentní progresi choroby u člověka, manifestující se pohybovou dyskinezi na začátku a akinezi v pozdějších stadiích nemoci (Kirkwood et al, 2001). Kognitivní změny, které jsou hlavním časným symptomem HD (Jason et al, 1997; Lawrence et al, 1998), byly doposud u myších modelů popsány jen u R6/2 transgenů (Lione et al, 1999; Murphy et al, 2000). Zatímco u pacientů s HD a u tgHD myší se kognitivní dysfunkce objevila před motorickou dysfunkcí (Lawrence et al, 1998; Lione et al, 1999; Van Raamsdonk et al, 2005), u tgHD potkanů byl kognitivní deficit detekován až po nástupu motorických symptomů (Nguyen et al, 2006). Zvířata většinou vykazovala obloukovité ohýbání hlavy směrem dozadu a dyskinetické pohyby hlavou, avšak na pohled nebyly pozorovány žádné známky třesu, ataxie, sevření tlapek ani záchvatovité ataky. Behaviorální abnormality ukázaly teprve podrobné testy (von Hörsten et al, 2003). TgHD potkani se vyznačují progresivními poruchami paměti. Zpočátku se vyskytují poruchy krátkodobé paměti, později je postižená i dlouhodobá paměť (Nguyen et al, 2006), podobně jako je to u pacientů s HD, u kterých dochází v počátečních stadiích k progredujícímu zhoršení pozornosti a krátkodobé paměti (Ho et al, 2003).

Na základě výsledků magnetické rezonance osmiměsíčních homozygotních tgHD potkanů byla zaznamenána kompenzační dilatace postranních komor a ložiskové léze ve striatu. Detekce neurochemických změn prokázala kompletní úbytek kyseliny xanthurenové ve striatu a kortexu tgHD homozygotů. Naproti tomu hladina xanthurenové kyseliny byla u heterozygotních tgHD potkanů v kortexu vyšší než u kontrolních zvířat. Snížená je i koncentrace tryptofanu a dopaminu ve striatu (von Hörsten et al, 2003).

Ke zmenšení objemu striata dochází až u 12 měsíčních tgHD potkanů. V tomto věku je zaznamenán i signifikantní úbytek neuronů ve striatu, ale nebyly zjištěny žádné změny v páté kortikální vrstvě (Kántor et al, 2006). Redukce objemu striata je nejvýraznější

v mediální paraventriculární části (Kántor et al, 2006), stejně jako u pacientů s HD (Vonsattel et al, 1985).

U tgHD potkanů dochází k formování poly-Q agregátů v buněčných jádrech a v neuropilu, především ve striatu, stejně jako u HD knock-in myši (Li et al, 2000; Wheeler et al, 2000) a u pacientů s HD (DiFiglia et al, 1997). Tyto poly-Q agregáty se u tgHD potkanů objevují až po devátém měsíci života (Nguyen et al, 2006).

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).

1.6. Mitochondriální dysfunkce

Mitochondrie jsou intracelulární orgány, ve kterých probíhá velké množství biochemických pochodů zahrnujících oxidativní fosforylaci a reakce metabolismu sacharidů, proteinů, tuků a steroidů. Jsou klíčové v přísunu ATP pro energetické požadavky buněk, zajišťování homeostázy Ca^{2+} a přenos intracelulárních signálů pro apoptózu. Počet mitochondrií v buňkách a tkáních je odrazem tkáňových požadavků na energii dodávanou procesem oxidativní fosforylace. Nejvyšší požadavky mají v lidském organismu neurony a svalové buňky, proto obsahují i nejvyšší počet mitochondrií (např. Schapira, 2010).

Hlavním procesem pro získávání energie je oxidativní fosforylace. Systém oxidativní fosforylace je rozdělený do pěti podjednotkových komplexů dýchacího řetězce lokalizovaných na vnitřní mitochondriální membráně. Tyto komplexy jsou označeny jako NADH-koenzym Q-oxidoreduktáza (komplex I), sukcinát-koenzym Q-oxidoreduktáza (komplex II), ubichinon-cytochrom c-oxidoreduktáza (komplex III), cytochrom c-oxidáza (komplex IV) a ATP-syntáza (komplex V). Prostřednictvím těchto komplexů jsou přenášeny elektrony na O_2 za současného přechodu protonů z matrix do mezimembránového prostoru mitochondrie pomocí komplexů I, III a IV, čím vznikne elektrochemický gradient, jehož energie je pak využívána ATP-syntázou pro tvorbu ATP (např. Sharma et al, 2009).

Mitochondriální dysfunkce je považována za jeden z počátečních příznaků prakticky všech neurodegenerativních onemocnění, např. HD, PD, AD (Alzheimerova choroba), ALS (amyotrofická laterální skleróza), iktus a epilepsie (např. Lin a Beal, 2006). Novější

poznatky ukazují, že mitochondriální dysfunkce může sehrávat roli i u psychiatrických onemocnění, např. bipolární porucha osobnosti a deprese (např. Kato, 2006).

Vztah mezi poškozením mitochondrií a neurodegenerativním procesem u pacientů s HD mimo jiné dokládají i následující nálezy: (1) zvýšená produkce laktátu v kortexu a bazálních gangliích pacientů s HD; (2) snížený klidový poměr mezi fosfokreatinem a anorganickými fosfáty ve svalech pacientů - jeho rozpětí koreluje s délkou CAG tripletu a po námaze se zhoršuje; (3) experimentální systémová aplikace mitochondriálních toxinů vyvolává u zvířat selektivní degeneraci striatových neuronů, která je obdobného charakteru jako u HD pacientů; (4) abnormální depolarizace mitochondriální membrány v lymfoblastech pacientů s HD; (5) zhoršená aktivita komplexů II-IV dýchacího řetězce a akonitázy v bazálních gangliích HD pacientů, prokázána biochemickými studiemi a (6) přítomnost poškozených mitochondrií při ultrastrukturální studii kortikálních biopsií HD pacientů (např. Browne a Beal, 2004).

1.7. Erythropoetin

Erythropoetin (EPO) je hemopoetický růstový faktor o molekulové hmotnosti 34 kDa, který stimuluje erythropézu. EPO podporuje proliferaci a diferenciaci erytroidních progenitorových buněk a je rozhodující pro jejich přežívání. Hlavním místem produkce EPO jsou fetální játra a adultní ledviny. Myši s deficitem genů pro EPO nebo jeho receptor umírají 13. den intrauterinního vývoje v důsledku anémie způsobené poruchou definitivní erythropézy (např. Byts a Sirén, 2009).

EPO se váže na specifický receptor (EPO-R), který patří mezi cytokinové receptory s jednoduchým řetězcem. Dráha signalizace EPO je ukončena aktivací fosfatáz, které defosforylují JAK2 (Janus family tyrosine kinase 2). Komplex ligand-receptor je potom internalizován a degradován proteazomy (Yousoufian et al, 1993).

Expres EPO/EPO-R mRNA, stejně jako samotného proteinu, byla detekována v několika oblastech v mozku myši i primátů. Tyto oblasti zahrnují kortex, hipokampus a amygdalu, mozeček, hypotalamus a NC (Marti et al, 1996; Sirén et al, 2001). V *in vitro* experimentech byla zjištěna exprese EPO a jeho receptoru v neuronech, astrocytech (Bernaudin et al, 2000; Masuda et al, 1994), oligodendrocytech (Genc et al, 2006), mikrogliových (Nagai et al, 2001) a endotelových buňkách (Brines et al, 2000). Tyto nálezy ukazují na široké spektrum funkcí erythropoetinu v mozku.

Expres EPO a EPO-R v dospělém mozku je citlivá na zátěž organismu a je regulována dostupností kyslíku - hypoxie a ischemie jejich expresi zvyšují (Bernaudin et al, 1999;

Bernaudin et al, 2000; Fandrey, 2004; Lewczuk et al, 2000). Jiné stimuly jako hypoglykémie, uvolnění inzulínu, reaktivní formy kyslíku, IGF (insulin-like growth factor) aktivují hypoxií indukovatelný faktor a tak zvyšují expresi EPO (Chandel et al, 1998; Masuda et al, 1997). Prozánětlivé cytokiny snižují v astrocytech expresi EPO mRNA, ale zvyšují expresi EPO-R mRNA (Nagai et al, 2001).

Mnohé *in vitro* a *in vivo* studie ukázaly, že erythropoetin může mít neurotrofické a neuroprotektivní účinky nezávisle na zvýšení hematokritu. EPO a jeho deriváty mají přímý neuroprotektivní účinek jak na modelech buněčných kultur, tak i po přímé aplikaci do mozku (Bernaudin et al, 1999; Sadamoto et al, 1998; Sakanaka et al, 1998). Exprese EPO/EPO-R v nervových buňkách je indukována hypoxickým a ischemickým stresem a přispívá k ischemické toleranci (Bergeron et al, 2000; Bernaudin et al, 2002; Dirnagl et al, 2003; Marti et al, 2004; Masuda et al, 1994; Prass et al, 2003; Ruscher et al, 2002; Sirén et al, 2001), zatímco snížení endogenního EPO v mozku zvyšuje ischemické poškození (Sakanaka et al, 1998). Geneticky podmíněná ablace EPO-R v mozku zhoršuje neurogenezi a přežívání neuronů po mozkové mrtvici (Chen et al, 2007; Tsai et al, 2006) a naopak, zvýšená exprese EPO je spojená s redukcí rozsahu postischemického poškození, edému mozku a funkčních deficitů u akutního (ischemického) modelu mozkové mrtvice (Kilic et al, 2005).

EPO tedy indukuje široké spektrum buněčných odpovědí v mozku, nasměrovaných na ochranu a regeneraci poškozené tkáně. Základním mechanismem neuroprotektce je schopnost EPO inhibovat apoptózu v kulturách neuronů tím, že redukuje poškození DNA a asymetrii buněčné membrány (Celik et al, 2002; Kilic et al, 2005; Ruscher et al, 2002; Shingo et al, 2001; Villa et al, 2003; Wu et al, 2007). Dalším protektivním mechanismem je schopnost EPO chránit buňky před oxidačním poškozením (Solaroglu et al, 2003; Wu et al, 2007). EPO inhibuje peroxidaci lipidů zvýšením aktivity antioxidantních enzymů, například superoxid-dismutázy a glutation-peroxidázy (např. Kumral et al, 2005). EPO snižuje zánětlivou odpověď, redukuje reaktivní astroglíózu a aktivaci mikroglie a inhibuje přesun buněk imunitního systému do místa poškození (např. Agnello et al, 2002; Villa et al, 2007; Zhang et al, 2005). V kulturách cerebrovaskulárních endotelových buněk EPO snižuje TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) a indukovanou expresi genů pro IL-6 (interleukin-6), IL-1 β , CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) a IL-1 α (Avasarala a Konduru, 2005). Erythropoetin chrání integritu cév a stimuluje angiogenezi (Jaquet et al, 2002; Ribatti et al, 2003; Wang L et al, 2004). EPO podporuje diferenciaci neuroblastů, jak v kulturách neurálních kmenových buněk pocházejících z embryonálních i adultních

neurogenních zón, tak v kulturách embryonálních neurálních progenitorových buněk (Chen et al, 2007; Lipton, 2004; Shingo et al, 2001; Tabira et al, 1995). Zvyšuje i proliferaci progenitorů oligodendrocytů a podporuje jejich diferenciaci *in vitro* (Nagai et al, 2001; Sugawa et al, 2002).

První studie účinku erythropoetinu u akutního ischemického poškození mozku u lidí dokazuje, že vysoké dávky intravenózně aplikovaného EPO jsou nejen dobře tolerované, ale mají za následek klinické zlepšení už po 30-ti dnech léčby (Ehrenreich et al, 2002). Povzbudivé výsledky prokazující neuroprotektivní vlastnosti EPO byly nedávno dosaženy i v dalších klinických pilotních studiích týkajících se léčby sekundární periferní neuropatie (Hassan et al, 2003), chronické schizofrenie a roztroušené sklerózy (Ehrenreich et al, 2007).

V současné době je erythropoetin prominentní součástí seznamu hemopoetických a angiogenetických faktorů, které jsou exprimovány v CNS a mají protektivní funkci, čím se řadí mezi slibné kandidáty pro terapeutické využití u onemocnění CNS.

2. CÍLE STUDIE

- 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 potkanů v porovnání s kontrolními zvířaty) vzhledem k předpokládané participaci mitochondriální dysfunkce v patogenezi HD.
- Kvantitativní (stereologická) analýza (program Ellipse) rozvoje reaktivní astroglie u jednotlivých skupin tgHD potkanů v porovnání s kontrolními zvířaty.
- Sledování bezprostředního účinku erythropoetinu na rozvoj degenerativního procesu ve striatu fenotypu HD u potkanů s neurotoxickou (QA) lézí (pomocí histologických, imunohistochemických a imunofluorescenčních technik, Western Blot analýzy, behaviorálního testování zvířat a vyšetření krevního obrazu).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Laboratorně připravovaná fixativa, roztoky, pufrы

4% neutrální formaldehyd – základní fixační roztok

- originální (40%) roztok formaldehydu se naředí „pramenitou“ vodou v poměru 1:9, roztok se neutralizuje přidáním CaCO₃ a uchovává se v tmavé láhvi.

4% paraformaldehyd – pro kryostatové řezy

- 4 g paraformaldehydu se rozpustí ve 100 ml PBS nebo PB pufru zahřátého na 60 °C. Do roztoku se přidá pár kapek 4M NaOH a konečný roztok se přefiltruje.

Koncentrovaný roztok sacharózy - pro kryoprezervaci

- 5 g sacharózy rozpuštěné ve 25 ml destilované vody se doplní 25 ml 0,2M PB (10% sacharóza); 10 g sacharózy rozpuštěné ve 25 ml destilované vody se doplní 25 ml 0,2M PB (20% sacharóza); 15 g sacharózy rozpuštěné ve 25 ml destilované vody se doplní 25 ml 0,2M PB (30% sacharóza).

Cytoskeletální extrakční pufr – pro WB analýzu GFAP

- 75 mM Tris, 0.9 M NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 2 mM CaCl₂, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.5% SDS, 0.5% deoxycholát; pH pufru se upraví na 7,4.

Respirační médium MiRO5 – pro oxygrafické měření

- 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 60 mM K-laktobionát, 20 mM taurin, 20 mM HEPES, 110 mM sacharóza, 1 g/l BSA (FFA); pH = 7,4.

3.2. Laboratorní zvířata

3.2.1. Potkani pro QA lézi a kontroly

K experimentům byli použiti bílí laboratorní potkani - samci kmene Wistar (o váze 220-240 g na začátku pokusu; BioTest Konárovice, ČR). Zvířata byla chována ve viváriu LF v Hradci Králové za standardních laboratorních podmínek (klimatizovaný vzduch, teplota 15-21°C, vlhkost 50-60% a 12 hodinový cyklus světla a tmy), denní limit potravy (standard) byl 25-28 g na potkana a tekutiny ad libitum. Zvířata byla po operaci chována v samostatných klecích, po měsíci byla seskupena do klecí po maximálně 4 zvířatech (podle skupin). Váha potkanů byla orientačně kontrolována před operací, před aplikací BrdU a před ukončením pokusu.

Zvířata byla usmrcena za 3, 6-7, 14 a 28 dní, 3, 6, 9 a 12 měsíců po aplikaci neurotoxické kyseliny.

3.2.2. Potkani transgenní pro Huntingtonovu chorobu a kontroly

Byli použiti homozygotní potkani transgenní pro HD a jejich homozygotní wt kontroly (na pozadí kmene Sprague-Dawley, 51 CAG repeticí na N-terminálním fragmentu htt). Množení i genotypizace potkanů byly provedeny dodavatelem (Nguyen HP a Riess O, Ústav lékařské genetiky, Univerzita v Tübingenu, Německo). Zvířata byla přivezena cca 2-4 týdny po genotypizaci (AnLab, Praha, ČR). Chovné podmínky ve viváriu LF-HK byly stejné jako pro potkany kmene Wistar.

Zvířata byla odebírána (usmrcena) ve věku 2, 6, 12, 18 a 22-24 měsíců.

3.3. 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.

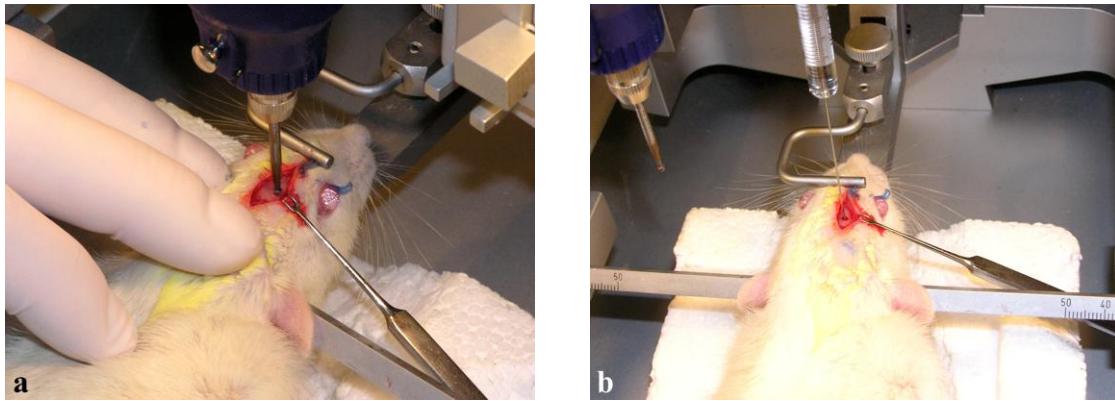
Operační zákroky byly prováděny neurochirurgem v operační místnosti vivária LF-HK za polosterilních podmínek.

3.3.1. Anestézie

Anestézie zvířat byla provedena i.m. aplikací kombinace ketaminu (Narketan 10% inj., Vétoquinol S.A., Francie; 100 mg/kg) a xylazinu (Xylazin 2% inj., Bioveta, ČR; 16 mg/kg).

3.3.2. Neurotoxická a kontrolní léze

Neurotoxická léze byla navozena intrastriatovou injekcí 2x1 μ l kyseliny chinolinové (QA; Sigma-Aldrich, ČR; 17 μ g/2 ml aqua pro inj.) do pravé hemisféry (obr. 3A, B) do dvou míst (etáží) z jednoho vpichu s použitím následujících koordinát: A 1.2; L 2.5; V 5.0 a 4.5 od bregmatu (A – anterior, P – posterior, V – ventralis; koordináty jsou uváděny v mm); linie zubů = 0. Aplikace byla provedena pomocí stereotaktického přístroje (Koppf, New York, USA) použitím automatického dávkovače Syringe Pump SP310 (World Precision Instruments, Německo). Zvířatům s kontrolní lézí (sham-lesioned/sham-L) byl do striata aplikován fyziologický roztok (2x1 μ l).



Obr. 3. (A) Detail návrtu kalvy a (B) injekční aplikace QA do striata v pravé hemisféře.

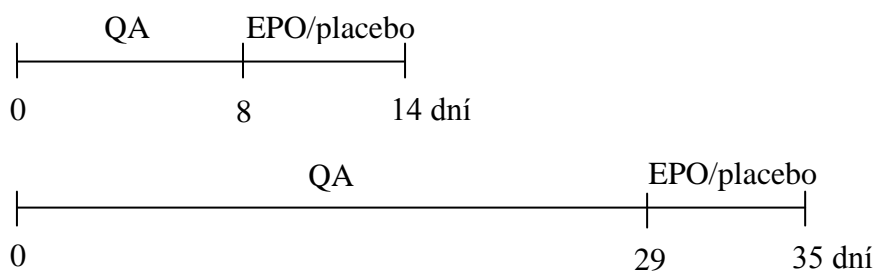
3.3.3. Aplikace bromodeoxyuridinu

Bromodeoxyuridin (BrdU; Sigma-Aldrich, ČR) byl rozpouštěn v aqua pro inj. na koncentraci 120 mg/kg nebo 50 mg/kg v termostatu při 60°C (aby bylo dosaženo jeho úplného rozpuštění), maximálně půl dne před podáním a až do aplikace uchováván při 37-40°C. Potkanům byl aplikován i.p. v několika schématech podle zaměření pokusu:

- a) 120 mg/kg 15 a 3 hodiny před ukončením pokusu
- b) 120 mg/kg 66, 42 a 15 hodin před ukončením pokusu
- c) 120 mg/kg 0.–3. den pokusu a pak 48 a 24 hodin před ukončením pokusu
- d) 50 mg/kg 13 dní po vytvoření neurotoxické QA léze a u zvířat přežívajících 35 dní navíc 29.–34. den pokusu - u zvířat ze skupiny EPO/placebo.

3.3.4. Aplikace erythropoetinu

RhEPO (rekombinantní lidský erythropoetin; EPREX, Janssen-Cilag, ČR) byl aplikován i.p. v dávce 3000 IU/kg, 1x denně po dobu 6 dní. Paralelně s aplikací rhEPO bylo kontrolní skupině 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 (obr. 4).



Obr. 4. Schéma podávání rhEPO/placebo v pilotní studii pro sledování okamžitého účinku EPO na rozvoj NDP ve striatu při aplikaci v akutní a chronické fázi NDP.

3.3.5. 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 pomocí Brain Blockeru (Better Hospital Equipment Corp., New York, USA) do identických tkáňových bloků určených pro další zpracování (po odkrojení 3 mm čelních laloků byl přikrojen vlastní blok tkáně o tloušťce 4 mm).

3.4. Histologické zpracování pro světelnou mikroskopii

3.4.1. Parafínové řezy

Tkáňové bloky byly imerzně dofixovány ještě 3 dny (ve 4% neutrálním formaldehydu) při pokojové teplotě. U transgenních potkanů i jejich wt kontrol byly navíc odděleny hemisféry (tedy každá hemisféra byla zpracovaná samostatně). Tkáň byla potom odvodněna vzestupnou alkoholovou řadou, projasněna xylenem a zalita do parafínu. Z parafínových bločků byly nakrájeny sériové frontální řezy o tloušťce 7 μm , které byly lepeny na podložní sklo pomocí kamencové želatiny. Po odparafínování a zavodnění byl každý 15. řez standardně obarven hematoxylinem a eosinem. Obarvené řezy byly opět dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou, projasněny xylenem a montovány do montovacího média (Klinipath b.v., Holandsko).

3.4.2. 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 10% roztoku sacharózy 2 hodiny, poté ve 20% sacharóze 3 hodiny a nakonec ve 30% sacharóze přes noc (resp. dokud tkáňový blok neklesl ke dnu nádobky). Postfixace i kryoprezervace probíhala v lednici při 4°C. Na kryostatu pak byly krájeny sériové řezy o tloušťce 8 μm a lepeny na APES-ová skla.

3.5. Imunohistochemie a imunofluorescence

Byla provedena imunohistochemická analýza vybraných protilátek jak na parafínových řezech, tak i na řezech kryostatových, které však byly používány jen výjimečně. Parafínové řezy byly odparafínovány a zavodněny sestupnou alkoholovou řadou. Použití některých protilátek vyžadovalo ještě speciální předpřípravu řezů:

- pro detekci polyglutaminu byla použita 98% kyselina mravenčí (5 minut při pokojové teplotě) - aby se rozpustily amyloidní fibrily a došlo tak k maximálnímu odhalení epitopů
- pro detekci BrdU byla nezbytná hydrolýza DNA inkubací s 2N HCl po dobu 30 min při 4°C
- pro detekci CNP-ázy byly řezy natráveny 0,1% pepsinem v roztoku 0,1 N HCl - 30 minut při 37°C
- většina detekcí ještě vyžadovala následné ošetření řezů v mikrovlnné troubě 3x 5 minut při 800W v citrátovém pufru (pH 6,0) pro odhalení epitopů. Po vychladnutí byly řezy opláchnuty v destilované vodě a v PBS.

Všechny řezy byly inkubovány 3x10 minut v roztoku 0,2% H₂O₂ pro redukci aktivity endogenní peroxidázy. Po dalším oplachu v PBS pufru bylo na řezy aplikováno neimunní oslí sérum (pro potlačení nespecifické vazby protilátek) na dobu 20 minut při pokojové teplotě. Bez oplachu byla přidána primární protilátka (*viz* 3.5.1.) a řezy byly inkubovány přes noc ve vlhké komůrce v lednici (při 4°C). Druhý den byly řezy opláchnuty 3x 5 minut v PBS a dalších 45 minut inkubovány s odpovídající sekundární protilátkou (*viz* 3.5.2.) při pokojové teplotě. Po dalším oplachu v PBS pufru byly řezy inkubovány se streptavidinem konjugovaném s křenovou peroxidázou (ředení 1:300) po dobu 45 minut při pokojové teplotě. Místo vazby peroxidázy bylo po oplachu v PBS vizualizováno tetrachloridem diaminobenzidinu (DAB) 5 až 15 minut za kontroly ve světelném mikroskopu. Po oplachu v destilované vodě následovalo ještě zvýraznění 3% roztokem modré skalice, další oplach v destilované vodě a dobarvení řezů 0,1% metylovou zelení nebo Gilloým hematoxylinem, dehydratace a zamontování do montovacího média (Klinipath b.v., Holandsko).

Pro imunofluorescenci jsme použili dvoustupňovou nebo třístupňovou sekvenční metodu, kdy fluorochrom Cy3 nebo Alexa 488 byly navázány na sekundární protilátku nebo na streptavidin. Jádra byla dobarvena 4',6-diamidino-2-phenylindolem (DAPI). Řezy byly zamontovány do montovacího média DAPCO (Sigma-Aldrich, ČR).

3.5.1. Použité primární protilátky

3.5.1.1. Monoklonální protilátky

Seznam použitých primárních monoklonálních protilátek je uvedený v tabulce 1.

Tab. 1. *Přehled primárních monoklonálních protilátek*

protilátka	klon	hostitel	ředení	výrobce/dodavatel
AIF1	1022-5	myš	1:40	Acris Antibodies
BrdU	Bu20a	myš	1:100	Dako
β -III-tubulin	TU-20	myš	1:20	Exbio
CNP-ase	11-5B	myš	1:500	Sigma-Aldrich
GFAP	G-A-5	myš	1:400	Sigma-Aldrich
MAP2	HM-2	myš	1:500	Sigma-Aldrich
NCAM	5B8	myš	1:4	DSHB
NeuN	A60	myš	1:50	Chemicon
nestin	10C2	myš	1:200	Chemicon
nestin	RAT-401	potkan	1:4	DSHB
PCNA	PC-10	myš	1:20	CRC Lab. Univ.
polyglutamine	5TF1-1C2	myš	1:20000	Chemicon
synaptophysin	SY38	myš	1:20	Dako
vimentin	V9	myš	1:100	Sigma-Aldrich
vimentin (konjugovaný s Cy3)	V9	myš	1:100	Sigma-Aldrich

3.5.1.2. Polyklonální protilátky

Seznam použitých primárních polyklonálních protilátek je uvedený v tabulce 2.

Tab. 2. *Přehled primárních polyklonálních protilátek*

protilátka	hostitel	ředení	výrobce/dodavatel
BrdU	ovce	1:50	Abcam
GFAP	králík	1:400	Dako
MAP2	králík	1:700	Chemicon
S100 β	králík	1:300	Dako
vimentin	koza	1:20	Chemicon
NG2	králík	1:200	Chemicon

3.5.2. Použité sekundární protilátky

Seznam použitých sekundárních protilátek je uvedený v tabulce 3.

Tab. 3. *Přehled sekundárních protilátek*

protilátka (konjugát)	hostitel	ředení	výrobce/dodavatel
anti-kozí (biotin)	osel	1:1000	Jackson ImmunoRes. Lab.
anti-králičí (biotin)	osel	1:500	Jackson ImmunoRes. Lab.
anti-myší (biotin)	osel	1:500	Jackson ImmunoRes. Lab.
anti-potkaní (peroxidáza)	koza	1:1000	Pierce Biotechnology
anti-kozí (Alexa 488)	kuře	1:250	Molecular Probes
anti-kozí (Alexa 488)	osel	1:250	Invitrogen
anti-králičí (Alexa 488)	koza	1:250	Invitrogen
anti-myší (Alexa 488)	koza	1:250	Molecular Probes
anti-myší (Cy3)	osel	1:250	Jackson ImmunoRes. Lab.

3.6. Fotodokumentace

Digitální mikrofotografie z histologických a imunohistochemických řezů byly zhotoveny na mikroskopu BX-51 (Olympus, ČR) pomocí softwaru Cybernetics, verze 4.51 (Laboratory Imaging, Praha, ČR).

Pro digitální mikrofotografie z fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E400 byl použit software Lucia G/F, verze 4.82 (Laboratory Imaging, Praha, ČR).

Přehledové digitální mikrofotografie řezů mozem byly získány na stereomikroskopu Olympus SZX9 s použitím horního studeného světla KL 1500 LCD Olympus softwarem Quick Photo Micro (Olympus, ČR).

Snímky byly podle potřeby upraveny (pouze jejich jas a kontrast) v programu Corel Photo-Paint X3 (Corel Corp., Ontario, Kanada).

V obrazové dokumentaci jsou mikrofotografie seskupeny v tematické celky (pro snadné porovnávání změn, popisovaných u jednotlivých skupin zvířat), ne podle pořadí, ve kterém se objevují v textu.

3.7. 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.

3.8. Odběr krve

Krev pro kompletní hematologické vyšetření byla odebírána skleněnou kapilárou z retroorbitálních sinusů ve vnitřním koutku oka potkanů. Krevní rozbor byl proveden na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

3.9. Western Blot

K semikvantitativnímu hodnocení obsahu GFAP ve striatu po aplikaci rhEPO nebo placebo jsme použili Western Blot (WB) analýzu, která byla prováděna ve spolupráci s Ústavem farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

U zvířat usmrcených exsanguinací byly z vyjmutých mozků nejprve odkrojeny 3 mm z čelních laloků a pak přikrojen 5 mm blok tkáně. Hemisféry byly odděleny od sebe a z každé bylo vypreparováno celé striatum. Tkáň striata jsme zhomogenizovali v chlazeném cytoskeletálním extrakčním pufru. Následovala extrakce proteinů a měření jejich koncentrace Löwryho metodou. Homogenáty byly potom inkubovány 30 minut při pokojové teplotě se vzorkovým pufrem. Proteiny byly separovány pomocí gelové elektroforézy (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) na 11% polyakrylamidových gelech. Proteiny byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu, která pak byla inkubována 1 hodinu s Chemiblockerem (Chemicon, ČR) pro zablokování nespecifických vazebných míst. Následně byla membrána inkubována 1 hodinu s anti-GFAP (ředení 1:200) při pokojové teplotě a pak se sekundární protilátkou (ředení 1:7000). Navázaná protilátka byla vizualizována chemiluminiscenčně s následnou expozicí filmu. Získaný obraz byl naskenován do počítače (ScanMaker i900, UMAX, Praha, ČR) a vyhodnocen za použití softwaru QuantityOne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

3.10. Mitochondriální respirace

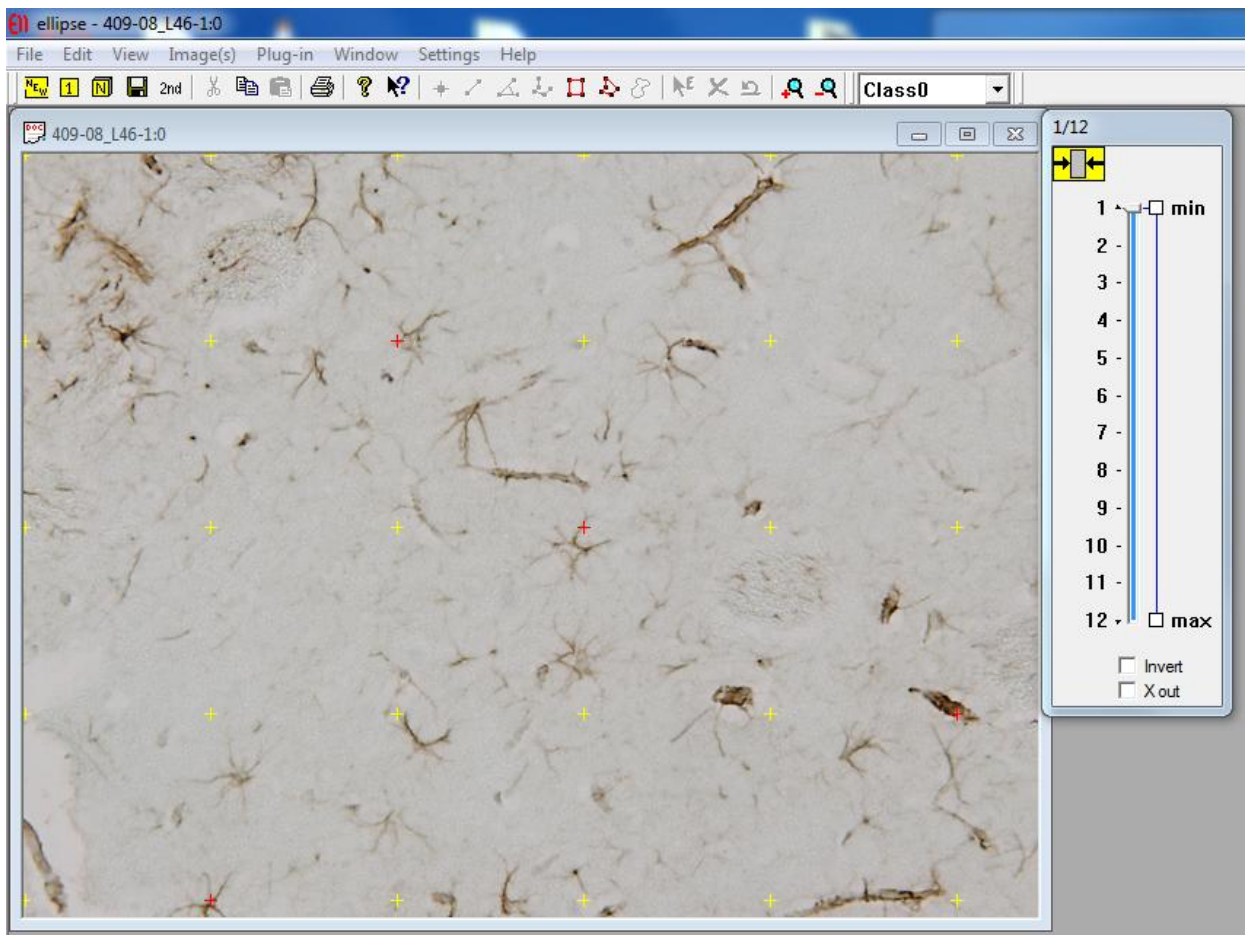
Aktivitu enzymových komplexů dýchacího řetězce jsme hodnotili pomocí respirometrie. Principem této metody je měření úbytku kyslíku v uzavřené komůrce v důsledku spotřeby O₂ biologickým materiálem. K měření jsme využili oxygraf Oroboros-2k (Rakousko). Měření bylo prováděno na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Mozky potkanů usmrcených exsanguinací byly zpracovány stejným postupem jako pro WB analýzu (viz 3.9.). Vypreparovaná striata jsme zhomogenizovali v médiu MiRO5

pístovým homogenizátorem na ledu na 50% homogenát. Při hodnocení aktivity respiračních komplexů I a II jsme do komůrky, temperované na 37°C, napipetovali 2,1 ml média MiRO5 a 50 µl homogenátu mozku a komůrku jsme uzavřeli titanovým uzávěrem. Signál jsme nechali ustálit a přes kapiláru uzávěru jsme přidali respirační substráty a inhibitory. Nejprve jsme přidali substráty oxidované NADH-dependentními dehydrogenázami - malát (2,5 mM) + glutamát (10 mM) - které předávají elektrony na respirační komplex I. ATP-syntázu jsme aktivovali pomocí ADP (1 mM) a hodnotili jsme index respirační kontroly. Přídavek cytochromu c (20 µM) sloužil k hodnocení integrity mitochondriálních membrán. Komplex I jsme následně inhibovali rotenem (1 µM) a pak jsme přidali substrát pro komplex II (10 mM sukcinátu). Při hodnocení funkce cytochrom c-oxidázy (COX) jsme do komůrky ke 2,1 ml média MiRO5 napipetovali 10 µl homogenátu a po uzavření komůrky jsme přidali cytochrom c (20 µM), askorbát (5 mM) a tetramethylfenylendiamin (TMPD - 1 mM). Data byla zpracována pomocí softwaru Datlab 3 a Datlab 4 (OROBOROS, Rakousko). Od spotřeby kyslíku COX byla odečtena autooxidace askorbátu a TMPD. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako spotřeba kyslíku za jednotku času na množství biologického materiálu ($\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinu).

3.11. Stereologická analýza digitalizovaného obrazu

Pokusili jsme se aplikovat morfometrické principy pro odhad celkové denzity GFAP ve striatu. Imunohistochemické barvení anti-GFAP jsme kvantifikovali pomocí programu Ellipse 2D (ViDiTo, Košice, SR). Z každé série řezů, nakrájených z mozku tgHD potkanů a jejich wt kontrol, jsme vybrali 10 řezů (vzdálenost mezi hodnocenými řezy byla 70 µm) a provedli jsme imunohistochemickou detekci GFAP. Digitální mikrofotografie striata byly pořízeny standardním způsobem (viz 3.6.) při zvětšení 20x. Velikost plochy imunohistochemického barvení ve striatu byla hodnocena pomocí bodové testovací sondy (testovací mřížky). Princip kvantifikace je demonstrován na obr. 5. 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 (Nachtigal et al, 2002). Plocha pozitivního GFAP barvení je pak vyjádřena v mm^2 .



Obr. 5. Princip kvantifikace GFAP ve striatu. Průsečníky barvení a testovací mřížky jsou vyznačeny červeně.

3.12. Statistické hodnocení

Statistické hodnocení bylo provedeno použitím softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA). Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka průměru (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.

4. VÝSLEDKY

4.1. Experimentální modely Huntingtonovy choroby

4.1.1. Neurotoxická (QA) léze

Neurodegenerativní proces ve striatu je hlavním morfologickým znakem HD. Morfologické změny při NDP jsou u QA lézí charakterizovány zejména rychlým rozvojem degenerace většiny striatových neuronů a následné reaktivní gliózy. Degenerace neuronů, zejména jejich dendritů, se významně podílí na redukci neuropilu. Rozvoj těchto změn postupuje přibližně koncentricky od místa vpichu jehly při aplikaci QA směrem na periferii striata (tedy vzhledem ke struktuře striata více laterálně než mediálně), proto intenzita poškození není homogenní. V oblasti kanálu vpichu (KV) se rozvíjí totální nekróza. 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. 4.2.1.). Typický NDP se rozvíjí především laterálně od centra QA léze, proto je tato oblast zvolena za základní nejen při porovnávání jednotlivých věkových skupin po QA lézi, ale i pro porovnání se skupinou transgenních potkanů. Centrální část léze (kromě oblasti KV) ale poskytuje možnost studia celé škály změn, především ve vztahu k rozvoji akutní reaktivní gliózy. Proto při popisu akutní fáze NDP v QA lézi věnujeme pozornost i této oblasti. I když se v NDP postiženém striatu rozvíjí výrazná reparativní glióza, tyto astrocyty nestačí nahradit úbytek šedé hmoty a dochází tak k atrofii striata kompenzované rozšiřováním laterálních mozkových komor. Stupeň dilatace komor odpovídá jak závažnosti poškození, tak i stadiu NDP.

Do akutní fáze NDP jsme zahrnuli rozvoj změn v mozku dospělých potkanů za 3, 6-7, 14 dní a 1 měsíc po aplikaci QA. Masivní neurodegenerace, provázená reakcí gliové složky parenchymu (v této časné fázi zejména astrocytů) se začíná rozvíjet zhruba po 2 dnech a maxima dosahuje 6.-8. den. Pak se rozvoj NDP zpomaluje, ale přibližně do konce 1. měsíce má ještě charakter akutního poškození striata (obr. 6a). Následně pak přechází do chronického stadia. Chronické stadium NDP, opět především se zaměřením na reaktivní gliózu, jsme hodnotili za 3, 6, 9 a 12 měsíců po QA lézi (obr. 6b, 6c).



Obr. 6. Po intrastriatové aplikaci QA do pravé hemisféry se ve striatu rozvíjí NDP, který vede k jeho atrofii, kompenzované dilatací ipsilaterální postranní mozkové komory. Rozšíření komory v porovnání s kontralaterální intaktní hemisférou je dobře patrné již (a) za 14 dní. Rozsah dilatace odpovídá závažnosti poškození, tedy progresi NDP ve striatu, jak vidíme za (b) 3 měsíce a (c) 6 měsíců po QA lézi. **H&E**; měřítko 1,5 mm.

4.1.1.1. Akutní fáze neurodegenerativního procesu u QA léze

Tři dny po QA lézi jsme již zaznamenali výraznou degeneraci neuronů v centrální oblasti léze. K jejich detekci jsme kromě H&E a Bodianovy impregnace neurofilament použili škálu neuronálních markerů detekujících jednak jádra neuronů (anti-NeuN), jednak neurofilamenta v cytoplasmě (těl i výběžků) – anti- β -III-tubulin a anti-MAP2 – i synapse v neuropilu (anti-Synaptophysin). Všechny uvedené markery (kromě anti-Synaptophysinu) nám potvrdily vymizení neuronů v centrální části QA léze a jejich postupnou degeneraci směrem k periférii, tedy rozvíjející se NDP ve striatu. Detekce synaptophysinu ukázala, že hustota synapsí v neuropilu se redukuje jen pozvolna (částečně i proto, že jejich denzita je v normálním striatu tak vysoká, že mírný úbytek většinou ani nelze postřehnout). Charakteristické změny v jádrech degenerujících hyperchromních (tzv. denzních) neuronů (karyorexi až karyolýzu) na začátku rozvoje NDP v porovnání s kontrolními zvířaty prokázala především detekce NeuN. U sham-operovaných potkanů došlo k degeneraci neuronů pouze v oblasti bezprostředně kolem KV.

Ke znázornění ostatních elementů, především astrocytů, jsme použili detekci (zejména imunofluorescenční) tří intermediálních filament – nestinu, jako markeru neurálních kmenových/progenitorových buněk (NKB/NPB), ale i aktivovaného endotelu cév, vimentinu, který je typický pro nezralé/aktivované astrocytární buňky, endotel a zejména hladkou svalovinu cév, a GFAP především k detekci reaktivních astrocytů – a dále S100 β proteinu, který je exprimován většinou GFAP⁺ i GFAP⁻ astrocytů, ale (jak prokázaly naše nálezy) lze pomocí něho také prokázat postupné vyzrávání/stárnutí těchto astrocytů.

Ve striatu, poškozeném rozvíjejícím se NDP, byl také přítomen značný počet relativně velkých BrdU⁺ jader, značících výraznou proliferaci buněk (obr. 12a). BrdU je analog tymidinu, který se zabudovává do DNA dělicích se buněk v průběhu S-fáze. Výraznou proliferální aktivitu dokumentovala i detekce PCNA (proliferating cell nuclear antigen), který je akumulován v jádře dělicích se buněk na konci G₁ a na začátku S-fáze, tedy ještě před replikací DNA, a jeho koncentrace se v průběhu G₂ a M-fáze snižuje. Překvapivě, jen zcela ojediněle BrdU⁺ buňky exprimovaly také nestin, vimentin nebo GFAP (obr. 13a, 13b). Část BrdU⁺ (PCNA⁺) buněk v centru léze (především kolem KV) představují fagocyty, tedy mikroglie a makrofágy, k jejichž aktivaci dochází v důsledku zánětlivé reakce spojené s aplikací QA. Kromě použití specifického markeru anti-AIF1 lze tyto elementy do jisté míry odlišit i podle jejich typické morfologie, to znamená podle poměrně objemného těla s obsahem vakuolizované cytoplazmy (v důsledku akumulace fagocytovaných částic) – (obr. 14). Mikroglie se aktivuje z rezidentní/neaktivní formy těchto buněk, zatímco makrofágy vycestovávají z krevního řečiště (monocyty) a mění se v tkáňové fagocyty (histiocyty), jak (mimo jiné) dokumentuje i jejich typická lokalizace v blízkosti cév.

Nestin⁺ buněk byl ve třídení QA lézi poměrně značný počet, zejména kolem centrální oblasti léze (obr. 15a), avšak rychle se snižoval směrem k periférii, kde nestin-pozitivní byly v podstatě pouze vaskulární nožky reaktivních astrocytů, které svým koncovým rozšířením vyznačují stěnu cév (a vytvářejí tak MLGP), ale navíc i aktivovaný endotel v cévách (obr. 15b). Naproti tomu v intaktním striatu kontrolních zvířat jsme expresi nestinu nezaznamenali vůbec, tedy ani v astrocytech, ani v endotelu (obr. 15c). Převážná většina nestin⁺ buněk měla charakter typických reaktivních astrocytů s četnými větvenými výběžky (obr. 17f), z nichž (jako vždy) byly nejmohutnější vaskulární nožky, zakotvené na stěně cév (obr. 17e, 17c, resp. 15a, 17a, 17b). Charakteristická byla ale i přítomnost nestinu v endotelových buňkách všech cév (obr. 16a) nejen v celé oblasti zasažené NDP (obr. 15a), ale i v periferních částech striga (obr. 15b), kde ještě nebyl patrný ani typický zánik

neuronů, ani reaktivní glióza (GFAP⁺ astrocyty), což svědčí pro jeho aktivaci v reakci na intenzivní poškození (QA léze) v téměř celém striatu. Na rozdíl od intaktních kontrol, kde byl endotel ve všech cévách nestin-negativní (obr. 15c).

V centru léze měla většina elementů charakter nezralých gliových buněk (glioblastů) s malým počtem krátkých výběžků (výjimečně i apolárních), které byly převážně pouze VIM⁺ (obr. 18b, 18c). Vimentin exprimují také buňky endotelu a hladké svaloviny (v tunica media) stěny cév, ale (na rozdíl od exprese nestinu) nejen v oblasti striatové léze (obr. 16b), ale standardně ve všech cévách, tedy i v intaktním striatu (obr. 16c). To znamená, že exprese VIM v endotelových buňkách nesignalizuje jejich aktivaci, resp. neovaskularizaci, ale jde o standardní přítomnost tohoto IF v endotelu.

Zajímavé nálezy jsme dostali při detekci NG2-glie. Zejména v oblasti centra léze dochází k aktivaci těchto buněk, avšak jen v poměrně malém počtu. Výrazně NG2⁺ buňky postupně získávají typickou charakteristiku reaktivních astrocytů (porovnej obr. 11a, 11b a 11c, 11d).

Nestin⁺ reaktivní astrocyty byly seskupeny zejména kolem centra léze (obr. 17a, příp. 15a) a koexpresi s vimentinem (obr. 17b, 17e, 17f) nebo s GFAP (obr. 15a) většinou vykazovaly spíše směrem do periferie rozšiřujícího se neurodegenerativního poškození striata. Některé z těchto reaktivních astrocytů již výrazně zvětšily svůj objem i množství IF (zejména vimentinu a GFAP) v cytoplasmě, a proto je označujeme jako hypertrofické reaktivní astrocyty (obr. 17d, 17f, 18a).

Použití protilátky proti S100β proteinu je dalším způsobem detekce astrocytů. S100β pozitivitu vykazovala hlavně jádra a cytoplasma v tělech astrocytů, ale jen minimálně ve výběžcích. V porovnání se striatem intaktních zvířat (obr. 19a) jsme však zvýšení exprese S100β zaznamenali pouze v centru léze a blízkém okolí – tyto buňky byly buď pouze S100β⁺ a měly charakter astroblastů (obr. 19b) nebo VIM⁺/S100β⁺ (obr. 19c) - přestože přítomnost značného počtu reaktivních GFAP⁺ astrocytů jasně dokazovala rozvoj NDP (obr. 19b). Jak VIM⁺/S100β⁺ (obr. 19c), tak GFAP⁺/S100β⁺ (obr. 19b) reaktivní astrocyty se vyskytovaly především v blízkosti cév.

Šestý až sedmý den po QA lézi je postupně se rozvíjející atrofie striata již natolik výrazná, že je dobře patrné kompenzační rozšíření ipsilaterální mozkové komory. Detekce NeuN⁺ (hematoxylin⁺) jader neuronů (obr. 20a, 20b) prokázala postupný zánik většiny neuronů v NDP postiženém striatu a pokračující propagaci tohoto procesu zejména laterálně (obr. 20c). V blízkosti hranice s normální tkání striata je vždy v degenerujícím parenchymu ještě

část neuronů zachována, i když řada z nich již vykazuje známky degenerace různého stupně (obr. 20c). I přes zánik většiny neuronů v oblasti rozvíjejícího se NDP (zejména laterálně od KV), který zasáhl již více než polovinu objemu striata, se zatím neobjevují typické změny v integritě neuropilu (detekce neurofilament především impregnací podle Bodiana – obr. 7c, 7d). Změny týkající se neuronů, astrocytů i cév, které jsme popsali u tří denní QA léze, se v souvislosti s rychle se rozvíjejícím NDP ve striatu výrazně prohlubují.

Část BrdU⁺ buněčných jader již měla o něco menší velikost a především sníženou pozitivitu BrdU (obr. 12b), resp. tato jádra stále více vázala DAPI, a to zejména v blízkosti centra léze (obr. 21a, 21b). To dokládá další dělení a vyžívání BrdU⁺ buněk. Ani v tomto stadiu jsme však nenašli větší počet BrdU⁺/NEST⁺ (obr. 21a, 21b) nebo BrdU⁺/GFAP⁺ buněk, tedy důkaz diferenciaci nově generovaných buněk v astrocyty. V podstatě stejné změny (i když méně vyhraněné) bylo možné vidět i při detekci PCNA (obr. 21c) v porovnání se stejně starými kontrolními zvířaty (obr. 9e). Intenzita proliferace byla v této skupině nejvyšší ze všech sledovaných skupin.

NG2⁺ buňky velmi pozvolna získávají charakter hypertrofických reaktivních astrocytů a překvapivě, jejich počet se výrazněji nemění (obr. 11c, 11d), ačkoliv počet typických GFAP⁺ reaktivních astrocytů se zvyšuje (v porovnání se skupinou potkanů 3 dny po QA lézi) velmi výrazně (obr. 8a, 25a, 25b, 26a, 26b), zejména v centrální oblasti (tj. kolem kanálu vpichu).

Expresí nestinu je v reaktivních astrocytech především v centru léze a kolem něho (obr. 22a, 22b), a to zejména v mohutných, silných výběžcích, tedy nejčastěji ve vaskulárních nožkách (obr. 22a), které jsou obvykle také NEST⁺/GFAP⁺ (obr. 23a). Zdaleka nejvýraznější je však pozitivita nestinu v aktivovaném endotelu cév (obr. 22b), avšak směrem do periferie degenerujícího striata jí výrazně ubývá (obr. 22c).

V centru léze stále zůstávají nezralé glioblasty (s ojedinělými krátkými výběžky), které exprimují v podstatě pouze vimentin (obr. 24a, 22a). V okolní zóně je pak charakteristická přítomnost VIM⁺/GFAP⁺ reaktivních astrocytů (obr. 24b), z nichž mnohé jsou typické hypertrofické reaktivní astrocyty (obr. 24c). Směrem k periférii (tedy s klesající intenzitou degenerace neuronů) počet VIM⁺ astrocytů poměrně rychle klesá, zatímco GFAP⁺ astrocytů naopak přibývá, takže v okrajové oblasti NDP pak převažují reaktivní astrocyty exprimující většinou pouze GFAP (obr. 23b, 24b).

Přítomnost silných svazků denzních GFAP⁺ gliofilament v cytoplasmě, výrazně zvětšená těla a silné výběžky jsou charakteristické znaky reaktivních (hypertrofických) astrocytů

(obr. 25a, 25b) v porovnání s GFAP⁺ astrocyty v intaktním striatu (obr. 25c). Překvapivým nálezem byla detekce dvoujaderných reaktivních astrocytů (obr. 25a, 25b). Na podkladě řady dalších morfologických nálezů předpokládáme (např. také obr. 26a-e), že tento jev svědčí spíše o dělení těchto buněk, než o vzniku pouze aberantních diploidních elementů (pro tento předpoklad svědčí např. i to, že polyploidní astrocyty jsme nikdy nenalezli). U této skupiny jsme poprvé zaznamenali značný počet typických hypertrofických reaktivních astrocytů (obr. 8a). Výsledkem zvýšené exprese GFAP ve vaskulárních nožkách byla výrazná konturace cév (obr. 8b).

Počet S100β⁺ reaktivních astrocytů byl výrazně vyšší než u předchozí skupiny, a to zejména v blízkosti centra léze, kde tyto buňky zároveň exprimovaly také vimentin (obr. 26a), resp. GFAP (obr. 26b, 26c, 26d, 26e). S100β protein byl kolem centra léze lokalizován nejen v jádře astrocytů, což je typická lokalizace ve většině S100β⁺ buněk ve třídní QA lézi (obr. 19b, 19c) a také v astrocytech intaktního striata u mladých potkanů (obr. 19a), ale v blízkosti centra léze i ve výběžcích reaktivních hypertrofických astrocytů (obr. 26a, 26b, 26c, 26e), zatímco směrem k periférii byly (zejména S100β⁺/GFAP⁺) astrocyty menší a S100β protein byl opět vázán především v jádře (obr. 26d, 26e). Je tedy evidentní, že hypertrofické reaktivní astrocyty se objevují nejdříve v místě největšího poškození (v tomto případě kolem centra QA léze) a zde také dosahují maximální velikosti a nejvýraznější exprese, resp. koexprese všech tří detekovaných IF i S100β proteinu.

Nejvýraznější koexprese všech tří IF, tj. nestinu a zejména pak vimentinu a GFAP, byla i zde ve vaskulárních nožkách astrocytů (obr. 27a). Tento jev můžeme pozorovat i u cév v intaktním striatu, ale v tomto případě jsou VIM⁺/GFAP⁺ pouze vaskulární nožky (ne tělo astrocytu), které jsou vždy jemnější, než u typických reaktivních astrocytů (obr. 27b).

Dva týdny (14 dní) po aplikaci QA se základní charakteristika NDP ve striatu v zásadě neliší od předešlé skupiny, avšak celý proces se začíná postupně zpomalovat. Atrofie striata je již výrazná, kompenzovaná dilatací ipsilaterální mozkové komory (obr. 6a). Vzhledem k protrahovanému účinku QA jsme na periférii léze ještě detekovali ojedinělé intaktní neurony nebo pomalu degenerující neurony s pyknotickými jádry během celého období akutní fáze rozvoje NDP.

Výrazně snížená exprese BrdU v jádrech značených buněk, resp. postupné „ředění“ intenzity signálu, tedy náhrada exprese BrdU znázorněním chromatinu pomocí DAPI, dokazuje opakované dělení (proliferaci), případně následnou diferenciaci novotvořených buněk (obr. 28). Detekce PCNA v blízkosti centra léze rovněž potvrzovala úbytek velkých, výrazně PCNA⁺ jader, tedy nově generovaných buněk, a naopak byl nárůst počtu menších

jader se sníženou denzitou exprese PCNA (obr. 9a). Tyto opakovaně se dělící buňky (jádra) byly téměř výhradně v degenerujícím neuropilu a jen ojediněle ve svazcích myelinizovaných nervových vláken. To potvrzuje naše nálezy, že k postupné fokální demyelinizaci až degeneraci těchto axonů, vyvolávající reaktivní oligodendrogliózu, dochází až v pozdějších stádiích (spíše v chronické fázi NDP).

Počet GFAP⁺ reaktivních astrocytů (zejména hypertrofických) ještě oproti předchozí skupině mírně vzrostl (obr. 29a) a byl v této a předchozí (6-7 denní) skupině nejvyšší ze všech hodnocených skupin, to znamená, že proces rozvoje reaktivní gliózy ve striatu, který vždy odpovídá intenzitě NDP, kulminuje v období 1-2 týdnů po intrastriatové aplikaci neurotoxické quolinátové kyseliny. I nadále představovaly tyto astrocyty dominantní složku parenchymu poškozeného striata.

Expresie nestinu přetrvávala většinou již jen ve vaskulárních nožkách reaktivních astrocytů (obr. 29b), což je pravděpodobně dokladem postupného vyžívání lézí aktivovaných astrocytů. Nestin⁺ byl tedy především aktivovaný endotel v původních nebo v novotvořených cévách (sproutech) – (obr. 29a). V blízkosti centra léze se ještě stále vyskytovaly VIM⁺ diferencující se astroblasty s malým počtem výběžků (obr. 30a, 30b), avšak převážná většina buněk byly hypertrofické reaktivní VIM⁺/S100β⁺/GFAP⁺ astrocyty (obr. 30a, 30b, 31a, 31c, 32a, 32b). Naproti tomu v periferních oblastech, postižených NDP, jsme hypertrofické astrocyty v podstatě již nenacházeli (obr. 31b, 32b), to znamená, že těla/jádra VIM⁺/S100β⁺/GFAP⁺ reaktivních astrocytů (znázorněná především detekcí S100β proteinu, příp. DAPI) byla zřetelně menší než v centrální části NDP (obr. 31a, 32a). Počet S100β⁺ astrocytů, zejména reaktivních (VIM⁺/S100β⁺, GFAP⁺/S100β⁺) se zvýšil zejména v periferní zóně NDP, a také zde se S100β protein již často objevoval i v odstupu silných výběžků (obr. 31b, 32b).

Jeden měsíc po aplikaci QA je léze ve striatu již plně rozvinutá a postihuje přibližně $\frac{2}{3}$ – $\frac{3}{4}$ striata. Většina striatových neuronů v centru léze je zničena a zbývající neurony, které zůstaly sporadicky zachovány v postižené tkáni (zejména na periférii léze), postupně také degenerují (mají charakteristická tmavá kondenzovaná jádra) nebo mohou přežívat bez výraznějších změn. I když jsme s progresí NDP zaznamenali snížení exprese neuronálních markerů (β-III-tubulinu a MAP2), denzita synaptophysinu, tedy synapsí, se výrazněji nezměnila. Také jsme (ve srovnávané laterální oblasti) ještě nenašli zřetelnější prořídnutí neuropilu. Nicméně, mozková komora v poškozené hemisféře byla v porovnání se stejně

starými kontrolními zvířaty již výrazně rozšířená a objem šedé hmoty byl zřetelně zredukovaný.

Počet PCNA⁺ buněk byl v porovnání s předchozí skupinou již o něco nižší. Přesto byla proliferační aktivita v oblasti NDP (zejména v neuropilu) stále relativně zvýšená (obr. 9b), i když denzita exprese PCNA v řadě buněk již výrazně poklesla. (Hodnocení exprese BrdU je v tomto intervalu přežívání zvířat již v podstatě bezpředmětné.)

Počet reaktivních GFAP⁺ astrocytů i jejich morfologie odpovídaly stupni rozvoje NDP v daném místě. Astrocyty zejména v centrální oblasti NDP vykazovaly všechny vlastnosti charakteristické pro hypertrofické reaktivní astrocyty, reprezentující akutní reakci striata na poškození, i když denzita exprese GFAP byla v některých elementech o trochu nižší (obr. 8c). Počet GFAP⁺ reaktivních astrocytů v degenerovaném striatu se v porovnání s předchozí skupinou zvýšil již jen nevýrazně.

Lokalizace exprese nestinu se od stadia 14 dnů po QA lézi již dále neměnila, to znamená, že nestin-pozitivitu vykazuje pouze aktivovaný endotel v cévách a v novotvořených „sproutech“ cév. Stejnou lokalizaci, tj. ve stěně cév, má i vimentin – avšak v tomto případě je VIM⁺ hladká svalovina ve všech cévách (tedy kromě kapilár, kde chybí) a VIM⁺ je i endotel (obr. 33a, 33b, 33c). Kromě toho (na rozdíl od nestinu) je typická exprese vimentinu také ve vaskulárních nožkách reaktivních astrocytů v koexpresi zejména s GFAP (obr. 33a, 33c), méně s S100 β proteinem (obr. 33b). Výrazná koexprese S100 β a GFAP je stále ještě v hypertrofických reaktivních astrocytech v oblasti kolem centra léze, a to nejen v jejich tělech (jádrech), ale i ve vaskulárních nožkách, tvořících MLGP (obr. 34a, 34b).

Po tomto období se expanze reaktivní gliózy téměř zastavila a NDP postupně přešel do chronického stadia.

U zvířat s kontrolní **sham-lézi** byly změny v parenchymu striata zcela minimální. Jediným nápadným nálezem (avšak v porovnání s lidským mozkem zcela arteficiálním) bylo vytvoření jizvy v místě vpichu jehly (KV) při aplikaci fyziologického roztoku (vyznačené přítomností fagocytů s hemosiderinem – obr. 9g). Dále jsme kolem KV našli mírný lokální edém a rozvoj reaktivní gliózy, která se však rozbíhala pouze do nevelké vzdálenosti od místa vpichu. NEST⁺/VIM⁺ reaktivních astrocytů byl jen malý počet a tyto buňky tvořily lem kolem KV.

Tyto nálezy tedy zcela jasně dokládají, že veškeré změny, které jsme popsali u zvířat s QA lézí, se skutečně rozvíjejí v důsledku progresu NDP ve striatu.

Ve striatu **kontrolních intaktních zvířat**, ani v hemisféře kontralaterální ke QA lézi, jsme nenašli žádné BrdU⁺ buňky nebo nestin⁺ astrocyty či endotelové buňky. Pozitivita na vimentin byla patrna jen v endotelu a ve svalovině cév (obr. 16c, 27b), ne však v astrocytech, s výjimkou jejich silných vaskulárních nožek (obr. 27b). I když plasmatické astrocyty tvoří významnou složku šedé hmoty striata, GFAP⁺ buněk je v intaktním striatu jen málo, protože většina astrocytů je GFAP-negativních (obr. 8g, 15c, 20a, 20b, 25c). Naproti tomu počet S100β⁺ astrocytů byl poměrně velký (obr. 25c), což dokládá, že část GFAP-negativních astrocytů je S100β⁺.

4.1.1.1.1. Závěry - akutní fáze NDP u QA léze

Hlavními znaky akutní fáze rozvoje NDP fenotypu HD je velmi rychlý zánik většiny striatových neuronů provázený rozvojem výrazné průvodní astrogliózy. Poškození striata NDP není v tomto případě homogenní, rozvíjí se především laterálně (i když přibližně koncentricky) od centra léze (resp. KV). Tím je dáno, že nejvýraznější poškození, tedy intenzita NDP a průvodní reaktivní astroglióza, jsou vždy v oblasti kolem KV, kdežto periferněji probíhá proces pozvolněji. Důsledkem rychle se rozvíjejícího zániku neuronů včetně jejich výběžků (především dendritů), je i výrazné narušení mikroprostředí pro všechny striatové elementy, zejména však pro gliové buňky (hlavně astrocyty), které prakticky okamžitě reagují a rozvíjí se výrazná reaktivní glióza.

V centrální oblasti léze 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 koexprese 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 z těl/jader astrocytů do odstupu kmenových výběžků reaktivních/hypertrofických astrocytů. Změna exprese uvedených proteinů dokumentuje nejprve velmi rychlou aktivaci astrocytů v centrální oblasti léze, tedy jejich přeměnu v reaktivní až 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, u některých však jen velmi pomalu.

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 v podstatě během akutní (časné) fáze reaktivní astrogliózy prakticky nepřibývalo. Všechny uvedené nálezy potvrzují, že reaktivní astrocyty při rozvoji reaktivní gliózy vznikají především aktivací existujících gliových buněk a jen minimálně dělením a diferenciací adultních NKB a gliálních prekurzorů (např. NG2⁺ glie).

V obou typech reaktivních astrocytů v průběhu celé akutní fáze rozvoje NDP byla nejintenzivnější exprese všech IF a následně i S100β proteinu ve vaskulárních nožkách, vytvářejících svými rozšířenými zakončeními na zevním povrchu cév 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 je standardním jevem i v intaktních cévách (u kontrolních zvířat).

4.1.1.2. Chronická fáze neurodegenerativního procesu u QA léze

Tři měsíce po lézi již nedochází k progresi NDP a pomalu probíhající morfologické změny se týkají především regresivních změn v neuropilu. Na frontálních řezech mozku je dobře

patrné, že NDP postihuje již téměř celé striatum a je příčinou jeho výrazné atrofie (obr. 6b). Na degeneraci a prořídnutí neuropilu se podílí jeho obě složky, tedy výběžky neuronů (především redukce bohatého větvení dendritů), jak je dobře patrné při impregnaci neurofilament (obr. 7e, 7f), i gliové buňky, tedy reaktivní astrocyty a oligodendrocyty. I když redukce sítě synapsí (značených anti-Synaptophysinem) byla zatím jen mírná, sledovala rarefakci neuropilu. S pokračující dezintegrací neuropilu se také dále prohlubuje narušení mikroprostředí v parenchymu striata.

I když se počet reaktivních astrocytů výrazněji nezměnil, již zcela chybí hypertrofické reaktivní astrocyty, a to i v centrální oblasti NDP (porovnej obr. 34a a 35a). Typické pro pomalu pokračující NDP je tedy nenápadné, ale postupné zmenšování buněk a změny charakteru výběžků, přesněji ubývání exprese GFAP v jemných výběžcích. Výsledkem je, že při detekci GFAP v těchto reaktivních astrocytech je výrazná GFAP-pozitivita, vázaná na svazky gliofilament v cytoplasmě, koncentrovaná pouze do nejsilnějších výběžků, tedy především (resp. téměř výhradně) do vaskulárních nožek astrocytů a zejména do jejich rozšířených zakončení na stěně cév. Charakteristickým znakem reaktivní gliózy v chronickém stadiu NDP je tak množství typických silně GFAP⁺ „prstenců“ lemujících lumen striatových cév (obr. 8d). Výsledkem tohoto procesu je tedy postupná redukce sítě GFAP⁺ výběžků reaktivních astrocytů především na periferii neurodegenerativní léze (porovnej obr. 35a a 35b, 35c).

Počet S100β⁺ reaktivních astrocytů, a zároveň koexprese s GFAP, ještě narůstá v centrální části degenerativní léze (obr. 35a), ale již ne v periferní oblasti (obr. 35b, 35c). U většiny GFAP⁺/S100β⁺ astrocytů zasahuje exprese S100β proteinu z těla astrocytu i do odstupů silných výběžků, zejména vaskulárních nožek, kde je pozitivita často v celé délce výběžku. Tvar S100β⁺ (převážně GFAP⁺/S100β⁺) reaktivních astrocytů se však výrazně liší od S100β⁺ astrocytů intaktního striata (porovnej obr. 35c a 35d).

Naproti tomu již nenacházíme koexpresi VIM s GFAP (obr. 36a, 36b) nebo s S100β proteinem (obr. 37b, 37c), protože VIM⁺ astrocyty již zcela vymizely a vimentin je exprimován pouze ve stěně cév (endotelem a buňkami hladké svaloviny). Takže co se týká exprese vimentinu, není zásadní rozdíl mezi striatem postiženým NDP (obr. 36a, 37b) a intaktním striatem (obr. 37a). Totéž se týká exprese nestinu, který rovněž značí již jen buňky endotelu. Na rozdíl od vimentinu však nestin-pozitivitu vykazuje pouze endotel aktivovaný NDP (obr. 38a, 38b), tato pozitivita tedy není v cévách intaktního striata.

V důsledku výraznějšího úbytku šedé hmoty striata dochází u svazků myelinizovaných nervových vláken, které striatem pouze procházejí, k jejich typickému nahuštění blíže

k sobě (obr. 7e, 7f). Objevuje se i demyelinizace části axonů ve svazcích, nejdříve v centru léze (obr. 10b), později i na periférii, takže klesá i denzita exprese CNP-ázy v těchto svazcích v porovnání s intaktním striatem (obr. 10a). V důsledku demyelinizace nervových vláken dochází k proliferaci oligodendrocytů (obr. 10c). Avšak při detekci CNP-ázou (která značí buňky produkující myelin) byly tyto buňky negativní. Morfologicky shodné buňky s tmavými homogenními jádry, typickými pro oligodendrocyty, se navíc objevují v malých skupinkách i v degenerujícím neuropilu a jejich počet se s pokračující degenerací neuropilu dále zvyšuje. Zmnožení těchto oligodendrocytům-podobných buněk v rámci reakce na rarefakci neuropilu navíc potvrzuje jejich participaci na reaktivní glióze (obr. 10a, 10b).

Šest měsíců po lézi je na frontálních řezech mozkiem vidět, že NDP stále pokračuje, protože atrofie striata se dále zhoršuje (porovnej obr. 6b a 6c). Důsledkem prořidnutí neuropilu, tedy zejména redukce dendritického stromu, jsou také očekávané signifikantní změny na synapsích. V porovnání s kontrolními skupinami (obr. 42a) je evidentní snížená hustota synapsí v důsledku jejich degenerace a vymizení (obr. 42b).

Zvýšenou proliferační aktivitu, tedy výrazně PCNA⁺ jádra, jsme našli již jen zcela ojediněle u endotelových buněk; avšak menší kulovitá středně denzní PCNA⁺ jádra gliových buněk, odpovídající jádrům oligodendrocytů, byla i zde přítomna ve značném počtu, zejména v místech, kde došlo k výrazné redukci neuropilu nebo k destrukci myelinových vláken, tedy v centrální oblasti léze (obr. 9c).

Změny, typické pro reaktivní astrocyty chronické fáze NDP, se mírně prohlubují. K tomu však přispívají i změny věkové, tedy v důsledku stárnutí potkanů (obr. 39a, 39b, 41a). Avšak vzhledem k tomu, že na reaktivní astroglióze se zde již nepodílejí hypertrofické astrocyty, velikostí se tyto astrocyty výrazněji neodlišují od reaktivních astrocytů, kterých přibývá s věkem u intaktních zvířat. Nejzajímavější je i zde paralelní detekce GFAP a S100 β proteinu (obr. 39a, 40a, 41a, 41b). Pomocí koexprese obou proteinů můžeme prokázat, že vymizení jemných výběžků GFAP⁺ reaktivních astrocytů je v podstatě arteficiální, způsobené redukcí, resp. vymizením GFAP⁺ gliofilament v těchto výběžcích, avšak detekce S100 β proteinu prokazuje, že i reaktivní astrocyty mají bohatě větvený strom S100 β ⁺ výběžků (obr. 41b). Výrazně GFAP⁺, resp. GFAP⁺/S100 β ⁺, tak zůstávají vaskulární nožky reaktivních astrocytů a jejich zakončení na stěně cév vytvářející charakteristický „prstenec“ kolem lumina cévy (obr. 8e, 40a, 41b). Toto typické zvýraznění stěny cévní se však objevuje i v intaktním striatu starších potkanů, i když

v podstatně menším rozsahu než při NDP (obr. 39a, 40a – porovnej s 35d). Přestože je počet reaktivních astrocytů v okrajových částech neurodegenerativní léze, ale i v centrální oblasti NDP (obr. 40a) o něco nižší, je reaktivní astroglióza základním charakteristickým znakem i chronické fáze NDP.

Exprese nestinu v aktivovaném endotelu cév, ani vimentinu ve stěně cév (obr. 40b) nevykazuje žádné změny oproti předchozí skupině nebo intaktním zvířatům (obr. 39b).

I když svazky myelinizovaných nervových vláken striatem pouze procházejí, dochází v chronické fázi NDP i k jejich poškození, tj. k demyelinizaci, resp. degeneraci axonů a ke kompenzační proliferaci oligodendrocytů. Navíc je tento typ buněk přítomen i v degenerujícím neuropilu, kde se jejich počet také postupně zvyšuje.

Za 9 a 12 měsíců po QA lézi jsme pozorovali pomalu, ale trvale se prohlubující redukci objemu striata, dokazující, že NDP stále, i když již jen pozvolna, pokračuje. Ve struktuře striata, postiženého NDP, jsme nenašli výraznější rozdíly mezi skupinami přežívajícími 9 a 12 měsíců. Atrofie striata se pomalu prohlubovala v důsledku pozvolna pokračující degenerace obou hlavních složek šedé hmoty, tj. striatových neuronů, tedy i sítě jejich dendritů vytvářejících spolu s gliovými buňkami neuropil. Prořídnutí neuropilu bylo viditelné v celé oblasti rozvinutého NDP (obr. 7g, 7h). S jeho degenerací je spojeno také fokální snižování hustoty synapsí až do jejich úplné ztráty.

Počet PCNA⁺ buněk se snížil na minimum a to překvapivě i v místech, kde je typická oligodendroglióza (obr. 9d, 7g). Tento nález potvrzuje, že k dalšímu výraznějšímu nárůstu počtu oligodendrocytů, resp. oligodendrocytům-podobných buněk, již nedochází i přesto, že rarefakce neuropilu nadále pokračuje (obr. 7g, 7h). U stejně starých kontrolních zvířat byla jádra striatových buněk PCNA-negativní (obr. 9f).

V souvislosti s reaktivní astrogliózou jsme v této skupině nezaznamenali jakékoliv výraznější změny v porovnání se skupinou šestiměsíčních potkanů. Počet GFAP⁺ reaktivních astrocytů se jen nevýrazně snižoval, spíše v důsledku redukce GFAP-pozitivity v jejich jemných výběžcích. I u nejdéle přežívající skupiny zvířat byly nejnápadnější strukturou v degenerovaném striatu cévy, lemované výrazně GFAP-pozitivní perivaskulární gliovou membránou (obr. 8f). Toto charakteristické „orámování“ cév je (i když v daleko menší míře) typické i pro intaktní striatum stejně starých potkanů kontrolní skupiny (obr. 8h).

Pomalu pokračující demyelinizace a degenerace axonů již postihla větší část myelinizovaných svazků (některé vykazovaly i velmi silné poškození – obr. 10d).

Na rozdíl od stagnující proliferace oligodendrocytům-podobných buněk v reakci na pokračující degeneraci neuropilu, je v těchto degenerujících nervových svazcích kompenzační proliferace oligodendrocytů velmi výrazná (obr. 7g, 7h).

Věkové změny u kontrolních zvířat

Charakteristické změny ve struktuře striata se objevovaly s přibývajícím věkem i u kontrolních potkanů. U nejstarších intaktních zvířat (9 a 12 měsíců starých) se rozvíjí mírná atrofie striata (symetricky v obou hemisférách). Změny v počtu a morfologii GFAP⁺ astrocytů se rozvíjejí v důsledku fyziologického zániku některých neuronů, který pomalu progreduje s věkem, a tím dochází k mírnému kompenzačnímu nárůstu gliové složky v parenchymu striata (obr. 39a, 39b). Již u skupiny půlročních zvířat pozorujeme redukcii GFAP⁺ gliofilament v jejich jemných výběžcích a tak jejich zdánlivé vymizení (porovnej obr. 35a, 35b, 35c a 39a, 41a). Výrazná GFAP-pozitivita se typicky u těchto zvířat objevuje ve vaskulárních nožkách a nejvíce v jejich zakončení na stěně cév, vytvářejících charakteristický „prsteneček“ kolem lumina cévy. Na rozdíl od mladých zvířat, u kterých byly ve striatu typické plasmatické astrocyty, ze kterých jen některé byly GFAP⁺ (obr. 8g, 25c), ve striatu starých potkanů jsme zaznamenali GFAP⁺ astrocyty, které charakterem výběžků odpovídaly spíše astrocytům fibrilárním (s menším počtem silnějších GFAP⁺ výběžků – obr. 39a, 41a). Překvapivě S100β⁺ astrocyty nevykazovaly výraznější věkové změny (porovnej např. obr. 25c a 41a).

Proliferační aktivita (detekovaná pomocí PCNA) byla v intaktním striatu zanedbatelná nejen u starých (obr. 9f), ale i u zcela mladých potkanů (obr. 9e).

Věkem podmíněné změny, týkající se astrocytů, představují další komponentu, která přispívá k prohlubování NDP v mozku potkanů po neurotoxické lézi.

4.1.1.2.1. Závěry - chronická fáze NDP u QA léze

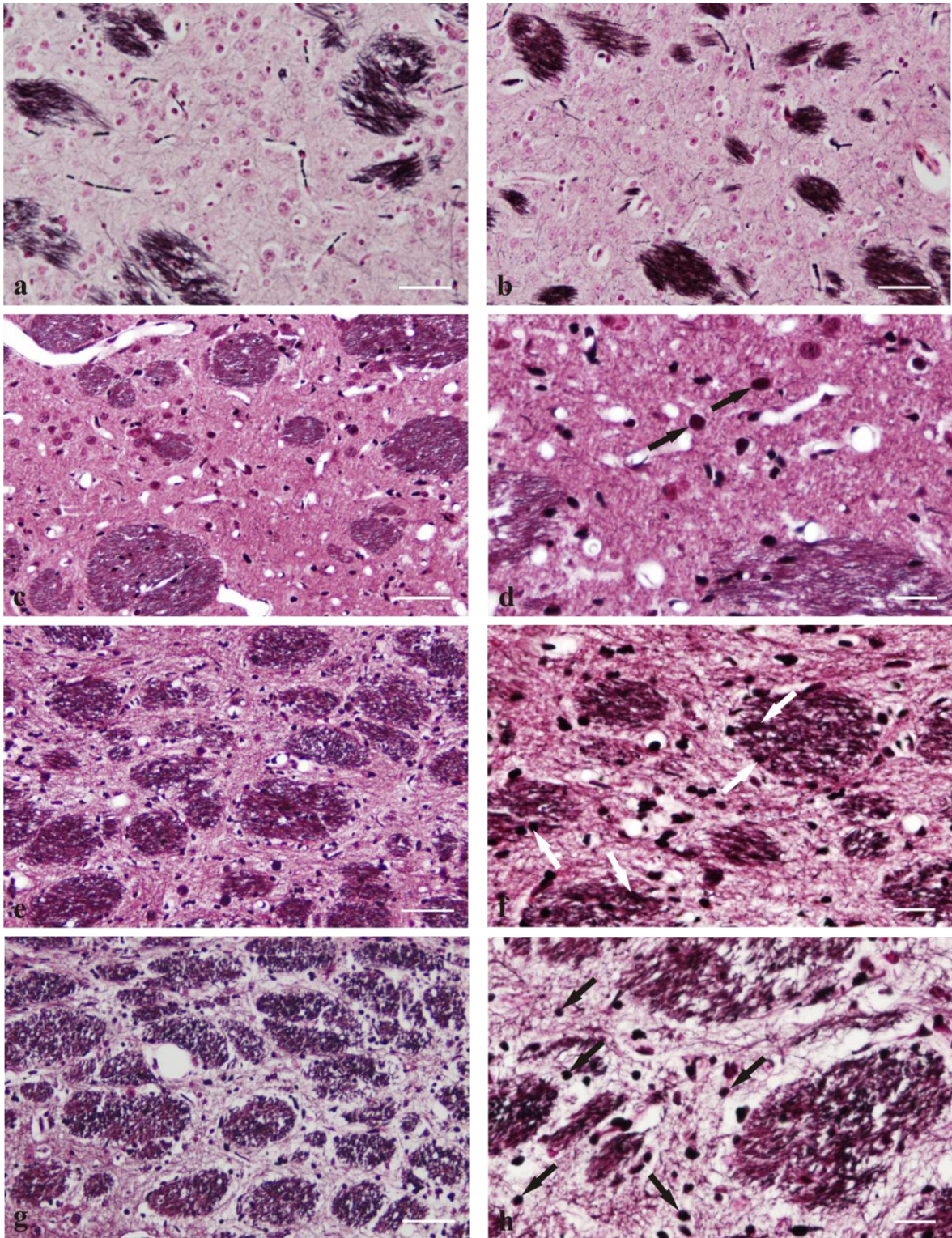
V této fázi již účinek QA odeznívá a QA lézi tedy označujeme jako stabilizovanou. Expanze NDP ve striatu se výrazně zpomalila a další změny, charakterizující chronickou fází NDP, spočívají především v prohlubování degenerativního procesu v neuropilu. Postiženy jsou obě jeho složky, tedy výběžky postupně zanikajících zbylých neuronů (zejména jejich velmi četné dendrity), ale hlavně gliové buňky – astrocyty a oligodendrocyty. Nejnápadnějším projevem této fáze NDP je progredující atrofie striata. Počet reaktivních astrocytů se již nezvyšuje, naopak jich pomalu ubývá, i když častěji než o skutečnou redukcii jejich počtu se spíše jedná o postupné zmenšování jejich těl a redukcii

výběžků. Hypertrofické reaktivní astrocyty již nejsou přítomny vůbec. Morfologické změny se týkají jak GFAP⁺/S100β⁺ a GFAP⁺/S100β⁻, tak (i když méně) GFAP⁻/S100β⁺ reaktivních astrocytů (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 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 perivaskulární gliovou membránou) kolem cév a 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) pravděpodobně také souvisí se zhoršením transportu látek (O₂, živin aj.) v degenerujícím striatu, případně i s narušenou HEB, na jejíž funkci se významně podílejí.

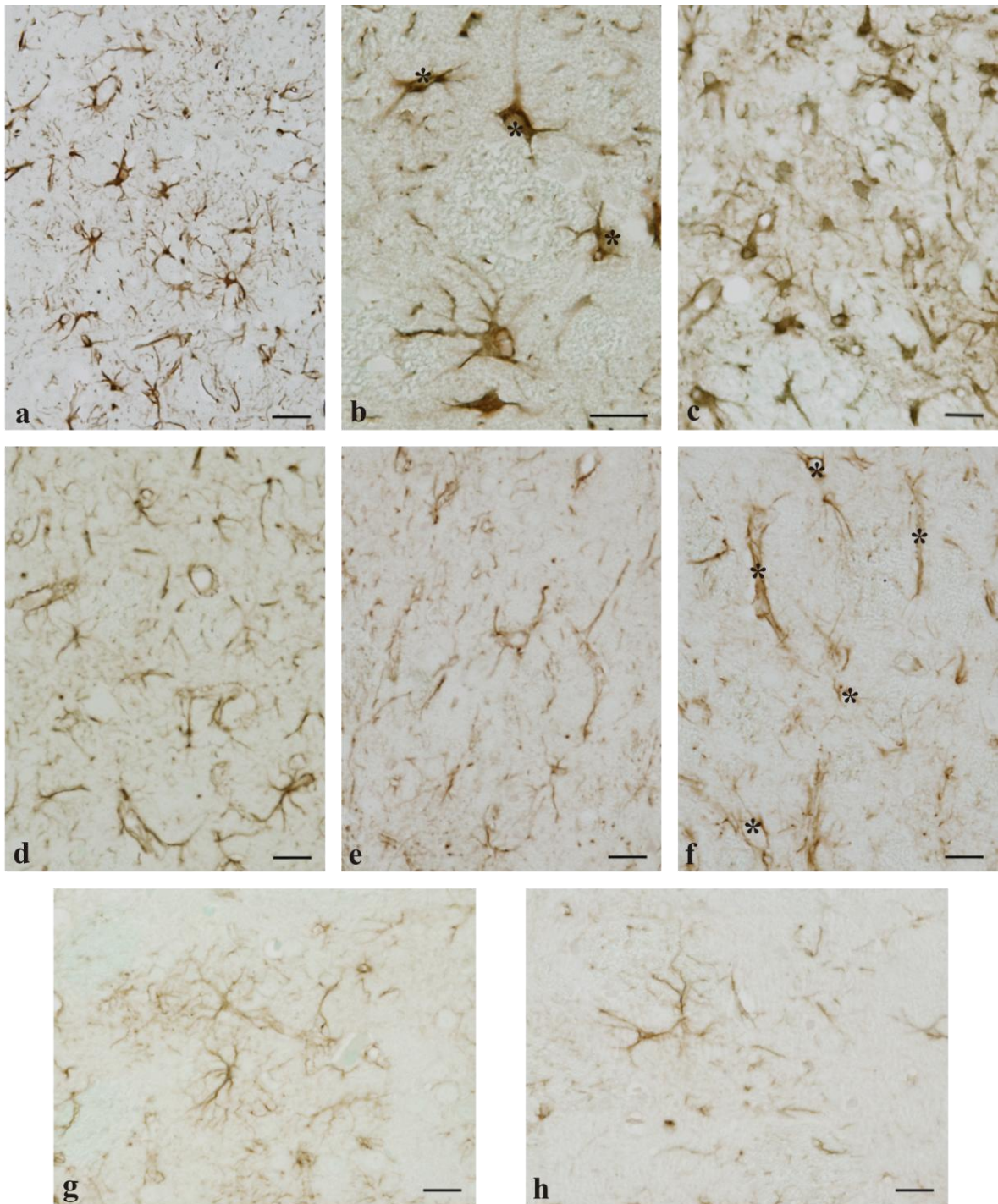
Překvapivě, zejména GFAP⁻/S100β⁺ astrocyty nevykazují během chronické fáze žádné výrazné změny s výjimkou pozvolného úbytku jemných výběžků, případně zmenšování těl. V návaznosti na výrazné prořídnutí neuropilu se posléze rozvíjí i degenerace synapsí. Také dochází k demyelinizaci a degeneraci nervových vláken ve svazcích procházejících striatem a k rozvoji reparativní oligodendrogliózy. Ta se rozvíjí především v nervových svazcích v návaznosti na jejich progresivní degeneraci. Proliferace oligodendrocytů (či oligodendrocytům-podobných buněk) v neuropilu je zpočátku (cca u 3 měsíčních zvířat) výrazná a pozvolna se snižuje; oligodendroglióza však přetrvávala až do ukončení experimentu (12 měsíční zvířata), ale typicky především v demyelinizovaných a poškozených svazcích nervových vláken. V žádném případě však ani zde nešlo o myelinizující oligodendrocyty.

Na celkovém obrazu NDP za 3-12 měsíců po aplikaci QA mají navíc podíl i věkové změny ve struktuře striata, tedy stáří potkanů.



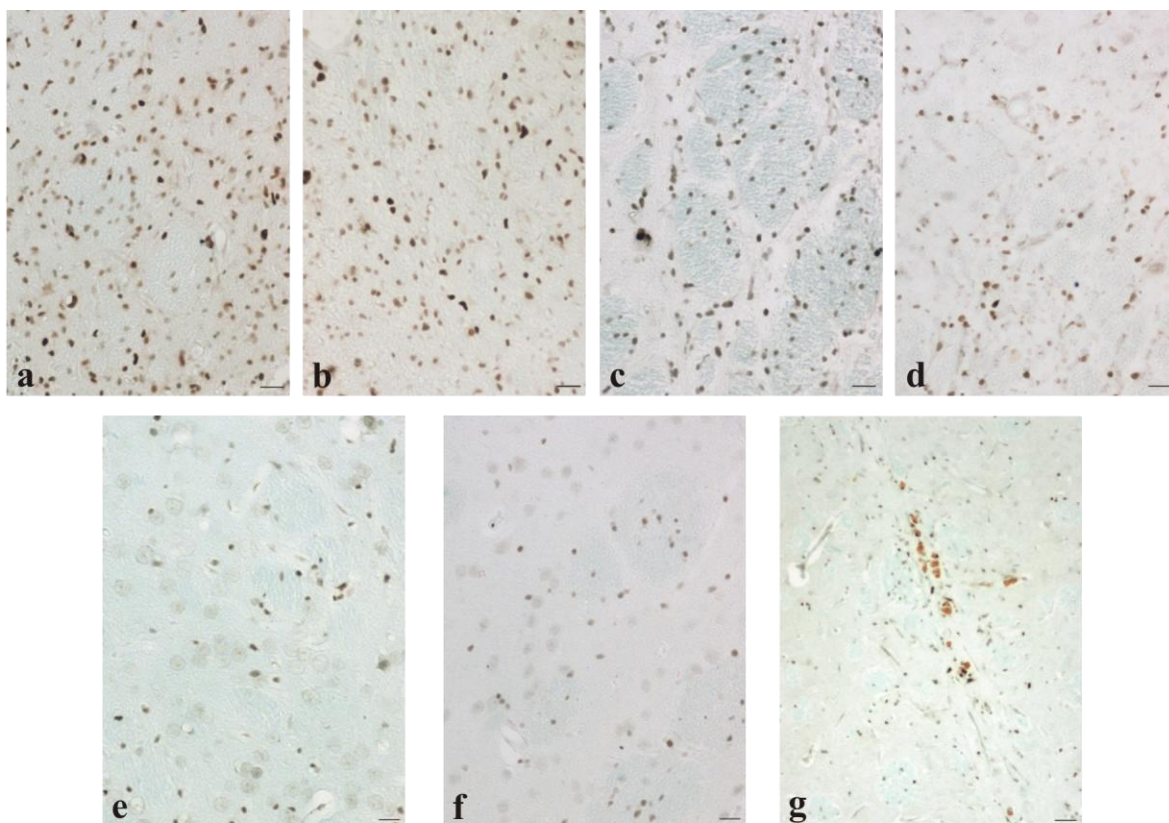
Obr. 7. (a) Normální vzhled striata u mladých kontrolních zvířat, (b) v porovnání s 12 měsíčním intaktním potkanem, kde ve striatu pozorujeme ne příliš nápadné věkové změny – mírné zhuštění neuropilu, vč. (impregnační záznamů) nervových vláken, a jen nenápadné zmenšování některých neuronů. (c, d) Za 7 dní po QA lézi již většina striatových neuronů degenerovala a zanikla; NDP se však dále rozšiřuje, takže na periferii ještě vidíme zachované neurony i typické denzní (hyperchromní) neurony v počáteční fázi degenerace – šipky. Následná degenerace, tedy prořidnutí (rarefakce) neuropilu se výrazněji projevuje (e, f) až u skupiny 3 měsíčních potkanů; v důsledku výrazného úbytku neuronů i neuropilu dochází k typickému nahuštění svazků striatových myelinizovaných nervových vláken blíže k sobě. Počínající demyelinizace axonů je spojena s mírnou oligodendroglíózou – (f) bílé šipky. (g, h) Za 9 měsíců po lézi prořidnutí neuropilu ještě více pokročilo, stejně jako demyelinizace a degenerace axonů v nervových svazcích a tedy i kompenzační oligodendroglíóza. Oligodendrocytům-podobné buňky jsou však zmoženy i v neuropilu – (h) černé šipky.

Impregnace neurofibril podle Bodiana; (a, b, c, e, g) měřítko 50 μm , (d, f, h) měřítko 20 μm .



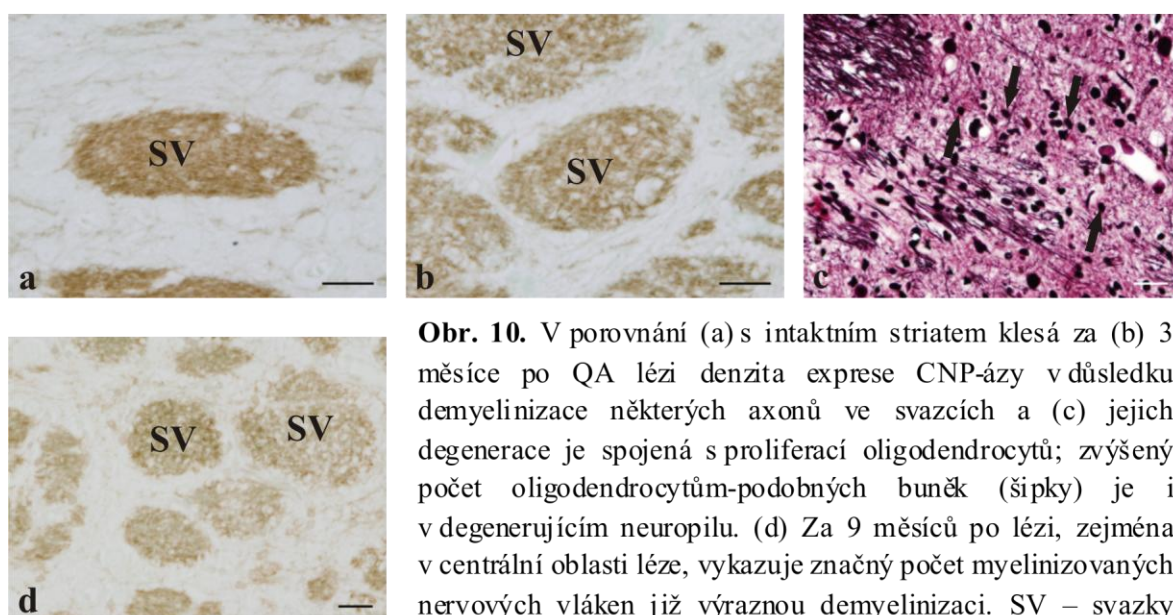
Obr. 8. Typické hypertrofické reaktivní astrocyty jsou charakteristické pouze pro akutní fázi rozvoje NDP – maximálního rozvoje dosahují kolem (a, b) 6. dne až 14. dne po QA lézi a přetrvávají jen několik týdnů, takže jsou přítomny ještě za (c) 1 měsíc, ale již ne za (d) 3 měsíce po QA lézi. (b) Největší koncentrace GFAP⁺ gliofilament je ve vaskulárních nožkách reaktivních astrocytů a vytváří tak typickou konturaci cév (*). V chronické fázi, tj. (d) 3 měsíce, (e) 6 měsíců a (f) 9 měsíců po QA lézi dochází ke zmenšování hypertrofických astrocytů, výrazně se redukuje počet výběžků s GFAP⁺ gliofilamenty, takže se počet reaktivních astrocytů zdánlivě snižuje; GFAP⁺ zůstávají pak již jen vaskulární nožky, které ve formě zbytnělé MLGP vytvářejí typické „prstence“, lemující stěnu striatových cév, a stávají se tak nejvýraznější strukturou ve striatu v chronické fázi NDP (*). (g) Ve striatu mladých intaktních zvířat (1 měsíc) je počet GFAP⁺ astrocytů jen malý, (h) s věkem (9-12 měsíců) se počet GFAP⁺ výběžků redukuje, tzn. původní plasmatické astrocyty, typické pro striatum mladých zvířat, nabývají charakter spíše fibrilárních astrocytů; nejvýraznější exprese GFAP je i u kontrolních zvířat ve vaskulárních nožkách astrocytů.

Anti-GFAP; měřítko 20 μm.

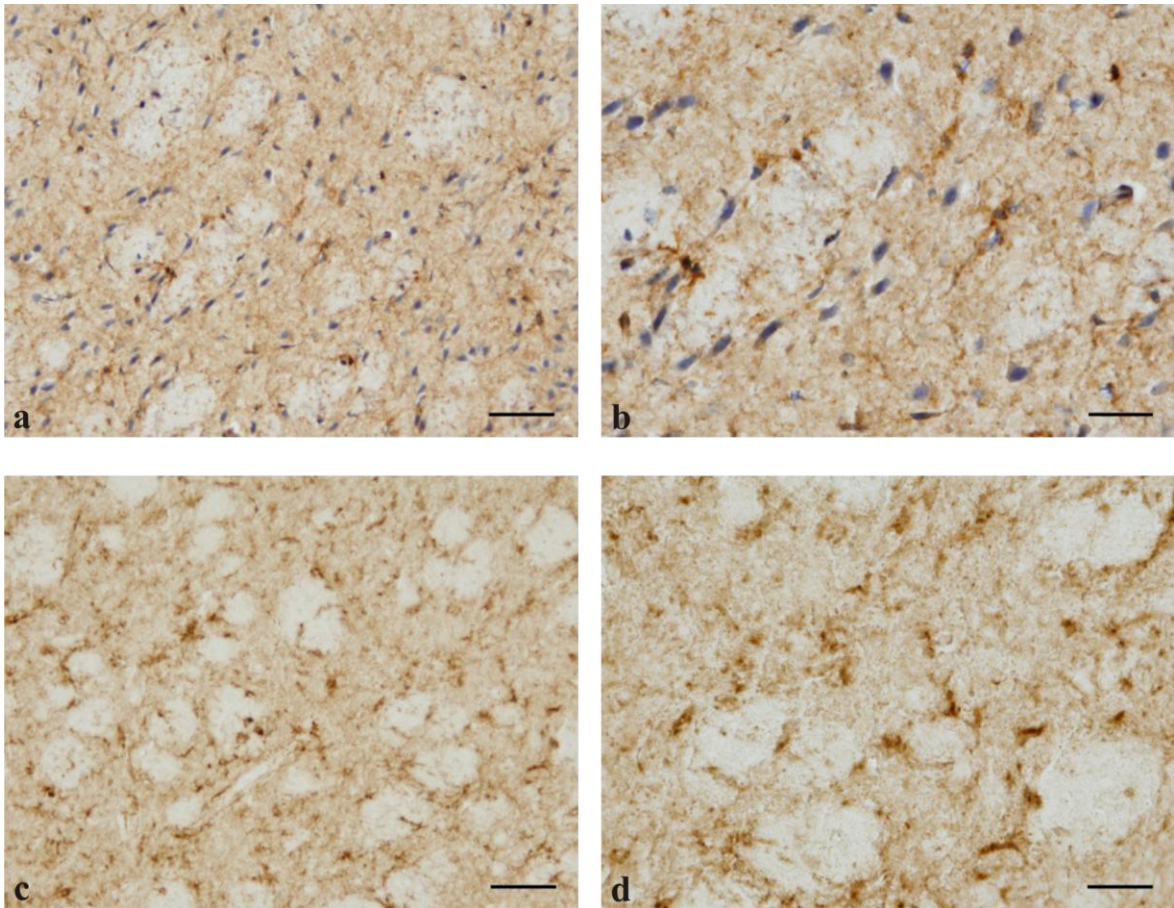


Obr. 9. (a) 2 týdny i (b) 1 měsíc po QA lézi byla proliferační aktivita při použití anti-PCNA (tmavá jádra buněk) poměrně vysoká. (c) Za 6 měsíců po QA lézi je viditelné snížení proliferační aktivity a (d) 9 měsíců po lézi byl počet PCNA⁺ buněk jen velmi malý – v obou případech se jedná především o endotelové buňky. U kontrolních zvířat byla proliferační aktivita jen minimální (e) u mladých 3 měsíčních, a v podstatě žádná u (f) starých 9 měsíčních potkanů. (g) U sham-lézi jsme zaznamenali expresi PCNA pouze v reakci na mechanickou lézi striata (vpich), tzn., že se jedná o zánětlivou reakci, tedy téměř výhradně o zmnožení fagocytujících buněk (makrofágy v místě KV značeny akumulací hemosiderinu).

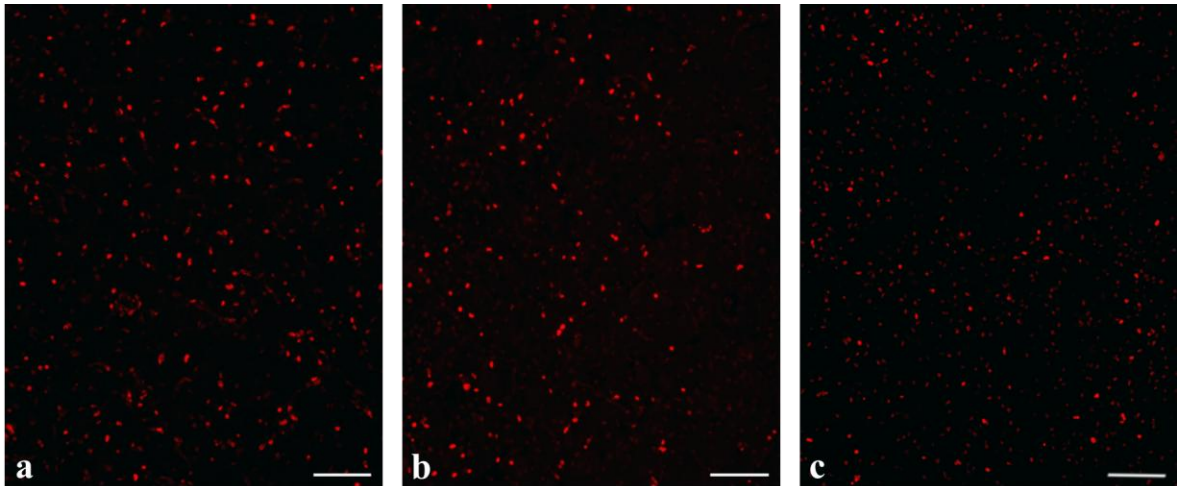
Anti-PCNA; (a-f) měřítko 50 μm , (g) měřítko 100 μm .



Obr. 10. V porovnání (a) s intaktním striatem klesá za (b) 3 měsíce po QA lézi denzita exprese CNP-ázy v důsledku demyelinizace některých axonů ve svazcích a (c) jejich degenerace je spojená s proliferací oligodendrocytů; zvýšený počet oligodendrocytům-podobných buněk (šipky) je i v degenerujícím neuropilu. (d) Za 9 měsíců po lézi, zejména v centrální oblasti léze, vykazuje značný počet myelinizovaných nervových vláken již výraznou demyelinizaci. SV – svazky myelinizovaných nervových vláken. (a, b, d) **Anti-CNP-ase,** (c) **Impregnace neurofibril podle Bodiana;** měřítko 20 μm .

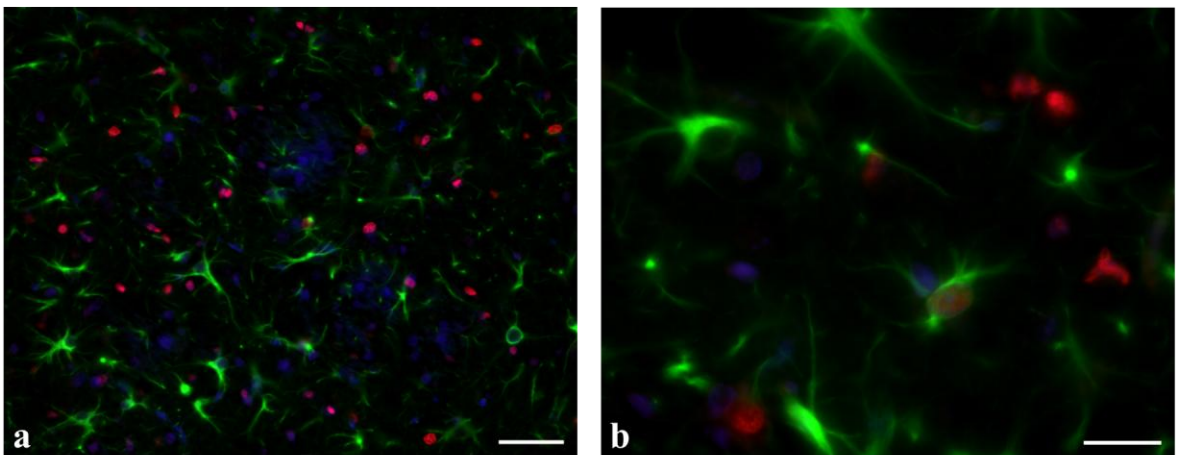


Obr. 11. (a, b) 3 dny po aplikaci QA dochází zejména v oblasti centra léze k aktivaci NG2⁺ gliových buněk. Tyto buňky pozvolna získávají charakter hypertrofických reaktivních astrocytů, ale jejich počet se za (c, d) 7 dní po lézi výrazněji nezměnil.
Anti-NG2; (a, c) měřítko 50 μm , (b, d) měřítko 20 μm .



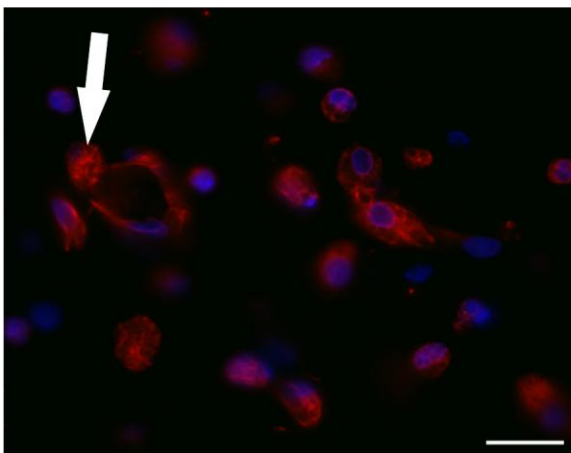
Obr. 12. Velmi intenzivní proliferace, kterou jsme zaznamenali už (a) 3 dny po QA lézi v průběhu dalších dní klesala - (b) 6-7 dní, (c) 14 dní po QA lézi. Snížení exprese BrdU a zmenšení velikosti většiny jader je založeno především na opakovaném dělení a diferenciaci buněk.

Anti-BrdU; měřítko 100 μ m.



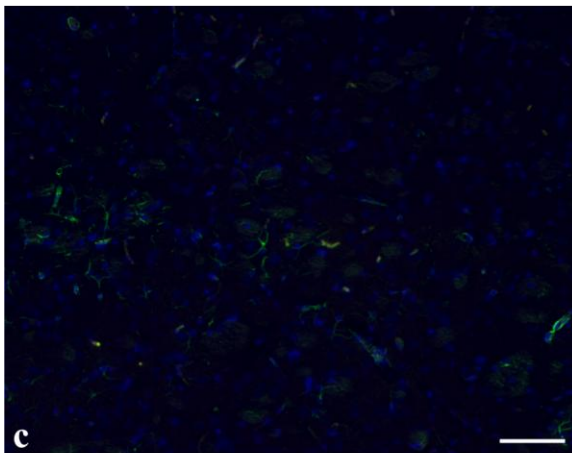
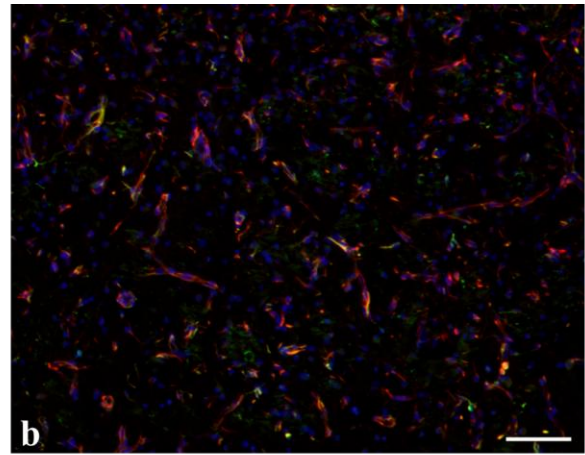
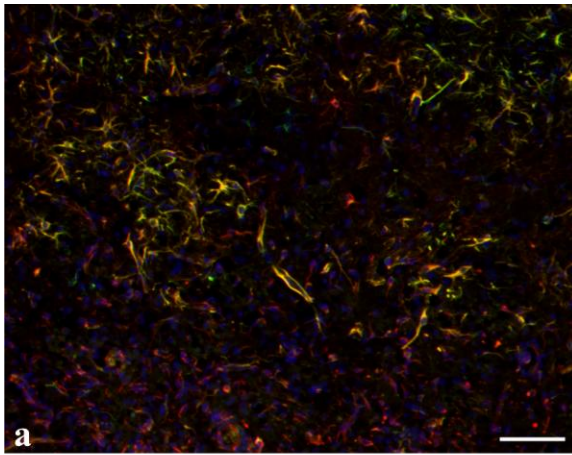
Obr. 13. (a, b) Ve striatu potkanů 3 dny po lézi jsme detekovali velký počet GFAP⁺ astrocytů, ale jen malý počet z těchto astrocytů byl BrdU⁺/GFAP⁺.

Anti-BrdU + anti-GFAP + DAPI; (a) měřítko 50 μ m, (b) měřítko 20 μ m.



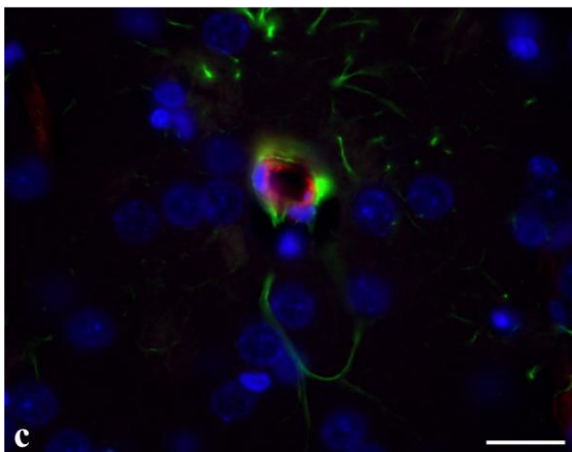
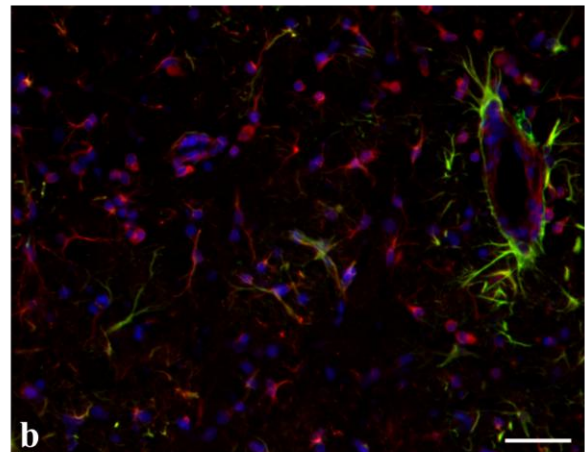
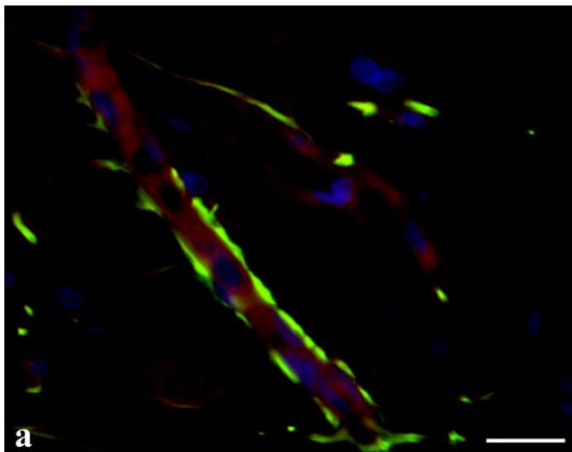
Obr. 14. V důsledku zánětlivé reakce, spojené s aplikací QA (zde u 3 denní léze), dochází v centru léze k aktivaci mikroglie i vycestování makrofágů z krevního řečiště - buňky s typickou vakuolizovanou cytoplasmou; šipka - fagocyt v kontaktu s cévou zatím zde nejsou přítomny žádné GFAP⁺ reaktivní astrocyty.

Anti-VIM + anti-GFAP + DAPI;
měřítko 20 μ m.



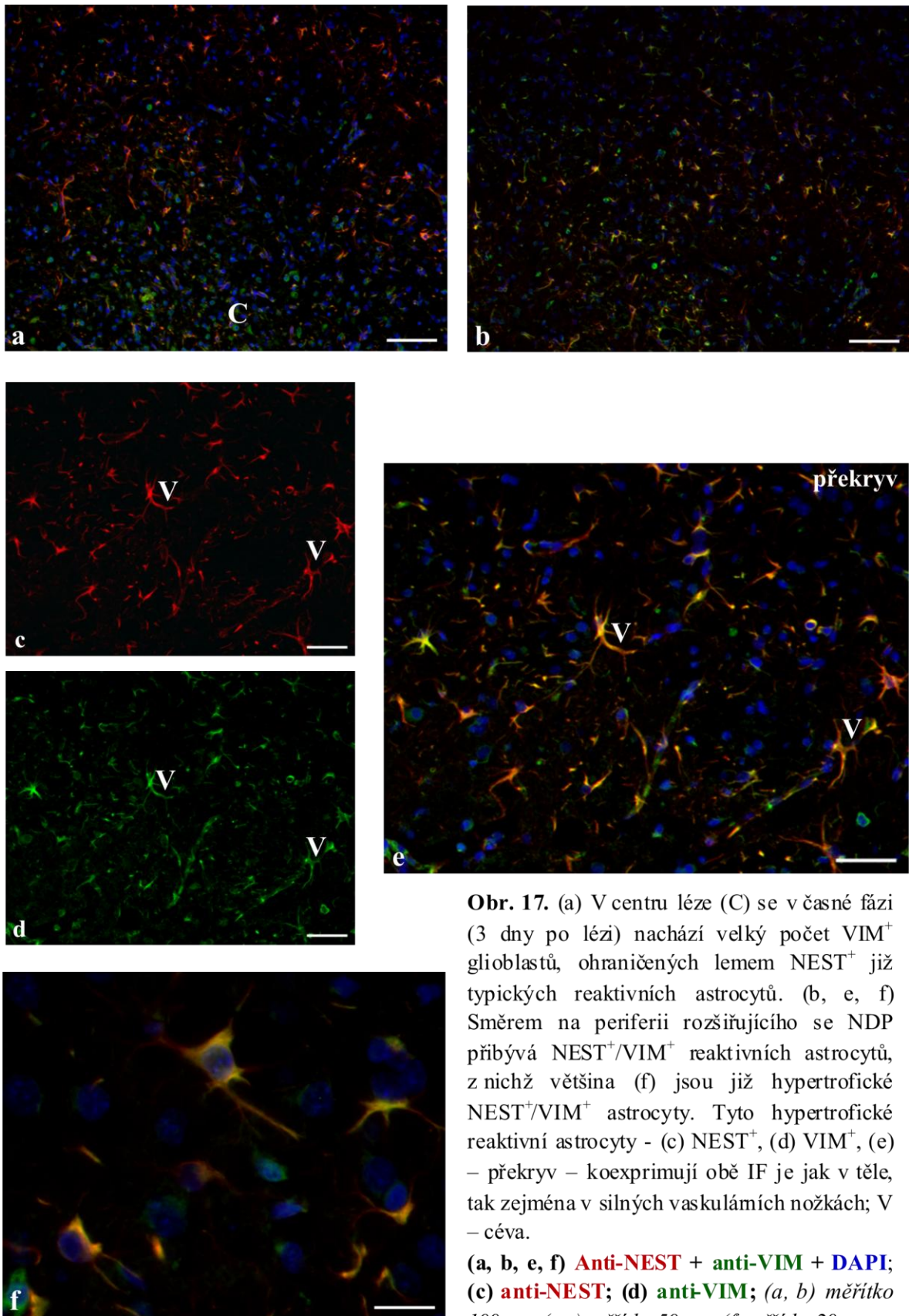
Obr. 15. Exprese nestinu je 3 dny po QA lézi nejvýraznější (a) v oblasti centra léze, kde se nacházejí reaktivní astrocyty, které jsou pouze NEST⁺ (červené) nebo NEST⁺/GFAP⁺ (žluté) a (b) směrem k periferii se snižuje - tady jsou NEST⁺ zejména vaskulární nožky reaktivních astrocytů a aktivované endotelové buňky v cévách. (c) V intaktním striatu astrocyty ani endotel cév nestin neexprimují.

Anti-NEST + anti-GFAP + DAPI; měřítko 100 μm.



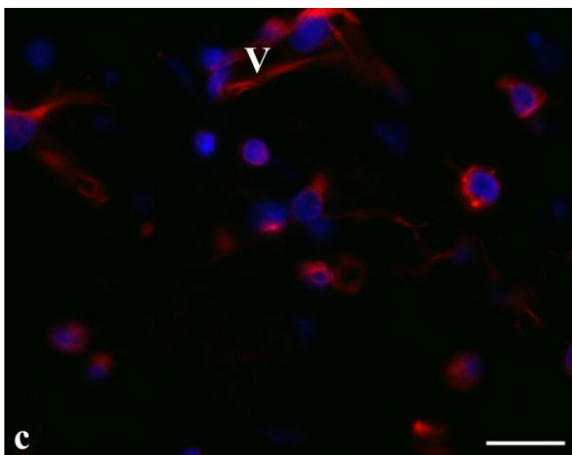
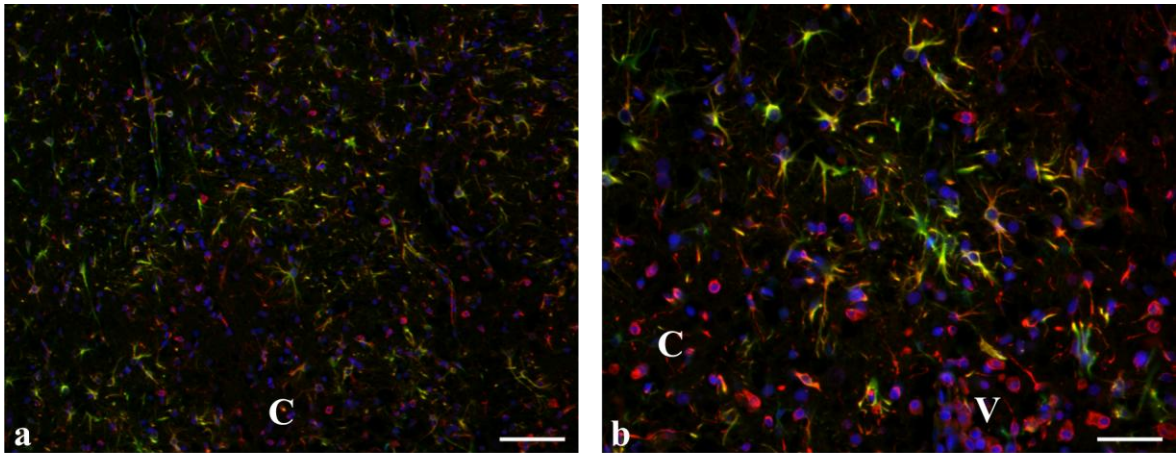
Obr. 16. (a) Endotelové buňky cév v odpovědi na poškození striata (zde 3 dny po QA lézi) exprimují nestin, který se v intaktním striatu nenachází a je tak dokladem aktivace endotelu. Vimentin je exprimován endotelem i buňkami hladké svaloviny (b) ve striatové lézi, ale (c) standardně i v intaktním striatu, proto jeho přítomnost není důkazem aktivace endotelu a neovaskularizace.

(a) Anti-NEST + anti-GFAP + DAPI, (b, c) anti-VIM + anti-GFAP + DAPI; (a, c) měřítko 20 μm, (b) měřítko 50 μm.

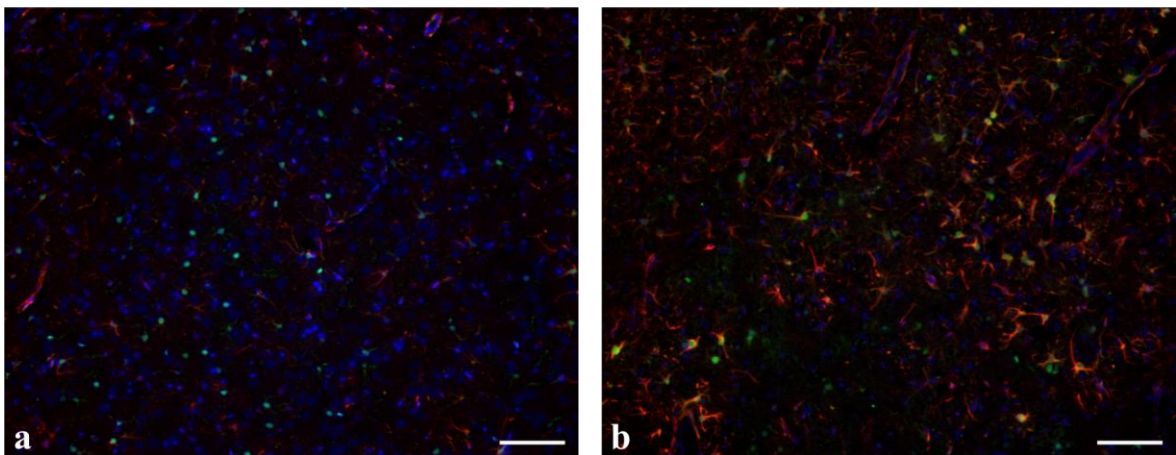


Obr. 17. (a) V centru léze (C) se v časné fázi (3 dny po lézi) nachází velký počet VIM⁺ glioblastů, ohraničených lemem NEST⁺ již typických reaktivních astrocytů. (b, e, f) Směrem na periferii rozšiřujícího se NDP přibývá NEST⁺/VIM⁺ reaktivních astrocytů, z nichž většina (f) jsou již hypertrofické NEST⁺/VIM⁺ astrocyty. Tyto hypertrofické reaktivní astrocyty - (c) NEST⁺, (d) VIM⁺, (e) – překryv – koexprimují obě IF je jak v těle, tak zejména v silných vaskulárních nožkách; V – céva.

(a, b, e, f) Anti-NEST + anti-VIM + DAPI; **(c) anti-NEST;** **(d) anti-VIM;** (a, b) měřítko 100 μ m, (c-e) měřítko 50 μ m, (f) měřítko 20 μ m.

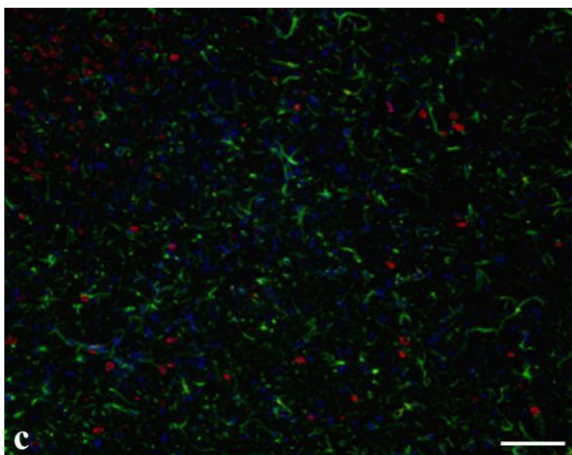
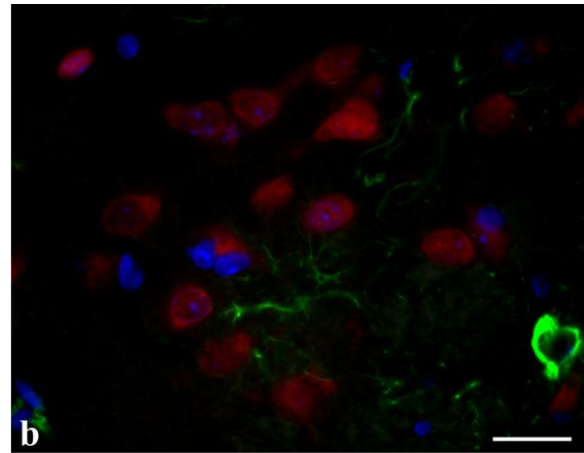
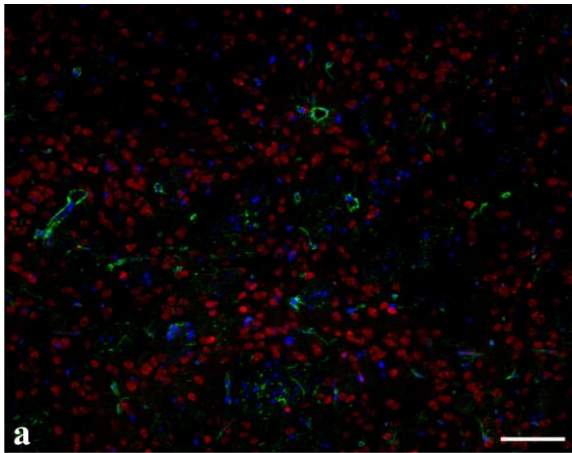


Obr. 18. (a, b) Expres vimentinu je za 3 dny po QA lézi výrazná jak (c) v nezralých glioblastech s malým počtem krátkých výběžků (některé teprve bez výběžků - apolární) v centru léze (C), tak i v reaktivních astrocytech, které se nacházejí směrem na periferii léze; většina těchto reaktivních astrocytů je GFAP⁺/VIM⁺ (žluté); V – céva. **Anti-VIM + anti-GFAP + DAPI**; (a) měřítko 100 μ m, (b) měřítko 50 μ m, (c) měřítko 20 μ m.



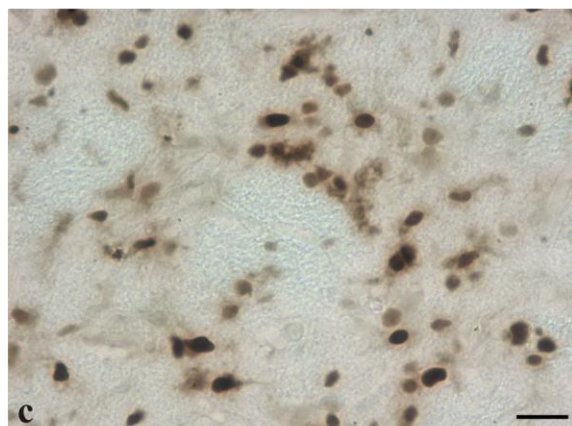
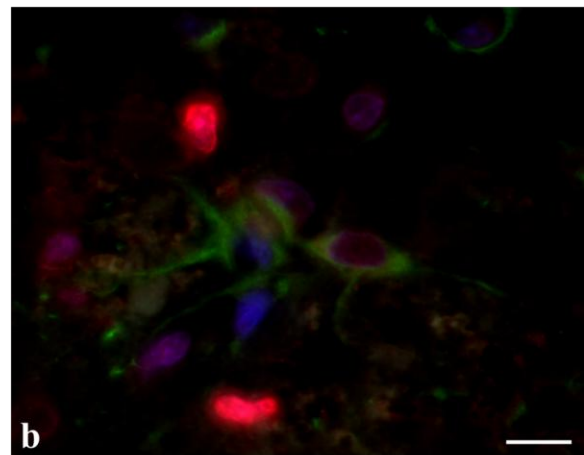
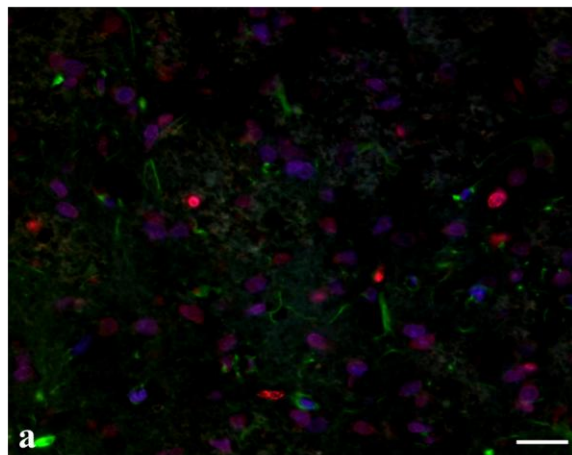
Obr. 19. (a) S100 β protein je v intaktním striatu typicky exprimován především v jádrech astrocytů. (b, c) Za 3 dny po QA lézi se exprese S100 β zvyšuje pouze v centru léze a blízkém okolí. Reaktivní astrocyty (b) GFAP⁺/S100 β ⁺ nebo (c) VIM⁺/S100 β ⁺ se ve větším počtu nacházejí kolem cév (V).

(a, b) **Anti-GFAP + anti-S100 β + DAPI**, (c) **anti-VIM + anti-S100 β + DAPI**; (a, b) měřítko 100 μ m, (c) měřítko 50 μ m.



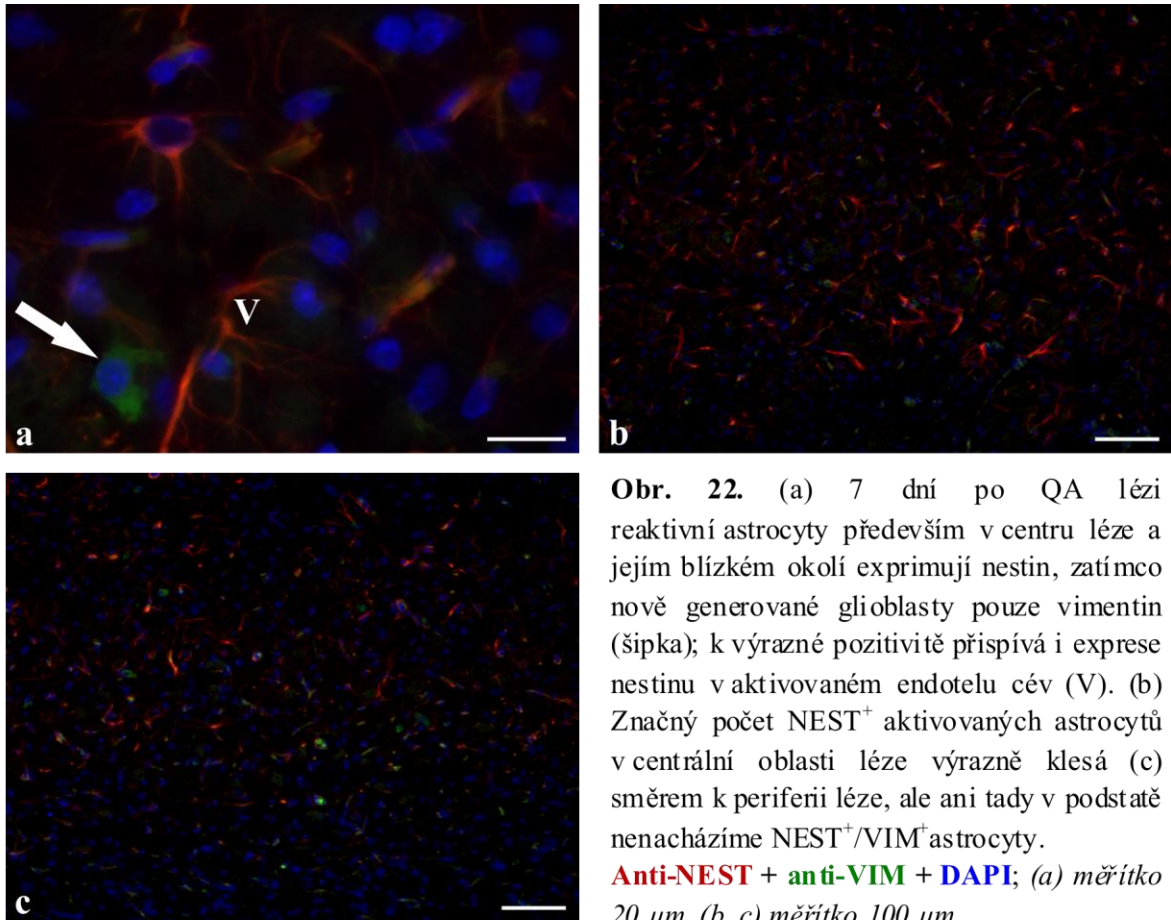
Obr. 20. (a, b) V porovnání s intaktním striatem je (c) za 7 dní po aplikaci QA viditelný zánik většiny NeuN⁺ neuronů; neurony, které jsou doposud přítomny na okraji rozšiřující se zóny NDP, vykazují známky různého stupně degenerace; v NDP postiženém striatu naopak výrazně přibýlo GFAP⁺ reaktivních astrocytů.

Anti-NeuN + anti-GFAP + DAPI; (a, c) měřítko 100 μ m, (b) měřítko 20 μ m.



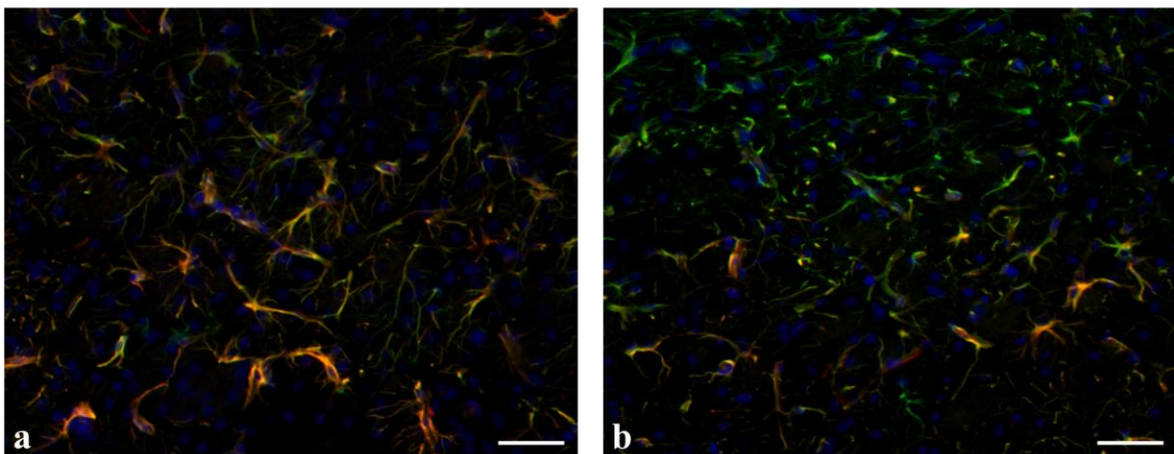
Obr. 21. (a, b) Snižující se pozitivita BrdU za 7 dní po QA lézi dokládá opakované dělení buněk především v blízkosti centra léze. Koexprese BrdU a nestinu, která by prokázala diferenciaci nově vzniklých buněk v astrocyty, je však jen ojedinělá. (c) Exprese PCNA potvrzuje výraznou proliferaci v této oblasti.

(a, b) Anti-BrdU + anti-NEST + DAPI, (c) **anti-PCNA;** (a, c) měřítko 20 μ m, (b) měřítko 10 μ m.



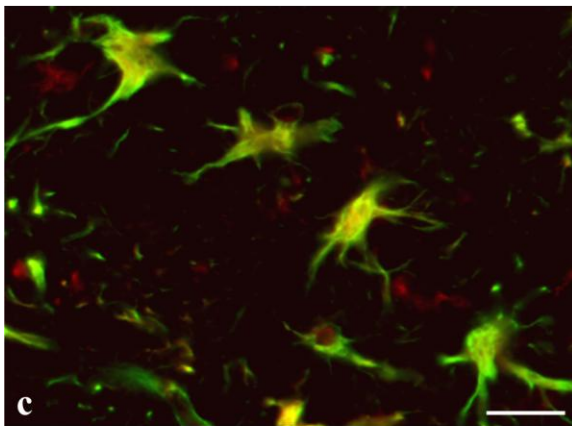
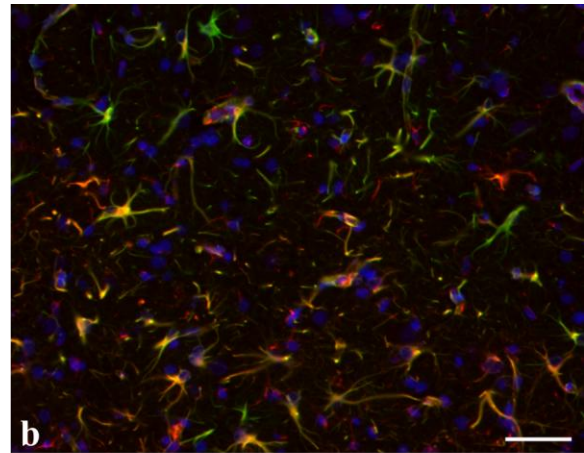
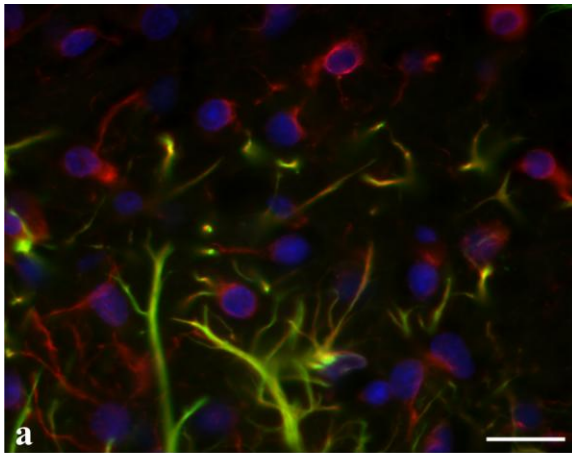
Obr. 22. (a) 7 dní po QA lézi reaktivní astrocyty především v centru léze a jejím blízkém okolí exprimují nestin, zatímco nově generované glioblasty pouze vimentin (šipka); k výrazné pozitivitě přispívá i exprese nestinu v aktivovaném endotelu cév (V). (b) Značný počet NEST⁺ aktivovaných astrocytů v centrální oblasti léze výrazně klesá (c) směrem k periférii léze, ale ani tady v podstatě nenacházíme NEST⁺/VIM⁺ astrocyty.

Anti-NEST + anti-VIM + DAPI; (a) měřítko 20 μm , (b, c) měřítko 100 μm .



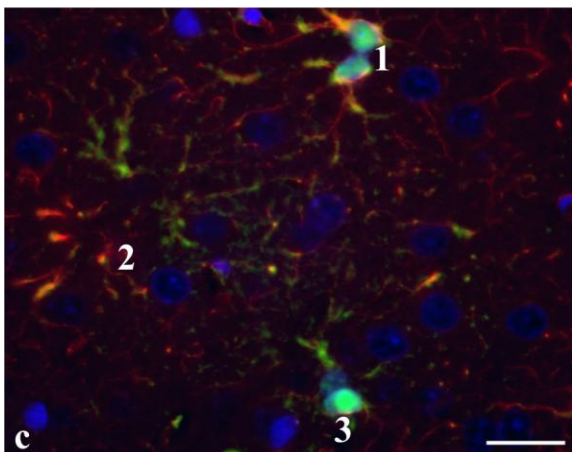
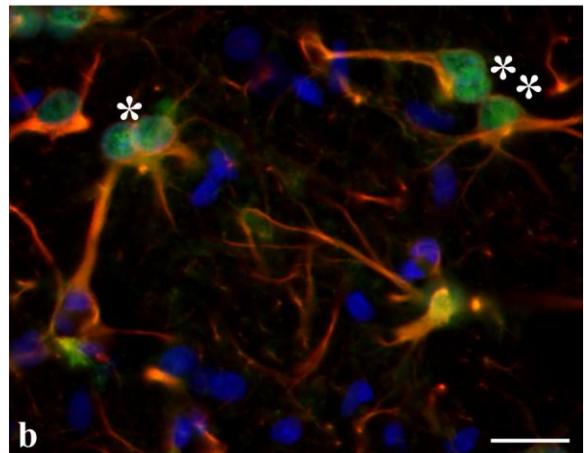
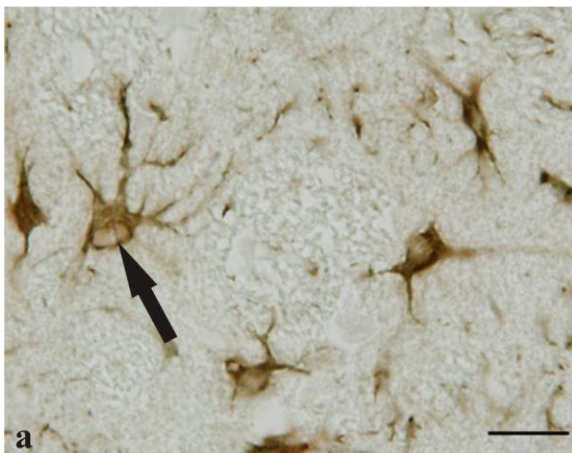
Obr. 23. (a) Naopak koexprese nestinu a GFAP je typická pro reaktivní astrocyty v centru léze, zatímco (b) směrem k okraji klesá a většina reaktivních astrocytů exprimuje pouze GFAP.

Anti-NEST + anti-GFAP + DAPI; měřítko 50 μm .



Obr. 24. (a) V centru 7 denní léze se nacházejí VIM⁺ nezralé astroblasty a mezi ně zabíhají reaktivní, většinou (b) VIM⁺/GFAP⁺ astrocyty. (c) Tyto VIM⁺/GFAP⁺ hypertrofní reaktivní astrocyty mají výrazně zvětšená těla a silné výběžky, z nichž nejnápadnější jsou vaskulární nožky.

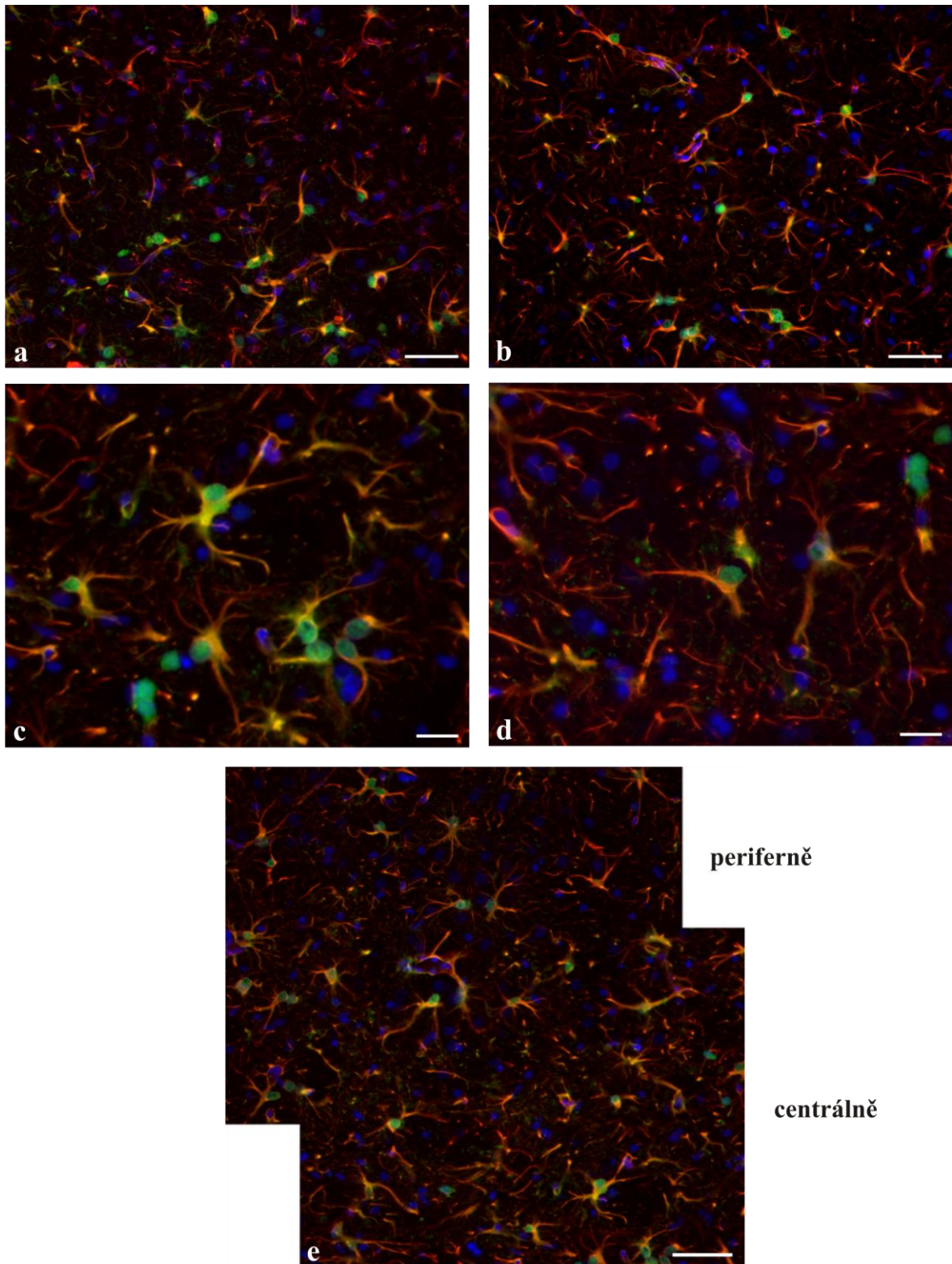
Anti-VIM + **anti-GFAP** + **DAPI**; (a, c) měřítko 20 μ m, (b) měřítko 50 μ m.



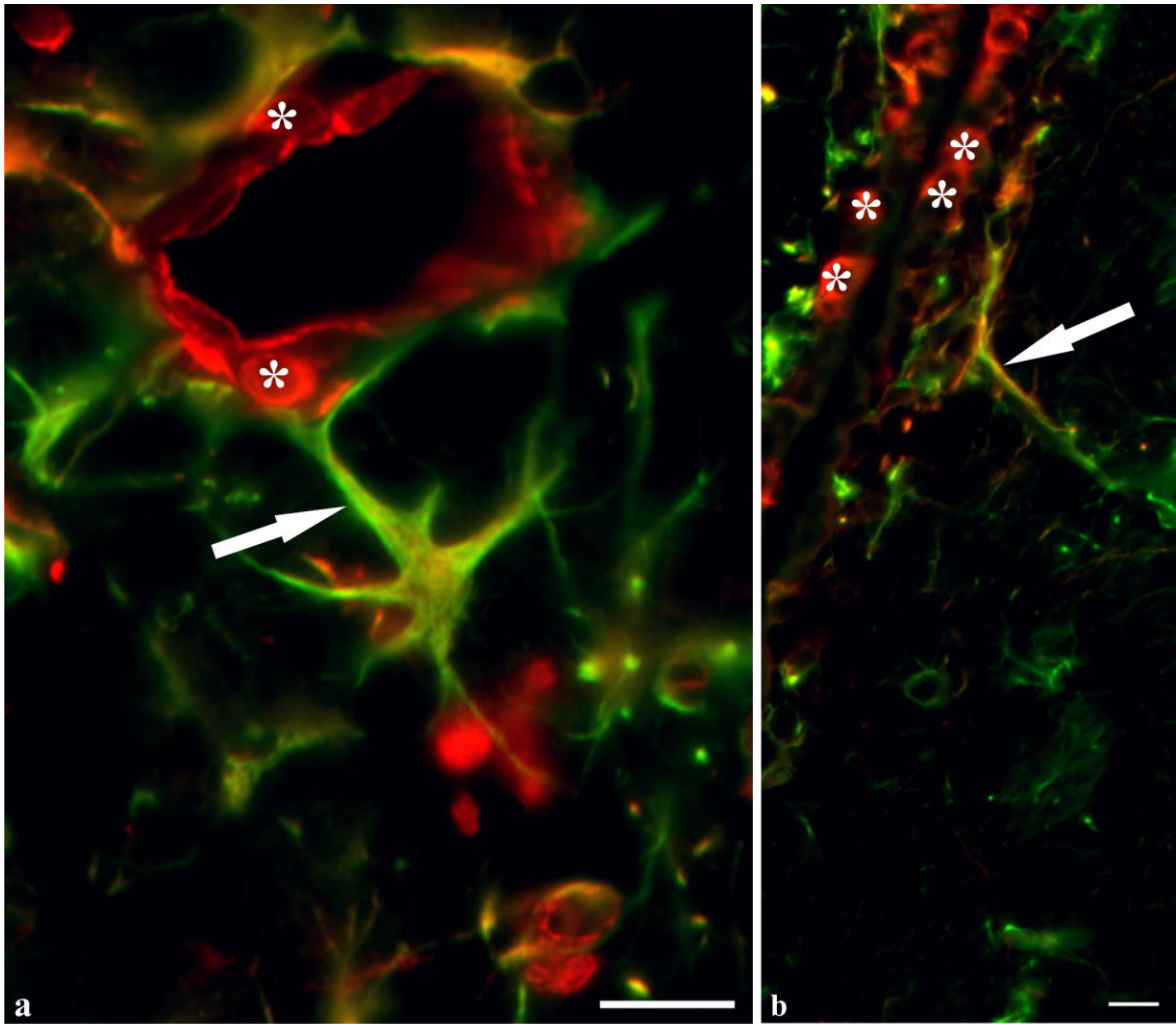
Obr. 25. (a, b) Charakteristickým znakem hypertrofních reaktivních astrocytů je přítomnost silných svazků GFAP⁺ (příp. VIM⁺/GFAP⁺ - viz předchozí obrázek) gliofilament v cytoplasmě; v některých vidíme i dělící se jádra (šipka). I když tyto astrocyty exprimují i S100 β protein, jeho pozitivita je lokalizovaná téměř výhradně jen v jádrech; dobře je tak patrné i dělení těchto buněk - (*) dvě S100 β ⁺ jádra těsně u sebe a jejich postupné oddalování (**). (c) Naproti tomu v intaktním striatu jsou GFAP⁺/S100 β ⁺ (1) astrocyty přítomny v menším počtu a jejich výběžky jsou vždy jemnější, velmi dlouhé a bohatě větvené, avšak GFAP-pozitivitu vykazují v podstatně menším rozsahu; některé

astrocyty jsou GFAP⁺/S100 β ⁻ (2), ale častěji GFAP⁺/S100 β ⁺ (3) opět s velmi početnými, dlouhými a bohatě větvenými výběžky, tedy typické plasmatické astrocyty.

(a) **Anti-GFAP**, (b, c) **anti-GFAP** + **anti-S100 β** + **DAPI**; (a) měřítko 50 μ m, (b, c) měřítko 20 μ m.

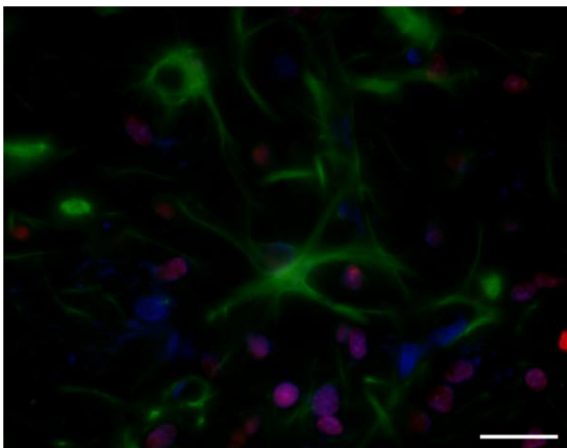


Obr. 26. (a-e) 7 dní po QA lézi počet $S100\beta^+$ astrocytů výrazně vzrostl, (a-c) zejména v centru léze. Tyto reaktivní, většinou hypertrofické astrocyty jsou (a) $VIM^+/S100\beta^+$ a/nebo (b-e) $GFAP^+/S100\beta^+$. (a-c, e) V centrální oblasti léze je $S100\beta$ protein lokalizován nejen v jádře hypertrofických reaktivních astrocytů, ale již i v odstupech velkých výběžků, zatímco (d, e) na periférii léze je $S100\beta$ protein stále lokalizován pouze v jádře reaktivních astrocytů. (e) Přechod z centrální oblasti (mediálně) do periferie (laterálně) ukazuje rozvoj NDP v akutní fázi. (a) **Anti-VIM + anti-S100β + DAPI**, (b-e) **anti-GFAP + anti-S100β + DAPI**; (a, b, e) měřítko $50\ \mu m$, (c, d) měřítko $20\ \mu m$.



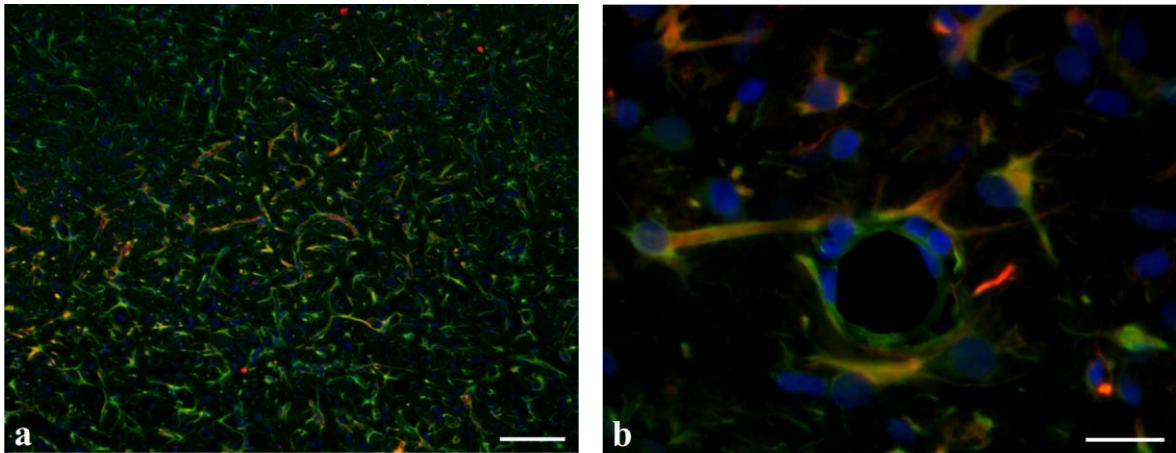
Obr. 27. Vimentin-pozitivní je endotel, lemující lumen všech cév, i buňky hladké svaloviny (*) a to jak (a) ve striatu, postiženém NDP, tak (b) v intaktním striatu (*). Naproti tomu koexprese VIM a GFAP, která je typická zejména pro vaskulární nožky astrocytů (šipka), (a) je výrazná pouze v zesílených nožkách reaktivních astrocytů v NDP postiženém striatu, zatímco (b) u kontrolních intaktních zvířat je tento jev vidět jen zřídka a vaskulární nožky jsou vždy mnohem jemnější.

Anti-VIM + anti-GFAP; měřítko 20 μ m.



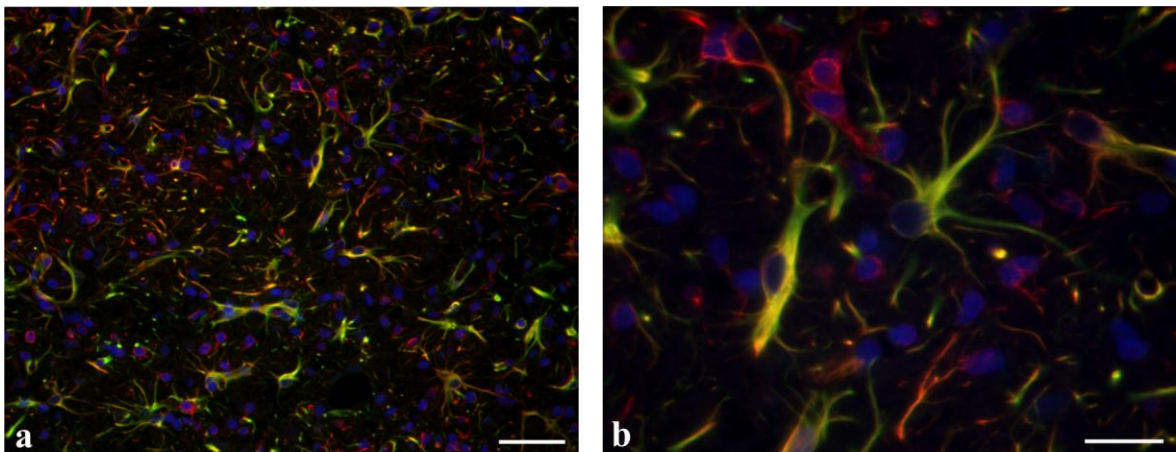
Obr. 28. Ve 14 denní lézi je exprese BrdU v jádrech značených buněk výrazně nižší a je nahrazována znázorněním chromatinu pomocí DAPI.

Anti-BrdU + anti-GFAP + DAPI; měřítko 20 μ m.



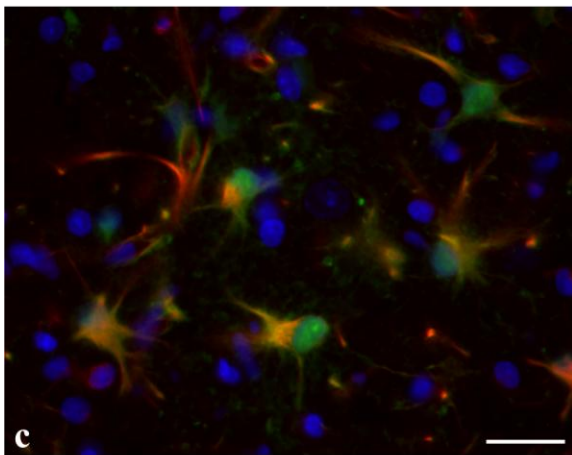
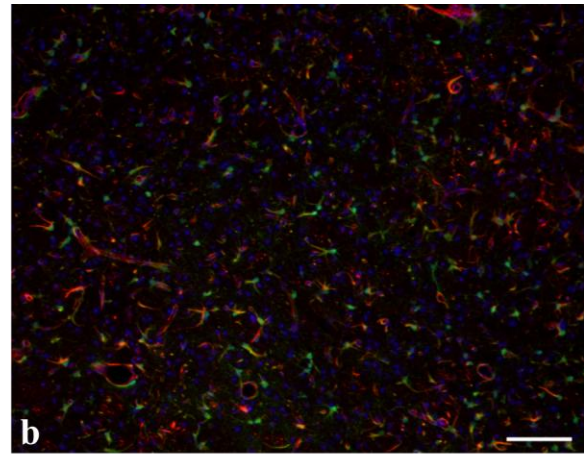
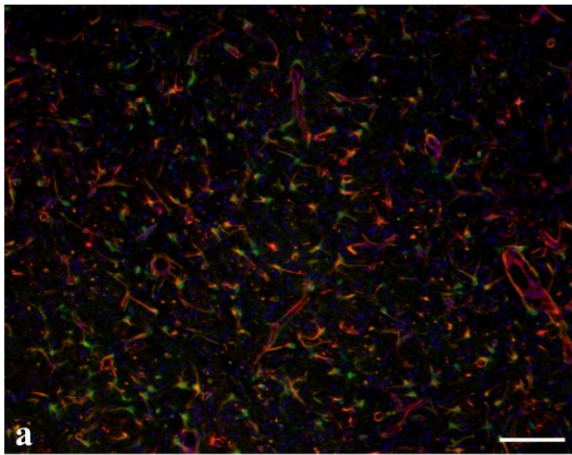
Obr. 29. (a) Počet GFAP⁺ hypertrofických reaktivních astrocytů 14 dní po lézi ještě vzrostl, naopak ubylo nestin⁺ reaktivních astrocytů a (a, b) pozitivita nestinu přetrvává zejména v jejich vaskulárních nožkách; (b) ubývá i cév s aktivovaným NEST⁺ endotelem (zde je pouze VIM⁺).

(a) **Anti-NEST + anti-GFAP + DAPI**, (b) **anti-NEST + anti-VIM + DAPI**; (a) měřítko 100 μm , (b) měřítko 20 μm .



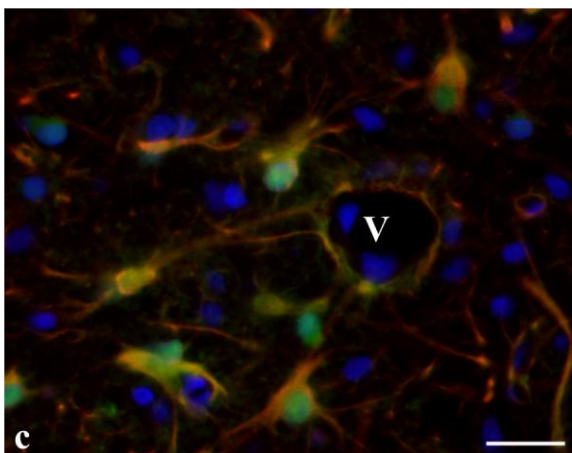
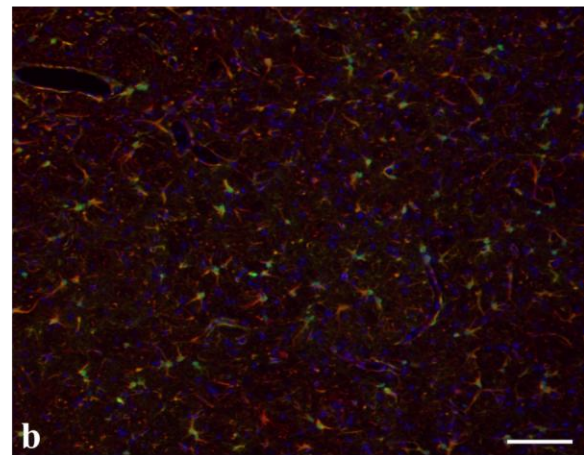
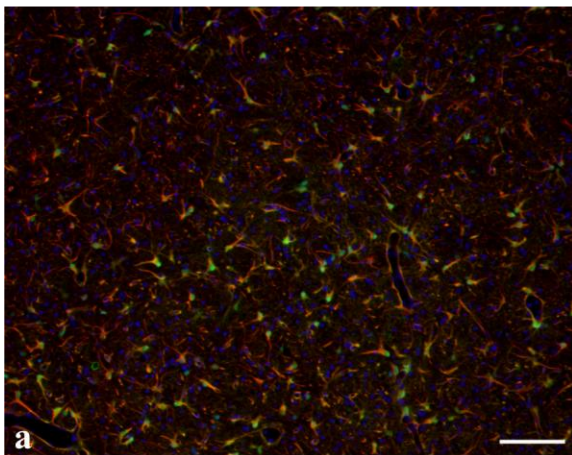
Obr. 30. (a, b) V oblasti centra léze se i po 14 dnech stále ve značném počtu nacházejí VIM⁺ astroblasty, z nichž jen část postupně vyžívá. (b) Zároveň se také zvyšuje počet VIM⁺/GFAP⁺ reaktivních astrocytů.

Anti-VIM + anti-GFAP + DAPI; (a) měřítko 50 μm , (b) měřítko 20 μm .



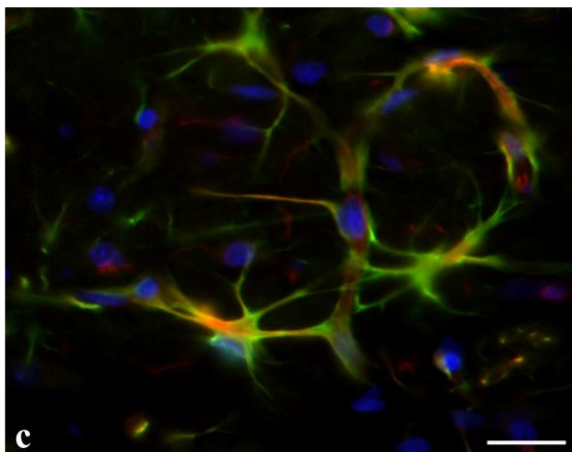
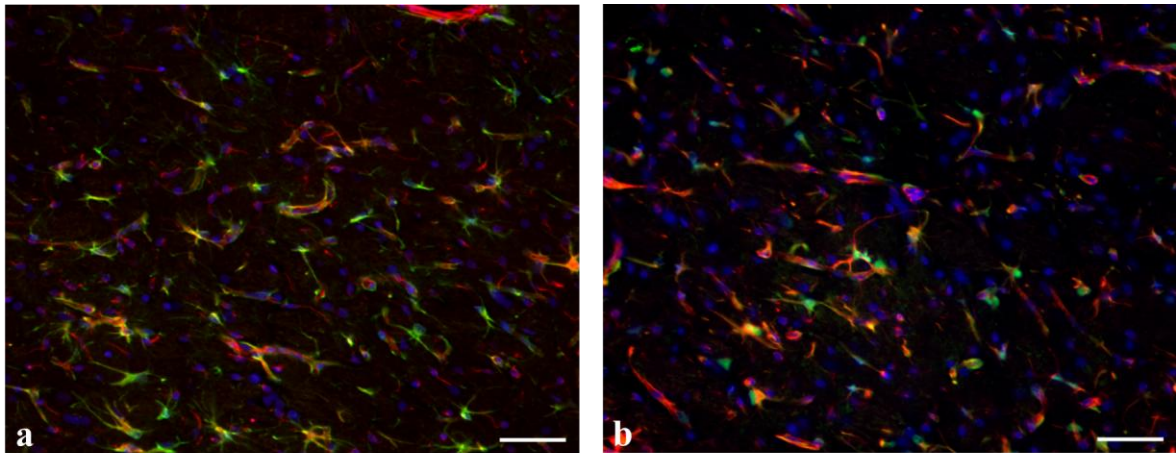
Obr. 31. (a, c) V typických početných hypertrofických $VIM^+/S100\beta^+$ reaktivních astrocytech v centru léze (c) se exprese $S100\beta$ objevuje nejen v jádře, ale již i v odstupu výběžků. (b) V periferní oblasti NDP se zvyšuje počet $S100\beta^+$, resp. $VIM^+/S100\beta^+$ reaktivních astrocytů, které však obvykle nejsou hypertrofické, a celkově zde denzita exprese vimentinu postupně klesá. (c) Z poměrně velkého počtu jader, obarvených pouze DAPI, patří většina nediferencovaným glioblastům, příp. fagocytujícím buňkám, část jader i endotelu v cévách (viz také obr. 32c).

Anti-VIM + anti-S100 β + DAPI; (a, b) měřítko 100 μm , (c) měřítko 20 μm .



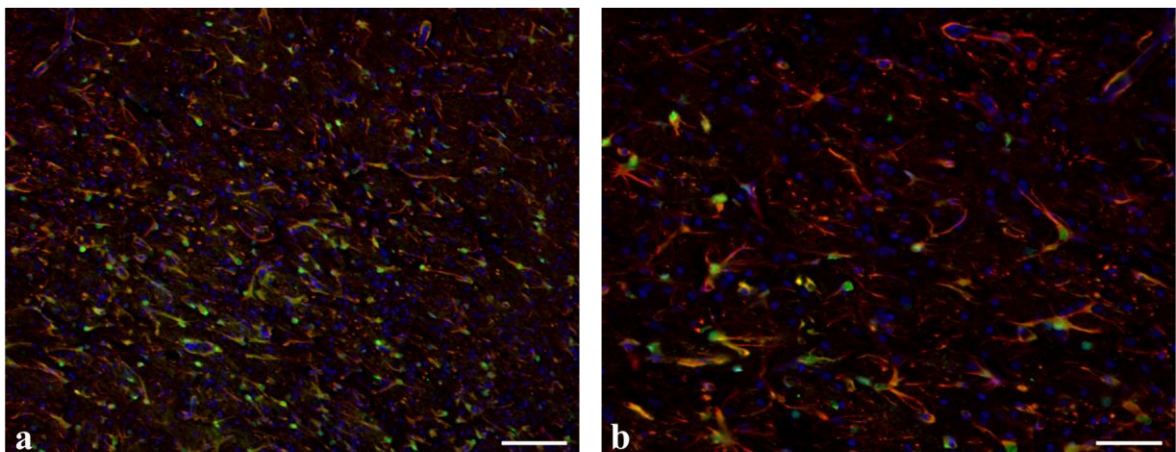
Obr. 32. (a, c) Ještě výraznější je v centru 14 denní léze hustota $GFAP^+/S100\beta^+$ hypertrofických reaktivních astrocytů, která se opět (b) zřetelně snižuje v okrajové oblasti NDP. (c) Silné $GFAP^+$ vaskulární nožky konturují lumina cév (V).

Anti-GFAP + anti-S100 β + DAPI; (a, b) měřítko 100 μm , (c) měřítko 20 μm .



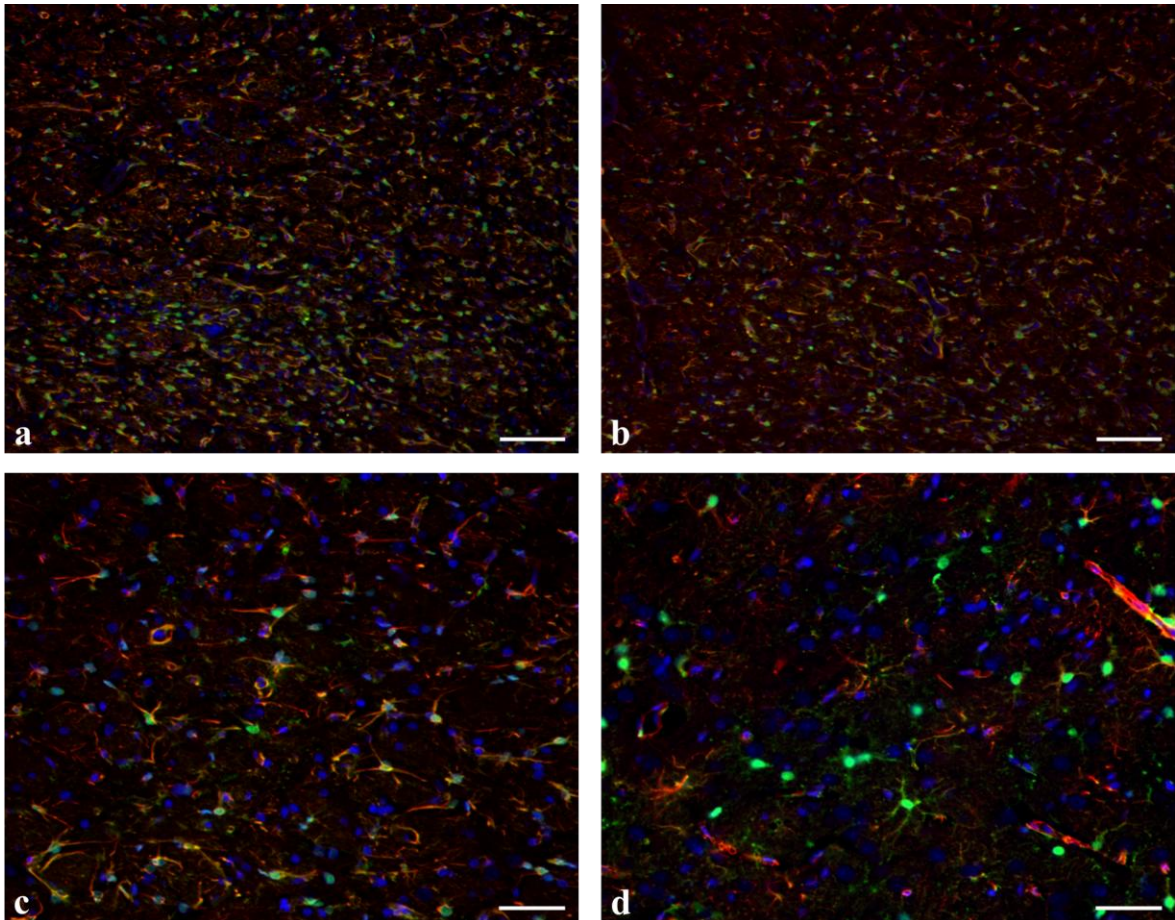
Obr. 33. (a-c) Za 1 měsíc po QA lézi je rozvoj NDP již za svým zenitem, i když jeho progresse dále pozvolna pokračuje, a proces přechází do chronického stadia – proto se také počet reaktivních astrocytů již nezvyšuje. (a-c) Expres vimentinu v této fázi již klesá, zejména právě na periferii NDP a typicky přetrvává ve vaskulárních nožkách reaktivních astrocytů tvořících ztlustělou MLGP - (a, c) zejména v koexpresi s GFAP, (b) méně s S100β proteinem.

(a, c) **Anti-VIM + anti-GFAP + DAPI**, (b) **anti-VIM + anti-S100β + DAPI**; (a, b) měřítko 50 μm, (c) měřítko 20 μm.

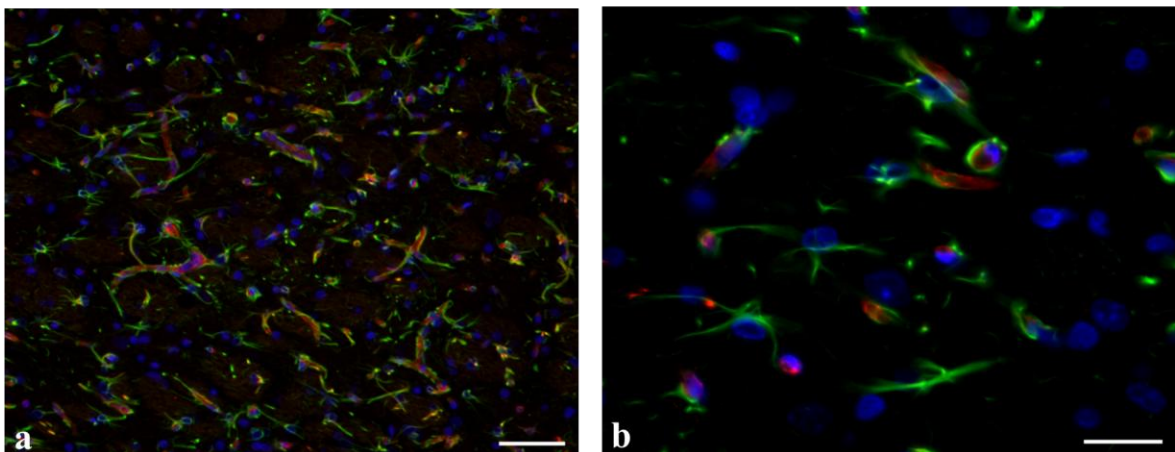


Obr. 34. (a, b) V oblasti NDP (po 1 měsíci) je velký počet GFAP⁺ reaktivních astrocytů – zde v koexpresi s S100β proteinem; počet S100β⁺ buněk se v okolí centra léze překvapivě ještě zvýšil – je exprimován v jádře i ve výběžcích reaktivních astrocytů, ale typicky hlavně ve vaskulárních nožkách.

Anti-GFAP + anti-S100β + DAPI; měřítko 50 μm.

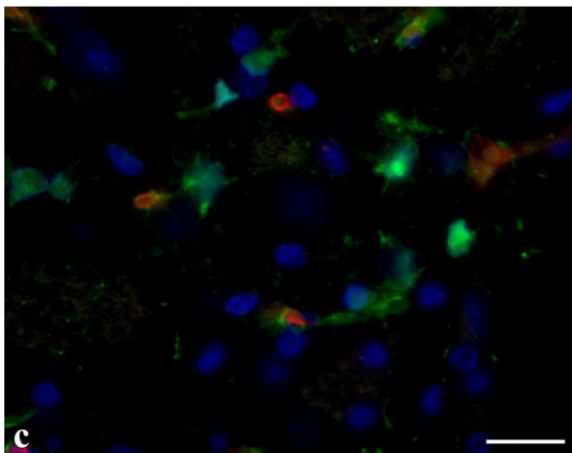
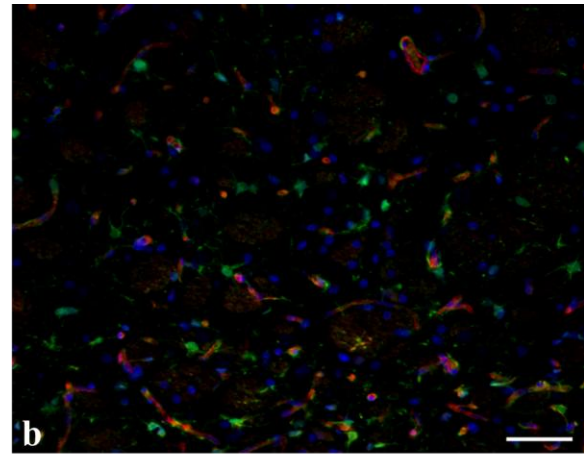
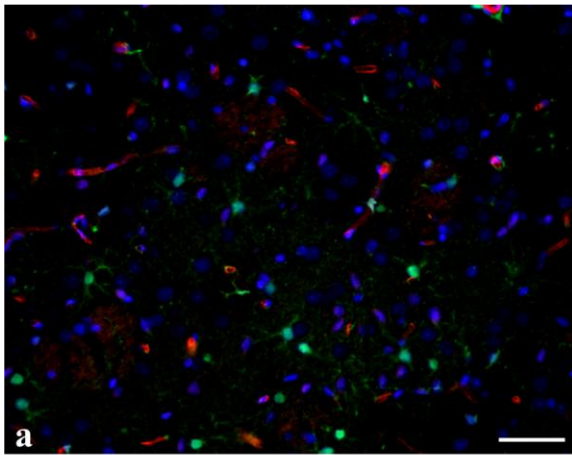


Obr. 35. (a) V centrální oblasti NDP u 3 měsíční léze je velký počet $S100\beta^+$, resp. $GFAP^+/S100\beta^+$ reaktivních astrocytů, zatímco (b, c) na periferii léze $S100\beta^+$ buněk ubývá. (c) Charakteristické znaky reaktivní astrogliózy při plně rozvinutém NDP vyplynou při porovnání (d) s intaktním striatem. **Anti-GFAP + anti-S100 β + DAPI**; (a, b) měřítko 100 μ m, (c, d) měřítko 50 μ m.

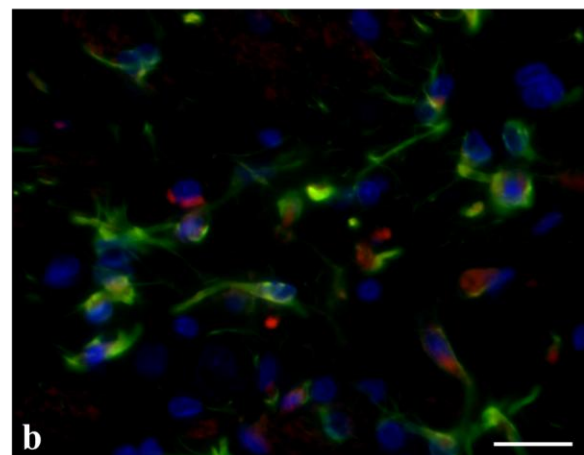
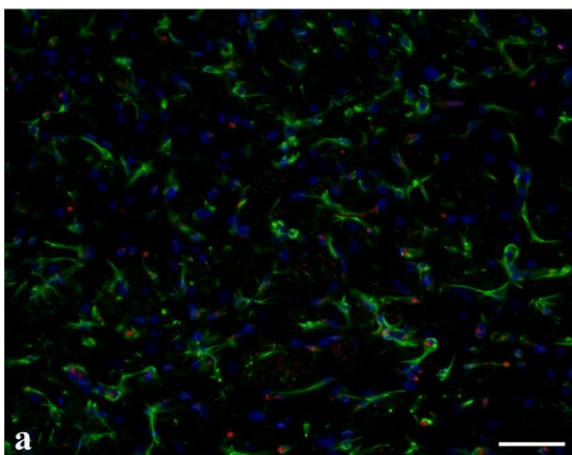


Obr. 36. (a, b) Za 3 měsíce po QA lézi reaktivní astrocyty již neexprimují vimentin; VIM-positivita je pouze ve stěně cév (stejně jako v intaktním striatu – viz obr. 37a), proto také již není v reaktivních astrocytech detekovatelná koexprese VIM a GFAP.

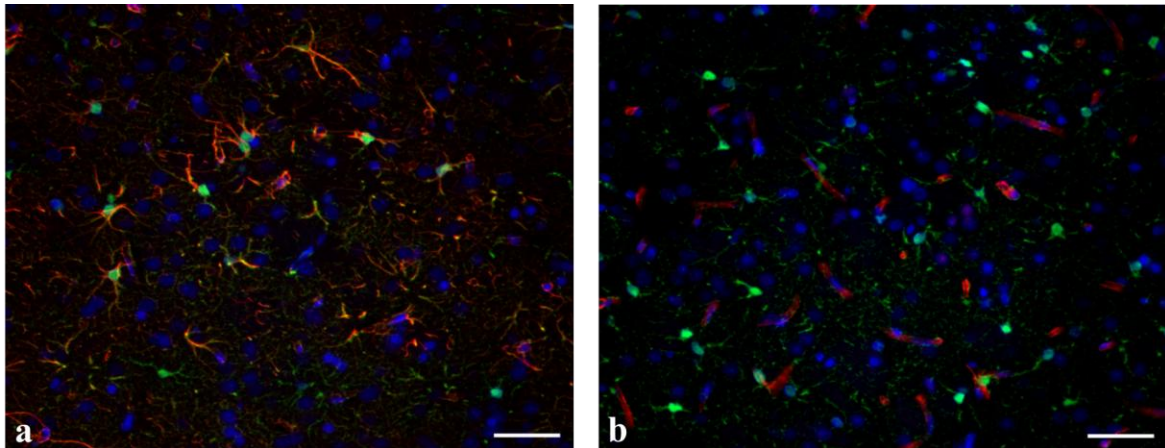
Anti-VIM + anti-GFAP + DAPI; (a) měřítko 50 μ m, (b) měřítko 20 μ m.



Obr. 37. (b, c) Pochopitelně, ze stejného důvodu, tedy vymizení exprese vimentinu v chronické fázi NDP, není již přítomna ani koexprese VIM a S100 β . (a) Expresa VIM v intaktním striatu (pouze v endotelu a v buňkách hladké svaloviny cév). **Anti-VIM** + **anti-S100 β** + **DAPI**; (a, b) měřítko 50 μ m, (c) měřítko 20 μ m.

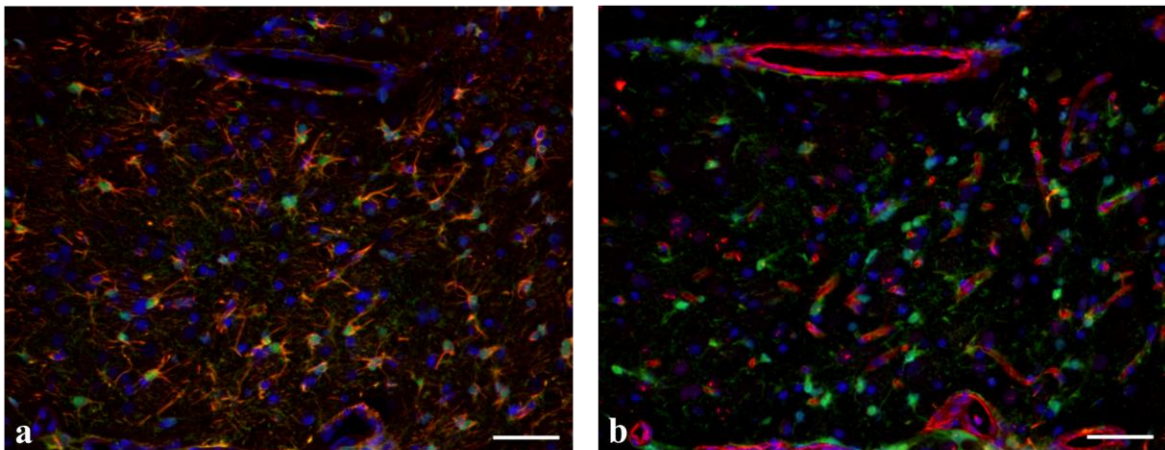


Obr. 38. (a) Reaktivní astrocyty ve 3 měsíční lézi již neexprimují nestin. (b) Nestin⁺ je pouze aktivovaný endotel, který však nacházíme již jen malém počtu cév v centrální části léze. **Anti-NEST** + **anti-GFAP** + **DAPI**; (a) měřítko 50 μ m, (b) měřítko 20 μ m.



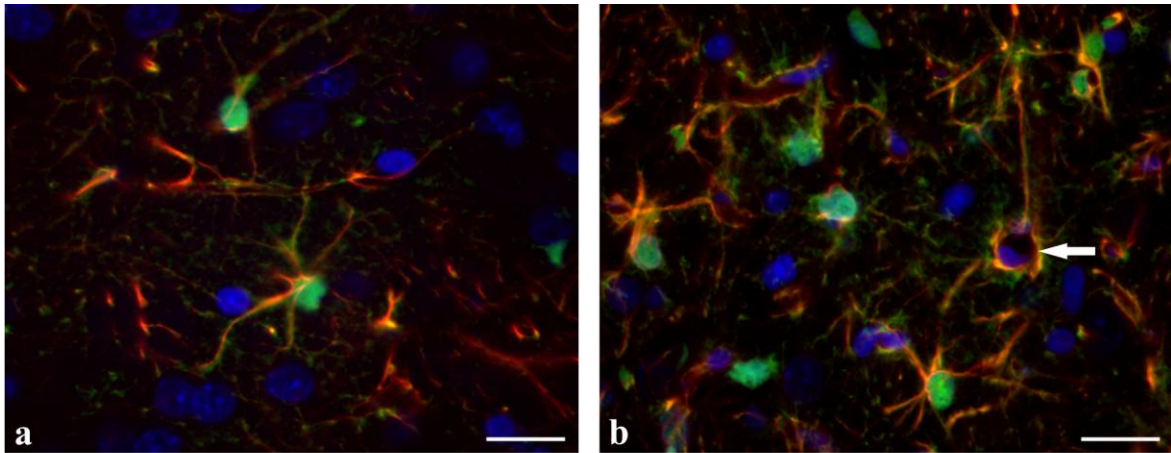
Obr. 39. (a) Ve striatu 6 měsíčních kontrolních zvířat se začínají projevovat věkové změny – mírně se zvyšuje počet GFAP⁺ astrocytů, ale zejména přibývá GFAP⁺ gliofilament v jejich hlavních výběžcích (tedy především ve vaskulárních nožkách). (a, b) Mírně stoupá i počet S100β⁺ astrocytů, to znamená, že s věkem přibývá v parenchymu gliové složky v důsledku (fyziologického) zániku některých neuronů. (b) Vimentin je exprimován pouze ve stěně cév, které v intaktním striatu nejsou příliš početné.

(a) **Anti-GFAP + anti-S100β + DAPI**, (b) **anti-VIM + anti-S100β + DAPI**; měřítko 50 μm.



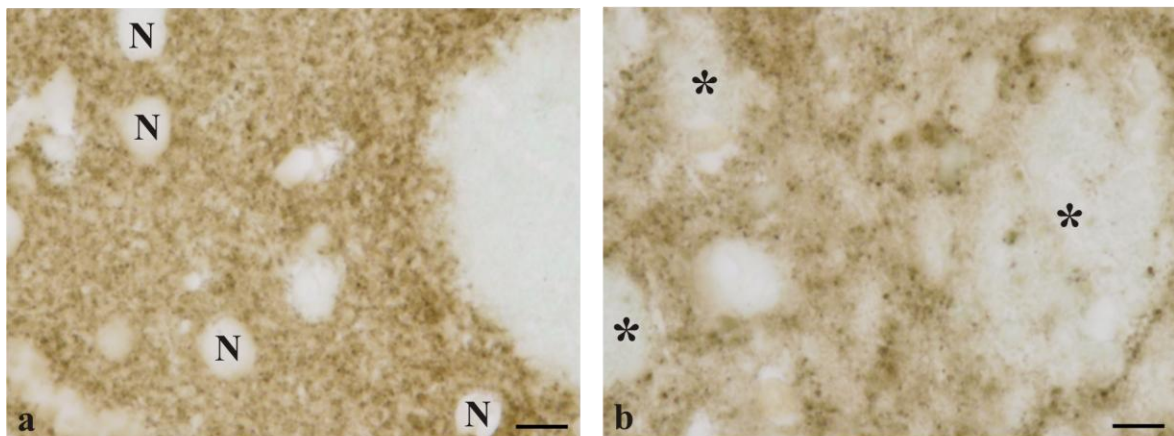
Obr. 40. (a) Zřetelný rozdíl ve struktuře striata u potkanů za 6 měsíců po QA lézi je dán výraznou reaktivní astrogliózou, která se rozvinula ve většině striata v důsledku progredujícího (v této fázi již chronického) NDP. (b) Expres vimentinu spolehlivě značí cévy, kterých je zde, v důsledku rozvoje NDP zejména v akutní fázi procesu, mnohem více než v intaktním striatu.

(a) **Anti-GFAP + anti-S100β + DAPI**, (b) **anti-VIM + anti-S100β + DAPI**; měřítko 50 μm.



Obr. 41. Porovnáme-li strukturu striata u potkanů (b) 6 měsíců po QA lézi, tj. v chronické fázi NDP, a (a) u stejně starých kontrolních zvířat, vidíme zřetelný rozdíl (b) v počtu GFAP⁺ i GFAP⁺/S100β⁺ reaktivních astrocytů v NDP postiženém striatu, ale vzhledem k tomu, že na reaktivní astroglióze se zde již nepodílejí hypertrofické astrocyty, velikostí se výrazněji neodlišují od (a) reaktivních astrocytů, kterých přibývá s věkem u intaktních zvířat; typické pro astrocyty reaktivní gliózy jsou obvykle mohutnější výběžky – především vaskulárními nožky, které tak vytvářejí zbytnělou MLGP charakteristicky konturující cévy („prstence“) – šipka – i tento znak se však s pokračujícím věkem zvířat objevuje u astrocytů v intaktním striatu.

Anti-GFAP + anti-S100β + DAPI; měřítko 20 μm.



Obr. 42. (a) V porovnání s kontrolním striatem je (b) za 6 měsíců po QA lézi snižena hustota synapsí ve vazbě na signifikantní prořidnutí neuropilu provázející rozvinutý NDP. (N) jádra striatových neuronů, (*) svazky myelinizovaných axonů.

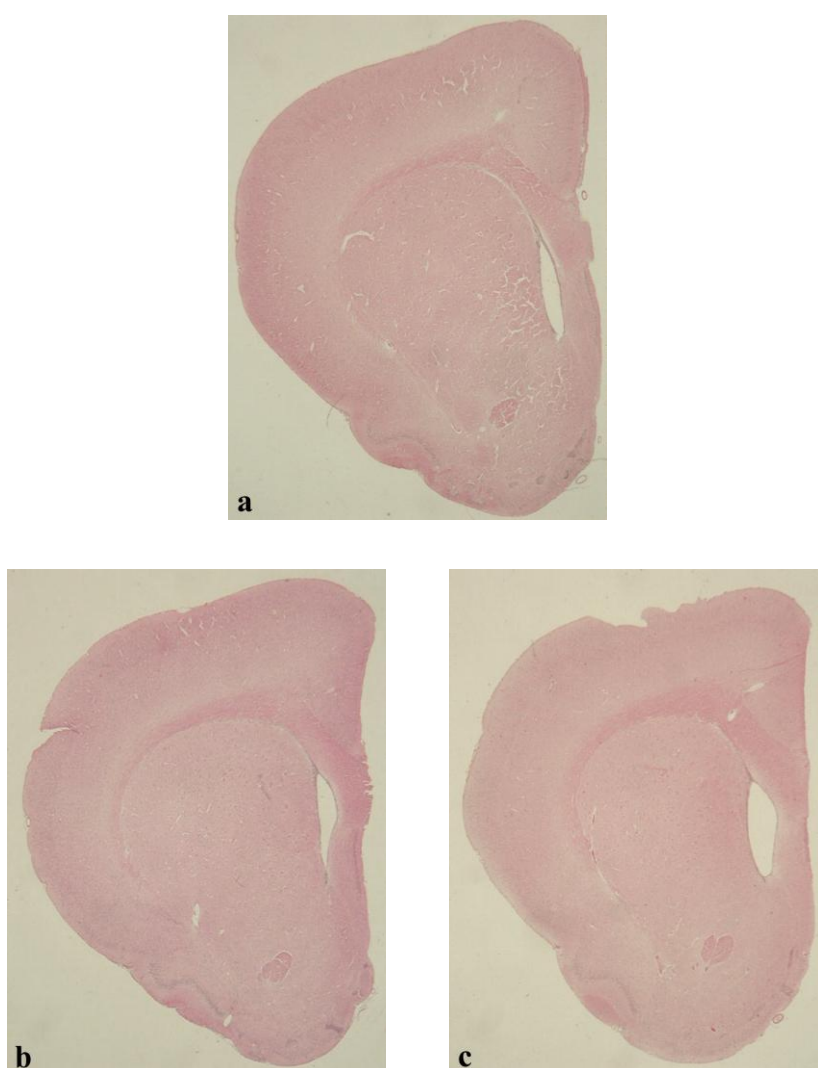
Anti-Synaptophysin; měřítko 20 μm.

4.2. Genetický model – potkani transgenní pro Huntingtonovu chorobu

Sledovali jsme rozvoj neurodegenerativních změn ve striatu u 2, 6, 12, 18 a 22-24 měsíčních tgHD potkanů a jejich wild-type kontrol. Jednotlivé věkové skupiny jsme vytvořili na podkladě doposud publikovaných prací, které charakterizují tgHD a wt potkany.

4.2.1. Morfologické hodnocení

Zjistili jsme, že rozvoj NDP ve striatu tgHD potkanů probíhá velmi pomalu a výraznější změny se objevují až u zvířat starých nejméně 1 rok.



Obr. 43. (a) Laterální komory jsou v mozku mladých intaktních (2 měsíčních wt) potkanů poměrně úzké. NDP fenotypu HD vyúsťuje v atrofii striata a následné rozšíření postranních mozkových komor – velmi mírné rozšíření můžeme pozorovat již (b) u 6 měsíčních tgHD potkanů, (c) atrofii striata s výraznějším rozšířením laterálních komor však až u 18 (a 24) měsíčních tgHD potkanů. **H&E**; zvětšení 16x.

U **2 měsíce** starých tgHD potkanů jsme nezaznamenali žádné morfologické odlišnosti od stejně starých wt zvířat, proto následně uvedená charakteristika platí shodně pro transgenní i wt zvířata. Veškeré nálezy jsou také stejné s charakteristikou stejně starých potkanů, použitých jako kontroly u QA lézí. Laterální mozkové komory jsou symetrické a poměrně úzké (obr. 43a).

Striatové neurony (β -III-tubulin⁺/MAP2⁺ a Bodian⁺), resp. jejich jádra (NeuN⁺ a Bodian⁺), jsou u wt i tgHD potkanů seskupené do typických shluků, a i když mají variabilní velikost (obr. 46c porovnej s 46d), převažují zde poměrně velké neurony (obr. 46a, 47a). Odstupy velmi početných dendritů (s dendritickými trny) vytvářejí charakteristickou β -III-tubulin-pozitivitu neuropilu kolem těl neuronů (obr. 47a). Jádra těchto neuronů jsou typicky velmi světlá (tedy s jemně rozptýleným chromatinem) s 1 výrazným jadérkem (obr. 44a). Densitě neuropilu (obr. 44a) odpovídá i velká hustota synapsí (obr. 48a), které (v porovnání se starými zvířaty, zejména tgHD - obr. 48b, 48c) lze charakterizovat jako „jemné“. Morfologická charakteristika striata je tedy totožná s nálezy u intaktních mladých zvířat ze skupiny s neurotoxickou lézí (viz kap. 4.1.1.1.).

Počet GFAP⁺ astrocytů u takto mladých zvířat je jen malý (obr. 50a, 51e). I u této skupiny (wt i tgHD potkanů) platí, že nejvýraznější GFAP-pozitivitu vykazují vaskulární nožky astrocytů, jejichž rozšířená oploštělá zakončení výrazně ohraničují lumina cév (obr. 50a). Přibližně stejně početné jsou i GFAP⁺/S100 β ⁺ astrocyty a jen ojediněle nacházíme GFAP⁺/S100 β ⁺ glii. S100 β protein je lokalizován především v jádrech a tělech astrocytů a z něho odstupujících kmenových výběžcích (obr. 51e). Jen výjimečně jsme našli BrdU⁺ jádra právě rozdělených gliových buněk (obr. 49a).

Expresi nestinu jsme nezaznamenali ani v gliových buňkách ani v endotelu cév, to znamená, že k žádné jejich aktivaci nedošlo. Stejně tak vimentin⁺ byl pouze endotel a hladká svalovina ve stěně cévní, ale žádné astrocyty, stejně jako u intaktních zvířat v předchozí skupině (viz kap. 4.1.1.1.).

I když u skupiny **6 měsíčních** tgHD potkanů nelze ještě postihnout změny v objemu striata, tedy jeho atrofii, u všech hodnocených tgHD potkanů jsme zaznamenali velmi mírné rozšíření postranních mozkových komor (obr. 43b) v porovnání z kontrolními wt potkany a zejména s 2 měsíčními zvířaty (obr. 43a). Jako první příznak NDP jsme zde (v porovnání se stejně starými wt potkany - obr. 47b) zjistili především zmenšování velikosti neuronů/jader, avšak jen u malého počtu (resp. jen v některých skupinách) striatových neuronů (obr. 44c, 47e). Degenerujících neuronů bylo v této skupině ještě

poměrně málo, výjimečně jsme nacházeli i zanikající hyperchromní (tmavé/denzní) neurony s pyknotickým jádrem (obr. 44c). Téměř nezměněná byla i hustota a charakter neuropilu (porovnej obr. 47b a 47e) - i když na některých místech striata byla textura o málo řidší – a proto jsme také nenašli žádné změny na synapsích.

V porovnání se stejně starými wt potkany (obr. 51a) se mírně zvyšuje počet GFAP⁺ astrocytů (obr. 50d), ale nelze říci, že by se jednalo o reaktivní gliózu. Na rozdíl od reaktivních astrocytů v neurotoxické lézi jsou změny v morfologii těchto buněk jen velmi pozvolné. Jejich těla nejsou výrazněji zvětšená (nejedná se tedy o hypertrofické astrocyty), typické je zejména zvýraznění jejich výběžků postupným přibýváním gliofilament a tím zvyšování denzity GFAP (obr. 50d). Nejnápadnější je opět zvýraznění gliové perivaskulární membrány (porovnej obr. 50d a 50a). V expresi S100 β proteinu jsme však nenašli žádné rozdíly oproti mladým potkanům, tedy nemění se počet GFAP⁺/S100 β ⁺ ani GFAP⁻/S100 β ⁺ astrocytů. Astrocyty ve striatu kontrolních (wt) zvířat se nijak nelišily od předchozí wt skupiny (porovnej obr. 51e a 51a).

U **12 měsíčních** tgHD potkanů bylo již patrné rozšíření laterálních komor, i když (v porovnání s potkany s neurotoxickou lézí) stále jen mírné. Úbytek neuronů je v této skupině již výraznější. Charakteristickým projevem však nadále zůstává zmenšování objemu těl (tedy i jader) striatových neuronů (při zachování nukleo-cytoplasmatického poměru - obr. 44d, 45b), které vynikne v porovnání s mladšími potkany (zejména kontrolními - obr. 44a, 46a, 46c, ale i tgHD – obr. 44c). Tento jev potvrzuje například i detekce β -III-tubulinu, který značí cytoplasmu neuronů včetně odstupe jejich výběžků (obr. 47f). Mírné zmenšení těl neuronů se však selektivně objevilo i u wt kontrol (obr. 47c). Tyto nálezy dokumentují průběh NDP, který začíná zmenšováním neuronů (včetně redukce jejich dendritů) a končí úplným zánikem těchto buněk. V případě tgHD potkanů však tento proces u většiny neuronů probíhá velmi pomalu a teprve u nejstarších skupin zvířat (18 – 24 měsíčních) je úbytek neuronů výraznější. U wt potkanů pak jde o fyziologický zánik některých neuronů. Také již bylo možné detekovat velmi mírné prořidnutí neuropilu (obr. 44d), především v porovnání s kontrolami (obr. 44a). Charakteristickým znakem je i to, že neurodegenerace je výrazně selektivní (což odpovídá nálezům u HD pacientů) - to znamená, že veškeré projevy neuronální degenerace (zmenšování neuronů, příp. jejich zánik) postihují jen některé neurony, ať již jednotlivě nebo v malých skupinách (obr. 44e). K celkovému obrazu neuronální degenerace patří i zvýšená akumulace polyglutaminových inkluzí v jádrech striatových (a kortikálních)

neuronů (obr. 45b) – zejména v porovnání s kontrolními zvířaty (obr. 45a) - dokumentující nejen zvýšené hromadění mhtt v jádrech, ale i kondenzaci karyoplasmy v důsledku zmenšování velikosti neuronů a tedy i jejich jader.

V důsledku zvyšujícího se počtu degenerujících neuronů se u této skupiny objevuje i podstatně více GFAP⁺ reaktivních astrocytů (obr. 50e), jak dokládá zejména provedená kvantitativní analýza (*viz kap. 4.2.2.*). Stejně jako v předchozích skupinách tgHD a wt potkanů, i zde ojediněle nacházíme dělící se jádra gliových buněk, z nichž některá mohou být i BrdU⁺ (obr. 49b). Vzhledem k tomu, že zánik neuronů však není ani v této skupině výrazný, je i rozvoj reaktivní gliózy jen pozvolný. Je však zcela zjevný zlom v progresi NDP u zvířat starých 1 rok v porovnání se 6 měsíční skupinou a následné prohlubování těchto změn u skupiny 18 a 24 měsíčních potkanů (porovnej obr. 50d a 50e-g). Je také třeba zdůraznit, že v důsledku selektivní degenerace striatových neuronů se i rozložení GFAP⁺ reaktivních astrocytů ve striatu liší v různých lokalitách – z tohoto důvodu jsme vždy na histologických řezech porovnávali jen stejné lokality (tj. pro fotodokumentaci vždy dorzo-mediální oblast striata). U 12 měsíčních wt potkanů vidíme, že se sice poněkud zvýšil počet GFAP⁺ astrocytů, tyto astrocyty však nevykazovaly atributy typických reaktivních astrocytů se silnými, výrazně GFAP⁺ výběžky, ale spíše se v nich zvýšil počet (objem) GFAP⁺ gliofilament, především v jejich vaskulárních nožkách zvýrazňujících cévní stěnu (porovnej obr. 50a a 50b).

Počet S100β⁺ astrocytů se téměř nezměnil, výraznější změny byly (jak již bylo uvedeno) pouze ve smyslu přibývání GFAP⁺ reaktivních astrocytů, zejména typicky ve vazbě na cévy (obr. 51f).

U skupin **18 a 22-24 měsíčních** tgHD potkanů je charakter změn stejný, liší se pouze intenzita neurodegenerativního postižení striata a tedy i tomu odpovídající rozsah a charakter reaktivní gliózy. Vzhledem k tomu, že se jedná o relativně velmi stará zvířata, je zde významná také participace procesu stárnutí, tedy morfologicky definovaných senilních změn.

Atrofie striata je (v porovnání především s mladými kontrolními zvířaty - obr. 43a) již zcela evidentní (obr. 43c). I když je úbytek neuronů výraznější, než u předchozích skupin tgHD potkanů (porovnej obr. 46b, 46e, 46f a 46d), i zde se významnou měrou na NDP ve striatu (tedy na redukci šedé hmoty) podílí pokračující zmenšování některých neuronů, ať již jednotlivých či ve skupinách (obr. 44e, 44f, 47g-i). Tím více také vyniká, že degenerace striatových neuronů je selektivní (porovnej např. u 18 měs. tgHD obr. 46e a 46f, a u 24

měs. tgHD obr. 47h a 47i). Zajímavým, i když ne neobvyklým nálezem, bylo rovněž zjištění, že intenzita NDP je u těchto starých tgHD potkanů, sledovaných v rámci jedné skupiny, poměrně výrazně rozdílná (obr. 46e a 46f). Tento jev zcela odpovídá variabilitě (jak fyziologické, tak ve vztahu k patologickým procesům), velmi dobře známé u lidí.

Spolu s degenerací striatových neuronů dochází i k postupnému, i když relativně mírnému, prořidnutí neuropilu (které je patrné např. při použití impregnace neurofibril – obr. 44e, 44f, i ve vazbě na detekci synapsí obr. 48c). V důsledku fyziologické degenerace neuronů (obr. 47d) dochází k prořidnutí neuropilu striata, a tedy i synapsí, také u starých wt potkanů (obr. 44b a 48b).

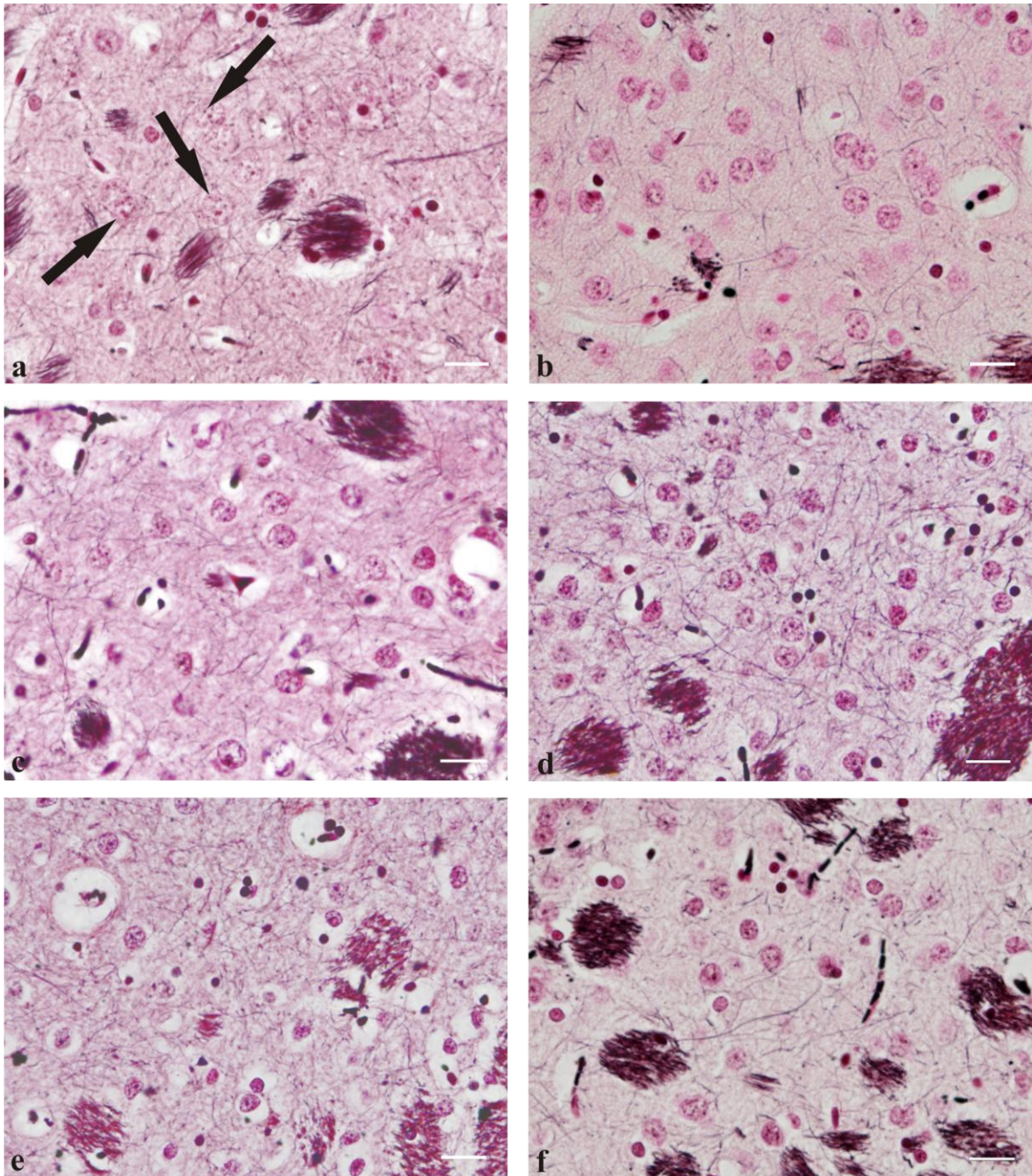
Pokračující atrofie striata se, mimo jiné, projevuje i typickým zhuštěním svazků myelinizovaných vláken v důsledku prořidnutí neuropilu a retrakce šedé hmoty striata (např. obr. 44f). Charakteristickým rysem progresu NDP u tgHD potkanů je také pomalu se zvyšující hustota polyglutaminových inkluzí v jádrech striatových (a kortikálních) neuronů (dokumentující přítomnost mhtt), pravděpodobně ale především v důsledku zmenšování těl a tedy i jader těchto neuronů (obr. 45c).

Průvodním jevem zvýšené degenerace neuronů je vždy rozvoj reaktivní gliózy. Vzhledem k atypicky pomalému zániku neuronů u transgenních potkanů se však i tento proces rozvíjí jen pomalu. Přesto již u 18 měsíčních (obr. 50f) a zejména pak u 22-24 měsíčních tgHD potkanů (obr. 50g) je astroglióza zřetelně výraznější v porovnání s mladými tgHD potkany (obr. 50d), i se stejně starými kontrolními zvířaty (obr. 50c). Teprve ve skupinách ročních (obr. 50e) a starších tgHD potkanů nacházíme typické GFAP⁺ reaktivní astrocyty - ve větším počtu však až u nejstarších zvířat (obr. 50g). Také u nejstarších kontrolních zvířat narůstá počet GFAP⁺ astrocytů (obr. 50c), avšak povětšinou je nelze podle jejich morfologie označit za typicky reaktivní (porovnej obr. 50c a 50g). Kromě astrocytů nacházíme v neuropilu pochopitelně i satelitní oligodendrocyty, ale u nich jsme (na rozdíl od QA léze) nezaznamenali zvýšení jejich počtu.

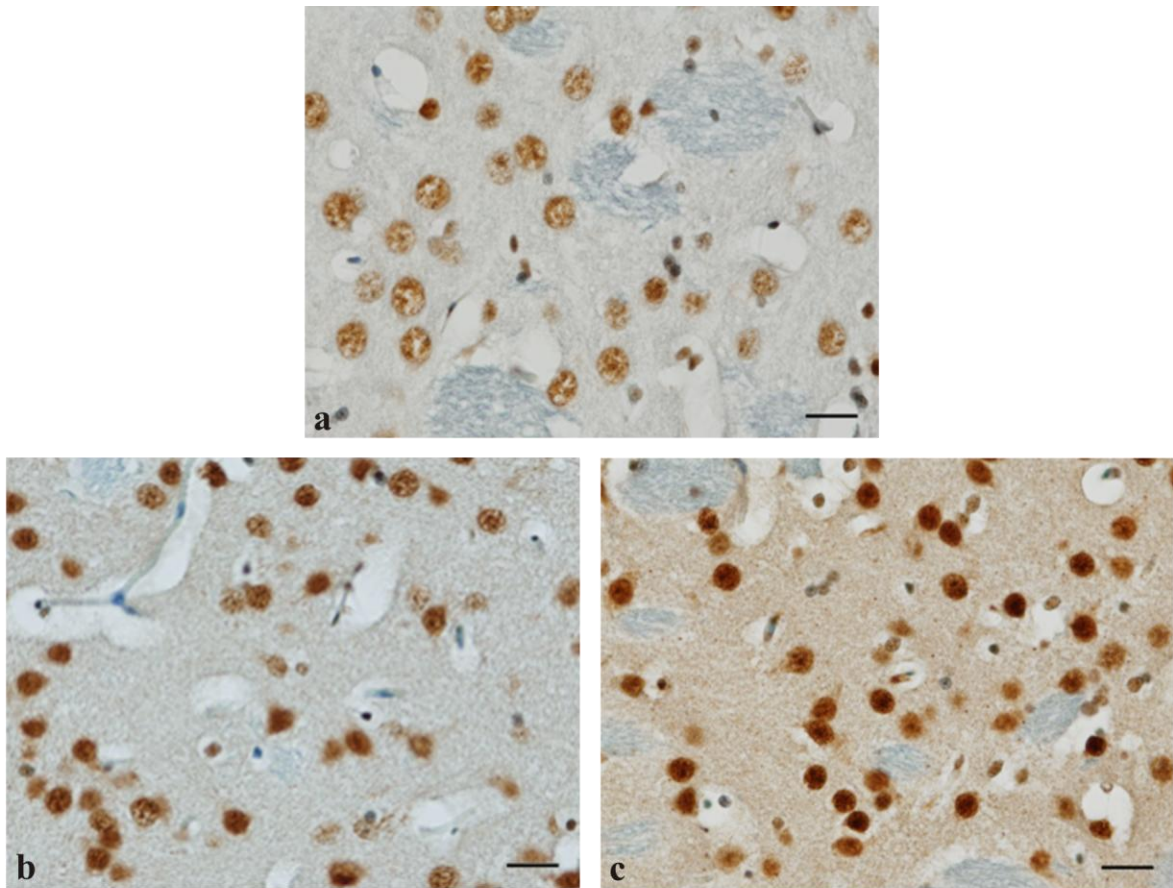
Zajímavý nálezem byl nárůst počtu GFAP⁻/S100β⁺ výběžků plasmatických astrocytů jako součásti neuropilu (obr. 51d), což můžeme považovat za důkaz zvýšené proliferace či aktivace i těchto buněk v reakci na rozvoj NDP. Tento předpoklad podporuje i fakt, že i v tomto případě se jednalo o ložiskové změny, tedy nejnápadnější v místech s pokročilou degenerací neuronů (porovnej obr. 51c a 51d, 51g a 51h). Zvýšení počtu GFAP⁻/S100β⁺ astrocytů jsme však zaznamenali i u nejstarších kontrolních potkanů (obr. 51b), ale nikdy ve stejném rozsahu jako u paralelních skupin tgHD potkanů (obr. 51d). U starých tgHD potkanů je také o něco vyšší počet GFAP⁺/S100β⁺ a zejména typický je nález koexpres

i v ostatních výběžcích GFAP⁺ reaktivních astrocytů (obr. 51h), nejen ve vaskulárních nožkách (obr. 51f, 51g). Exprese S100 β se totiž postupně rozšiřuje z těla astrocytů i do jejich výběžků (obr. 51g, 51h). Tento proces byl velmi typický pro maturaci nově generovaných/aktivovaných reaktivních astrocytů u NDP navozeného QA. Nejnápadnější změnou u GFAP⁺ astrocytů, vázanou na progresi NDP (tedy patrnou cca od 1 roku věku u tgHD potkanů) je hypertrofie vaskulárních nožek, zejména jejich koncových rozšířených částí, které vytvářejí MLGP, tedy ke ztluštění stěny cév (obr. 50f, 50g porovnej s 50e a 50a); zároveň se mírně zvyšuje i počet cév, což lze ale (alespoň z části) přičíst atrofii (zhuštění) parenchymu striata. Obdobné, ale podstatně méně intenzivní ztluštění MLGP vidíme i u starých wt potkanů (obr. 50b, 50c). Na rozdíl od neovaskularizace, resp. aktivace cév ve striatu potkanů s NDP po QA lézi (zejména v akutní fázi procesu), značené výraznou expresí nestinu v endotelu aktivovaných cév (obr. 16a), jsme u tgHD potkanů tento jev nepozorovali ani u nejstarších zvířat. Rovněž jsme u nich nedetekovali expresi vimentinu nebo BrdU ve vztahu k proliferaci, resp. aktivaci astrocytů ve striatu (obr. 52). Můžeme tedy předpokládat, že GFAP⁺ reaktivní astrocyty ve striatu tgHD potkanů, postiženém progredujícím NDP, vznikají spíše transformací z tzv. klidových gliových buněk/prekursorů, než generováním nových astrocytů z adultních neurálních (gliogenních) prekursorů, jak je typické zejména při akutních typech poškození mozku.

Zaznamenané morfologické změny u starých wt potkanů dokládají, že na progresi změn při NDP ve striatu mají podíl i věkové změny – typické je zejména zmenšování některých neuronů (jen málo jejich úplný zánik), nárůst počtu GFAP⁺ astrocytů, i ztluštění MLGP; tyto změny jsou však vždy méně intenzivní v porovnání s NDP u tgHD potkanů.

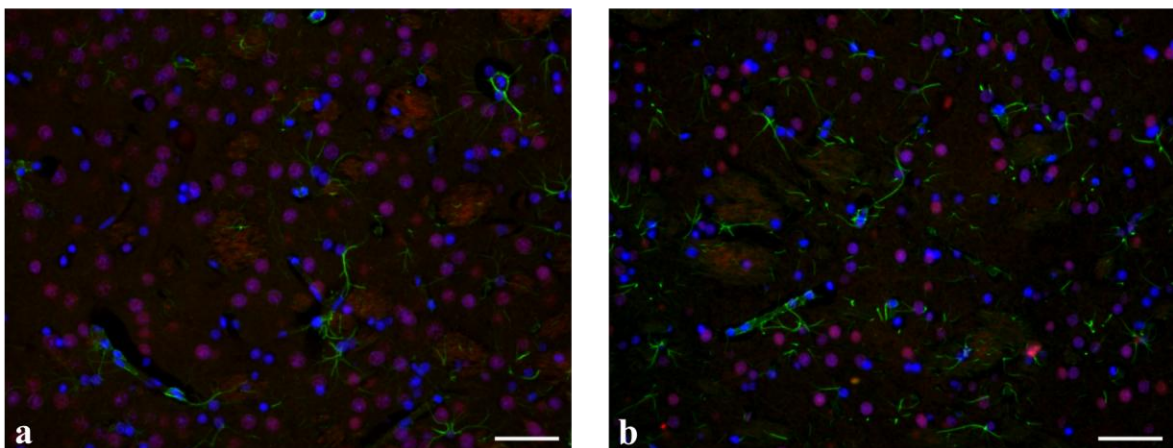


Obr. 44. (a) V porovnání s mladými wt zvířaty (šipky – neurony) je typickým příznakem progresu NDP selektivní zmenšování některých striatových neuronů či spíše jejich skupin, (b) ke kterému však, i když v menší míře, dochází také s vyšším věkem zvířat – zde u 24 měsíčního wt potkana. Postupné zmenšování a úbytek neuronů s progresí NDP je zde zachyceno u tgHD potkanů (c) starých 6 měsíců – malý rozsah degenerativních změn na neuronech zatím téměř neovlivnil charakter neuropilu; (d) u 12 měsíčních nastává v rozvoji NDP zlom, zmenšování i úbytek neuronů jsou již výraznější, takže je patrná i mírná rarefakce neuropilu, (e) u 18 a zejména (f) u 24 měsíčních tgHD potkanů jsou již selektivní zmenšení a zejména úbytek neuronů dobře patrné. **Impregnace neurofibril podle Bodiana; měřítko 20 μ m.**



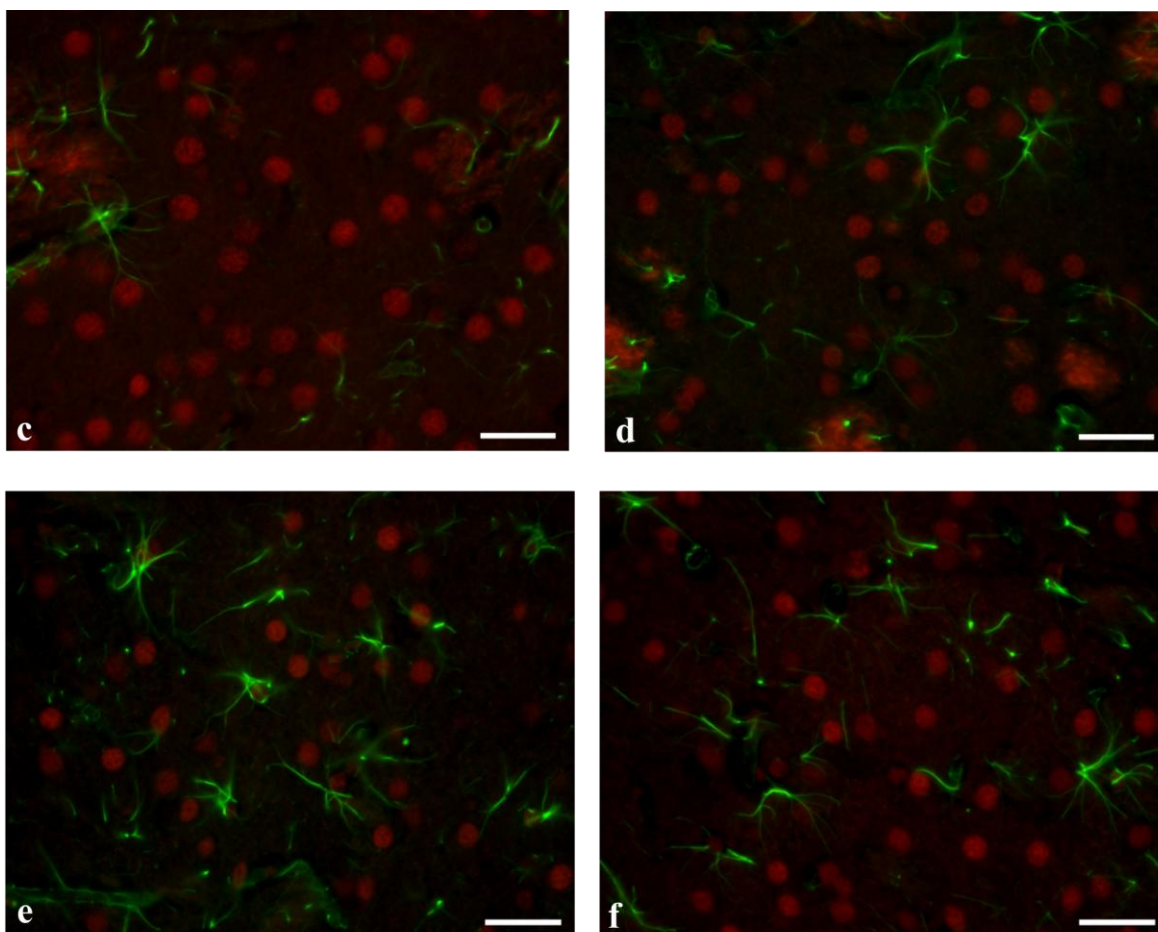
Obr. 45. (a) Akumulace polyglutaminových inkluzí v jádrech striatových neuronů je malá u kontrolních wt potkanů (zde 6 měsíčních). Ke zvýšené akumulaci, v souvislosti s hromaděním mhtt ve formě intranukleárních inkluzí, dochází (b) u 12, (c) 18 (a 24) měsíčních tgHD potkanů, zejména však v důsledku zmenšování neuronů a tedy i jejich jader.

Anti-Poly-Q; měřítko 20 μ m.



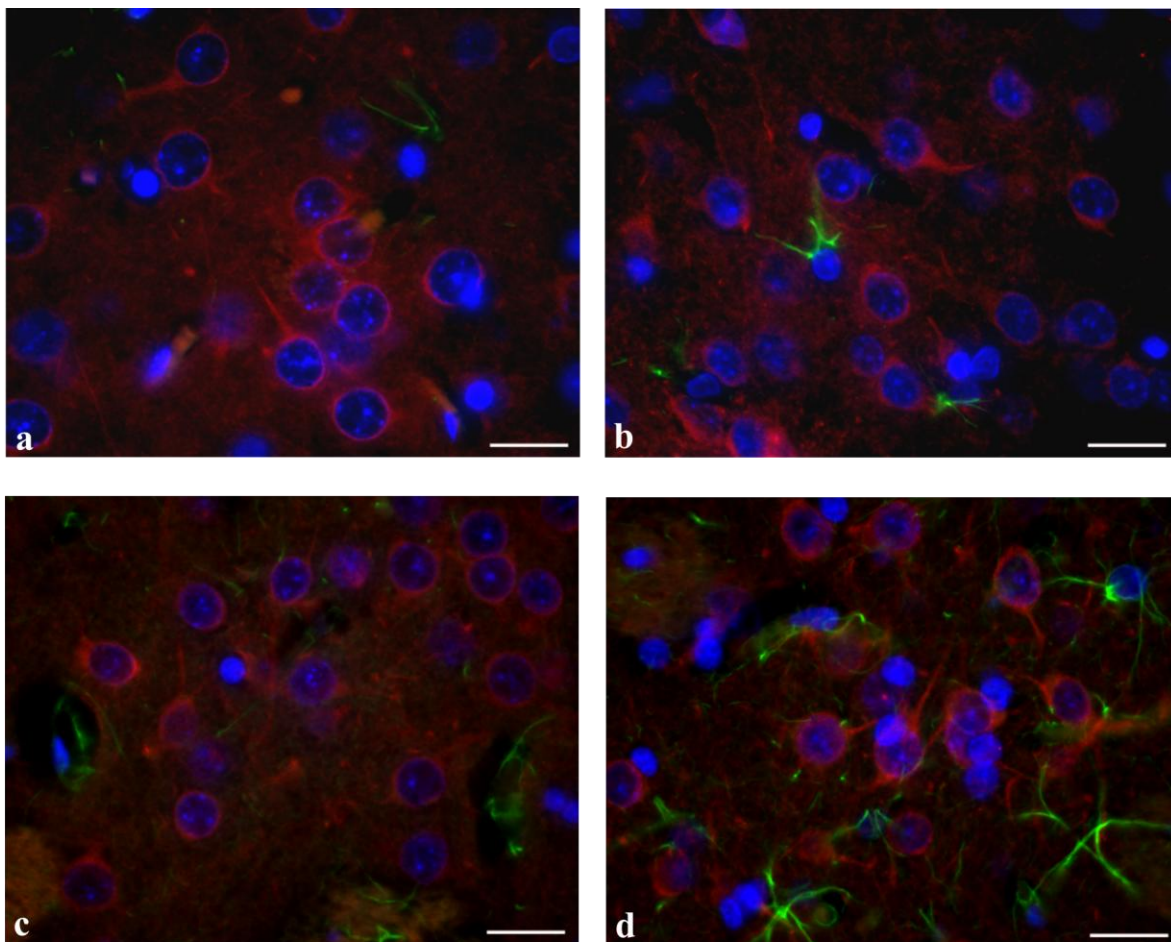
Obr. 46. Zřetelný rozdíl v počtu a velikosti striatových neuronů je patrný při porovnání (a) 2 měsíčních wt a (b) 18 měsíčních tgHD potkanů – je také dobře vidět, že zánik neuronů v důsledku progresu NDP je zde typicky selektivní.

Anti NeuN + anti-GFAP + DAPI; měřítko 50 μ m.



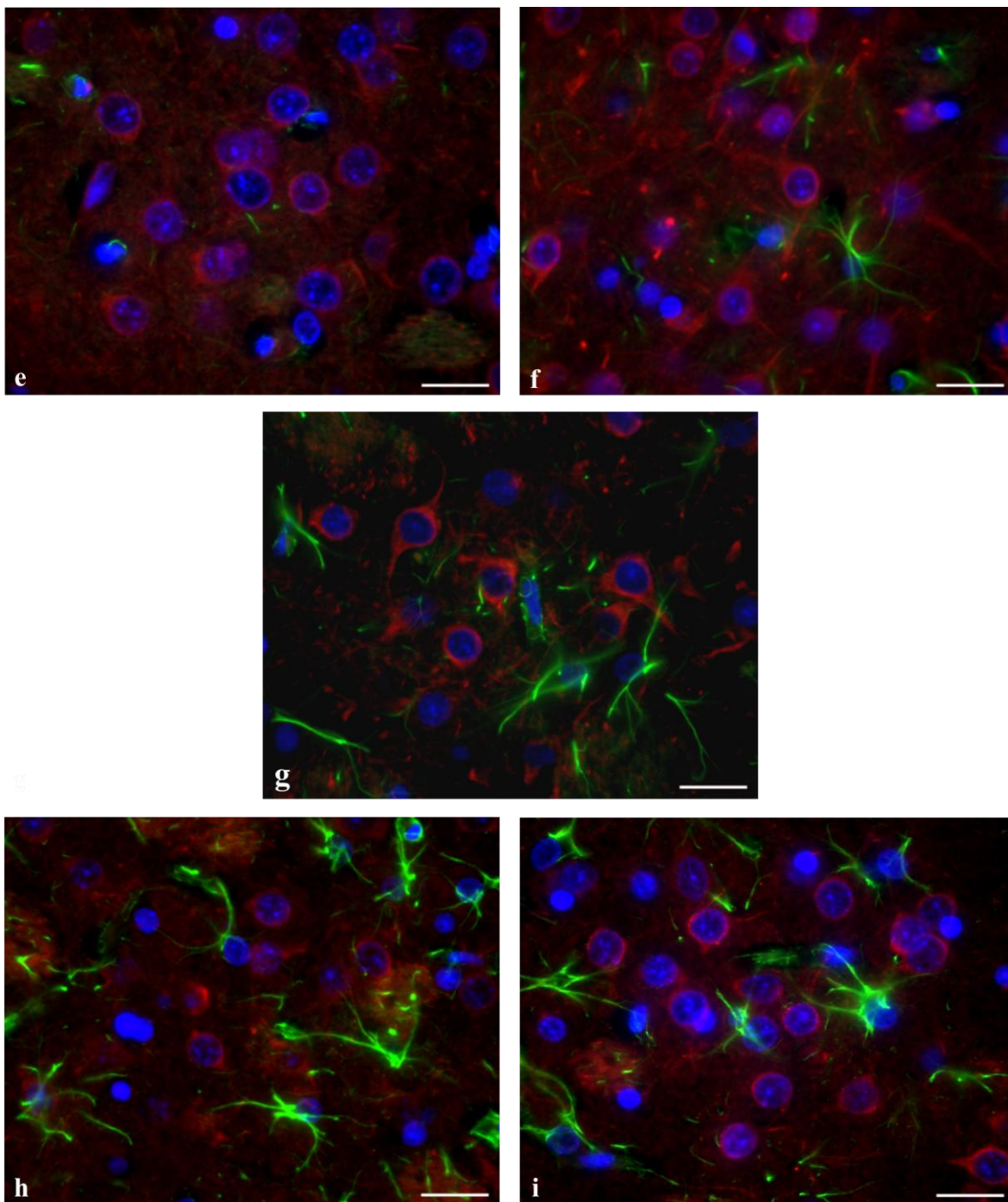
Obr. 46. (c) Mírné rozdíly ve velikosti neuronů i jejich počtu ve skupinách jsou typické pro jednotlivé regiony striata – velké neurony a jen malý počet GFAP⁺ astrocytů jsou charakteristické pro mladá kontrolní zvířata (cca do 6 měsíců) – zde 2 měsíční. Redukce šedé hmoty striata, tedy zmenšování a následně i výraznější úbytek neuronů, v důsledku progresu NDP se rozvíjí jen pomalu, proto i průvodní reaktivní astroglióza je (v porovnání s neurotoxickým modelem) jen mírná - (d) u 12 i (e, f) 18 měsíčních tgHD potkanů. (e, f) Zajímavým nálezem byla poměrně variabilní intenzita NDP u zvířat v nejstarších hodnocených skupinách, jak je patrné při porovnání dvou 18 měsíčních tgHD potkanů.

Anti-NeuN + anti-GFAP; měřítko 20 μm .



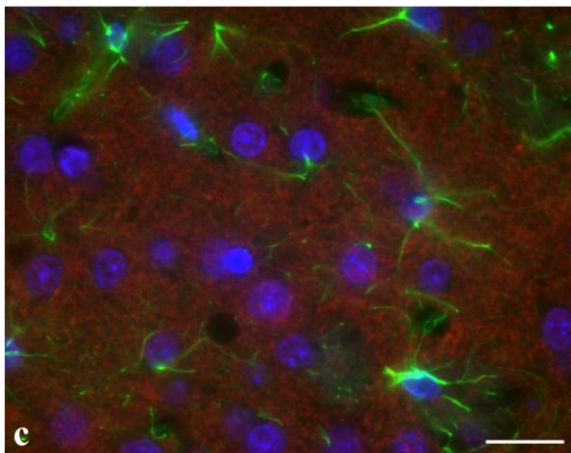
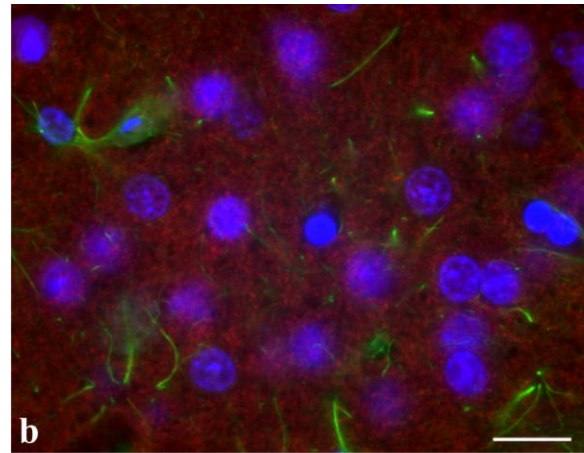
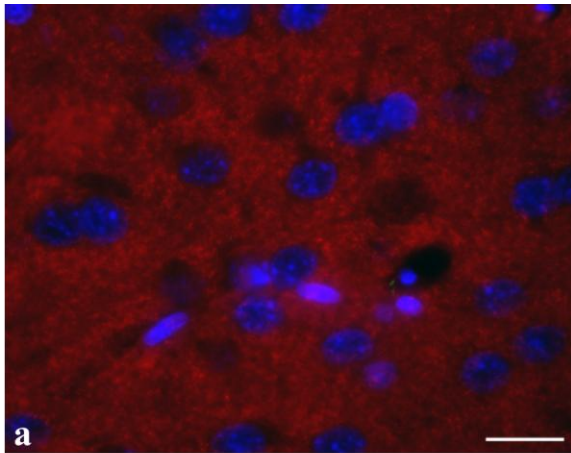
Obr. 47. Nejlépe lze změny ve velikosti neuronů detekovat pomocí anti- β -III-tubulinu, který znázorňuje neurofilamenta v cytoplasmě těl neuronů i v odstupu jejich výběžků; v kombinaci s obarvením jader DAPI, můžeme jasně prokázat, že zmenšování neuronů probíhá při zachování nukleo-cytoplasmatického poměru jak u intaktních wt potkanů (a-d) v rámci procesu fyziologického stárnutí, tak u (e-h) tgHD potkanů v důsledku progresu NDP (*obr. viz další str.*); zároveň vidíme i změny v množství GFAP⁺ astrocytů a v denzitě neuropilu. (a) wt 2 měsíce, (b) wt 6 měsíců, (c) wt 12 měsíců, (d) wt 22 měsíců.

Anti-TUB + anti-GFAP + DAPI; měřítko 20 μ m.



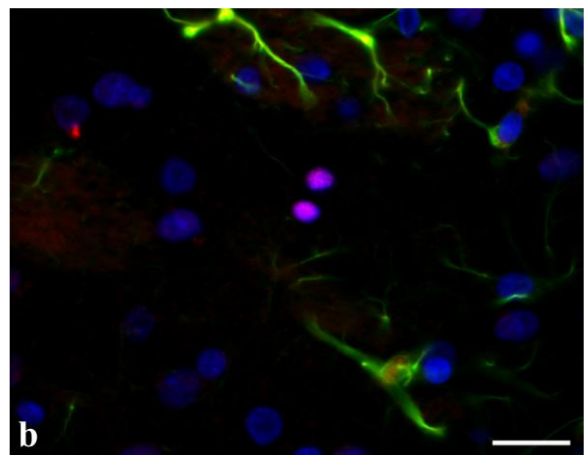
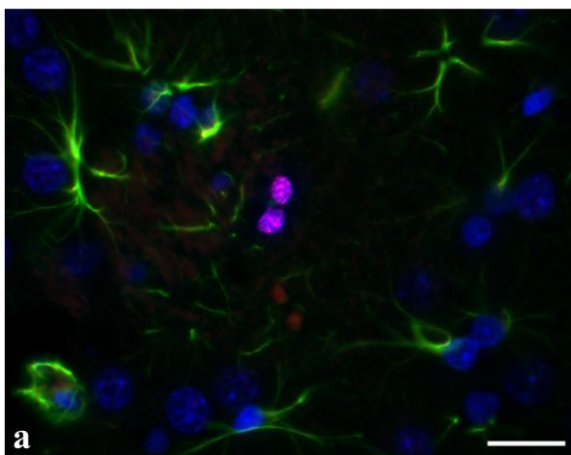
Obr. 47. (e) Při porovnání degenerativních změn ve striatu 6 měsíčních tgHD potkanů a (b) stejně starých wt kontrol, vidíme, že se nálezy v podstatě neliší, to znamená, že NDP se u tgHD potkanů ještě výrazněji nerozvíjí. (f) Naproti tomu, degenerace neuronů, prořidnutí neuropilu i mírná reaktivní astroglióza jsou již patrné u 12 měsíčních tgHD potkanů v porovnání (c) se stejně starými wt zvířaty. Progrese NDP (selektivní zmenšování i úbytek neuronů a reaktivní astroglióza i dezintegrace neuropilu) je pak dobře vidět u (g) 18 a (h, i) 24 měsíčních tgHD potkanů i v porovnání s kontrolami (d). Úbytek neuronů postihuje selektivně jen některé skupiny, což vyniká zejména u nejstarších tgHD potkanů (h versus i).

Anti-TUB + anti-GFAP + DAPI; měřítko 20 μ m.

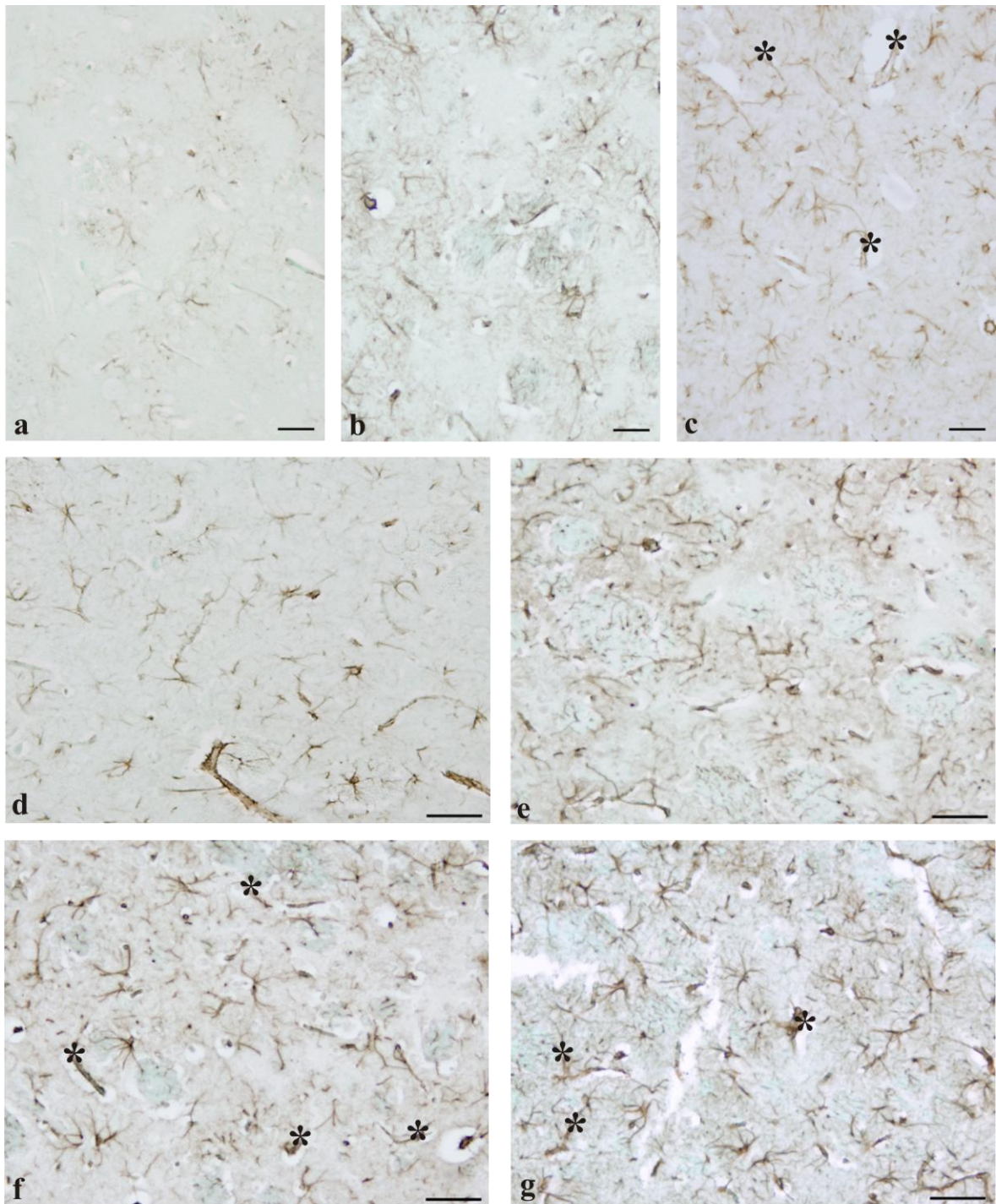


Obr. 48. (a) Synapse jsou v neuropilu u mladých 2 měsíčních tgHD potkanů jemné a velmi početné. (b) V důsledku fyziologické degenerace dochází k prořídnutí neuropilu i synapsí i u starých 22 měsíčních wt kontrol. (c) Ve striatu 24 měsíčních tgHD potkanů je však rarefakce neuropilu i degenerace synapsí výraznější; také reaktivní astroglióza se rozvíjí pouze v důsledku NDP u starých tgHD potkanů.

Anti-SY + anti-GFAP + DAPI; měřítko 20 μ m.

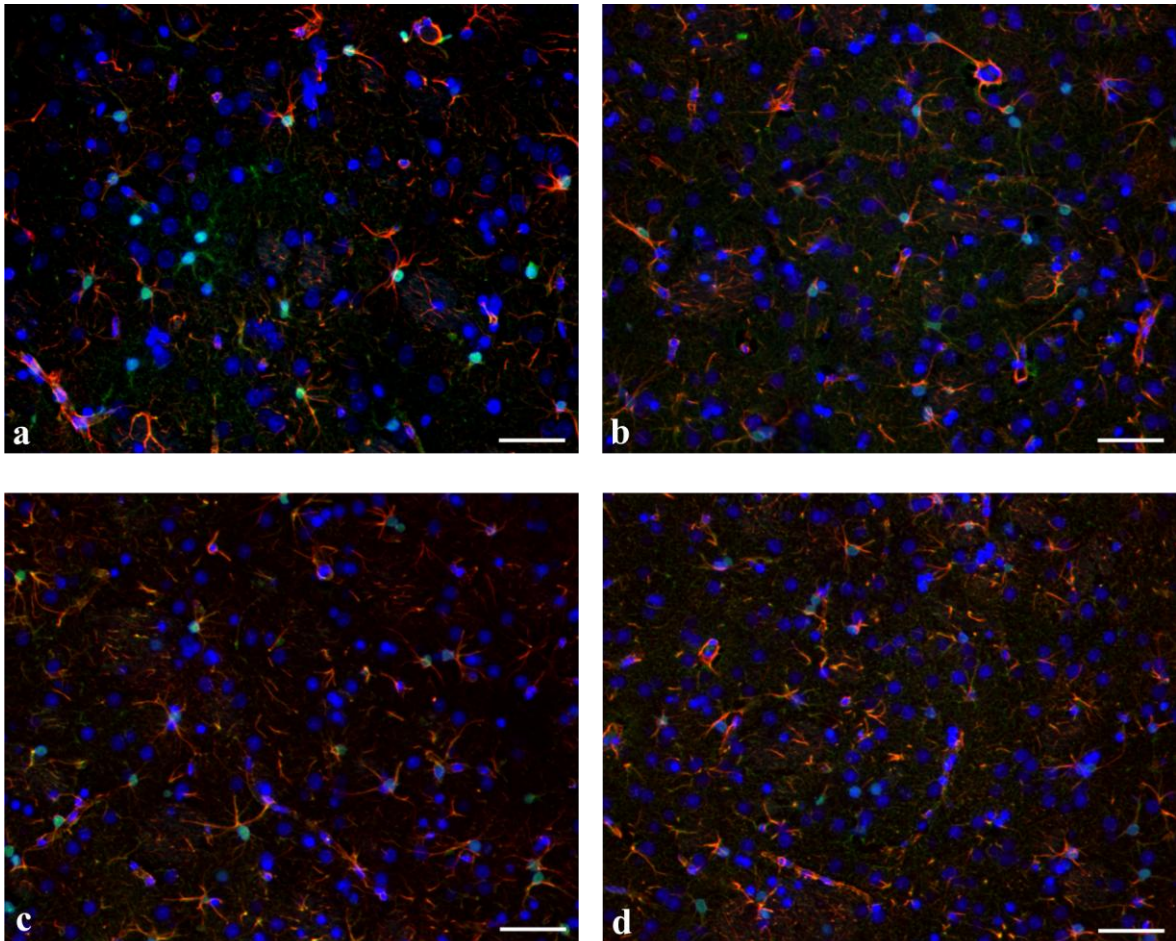


Obr. 49. (a) Ve striatu mladých 2 měsíčních tgHD potkanů můžeme ojediněle najít BrdU⁺ jádra právě rozdělených gliových buněk - (b) stejně tak se však objevují i u 12 měsíčních tgHD potkanů.
Anti-BrdU + anti-GFAP + DAPI; měřítko 20 μ m.



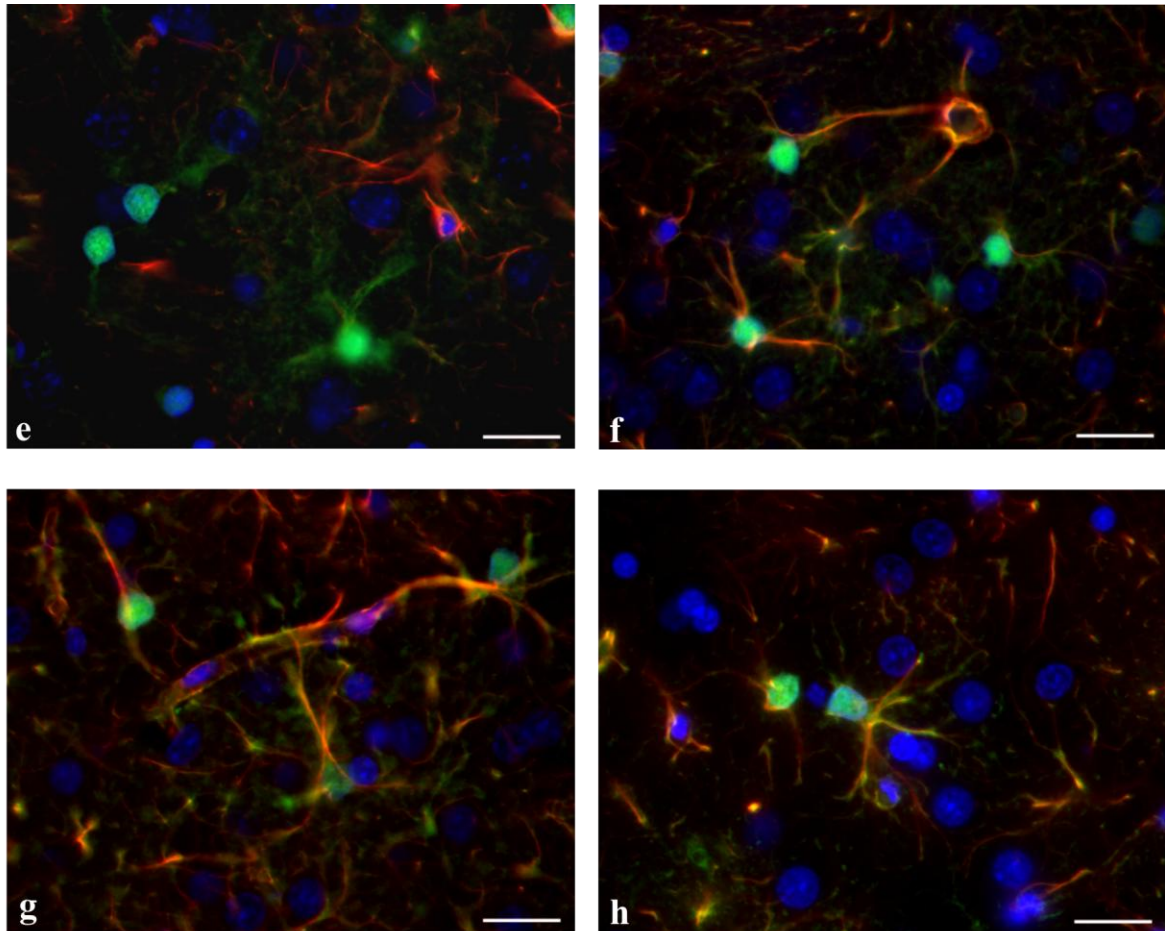
Obr. 50. Počet GFAP⁺ astrocytů je velmi malý (a) u 2 měsíčních wt potkanů, ale (b) u 12 měsíčních a (c) 22 měsíčních wt potkanů těchto astrocytů s věkem přibývá a především se zvyšuje množství GFAP⁺ gliofilament zejména ve vaskulárních nožkách, tvořících MLGP, takže nejvýraznější jsou pak kontury cév (*). V důsledku pomalého rozvoje NDP se i reaktivní glióza rozvíjí jen velmi pozvolna, takže (d) u 6 měsíčních tgHD potkanů je patrný jen mírný nárůst denzity GFAP ve vaskulárních nožkách kolem cév. (e) Vyšší počet reaktivních astrocytů se objevuje až u 12 měsíčních tgHD potkanů a postupně narůstá s progresí NDP u (f) 18 a (g) 24 měsíčních tgHD potkanů – nejvýraznější pozitivita GFAP je vždy v hypertrofických vaskulárních nožkách astrocytů, tedy kolem cév (*).

Anti-GFAP; měřítko 50 μ m.



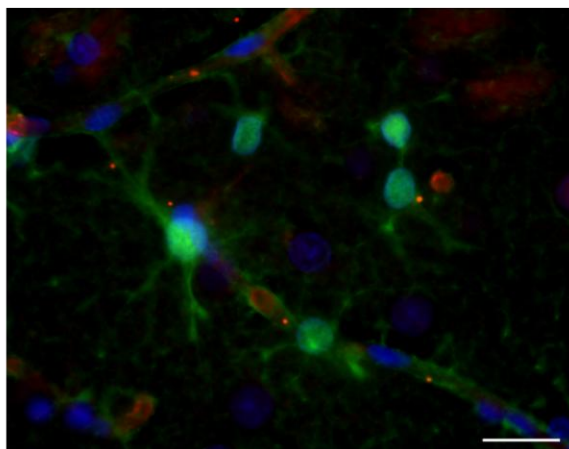
Obr. 51. Při porovnání kontrolních (a) 6 a (b) 22 měsíčních wt potkanů se změnami u (c) 18 a (d) 24 měsíčních tgHD potkanů vidíme, že s věkem (b), ale zejména s progresí NDP u tgHD potkanů přibývá ve striatu GFAP⁺ reaktivních astrocytů. Důležitou složkou neuropilu jsou však i S100β⁺ (GFAP⁺/S100β⁺ nebo častěji GFAP⁻/S100β⁺) astrocyty. Počet především GFAP⁻/S100β⁺ se zvyšuje s věkem (b) a také s progresí NDP u nejstarších skupin tgHD potkanů (d).

Anti-GFAP + anti-S100β + DAPI; měřítko 50 μm.



Obr. 51. (e) U 2 měsíčních kontrolních potkanů jsou $S100\beta^+$ astrocyty většinou plasmatické $GFAP^-/S100\beta^+$ ($GFAP^+/S100\beta^+$ astrocytů je zde jen velmi málo). S progresí NDP u (f) 12, (g, h) 18 (a 24) měsíčních tgHD potkanů naopak postupně přibývá $GFAP^+/S100\beta^+$ astrocytů především v blízkosti cév (f-h) a charakteristický je posun koexpresce $S100\beta$ a $GFAP$ z těla astrocytů i do výběžků (h).

Anti-GFAP + anti-S100β + DAPI; měřítko 20 μm.



Obr. 52. Expres vimentinu byla i u rozvinutého NDP (zde u 18 měsíčních tgHD potkanů) vždy vázaná pouze na endotel (příp. hladkou svalovinu) cév, to znamená, že nikdy nedošlo k jeho re-expresi ve vztahu k aktivaci nebo proliferaci astrocytů ve striatu.

Anti-VIM + anti-S100β + DAPI; měřítko 20 μm.

4.2.2. Kvantitativní stereologická analýza

Změny, které jsme popsali z histopatologického hlediska ve striatu tgHD i wt potkanů (tedy rozvíjející se jak v důsledku NDP, tak procesu stárnutí) jsme chtěli vyhodnotit i kvantitativně. Zajímal nás především rozvoj astrogliózy ve striatu, definovaný počtem GFAP⁺ astrocytů, resp. plochou, kterou na daném řezu zaujímají. Změny v množství GFAP⁺ astrocytů jsme totiž, na rozdíl od nepatrného úbytku neuronů, zaznamenali i v důsledku stárnutí u kontrolních skupin zvířat.

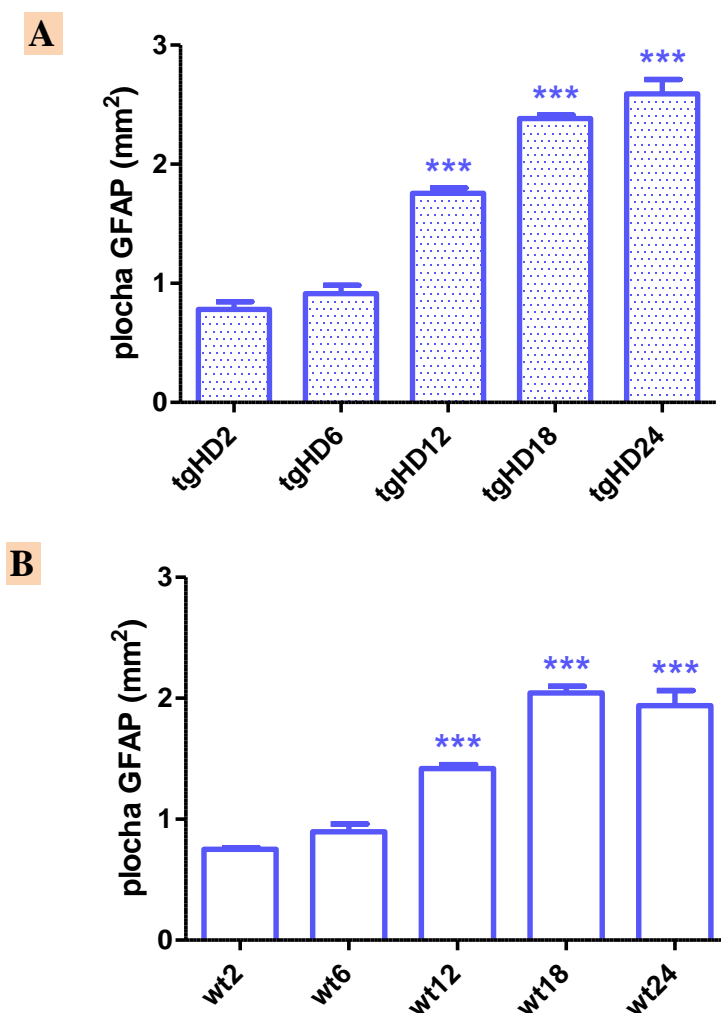
Pro kvantitativní vyhodnocení plochy GFAP-pozitivního imunohistochemického barvení jsme použili jednu ze stereologických metod, pomocí kterých je možné odhadem stanovit počet objektů, délek, ploch a objemů. Tyto postupy jsou založené na statistickém odvozování geometrických vlastností hodnocených struktur a objektů pomocí bodových, lineárních, rovinných či objemových testovacích sond. Oproti digitální analýze obrazu, jejíž výhodou je především možnost automatizace při rutinním hodnocení vzorků, zaručují tyto metody lepší reprodukovatelnost, tedy vyšší objektivitu hodnocení, zejména při různé kvalitě preparátů.

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 - graf 1A). U 2 a 6 měsíčních skupin jak wt, tak tgHD potkanů není významnější rozdíl mezi skupinami stejného typu ani vzájemně. To potvrzuje naše nálezy, že k rozvoji reaktivní astrogliózy dochází až u ročních a starších tgHD potkanů. Zjistili jsme však i poměrně významný nárůst GFAP-pozitivity ve striatu wt potkanů od 12. měsíce v porovnání s 2 měsíčními wt zvířaty (graf 1B). 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. To potvrzuje, že na progresi reaktivní astrogliózy u tgHD zvířat má podíl nejen neurodegenerativní proces, ale nezanedbatelně i věkové změny (graf 1B), což lze mimo jiné přičíst také poměrně vysokému věku potkanů ve dvou nejstarších sledovaných skupinách.

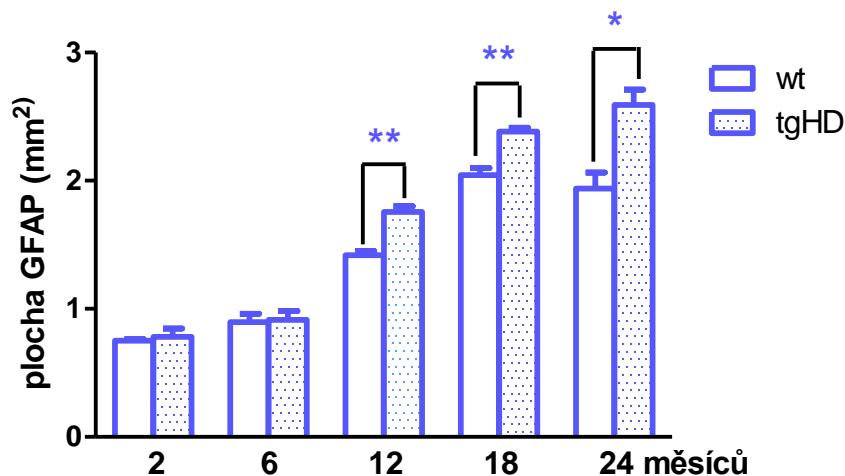
Z hlediska celkového hodnocení pro nás bylo důležité také porovnání množství GFAP⁺ astrocytů ve striatu tgHD, resp. wt potkanů v jednotlivých věkových skupinách: u tgHD je u 6 měsíční skupiny nárůst plochy GFAP⁺ astrocytů o 17% v porovnání s 2 měsíčními zvířaty, zatímco u 12 měsíčních potkanů je to o 125% v porovnání s 2 měsíčními zvířaty, resp. o 92,3% oproti 6 měsíčním potkanům; u 18 měsíčních tgHD potkanů se plocha GFAP⁺ astroglie zvětšila o dalších 35,7% oproti 12 měs. potkanům, zatímco u 22-24 měs.

skupiny již jen o 8,7% optoti 18 měs. tgHD skupině. Poměrně překvapivé byly výsledky porovnání wt skupin: u 12 měs. wt potkanů přibýlo o 58,23% GFAP pozitivitu oproti 6 měsíčním skupinám, u 18 měs. skupiny o 44% oproti 12 měs., zatímco u 22-24 měs. skupiny wt zvířat se denzita astrocytů již dále nezměnila. Porovnáme-li skupinu 22-24 měsíčních wt a tgHD potkanů (graf 2), pak je hustota reaktivní GFAP⁺ astroglie vyšší o 33,67% u tgHD potkanů oproti stejně starým kontrolním wt zvířatům.

Kvantitativní analýza tedy potvrzuje správnost našeho morfologického hodnocení rozvoje reaktivní astroglie ve striatu mozku tgHD potkanů starých 12 a více měsíců. Zajímavým nálezem, který vynikl teprve při kvantitativní analýze, byl výrazný (zlomový) nárůst plochy exprese GFAP právě ve skupině 12 měs. tgHD, ale i wt zvířat. Navíc toto hodnocení jasně dokládá výraznou participaci změn v důsledku stárnutí na rozvoji NDP a tedy i průvodní astroglie.



Graf 1: Plocha pozitivního barvení na GFAP ve striatu (A) tgHD a (B) wt potkanů. Statistická významnost (ANOVA, Tukey test, *** $p < 0,001$) v porovnání s referenční skupinou (A) tgHD2 a (B) wt2.



Graf 2: Porovnání velikosti plochy pozitivního barvení GFAP ve striatu tgHD a wt potkanů. Statistická významnost (nepárový *t*-test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) při porovnání tgHD a wt v jednotlivých věkových skupinách.

4.2.3. Kvantitativní hodnocení mitochondriální respirace

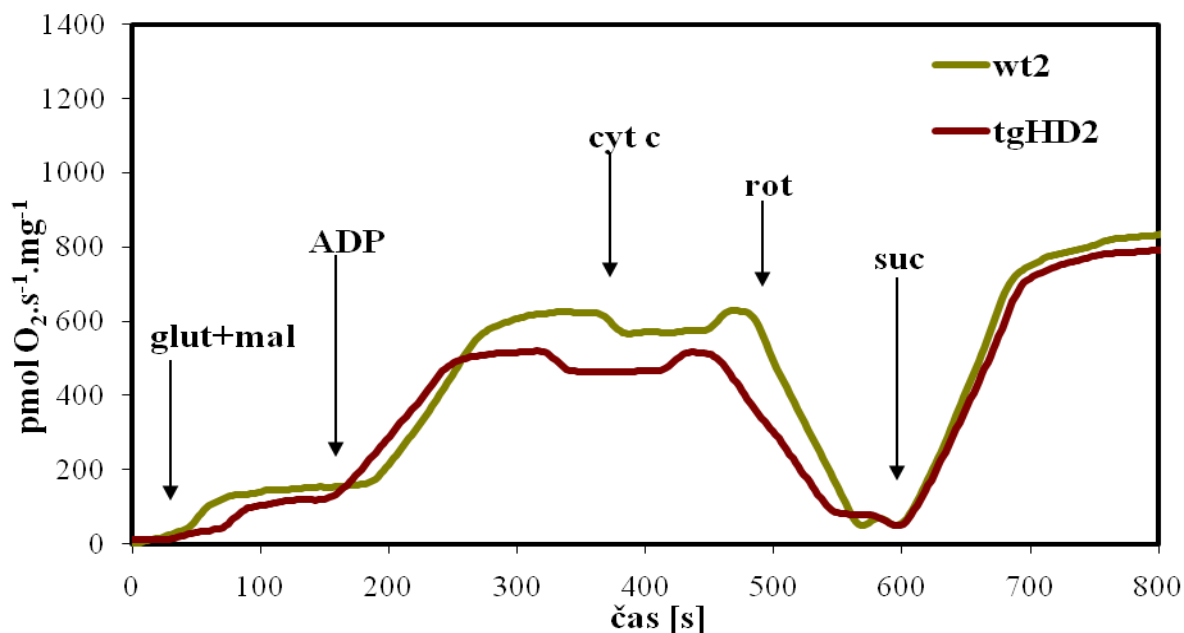
Mitochondriální dysfunkce je řazena mezi mechanismy zahrnuté v patogenezi HD. Rozhodli jsme se proto změřit, zda dochází ke změnám parametrů mitochondriální respirace (graf 3) a sledovali jsme aktivitu mitochondriálních komplexů I, II a IV. Tyto složky respiračního řetězce transportují elektrony z NADH a FADH₂ pomocí série redoxních reakcí, přičemž konečným akceptorem těchto elektronů je O₂ na konci řetězce.

Komplex I (NADH-koenzym Q-oxidoreduktáza): Výsledky oxygrafie homogenátu striata ukázaly signifikantní snížení aktivity komplexu I u tgHD potkanů od 12. měsíce v porovnání s tgHD ve věku 2 měsíců (graf 4A). Při porovnání tgHD a wt potkanů v každé věkové skupině jsme zaznamenali u skupin tgHD potkanů určitý trend ve snížení aktivity komplexu I (graf 5A), ale v důsledku vyšší variability výsledků a menšího počtu zvířat (vzhledem k předčasnému úhynu několika zvířat) ve skupinách přežívajících 22-24 měsíců však žádná ze změn nedosáhla statistické významnosti.

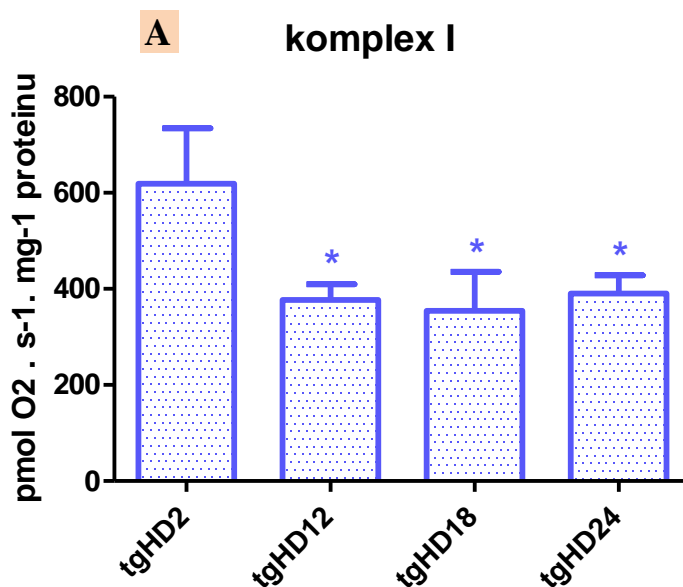
Komplex II (sukcinát-koenzym Q-oxidoreduktáza): V aktivitě komplexu II jsme překvapivě nezaznamenali žádné výraznější změny u tgHD potkanů a to ani v porovnání se stejně starými kontrolními zvířaty (graf 4B, 5B).

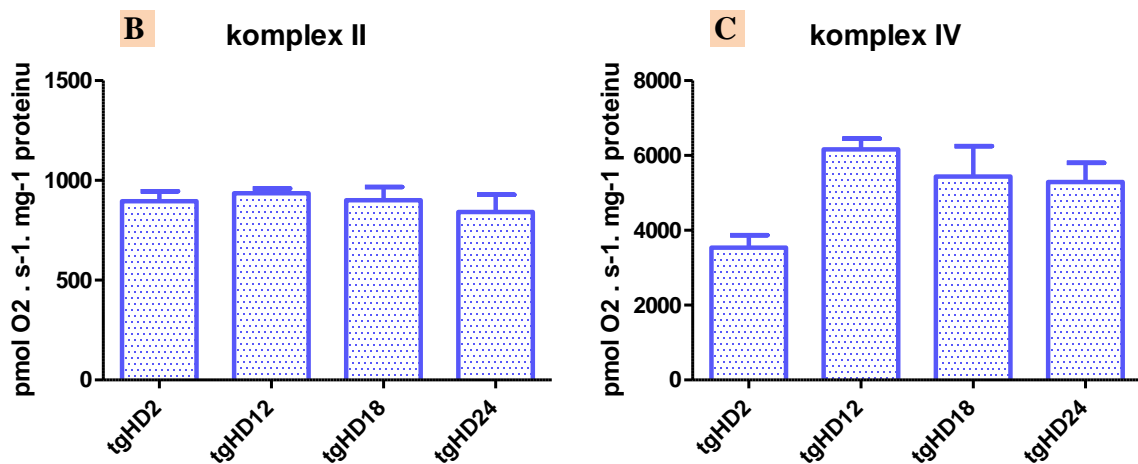
Komplex IV (cytochrom c-oxidáza): Naproti tomu u komplexu IV došlo nejprve k nárůstu aktivity u 12 měsíčních zvířat v porovnání s 2 měsíčními tgHD potkany, ale v dalším období se aktivita tohoto komplexu snižovala; vždy však byla vyšší než u 2 měsíčních tgHD potkanů (graf 4C). Při porovnání výsledků u tgHD a wt zvířat se však ani aktivita komplexu IV (stejně jako komplexu II) výrazněji nelišila (graf 5C).

Závěr: Výsledky měření mitochondriální respirace ukazují u tgHD potkanů poškození respiračního řetězce v důsledku snížené aktivity komplexu I, které se podílí na rozvoji mitochondriální dysfunkce.

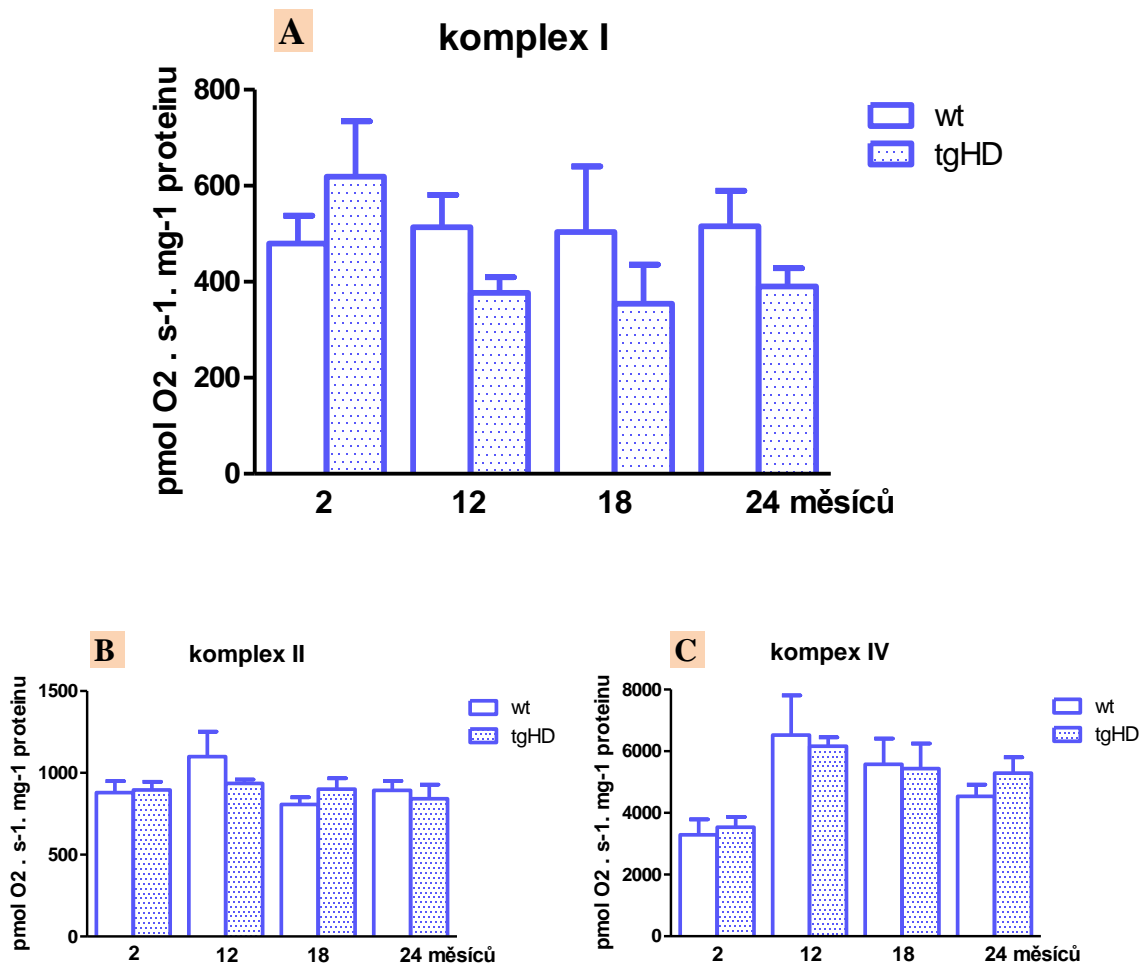


Graf 3: Reprezentativní respirační křivka u 2 měsíčních wt a tgHD potkanů. Glutamát + malát (glut+mal), adenosindifosfát (ADP), cytochrom c (cyt c), roten (rot), sukcinát (suc).





Graf 4: Změny spotřeby kyslíku (A) komplexem I, (B) komplexem II a (C) komplexem IV v homogenátu striata tgHD potkanů. Statistická významnost (ANOVA, Tukey test, $*p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou 2 měsíčních tgHD potkanů.



Graf 5: Porovnání aktivity (A) komplexu I, (B) komplexu II a (C) komplexu IV ve striatu tgHD a wt potkanů.

4.2.4. Závěry – rozvoj NDP ve striatu potkanů transgenních pro HD

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 prořídnutí neuropilu (a tedy i synapsí) i u nejstarších, 2-letých tgHD potkanů, a ne příliš intenzivní průvodní reaktivní gliózy. 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 zvyšuje s progresí NDP, ale patrně především v důsledku zmenšování neuronů a tedy i kondenzace karyoplasmu 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 astrogliózu).

Na progresi změn při NDP ve striatu mají 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, především zmožutnění jejich vaskulárních nožek, které způsobuje charakteristické ztluštění MLGP.

Popsaný atypický průběh rozvoje NDP je pravděpodobně také hlavním důvodem poměrně málo signifikantních změn při hodnocení respirační aktivity mitochondrií.

4.3. Vliv erythropoetinu na rozvoj nerodegenerativního procesu fenotypu HD – pilotní studie

Je známo, že hemopoetický růstový faktor erythropoetin přechází přes HEB a v mozkové tkáni indukuje široké spektrum buněčných odpovědí, nasměrovaných na ochranu a regeneraci poškozené tkáně, snižuje zánětlivou reakci a stimuluje angiogenezi aktivací endotelu. Na základě literárních údajů o experimentálním ovlivnění akutního ischemického poškození nás zajímal účinek EPO na rozvoj chronického poškození mozku typu HD, který doposud nebyl studován.

Vzhledem k významné roli astrocytů v CNS za normálního stavu i při jeho poškození nás zajímala možnost jejich ovlivnění EPO. Primárně jsme chtěli ověřit, zda krátkodobé podávání vysokých dávek EPO (3000 IU/kg i.p. denně po dobu 6 dnů) může (1) pozitivně ovlivnit rozvoj neurodegenerativního poškození striata, tj. zejména zmírnit rozvoj reaktivní gliózy a (2) zmírnit následky NDP ve striatu ve smyslu možného ovlivnění již rozvinuté gliózy. Porovnávali jsme tedy bezprostřední účinek EPO na NDP (1) v akutní fázi rozvoje neurotoxické léze – 7 dní po aplikaci QA, a (2) v subchronické fázi, kdy je striatová léze již plně rozvinutá, tzv. stabilizovaná (NDP se prohlubuje již jen pomalu, tedy obdobně jako u pacientů s HD) – 28 dní po QA lézi.

Morfologické nálezy jsme doplnili semikvantitativním hodnocením objemu GFAP ve striatu WB analýzou a behaviorálním testováním zvířat pomocí cylindr testu. Pro kompletnost nálezů bylo provedeno i hodnocení hematologické (krevní obraz), kde však nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi testovanými skupinami, ani v porovnání s kontrolními zvířaty.

Obě skupiny s aplikací EPO byly porovnávány se stejnými skupinami po aplikaci placeba (pl), tj. fyziologického roztoku, a také s intaktními zvířaty.

4.3.1. Morfologické hodnocení vlivu EPO

Při aplikaci EPO u potkanů s akutní neurotoxickou lézí (7 dní po aplikaci QA, QA7) jsme zjistili, že EPO ovlivňuje rozsah totální nekrózy v oblasti kanálu vpichu, ale v podstatě neovlivňuje rozsah léze ve striatu (porovnej obr. 53a a 53b). Vzhledem k menšímu objemu úplně destruované tkáně v oblasti KV dochází vlivem EPO i ke vzniku podstatně menšího lokálního edému a také k méně výrazné „úklidové“ reakci, tj. nachází se tady menší počet fagocytů a tím i nižší počet BrdU⁺ buněk v porovnání s placebovou skupinou.

Detekcí proliferace pomocí BrdU jsme zaznamenali vysokou proliferační aktivitu ve striatové lézi v souvislosti s rozvojem výrazné reaktivní gliózy v odpovědi na akutní fázi NDP ve striatu. Počet BrdU⁺ jader je po aplikaci EPO výrazně nižší (obr. 54b, 55b) v porovnání se skupinou s aplikací placebo (obr. 54a, 55a) zejména proto, že je zde menší počet fagocytujících buněk, což prokazuje sníženou zánětlivou odpověď tkáně striata. I tak ale část BrdU⁺ jader patřila mikroglii (menší oválná jádra s hrudkami chromatinu) a dalším gliovým elementům (satelitní oligodendrocyty s tmavým kulovitým jádrem) a také novotvořeným nediferencovaným gliovým buňkám, které jsou typicky VIM⁺ (viz *dále*).

Detekce GFAP ukázala, že rozsah reparativní gliózy je po aplikaci EPO o něco menší, avšak rozdíl mezi skupinou s EPO (obr. 54b, 56b) a s placebem (obr. 54a, 56a) byl jen malý, proto jsme k potvrzení tohoto nálezu ještě použili semikvantitativní WB analýzu (viz kap. 4.3.2.). Rozsah a intenzita koexpresy GFAP a vimentinu (viz *dále*) se však u porovnávaných skupin výrazněji nelišila (obr. 56a, 56b, 56c), to znamená, že krátkodobá aplikace EPO proces vyžívání novotvořených/aktivovaných astrocytů neovlivňuje. Kromě typických GFAP⁺ reaktivních astrocytů, byly samozřejmě přítomny ve zvýšeném počtu i S100 β protein exprimující astrocyty, ať již GFAP⁺/S100 β ⁺ nebo GFAP⁻/S100 β ⁺, a to v podstatě ve stejném rozsahu u skupiny s placebem a s EPO. Stejná situace byla i při kombinované detekci S100 β proteinu a vimentinu (obr. 57a). Expresy S100 β proteinu je typická pro vyžívající astrocyty, především ty, které jsou aktivovány v důsledku NDP, rozvíjejícího se po aplikaci QA (jak jsme již demonstrovali u neurotoxické léze – viz kap. – 4.1.1.).

Vimentin, který je v intaktním striatu exprimován pouze ve stěně cév, tj. endotelem a buňkami hladké svaloviny (obr. 58e), lze (jak jsme prokázali) s výhodou použít také pro detekci nezralých (novotvořených) nebo zralých aktivovaných astrocytů. Po aplikaci EPO (obr. 56b) jsme však v této skupině nezjistili významnější rozdíly v porovnání s placebovou skupinou (obr. 56a), to znamená, že EPO významněji neovlivňuje vyžívání nově generovaných astroblastů.

Re-expresy nestinu je ve striatu postiženém NDP typická pro aktivované (reaktivní) astrocyty v akutní fázi procesu, ale také pro aktivovaný endotel cév. Po aplikaci EPO (obr. 59b) nacházíme v porovnání s placebovou skupinou (obr. 59a) v centrální oblasti rozvíjejícího se NDP výraznější expresi nestinu především ve vaskulárních nožkách reaktivních hypertrofických astrocytů (méně v endotelu), což svědčí o jejich aktivaci, pravděpodobně i ve vztahu k rekonstrukci poškozené HEB v této oblasti. Můžeme tedy

tento efekt EPO považovat za další důkaz toho, že i v případě NDP podporuje (alespoň v určitém směru) vaskulogenezi.

Na základě detekce neuronálními markery MAP2 a β -III-tubulinem se zdá, že při rozvoji NDP ve striatu je po aplikaci EPO odumírání striatových neuronů o něco pozvolnější (což by odpovídalo neuroprotektivnímu efektu EPO) – zda je naše domněnka správná, je ale potřeba ověřit na podstatně větším počtu zvířat, než bylo použito v této studii.

Při aplikaci EPO do plně rozvinuté subchronické léze (28 dní po aplikaci QA, QA28) jsme zjistili, že podání EPO již neovlivní rozvoj totální nekrózy v oblasti KV, protože v průběhu 1 měsíce došlo k jejímu vyhojení, tj. k vytvoření gliové jizvy (obr. 53d). Nálezy v oblasti KV se proto neliší od kontrolní placebové skupiny (obr. 53c). Z důvodu pokračujícího procesu hojení (přechod do chronické fáze) ve tkáni již také není přítomno větší množství fagocytujících buněk (došlo k odeznění akutní zánětlivé reakce, včetně resorpce edémové tekutiny).

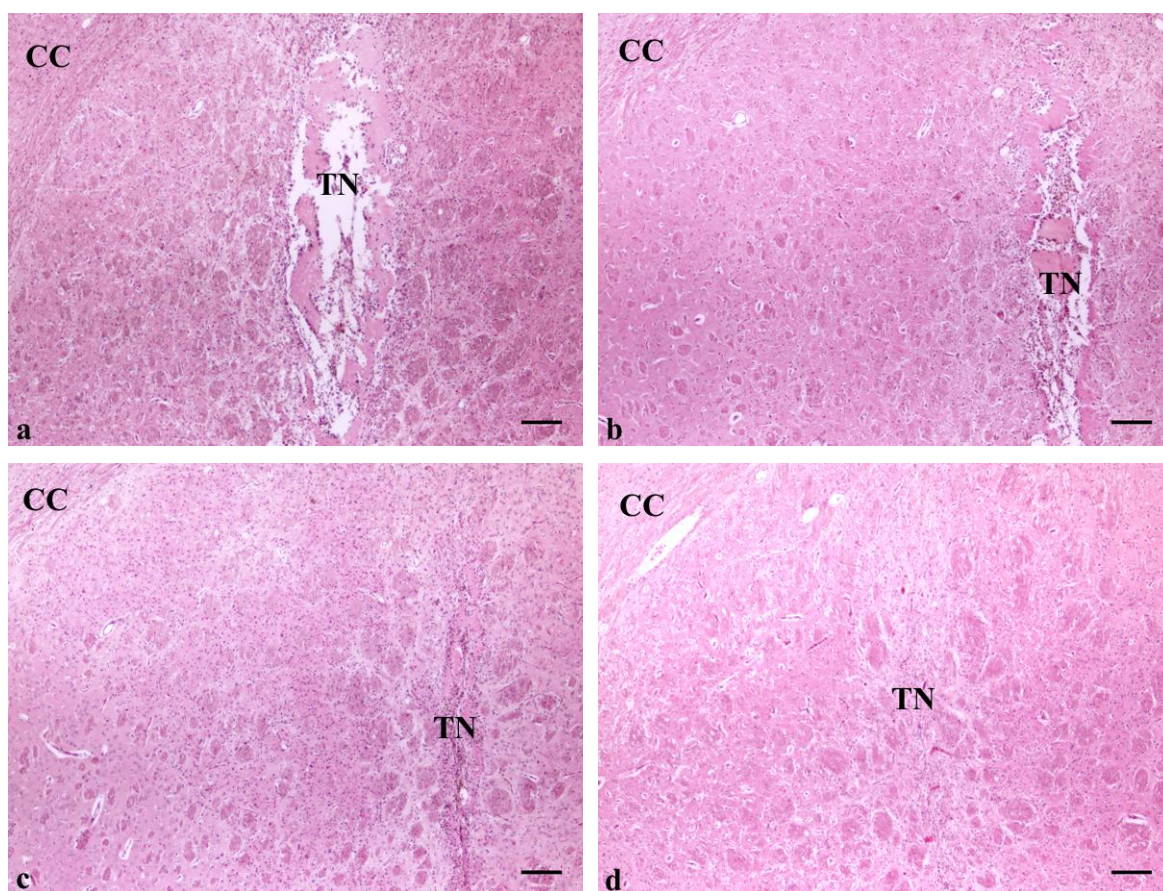
Většina striatových neuronů je 1 měsíc po QA lézi již zničená, proto jsme ani nezaznamenali žádný rozdíl v detekci MAP2 a β -III-tubulinu mezi skupinami s aplikací EPO a placebo.

Expresí BrdU byla u skupiny s aplikací placebo výrazně nižší (v porovnání s QA7), protože již v podstatě nedochází k nové proliferaci gliových buněk a další rozvoj léze pokračuje již jen velmi pomalu. Došlo k vymizení většiny fagocytujících buněk a subchronické stadium QA léze vykazuje již jen malý počet BrdU⁺ buněk, navíc se zřetelně sníženou expresí BrdU v jádře, což znamená, že u těchto buněk došlo k opakovanému dělení (obr. 54c, 55c). U skupiny s EPO však byl vyšší počet, i když většinou jen lehce BrdU⁺ jader, v převážné většině vykazujících morfologii jader astrocytů. To s největší pravděpodobností znamená, že po podání EPO došlo k další vlně proliferace gliových buněk a většina z nich se ještě dále, někdy i opakovaně dělila (obr. 54d, 55d).

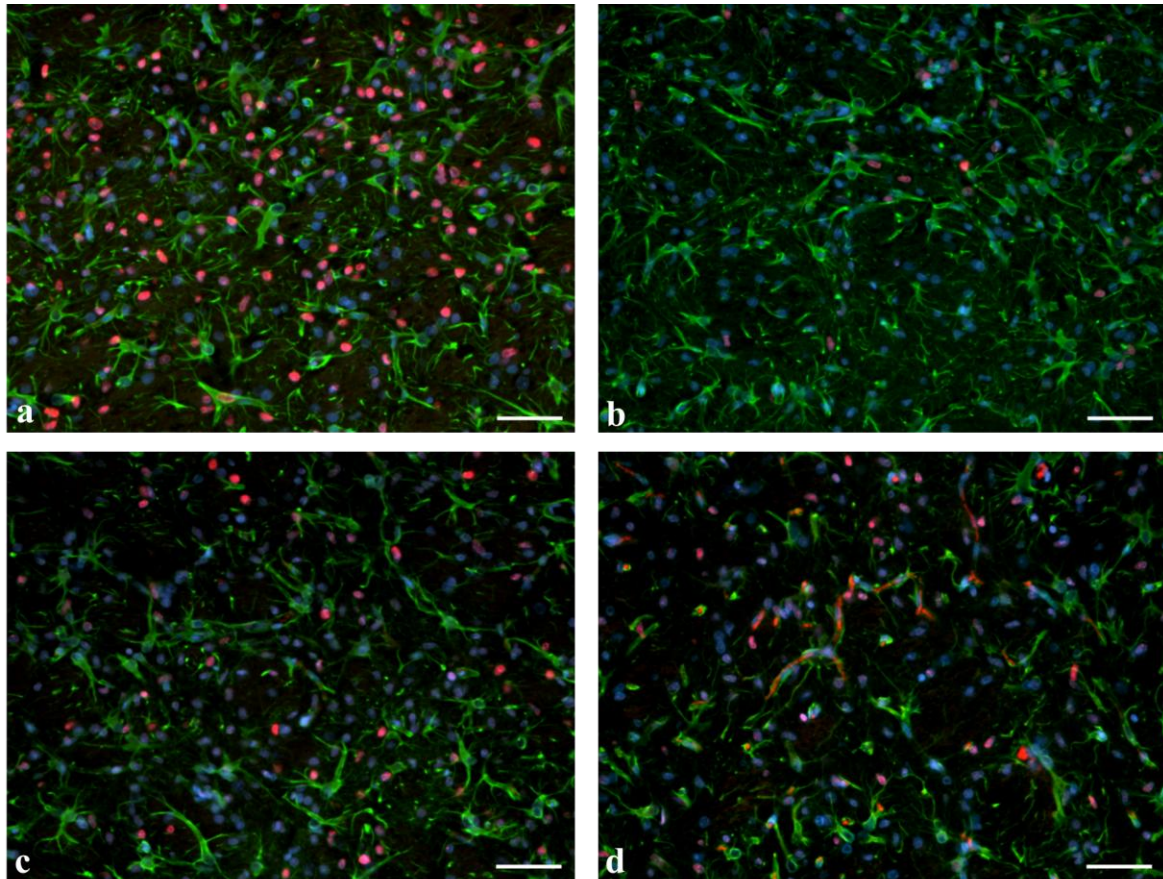
Při použití detekce vimentinu je dobře patrné, že po aplikaci EPO se jeho exprese mírně zvýšila v centrální oblasti NDP (obr. 56d, 58d) v porovnání s placebovou skupinou (obr. 58a), což koresponduje s nálezem zvýšeného počtu BrdU⁺ jader v této lokalitě. Důvodem je jednak generování (proliferace) nových gliových elementů, které v této fázi exprimují pouze vimentin (obr. 56c), jednak zvýšená aktivace vaskulárních nožek astrocytů v souvislosti s přepokládanou zvýšenou metabolickou aktivitou astrocytů (transport látek mezi krví a tkání šedé hmoty striata) v NDP postiženém striatu, příp. s tvorbou nových cév a rekonstrukcí (v oblasti KV) narušené HEB (obr. 58b).

Velmi mírné snížení počtu GFAP⁺ reaktivních astrocytů po podávání EPO (obr. 54b, 56d) se v podstatě prokázal až kvantitativní WB analýzou (*viz dále*). Naproti tomu změny v počtu S100β⁺ astrocytů (obr. 57b) jsme nezaznamenali. Oproti akutní fázi NDP byl počet reaktivních astrocytů nižší, ale v důsledku změn v subchronické fázi NDP, ne vlivem aplikace EPO.

Exprese nestinu byla v porovnání s předchozí skupinou méně výrazná, především proto, že došlo k postupné maturaci části aktivovaných astrocytů, a v podstatě jsme nezjistili rozdíl mezi skupinou s aplikací placebo nebo EPO.

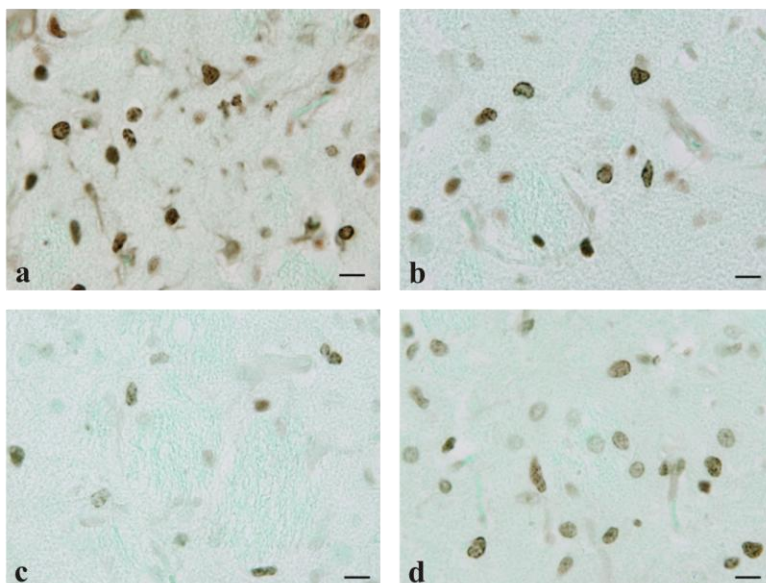


Obr. 53. (a) Při porovnání se skupinou s aplikací placebo do sedmidenní QA léze (QA7+P6), (b) zmenšuje aplikace EPO (QA7+EPO6) výrazně rozsah totální nekrózy v oblasti KV, ale v podstatě neovlivňuje rozsah a intenzitu NDP v okolním striatu. (d) Aplikace EPO do již plně rozvinuté léze (QA28+EPO6) neovlivňuje její rozsah a postižené striatum se neliší (c) od striata s aplikací placebo (QA28+P6); oblast KV je už vyhojená gliovou jizvou. *Porovnávány jsou řezy ze stejného místa v mozku potkanů.* CC – corpus callosum; TN – totální nekróza v oblasti KV. **H&E**; měřítko 150 μm.



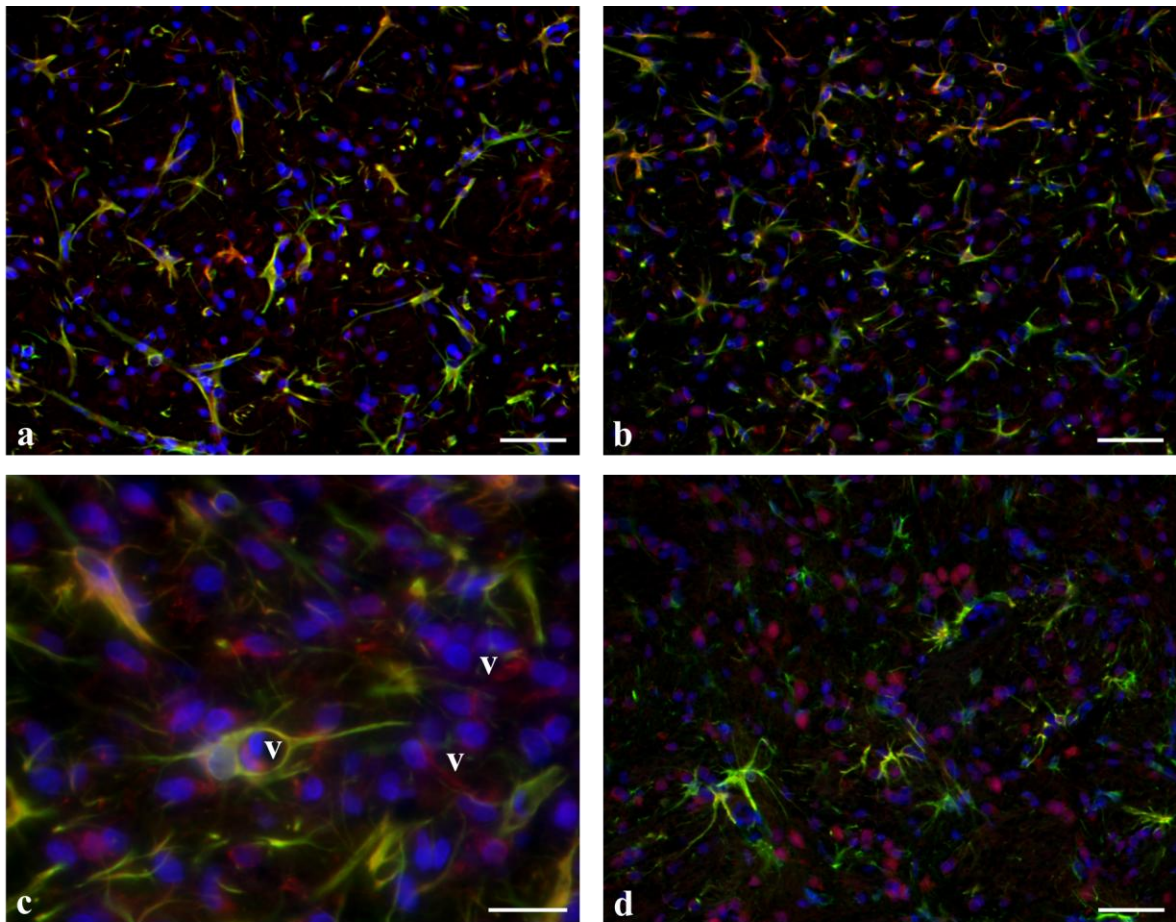
Obr. 54. (a) U skupiny QA7+P6 dochází k typickému rozvoji akutní fáze NDP, provázeného velmi výraznou reaktivní astrogliózou s hypertrofičnými reaktivními astrocyty; většina BrdU⁺ jader ale patří mikroglii v důsledku zánětlivé reakce kolem KV. (b) Po aplikaci EPO (QA7+EPO6) se výrazně snižuje počet BrdU⁺ buněk, což dokumentuje především protizánětlivý efekt EPO. Charakter reaktivní astrogliózy však zůstal nezměněný, i když jsme zaznamenali mírný pokles počtu GFAP⁺ reaktivních astrocytů u skupin s aplikací EPO (b, d). (c) V podstatě stabilizovaná neurotoxická léze s aplikací placebo (QA28+P6) vykazuje již jen malý počet buněk se zřetelně sníženou expresí BrdU v jádře v důsledku opakovaného dělení buněk. (d) Po aplikaci EPO (QA28+EPO6) došlo (kromě centrální oblasti léze – viz *dále*) jen k mírně zvýšené proliferaci buněk, které se však ještě následně opakovaně dělily.

Anti-BrdU + anti-GFAP + DAPI; měřítko 50 μ m.



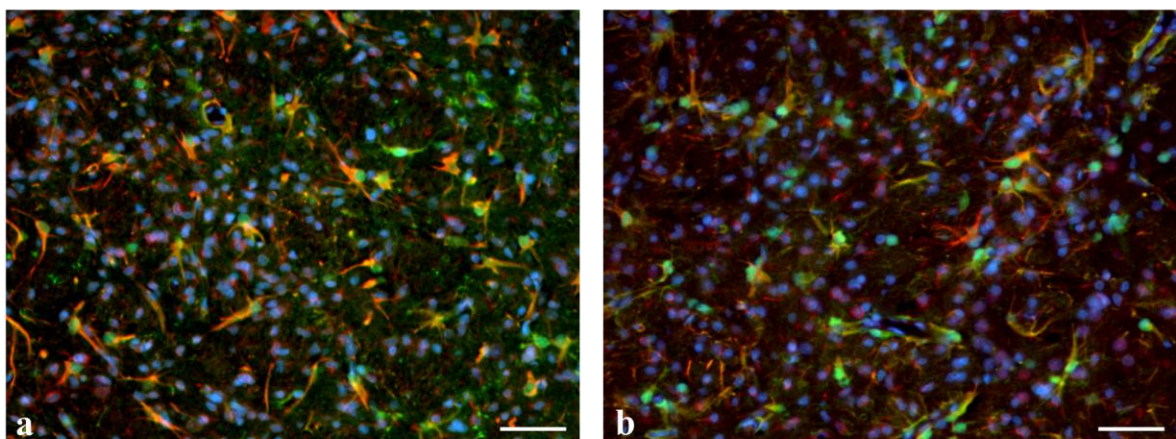
Obr. 55. (a) Vysoká proliferační aktivita (hlavně fagocytující elementy) u skupiny QA7+P6, neovlivněná podáním placebo se (b) výrazně snižuje po aplikaci EPO (QA7+EPO6) v důsledku protizánětlivého účinku EPO. (c) Minimální BrdU-pozitivita u skupiny QA28+P6, ale (d) poněkud zvýšený počet BrdU⁺ buněk v oblasti centra léze ukazuje na jakousi druhou proliferační vlnu po aplikaci EPO u skupiny QA28+EPO6; výrazně snížená exprese BrdU v jádrech těchto buněk prokazuje jejich opakované dělení.

Anti-BrdU; měřítko 10 μ m.



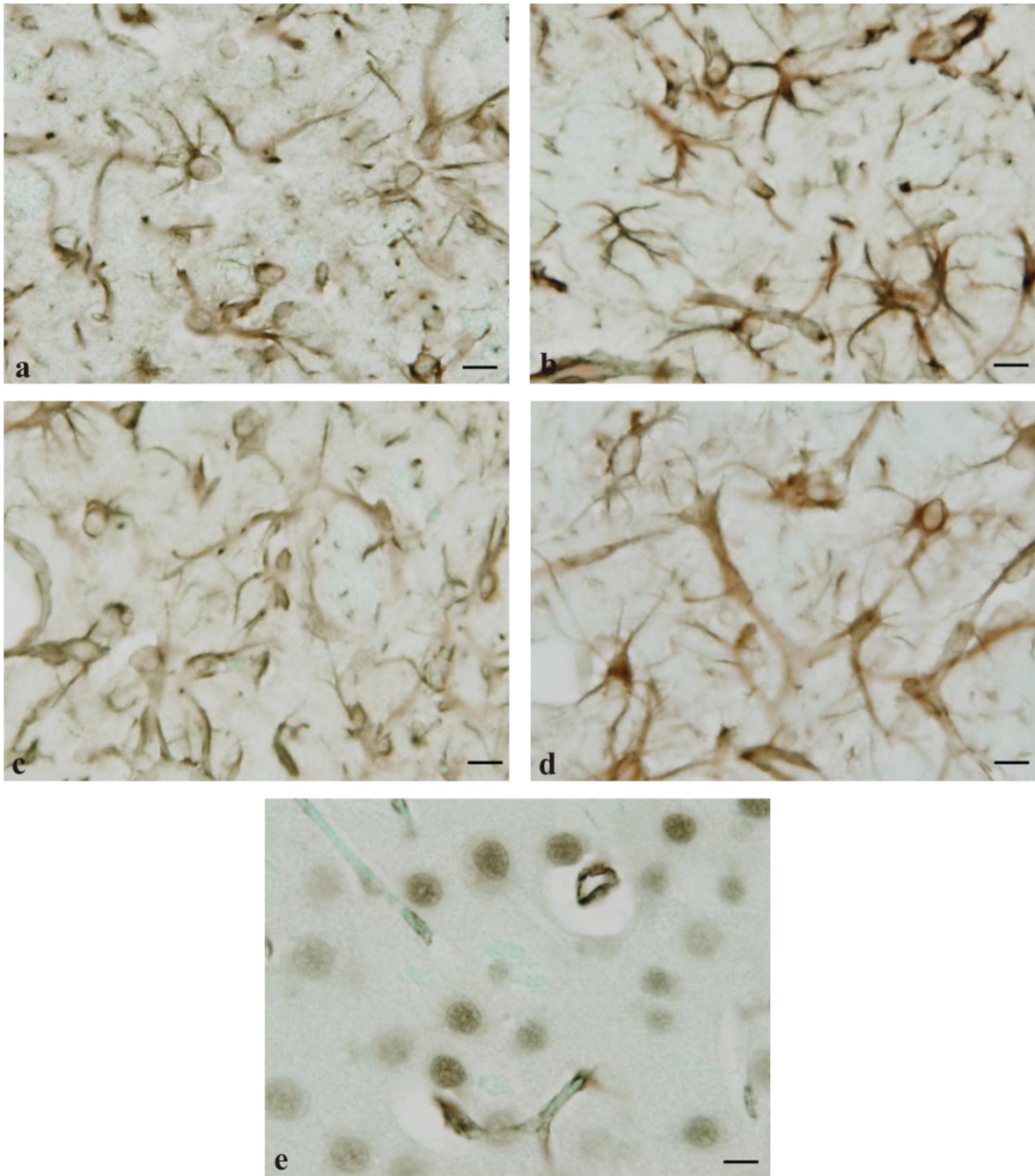
Obr. 56. Počet VIM⁺ glioblastů v akutní 7 denní QA lézi se neliší, porovnááme-li skupiny a) QA7+P6 a (b) QA7+EPO6, ale (d) je o něco vyšší u skupiny QA28+EPO6 v centrální oblasti NDP, což koresponduje s nálezem zvýšeného počtu BrdU⁺ jader v této lokalitě. (c) Vimentin⁺ (QA7+EPO6) jsou nejen glioblasty, ale standardně i endotel a hladká svalovina ve stěně cévní (V). Nižší počet GFAP⁺ reaktivní astrocytů u (d) QA28+EPO6 je dán rozdílem mezi intenzitou reaktivní astroglie v akutní (a, b, c) a subchronické fázi NDP (d).

Anti-VIM + anti-GFAP + DAPI; (a, b, d) měřítko 50 μ m, (c) měřítko 20 μ m.



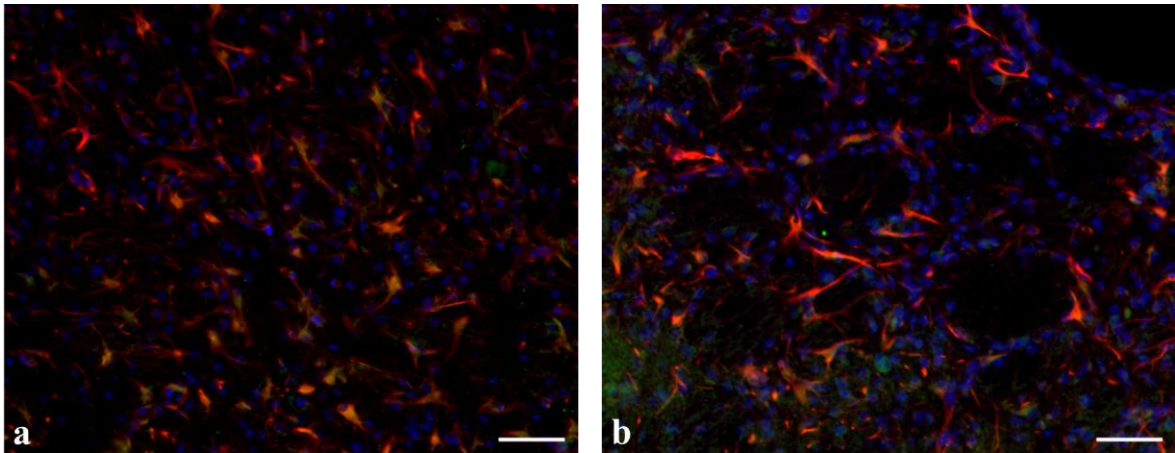
Obr. 57. Rozdíly v počtu S100 β ⁺ astrocytů a stupni aktivace hypertrofických reaktivních (VIM⁺/S100 β ⁺) astrocytů u skupin (a) QA7+EPO6 a (b) QA28+EPO6 jsou dány charakterem NDP u akutní a subchronické léze, ne vlivem aplikace EPO.

Anti-VIM + anti-S100 β + DAPI; měřítko 50 μ m.



Obr. 58. Zvýšená exprese vimentinu je charakteristickým znakem aktivace astrocytů ve striatu postiženém NDP. Při porovnání skupin po aplikaci placebo (a) QA7+P6 a (c) QA28+P6 se skupinami, kde byl podán EPO (b) QA7+EPO6 a (d) QA28+EPO6 je zcela zjevná zvýšená aktivace reaktivních astrocytů kolem cév (rep. jejich vaskulárních nožek) – to jasně prokazuje vaskulogenní efekt EPO i v neurodegenerativní lézi. (e) V intaktním striatu je exprese VIM pouze v endotelu a hladké svalovině cév.

Anti-VIM; měřítko 10 μ m.



Obr. 59. Re-exprese nestinu je ve striatu postiženém NDP typická jednak pro reaktivní astrocyty v akutní fázi procesu, ale také pro aktivovaný endotel cév. (a) V porovnání s placebovou skupinou (QA7+P6) u akutní léze vidíme v centrální oblasti NDP (b) po aplikaci EPO (QA7+EPO6) výraznější expresi nestinu především ve vaskulárních nožkách reaktivních hypertrofických astrocytů, což je důkaz aktivace těchto astrocytů pravděpodobně ve vztahu k rekonstrukci poškozené HEB v této oblasti, tedy opět důkaz, že EPO ovlivňuje i v případě NDP zejména vaskulogenezi. (Absence pozitivita MAP2 prokazuje, že se jedná o centrální oblast NDP, kde již téměř všech neuronů zanikly vlivem QA). **Anti-NEST + anti-MAP2 + DAPI**; měřítko 50 μm .

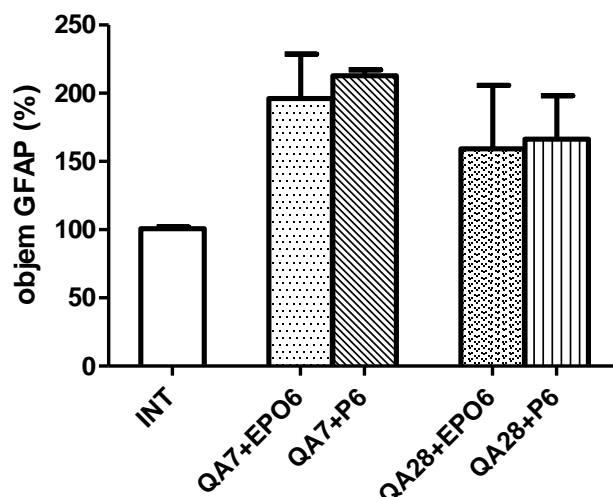
4.3.2. Western Blot analýza objemu GFAP ve striatu

Rozsah reparativní gliózy v důsledku NDP typu HD, která je charakterizovaná hlavně přítomností výrazně GFAP⁺ reaktivních astrocytů, jsme se rozhodli vyhodnotit také pomocí semikvantitativní metody WB, zejména proto, že morfologické nálezy naznačovaly zmírnění rozsahu reaktivní gliózy po aplikaci EPO.

Orientační výsledky WB analýzy (graf 6) nám potvrdily typický nárůst objemu GFAP u zvířat s QA lézí v důsledku reaktivní astrogliózy při rozvoji NDP typu HD, tedy u všech sledovaných skupin v porovnání s intaktními kontrolními zvířaty. Dále jsme prokázali, že u potkanů přežívajících 5 týdnů po neurotoxické lézi (QA28+P6) je objem GFAP ve striatu nižší oproti zvířatům s 2 týdenní QA lézí (QA7+P6). Morfologickým podkladem tohoto efektu je především postupná regrese hypertrofických astrocytů, tedy redukce jejich objemu a posléze i počtu.

Mírná redukce objemu GFAP u obou skupin s aplikací EPO - i když u skupiny QA28+EPO6 byl tento pokles zcela minimální – sice potvrzuje naše morfologické nálezy, avšak vzhledem k malému počtu hodnocených zvířat nelze prozatím s jistotou tvrdit, že podání EPO významněji ovlivňuje rozvoj reaktivní astrogliózy.

Vzhledem k malému počtu zvířat v naší pilotní studii (n = 2 v každé skupině) nebyly výsledky WB analýzy statisticky hodnoceny.

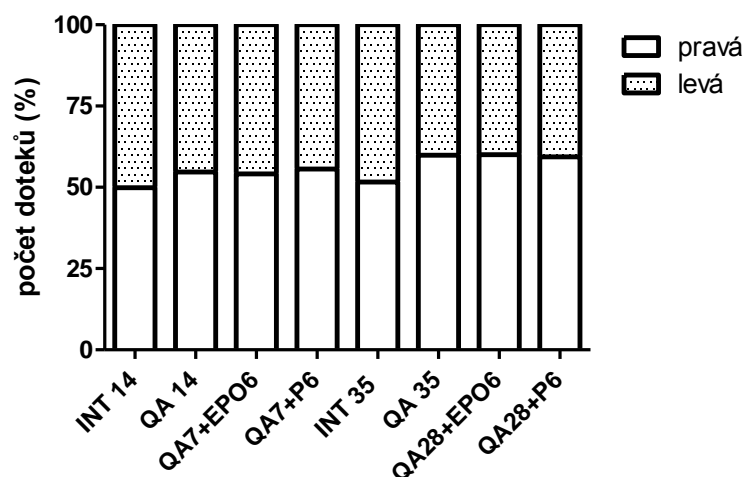


Graf 6: Výsledky WB analýzy objemu GFAP v hemisféře s QA lézí (pravé) po podávání EPO/placebo a u intaktních potkanů.

4.3.3. Behaviorální testování - cylindr test

Cylindr test vychází z tendence potkana prozkoumávat prostředí, ve kterém se nachází a dotýkat se předními končetinami bočních stěn skleněného válce, ve kterém je umístěn. Většina hlodavců nepreferuje výrazně jednu končetinu, takže použití pravé a levé tlapy je přibližně 50%:50%. Zvíře s poškozenou motorikou se dotekům postiženou tlapkou (končetina kontralaterální k poškozené hemisféře) vyhýbá.

Výsledky behaviorálního testování (graf 7) nám naznačují sníženou motoriku levé přední končetiny (kontralaterální) k poškozené (pravé) hemisféře v důsledku rozvíjejícího se NDP a preferenci ipsilaterální přední končetiny. Nepozorovali jsme však rozdíl mezi skupinami po aplikaci EPO/placebo. Hlavním důvodem je patrně to, že pokus byl ukončen po poslední aplikaci testovaných látek, takže případný vliv celé dávky EPO na motoriku zvířat se nemohl výrazněji projevit.



Graf 7: Snížení motoriky levé (kontralaterální) tlapy se zhoršuje s progresí NDP, není však rozdíl mezi skupinami po podání EPO a placebo.

4.3.4. Závěry - vliv erythropoetinu na rozvoj NDP fenotypu HD – pilotní studie

Krátkodobé podávání (i.p.) 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). Tato fáze svojí velmi rychlou progresí NDP i dalších průvodních změn 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 minimálně velmi problematické a spíše nereálné.

5. 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 pochev. Mnohá z nich jsou dědičná nebo vznikají sekundárně následkem toxického či metabolického poškození, jiná se rozvíjejí v důsledku působení infekčních agens. Rychlý rozvoj lékařské genetiky umožnil identifikaci genů specifických pro různá neurodegenerativní onemocnění a využití různých zvířecích modelů dovoluje studium etiologie a příslušných patogenních mechanismů této skupiny chorob.

Huntingtonova choroba, původně spíše označovaná 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). Funkce tohoto proteinu není doposud přesně objasněna, částečně z důvodu jeho exprese v celém organismu a v různých buněčných strukturách, a proto se také předpokládají jeho mnohostranné funkce jak v cytoplasmě, tak i v buněčném jádře. Htt participuje na genové expresi, intracelulárním transportu, intracelulární signalizaci a metabolismu (Harjes a Wanker, 2003; Hoogeveen et al, 1993; Kegel et al, 2002; Li SH a Li XJ, 2004). Mutantní forma htt způsobuje formování nukleárních i cytoplasmatických inkluzí a spouští v buňkách řadu škodlivých biochemických reakcí, které vedou k buněčnému stresu, buněčné dysfunkci, kompenzačním odpovědím, degeneraci a nakonec k buněčné smrti.

Neurodegenerativní proces typu HD se rozvíjí postupně (během 10-20 let) a je charakterizován progresivním postižením neuronů s pozvolnou ztrátou synapsí, dendritů, axonů i buněčných organel zapojených do biosyntetických, transportních a degradačních procesů (Ferrante et al, 1991; Sotrel et al, 1993). Navzdory tomu, že onemocnění bylo identifikováno před více než 100 lety a neustále probíhají intenzivní studie zkoumající patogenезi HD z různých pohledů (patologie, morfologie, biochemie, fyziologie, imunologie, molekulární biologie, atd.), doposud neexistuje žádná účinná terapie pro léčbu tohoto devastujícího onemocnění.

Většina klinických projevů HD je připisována degeneraci v CNS, ale některé znaky onemocnění jsou zprostředkované poruchami mimo CNS (Björkqvist et al, 2008; van der

Burg et al, 2009; Wild a Tabrizi, 2008), např. ztráta hmotnosti a ochabování svalů, metabolická dysfunkce a endokrinní poruchy. Mozek postihuje masivní zánik striatových neuronů, až z 95% to jsou GABA-ergní středně velké neurony s trny s projekcí do globus pallidus a substantia nigra, zatímco velké interneurony zůstávají zachovány. Důsledkem NDP je progredující atrofie striata, v menším rozsahu i mozkové kůry, subkortikální bílé hmoty, talamu, některých hypotalamických jader a jiných dalších oblastí. V pokročilejších stádiích, zejména u juvenilní formy HD, je patrná difuzní atrofie celého mozku (Halliday et al, 1998; Vonsattel, 2008).

Velké množství informací o HD vychází ze studia modelových systémů. Ke studiu patogeneze onemocnění jsou široce využívány různé jak *in vitro*, tak *in vivo* modely. Navzdory tomu, že každý z existujících zvířecích modelů reprodukuje jen některé mechanismy, podílející se na NDP typu HD, představují tyto modely důležitou součást výzkumu HD.

5.1. Experimentální modely Huntingtonovy choroby – neurotoxická léze

Excitotoxicita (nadměrná stimulace receptorů excitačních aminokyselin, hlavně NMDA-receptorů) je už dlouho považována za jeden z hlavních mechanismů sehrávajících důležitou roli v patogenezi HD (např. Cowan a Raymond, 2006; Schwarcz et al, 2010).

Jedním z ne-glutamátových agonistů NMDA-receptorů je i kyselina quinolinová. QA je endogenním metabolitem tryptofanu a její nízká hladina ve fyziologickém rozmezí není škodlivá, ale už mírné zvýšení hladiny působí cytotoxicky. QA není schopna přecházet HEB, proto musí být v experimentech aplikována přímo do striata (Foster et al, 1984), kde navodí neurodegenerativní proces typu HD u pokusných zvířat – nejčastěji používaní jsou potkani (Bordelon et al, 1997; Ribeiro et al, 2006) a myši (McLin et al, 2006), méně primáti (Emerich et al, 2006; Kendall et al, 2000).

Typickým průvodním znakem NDP ve striatu 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, 2009b; Isacson et al, 1987; Jabs et al, 1999; Mazurová et al, 2008; Schiffer et al, 1993; Takamiya et al, 1988). Reaktivní glióza je charakterizována především hypertrofií a proliferací astrocytů, méně aktivací mikrogliových buněk (např. Jabs et al, 1999; Ridet et al, 1997). K výraznému nárůstu počtu reaktivních astrocytů dochází už v prvních dnech po QA lézi. Reaktivní astrocyty se vyznačují vysokou heterogenitou, zvýšenou expresí GFAP a re-expresí IF, typických pro nezralé gliové elementy (Gunčová et al, 2007b; Gunčová et al, 2009b), jak potvrzují i čtené práce

zabývající se především akutní reakcí mozku dospělého jedince na poškození (např. Kimelberg, 2004; Schiffer et al, 1993). Tato heterogenita se zřejmě odvíjí od různé funkce reaktivních astrocytů v závislosti na jejich vzdálenosti od místa poškození. Zatímco reaktivní astrocyty v blízkosti centra léze participují na zánětlivé odpovědi, vzniku edému a vytvoření gliové jizvy, která ohraničuje místo poškození a brání postupu poškození do okolní tkáně, reaktivní astrocyty na okraji ložiska poškození (tzv. distální) se podílejí na zachování funkčního mikroprostředí.

V šedé hmotě zdravého CNS převládají GFAP-negativní astrocyty a GFAP⁺ astrocytů je jen velmi málo. Jejich počet se však výrazně zvyšuje v průběhu reaktivní astrogliózy (Mazurová et al, 2006a; Pekny a Pekna, 2004), která představuje obecnou reakci parenchymu CNS na jakýkoliv typ poranění. Zvýšená exprese GFAP v astrocytech je důležitým ukazatelem jejich reaktivního stavu (Eng a Ghirnikar, 1994; Eng et al, 2000). 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 proliferačního 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 maximalního 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; Takamiya et al, 1988), recentní práce (především Buffo et al, 2008) však jako hlavní zdroj uvádějí tzv. klidové („quiescent“) astrocyty. Buffo a spol. (2008) dokládají, že kortexu mozku myši po akutní mechanické lézi (poranění vpichem) se reaktivní astrocyty generují hlavně ze zmíněných klidových astrocytů, které získávají vlastnosti NKB. 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 prekurzorů (např. NG2⁺ glie). Koexpresi BrdU a GFAP, tedy reaktivní astrocyty vzniklé proliferací, jsme v malém množství - podobně jako další autoři (např. Takamiya et al, 1988) - detekovali hlavně v blízkosti centra léze. Většina BrdU⁺ rychle proliferujících buněk v centru léze (v oblasti kanálu vpichu) byla však mikroglie, případně makrofágy, které vycestovaly z krevního řečiště. Ostatní BrdU⁺ buňky

exprimovaly nestin, který je typickým markerem NKB a NPB, a vimentin, který – jak jsme i prokázali (Gunčová et al, 2009b) - je charakteristický pro nezralé, resp. aktivované málo diferencované gliové buňky. Tyto buňky během prvních 14 dnů téměř nevykazovaly žádné změny v expresi markerů ani v morfologii a tento náš náález potvrzuje, že diferenciaci novotvořených gliových buněk trvá déle než 14 dní (např. Mao a Wang, 2001 uvádějí rozpětí kolem 1 měsíce).

Hlavním znakem je zejména hypertrofie původních plasmatických (většinou GFAP⁺/S100β⁺) astrocytů. Typické hypertrofické GFAP⁺ reaktivní astrocyty jsme zaznamenali až kolem 7. dne po QA lézi, což znamená, že aktivace astrocytů je postupná a trvá několik dní (např. Brickell et al, 1999; Mazurová et al, 2008).

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 (např. Gunčová et al, 2007b; Gunčová et al, 2009b; Janeczko, 1993; Krum a Rosenstein, 1999; Mazurová et al, 2006b; Wang K et al, 2004). 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. V centrální části QA léze vznikají typické hypertrofické reaktivní astrocyty z části z nediferencovaných adultních neurálních progenitorů/prekurzorů (v centru léze především VIM⁺ astroblasty) a následně pak postupně vyžívají (některé velmi pomalu, i několik týdnů), ostatní pak aktivací existujících astrocytů (obvykle NEST⁺/VIM⁺, méně NEST⁺/GFAP⁺). V perifernějších částech, kde se NDP vyvíjí pozvolněji, dochází téměř výhradně k aktivaci existujících astrocytů. Proto v centru QA léze dochází k sice postupné, ale rychlejší expresi/koexpresi nestinu, vimentinu a GFAP, svědčící pro vyžívání (většiny) těchto buněk, než na periférii, kde v oblasti postupně se rozšiřující degenerace neuronů je typická přítomnost většinou již jen výrazně GFAP⁺ reaktivních astrocytů. Nejrychlejší pokles byl v expresi nestinu (14. den jsme již nacházeli tyto astrocyty jen ojedinele). Pokles exprese vimentinu byl nahrazován zvýšeným objemem GFAP⁺ gliofilament a narůstala i exprese S100β proteinu. Velmi zajímavým nálezem byl i posun exprese S100β z těl/jader astrocytů i do odstupů kmenových výběžků reaktivních/hypertrofických astrocytů. Schopnost aktivace existujících astrocytů, dokumentovaná především re-expresí IF nestinu a vimentinu, je dokladem, že reaktivní astrocyty mají některé atributy adultních neurálních kmenových buněk, které jsou v dospělém mozku lokalizovány pouze v sekundárních neurogenických zónách (subependymové a subgranulární).

Rozvoj reaktivní gliózy a změny v morfologii astrocytů jsou podmíněny intenzitou a stupněm degenerace neuronů zřejmě v návaznosti na úzký vzájemný vztah mezi neurony a gliovými buňkami, proto je rychlý úbytek neuronů ve striatu postiženém QA lézí nahrazován hypertrofickými reaktivními astrocyty.

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. Postiženy jsou obě jeho složky, tedy jak zbývající neurony (včetně velmi bohatého stromu dendritů), tak hlavně gliové buňky – astrocyty a oligodendrocyty. Mikroglie se na této fázi již v podstatě nepodílí, protože se jedná o chronickou fází NDP. Počet reaktivních astrocytů se již nezvyšuje (hypertrofické astrocyty již nejsou přítomny vůbec), naopak dochází k postupnému zmenšování jejich těl a redukci výběžků. Také jsme již nenašli nestin⁺ ani vimentin⁺ astrocyty. Morfologické změny se týkají především jemných výběžků GFAP⁺ astrocytů. Reaktivní astrocyty v této fázi vykazují výraznou GFAP-pozitivitu pouze v těle a v nejsilnějších výběžcích, tedy především (později téměř výhradně) ve vaskulárních nožkách. Jejich rozšířená zakončení obklopují cévy ve formě perivaskulární ohraničující membrány a vytvářejí tak specifickou morfologicko-funkční glio-vaskulární jednotku (Nedergaard et al, 2003), která je součástí hematoencefalické bariéry (např. Mathiisen et al, 2010). Vzniká charakteristický obraz degenerujícího striata v chronické fázi procesu, kde dominují GFAP⁺ „prstence“, tvořené zbytnělou perivaskulární gliovou membránou kolem cév (Mazurová et al, 2006a). Navíc jsme zaznamenali mírnou participaci věkových změn (např. Cotrina a Nedergaard, 2002; Mazurová et al, 2006a) 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.

Jak již bylo uvedeno, schopnost proliferace astrocytů v odpovědi na degeneraci neuronů ve striatu je poměrně omezená, v podstatě je suplovaná aktivací a hypertrofií existujících gliových elementů, a tato skutečnost významně přispívá k redukci šedé hmoty striata a jeho výrazné atrofii.

Jen poměrně málo je popsána participace oligodendrocytů na rozvoji reaktivní gliózy a většina prací se týká pacientů s HD (např. Myers et al, 1991; Vonsattel, 2008). Naše nálezy dokládají zvýšený počet oligodendrogliových buněk v souvislosti s redukcí

neuropilu v důsledku progredujícího NDP (např. Gunčová et al, 2011; Mazurová et al, 2002). Je zřejmé, že tyto buňky se nacházejí jak v šedé hmotě striata postiženého NDP, tak v bílé hmotě, tj. ve svazcích myelinizovaných nervů, ve kterých došlo k degeneraci axonů. V obou lokalitách jsou tyto buňky vždy CNP-ase negativní, to znamená, že neprodukují myelin, a navíc neexprimují ani žádné markery charakteristické pro astrocyty. Z našich nálezů zatím není jasný ani vztah těchto buněk k NG2⁺ glii, která představuje poměrně početnou skupinu buněk, nacházejících se v parenchymu mozku za normálních i patologických podmínek (např. Kimelberg, 2004; Nishiyama, 2007). I když původně byly NG2⁺ buňky považovány za progenitorové buňky oligodendrocytů, bylo zjištěno, že vytvářejí interakce s astrocyty i neurony, přijímají presynaptické podněty a odpovídají na uvolněné neurotransmitery ze synapsí (Wigley a Butt, 2009). Významné je, že z morfologického hlediska vypadají jejich těla a jádra podobně jako v plasmatických astrocytech, ale větvením a typem výběžků se liší (Nishiyama, 2007). Studium proliferačního potenciálu a reaktivních vlastností NG2⁺ buněk, astrocytů a mikroglie je nejčastěji zaměřeno na akutní kortikální léze v mozku potkanů (např. Hampton et al, 2004). Naše dílčí nálezy zatím ukazují na to, že v důsledku rozvoje akutního NDP ve striatu dochází k aktivaci NG2⁺ buněk a v menší míře 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.

Hlavním důsledkem degenerace neuronů a rozvoje reaktivní gliózy je dezintegrace neuropilu, tvořeného především hustou sítí dendritů a výběžků astrocytů (méně jiných typů gliových buněk). Na neuropil je vázána i vaskularizace parenchymu CNS. NDP tedy představuje progresivní narušení mikroprostředí ve striatu včetně vaskulárního niché. Společně s rarefakcí neuropilu se snižovala i hustota synapsí. Je pravděpodobné, že na citlivosti striatových neuronů k excitotoxickému poškození se podílí i zhoršená schopnost astrocytů vylučovat extracelulární glutamát ze synaptických štěrbin (Gil a Rego, 2008). Naproti tomu však, při uvážení tohoto vztahu mezi synaptickými a astrocytárními sítěmi a relativně pomalé degeneraci synapsí, můžeme předpokládat, že reaktivní astrocyty, i když pravděpodobně v omezené míře, pokračují v udržování homeostázy ve striatu, dokud NDP nedosáhne maxima.

5.2. Genetický model – potkani transgenní pro Huntingtonovu chorobu

Objevení genu IT 15 kódujícího nestabilní protein huntingtin a rozvoj molekulárních technologií umožnilo vytvoření transgenních modelů pro studium neuropatologických

mechanismů HD. Naše studie poprvé přehledně dokumentuje histopatologické změny ve striatu tgHD potkanů, kteří představují nový a jediný transgenní potkaní model pro studium HD. Prokázali jsme zde, že na rozdíl od často používaných transgenních 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 repeticií, takže představují spíše adultní typ HD s pomalou progresí nejen z hlediska funkčního (von Hörsten et al, 2003), ale i morfologického.

Naše práce prokazuje, že rozvoj histopatologických změn v mozku tgHD potkanů je naopak velmi pozvolný a charakteristické rysy NDP se rozvíjejí až ve 2. roce života těchto zvířat (Gunčová et al, 2009a; Gunčová et al, 2010; Mazurová et al, 2009, Mazurová et al, 2011). V souhlase se studiiemi autorů tohoto modelu (Nguyen et al, 2006; von Hörsten et al, 2003) jsme potvrdili, že atrofie striata (kompenzovaná dilatací postranních mozkových komor) je relativně časným příznakem – začíná se objevovat již u 6 měsíčních tgHD potkanů. Prokázali jsme, že NDP ve striatu probíhá v podstatě atypicky, protože rozvoj NDP typu HD je u tohoto modelu velmi pomalý, proto také nejvýraznější podíl na úbytku šedé hmoty má zmenšování neuronů (především jejich těl) a teprve pak zánik neuronů. Navíc degenerace neuronů probíhá typicky selektivně, to znamená, že některé shluky neuronů jsou postiženy degenerací s rychlejší progresí, některé degenerují pozvolna a jiné přetrvávají beze změn (nejčastěji v oblasti pod corpus callosum) i u nejstarších sledovaných skupin tgHD potkanů. Tento specifický rys byl doposud popsán pouze v lidském mozku postiženém HD (Vonsattel, 2008). Pozvolný rozvoj NDP je také důvodem pouze mírného prořídnutí neuropilu (a tedy i synapsí) i u nejstarších skupin tgHD potkanů, a ne příliš intenzivní průvodní reaktivní gliózy.

Charakter jader striatových neuronů se však u tgHD potkanů mění také v důsledku akumulace intranukleárních agregátů mhtt. Předpokládá se, že mhtt v jádře způsobuje poruchu transkripce (Ross et al, 1999) a je selektivně toxický pro striatové neurony, což právě by mohlo být důvodem jejich selektivní degenerace a zániku (Gu et al, 2007). Nicméně úloha intracelulárních polyglutaminových inkluzí v neurodegenerativním procesu je zatím stále nejasná (např. Rowan, 2004). Částečně k tomu přispívá i velmi složitá metoda znázornění těchto inkluzí (zejména cytoplasmatických, tj. v axonech a dendritech) u zvířecích modelů HD (např. Osmand et al, 2006). První neurony se zvýšeným množstvím denzních intranukleárních agregátů jsme zaznamenali u 6 měsíčních tgHD potkanů a zejména pak u ročních a starších zvířat. Také jsme poukázali na postupné zhušťování

polyglutaminových inkluzí u 12-24 měsíčních zvířat v důsledku zmenšování jader, resp. celých striatových neuronů. Velmi jemné, málo početné agregáty v neuropilu byly pouze ve striatu nejstarších (18 a 24 měsíců) potkanů. I když určité změny v expresi poly-Q najdeme i u 12-24 měsíců starých wt potkanů, jádra striatových neuronů u těchto kontrolních zvířat stále zůstávají typicky velmi světlá s 1 výrazným jádérkem, a to i přesto, že se postupně mírně zmenšují.

Jako první jsme také popsali progresi reaktivní gliózy ve striatu tgHD potkanů. Nárůst počtu GFAP⁺ astrocytů provázelo i zesilování vaskulárních nožek a s tím spojené ztlustění MLGP, tedy vytváření typických výrazně GFAP⁺ „prstenců“ kolem cév. Naopak ani u nejstarších zvířat nebyly přítomny hypertrofické astrocyty, typické pro akutní fázi rozvoje NDP u neurotoxické léze a pro pokročilá stadia HD v lidském mozku. 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 využitím stereologie jednoznačně prokázali, že progresi NDP ve 2. roce života tgHD potkanů je provázena reaktivní gliózou. Důvodem odlišných výsledků může být i použití rozdílného pohlaví potkanů v experimentu, tedy samic na rozdíl od námi používaných samců. Neuroprotektivní vliv ženských pohlavních hormonů byl popsán v různých *in vitro* a *in vivo* HD studiích (např. Stroppolo et al, 2007; Túnez et al, 2006). Byla provedena i studie s tgHD potkany, která charakterizovala a prokázala lehčí průběh onemocnění u tgHD samic a potenciální neuroprotektivní efekt 17β-estradiolu (Bode et al, 2008). Proto také v jedné z našich dalších studií na tomto modelu chceme provést porovnání morfologických změn při rozvoji NDP u potkanů obou pohlaví.

Jak jsme již uvedli, NDP typu HD se ve striatu mozku transgenních potkanů rozvíjí jen pozvolna a nemůže tedy vyvolat akutní reakci astrocytů (reaktivní astrogliózu), která je naopak charakteristická pro NDP navozený akutním neurotoxickým poškozením po intrastriatové aplikaci QA. Proto také u tohoto modelu nenacházíme nestin⁺ a vimentin⁺ astrocyty. Rovněž zmnožení oligodendrocytů je zcela minimální a to pouze u 18 a 24 měsíčních tgHD potkanů, protože také k degeneraci myelinizovaných nervových vláken dochází jen v několika málo svazcích.

Na základě těchto našich poznatků se domníváme, že kdyby tgHD potkani přežívali déle (cca 3-4 roky), pravděpodobně by se u nich rozvinuly morfologické (a tedy s největší pravděpodobností i funkční) projevy velmi podobné pokročilé fázi NDP u pacientů s HD. Avšak (jak již popsali i autoři modelu) tyto potkani koncem 2. roku života (mezi 22.-24. měsícem) velmi rychle hynou (často během 1 týdne). Překvapivé je, že 2 roky je

maximální doba přežití nejen pro samce potkanů transgenních pro HD, ale i pro stejně stará kontrolní (wt) zvířata. Proto také nejstarší námi hodnocené skupiny tgHD a wt potkanů zahrnují zvířata stará 22-24 měsíců. Tento jev potvrzuje, že limitovaný věk zvířat v tomto případě nesouvisí s genetickou mutací, ale s kmenem potkanů Sprague-Dawley (SD).

Dále jsme u tohoto modelu prokázali poměrně významný podíl věkových změn na rozvoji NDP, protože i u kontrolních wt zvířat dochází jak k typickému zmenšování a mírnému úbytku neuronů, tak k nárůstu GFAP⁺ astrocytů. I když jsou tyto změny menšího rozsahu než u tgHD potkanů, kvantitativní stereologická analýza denzity GFAP ve striatu prokázala signifikantní zvýšení u nejstarších sledovaných skupin wt potkanů. Při porovnání Sprague-Dawley wt potkanů (samců) se stejně starými (maximálně 12 měsíčními) potkany kmene Wistar jsme charakteristické zmenšování u většího počtu neuronů pozorovali pouze u SD potkanů. I tento nálezn zapadá do celkové charakteristiky SD potkanů, a sice že se celkově dožívají kratšího věku než potkani kmene Wistar, a proto i změny spojené s procesem stárnutí se u nich objevují dříve a rozvíjejí se rychleji.

Tyto nálezy jsou v souladu s novějšími poznatky o změnách CNS v procesu stárnutí, které mění vžitě spojení zániku neuronů s věkem – naopak, jejich úbytek je minimální a spíše než k zániku neuronů dochází ke zmenšování jejich těla a postižení jejich výběžků i synapsí (např. Hof a Morrison, 2004). Makroskopicky je pozorovatelná atrofie mozku, úbytek bílé hmoty je difusní a rovnoměrný, zatímco u šedé hmoty jsou popisovány regionální odlišnosti, kortex ve frontální a parietální oblasti je postižen více než kortex v temporální a okcipitální oblasti, stejně jako je vážně postižené i striatum (Resnick et al, 2003; Scahill et al, 2003). Změny gliových buněk ve stáří byly dlouho považovány za nepodstatné v porovnání s degenerací neuronů. S věkem byl zaznamenán rozvoj reaktivní gliózy stejně jako v odpovědích na poškození nervové tkáně. Aktivace astrocytů byla detekována v průběhu fyziologického stárnutí použitím GFAP jako markeru, kdy docházelo ke zvýšení exprese mRNA i proteinu (např. Finch, 2003).

Mitochondriální dysfunkci je již poměrně dlouho připisována významná úloha v rozvoji neurodegenerativních onemocnění (např. Beal, 2005). Různé práce poukazují na narušení buněčného metabolismu u HD v souvislosti s možnými mitochondriotoxickými účinky mhtt (např. Gizatullina et al, 2006; Harjes a Wanker, 2003; Panov et al, 2002).

Mitochondriální respirační řetězec je základní pro udržení neuronální homeostázy a jeho narušení by mohlo vést k neurodegeneraci. Funkční respirační komplexy jsou důležité pro řadu dějů (Nicholls a Budd, 2000) - pohyb protonů/elektronů, membránový potenciál

mitochondrií (důležitý pro tvorbu ATP), hospodaření s Ca^{2+} a tvorbu/detoxikaci kyslíkových volných radikálů (reactive oxygen species, ROS). Navzdory předpokladům, že poškození respiračního řetězce představuje primární mechanismus v patogenezi HD, současné poznatky ho řadí mezi mechanismy sekundární (např. Schapira, 2002).

U pacientů s HD (stupeň postižení 3 a 4) je v mozku popisována redukce aktivity mitochondriálních komplexů II, III a IV (např. Browne et al, 1997; Gu et al, 1996; Mann et al, 1990). Poruchy funkce enzymů respiračního řetězce jsou u genetických transgenních modelů doloženy jen u R6/2 myši, u kterých byla ve striatu a v kortexu zjištěna redukce aktivity komplexu IV, zatímco aktivita komplexu II se neměnila (Tabrizi et al, 2000). V naší studii jsme rovněž nezaznamenali změny v aktivitě komplexu II. Toto zjištění bylo celkem překvapivé, vzhledem k tomu, že inhibitory komplexu II (např. 3-NP, MA) jsou běžně využívány pro generaci experimentálních modelů HD (např. Brouillet et al, 1999).

Výsledky oxygrafického měření homogenátu striata tgHD potkanů ukazují snížení aktivity pouze u komplexu I, které bylo doposud zaznamenáno jen u R6/2 myši v mitochondriích buněk kosterního svalů a jen za ztížených podmínek (v přítomnosti nadbytku Ca^{2+}) (Gizatullina et al, 2006). Komplex I je prvním enzymem dýchacího řetězce, oxiduje NADH pocházející z Krebsova cyklu a využívá 2 elektrony na redukci ubichinonu (koenzym Q10) na ubichinol. Protože je tedy hlavním místem vstupu do elektronů do respiračního řetězce a je považován za limitující faktor respirace, tak sehrává centrální úlohu v energetickém metabolismu. Inhibitory komplexu I (např. rotenone, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine - MPTP) sice vyvolávají vznik parkinsonského syndromu, selektivní zánik dopaminergních neuronů a výrazný deficit dopaminu (např. Betarbet et al, 2000; Langston et al, 1983), ale protože striatum přijímá dopaminergní vstupy ze SNC, je možné zavzetí této cesty do mechanismů selektivní degenerace u HD. Byly provedeny různé studie, které prokázaly degeneraci nigrostriatových projekcí, atrofii dopaminergních neuronů v SN a redukcii množství dopaminergních neuronů ve striatu postiženém HD (např. Huot et al, 2007; Suzuki et al, 2001; Yohrling et al, 2003). Lze tedy předpokládat, že u tgHD potkanů se na rozvoji mitochondriální dysfunkce podílí i komplex I. V poslední době přibývají teorie o diverzitě mitochondrií v různých typech buněk a tkání v závislosti na jejich funkčních požadavcích (Kuznetsov et al, 2009; Mootha et al, 2003). Proto by se dalo předpokládat, že mitochondriální dysfunkce v neuronech striata postiženého HD bude probíhat poněkud odlišně než v krevních destičkách, lymfocytech, buňkách kosterního svalstva a dalších buňkách, které jsou u HD obvykle studovány. Navíc se mitochondrie liší i v jednotlivých buňkách (Huang et al, 2004; Sonnewald et al, 1998;

Wikstrom et al, 2009), proto by se mohly mitochondrie studovat *in situ* v buňkách a tkáních primárně postižených HD.

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 (participace věkových změn), tak i z hlediska ekonomického. Naopak velkou výhodou pro nás byla možnost porovnání s předchozím studovaným neurotoxickým modelem bez nutnosti přihlížení k mezidruhovým rozdílům (potkan vs. myš).

5.3. Vliv erythropoetinu na rozvoj degenerativního procesu fenotypu HD – pilotní studie

Dlouhou dobu byla erythropoetinu připisována výhradně úloha hemopoetického faktoru, kdy podporuje maturaci a přežívání erytroidních progenitorových buněk (Jelkmann a Hellwig-Burgel, 2001). V posledních letech však bylo prokázáno, že EPO je zahrnutý i v procesu neuroprotektce, neurogeneze a angiogeneze, a sehrává důležitou roli jako neurotrofický i imunomodelační faktor (např. Carlini et al, 1995; Sakanaka et al, 1998; Studer et al, 2000). Důležitá funkce EPO v CNS byla zjištěna především ve studiích s EPO-R deficientním modelem myši, u kterých byla zaznamenána masivní apoptóza a redukce počtu neuronálních progenitorových buněk (např. Yu et al, 2002).

Vzhledem k velmi významné funkci astroglie v CNS (např. Ransom 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. Navíc bylo zjištěno, že EPO podporuje diferenciaci nervových buněk prostřednictvím astrocytů (Park et al, 2006).

Na základě literárních údajů o experimentálním ovlivnění akutního ischemického poškození mozku jsme se pokusili vytvořit model, kterým jsme chtěli nejprve ověřit, zda má EPO nějaký okamžitý efekt na rozvoj reaktivní astrogliózy, která je základním morfologickým znakem HD, v důsledku chronického (neurodegenerativního) poškození striata.

Na rozdíl od humánní aplikace jsme EPO podávali nárazově po dobu 6 dní v poměrně vysoké dávce (3000 IU/kg). Zvířata byla usmrcena hned následující den po ukončení aplikace EPO z důvodu zjištění rozsahu bezprostředního efektu EPO na reaktivní gliózu v její akutní fázi (tj. na začátku jejího rozvoje) a v subchronické fázi. Pokud by tato naše

pilotní studie prokázala pozitivní vliv EPO na rozvoj reaktivní gliózy (tedy její omezení) u neurotoxického modelu v akutní a subchronické fázi procesu, předpokládali jsme další testování EPO v chronické fázi rozvoje NDP po neurotoxické lézi a následně i u tgHD modelu v různých časových odstupech po aplikaci EPO.

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 opětovné aktivace astrocytů ve smyslu proliferace, avšak ne ve formě hypertrofických reaktivních výrazně GFAP⁺ astrocytů, ale především GFAP⁻ plasmatických astrocytů, po aplikaci EPO do rozvinuté (subchronické) neurotoxické léze (Gunčová et al, 2007a). 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 lze prokázat, že EPO mírně ovlivňuje reparativní gliózu ve striatu především při aplikaci v akutní fázi, a jen velmi málo v subchronické fázi rozvoje NDP. Toto zjištění do jisté míry koresponduje s nálezy jiných autorů (např. Gorio et al, 2005; Vitellaro-Zuccarello et al, 2008) po aplikaci EPO do akutní míšní léze. Porovnání je však problematické, protože se jedná o zcela jiný typ poškození parenchymu CNS – posttraumatická léze s tvorbou gliové jizvy vs. NDP, který vyvolává těžkou difúzní astrogliózu.

Pro kompletaci nálezů bylo provedeno i behaviorální testování zvířat. Testy nám sice potvrdily existenci striatové léze, avšak ve shodě s některými autory (např. Urakawa et al, 2007) je třeba konstatovat, že výraznější lateralizace předních končetin se projevuje až u rozvinuté léze, tedy nejdříve za 14 dní po aplikaci QA. Navíc v takto postaveném experimentu, tedy při ukončení pokusu po poslední aplikaci EPO, se jeho účinek na motoriku nemůže projevit. Stejně nálezy – tedy žádné signifikantní změny – jsme dostali i při hodnocení krevního obrazu testovaných zvířat, to znamená, že hemopoetický účinek EPO (tedy zvýšená produkce červených krvinek) se nemohl projevit.

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 myší (Gil et al, 2004).

6. 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 progres 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, redukci jejich výběžků, „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 významně 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 diferenciacie gliových buněk (nestin a vimentin), v malé míře i např. NG2 (marker gliálních prekurzorů), 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

všech 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.

7. SOUHRN

Huntingtonova choroba (HD) je dědičné neurodegenerativní onemocnění. I přes to, že již známe příčinu vzniku tohoto onemocnění, jíž 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 morfologická 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 morfologickým 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.

8. 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.

9. LITERATURA

- [1] Afifi AK (2003) The basal ganglia: a neural network with more than motor function. *Semin Pediatr Neurol* **10**:3–10.
- [2] Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P (2002) Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* **952**:128-34.
- [3] Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* **13**:266-71.
- [4] Alonso G (2005) NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: Possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound. *Glia* **49**:318–38.
- [5] Antal A, Beniczky S, Kincses TZ, Jakab K, Benedek G, Vécsei L (2003) Perceptual categorization is impaired in Huntington's disease: an electrophysiological study. *Dement Geriatr Cogn Disord* **16**:187-92.
- [6] Avasarala JR, Konduru SS (2005) Recombinant erythropoietin down-regulates IL-6 and CXCR4 genes in TNF-alpha-treated primary cultures of human microvascular endothelial cells: Implications for Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci* **25**:183-90.
- [7] Barres BA (2003) What is a glial cell? *Glia* **43**:4–5.
- [8] Bates GP, Mangiarini L, Mahal A, Davies SW (1997) Transgenic models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **6**:1633-7.
- [9] Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Schwarcz KJ, Martin JB (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* **321**:168–71.
- [10] 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.
- [11] Beal MF (1997) Oxidative damage in neurodegenerative diseases. *The Neuroscientist* **3**:21–7.
- [12] Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* **58**:495–505.
- [13] Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol* **48**:285-96.
- [14] Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**:643-51.
- [15] Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, MacKenzie ET, Petit E (2000) Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* **30**:271–8.

- [16] Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **3**:1301–6.
- [17] Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, Raibon E, Lee RV, Benn CL, Soulet D, Magnusson A, Woodman B, Landles C, Pouladi MA, Hayden MR, Khalili-Shirazi A, Lowdell MW, Brundin P, Bates GP, Leavitt BR, Möller T, Tabrizi SJ (2008) A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med* **205**:1869–77.
- [18] Bode FJ, Stephan M, Suhling H, Pabst R, Straub RH, Raber KA, Bonin M, Nguyen HP, Riess O, Bauer A, Sjoberg C, Petersén A, von Hörsten S (2008) Sex differences in a transgenic rat model of Huntington's disease: decreased 17beta-estradiol levels correlate with reduced numbers of DARPP32+ neurons in males. *Hum Mol Genet* **17**:2595–609.
- [19] Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* **196**:527–42.
- [20] Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecinska M (1997) Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* **69**:1629–39.
- [21] Brickell KL, Nicholson LF, Waldvogel HJ, Faull RL (1999) Chemical and anatomical changes in the striatum and substantia nigra following quinolinic acid lesions in the striatum of the rat: a detailed time course of the cellular and GABA(A) receptor changes. *J Chem Neuroanat* **17**:75–97.
- [22] Brignull HR, Morley JF, Garcia SM, Morimoto RI (2006) Modeling polyglutamine pathogenesis in *C. elegans*. *Methods Enzymol* **412**:256–82.
- [23] Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:10526–31.
- [24] Brouillet E, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW, Srivastava R, Roy DS, Rosen BR, Beal MF (1993) Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* **60**:356–9.
- [25] Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* **59**:427–68.
- [26] Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* **41**:646–53.
- [27] Browne SE, Beal MF (2004) The energetics of Huntington's disease. *Neurochem Res* **29**:531–46.
- [28] Buffo A, Vosko MR, Ertürk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Götz M (2005) Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:18183–8.
- [29] 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.
- [30] Byts N, Sirén AL (2009) Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med* **1**:4.

- [31] Campbell K, Götz M (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* **25**:235–8.
- [32] Capetanaki Y, Starnes S, Smith S (1989) Expression of the chicken vimentin gene in transgenic mice: efficient assembly of the avian protein into the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:4882–6.
- [33] Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M (1995) Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* **47**:740–5.
- [34] Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* **24**:182–8.
- [35] Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M (2002) Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:2258–63.
- [36] Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, Turner DA (1994) Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* **5**:1885–8.
- [37] Cochard P, Paulin D (1984). Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci* **4**:2080–94.
- [38] Cotrina ML, Nedergaard M (2002) Astrocytes in the aging brain. *J Neurosci Res* **67**:1–10.
- [39] Cowan CM, Raymond LA (2006) Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr Top Dev Biol* **75**:25–71.
- [40] Coyle JF, Schwarcz R (1976) Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model of Huntington's chorea. *Nature* **263**:244–6.
- [41] Dahl D (1981) The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J Neurosci Res* **6**:741–8.
- [42] Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates, GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**:537–48.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] Deckel AW, Robinson RG, Coyle JT, Sanberg PR (1983) Reversal of long-term locomotor abnormalities in the kainic acid model of Huntington's disease by day 18 fetal striatal implants. *Eur J Pharmac* **93**:287–8.
- [46] De Long MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* **13**:281–5.

- [47] DiFiglia M (1990) Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* **13**:286–9.
- [48] DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young Ch, Martin E, Vonsattel JPG, Carraway R, Reeves SA, Boyce FM, Aronin N (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein association with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* **14**:1075–81.
- [49] DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JPG, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**:1990-3.
- [50] Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003) Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* **26**:248-54.
- [51] Djoussé L, Knowlton B, Cupples LA, Marder K, Shoulson I, Myers RH (2002) Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology* **59**:1325-30.
- [52] Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**:703–16.
- [53] Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S (2000) Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* **26**:300–6.
- [54] Dragunow M, Faull RL, Lawlor P, Beilharz EJ, Singleton K, Walker EB, Mee E (1995) In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport* **6**:1053–7.
- [55] Dunnett SB, Iversen SD (1982) Spontaneous and drug- induced rotation following localized 6-hydroxydopamine and kainic acid-induced lesions of the neostriatum. *Neuropharmacology* **21**:899-908.
- [56] 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.
- [57] Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* **54**:15–36.
- [58] Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL (2002) Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* **8**:495-505.
- [59] Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, Heinz G, Erdag S, Jahn H, Degner D, Ritzen M, Mohr A, Wagner M, Schneider U, Bohn M, Huber M, Czernik A, Pollmacher T, Maier W, Sirén AL, Klosterkötter J, Falkai P, Ruther E, Aldenhoff JB, Krampe H (2007) Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry* **12**:206-20.
- [60] 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.

- [61] Emerich DF, Thanos CG, Goddard M, Skinner SJ, Geany MS, Bell WJ, Bintz B, Schneider P, Chu Y, Babu RS, Borlongan CV, Boekelheide K, Hall S, Bryant B, Kordower JH (2006) Extensive neuroprotection by choroid plexus transplants in excitotoxin lesioned monkeys. *Neurobiol Dis* **23**:471-80.
- [62] Eng LF, Gerstl B, Vanderhaeghen JJ (1970) A study of proteins in old multiple sclerosis plaques. *Trans Am Soc Neurochem* **1**:42.
- [63] Eng LF, Ghirnikar RS (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* **4**:229-37.
- [64] Eng LF, LeeYL (1995) Intermediate filaments in astrocytes. In: Neuroglial cells, Ransom BR, Kettenmann H (Eds.), *Oxford University Press*, New York, pp. 650-67.
- [65] Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**:1439-51.
- [66] Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* **119**:1763-71.
- [67] Fandrey J (2004) Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**:977-88.
- [68] Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* **49**:377-91.
- [69] 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.
- [70] Ferrante RJ, Kowall NW, Richardson EP Jr (1991) Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J Neurosci* **11**:3877-87.
- [71] Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E, Beal MF (1993) Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* **119**:46-71.
- [72] File SE, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP (1998) Striking changes in anxiety in Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res* **805**:234-40.
- [73] Finch CE (2003) Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Neurobiol Aging* **24**(Suppl1):S123-7, discussion S131.
- [74] Folstein S, Abbott MH, Chase GA, Jensen BA, Folstein MF (1983) The association of affective disorder with Huntington's disease in a case series and in families. *Psychol Med* **13**:537-42.
- [75] Foroud T, Gray J, Ivashina J, Conneally PM (1999) Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **66**:52-6.
- [76] Foster AC, Miller LP, Oldendorf WH, Schwarcz R (1984) Studies on the disposition of quinolinic acid after intracerebral or systemic administration in the rat. *Exp Neurol* **84**:428-40.

- [77] Franke WW, Hergt M, Grund C (1987) Rearrangement of vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* **49**:131-41.
- [78] Fröjdman K, Pelliniemi L, Lendahl U, Virtanen I, Eriksson J (1997) The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation* **61**:243-9.
- [79] Fürst DO, Osborn M, Weber K (1989) Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J Cell Biol* **709**:517-27.
- [80] Fusco FR, Chen Q, Lamoreaux WJ, Figueredo-Cardenas G, Jiao Y, Coffman JA, Surmeier DJ, Honig MG, Carlock LR, Reiner A (1999) Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J Neurosci* **19**:1189-202.
- [81] Garcia Ruiz PJ, Gomez Tortosa E, Sanchez Bernados V, Rojo A, Fontán A, Garcia de Yébenes J (2000) Bradykinesia in Huntington's disease. *Clin Neuropharmacol* **23**:50-2.
- [82] Gárdián G, Vécsei L (2004) Huntington's disease: pathomechanism and therapeutic perspectives. *J Neural Transm* **111**:1485-94.
- [83] Garron DC (1973) Behavioral aspects of Huntington's chorea. *Adv Neurol* **1**:729-35.
- [84] Genc K, Genc S, Baskin H, Semin I (2006) Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes. *Physiol Res* **55**:33-8.
- [85] 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.
- [86] Gil JM, Rego AC (2008) Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* **27**:2803-20.
- [87] Giménez-Amaya JM, Graybiel AM (1990) Compartmental origins of the striatopallidal projection in the primate. *Neuroscience* **34**:111-26.
- [88] Gizatullina ZZ, Lindenberg KS, Harjes P, Chen Y, Kosinski CM, Landwehrmeyer BG, Ludolph AC, Striggow F, Zierz S, Gellerich FN (2006) Low stability of Huntington muscle mitochondria against Ca²⁺ in R6/2 mice. *Ann Neurol* **59**:407-11.
- [89] Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* **134**:971-83.
- [90] Goldman RD, Chou YH, Prahlad V, Yoon M (1999) Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J* **13**(Suppl 2):261-5.
- [91] Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, Carelli S, Di Giulio AM, De Biasi S, Coleman T, Cerami A, Brines M (2005) Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:16379-84.

- [92] Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **13**:244-54.
- [93] Graybiel AM (2000) The basal ganglia. *Curt Biol* 10:509-11.
- [94] Green KJ, Simpson CL (2007) Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* **127**:2499-515.
- [95] Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* **39**:385-9.
- [96] Gu X, André VM, Cepeda C, Li SH, Li XJ, Levine MS, Yang XW (2007) Pathological cell-cell interactions are necessary for striatal pathogenesis in a conditional mouse model of Huntington's disease. *Mol Neurodegener* **2**:8.
- [97] Gunčová I, Mazurová Y, Látr I, Mičuda S (2007a) Vliv erythropoetinu na rozvoj reaktivní gliózy ve striatu při Huntingtonově chorobě – pilotní studie. *Lék Zpr LF UK Hradec Králové* **52**:145-56.
- [98] Gunčová I, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I. (2007b) 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, pp.25–28. ISBN 978-80-254-1310-4.
- [99] Gunčová I, Mazurová Y, Rudolf E (2009a) Immunohistochemical study of progression of neurodegenerative process within the striatum of rats transgenic for Huntington's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* **15**(Suppl 2):164-5.
- [100] Gunčová I, Mazurová Y, Rudolf E, Látr I (2009b) 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.
- [101] Gunčová I, Mazurová Y, Rudolf E, Staňková P (2010) Specifické rysy neurodegenerativního procesu ve striatu potkanů transgenních pro Huntingtonovu chorobu. *4. morfologická postgraduální konference: Program a sborník abstrakt*, Hradec Králové, ČR, 7-7. ISBN 978-80-254-8612-2.
- [102] 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.
- [103] Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234-8.
- [104] Gusella JF (2001) Huntington Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group (<http://www.els.net>).
- [105] Halliday GM, McRitchie DA, MacDonald V, Double KL, Trent RJ, McCusker E (1998) Regional specificity of brain atrophy in Huntington's disease. *Exp Neurol* 154:663-72.
- [106] Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJ, Fawcett JW (2004) The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience* 127:813-20.

- [107] Harjes P, Wanker EE (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28:425–33.
- [108] Harper PS (2002) The epidemiology of Huntington's disease. In: Huntington's disease, Bates G, Harper P, Jones L (Eds.), *Oxford University Press*, New York, pp.159–97.
- [109] Hassan K, Simri W, Rubenchik I, Manelis J, Gross B, Shasha SM, Kristal B (2003) Effect of erythropoietin therapy on polyneuropathy in predialytic patients. *J Nephrol* 16:121-5.
- [110] Haydon PG (2000) Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. *Curr Biol* 10:712-4.
- [111] Hedreen JC, Peyser CE, Folstein SE, Ross CA (1991) Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 133:257-61.
- [112] 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.
- [113] Herrmann H, Bär H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U (2007) Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:562–73.
- [114] Hickey MA, Chesselet MF (2003) The use of transgenic and knock-in mice to study Huntington's disease. *Cytogenet Genome Res* 100:276–86.
- [115] Ho AK, Sahakian BJ, Brown RG, Barker RA, Hodges JR, Ane MN, Snowden J, Thompson J, Esmonde T, Gentry R, Moore JW, Bodner T (2003) Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. *Neurology* 61:1702-6.
- [116] Ho LW, Brown R, Maxwell M, Wytttenbach A, Rubinsztein DC (2001) Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. *J Med Genet* 38:450–2.
- [117] Hockfield S, McKay R (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5:3310-28.
- [118] 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.
- [119] Hof PR, Morrison JH (2004) The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci* 27:607–13.
- [120] Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, de Rooij KE, Roos RA, van Ommen GJ, Galjaard H (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 2:2069–73.
- [121] Hornykiewicz O (2001) Chemical neuroanatomy of the basal ganglia-normal and in Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat* 22:3-12.
- [122] Houle J, Fedoroff S (1983) Temporal relationship between the appearance of vimentin and neural tube development. *Dev Brain Res* 9:189-95.

- [123] Huang HM, Fowler C, Zhang H, Gibson GE (2004) Mitochondrial heterogeneity within and between different cell types. *Neurochem Res* **29**:651–8.
- [124] Huntington G (1872) On chorea. *Med Surg Reporter* **26**:317–21.
- [125] Huot P, Lévesque M, Parent A (2007) The fate of striatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Brain* **130**:222–32.
- [126] Hurlbert MS, Zhou W, Wasmeier C, Kaddis FG, Hutton JC, Freed CR (1999) Mice transgenic for an expanded CAG repeat in the Huntington's disease gene develop diabetes. *Diabetes* **48**:649–51.
- [127] Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:11715-20.
- [128] Chen ZJ, Negra M, Levine A, Ughrin Y, Levine JM (2002) Oligodendrocyte precursor cells: Reactive cells that inhibit axon growth and regeneration. *J Neurocytol* **31**:481–95.
- [129] Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, Noguchi CT (2007) Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem* **282**:25875-83.
- [130] Chiu AY, Espinosa de los MA, Cole RA, Loera S, de Vellis J (1991) Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, Schwann cells, and schwannomas in culture. *Glia* **4**:11–24.
- [131] Chiu E, Alexander L (1982) Causes of death in Huntington's disease. *Med J Aust* **1**:153.
- [132] Isacson O, Brundin P, Kelly PA, Gage FH, Björklund A (1984) Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid lesioned rat striatum. *Nature* **311**:458-60.
- [133] Isacson O, Fischer W, Wictorin K, Dawbarn D, Björklund A (1987) Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience* **20**:1043-56.
- [134] Jabs R, Bekar LK, Walz W (1999) Reactive astrogliosis in the injured and postischemic brain. In: Pathophysiology of Cerebral Ischemia, Walz W (Ed.), *Humana Press*, Totowa NJ, pp.233-49.
- [135] Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL (1998) Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons. *Neuron* **21**:633-42.
- [136] Janeczko K (1993) Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci* **11**:139–47.
- [137] Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH (2002) Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* **64**:326-33.
- [138] Jason GW, Suchowersky O, Pajurkova EM, Graham L, Klimek ML, Garber AT, Poirier-Heine D (1997) Cognitive manifestations of Huntington disease in relation to genetic structure and clinical onset. *Arch Neurol* **54**:1081-8.

- [139] Jelkmann W, Hellwig-Burgel T (2001) Biology of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol* **502**:169–87.
- [140] Jensen P, Sørensen SA, Fenger K, Bolwig TG (1993) A study of psychiatric morbidity in patients with Huntington's disease, their relatives, and controls. Admissions to psychiatric hospitals in Denmark from 1969 to 1991. *Br J Psychiatry* **163**:790–7.
- [141] Jing R, Wilhelmsson U, Goodwill W, Li L, Pan Y, Pekny M, Skalli O (2007) Synemin is expressed in reactive astrocytes in neurotrauma and interacts differentially with vimentin and GFAP intermediate filament networks. *J Cell Sci* **120**:1267–77.
- [142] Johansson C, Lothian C, Molin M, Okano H, Lendahl U (2002) Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *J Neurosci Res* **69**:784–94.
- [143] Junqueira CL, Carneiro J, Kelley RO (1999) Základy histologie. a Lange medical book, *H+H*, Jinočany:160.
- [144] Kachinsky A, Dominov J, Miller J (1994) Myogenesis and the intermediate filament protein nestin. *Dev Biol* **165**:216–28.
- [145] Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* **1**:683–92.
- [146] 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.
- [147] Kasischke KA, Vishwasrao HD, Fisher PJ, Zipfel WR, Webb WW (2004) Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* **305**:99–103.
- [148] Kassubek J, Gaus W, Landwehrmeyer GB (2004) Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* **62**:523–4.
- [149] Kato T (2006) The role of mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Drug News Perspect* **19**:597–602.
- [150] Kegel KB, Meloni AR, Yi Y, Kim YJ, Doyle E, Cuiffo BG, Sapp E, Wang Y, Qin ZH, Chen JD, Nevins JR, Aronin N, DiFiglia M (2002) Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem* **277**:7466–76.
- [151] Kendall AL, David F, Rayment G, Torres EM, Annett LE, Dunnett SB (2000) The influence of excitotoxic basal ganglia lesions on motor performance in the common marmoset. *Brain* **123**(Pt 7):1442–58.
- [152] Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti CL, Gassmann M, Hermann DM (2005) Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *Faseb J* **19**:2026–8.
- [153] Kimelberg HK (2004) Volume activated anion channel and astrocytic cellular edema in traumatic brain injury and stroke. *Adv Exp Med Biol* **559**:157–67.

- [154] Kirkwood SC, Su JL, Conneally P, Foroud T (2001) Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease. *Arch Neurol* **58**:273–8.
- [155] Környei Z, Szlávik V, Szabó B, Gócza E, Cziráok A, Madarász E (2005) Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell co-cultures in the course of glia-induced neurogenesis. *Glia* **49**:430-44.
- [156] Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E, Bird TD, Hayden MR (1994) A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* **330**:1401-6.
- [157] 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.
- [158] Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H (2005) Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* **87**:15-8.
- [159] Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R (2009) The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* **41**:1928–39.
- [160] Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* **364**:535-7.
- [161] Landles C, Bates GP (2004) Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* **5**:958–63.
- [162] Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**:979–80.
- [163] Lawrence AD, Hodges JR, Rosser AE, Kershaw A, French-Constant C, Rubinsztein DC, Robbins TW, Sahakian BJ (1998) Evidence for specific cognitive deficits in preclinical Huntington's disease. *Brain* **121**:1329-41.
- [164] Leavitt BR, Guttman JA, Hodgson JG, Kimel GH, Singaraja R, Vogl AW, Hayden MR (2001) Wildtype huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet* **68**:313–24.
- [165] Leavitt BR, Raamsdonk JM, Shehadeh J, Fernandes H, Murphy Z, Graham RK, Wellington CL, Raymond LA, Hayden MR (2006) Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *J Neurochem* **96**:1121–9.
- [166] Lendahl U, Zimmerman L, McKay R (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**:585-95.
- [167] Levitt P, Rakic P (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* **193**:815–40.
- [168] Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Sirén AL, Ehrenreich H (2000) Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport* **11**:3485-8.

- [169] Li H, Li SH, Johnston H, Shelbourne PF, Li XJ (2000) Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet* **25**:385-9.
- [170] Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, Hoffman R (2003) Nestin expression in hair follicle. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:9958-61.
- [171] Li R, Messing A, Goldman JE, Brenner M (2002) GFAP mutations in Alexander disease. *Int J Dev Neurosci* **20**:259–68.
- [172] Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* **20**:146–54.
- [173] Lin CH, Tallaksen-Greene S, Chien WM, Cearley JA, Jackson WS, Crouse AB, Ren S, Li XJ, Albin RL, Detloff PJ (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **10**:137–44.
- [174] Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**:787–95.
- [175] Lione LA, Carter RJ, Hunt MJ, Bates GP, Morton AJ, Dunnett SB (1999) Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* **19**:10428-37.
- [176] Lipton SA (2004) Erythropoietin for neurologic protection and diabetic neuropathy. *N Engl J Med* **350**:2516-7.
- [177] Liu ZY, Chin K, Noguchi CT (1994) Tissue specific expression of human erythropoietin receptor in transgenic mice. *Dev Biol* **166**:159-69.
- [178] Lothian C, Lendahl U (1997) An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur J Neurosci* **9**:452-62.
- [179] Luesse HG, Schiefer J, Spruenken A, Puls C, Block F, Kosinski CM (2001) Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res* **126**:185–95.
- [180] Magnus T, Coksaygan T, Korn T, Xue H, Arumugam TV, Mughal MR, Eckley DM, Tang SC, Detolla L, Rao MS, Cassiani-Ingoni R, Mattson MP (2007) Evidence that nucleocytoplasmic Olig2 translocation mediates brain-injury-induced differentiation of glial precursors to astrocytes. *J Neurosci Res* **85**:2126–37.
- [181] Malatesta P, Hartfuss E, Götz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**:5253–63.
- [182] Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhof F, Götz M (2003) Neuronal or glial progeny: Regional differences in radial glia fate. *Neuron* **37**:751–64.
- [183] Manfredi G, Beal F (2000) The role of mitochondria in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* **10**:462–72.
- [184] Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier 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.

- [185] Mangiarini L, Sathasivam K, Mahal A, Mott R, Seller M, Bates GP (1997) Instability of highly expanded CAG repeats in transgenic mice is related to expression of the transgene. *Nature Genet* **15**:197-200.
- [186] Mann VM, Cooper JM, Javoy-Agid F, Agid Y, Jenner P, Schapira AH (1990) Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease. *Lancet* **336**:749.
- [187] Mao L, Wang JQ (2001) Gliogenesis in the striatum of the adult rat: alteration in neural progenitor population after psychostimulant exposure. *Brain Res Dev Brain Res* **130**:41-51.
- [188] Markiewicz I, Lukomska B (2006) The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **66**:343-58.
- [189] Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* **8**:666-76.
- [190] Marti HH (2004) Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* **207**:3233-42.
- [191] Mason ST, Fibiger HC (1979) Kainic acid lesions of the striatum in rats mimic the spontaneous motor abnormalities of Huntington's disease. *Neuropharmacology* **18**:403-7.
- [192] Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R (1994) A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* **269**:19488-93.
- [193] Masuda S, Chikuma M, Sasaki R (1997) Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res* **746**:63-70.
- [194] 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.
- [195] Matthiessen HP, Schmalenbach C, Müller HW (1989) Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia* **2**:177-88.
- [196] 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.
- [197] Mazurová Y, Látr I, Österreicher J, Gunčová I (2006a) 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.
- [198] Mazurová Y, Rudolf E, Látr I, Österreicher J (2006b) Proliferation and differentiation of adult endogenous neural stem cells in response to neurodegenerative process within the striatum. *Neurodegenerative Dis* **3**:12-8.
- [199] 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.

- [200] 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.
- [201] 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.
- [202] Mazzanti M, Sul JY, Haydon PG (2001). Glutamate on demand: astrocytes as a ready source. *Neuroscientist* **7**:396-405.
- [203] McGeer EG, Staines WA, McGeer PL (1984) Neurotransmitters in the basal ganglia. *Can J Neurol Sci* **11**:89-99.
- [204] McLin JP, Thompson LM, Steward O (2006) Differential susceptibility to striatal neurodegeneration induced by quinolinic acid and kainate in inbred, outbred and hybrid mouse strains. *Eur J Neurosci* **24**:3134-40.
- [205] Menalled LB, Sison JD, Wu Y, Olivieri M, Li XJ, Li H, Zeitlin S, Chesselet MF (2002) Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice. *J Neurosci* **22**:8266-76.
- [206] Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF (2003) Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* **465**:11-26.
- [207] Menalled LB (2005) Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx* **2**:465-70.
- [208] Merdes A, Gounari F, Georgatos SD (1993) The 47-kD lens-specific protein phakinin is a tailless intermediate filament protein and an assembly partner of filensin. *J Cell Biol* **123**:1507-16.
- [209] Miller G (2005) The dark side of glia. *Science* **308**:778-81.
- [210] Miyake T, Okada M, Kitamura T (1992) Reactive proliferation of astrocytes studied by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res* **590**:300-2.
- [211] Mokry J, Nemecek S (1998) Immunohistochemical detection of intermediate filament nestin. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **41**:73-80.
- [212] Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M (2003) Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* **115**:629-40.
- [213] Mori T, Buffo A, Götz M (2005) The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* **69**:67-99.
- [214] Muir EM, Adcock KH, Morgenstern DA, Clayton R, von Stillfried N, Rhodes K, Ellis C, Fawcett JW, Rogers JH (2002) Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* **100**:103-17.
- [215] Mujtaba T, Mayer-Proschel M, Rao M (1998) A common neural progenitor for the CNS and PNS. *Dev Biol* **200**:1-15.

- [216] Murphy KP, Carter RJ, Lione LA, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ (2000) Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* **20**:5115-23.
- [217] Myers RH, Vonsattel JP, Paskevich PA, Kiely DK, Stevens TJ, Cupples LA, Richardson EPJr, Bird ED (1991) Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol* **50**:729-42.
- [218] Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim S (2001) Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**:386-92.
- [219] Nachtigal P, Semecký V, Kopecký M, Gojová A, Solichová D, Zdánský P, Zadák Z (2004) Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* **200**:219-29.
- [220] Namiki J, Tator C (1999) Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**:489-98.
- [221] Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**:811-23.
- [222] Naver B, Stub C, Moller M, Fenger K, Hansen AK, Hasholt L, Sørensen SA (2003) Molecular and behavioral analysis of the R6/1 Huntington's disease transgenic mouse. *Neuroscience* **122**:1049-57.
- [223] Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**:523-30.
- [224] Neugebauer KM, Tomaselli KJ, Lilien J, Reichardt LF (1988) N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J Cell Biol* **107**:1177-87.
- [225] 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.
- [226] Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* **80**:315-60.
- [227] Nishiyama A (2007) Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS. *Neuroscientist* **13**:62-76.
- [228] Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409**:714-20.
- [229] Osmand AP, Bertheliev V, Wetzel R (2006) Imaging polyglutamine deposits in brain tissue. *Methods Enzymol* **412**:106-22.

- [230] Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* **5**:731–6.
- [231] Park MH, Lee SM, Lee JW, Son DJ, Moon DC, Yoon DY, Hong JT (2006) ERK-mediated production of neurotrophic factors by astrocytes promotes neuronal stem cell differentiation by erythropoietin. *Biochem Biophys Res Commun* **339**:1021–8.
- [232] Pekny M (2001) Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. *Prog Brain Res* **132**:23–30.
- [233] Pekny M, Pekna M (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* **204**:428-37.
- [234] Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:10625–9.
- [235] Pollack AE (2001) Anatomy, physiology, and pharmacology of the basal ganglia. *Neurol Clin* **19**:523-34.
- [236] Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE (1995) Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* **15**:3775–87.
- [237] Prass K, Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A (2003) Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* **34**:1981-6.
- [238] Prensa L, Cosette M, Parent A (2000) Dopaminergic innervation of human basal ganglia. *J Chem Neuroanat* **20**:207-13.
- [239] Prescott TJ, Montes González FM, Gurney K, Humphries MD, Redgrave P (2006) A robot model of the basal ganglia: behavior and intrinsic processing. *Neural Netw* **19**:31-61.
- [240] Rakic P (2003) Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* **43**:19–32.
- [241] Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH (2007) Animal models of Huntington's disease. *ILAR J* **48**:356-73.
- [242] Ransom B, Behar T, Nedergaard M (2003) New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* **26**:520-2.
- [243] Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato JD, Penney JB, Young AB (1988) Differential loss of striatal projection neurones in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:5733–7.
- [244] Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C (2003) Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *J Neurosci* **23**:3295–301.
- [245] Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M (2003) Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* **33**:891-6.
- [246] Ribeiro CA, Grando V, Dutra Filho CS, Wannmacher CM, Wajner M (2006) Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through

- activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J Neurochem* **99**:1531-42.
- [247] Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* **20**:570-7.
- [248] Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* **20**:3705-13.
- [249] Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, Zuccato C, Fossale E, Cattaneo E (2001) Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* **276**:14545-8.
- [250] Ross CA, Wood JD, Schilling G, Peters MF, Nucifora FCJr, Cooper JK, Sharp AH, Margolis RL, Borchelt DR (1999) Polyglutamine pathogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**:1005-11.
- [251] Rowan A (2004) Allies in the fight against neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* **5**:896.
- [252] Ruhl A (2005) Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* **17**:777-90.
- [253] Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A (2002) Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* **22**:10291-301.
- [254] Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R (1998) Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* **253**:26-32.
- [255] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R (1998) In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:4635-40.
- [256] Sanberg PR, Lehmann J, Fibiger, HC (1978) Impaired learning and memory after kainic acid lesions of the striatum: a behavioral model of Huntington's disease. *Brain Res* **149**:546-51.
- [257] Sanberg PR, Fibiger HC, Mark RF (1981) Body weight and dietary factors in Huntington's disease patients compared with matched controls. *Med J Aust* **1**:407-9.
- [258] Sánchez-Pernaute R, Küinig G, del Barrio Alba A, de Yébenes JG, Vontobel P, Leenders KL (2000) Bradykinesia in early Huntington's disease. *Neurology* **54**:119-25.
- [259] Sapp E, Penney J, Young A, Aronin N, Vonsattel JPG, DiFiglia M (1999) Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**:165-73.
- [260] Scahill RI, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC (2003) A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* **60**:989-94.
- [261] Sejersen T, Lendahl U (1993) Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* **106**:1291-300.

- [262] Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1985) Longitudinal topography and interdigitations of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci* **5**:776-94.
- [263] Senut MC, Suhr ST, Kaspar B, Gage FH (2000) Intraneuronal aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain. *J Neurosci* **20**:219–29.
- [264] Sharma LK, Lu J, Bai Y (2009) Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem* **16**:1266-77.
- [265] Shea TB, Beermann ML, Nixon RA (1992) Sequential effects of astroglial-derived factors on neurite outgrowth: initiation by protease inhibitors and potentiation by extracellular matrix components. *J Neurosci Res* **31**:309–17.
- [266] Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S (2001) Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **21**:9733-43.
- [267] Schapira AH (2002) Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. *J Inherit Metab Dis* **25**:207–14.
- [268] Schapira AH (2010) Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Exp Neurol* **224**:331-5.
- [269] 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.
- [270] 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.
- [271] Schmechel DE, Rakic P (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)* **156**:115–52.
- [272] Schwarcz R, Fuxe K, Agnati LF, Hökfelt T, Coyle JT (1979a) Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res* **170**:485-95.
- [273] Schwarcz R, Hökfelt T, Fuxe K, Jonsson G, Goldstein M, Terenius L (1979b) Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. *Exp Brain Res* **37**:199–216.
- [274] Schwarcz R, Okuno E, White RJ, Bird ED, Whetsell WO Jr (1988) 3-Hydroxyanthranilic acid oxygenase activity is increased in the brains of Huntington's disease victims. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:4079- 81.
- [275] Schwarcz R, Guidetti P, Sathyasaikumar KV, Muchowski PJ (2010) Of mice, rats and men: revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol* **90**:230–45.
- [276] Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H (2001) Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol (Berl)* **101**:271–6.

- [277] Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, Oh R, Bissada N, Hossain SM, Yang YZ, Li XJ, Simpson EM, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR (2003) Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* **12**:1555-67.
- [278] Smith Y, Kieval JZ (2000) Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **23**:28-33.
- [279] Smith Y, Raju DV, Pare JF, Sidibe M (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci* **27**:520-7.
- [280] Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* **11**:400-7.
- [281] Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* **32**:638-47.
- [282] Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, Kilinc K (2003) Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Childs Nerv Syst* **19**:19-22.
- [283] Sonnewald U, Hertz L, Schousboe A (1998) Mitochondrial heterogeneity in the brain at the cellular level. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**:231-7.
- [284] Sotrel A, Williams RS, Kaufmann WE, Myers RH (1993) Evidence for neuronal degeneration and dendritic plasticity in cortical pyramidal neurons of Huntington's disease: a quantitative Golgi study. *Neurology* **43**:2088-96.
- [285] Steinert PM, Roop DR (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* **57**:593-625.
- [286] Stroppolo A, Tian C, Guinea B, Olm V, Sheffield R, Sommer J, Ehrlich ME (2004) 17beta-estradiol promotes striatal medium size spiny neuronal maturation in vitro. *Neuroendocrinology* **79**:259-67.
- [287] Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* **20**:7377-83.
- [288] Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H (2002) Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res* **44**:391-403.
- [289] Sultana S, Sernett SW, Bellin RM, Robson RM, Skalli O (2000) Intermediate filament protein synemin is transiently expressed in a subset of astrocytes during development. *Glia* **30**:143-53.
- [290] Suzuki M, Desmond TJ, Albin RL, Frey KA (2001) Vesicular neurotransmitter transporters in Huntington's disease: initial observations and comparison with traditional synaptic markers. *Synapse* **41**:329-36.
- [291] Tabira T, Konishi Y, Gallyas FJr (1995) Neurotrophic effect of hematopoietic cytokines on cholinergic and other neurons in vitro. *Int J Dev Neurosci* **13**:241-52.
- [292] 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.

- [293] Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada Y (1988) Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res* **466**:201-10.
- [294] Takano H, Cancel G, Ikeuchi T, Lorenzetti D, Mawad R, Stevanin G, Didierjean O, Dürr A, Oyake M, Shimohata T, Sasaki R, Koide R, Igarashi S, Hayashi S, Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Zoghbi H, Brice A, Tsuji S (1998) Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am J Hum Genet* **63**:1060-6.
- [295] Terling C, Rass A, Midsiadis T, Fried K, Lendahl U, Wroblewski J (1995) Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int J Dev Biol* **39**:947-56.
- [296] 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.
- [297] Thompson PD, Berardelli A, Rothwell JC, Day BL, Dick JP, Benecke R, Marsden CD (1988) The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. *Brain* **11**:223-44.
- [298] Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST (2006) A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* **26**:1269-74.
- [299] Túnez I, Collado JA, Medina FJ, Peña J, Del C Muñoz M, Jimena I, Franco F, Rueda I, Feijóo M, Muntané J, Montilla P (2006) 17 beta-Estradiol may affect vulnerability of striatum in a 3-nitropropionic acid-induced experimental model of Huntington's disease in ovariectomized rats. *Neurochem Int* **48**:367-73.
- [300] Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* **291**:657-61.
- [301] Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia* **47**:209-16.
- [302] Urakawa S, Hida H, Masuda T, Misumi S, Kim TS, Nishino H (2007) Environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of doublecortin positive cells following striatal lesions in rats. *Neuroscience* **114**:920-33.
- [303] Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, Lendahl U, Eriksson J, Kalimo H (2001) The expression of intermediate filament nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**:588-97.
- [304] Van der Burg JMM, Björkqvist M, Brundin P (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol* **8**:765-74.
- [305] van Dijk JG, van der Velde EA, Roos RA, Bruyn GW (1986) Juvenile Huntington disease. *Hum Genet* **73**:235-9.

- [306] Van Raamsdonk JM, Pearson J, Slow EJ, Hossain SM, Leavitt BR, Hayden MR (2005) Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* **25**:4169-80.
- [307] Verkhratsky A, Butt A (2007) Glial Neurobiology. A textbook. John Wiley & Sons, Chichester.
- [308] Verkhratsky A, Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* **13**:28-37.
- [309] Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* **198**:971-5.
- [310] Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M, Ghezzi P, Torup L (2007) Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**:552-63.
- [311] Villegas SN, Poletta FA, Carri NG (2003) GLIA: A reassessment based on novel data on the developing and mature central nervous system. *Cell Biol Int* **27**:599-609.
- [312] Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosisio P, Fontana E, Gorio A, De Biasi S (2008) Chronic erythropoietin-mediated effects on the expression of astrocyte markers in a rat model of contusive spinal cord injury. *Neuroscience* **151**:452-66.
- [313] Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* **6**:626-40.
- [314] 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.
- [315] Vonsattel JPG, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**:559-77.
- [316] Vonsattel JPG, DiFiglia M (1998) Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**:369-84.
- [317] Vonsattel JPG (2008) Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* **115**:55-69.
- [318] Wang K, Bekar LK, Furber K, Walz W (2004) Vimentin-expressing proximal reactive astrocytes correlate with migration rather than proliferation following focal brain injury. *Brain Res* **1024**:193-202.
- [319] Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004) Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* **35**:1732-7.

- [320] Wells GM, Catlin G, Cossins JA, Mangan M, Ward GA, Miller KM, Clements JM (1996) Quantitation of matrix metalloproteinases in cultured rat astrocytes using the polymerase chain reaction with a multicompetitor cDNA standard. *Glia* **18**:332–40.
- [321] Wheeler VC, White JK, Gutekunst CA, Vrbanac V, Weaver M, Li XJ, Li SH, Yi H, Vonsattel JPG, Gusella JF, Hersch S, Auerbach W, Joyner AL, MacDonald ME (2000) Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet* **9**:503-13.
- [322] Wigley R, Butt AM (2009) Integration of NG2-glia (synantocytes) into the neuroglial network. *Neuron Glia Biol* **5**:21–8.
- [323] Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS (2009) What can mitochondrial heterogeneity tell us about mitochondrial dynamics and autophagy? *Int J Biochem Cell Biol* **41**:1914–27.
- [324] Wild EJ, Tabrizi SJ. Biomarkers for Huntington’s disease (2008) *Expert Opin Med Diagn* **2**:47–62.
- [325] Wright HH, Still CN, Abramson RK (1981) Huntington's disease in black kindreds in South Carolina. *Arch Neurol* **38**:412-4.
- [326] Wu Y, Shang Y, Sun S, Liang H, Liu R (2007) Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis* **12**:1365-75.
- [327] Yohrling GJ4th, Jiang GC, DeJohn MM, Miller DW, Young AB, Vrana KE, Cha JH (2003) Analysis of cellular, transgenic and human models of Huntington’s disease reveals tyrosine hydroxylase alterations and substantia nigra neuropathology. *Brain Res Mol Brain Res* **119**:28–36.
- [328] Young AB (2003) Huntingtin in health and disease. *J Clin Invest* **111**:299– 302.
- [329] Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF (1993) Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* **81**:2223-36.
- [330] Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT (2002) Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* **129**:505–16.
- [331] Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington’s disease gene homologue. *Nat Genet* **11**:155–63.
- [332] Zhang J, Li Y, Cui Y, Chen J, Lu M, Elias SB, Chopp M (2005) Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Brain Res* **1034**:34-9.
- [333] Zhang Y, Li M, Drozda M, Chen M, Ren S, Mejia Sanchez RO, Leavitt BR, Cattaneo E, Ferrante RJ, Hayden MR, Friedlander RM (2003) Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases. *J Neurochem* **87**:101–6.
- [334] Zhang Y, Leavitt BR, van Raamsdonk JM, Dragatsis I, Goldowitz D, MacDonald ME, Hayden MR, Friedlander RM (2006) Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J* **25**:5896–906.

- [335] Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct trans gene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* **12**:11-24.
- [336] Zoghbi HY, Orr HT (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* **23**:217-47.
- [337] Zühlke C, Riess O, Schröder K, Siedlaczek I, Epplen JT, Engel W, Thies U (1993) Expansion of the (CAG)_n repeat causing Huntington's disease in 352 patients of German origin. *Hum Mol Genet* **2**:1467-9.