

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 6: Zdravotnictví**

## **Role choroidálního plexu v průběhu Alzheimerovy choroby**

**Karolína Jeřábková  
Jihomoravský kraj**

**Brno 2022**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

## Role choroidálního plexu v průběhu Alzheimerovy choroby

## Involvement of the choroid plexus in Alzheimer's disease progression

**Autoři:** Karolína Jeřábková  
**Škola:** Gymnázium Brno-Řečkovice, p. o.  
Terezy Novákové 2  
621 00 Brno  
**Kraj:** Jihomoravský kraj  
**Konzultant:** Alemeh Zamani, Ph.D.

Brno 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 7. 2. 2022 .....

Karolína Jeřábková

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit své velké poděkování **Alemeh Zamani, Ph.D.**, nejen za odborné vedení mé práce, ale především vůbec za možnost s ní pracovat. Děkuji za přátelský a vlídný přístup, věnovaný čas, vynaložené úsilí, obětavou pomoc a zejména za maximální podporu.

Dále chci poděkovat celému kolektivu **Anatomického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity** za příjemnou atmosféru a za poskytnutí zázemí pro mojí práci. Jmenovitě děkuji **Mgr. Klauzii Lakatosové, doc. MUDr. Marku Joukalovi, Ph.D.**, a **MUDr. Peteru Solárovi** za odborné konzultace, korekturu práce a cenné poznatky. Děkuji **Martě Lněničkové** za pomoc s imunocytochemickými metodami v experimentální části práce.

Velké dík také patří **Mgr. Michalu Kuňákovi, Ph.D.**, mému internímu konzultantovi, za pomoc při sestavování formální stránky práce, za věcné připomínky a především za trpělivost. Ráda bych také poděkovala **RNDr. Kateřině Cibulkové, Mgr. Michaele Strakové** a **Mgr. Zuzaně Dvořákové, Ph.D.**, za jejich laskavost a obětovaný čas.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat **Anně Brodecké** za spolupráci na pracovišti a ochotu, se kterou se mi vždy věnovala. Děkuji **své rodině** a **kamarádům** za neustálou oporu.

# Abstrakt

**Úvod.** Alzheimerova choroba je jedno z nejčastějších neurodegenerativních onemocnění, pro které do dnešního dne neexistuje žádná účinná léčba. V průběhu choroby jsou v centrální nervové soustavě popsány dva hlavní patologické nálezy – agregace amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptidu a formace hyperfosforylovaných tau proteinů. Stále více důkazů však poukazuje na třetí významný jev, a to chronickou imunitní reakci asociovanou s nadměrnou aktivací gliových buněk a expresí zánětlivých cytokinů. Choroidální plexus je hustě prokrvená tkáň tvořena specializovanými epiteliálními buňkami, které produkují mozkomíšni mok, tvoří základ hematolikvorové bariéry, a celkově tak zajišťují homeostázu centrální nervové soustavy. Nejnovější studie potvrdily změny v jeho struktuře a imunitních funkcích během Alzheimerovy choroby. Práce se zabývá rolí choroidálního plexu v průběhu Alzheimerovy choroby a jeho potenciálním vztahem s přítomnou neuroinflamací.

**Materiál a metody.** Potkaní epiteliální buňky choroidálního plexu (buněčná linie Z310) byly různě dlouhou dobu inkubovány s odlišně koncentrovanými roztoky lidského A $\beta$ 1-42 peptidu. Následně byly buňky podrobeny imunocytochemické metodě pro detekci agregace A $\beta$  a exprese prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a protizánětlivého cytokinu IL-10. Vyhotovené mikroskopické preparáty byly vizualizovány fluorescenčním mikroskopem.

**Výsledky.** Agregace A $\beta$  se v buňkách Z310 projevila při všech experimentálních podmínkách. Významná formace agregátů byla detekována po 72hodinové inkubační době u skupiny ovlivněné 5  $\mu$ M roztokem A $\beta$ . Dle tohoto výsledku byl vytvořen *in vitro* model, na kterém byla zkoumána exprese IL-1 $\beta$  a IL-10. Po 72 hodinách převažovala exprese IL-1 $\beta$ , nicméně po následující 5denní inkubaci se podstatně navýšila hladina IL-10. Nadměrná exprese IL-10 po 5 dnech však byla stále nižší než exprese IL-1 $\beta$ .

**Závěr.** Výsledky ukazují, že agregace A $\beta$  peptidu způsobuje zánětlivou reakci v choroidálním plexu, která by potenciálně mohla modifikovat strukturu těsných spojů, jež jsou nezbytné pro fungování hematolikvorové bariéry. Práce navíc podporuje hypotézu o protektivním charakteru choroidálního plexu během patologického stavu. Získaná data poskytují možný molekulární mechanismus neuroinflamace během Alzheimerovy choroby. Budoucí výzkum zaměřený na dysfunkci choroidálního plexu v průběhu neurodegenerativních onemocnění se tudíž jeví jako slibný terapeutický cíl.

## Klíčová slova

Alzheimerova choroba; agregace A $\beta$ ; choroidální plexus; hematolikvorová bariéra; neuroinflamace; zánětlivé cytokiny

## Abstract

**Background.** Alzheimer's disease is one of the most common neurodegenerative disorders, with no efficient treatment so far. During disease, the main pathological hallmarks – amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide aggregation and hyperphosphorylated tau proteins formation are found in the central nervous system. However, an increasing amount of evidence points to a third significant finding, a chronic immune response associated with the excessive activation of glial cells and the expression of inflammatory cytokines. The choroid plexus is a densely vascularized tissue consisting of specialized epithelial cells that produce cerebrospinal fluid, form the blood-cerebrospinal fluid barrier, and thus ensure homeostasis of the central nervous system. Recent studies have confirmed changes in its structure and immune functions during Alzheimer's disease. This study deals with the role of the choroid plexus during Alzheimer's disease and its potential relationship with the present neuroinflammation.

**Material and Methods.** Rat epithelial cells of the choroid plexus (cell line Z310) were incubated with the human A $\beta$ 1-42 peptide in a concentration and time-dependent manner. Subsequently, the cells were subjected to an immunocytochemical method to detect A $\beta$  aggregation and expression of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and the anti-inflammatory cytokine IL-10. The prepared microscope slides were visualized using fluorescence microscope.

**Results.** A $\beta$  aggregation occurred in Z310 cells in all experimental conditions. Significant formation of aggregates appeared after a 72-hour incubation in the group treated with 5  $\mu$ M A $\beta$  solution. According to this result, an *in vitro* model was developed in which the expression of IL-1 $\beta$  and IL-10 was examined. After 72 hours, IL-1 $\beta$  expression predominated, but after 5-day incubation, IL-10 levels increased significantly. However, IL-10 overexpression after 5 days was consistently lower than IL-1 $\beta$  expression.

**Conclusions.** Results show that A $\beta$  aggregation causes an inflammatory response in the choroid plexus, which could potentially alter the structure of tight junction proteins, which are essential for the functionality of the blood-cerebrospinal fluid barrier. In addition, this research supports the hypothesis of the choroid plexus' protective nature during pathological conditions. Overall, the obtained data provide a possible molecular mechanism of the neuroinflammation during Alzheimer's disease. Therefore, future research into dysfunction of the choroid plexus during neurodegenerative disorders appears to be a promising therapeutic target.

## Keywords

Alzheimer's disease; A $\beta$  aggregation; choroid plexus; blood-cerebrospinal fluid barrier; neuroinflammation; inflammatory cytokines

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>12</b>
2.1 Choroidální plexus .....	12
2.1.1 Lokace.....	12
2.1.2 Struktura.....	13
2.1.3 Funkce.....	14
2.1.3.1 Mozkomíšní mok.....	14
2.1.3.2 Hematolikvorová bariéra .....	15
2.1.4 Poruchy .....	16
2.2 Alzheimerova choroba .....	17
2.2.1 Historie.....	17
2.2.2 Stádia Alzheimerovy choroby .....	17
2.2.3 Patologie .....	18
2.2.3.1 Senilní plaky .....	19
2.2.3.2 Neurofibrilární klubka .....	19
2.2.4 Rizikové faktory .....	20
2.2.5 Diagnóza .....	20
2.2.6 Léčba.....	21
2.3 Neuroinflamace .....	22
2.3.1 Alzheimerova choroba.....	23
2.3.1.1 Mikroglie .....	23
2.3.1.2 Astrocyty .....	24
2.3.1.3 Cytokiny .....	26
2.3.1.4 Ependymální buňky.....	26
<b>3 Cíle práce</b> .....	<b>27</b>
<b>4 Materiál</b> .....	<b>28</b>
4.1 Buněčná linie.....	28
4.2 Amyloid- $\beta$ 1–42 .....	28
4.3 Reagencie .....	29
4.4 Protilátky .....	30
4.5 Laboratorní vybavení .....	30

4.6	Software .....	31
<b>5</b>	<b>Metody .....</b>	<b>32</b>
5.1	Buněčná kultura .....	32
5.1.1	Kultivace a pasážování buněk.....	32
5.2	Příprava buněčných vzorků pro detekci agregace A $\beta$ .....	33
5.2.1	Příprava roztoků A $\beta$ .....	33
5.2.2	Nasazení buněk a inkubace s A $\beta$ .....	33
5.3	Příprava buněčných vzorků pro detekci exprese cytokinů.....	34
5.3.1	Nasazení buněk a inkubace s A $\beta$ .....	34
5.4	Imunocytochemické metody .....	35
5.4.1	Detekce agregace A $\beta$ .....	35
5.4.2	Detekce exprese cytokinů .....	36
5.5	Fluorescenční mikroskopie .....	36
5.5.1	Vizualizace.....	37
5.6	Zpracování dat.....	37
<b>6</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>38</b>
6.1	Agregace A $\beta$ .....	38
6.2	Exprese cytokinů.....	42
<b>7</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>53</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých internetových zdrojů.....</b>	<b>64</b>
<b>11</b>	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>65</b>
<b>12</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>67</b>
<b>13</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>68</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	protilátka (antibody)
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
Ag	antigen (antigen)
Ag-Ab	antigen-protilátka (antigen-antibody)
AJ	adhezní spoje (adherens junctions)
APP	amyloidový prekurzorový protein (amyloid precursor protein)
A $\beta$	amyloid- $\beta$ (amyloid- $\beta$ )
BACE1	$\beta$ -sekretáza 1 ( $\beta$ -secretase 1)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CNS	centrální nervová soustava (central nervous system)
CSF	mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid)
CT	výpočetní tomografie (computed tomography)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DMEM/F12	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium/Hamova směs živin F12 (Dulbecco's Modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F12)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DSM	Diagnostický a statistický manuál duševních chorob (Diagnostic and statistical manual of mental disorders)
EEG	elektroencefalografie (electroencephalography)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
EKG	elektrokardiografie (electrocardiography)
Fab	antigen vázající fragment (fragment antigen-binding)
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
Fc	krystalizující fragment (fragment crystallizable)
GJ	mezerové spoje (gap junctions)

HEB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
HLB	hematolikvorová bariéra (blood-cerebrospinal fluid barrier)
ChP	choroidální plexus (choroid plexus)
ICC	imunocytochemie (immunocytochemistry)
IF	imunofluorescence (immunofluorescence)
IL	interleukin (interleukin)
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
JAK/STAT	Janus kináza/přenašeč signálu a aktivátor transkripce (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription)
LRP1	protein 1 související s lipoproteinovým receptorem s nízkou hustotou (low density lipoprotein receptor-related protein 1)
MMSE	krátký test kognitivních funkcí (Mini-mental test examination)
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NDS	normální oslí sérum (normal donkey serum)
NFTs	neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles)
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
NMDAR	N-metyl-D-aspartát receptor (N-methyl-D-aspartate receptor)
NPs	senilní plaky, neuritické plaky (neuritic plaques)
NSAID	nesteroidní antiflogistika (non-steroidal anti-inflammatory drug)
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PET	pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)
PFA	paraformaldehyd (paraformaldehyde)
RAGE	receptor pro produkty pokročilé glykace (receptor for advanced glycation endproducts)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie (single-photon emission computed tomography)
SV40	opičí vakuolační virus 40 (simian vacuolating virus 40)
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
TJ	těsné spoje (tight junctions)
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
TTR	transtyretin (transthyretin)
ZO	zonulin (zonulin)

# 1 ÚVOD

Není žádné tajemství, že světová populace stárne. Nepřetržitě se zlepšující zdravotní péče již před několika desítkami let začala přispívat jak ke zkvalitnění lidských životů, tak k jejich prodloužení. V důsledku tohoto vývoje se pochopitelně zvýšil výskyt chorob postihujících starší obyvatelstvo včetně neurologických onemocnění, a to zejména demence (World Health Organization a Alzheimer's Disease International, 2012). Nejčastější příčina jejího propuknutí ve středním a vyšším věku, která se podílí na 60–70 % případů, je nevratné progresivní neurodegenerativní onemocnění nesoucí název Alzheimerova choroba. Mezi její typické behaviorální a psychologické příznaky patří poruchy paměti a jiných kognitivních funkcí, emoční labilita a změny afektivity, které postupně vedou k celkové neschopnosti vykonávat běžné denní činnosti. Nejenže má nemoc zásadní vliv na pacienta, ale i na pečující osoby, na kterých je plně závislý. Alzheimerova choroba je fatální onemocnění, pro které dodnes neexistuje žádná účinná léčba (Povová *et al.*, 2013; Zvěřová, 2017; Alzheimer's Association, 2021).

Před více než sto lety byly již německým psychiatrem Aloisem Alzheimerem popsány dva hlavní patologické nálezy, které dodnes zůstávají jediným vysvětlením vzniku této choroby. Jedná se o nadměrnou tvorbu senilních plaků a neurofibrilárních klubek vedoucí ke globálnímu úbytku mozkové kůry, poškození synapsí a neuronů, které pak zapříčiňují výše popsané příznaky. V mnoha studiích byla navíc prokázána zásadní role chronické imunitní reakce v patogenezi Alzheimerovy choroby. Takzvaná neuroinflamace je asociována s přílišnou aktivací gliových buněk a expresí zánětlivých cytokinů či kyslíkových radikálů. Nicméně souvislost mezi senilními plaky, neurofibrilárními klubky a neuroinflamací ještě zbývá objasnit (Šerý *et al.*, 2013; Zhang a Jiang, 2015).

Jednou z nejméně prozkoumaných struktur centrální nervové soustavy navzdory jejímu velkému klinickému významu je choroidální plexus. Tato hustě prokrvená tkáň se skládá ze specializovaných epiteliálních buněk, které produkují mozkomíšní mok v mozkových komorách. Buňky choroidálního plexu jsou navíc součástí hematolikorové bariéry, která zabezpečuje stálost vnitřního prostředí regulací chemických výměn mezi krví a mozkomíšním mokem. V průběhu Alzheimerovy choroby prochází choroidální plexus a hematolikorová bariéra morfologickými změnami, které mají za následek jak snížení produkce mozkomíšního moku, tak znemožnění eliminace senilních plaků, a tedy narušení rovnováhy (Solár *et al.*, 2020). Vyjasnění vlivu poškození choroidálního plexu na průběh Alzheimerovy choroby se jeví jako slibný cíl pro potenciální léčbu. V nedávné studii Taipa *et al.* (2019) byly navíc prokázány zvýšené hladiny cytokinů v mozkomíšním moku, avšak zda se přímo choroidální plexus, produkující mozkomíšní mok, podílí na neuroinflamaci při Alzheimerově chorobě, není dosud známo.

Otázkou tedy zůstává, zda existuje vztah mezi choroidálním plexem a neuroinflamací v průběhu Alzheimerovy choroby, a pokud ano, jaký?

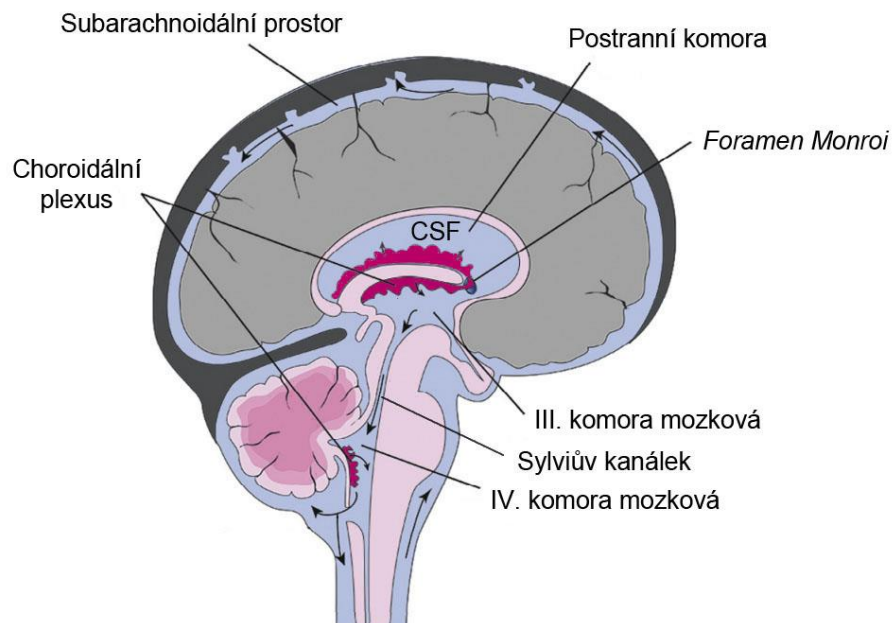
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Choroidální plexus

Choroidální plexus (*plexus chorioideus*, ChP) je hustě prokrvená tkáň tvořena specializovanými epiteliálními buňkami. Nachází se v mozkových komorách, v tzv. komorovém systému mozku (ventrikulární systém). Podstatnou funkcí ChP je produkce mozkomíšního moku (*liquor cerebrospinalis*, CSF). V neposlední řadě se podílí na hematoliquorové bariéře, která tvoří rozhraní mezi krví a mozkomíšním mokem (Javed *et al.*, 2021).

#### 2.1.1 Lokace

Ventrikulární systém lze rozdělit do čtyř komor, ve kterých se nacházejí tkáň choroidálního plexu. V mozkových hemisférách se laterálně rozkládají párové postranní komory, které jsou často označovány jako I. a II. komora mozková. Postranní komory jsou propojeny přes *foramen Monroi* (*foramen interventriculare*) s nepárovou III. komorou mozkovou uloženou v blízkosti mezimozku. Komorový systém dále pokračuje přes Sylviův kanálek (*aqueductus mesencephali*) do oblasti zadního mozku, kde se nachází nepárová IV. komora mozková (Butler *et al.*, 2005). Tkáň ChP (obr. 1) se nacházejí ve všech výše zmíněných mozkových komorách s výjimkou čelního a týlního rohu postranních komor a Sylviova kanálku (Javed *et al.*, 2021).

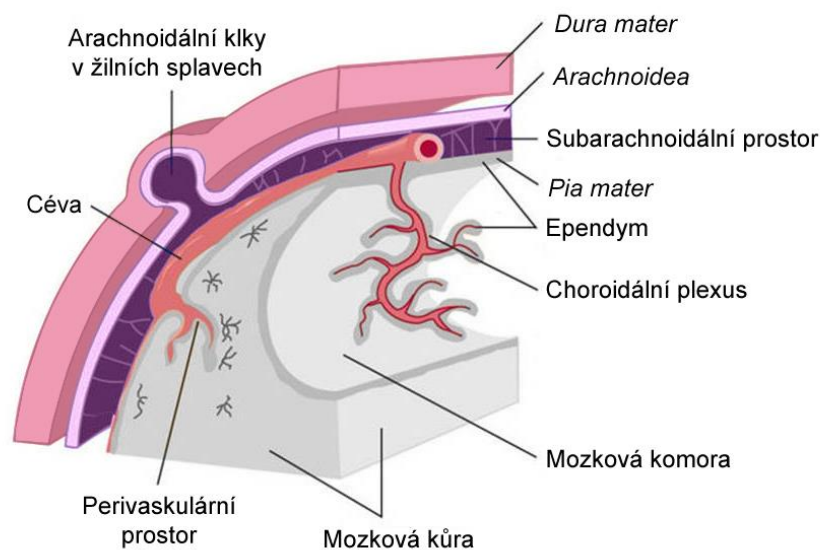


**Obrázek 1: Komorový systém mozku**  
Upraveno podle (Santos *et al.*, 2017).

## 2.1.2 Struktura

Mozek a míchu obalují mozkové pleny, meningy (obr. 2), mezi které patří od nejsvrchnější po nejspodnější: tvrdá plena mozková (*dura mater*), pavučnice (*arachnoidea*) a omozečnice (*pia mater*) (Esteves *et al.*, 2020). Choroidální plexus vzniká u nejnižší mozkové pleny (Javed *et al.*, 2021). *Pia mater* společně s epitelem specializovaných ependymálních buněk (ependym)<sup>1</sup> tvoří tkáň nazývanou *tela choroidea*. Při pronikání cév do *tela choroidea* se formují vychlípeniny do mozkové komory, které nazýváme choroidálními plexy (Haines *et al.*, 2013).

Anatomický základ ChP je tvořen prokrveným stromatem obsahujícím fenestrované kapiláry a pojivovou tkáň. Na povrch pojivové tkáň (*pia mater*) nasedají epiteliální buňky kuboidního tvaru, které obklopují fenestrované kapiláry (Lun *et al.*, 2015). Apikální strana buňky je pokryta řasinkami (*cilia*), zajišťujícími proudění CSF, a mikroklky (*microvilli*). Mikroklky utváří tzv. kartáčový lem, který zdatně zvyšuje plochu choroidálního plexu, a navíc napomáhá zpětnému vstřebávání CSF (Javed *et al.*, 2021). Sousedící buňky jsou navzájem laterálně propojeny těsnými spoji (*zonulae occludens*). Tyto spoje jsou považovány za jednu z hlavních složek hematolikorové bariéry (Strazielle a Gherzi-Egea, 2000).



**Obrázek 2: Formování choroidálního plexu**

*Upraveno podle (Waxman, 2017).*

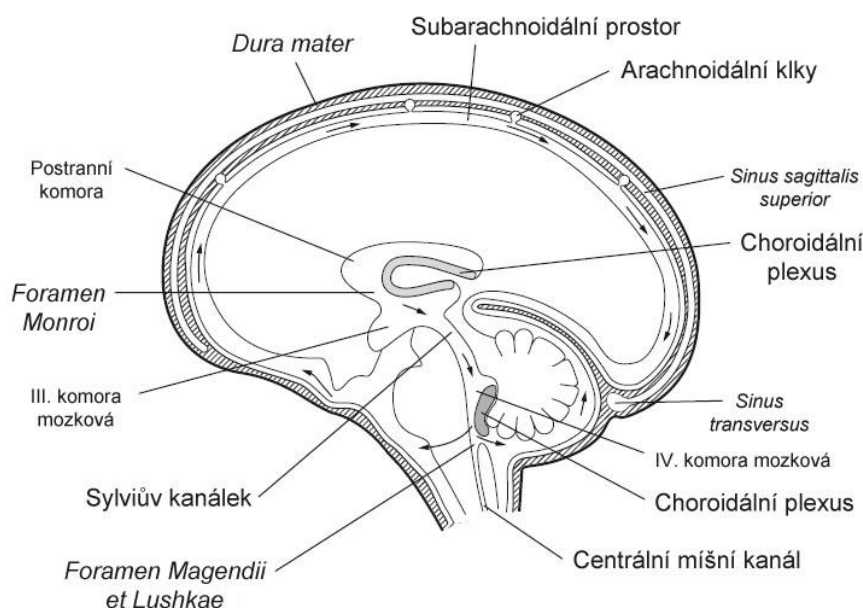
---

<sup>1</sup> Ependymální buňky vystylají vnitřní stěny mozkových komor a centrálního míšního kanálu. Epiteliální buňky choroidálního plexu jsou pouze typem modifikovaných ependymálních buněk (Snell, 2009).

## 2.1.3 Funkce

### 2.1.3.1 Mozkomíšní mok

Mezi důležité funkce choroidálního plexu patří produkce mozkomíšního moku. Celkový objem CSF v lidském mozku se pohybuje okolo 150 ml. Denně vzniká přibližně 450 ml nového CSF (tzn., že se obměňuje 3x denně), z toho až 70 %<sup>2</sup> produkují choroidální buňky (Damkier *et al.*, 2013). Mozkomíšní mok obklopuje mozek a míchu; odděluje je od okolních kostí a chrání je před poškozením během úrazů a otřesů hlavy. Svým biochemickým složením zabezpečuje homeostázu a optimální prostředí pro buňky centrální nervové soustavy (CNS). Plní také ochrannou funkci při zánětu (Dotiwala *et al.*, 2021).



**Obrázek 3: Cirkulace CSF**

*Sinus transversus, sinus sagittalis superior* – žilní splavy.

*Upraveno podle (URL 1).*

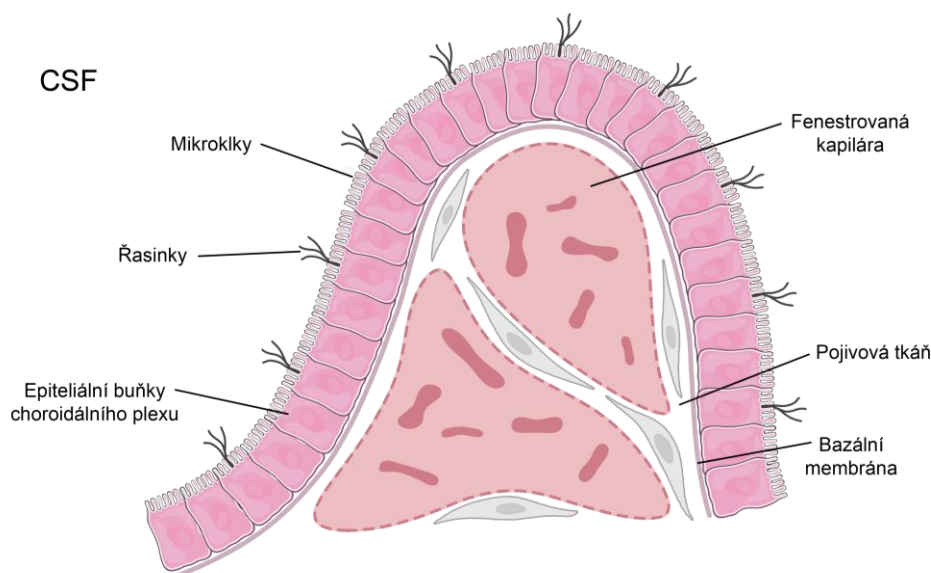
Cirkulace počíná tvorbou mozkomíšního moku primárně v laterálních komorách (obr. 3). Odtud odtéká do III. komory mozkové přes *foramen Monroi* a pokračuje do IV. komory skrze Sylviov kanálek. Dále se mozkomíšní mok dostává do mozkových cisteren a subarachnoidálního prostoru prostřednictvím nepárového otvoru *apertura mediana ventriculi quarti* (*foramen Magendii*) a párového otvoru *apertura lateralis ventriculi quarti* (*foramen Lushkae*). V subarachnoidálním prostoru se část moku vstřebává do žilních splavů (*sinus durae matris*) pomocí arachnoidálních klků (*granulationes arachnoideae*, Pacchioniho granulace). Zbývá část CSF končí v míše; zde se absorbuje prostřednictvím míšních cév do žilních pletení *plexus venosi vertebrales interni* (Snell, 2009).

---

<sup>2</sup> Zbýlý objem denní výroby CSF zajišťují ependymální buňky (Damkier *et al.*, 2013).

### 2.1.3.2 Hematolikvorová bariéra

Hematolikvorová bariéra (HLB) (obr. 4) je tvořena kuboidními epiteliálními buňkami ChP (Laterra *et al.*, 1999). Odděluje od sebe mozkomíšni mok v mozkových komorách a fenestrované kapiláry (kapiláry viscerálního typu<sup>3</sup>). Těsné spoje (TJ) mezi epiteliálními buňkami HLB regulují difúzi vody, iontů a molekul z krve do mozkomíšního moku (Santos *et al.*, 2017; Javed *et al.*, 2021). Mezi hlavní transmembránové proteiny TJ zabezpečující mezibuněčný kontakt patří occludin a claudin. Occludin je prvním proteinem TJ popsáným u ChP. Tento protein upevňuje těsné spoje a omezuje permeabilitu HLB. Skupina těsných spojů s názvem claudiny zahrnuje transmembránové proteiny omezující přestup molekul o různých molekulárních hmotnostích přes HLB. Mezi submembránózní komponenty TJ patří proteiny zonuliny (ZO). K této skupině náleží ZO-1, ZO-2 a ZO-3, které jsou zodpovědné za ukotvení occludinu a claudinu k aktinovým filamentům (cytoskeletu) epiteliálních buněk (Kratzer *et al.*, 2012; Solár *et al.*, 2020).



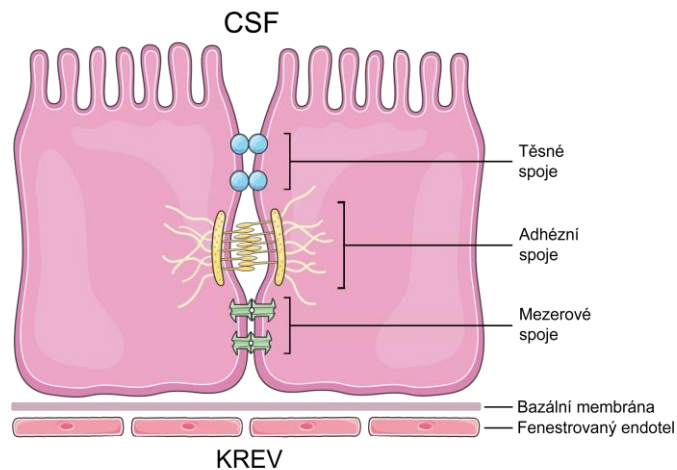
**Obrázek 4: Hematolikvorová bariéra**

Vytvořeno podle (Solár *et al.*, 2020), (URL 2) a (URL 3).

Adhezní spoje (AJ) jsou lokalizované na bazolaterální straně epiteliálních buněk ChP. Podílejí se na regulaci buněčného kontaktu, určují polaritu epiteliálních buněk a jsou důležité při formování TJ (Vorbrodt a Dobrogowska, 2003; Redzic, 2011). Na regulaci HLB se podílí i mezerové spoje (GJ). Tyto spoje jsou tvořeny proteiny – konexiny, které utvářejí póry v cytoplazmatických membránách buněk. GJ zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci, výměnu metabolitů, iontů a sekundárních posílů mezi sousedními epiteliálními buňkami (obr. 5) (Dermietzel a Spray, 1993; Jovanova-Nesic *et al.*, 2009).

<sup>3</sup> Kapiláry vystlané endotelovými buňkami s vytvořenými fenestracemi (otvory) (Vajner *et al.*, 2018).





**Obrázek 5: Buněčné spoje epiteliálních buněk choroidálního plexu**

*Vytvořeno podle (Solár et al., 2020) a (URL 2).*

V porovnání s hematoencefalickou bariérou (HEB) jsou buňky HLB propustnější, což může mít za následek jednodušší průnik patogenů do mozkomíšního moku, a tak i do centrální nervové soustavy. Jako prevence vstupu škodlivých patogenů do CNS slouží různé typy imunitních buněk vyskytujících se v blízkosti tkání choroidálního plexu (Santos *et al.*, 2017; Javed *et al.*, 2021).

## 2.1.4 Poruchy

Významnou, avšak dosud málo prozkoumanou roli hraje choroidální plexus v neurologických onemocněních včetně neurodegenerativních, zánětlivých, traumatických aj. (Wolburg a Paulus, 2010). V několika klinických a preklinických studiích byly prokázány jak anatomické, tak fyziologické změny ChP v průběhu stárnutí a neurodegenerace (Emerich *et al.*, 2004). Mezi vzácnější případy patologických jevů u ChP patří nádory (papilomy a karcinomy choroidálních plexů), které mohou způsobovat nadměrnou produkci CSF (Javed *et al.*, 2021). Infekční choroidální plexitida (zánět nervové pleteně) se projevuje u onemocnění, jako je tuberkulóza nebo kryptokokóza, intenzivním zvětšením choroidální tkáně (Wolburg a Paulus, 2010). Choroidální plexus se aktivně podílí na zneškodnění a odklizení patogenů z CSF a mozku. Nicméně v průběhu Alzheimerovy choroby dochází k morfologickým a fyziologickým změnám postihujícím i ChP. Schopnost HLB odstranit nahromaděný amyloid- $\beta$  peptid (viz kapitola 2.2.3.1 *Senilní plaky*) selhává (Lun *et al.*, 2015). K dalším projevům se řadí zhoršená mitochondriální funkce a poškození v důsledku oxidačního stresu v tkáních choroidálního plexu (Wolburg a Paulus, 2010). Zvýšená atrofie choroidálního plexu byla popsána také u mrtvice, roztroušené sklerózy a schizofrenie. Uvedené poznatky vedou k možné roli, kterou poškození ChP může hrát při mnoha onemocněních CNS (Lun *et al.*, 2015).

## 2.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nevratné neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy vyúsťující v demenci (Zvěřová, 2017). Jedná se o nejčastěji se vyskytující příčinu demence ve středním a vyšším věku přispívající až k 60–70 % všech případů (World Health Organization a Alzheimer's Disease International, 2012). Typický klinický obraz je charakterizován poruchami paměti a dalších kognitivních funkcí vedoucími až k úplné neschopnosti vykonávat běžné činnosti. Mezi další příznaky patří emoční labilita či změny afektivity (deprese, apatie atd.) (Nevšímalová *et al.*, 2002). V důsledku silně progresivního zhoršení choroby je pacient plně odkázán na péči druhých osob (Zvěřová, 2017).

### 2.2.1 Historie

Objev Alzheimerovy choroby a počátek jejího výzkumu se obvykle datuje do roku 1907, kdy svou práci uveřejnil německý psychiatr Alois Alzheimer. Jeho práce pojednávala o případu 51leté paní Auguste Deter, která vykazovala příznaky těžké demence. U pacientky byla popsána neurofibrilární klubka, jeden z hlavních patologických nálezů. Naproti tomu senilní plaky byly objeveny již o přibližně 30 let dříve francouzským patologem Blocquem a rumunským neurologem Marinescem. Ve stejném roce jako Alzheimer publikoval český psychiatr a neuropatolog Oskar Fischer obdobnou práci týkající se stejného onemocnění. Termínu Alzheimerova choroba pak poprvé užil německý psychiatr Emil Kraepelin roku 1910 (Koukolík a Jiráček, 1998; Zvěřová, 2017).

### 2.2.2 Stádia Alzheimerovy choroby

Průběh choroby lze rozlišit do několika stádií podle různých kritérií. Starší Reisbergova škála celkové deteriorace<sup>4</sup> dělí AD na sedm přesně popsaných stupňů. V klinické praxi je však více rozšířeno rozdělení na tři stádia:

#### I. Rané stádium

Prvotní stádium (1–4 let od prvních příznaků AD) se určuje složitě, protože začátek choroby je charakteristicky nenápadný a tzv. plíživý. Proto je rané (lehké) stádium často přehlíženo a mylně zaměňováno za normální příznaky stáří (World Health Organization a Alzheimer's Disease International, 2012; Zvěřová, 2017). U nemocného lze pozorovat poruchy učení novým věcem a nezávažné výpadky paměti. Nastávají potíže s pozorováním, vštěpováním (zapamatováním) a vybavováním si běžných událostí. Zmíněné symptomy ztěžují každodenní činnosti, avšak neomezují jedincovu soběstačnost (Nevšímalová *et al.*, 2002). Tato fáze odpovídá 2.–4. stupni<sup>5</sup> Reisbergovy škály (Šimková, 2010).

---

<sup>4</sup> Termín deteriorace označuje dočasné, krátkodobé zhoršení rozumových schopností.

<sup>5</sup> První stádium Reisbergovy škály je bezpříznakové, lze ho tedy pokládat za preklinické stádium (Koukolík a Jiráček, 1998).

## II. Střední stádium

Následující střední (mírné) stádium obvykle trvá v rozmezí 2–10 let od počátku AD. Problémy už jsou zřejmé; obvykle v této fázi dochází k návštěvě lékaře. Porucha paměti se značně prohlubuje; pacient si vybavuje pouze silně vštípené údaje. Nevzpomíná si na jména blízkých osob či svoji domácí adresu. Je dezorientován i ve známém prostředí a nepamatuje si základní informace o tom, kde se nachází. Soběstačnost je narušena; nemocný není schopen bezpečně samostatně žít (Nevšimalová *et al.*, 2002). Na Reisbergově škále odpovídá mírné stádium 4.–5. fázi (Šimková, 2010).

## III. Pozdní stádium

Pacienti v pozdním (těžkém) stádiu (7–14 let od prvních příznaků AD) téměř kompletně ztrácí paměť. Vybavují si pouze nesourodé útržky dříve dobře známých informací (Nevšimalová *et al.*, 2002). Častá je úplná nevědomost o čase, místě a okolním dění. Nemocní nepoznávají známé osoby nebo předměty. Jsou postiženy řečové funkce a mobilita. Navíc slábnou či úplně selhávají tělesné funkce (např. dochází k inkontinenci); vegetativní funkce probíhají spontánně (World Health Organization a Alzheimer's Disease International, 2012). Objevují se emoční poruchy (podrážděnost), změny v chování, nebo dokonce psychotické projevy (bludy, halucinace). Člověk trpící AD v těžkém stádiu je absolutně nesoběstačný a zcela závislý na pečujících (Nevšimalová *et al.*, 2002). Třetí stádium odpovídá 6. a 7. stupni Reisbergovy škály (Šimková, 2010).

### 2.2.3 Patologie

Přesná patogeneze AD dosud není řádně objasněna; podílí se na ní však několik faktorů. Neurobiologické změny v Alzheimerově chorobě lze rozlišit na makroskopické a mikroskopické (Nevšimalová *et al.*, 2002).

Nejlépe pozorovatelnou makroskopickou změnou je globální mozková atrofie projevující se nejdříve v mediotemporální oblasti. Postupně pak zasahuje temporální lalok, parietální lalok a zadní cingulární kortex (Nikolai, 2013). Pacientovi s AD se ztenčuje mozková kůra, zmenšuje se objem a hmotnost mozku, a navíc se tak rozšiřují mozkové komory (Koukolík a Jiráček, 1998).

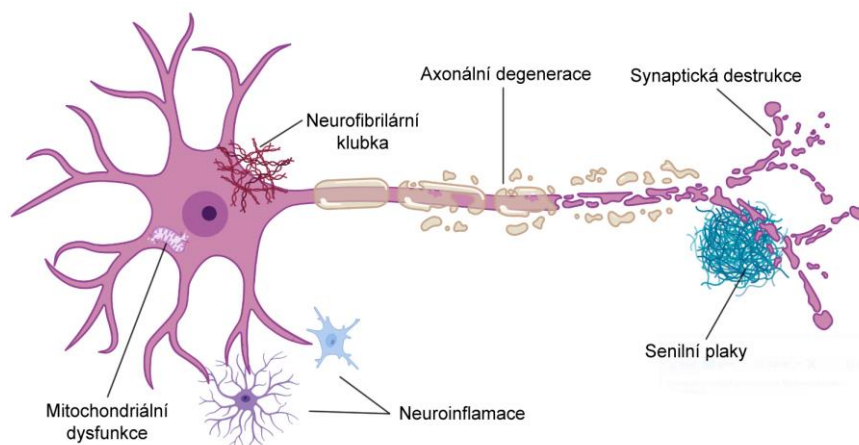
V rámci mikroskopických změn jsou popsány klasické patologické nálezy u AD – senilní plaky, neurofibrilární klubka<sup>6</sup> a rozsáhlý úbytek neuronů spojený se synaptickou destrukcí (obr. 6) (Budson a Kowall, 2011). Plaky a klubka se postupně šíří do celého mozku; v hojném počtu jsou přítomny v mozkových oblastech spojovaných s učením a pamětí (Pešák, 2013). Řada nejnovějších studií navíc poukazuje na zásadní roli neuroinflamace, chronické imunitní reakce, v progresi patologických změn u Alzheimerovy choroby (Kinney *et al.*, 2018).

---

<sup>6</sup> Zmíněné patologické změny nejsou unikátní pro AD, jsou přítomny i při jiných neurodegenerativních onemocněních (Yaari a Corey-Bloom, 2007). Běžně se také vyskytují u klinicky normálně stárnoucího mozku; AD je charakterizována zřetelně vyšší mírou (Koukolík a Jiráček, 1998).

### 2.2.3.1 Senilní plaky

Extracelulární senilní (neuritické) plaky (NPs) jsou sférické heterogenní útvary o velikosti přibližně 10–200  $\mu\text{m}$  (Koukolík a Jiráček, 1998). Centrální jádro sestává z vláknitého amyloid- $\beta$  ( $\text{A}\beta$ ) peptidu, který obklopují dystrofické axony. Amyloid- $\beta$  peptid je složený ze 36 až 43 aminokyselin. Vzniká amyloidogenním štěpením amyloidového prekursorového proteinu (APP) současným působením  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy (Yaari a Corey-Bloom, 2007). Nejvíce patogenní formou amyloid- $\beta$  peptidu je  $\text{A}\beta_{1-42}$  (obsahující 42 aminokyselin). Podstata cytotoxického účinku  $\text{A}\beta$  spočívá v tvoření fibrilárních agregátů (NPs), což má za následek poškození buněk a buněčných membrán; mj. nejspíše vede k hyperfosforylaci tau proteinu (viz kapitola 2.2.3.2 *Neurofibrilární klubka*). Přesné mechanismy agregace  $\text{A}\beta$  nejsou jasné, předpokládá se však, že zahrnují narušení neurotransmiterových systémů vedoucích k oxidativnímu stresu, mitochondriální dysfunkci, zánětu, a nakonec k apoptóze (typ programované buněčné smrti) (Manová, 2011; Pešák, 2013).



**Obrázek 6: Patologie AD**

**Neuroinflamace** viz kapitola 2.3. *Neuroinflamace*.

Vytvořeno podle (Chaudhry et al., 2020) a (URL 3).

### 2.2.3.2 Neurofibrilární klubka

Intracelulární neurofibrilární klubka (NFTs) se nacházejí uvnitř neuronů; jsou tvořeny párovými spirálními vlákny hyperfosforylovaného tau proteinu ( $\tau$ -protein) (Yaari a Corey-Bloom, 2007). Za normálních podmínek k sobě připojuje  $\tau$ -protein mikrotubuly v axonech, poskytuje jim tak stabilitu a přispívá k regulaci intracelulárního transportu látek (Querfurth a LaFerla, 2010). Při Alzheimerově chorobě je ovšem tau protein nadměrně fosforylován prostřednictvím proteinových kináz<sup>7</sup> a fosfatáz<sup>8</sup> (Koukolík a Jiráček, 1998). Takto modifikovaný  $\tau$ -protein způsobuje narušení normálního cytoskeletu a následné odumírání neuronů. Některé studie naznačují, že nerovnováha mezi produkcí a odstraňováním  $\text{A}\beta$  předchází vzniku NFTs (Pešák, 2013).

<sup>7</sup> Enzym přenášející fosfátovou skupinu z vysokoenergetické molekuly na danou cílovou molekulu (proces fosforylace).

<sup>8</sup> Enzym odstraňující fosfátovou skupinu.

## 2.2.4 Rizikové faktory

Alzheimerovou chorobou trpí přibližně 10 % populace starší 65 let; nad 85 let choroba postihuje skoro polovinu této věkové kategorie. Riziko vývoje nemoci u jedince tedy nepochybně stoupá s věkem. Z hlediska dostavení se prvních klinických příznaků lze rozlišit dva typy AD.

Familiární (raná) AD se projevuje před 60. až 65. rokem života a obvykle trvá šest až osm let. Raná forma může být podmíněna genetickými mutacemi genů pro APP, presenilin 1 a presenilin 2 (Koukolík a Jiráček, 1998).

Sporadická (pozdní) AD propuká po 65. roce života. Jedná se o nejčastěji se vyskytující formu tvořící 80–90 % všech případů Alzheimerovy choroby (Crews a Masliah, 2010). Průběh onemocnění je v tomto případě delší – zhruba 10 let. Pozdní forma má pravděpodobně souvislost s  $\epsilon 4$  alelou genu pro apolipoprotein E.

Příjem alkoholu a kouření jsou jedněmi z mnoha faktorů, které mohou přispívat k propuknutí AD. Příjem antioxidantů a strava bohatá na ovoce nebo ryby snižují riziko propuknutí AD, zatímco se zvýšeným příjmem potravin obsahujících nasycené tuky a cholesterol toto riziko roste. Stejně tak je s větším rizikem spojováno nízké vzdělání a nedostatek sociální interakce (Povova *et al.*, 2012).

## 2.2.5 Diagnóza

Při diagnostikování AD se vychází především z kritérií pro diagnózu demence<sup>9</sup>. Zároveň musí být vyloučeny jiné možné příčiny demence, kterými mohou být např. demence s Lewyho tělísky, vaskulární demence, demence při Parkinsonově chorobě aj. (Nevšimalová *et al.*, 2002; Raboch *et al.*, 2012). Pro stanovení diagnózy AD se uplatňují klinická vyšetření v podobě neuropsychologických testů, moderních zobrazovacích metod, elektrofyziologie a jiných pomocných vyšetření zahrnující např. hematologické, endokrinologické, EKG a EEG (Šimková, 2010).

Při podezření na demenci jsou pacienti podrobena vyšetření stavu kognitivních funkcí pomocí testů skládajících se z otázek a úkolů zaměřených na orientaci, paměť, pozornost a na řečové či praktické schopnosti (Nevšimalová *et al.*, 2002). Nejvíce využívaný je test MMSE (Mini-mental state examination) sestávající ze 30 otázek (např. stanovení dne, měsíce, roku; obkreslení dvou prolínajících se pětiúhelníků; zapamatování si tří podstatných jmen atd.). Člověk s nepoškozenými kognitivními schopnostmi by měl dosáhnout 30 bodů (1 bod za otázku), od 26 bodů a níže se určuje stupeň kognitivní poruchy. Pod 10 bodů se stav pacienta hodnotí jako těžká demence. Jiná používaná zkouška je test kreslení hodin. Nemocný má za úkol nakreslit hodinový ciferník s ručičkami, který ukazují zadaný čas. Kresba je poté zhodnocena dle návodu (Raboch *et al.*, 2012).

---

<sup>9</sup> Kritéria jsou stanovena podle Diagnostického a statistického manuálu duševních chorob (DSM) (Nevšimalová *et al.*, 2002).

Zobrazovací metody dovedou lépe rozlišit AD od jiných potenciálních příčin demence. Neinvazivní metody, jako jsou výpočetní tomografie (CT) a magnetická rezonance (MRI), dokáží odhalit strukturální příčiny demence, především atrofii mozku nebo zvětšení mozkových komor; jsou však diagnosticky nespecifické (Nevšimalová *et al.*, 2002; Raboch *et al.*, 2012). Navazujícím vyšetřením je přesnější pozitronová emisní tomografie (PET), která detekuje mozkový cévní průtok a mozkový metabolismus, který je při demenci značně narušen. V současné době je dokonce možné pomocí PET zobrazit hromadění A $\beta$  nebo hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu (Scheltens *et al.*, 2021). Obdobnou zobrazovací metodou je jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT). Přestože PET a SPECT patří k nejmodernějším a nejpresnějším zobrazovacím technikám, nejsou natolik specifické, aby byly zařazeny do rutinního diagnostického využití (Nevšimalová *et al.*, 2002).

## 2.2.6 Léčba

Terapie Alzheimerovy choroby zahrnuje jak farmakologické, tak neméně důležité nefarmakologické přístupy. Farmakoterapeutické postupy lze rozdělit na symptomatické a neuroprotektivní (preventivní), které se soustředí na ovlivnění projevů onemocnění, nebo dokonce jeho zpomalení a zastavení – souhrnně se jedná o tzv. kognitivní farmakoterapii. Rozlišujeme i nekognitivní farmakoterapii (doplňkové postupy), jejíž cílem je léčba přidružených, nekognitivních symptomů, jako jsou depresivní a úzkostné stavy, poruchy spánku a stavy neklidu (Koukolík a Jiráček, 1998; Nevšimalová *et al.*, 2002; Raboch *et al.*, 2012).

Symptomatická terapie zahrnuje léčiva, která mají za cíl zlepšení zejména paměťové výkonnosti (tzv. kognitiva) (Nevšimalová *et al.*, 2002). V současnosti patří k neúčinnějším prostředkům léky ze skupiny inhibitorů acetylcholinesteráz a antagonistů N-metyl-D-aspartát receptoru (NMDAR). U AD je nejvíce postiženo několik neurotransmiterových systémů včetně acetylcholinergního, který je důležitý pro správné fungování paměti a vědomí. Při onemocnění dochází k nadměrnému odbourávání a úbytku acetylcholinu činností enzymu acetylcholinesterázy, tudíž spolu nervové buňky nejsou schopny komunikovat a zkracují se (Nováková, 2020). Na bázi inhibitorů acetylcholinesterázy (jejího zablokování, a tedy zvýšení hladiny acetylcholinu) se používají léky donepezil (Aricept), rivastigmin (Exelon) a galantamin (Reminyl, Razadyn) (Koukolík a Jiráček, 1998; Yaari a Corey-Bloom, 2007). Přílišné působení excitačních aminokyselin glutamátu a aspartátu na N-metyl-D-aspartát receptory vede k destabilizaci a zániku neuronu. Jako antagonist NMDAR se uplatňuje především memantin (Namenda) (Koukolík a Jiráček, 1998).

Neuroprotektivní terapie se soustředí na zmírnění či úplné vyvrácení patologie AD. V současné době probíhá vývoj léčiv zabraňujících akumulaci A $\beta$ , tvorbě hyperfosforylovaných  $\tau$ -proteinů a potlačení neuroinflammace (Scheltens *et al.*, 2021). Účinnost žádné neuroprotektivní léčby ovšem nebyla dosud potvrzena (Koukolík a Jiráček, 1998; Raboch *et al.*, 2012).

Doplňková farmakoterapie zahrnuje hlavně psychotropní látky ovlivňující nekognitivní funkce. Při zvolení léků se upřednostňují léčiva bez anticholinergních efektů (např. tricyklická antidepresiva proto nejsou vhodná). Pro ovlivnění deprese se používají antidepresiva II. generace – maprotilin (Ludiomil), mianserin (Lerivon), fluoxetin (Deprex, Portal, Prozac) aj.

Poruchy spánku se většinou tlumí atypickými neuroleptiky – tiaprid (Tiapridal) či risperidon (Risperdal). Poruchy chování (agitovanost) se léčí jak zmíněnými atypickými neuroleptiky, tak typickými – melperon (Buronil) a haloperidol (Haloperidol, Haldol). Je nutno dodat, že psychotropní léčbě by vždy měl předcházet pokus o nefarmakologické řešení formou psychoterapie a adekvátní sociální pomoci (Nevšimalová *et al.*, 2002; Raboch *et al.*, 2012).

Nefarmakologické přístupy jsou nedílnou součástí terapie AD. Psychoterapií lze v raných stádiích docílit zpomalení progresu paměťové poruchy za pomoci technik, které procvičují paměť a orientaci nebo naopak vytváří náhradní mechanismy pro běžné denní aktivity (např. zapisování si poznámek) (Nevšimalová *et al.*, 2002). Často bývají pořádány skupinové terapie pro pacienty, jejichž náplní je procvičování různých dovedností uplatňujících se v každodenní rutině. Možná je i muzikoterapie (Koukolík a Jiráček, 1998). Velmi důležitá je však i starost o pečující osoby. Velký význam má jejich edukace a seznámení se s AD. Pro rodinné příslušníky nemocného je také nezbytná psychoterapeutická a sociální podpora. Existuje několik organizací, které sdružují příbuzné pacientů, vzdělávají je a zajišťují jim pečovatelskou službu. V České republice působí Česká alzheimerovská společnost, která je členem mezinárodní Alzheimer Europe a Alzheimer's Disease International (Koukolík a Jiráček, 1998; Nevšimalová *et al.*, 2002).

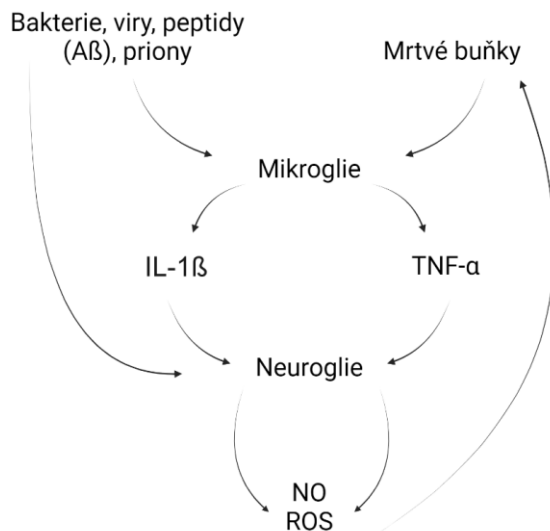
## 2.3 Neuroinflamace

Po dlouhou dobu se věřilo, že imunitní systém v rámci nervového systému nehraje žádnou roli; nejspíše kvůli unikátní anatomii mozku, která prostřednictvím svých bariér do centrální nervové soustavy vpustí jen minimum buněk a molekul přenášených krví. V současnosti je již objasněno, že imunitní, nervový a endokrinní systém mezi sebou spolupracují a vzájemně se ovlivňují a doplňují. Vytvářejí tak superinformační systém, který používá společné signální molekuly a jejich receptory – zejména neurotransmitery, cytokiny (viz kapitola 2.3.1.3 *Cytokiny*) a peptidové hormony. Hlubší objasnění vzájemných interakcí mezi informačními systémy imunity a CNS by poté mělo velký význam v hledání terapeutik u několika neurologických onemocnění (Havrdová, 2001; Schwartz *et al.*, 2016).

Akutní zánět v mozku slouží jako dobře vyvinutá ochrana proti patogenům a poraněním. Jakmile přetrvává akutní zánětlivý proces, dojde k narušení rovnováhy prozánětlivých a protizánětlivých signalizačních molekul a akutní zánět vyústí v chronický zánět, a tj. v rámci CNS neuroinflamace, která již působí toxicky (Kinney *et al.*, 2018). Neuroinflamace souvisí s odpověďmi a reakcemi vrozeného imunitního systému CNS zprostředkovanými aktivovanými neurogliemi (mikroglie a astrocyty), které produkují zánětlivé faktory, chemokiny<sup>10</sup>, cytokiny, reaktivní formy kyslíku (ROS) a oxid dusnatý (NO) (Zhang a Jiang, 2015). Neuroglie mohou být aktivovány jak bakteriálními a virovými složkami, peptidy, jako je A $\beta$ , tak prozánětlivými cytokiny, a to např. interferonem- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  (obr. 7).

---

<sup>10</sup> Chemokiny neboli chemotaktické cytokiny patří do skupiny malých cytokinů o molekulové hmotnosti 7–12 kDa. Jejich hlavní funkcí je regulace migrace různých typů buněk (chemotaxe) (Rossi a Zlotnik, 2000).



**Obrázek 7: Mechanismus aktivace neuroglií.**

Mikroglie (či jiné neuroglie) mohou být aktivovány patogeny. Následně spustí produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ , které dále společně s patogeny aktivují další mikroglie a astrocyty. Zaktivované neuroglie indukují iNOS (indukovatelná syntáza oxidu dusnatého) k produkci NO, který usmrcuje další neurony, což má za následek prohlubování zánětu. Ve schématu nejsou zahrnuty T-lymfocyty produkující prozánětlivý cytokin interferon- $\gamma$ , který rovněž aktivuje neuroglie.

*Vytvořeno podle (Brown a Bal-Price, 2003).*

### 2.3.1 Alzheimerova choroba

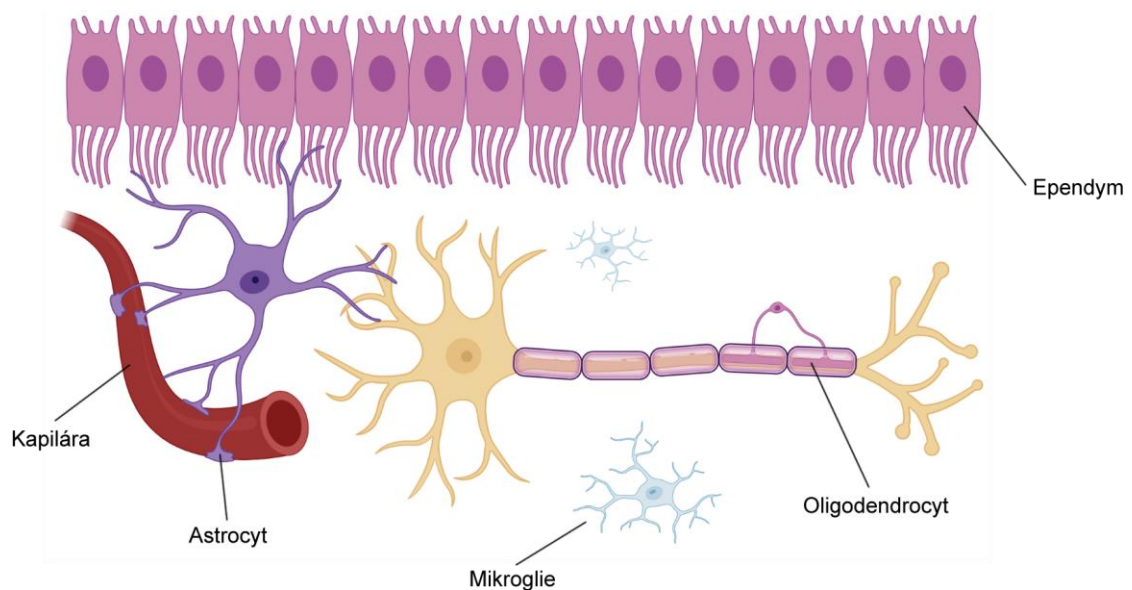
Nespočet studií již prokázalo, že neuroinflamace hraje podstatnou roli v progresi patologických změn u AD. Zánětlivé procesy zahrnují řadu buněčných a molekulárních změn, zapojení buněk periferního imunitního systému, indukci intracelulárních signálních drah a uvolňování zánětlivých mediátorů v mozku. Všechny tyto faktory mohou přispívat k neuronální dysfunkci a smrti buňky buď samostatně, nebo v kombinaci (Zhang a Jiang, 2015). Na rozdíl od jiných rizikových faktorů není vyjasněno, zda je neuroinflamace ústředním dějem v patofyziologii AD, nebo spíše výsledek jiných charakteristických patologických nálezů (Kinney *et al.*, 2018; Korábečný *et al.*, 2020). V CNS jsou hlavními typy neuroglií mikroglie a astrocyty (obr. 8), které jsou zodpovědné za zánětlivé reakce při neuroinflamaci u AD svou produkcí zánětlivých cytokinů (Zhang a Jiang, 2015).

#### 2.3.1.1 Mikroglie

Mikroglie jsou hlavními buňkami vrozeného imunitního systému CNS. Tvoří asi 10 % buněk centrální nervové soustavy dospělého mozku. V rámci CNS představují rezidentní makrofágy a prvotní obranu proti patogenům a poraněním mozkové tkáně (Rubio-Perez a Morillas-Ruiz, 2012; Zhang a Jiang, 2015). Při patologických stavech se mikroglie aktivují (tvarově se přemění od klidové mikroglie) a zahájí vrozenou imunitní odpověď migrací k poškozeným či mrtvým buňkám, které následně odklidí, a zajistí reparaci poškozených tkání. Mikroglie jako první uvolňují zánětlivé cytokiny a o zánětu informují astrocyty a neurony (Rubio-Perez a Morillas-Ruiz, 2012).



Během AD je aktivace mikroglíí asociována s výskytem A $\beta$  plaků. V raných fázích AD aktivované mikroglie migrují k agregátům A $\beta$  a fagocytují je. Množství imunitních reakcí tak poskytuje pozitivní účinky na patologii AD – odklizení a vymizení A $\beta$ . Nicméně přetrvávající aktivace mikroglíí vede ke zhoršení patologického stavu. Mikroglie jsou přetížené velkým množstvím produkovaného A $\beta$  a uvolňují prozánětlivé cytokiny (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18), NO a ROS, a tudíž působí cytotoxicky. Poškozené neurony pak aktivují další mikroglie; z imunitních reakcí se pak stává smyčka, tzv. reaktivní mikroglióza (obr. 9) (Zhang a Jiang, 2015; Kinney *et al.*, 2018). Zánětlivé mediátory a stresové podmínky navíc zvyšují amyloidogenní štěpení APP, a tedy produkci A $\beta$ . Schopnost mikroglíí interagovat s A $\beta$  a eliminovat je, se postupně vytrácí. Novější studie ukazují, že kvůli této skutečnosti jsou rekrutovány periferní imunitní buňky (makrofágy) ve snaze odstranit A $\beta$  plaky. Tyto periferní makrofágy však neuroinflamaci i patologii AD zhoršují (Rubio-Perez a Morillas-Ruiz, 2012).



**Obrázek 8: Neuroglie**

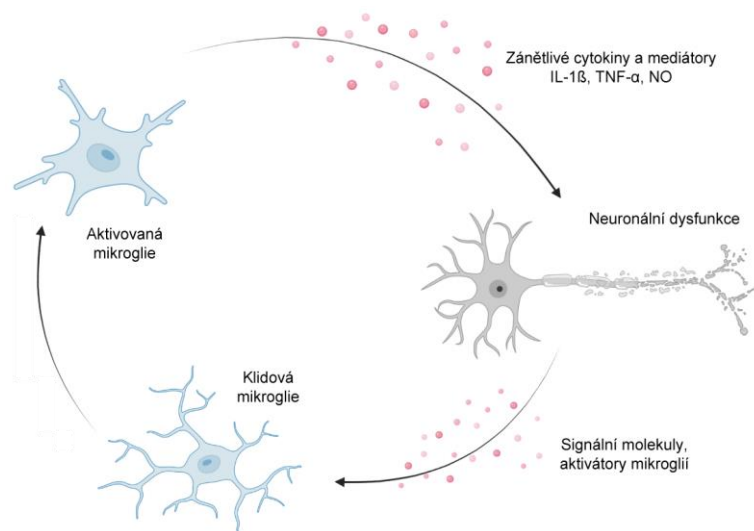
Vytvořeno podle (Snell, 2009) a (URL 3).

### 2.3.1.2 Astrocyty

Astrocyty (astroglie) se nachází ve všech oblastech CNS a tvoří asi 35 % jejího celkového počtu buněk. Na rozdíl od mikroglíí patří k tzv. makroglíím společně s oligodendrocyty<sup>11</sup> a ependymálními buňkami lemujícími mozkové komory (Jennes, 2017). Astroglie rozdělujeme podle morfologie na plazmatické astrocyty v šedé hmotě mozkové a vláknité (fibrilární) astrocyty v bílé hmotě mozkové. Mezi astrocytické funkce patří odklizení tkáňového detritu (poškozené nebo mrtvé buňky) a toxinů z mozkomíšního moku, regulace neurotransmiterů a produkce trofických (vyživujících) faktorů pro podporu neuronů (Rubio-Perez a Morillas-Ruiz, 2012; Zhang a Jiang, 2015).

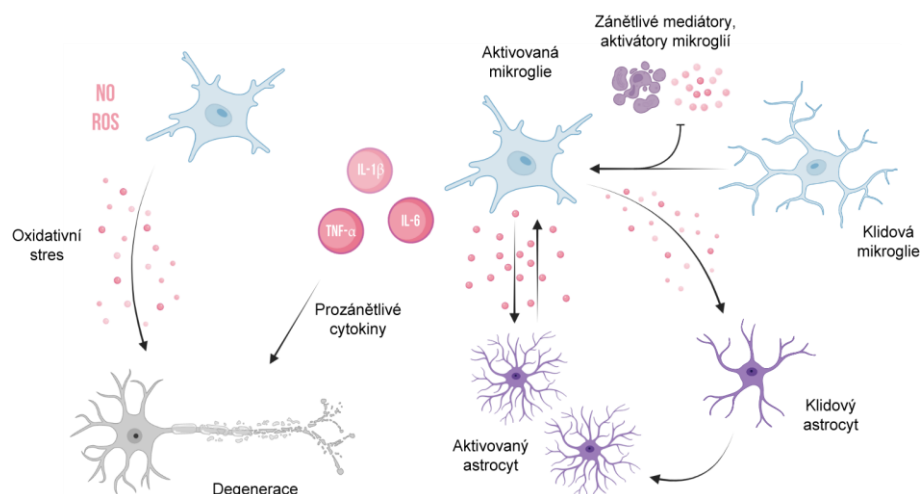
<sup>11</sup> Oligodendrocyty jsou relativně malé buňky, které řadíme k neuroglíím. Jejich hlavní funkcí je izolace axonových výběžků neuronů za účelem zvýšení rychlosti vodivosti elektrických signálů. Oligodendrocyty svými výběžky obalují jednotlivé axony a vytvářejí myelinovou pochvu (Bradl a Lassmann, 2010).

Aktivace astrocytů u AD může být vyvolána cytokiny IL-1 $\beta$  produkovanými mikroglie. Naopak aktivaci mikroglíi způsobují stimuly, které uvolňují astroglie. Astrocyty také mohou být aktivovány samotným A $\beta$ . Tvorby NO, a jeho cytotoxických účinků, v astrocytu lze snadno dosáhnout kombinací působení IL-1 $\beta$  a interferonu- $\gamma$  nebo TNF- $\alpha$  (Havrdová, 2001). Při prodloužené aktivaci jsou astrocyty, stejně jako mikroglie, ve stavu reaktivní astrogliózy (obr. 10), která je charakteristická proliferací a hypertrofií (zvětšením) astrocytů a následnou produkcí zánětlivých mediátorů (Tozaki-Saitoh *et al.*, 2011). Vylučují, ale zároveň i reagují na velké množství zánětlivých cytokinů včetně IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , interferonu- $\gamma$  a interferonu- $\beta$  (Zhang a Jiang, 2015). Studie Talantova *et al.* (2013) prokázala synaptické ztráty v důsledku A $\beta$ , který indukuje uvolňování glutamátu z astrocytů, což nato aktivuje NMDAR (viz kapitola 2.2.6. *Léčba*). V jiné studii provedené na myších bylo objasněno, že astrocyty v důsledku zánětlivého cytokinu interferonu- $\gamma$  a chronického stresu nadměrně exprimují  $\beta$ -sekretázu 1 (BACE1), která štěpí APP na A $\beta$  (Hong *et al.*, 2003).



**Obrázek 9: Mikroglióza**

Vytvořeno podle (Calsolaro a Edison, 2016) a (URL 3).



**Obrázek 10: Role astrocytů v aktivaci mikroglíi během neuroinflamace**

Vytvořeno podle (Calsolaro a Edison, 2016) a (URL 3).

### 2.3.1.3 Cytokiny

Cytokiny jsou malé nestrukturované proteiny imunitního systému, které regulují biologickou odpověď navázáním se na receptory svých cílových buněk. Jsou secernovány hlavně imunitními buňkami (tj. lymfocyty, makrofágy, neurogliemi atd.), ale i některými buňkami pojivových tkání (např. fibroblasty) (Havrdová, 2001; Rubio-Perez a Morillas-Ruiz, 2012). Účinky cytokinů zahrnují stimulaci, či inhibici buněčné proliferace, buněčný růst, diferenciaci, ale i cytotoxicitu, zánětlivé reakce, a mnoho dalších. Jejich hlavní imunologickou funkcí je regulovat zánět a udržovat rovnováhu pro- a protizánětlivých faktorů. Cytokiny, které značně podporují zánět, se nazývají prozánětlivé cytokiny, a ty, které ho potlačují, se nazývají protizánětlivé cytokiny (Arango Duque a Descoteaux, 2014).

Prozánětlivé cytokiny jsou uvolňovány imunitními buňkami, když přijdou do styku se zánětlivým podnětem. Když je prozánětlivá odpověď regulovaná ve vhodném množství, je pro hostitele prospěšná, jakmile je však nadbytečná a deregulovaná, působí toxicky (Arango Duque a Descoteaux, 2014). Prozánětlivé cytokiny jsou během neuroinflamace produkovány mikroglie či astroglie a soustředí se okolo A $\beta$  plaků. U AD byla prokázána zvýšená hladina cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-18 a jejich interakce s A $\beta$  (Walters *et al.*, 2016; Kinney *et al.*, 2018).

Protizánětlivé cytokiny přísně regulují imunitní odpověď, působí jako inhibitory a antagonisté prozánětlivých cytokinů. Nízká hladina nebo snížená aktivita protizánětlivých cytokinů vede u AD k reaktivní mikroglie a astroglie, která vyúsťuje v cytotoxicitu (Arango Duque a Descoteaux, 2014). V minulosti byla zjištěna prospěšná účinnost nesteroidních antiflogistik (NSAID), které způsobovaly až 50% snížení rizika rozvoje AD u pacientů, kteří dlouhodobě NSAID používali. Studie provedené na zvířecích transgenních modelech s AD demonstrovaly, že NSAID dokáže potlačit patologii nemoci. Nicméně klinické studie na lidech vykazovaly různé výsledky bez přesvědčivého důkazu. U AD byla celkově prokázána aktivita protizánětlivých cytokinů TNF- $\beta$ , IL-4, IL-10 (mj. i zvýšená hladina tohoto cytokinu v CSF) a IL-13 (Kinney *et al.*, 2018).

### 2.3.1.4 Ependymální buňky

Ependym je stejně tak jako mikroglie, astrocyty a oligodendrocyty řazen ke gliovým buňkám CNS. Ependymální buňky vystylají vnitřní stěny mozkových komor a centrálního míšního kanálu. Jedna z modifikací těchto buněk dává vzniku epiteliálním buňkám choroidálního plexu (Jennes, 2017).

Během stárnutí se ChP komprimuje a vykazuje zánětlivé reakce. Ve zvířecích modelech byly zjištěny zvýšené hladiny cytokinů a narušení HLB. Zhoršené funkce, morfologické změny ChP a zánětlivé abnormality v CSF u AD silně naznačují vztah mezi dysfunkcí ChP, neuroinflamací a AD. Potenciální role ChP v průběhu AD však ještě musí být objasněna (Čarna *et al.*, 2021).

### 3 CÍLE PRÁCE

Práce si klade za cíl odhalit případný vztah mezi choroidálním plexem a neuroinflamací v průběhu Alzheimerovy choroby, k dosažení čehož bylo zapotřebí:

1. zjistit agregaci amyloid- $\beta$  peptidu v potkaních epiteliálních buňkách choroidálního plexu
2. zjistit expresi cytokinů v těchto buňkách v reakci na agregovaný amyloid- $\beta$  peptid

Konkrétně byly stanoveny tyto dílčí cíle:

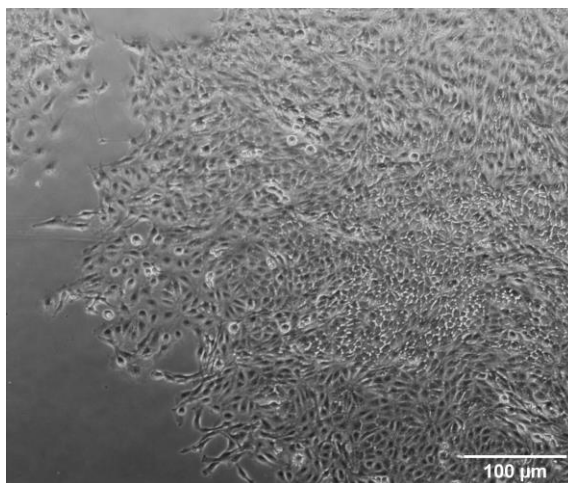
- analyzovat agregaci amyloid- $\beta$  peptidu v buňkách pomocí imunocytochemické metody
- porovnat míru agregace v buňkách po ovlivnění třemi roztoky, a to 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M, a ve dvou časových intervalech, a to po 24hodinové a 72hodinové inkubaci
- stanovit vhodnou koncentraci amyloid- $\beta$  peptidu pro navazující experiment odhalující možnou expresi zánětlivých cytokinů v buňkách v reakci na něj
- vytvořit *in vitro* model Alzheimerovy choroby v potkaních epiteliálních buňkách choroidálního plexu
- analyzovat expresi prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a protizánětlivého cytokinu IL-10 v *in vitro* modelu pomocí imunocytochemické metody
- porovnat míru exprese těchto cytokinů v *in vitro* modelu ve dvou časových intervalech, a to po 72hodinové a 5denní inkubaci

## 4 MATERIÁL

Praktická část práce byla uskutečněna na pracovišti Anatomického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

### 4.1 Buněčná linie

V experimentech byla použita imortalizovaná buněčná linie Z310 (obr. 11). Buněčná linie Z310 byla odvozena z primárních kultur choroidálních epiteliálních buněk laboratorního potkana obecného (*Rattus norvegicus domestica*), outbrední kmen Sprague-Dawley, které byly transfektovány plazmidem nesoucím T-antigen z opičího viru SV40<sup>12</sup>. Buňky vykazují typickou polygonální morfologii choroidálních epiteliálních buněk. Jedná se o adherentní buňky tvořící monovrstvu (Zheng a Zhao, 2002). Buněčná linie byla poskytnuta jako dar od výzkumného týmu profesora Weie Zhanga působícího na Purduově univerzitě v americkém státě Indiana.



**Obrázek 11: Buněčná linie Z310**

Foto Alemeh Zamani, Ph.D., Anatomický ústav LF MU.

### 4.2 Amyloid- $\beta$ 1–42

Lidský A $\beta$ 1–42 peptid (kat. č. #A14075; AdooQ Bioscience) byl poskytnut Loschmidtovými laboratořemi proteinového inženýrství, RECETOX na Masarykově univerzitě v Brně. Pro vytvoření zásobního roztoku A $\beta$  byla použita následující metoda. V 80  $\mu$ l 1% NH<sub>4</sub>OH byl rozpuštěn 1 mg lyofilizované formy A $\beta$ . Roztok byl podroben sonikaci po dobu 30 s. Poté byl přidán 1  $\times$  koncentrovaný fosfátový pufr (PBS)<sup>13</sup> na finální koncentraci 220  $\mu$ M; roztok byl následně rozdělen do alikvotů a uskladněn v  $-20$  °C do dalšího použití.

---

<sup>12</sup> Chemická úprava pomocí onkogenu (T-antigen z opičího viru SV40) slouží k účelu transformace buněk, a tedy k jejich imortalizaci (znesmrtelnění).

<sup>13</sup> 1  $\times$  PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 7,4).

### 4.3 Reagencie

Reagencie	Zdroj
akutáza	Serana Europe
antibiotika (penicilin, streptomycin, gentamicin)	Sigma-Aldrich
0,3% BSA	
DAPI	
DMEM/F12	
EGF	
FBS	
kolagen typu I	
MOWIOL	
3% NDS	
PBS	
4% PFA	
0,1% TWEEN 20	

**Tabulka 1: Seznam použitých reagentů**

## 4.4 Protilátky

Název/katalogové číslo	Původ	Ředění	Inkubace	Zdroj
A $\beta$ (#ab11132)	myší monoklonální protilátka	1 : 400	přes noc, pokojová teplota	Abcam
IL-1 $\beta$ (#LS-C801255)	králičí polyklonální protilátka	1 : 100	přes noc, pokojová teplota	LifeSpan Biosciences
IL-10 (#AAR29)	králičí polyklonální protilátka	1 : 100	přes noc, pokojová teplota	CiteAb
CY5 (#715-175-150)	oslí anti-myší polyklonální protilátka	1 : 100	90 min, 37 °C	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd
CY5 (#711-175-152)	oslí anti-králičí polyklonální protilátka	1 : 100	90 min, 37 °C	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd

Tabulka 2: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek

## 4.5 Laboratorní vybavení

Zařízení	Výrobce
epifluorescenční mikroskop Nikon Eclipse NI-E Motorized Microscope System	Nikon Instruments Inc.
mikroskopová kamera Nikon DS-Ri1	
inkubátor IFA-32-8	Esco Lifesciences Group
laminární box BBS-V1300	BIOBASE

Tabulka 3: Seznam použitého laboratorního vybavení

## 4.6 Software

Název	Funkce
ImageJ (FIJI)	zpracování obrazu z mikroskopu
GraphPad Prism 8	statistická analýza dat
NIS Elements	analýza obrazu z mikroskopu

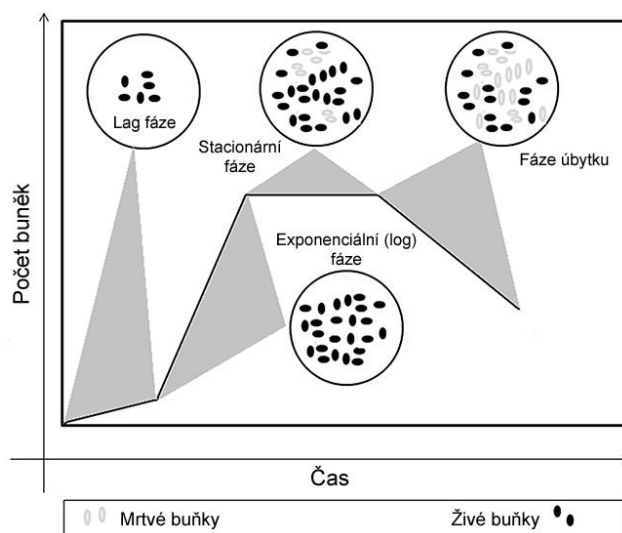
**Tabulka 4: Seznam použitých softwarů**



## 5 METODY

### 5.1 Buněčná kultura

Buněčná kultura je pojem označující růst a udržování buněk ve vhodném uměle vytvořeném prostředí, tj. *in vitro* (ve skle), za přesně stanovených podmínek, které stimulují jejich fyziologický stav (Kočárek *et al.*, 2006). Kultivace (pěstování) buněk probíhá v kultivační nádobě (např. v kultivační láhvi) obsahující růstové médium poskytující buňkám optimální prostředí pro jejich růst; nádoba je uložena v inkubátoru, který zajišťuje vhodnou teplotu, vlhkost a úroveň CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>. Nárůst buněk v kultuře lze vyjádřit tzv. růstovou křivkou, která popisuje změny četnosti buněk v závislosti na čase (obr. 12). Jakmile buněčná kultura dosáhne vysokého procenta konfluence (~80 %), tj. stav, kdy je spotřebována většina růstového média a buňky zaplní dané procento prostoru v kultivační nádobě, je třeba buňky pasážovat (subkultivovat) (Segeritz a Vallier, 2017; Bhatia, 2019).



**Obrázek 12: Růstová křivka.** **Lag fáze** – počáteční fáze, počet buněk nejprve mírně klesne a pak rychle roste. **Log fáze** – exponenciální růst počtu buněk; pasážování buněk. **Stacionární fáze** – růst buněk postupně klesá, dochází ke kontaktní inhibici; pasážování buněk. **Fáze úbytku** – postupné odumírání buněk.

*Upraveno podle (Bhatia, 2019) a (Kočárek et al., 2006).*

#### 5.1.1 Kultivace a pasážování buněk

Buňky Z310 byly uchovávány v kultivačních láhvích (kat. č. #90076, Techno Plastic Products) v médiu DMEM/F12, které bylo doplněno 10% FBS, 10 ng/ml EGF a antibiotiky (penicilin, streptomycin a gentamicin). Buněčná linie byla kultivována ve sterilním inkubátoru udržujícím stálou teplotu 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> v atmosféře a vysokou vzdušnou vlhkost.

Jakmile byly buňky z 80–90 % konfluentní, byly pasážovány do nového růstového média. Dle rychlosti růstu probíhala pasáž každé 2–3 dny. Před zahájením experimentu je nutno sterilizovat laminární box a pomůcky 70% etanolem. Po celou dobu práce v laminárním boxu je třeba používat sterilní nitrilové rukavice. Nejdříve bylo odsáto staré médium a následně byly buňky

promyty  $1 \times$  PBS. Pro uvolnění buněk od povrchu byl použit proteolytický enzym akutáza, se kterým byly buňky inkubovány po dobu dvou minut v inkubátoru. Působení enzymu bylo pozastaveno přidáním DMEM/F12. Vzniklá buněčná suspenze byla sesbírána pipetou a přenesena do sterilní zkumavky, kde byly buňky šetrně resuspendovány<sup>14</sup>. Na základě požadované koncentrace buněk v nové buněčné kultuře se odebralo dané množství buněčné suspenze, která byla přidána k novému DMEM/F12 ve sterilní kultivační láhvi. Kultivační nádoba byla při každé pasáži popsána informacemi o typu buněk, datu pasážování, číslu pasážování, koncentraci buněk a o jméně pracovníka provádějící pasáž.

## 5.2 Příprava buněčných vzorků pro detekci agregace A $\beta$

Agregace A $\beta$  v buňkách Z310 byla posuzována ve dvou časových intervalech – po 24 hodinách a 72 hodinách, při inkubaci buněk s roztoky A $\beta$  o třech koncentracích – 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M.

### 5.2.1 Příprava roztoků A $\beta$

Pro experimenty byly vyrobeny tři roztoky A $\beta$  o koncentracích 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M, a to vždy o objemu 500  $\mu$ l. Roztoky vznikly smícháním zásobního roztoku A $\beta$  o koncentraci 220  $\mu$ M s růstovým médiem DMEM/F12. Na základě výpočtů byla stanovena tato množství: roztok A $\beta$  o koncentraci 1  $\mu$ M: 497,97  $\mu$ l DMEM/F12 + 2,27  $\mu$ l A $\beta$  (220 $\mu$ M); roztok A $\beta$  o koncentraci 5  $\mu$ M: 488,64  $\mu$ l DMEM/F12 + 11,36  $\mu$ l A $\beta$  (220 $\mu$ M); roztok A $\beta$  o koncentraci 10  $\mu$ M: 477,24  $\mu$ l DMEM/F12 + 22,72  $\mu$ l A $\beta$  (220  $\mu$ M).

### 5.2.2 Nasazení buněk a inkubace s A $\beta$

Pro stanovené údaje byly nachystány dvě šestijamkové kultivační destičky (kat. č. #92006, Techno Plastic Products). V kultivační destičce č. 1 byly buňky inkubované s A $\beta$  po dobu 24 h a v kultivační destičce č. 2 po dobu 72 h. Obě destičky obsahovaly vždy v jedné jamce právě jedno kulaté krycí sklíčko o průměru 13 mm, tzn. že, v jedné kultivační destičce byla tři krycí sklíčka určená pro buňky inkubované s požadovaně koncentrovaným roztokem A $\beta$  (experiment) a tři kontrolní krycí sklíčka pro buňky nevystavené A $\beta$  (kontrolní skupina). Před nasazením buněk byla krycí sklíčka ponořena v 97% roztoku etanolu přes noc. Sklíčka byla následující den podrobena tříhodinovému ošetření kolagenem za účelem lepšího přilnutí buněk. Krycí sklíčka byla třikrát promyta redestilovanou vodou a ponechána v laminárním boxu pro úplné uschnutí. Na kultivační destičku č. 1 byly nasazeny alikvoty (100  $\mu$ l) buněčné suspenze o koncentraci  $4 \times 10^4$  buněk/ml; na kultivační destičku č. 2 o koncentraci  $2 \times 10^4$  buněk/ml. Buňky byly inkubovány po dobu dvou hodin za běžných podmínek, aby se uchytily k povrchu. Po uplynulém čase bylo přidáno 900  $\mu$ l růstového média DMEM/F12.

Druhý den bylo médium odsáto a kontrolním skupinám bylo poskytnuto 500  $\mu$ l nového média. Do zbylých jamek byly přidány tři roztoky A $\beta$  o koncentracích 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M. V obou

---

<sup>14</sup> Proces pipetování, při kterém dochází k rozbití shluku buněk.

destičkách byla vždy právě jedna jamka obsahující jeden stanovený roztok. Kultivační destička č. 1 byla inkubována 24 h a kultivační destička č. 2 72 h, obě za stejných podmínek.

### 5.3 Příprava buněčných vzorků pro detekci exprese cytokinů

Expresе cytokinů v buňkách Z310 byla posuzována ve dvou časových intervalech – po 72 hodinách a 5 dnech, při inkubaci buněk s roztokem A $\beta$  o koncentraci 5  $\mu$ M, která byla stanovena na základě výsledků předchozího experimentu. Tento pokus byl zaměřen na detekci prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a protizánětlivého cytokinu IL-10.

#### 5.3.1 Nasazení buněk a inkubace s A $\beta$

Pro stanovené údaje byly nachystány dvě šestijamkové kultivační destičky (kat. č. #92006, Techno Plastic Products). V kultivační destičce č. 3 byly buňky inkubované s A $\beta$  po dobu 72 h a v kultivační destičce č. 4 po dobu 5 d. Kultivační destičky obsahovaly vždy v jedné jamce právě jedno kulaté krycí sklíčko o průměru 13 mm; jedna kultivační destička tedy obsahovala dvě krycí sklíčka určené pro experiment a dvě krycí sklíčka jako kontrolní skupiny. Krycí sklíčka byla podrobena stejnému výše uvedenému protokolu o jejich přípravě. Na kultivační destičku č. 3 byly nasazeny alikvoty (100  $\mu$ l) buněčné suspenze o koncentraci  $2 \times 10^4$  buněk/ml; na kultivační destičku č. 4 o koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/ml. Pro úplné uchycení k povrchu byly buňky inkubovány dvě hodiny za běžných podmínek. Po uplynulé době bylo přidáno 900  $\mu$ l růstového média DMEM/F12.

Následující den bylo totožně jako v prvním experimentu kontrolním skupinám poskytnuto 500  $\mu$ l nového média. Ve zbylých jamkách byly buňky inkubovány s roztokem A $\beta$  o koncentraci 5  $\mu$ M. Kultivační destička č. 3 byla inkubována 72 hodin a kultivační destička č. 4 5 dní, obě za stejných podmínek.

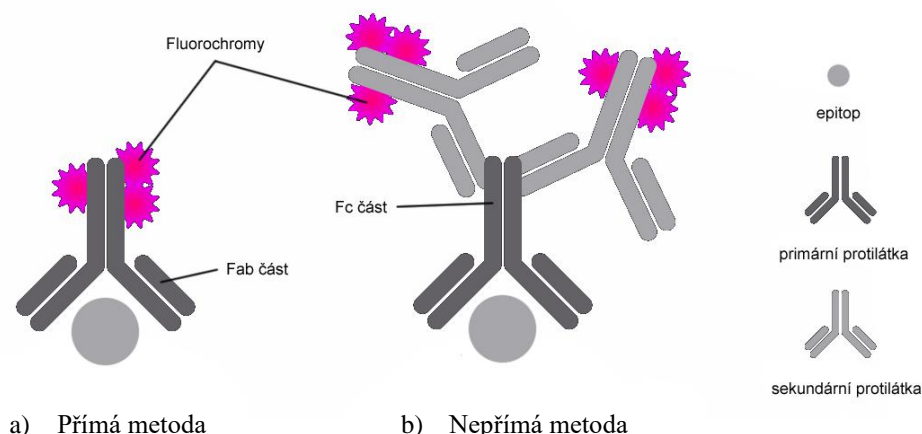
Celkové schéma obou experimentů bylo následující (tab. 5).

Experiment	Koncentrace buněčné suspenze [buňky/ml]	Doba inkubace s A $\beta$	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M
Agregace A $\beta$	$4 \times 10^4$	24 h	+	+	+
	$2 \times 10^4$	72 h	+	+	+
Expresе cytokinů	$2 \times 10^4$	72 h	-	+	-
	$1 \times 10^4$	5 d	-	+	-

**Tabulka 5: Shrnutí použitých koncentrací buněčných suspenzí, inkubačních dob a koncentrací roztoků A $\beta$  v provedených experimentech**

## 5.4 Imunocytochemické metody

Imunocytochemie (ICC) je laboratorní metoda umožňující detekci a vizualizaci antigenů (Ag) přítomných na cílených strukturách v buněčném vzorku na základě jejich vazby se specifickou protilátkou (Ab). Protilátky jsou buď přímou, nebo nepřímou metodou spojeny s reportérem (enzym nebo fluorochrom). Poté, co se protilátka naváže na antigen, vykazuje reportér (marker) barvu z enzymatické reakce nebo fluorescence. Signály lze pozorovat určitým druhem mikroskopu podle typu markeru (Burry, 2010).



**Obrázek 13: Imunocytochemická detekce antigenů**

*Upraveno podle (Burry, 2011) a (URL 4).*

Pro detekci A $\beta$  a exprese cytokinů byla konkrétně zvolena nepřímá imunofluorescenční metoda. Imunofluorescence (IF) je metoda založená na stejném principu jako ICC, tedy na vazbě antigen-protilátka (Ag-Ab). Pro zviditelnění vazby Ag-Ab se využívá fluorochromů, které slouží jako markery na protilátkách. Podle způsobu navázání konjugátu (fluorochromu) existují dva způsoby detekce antigenů (obr. 13). Při přímé metodě je fluorescenčním reportérem značena protilátka (primární protilátka), která se váže na epitop antigenu (oblast antigenu, na kterou se vážou protilátky). V nepřímé metodě je fluorochrom konjugován s jinou protilátkou (sekundární protilátka), která se až poté naváže na primární protilátku spojenou s epitopem antigenu (Odell a Cook, 2013). Protokol imunofluorescence probíhal pro oba experimenty, a tedy všechny kultivační destičky, totožně.

### 5.4.1 Detekce agregace A $\beta$

Po inkubaci s roztokem A $\beta$  bylo odsáto staré médium a buňky byly dvakrát promyty v  $1 \times$  PBS. Pro udržení buněk a jejich intracelulárních struktur bezpečně ve své poloze bylo nutné buňky zafixovat. Po oplachu v  $1 \times$  PBS bylo dno jamek pokryto fixačním roztokem 4% PFA, který byl inkubován po dobu 20 min při pokojové teplotě. Před permeabilizací byly buňky opláchnuty pětkrát v  $1 \times$  PBS. V permeabilizačním roztoku aceton : metanol (1 : 1) byly pak buňky inkubovány po dobu 3 min v  $-20$  °C. Krokem permeabilizace se zajistí penetrace buněčných membrán, a tak je umožněno proniknutí protilátek do nitra buněk. Následně byly buňky pro úplný oplach ponechány v roztoku 0,1% Tween 20 a 0,3% BSA v  $1 \times$  PBS po dobu 30 min.

Před barvením musely být buněčné vzorky podrobeny blokování všech nespecifických vazebných míst pro zabránění navázání protilátek na necílové struktury. Blokování proběhlo v 3% NDS po dobu 30 min.

Buňky byly inkubovány s primární protilátkou (kat. č. #ab240360) naředěnou v 3% NDS v poměru 1 : 400 přes noc při pokojové teplotě. Další den byly vzorky opět promyty v 1 × PBS a inkubovány se sekundární protilátkou (kat. č. #715-175-150) konjugovanou s fluorescenčním barvivem CY5 naředěnou v 3% NDS v poměru 1 : 100 po dobu 90 min při teplotě 37 °C. Po inkubaci byly vzorky propláchnuty v 1 × PBS. Následovala pětiminutová inkubace v roztoku fluorescenčního interkalačního barviva DAPI v 1 × PBS, který slouží ke značení jader buněk<sup>15</sup>.

#### 5.4.2 Detekce exprese cytokinů

Expresce cytokinů byla detekována stejnými metodami jako v předchozím experimentu, rovněž byly obě kultivační destičky podrobeny stejnému protokolu popsanému výše.

Po provedení fixace, permeabilizace a blokování byly buňky inkubovány s odlišnými primárními protilátkami. Pro detekci IL-1 $\beta$  byly buňky inkubovány s primární protilátkou (kat. č. #LS-C801255) naředěnou v 3% NDS v poměru 1 : 100 přes noc při pokojové teplotě; pro detekci IL-10 s primární protilátkou (kat. č. #AAR29) rovněž naředěnou v 3% NDS v poměru 1 : 100 přes noc při pokojové teplotě. Po oplachu v 1 × PBS následovala inkubace se sekundární protilátkou (kat. č. #711-175-152) konjugovanou s fluorescenčním barvivem CY5 a s fluorescenčním barvivem DAPI.

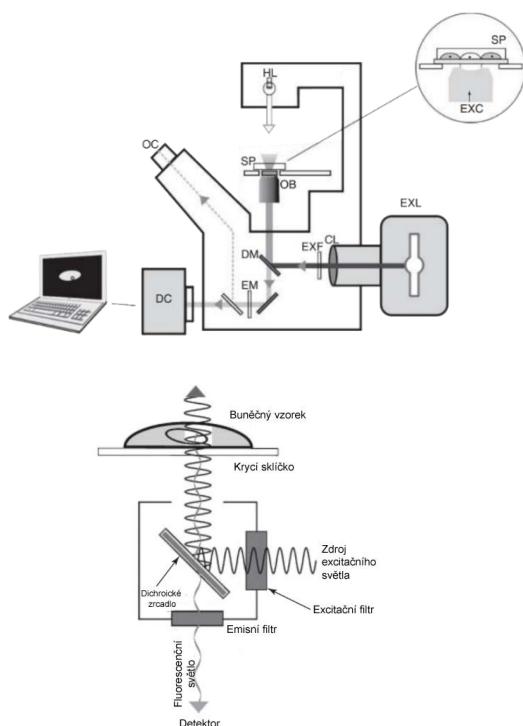
### 5.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je typ optické zobrazovací techniky založené na schopnosti fluorescence pozorovaných vzorků. Prvně je ze zdroje vyzářeno excitační světlo blížící se svou vlnovou délkou ultrafialovému záření. Poté prochází skrze excitační filtr selektující paprsky o požadovaných vlnových délkách, které se odráží od povrchu dichroického zrcadla umístěného pod úhlem 45° vzhledem ke zdroji světla. Odražené paprsky dopadají na fluorochromy v buněčném vzorku a v důsledku toho dochází v atomech k excitaci elektronů. Elektrony po chvíli přechází zpět na nižší energetickou hladinu a přebytečná energie je vyzářena v podobě emisního světla s delší vlnovou délkou<sup>16</sup>. Emitované světlo z fluorochromů je kolektováno objektivem a opět propuštěno dichroickým zrcadlem. Následuje emisní (bariérový) filtr, který selektuje paprsky o požadovaných delších vlnových délkách emisního světla (paprsky o krátkých vlnových délkách excitačního světla zadrží). Tímto způsobem se v objektivu či digitální kameře zobrazí jen fluorescenční záření. Výše popsaný epifluorescenční mikroskop je znázorněn na obrázku 14 (Kočárek *et al.*, 2006; Dobrucki a Kubitscheck, 2017).

---

<sup>15</sup> Fluorescenční barvivo DAPI se využívá pro barvení buněčných jader díky jeho schopnosti vázat se na oblasti DNA s bohatým výskytem adeninu a thyminu.

<sup>16</sup> Emisní světlo má delší vlnovou délku než excitační světlo. Tento rozdíl se nazývá Stokesův posun.



- a) Schematický diagram invertovaného epifluorescenčního mikroskopu.  
 HL – halogenová lampa;  
 SP – vzorek;  
 OB – objektiv;  
 OC – čočka (okulár);  
 DC – digitální fotoaparát;  
 EXL – zdroj excitačního světla;  
 CL – čočka kolektoru;  
 EXF – excitační filtr;  
 DM – dichroické zrcadlo;  
 EM – emisní filtr;  
 EXC – excitační světlo dopadající na vzorek
- b) Schematický diagram excitačního filtru, dichroického zrcadla a emisního filtru.

**Obrázek 14: Epifluorescenční mikroskop**  
 Upraveno podle (Dobrucki a Kubitscheck, 2017).

### 5.5.1 Vizualizace

Krycí sklíčka byla v obou experimentech po omytí redestilovanou vodou kladena na podložní sklíčka do kapky montovacího média MOWIOL. Aby nedošlo k vyschnutí buněk, byla krycí sklíčka na podložní sklíčka zafixována průhledným lakem. Po uschnutí laku byly preparáty pozorovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse NI-E Motorized Microscope System) vybaveného kamerou (Nikon DS-Ri1). Z každého preparátu bylo pořízeno přibližně 20–25 mikroskopických snímků. Intenzita fluorescence mikroskopového obrazu byla analyzována v programu ImageJ (FIJI).

## 5.6 Zpracování dat

Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 8. Ze získaných dat o intenzitách fluorescence byl určen aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Statistická významnost, jejíž hladina byla předem stanovena na  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,001$  \*\*\* a  $p < 0,0001$  \*\*\*\*, byla provedena pomocí neparametrického Studentova t-testu. Pro účely experimentu byl zvolen nepárový dvouvýběrový t-test.

## 6 VÝSLEDKY

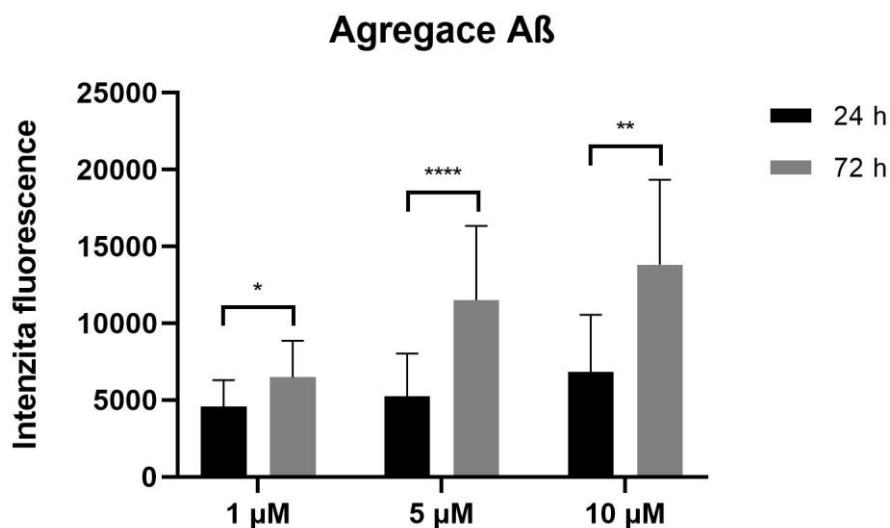
Primárním účelem práce bylo zhotovit *in vitro* model AD v potkaních epitelálních buňkách choroidálního plexu. K dosažení tohoto cíle byly buňky vystaveny různým koncentracím A $\beta$ , jehož agregovaná forma patří k hlavním patologickým nálezům u tohoto onemocnění. Míra agregace A $\beta$  byla posuzována v různých časových intervalech. Ze získaných výsledků pak byla určena vhodná koncentrace A $\beta$  a vhodný časový interval pro zhotovení *in vitro* modelu AD. Sekundárním účelem bylo pozorování a studium buněčných imunitních regulačních mechanismů v *in vitro* modelu v reakci na agregovaný A $\beta$ .

U pořízených mikroskopických snímků byla určena intenzita fluorescence; ze získaných dat pak byly vytvořeny grafy. Z mikroskopických snímků byla sestavena schémata objasňující výsledky provedených experimentů.

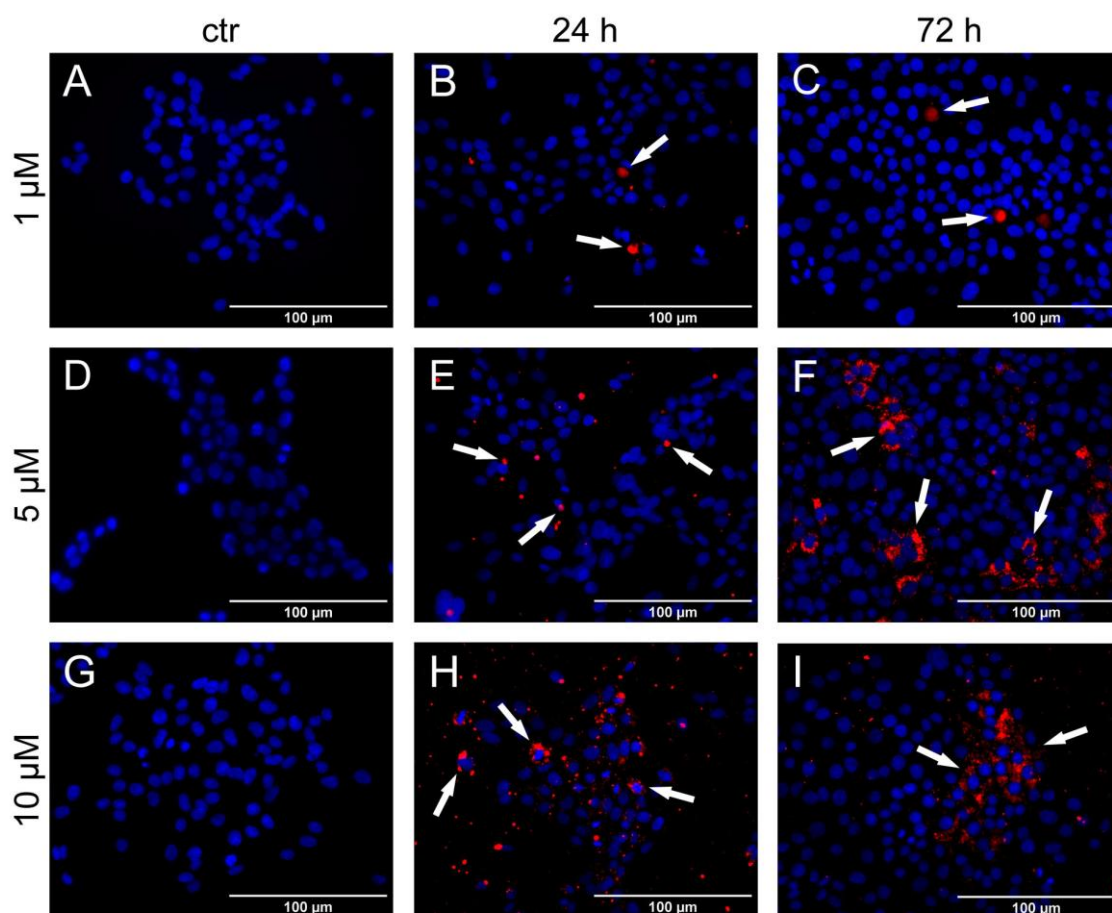
### 6.1 Agregace A $\beta$

Cílem prvního experimentu bylo zjistit agregaci A $\beta$  v buňkách Z310. Agregace A $\beta$  byla hodnocena za použití roztoků o třech různých koncentracích A $\beta$ . Na základě inkubační doby byly buněčné preparáty rozděleny do dvou skupin. Agregace A $\beta$  v buňkách byla navozena přidáním roztoků A $\beta$  o koncentracích 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M k buňkám v jamkách dvou kultivačních destiček. Kultivační destičky pak byly s A $\beta$  inkubovány po dobu 24 hodin a 72 hodin. Jako kontrolní skupiny byly použity buňky inkubované pouze v růstovém médiu DMEM/F12 s přidavkem FBS, EGF a antibiotik. Inkubační doba kontrolních skupin byla vždy stejná jako pro experimentální skupiny. Pomocí imunocytochemických metod byl A $\beta$  vizualizován a na základě intenzity fluorescence (viz *Přílohy*, tab. 6, 7), kterou vyzařovala sekundární protilátka CY5 značící přítomný A $\beta$ , byly poté stanoveny výsledky. Buněčná jádra byla detekovaná pomocí fluorescenčního barviva DAPI.

Při všech experimentálních podmínkách bylo možné pozorovat agregovaný A $\beta$ . Po 24hodinové inkubaci byla míra agregace A $\beta$  obecně nižší než při 72hodinové inkubaci. Nejvyšší míra agregace byla pozorována za použití 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M roztoku A $\beta$  a inkubační doby 72 h, naopak nejnižší míru agregace vykazovaly buňky při ovlivnění roztoky o koncentracích 1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M a inkubování po dobu 24 h. Nejvýznamnější rozdíl v agregaci A $\beta$  vzhledem k inkubační době byl pozorován mezi skupinami vystavenými roztoku o koncentraci 5  $\mu$ M. Vzájemný vztah a rozdíly mezi pozorovanými skupinami jsou znázorněny na obrázku 15; schémata sestávající z vybraných mikroskopických snímků experimentálních skupin pak na obrázku 16. Výsledky a porovnání kultivačních destiček č. 1 a č. 2 jsou detailněji rozebrány níže.



**Obrázek 15: Agregace A $\beta$  v buňkách Z310.** Potkaní epiteliální buňky choroidální plexu byly kultivovány v roztocích A $\beta$  o třech koncentracích, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M, a inkubovány po dobu 24 h a 72 h; pomocí imunocytochemických metod pak byla pro každou skupinu analyzována intenzita fluorescence. Jako kontrolní skupiny byly použity buňky inkubované pouze v DMEM/F12 dle inkubační doby experimentální skupiny (kontrolní skupina není v grafu vyobrazena, protože použitá sekundární protilátka vykazovala nulovou intenzitu fluorescence). Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. Všechny rozdíly mezi skupinami vystavenými roztoku o stejné koncentraci, ale odlišné inkubační době byly statisticky významné. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . Vytvořeno v GraphPad Prism 8 autorkou.

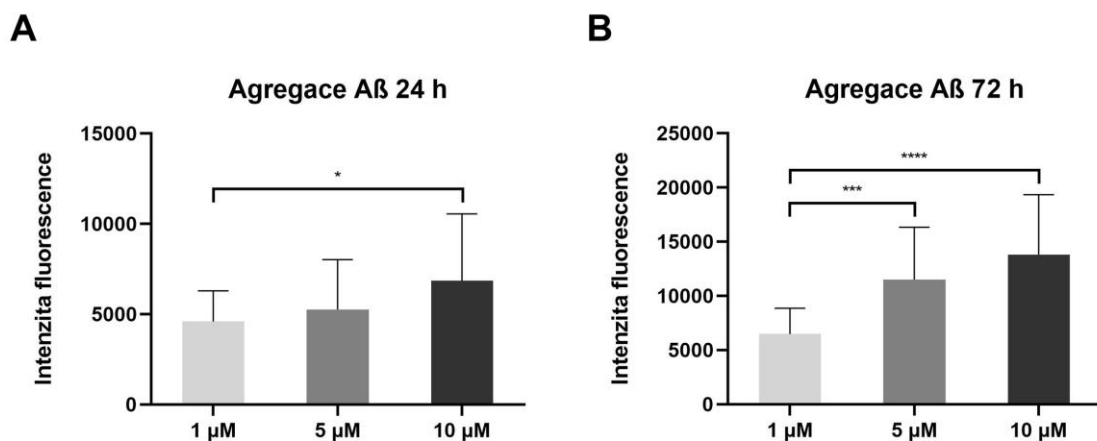




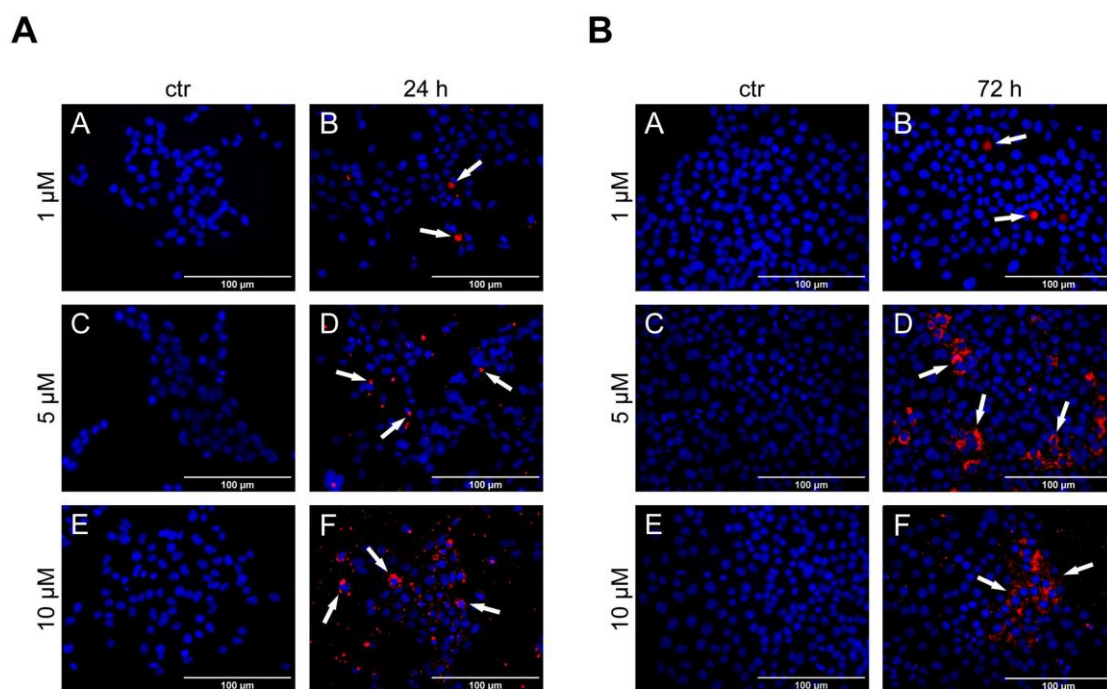
**Obrázek 16: Snímky z epifluorescenčního mikroskopu zobrazující agregaci A $\beta$  v buňkách Z310.** Agregovaný A $\beta$  je značen **červeně (šipky)** sekundární protilátkou CY5 (kat. č. #715-175-150), jádra buněk **modře** fluorescenčním barvivem DAPI. **(A)(D)(G) Kontrolní skupiny.** Jako kontrolní skupiny byly použity buňky inkubované pouze v DMEM/F12. Kontrolní skupiny nevykazovaly žádné známky A $\beta$ . Mikroskopické snímky ukazují kontrolní skupiny pro 24hodinovou inkubaci; v den nasazení pocházely buňky z buněčné suspenze o koncentraci  $4 \times 10^4$  buněk/ml. **(B) 1  $\mu$ M roztok A $\beta$  inkubovaný 24 h.** Agregovaný A $\beta$  byl pozorovatelný okolo buněčných jader, avšak míra agregace byla minimální. A $\beta$  se vyskytoval spíše v méně četných seskupení buněk. **(E) 5  $\mu$ M roztok A $\beta$  inkubovaný 24 h.** Agregace A $\beta$  při 5  $\mu$ M roztoku se velmi podobala agregaci při 1  $\mu$ M roztoku v buňkách inkubovaných 24 h. **(H) 10  $\mu$ M roztok A $\beta$  inkubovaný 24 h.** Míra agregace v buňkách inkubovaných s 10  $\mu$ M A $\beta$  24 h se významně lišila od agregace zobrazené na snímku **(B)** a **(E)**. **(C) 1  $\mu$ M roztok A $\beta$  inkubovaný 72 h.** V porovnání s inkubační dobou 24 h za použití stejného roztoku byl rozdíl statisticky významný na nejnižší hladině ( $p < 0,05$ ). Stejně jako při 24hodinové inkubaci se A $\beta$  agregoval spíše u jader buněk v méně četných koloniích. **(F) 5  $\mu$ M roztok inkubovaný 72 h.** V porovnání s předchozí skupinou se A $\beta$  při použití koncentrace 5  $\mu$ M a inkubační době 72 h výrazně zvýšila; rozdíl byl statisticky významný na nejvyšší možné hladině ( $p < 0,0001$ ). Ze všech zkoumaných skupin právě tato prokazovala nejlepší podmínky pro agregaci A $\beta$ . **(I) 10  $\mu$ M roztok inkubovaný 72 h.** Agregace A $\beta$  byla v porovnání s buňkami inkubovanými s 5  $\mu$ M A $\beta$  po stejnou dobu podobná. V porovnání s 24hodinovou inkubací za použití stejného roztoku je rozdíl statisticky významný na hladině  $p < 0,01$ . Vzhledem k výsledkům skupiny **(F)** byl z praktických důvodů 10  $\mu$ M roztok A $\beta$  považován za nevhodný pro navazující experiment. **ctr = kontrolní skupina.** Vytvořeno ve FIJI a Adobe Photoshop 11 autorkou.

Jak již bylo zmíněno, agregace A $\beta$  se pro účely práce ukázala být vhodnější při inkubační době 72 h. Skupiny, které byly inkubovány s odlišnými roztoky A $\beta$  po stejnou dobu 24 h, nevykazují statisticky významné rozdíly (obr. 17-A). Agregace A $\beta$  za použití 1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M roztoku po 24hodinové inkubaci byla velmi podobná, zatímco při použití 10  $\mu$ M roztoku se míra agregace jevila podstatně vyšší. V buňkách se při inkubování s roztokem o nejvyšší možné koncentraci 10  $\mu$ M po 24hodinové inkubaci tvořily agregáty většinou samostatně z menšího počtu amyloidových fibrilů (obr. 18-A). Po 72 h se A $\beta$  agregoval mnohem účinněji u buněk inkubovaných s 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M roztokem v porovnání s buňkami inkubovanými s roztokem 1  $\mu$ M. Skupiny vystavené A $\beta$  po dobu 72 h měly lepší výsledky, co se týče jak statisticky vysoce významných rozdílů, tak vyššího počtu agregovaných amyloidových fibrilů (obr. 17-B, 18-B). Na rozdíl od předpokladů stanovených na základě studie Hu *et al.* (2009), které směřovaly k použití koncentrace A $\beta$  1  $\mu$ M pro následující experimenty, se nejvhodnější variantou jevila koncentrace 5  $\mu$ M.

Pro vytvoření *in vitro* modelu AD v potkaních epiteliálních buňkách choroidálního plexu byla zvolena koncentrace roztoku A $\beta$  5  $\mu$ M. Nižší koncentrace, 1  $\mu$ M, není vhodná pro experimenty studující AD v buňkách Z310, protože v obou skupinách, rozdílně inkubovaných, nebyla agregace dostačující, tudíž by v těchto experimentech nedošlo k dostatečnému navození patologického stavu. Na druhou stranu byla zavržena i nejvyšší koncentrace, 10  $\mu$ M, zejména kvůli zbytečné spotřebě nákladného roztoku A $\beta$ . Vysoká koncentrace A $\beta$  by také mohla způsobovat buněčnou smrt (apoptózu) přebytečného množství buněk. V následujícím experimentu zkoumajícím expresi cytokinů v buňkách v reakci na agregovaný A $\beta$  byla zavržena inkubační doba 24 h, protože při použití žádné ze tří zmiňovaných koncentrací neposkytovala uspokojivé výsledky. Naopak musela být inkubační doba prodloužena na 5 dní pro pochopení mechanismů z dlouhodobějšího hlediska (viz kapitola 6.2. *Expresie cytokinů*).



**Obrázek 17: Porovnání agregace Aβ v buňkách Z310 vzhledem k inkubační době.** Graf popisuje stejné experimentální skupiny jako obrázek 15. **(A) Agregace Aβ v buňkách Z310 po 24 h.** Rozdíly intenzit fluorescence Aβ nebyly mezi 1 μM oproti 5 μM a 5 μM oproti 10 μM statisticky významné. Statisticky významný rozdíl byl až v porovnání 1 μM a 10 μM Aβ ( $p < 0,05$ ). **(B) Agregace Aβ v buňkách Z310 po 72 h.** Výsledky kulturační destičky č. 2 byly celkově hodnoceny jako úspěšnější. Nejvýznamnějšího výsledku bylo dosaženo při použití koncentrace Aβ 5 μM. Oproti kulturační destičce č. 1 bylo možné při porovnání koncentrací 1 μM oproti 5 μM hodnotit statisticky vysoce významný rozdíl ( $p < 0,001$ ), stejně tak byla hladina významnosti zvýšená při porovnání 1 μM oproti 10 μM roztoku ( $p < 0,0001$ ). \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . Vytvořeno v GraphPad Prism 8 autorkou.

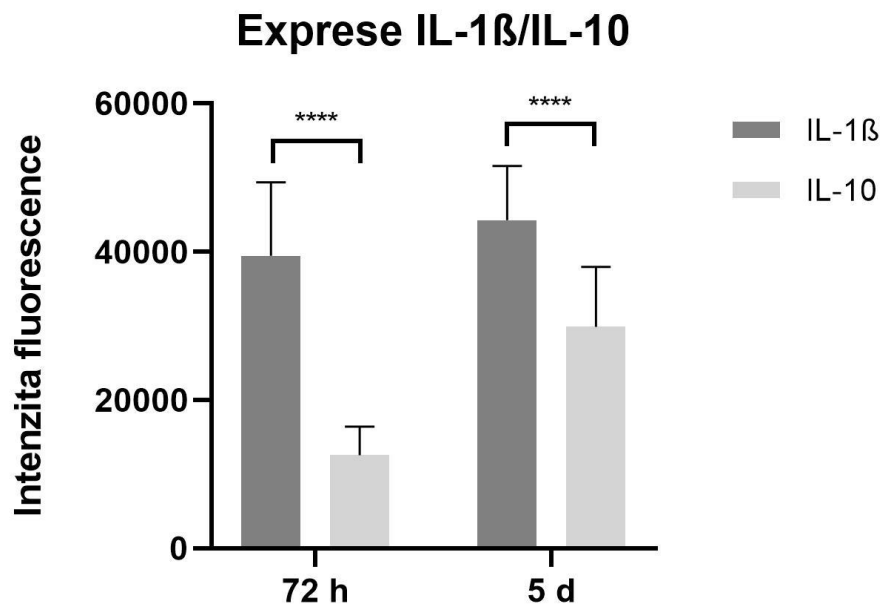


**Obrázek 18: Snímky z epifluorescenčního mikroskopu porovnávající agregaci Aβ v buňkách Z310 vzhledem k inkubační době.** Agregovaný Aβ je značen červeně (šipky) sekundární protilátkou CY5 (kat. č. #715-175-150), jádra buněk modře fluorescenčním barvivem DAPI. **(A) Agregace Aβ v buňkách Z310 po 24 h.** **(B) Agregace Aβ v buňkách Z310 po 72 h.** Mikroskopické snímky se shodují se snímky na obrázku 16. V případě (B) jsou uvedeny kontrolní skupiny, které byly inkubovány v DMEM/F12 72 h; v den nasazení pocházely buňky z buněčné suspenze o koncentraci  $2 \times 10^4$  buněk/ml. ctr = kontrolní skupina. Vytvořeno ve FIJI a Adobe Photoshop 11 autorkou.

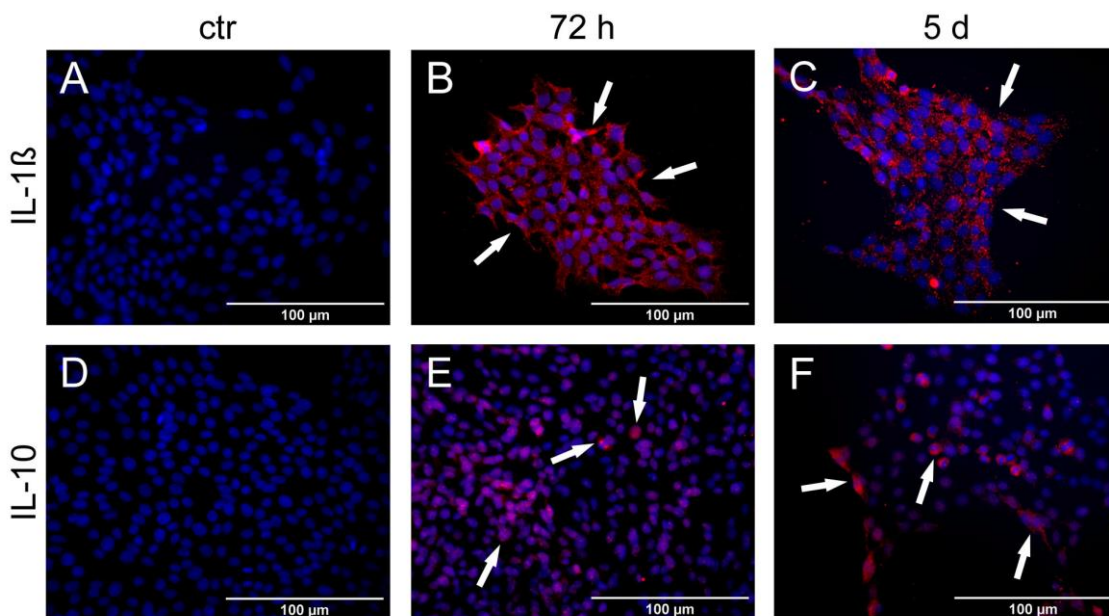
## 6.2 Exprese cytokinů

Za účelem studia imunitních regulačních mechanismů bylo nejdříve třeba vytvořit vhodný *in vitro* model AD v potkaních epitelálních buňkách choroidálního plexu. Pro zhotovení modelu byla, v závislosti na výsledcích popsaných výše, použita koncentrace roztoku A $\beta$  5  $\mu$ M. Na základě inkubační doby byly skupiny rozděleny na dvě kultivační destičky; kultivační destička č. 3 byla inkubována 72 hodin a kultivační destička č. 4 byla inkubována 5 dní. Jako kontrolní skupiny byly použity buňky inkubované pouze v růstovém médiu DMEM/F12 s přídavkem FBS, EGF a antibiotik. Inkubace kontrolních skupin byla vždy dodržena dle inkubační doby experimentálních skupin. Pomocí imunocytochemických metod, obdobných jako v prvním experimentu (viz kapitola 6.1. *Agregace A $\beta$* ), byla vizualizována exprese prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a protizánětlivého cytokinu IL-10. Z pořízených mikroskopických snímků pak byla určena intenzita fluorescence (viz *Přílohy*, tab. 8, 9) vyzařující sekundární protilátkou CY5 značící buď IL-1 $\beta$ , nebo IL-10; z dat byly poté vyhodnoceny výsledky. Buněčná jádra byla detekovaná pomocí fluorescenčního barviva DAPI.

Ve vytvořeném *in vitro* modelu AD v buňkách Z310 bylo možné pozorovat expresi cytokinů, jak IL-1 $\beta$ , tak IL-10. Nejvyšší míra exprese byla zaznamenána u IL-1 $\beta$  a po inkubační době 5 d, zatímco nejnižší míra exprese byla znatelná u IL-10 při 72hodinové inkubaci. Mnohem zajímavější je však vzájemný vztah mezi expresí pro- a protizánětlivých cytokinů. Po 72 hodinách byl IL-1 $\beta$  v buňkách Z310 exprimován ve významně větší míře než IL-10. Přestože po 5denní inkubaci s A $\beta$  exprese IL-1 $\beta$  stále převažovala nad IL-10, exprese protizánětlivého cytokinu se podstatně zvýšila oproti expresi téhož cytokinu ve vzorcích inkubovaných 72 h. Oproti tomu rozdíl mezi expresí IL-1 $\beta$  po 72 h a 5 d nebyl nijak statisticky významný. Obecně však míra exprese IL-1 $\beta$  převažovala nad expresí IL-10. Z těchto výsledků by se tak dalo usuzovat, že buňky prvotně exprimují prozánětlivé cytokiny v reakci na cytotoxický A $\beta$ , avšak i po delším vystavení jejich exprese neklesá. Po delším kontaktu buněk s A $\beta$  se naopak významně zvyšuje exprese protizánětlivých cytokinů, ale rovnováhy mezi nimi a prozánětlivými cytokiny buňky nedosahují. Takový závěr podporuje patologii AD v choroidálním plexu, mezi kterou řadíme mj. i dysbalanci hladin exprimovaných cytokinů (viz kapitola 2.3. *Neuroinflamace*). Další podstatnou informací je vztah mezi neuroinflamačními reakcemi v buňkách choroidálního plexu a hematolivorovu bariérou (viz *Diskuze*). Vzájemný vztah mezi expresí IL-1 $\beta$  a IL-10 lze vyčíst z grafu na obrázku 19; vybrané mikroskopické snímky experimentálních skupin jsou znázorněny na obrázku 20. Rozdíly mezi expresí buď IL-1 $\beta$ , nebo IL-10 vzhledem k inkubační době jsou detailněji rozebrány níže.



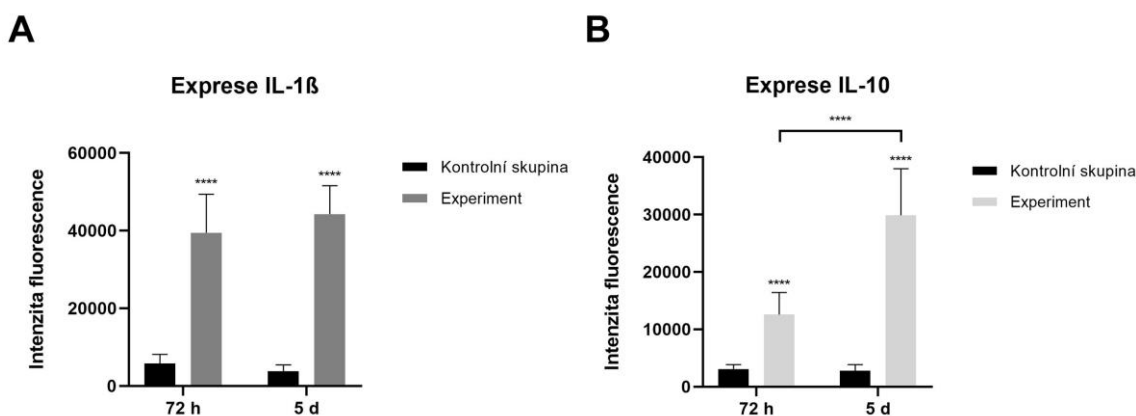
**Obrázek 19: Expresse cytokinů v buňkách Z310.** Potkaní epitelální buňky choroidální plexu byly kultivovány v roztoku A $\beta$  o koncentraci 5  $\mu$ M a inkubovány po dobu 72 h nebo 5 d; pomocí imunocytochemických metod pak byla pro každou skupinu analyzována její intenzita fluorescence. Jako kontrolní skupiny byly použity buňky inkubované pouze v DMEM/F12 dle inkubační doby experimentální skupiny (kontrolní skupiny jsou v grafu započítány v detailnějším porovnání níže). Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. Rozdíly mezi skupinami buněk exprimujícími rozdílné cytokiny, avšak po stejné inkubační době byly statisticky významné. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . Vytvořeno v GraphPad Prism 8 autorkou.



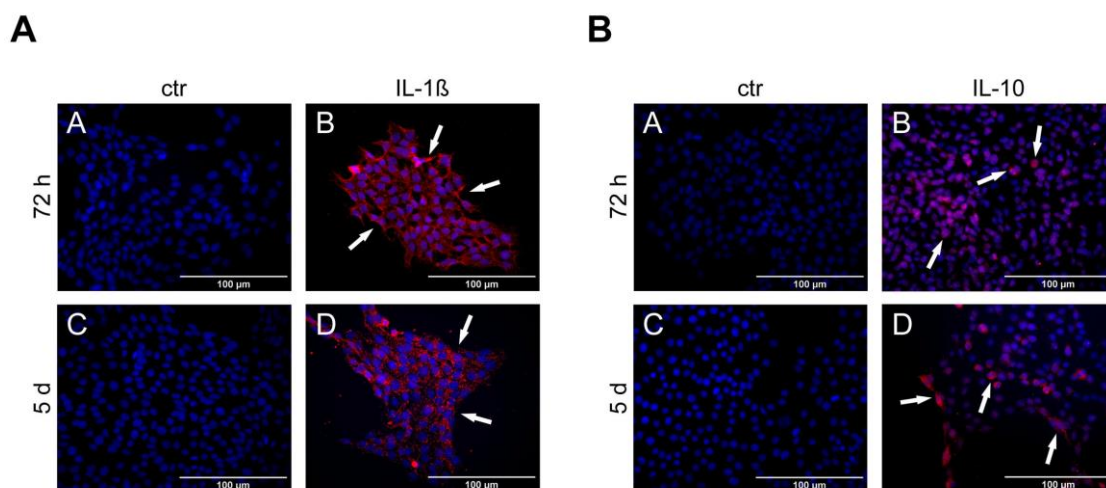
**Obrázek 20:** Snímky z epifluorescenčního mikroskopu zobrazující expresi cytokinů v buňkách Z310. IL-1 $\beta$  a IL-10 je značen **červeně** (šipky) sekundární protilátkou CY5 (kat. č. #711-175-152), jádra buněk **modře** fluorescenčním barvivem DAPI. **(A)(D) Kontrolní skupiny.** Jako kontrolní skupiny byly použity buňky inkubované pouze v DMEM/F12. Mikroskopické snímky ukazují kontrolní skupiny po 72hodinové inkubaci; v den nasazení pocházely buňky z buněčné suspenze o koncentraci  $2 \times 10^4$  buněk/ml. **(B) Expresie IL-1 $\beta$  po 72 h.** Buňky exprimovaly IL-1 $\beta$  ve velké míře; cytokiny bylo možné pozorovat zejména okolo jádra, tedy v cytoplasmě. **(C) Expresie IL-1 $\beta$  po 5 d.** IL-1 $\beta$  byl buňkami exprimován obdobně jako po 72hodinové inkubaci. **(E) Expresie IL-10 po 72 h.** Expresie IL-10 po 72 h byla poměrně nízká; koncentrovala se především v těsné blízkosti jader. **(F) Expresie IL-10 po 5 d.** Buňky exprimovaly IL-10 znatelně víc oproti předchozí skupině. Cytokiny se koncentrovaly okolo jader s větší specificitou. **ctr = kontrolní skupina.** Vytvořeno ve FIJI a Adobe Photoshop 11 autorkou.

Prozánětlivý cytokin IL-1 $\beta$  byl po 72hodinové inkubaci A $\beta$  s buňkami Z310 exprimován ve vysoké míře. Po 5denní inkubaci s A $\beta$  se jeho exprese navýšila, avšak v porovnání s expresí po 72 h nebyl tento rozdíl nijak statisticky významný (obr. 21-A, 22-A).

Expresie protizánětlivého cytokinu IL-10 buňkami Z310 po 72hodinové inkubaci s A $\beta$  byla značně nižší vzhledem k IL-1 $\beta$ . Mnohem významnější byla míra exprese po 5 dnech. Rozdíl mezi expresemi po těchto dvou inkubačních dobách byl statisticky vysoce významný (oproti rozdílu při IL-1 $\beta$ ) (obr. 21-B, 22-B).



**Obrázek 21: Porovnání exprese cytokinů v buňkách Z310 vzhledem ke kontrolním skupinám.** Graf popisuje stejné experimentální skupiny jako obrázek 19. **(A) Expresie IL-1 $\beta$  v buňkách Z310.** Vysoká exprese IL-1 $\beta$  v buňkách Z310 je z grafu patrná jak po 72 h, tak po 5 d. Při porovnání obou skupin s jejich kontrolami byl rozdíl statisticky vysoce významný ( $p < 0,0001$ ). Rozdíl mezi expresemi po 72hodinové a 5denní inkubaci však nebyl nijak statisticky významný ( $p > 0,05$ ). **(B) Expresie IL-10 v buňkách Z310.** Expresie IL-10 v buňkách Z310 po 72 h byla poměrně nízká, avšak při porovnání s kontrolou byl rozdíl rovněž statisticky významný ( $p < 0,0001$ ). Stejně statisticky významný byl i rozdíl mezi kontrolní skupinou a 5denní inkubací. Oproti porovnání expresí IL-1 $\beta$  bylo při porovnání expresí IL-10 po 72hodinové a 5denní inkubaci dosaženo výsledku se statisticky vysoce významným rozdílem ( $p < 0,0001$ ). \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . Vytvořeno v GraphPad Prism 8 autorkou.



**Obrázek 22: Porovnání exprese cytokinů v buňkách Z310 vzhledem ke kontrolním skupinám.** IL-1 $\beta$  a IL-10 je značen **červeně** (šipky) sekundární protilátkou CY5 (kat. č. #711-175-152), jádra buněk **modře** fluorescenčním barvivem DAPI. (A) **Expres IL-1 $\beta$  v buňkách Z310.** (B) **Expres IL-10 v buňkách Z310.** Mikroskopické snímky se shodují se snímky na obrázku 20. V obou schématech fluorescenční snímky (C) navíc zobrazují kontrolní skupiny inkubovány v DMEM/F12 5 d; v den nasazení pocházely buňky z buněčné suspenze o koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/ml. **ctr = kontrolní skupina.** Vytvořeno ve FIJI a Adobe Photoshop 11 autorkou.

## 7 DISKUZE

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou vzniku demence. Její klinický obraz je charakterizován poškozením synaptických spojení, neuronů, neurodegenerací a kognitivními poruchami. Za poslední desítky let bylo provedeno nespočet výzkumů patogeneze AD, které opět napomohly k rozluštění centrálních mechanismů vzniku této choroby. V neposlední řadě bylo objasněno, že spolu s dvěma hlavními patologickými znaky, akumulací A $\beta$  peptidu (senilními plaky) a tvorbou hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu (neurofibrilárními klubky), se na průběhu AD podílí neuroinflamace vyvolaná vrozenými imunitními reakcemi CNS (Walters *et al.*, 2016; Alzheimer's Association, 2021). V několika studiích byla i označena role choroidálního plexu jako vstupní brána pro imunitní buňky napadající CNS, a tedy zahájení neuroinflamace (Engelhardt *et al.*, 2001; Vercellino *et al.*, 2008; Murugesan *et al.*, 2012).

Navzdory narůstajícímu povědomí o choroidálním plexu je tato tkáň, tvořená specializovanými epiteliálními buňkami, relativně málo prostudovaná struktura v rámci neurovědeckého výzkumu. Mezi hlavní funkce choroidálního plexu patří produkce mozkomíšního moku, eliminace toxinů, a tedy udržování homeostázy; celkově slouží jako klíčová struktura pro komunikaci mezi mozkem a periferií (Marques *et al.*, 2017). Samotný CSF poskytuje stálost vnitřního prostředí v centrální nervové soustavě; jeho produkci, korektní chemické složení a imunologický stav monitoruje hematolymphatická bariéra sestávající z epiteliálních buněk choroidálního plexu (viz níže). Řada experimentálních a klinických výzkumů směřuje svůj zájem k významné roli dysfunkce choroidálního plexu u různých onemocnění postihujících CNS (E. Vandembroucke, 2016). Společně u infekčních, autoimunitních a traumatických nemocí byl prokázán vliv poškození struktury a funkcí choroidálního plexu i při stárnutí a v průběhu Alzheimerovy choroby (Krzyzanowska a Carro, 2012; Solár *et al.*, 2020).

Během AD prochází choroidální plexus morfologickými změnami ovlivňujícími jeho klinicky významné funkce; zejména dochází k atrofii epitelu (nepravidelnost jader, zmenšování mikrokrevních cév, ztlustění bazální membrány atd.), snížení produkce CSF, modifikaci jeho složení a narušení integrity HLB. V důsledku globální neurodegenerace, typické pro AD, se mozkové komory s přítomnými tkáněmi ChP začínají zvětšovat (E. Vandembroucke, 2016). Ve studiích Crossgrove *et al.* (2005), Wostyn *et al.* (2011) a González-Marrero *et al.* (2015) bylo pouze naznačeno, že akumulovaný A $\beta$  by mohl způsobovat dysfunkci ChP. Následné poškození ChP a nedostatečné odbourávání A $\beta$ , který se za přirozeného stavu v mozku vyskytuje v malém množství a ChP společně s gliovými buňkami jeho množství reguluje, by tak mohla být důvodem k rozvoji AD. Jedním z možných mechanismů vyvolávajících poškození neuronů v důsledku akumulace A $\beta$  je selhání ChP včetně fungování HLB (Solár *et al.*, 2020). Velký počet studií naznačuje přímý vztah mezi toxicitou A $\beta$  a narušením integrity HLB (Vargas *et al.*, 2010). Současné znalosti v rámci vztahu choroidálního plexu a Alzheimerovy choroby jsou však zásadně nedostatečné.

V práci byla sledována účast potkaních epiteliálních buněk choroidálního plexu (buněčná linie Z310) v průběhu AD, která byla navozena inkubací buněk s různě koncentrovanými roztoky A $\beta$ , jehož agregáty (senilní plaky) jsou ve zkoumaném onemocnění přítomny v mozkové kůře. Následně pak byla pozorováno, zda je A $\beta$  v těchto buňkách schopný agregace. V druhé části experimentu byla zkoumána role neuroinflamace, jejíž významnost v patogenezi AD začíná být čím dál patrnější. Konkrétně byla zjišťována exprese prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů v buňkách Z310 v reakci na přítomnost agregovaného A $\beta$ .

Získané výsledky dokazují, že A $\beta$  peptid se v buňkách Z310 agregoval i při ovlivnění roztokem o velmi nízké koncentraci 1  $\mu$ M. Míra agregace byla závislá na čase a koncentraci roztoku A $\beta$ , kterému byly buňky vystaveny. Po delší inkubační době se míra agregace zvyšovala. Při použití 5  $\mu$ M roztoku A $\beta$  a 72hodinové inkubace byly výsledky zhodnoceny jako vhodné pro navazující experimenty studující průběh AD v *in vitro* modelu potkaních epiteliálních buněk choroidálního plexu.

Přestože momentálně neexistují žádné studie, které by agregaci A $\beta$  v epiteliálních buňkách choroidálního plexu popisovaly, lze výsledky porovnat s již zmiňovanou studií Hu *et al.* (2009). Publikace popisuje agregaci A $\beta$  v myších buňkách kortikálních neuronů a neuroblastomu. Buňky byly vystaveny různým koncentracím A $\beta$ , jehož aktivita byla detekována již po 24 h i při velmi nízké, fyziologicky relevantní, koncentraci 1 nM. Agregace A $\beta$ , která byla pozorována v experimentu závislém na koncentraci a inkubační době, se již objevila po 72 h u skupin inkubovaných s 1  $\mu$ M roztokem. Hu *et al.* předpokládali, že agregace A $\beta$  by při nižších koncentracích (nM) mohla nastat po mnohem delší inkubační době. V souladu s tím by pravděpodobně mohlo docházet k agregaci A $\beta$  v choroidálním plexu při použití fyziologického rozmezí koncentrací; tyto skutečnosti však ještě musí být potvrzeny.

Jakýkoliv zánět (inflamace) podněcuje reakci vrozeného (nespecifického) imunitního systému. Akutní zánět pak slouží jako obranný a ozdravný mechanismus těla. Přetrvávající akutní zánět vyústí v škodlivý chronický zánět, jenž se uplatňuje nejen v periferních onemocněních, ale i v onemocněních centrální nervové soustavy, jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza aj. V takovém případě se jedná o neuroinflamaci, která je řízena aktivací gliových buněk (mikroglie a astrocyty) a expresí zánětlivých cytokinů (Schwab a McGeer, 2008; Crews a Masliah, 2010). Úloha mikroglie při AD je však vysoce komplexní, protože vykazuje jak prospěšné, tak škodlivé účinky. *Post mortem* imunohistochemické vyšetření mozkových řezů pacientů trpících AD odhalilo přítomnost aktivovaných mikroglie v blízkosti agregátů amyloid- $\beta$  peptidu (Rogers *et al.*, 1988; Itagaki *et al.*, 1989). Prozatímni výzkumy potvrzují, že agregáty A $\beta$  jsou klíčovým faktorem ke spuštění chronické imunitní reakce v CNS. Současná hypotéza mechanismu neuroinflamace u AD tvrdí, že aktivované mikroglie zpočátku eliminují agregovaný A $\beta$  fagocytózou a sekrecí proteolytických enzymů degradujících A $\beta$ . Ve snaze agregáty dočista zneškodnit pak začínají produkovat prozánětlivé cytokiny, chemokiny, komplementy, ale i toxické volné radikály, které způsobují odumírání neuronů (Krabbe *et al.*, 2013).

Podle výzkumů, které prokázaly jak zmírňující, tak zhoršující dopad lokálně uvolněných cytokinů na tvorbu A $\beta$  a  $\tau$ -protein plaků, je evidentní přímý vztah mezi neurozánětlivými



reakcemi a patologickými jevy AD. Experimenty provedené na vzorcích mozkových tkání pacientů s AD ukázaly zvýšenou genovou expresi pro signální dráhy včetně JAK/STAT signalizace a proteinů imunitních reakcí (interleukinů). Ve studii Sastre *et al.* (2008) byla například demonstrována spojitost mezi zvýšenou hladinou zánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a upregulací transkripčních faktorů  $\beta$ -sekretázy. Při aktivaci  $\beta$ -sekretázy je APP štěpen na své  $\beta$  podjednotce, což vede k rozvoji A $\beta$  plaků.

V současné době narůstá počet důkazů, které naznačují, že se choroidální plexus podílí nejen na produkci mozkomíšního moku, ale i na regulaci imunitní reakce v CNS během neurozánětlivých onemocnění. Studie Kivisäkk *et al.* (2003) navrhuje, že ChP (skrže HLB) řídí vstup T-lymfocytů do nezanícené CNS v průběhu raných stádií roztroušené sklerózy podle zvířecího modelu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy. Zánětlivé procesy popsané v rámci AD byly pozorovány i v mozkomíšním moku (Taipa *et al.*, 2019). Na základě toho pak bylo v nedávné studii Čarna *et al.* (2021) na buněčných lysátech lidských tkání choroidálního plexu *post mortem* objasněno, že selhání ChP spočívá v zánětlivých poruchách, které dodatečně vedou ke specifickým změnám v genové expresi v ChP pro produkci CSF. Tato zjištění naznačují neschopnost poškozeného ChP se dále vypořádat s periferními imunitními reakcemi, což zhoršuje zánětlivé reakce a způsobuje dysfunkce v ChP, které přispívají ke chronickému zánětu. Jiný výzkum, studující zánětlivé reakce v ChP u AD po injekci A $\beta$ 1-42 oligomerů do mozkových komor myši, prokazuje indukci zvýšených hladin zánětlivých genových expresí v ChP a zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů a chemokinů v CSF. Kromě toho byla popsána změna v morfologii buněk ChP, a to zejména proteinů utvářejících HLB (viz níže) (Brkic *et al.*, 2015). Je proto pozoruhodné, že je dosud jen velmi málo známo o přesných molekulárních mechanismech, kterými lokální uvolňování zánětlivých cytokinů (jako je IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ ) v ChP a HLB ovlivňuje akumulaci A $\beta$  a fosforylaci  $\tau$ -proteinu.

V druhé části experimentu byly zkoumány regulační imunitní mechanismy v *in vitro* modelu AD v potkaních epiteliálních buňkách choroidálního plexu. Primárním záměrem bylo zjistit a studovat expresi prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a protizánětlivého cytokinu IL-10 v těchto buňkách.

Po získání *in vitro* modelu AD v ChP, který byl vytvořen na základě výsledků z první části experimentu zkoumajícího agregaci A $\beta$  v buňkách Z310, byla studována exprese cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-10. Výsledky vykazují poněkud zajímavý vztah mezi hladinami těchto prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů při porovnání dvou časových intervalů (72 h a 5 d), kdy byla exprese examinována. Vyplývá z nich, že buňky Z310 nejdříve exprimují velké množství prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  oproti protizánětlivým cytokinům IL-10, jejichž hladina je po 72hodinové inkubaci minimální. Později však exprese IL-10 významně stoupá, což by mohlo naznačovat snahu buněk choroidálního plexu agregaci A $\beta$  potlačit. Choroidální plexus u AD by tak na základě tohoto zvířecího *in vitro* modelu mohl potvrzovat hypotézu o jeho protektivním charakteru. Na druhou stranu však po delší inkubační době exprese IL-1 $\beta$  stále převažovala nad IL-10. Dysbalance mezi expresemi pro- a protizánětlivých cytokinů podporuje domněnky výzkumů o roli neuroinflamace v průběhu AD. Získané vědomosti v rámci vztahu neuroinflamace a ChP u AD je třeba nadále studovat pro přiblížení se

k opravdovým mechanismům, které probíhají v lidském těle. Další pozorovanou skutečností byla zvýšená exprese prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  v blízkosti mrtvých Z310 buněk. Vysoká hladina prozánětlivých cytokinů nejspíš vede k poškození a následnému usmrcení buněk, avšak jejich přítomnost může být stejně tak vysvětlena tím, že buňky usmrčené A $\beta$  expresí IL-1 $\beta$  informují sousedící buňky o cytotoxické látce v okolí. Podobné jevy, avšak v mnohem nižší míře, byly patrné i u experimentálních skupin určených pro studium exprese IL-10.

Potvrzenou zvýšenou expresí IL-1 $\beta$  podporuje již výše zmíněná studie Brkic *et al.* (2015), ve které byly prokázány zvýšené genové exprese IL-1 $\beta$  (+ IL-6, TNF- $\alpha$  a iNOS) již po dvou a šesti hodinách od injekce oligomerů A $\beta$ 1-42 do mozkových komor laboratorních myší. Zánětlivá exprese stejných cytokinů pak byla pozorována i v CSF společně s navýšenou expresí chemokinů MIP-1 $\alpha$ , MIP-1, MCP-1 a GM-CSF.

Mezi budoucí vize v rámci studování vztahu choroidálního plexu a neuroinflamace v průběhu Alzheimerovy choroby patří detailnější popsání agregace A $\beta$ , jak ve větším rozsahu koncentrací, tak i časových intervalů, a důslednější prozkoumání exprese cytokinů, a to zejména při pozorování jiných typů cytokinů ve větším časovém úseku. Pro přesnější a hodnotnější výsledky bude zajisté nutné již provedené experimenty otestovat na lidských buněčných liniích či lidských organoidech prostřednictvím kombinace různých experimentálních přístupů, jako jsou imunocytochemie, sekvenování nové generace (NGS), využití proteomů založených na hmotnostní spektrometrii (MS), Transwell® transport či elektrofyziologie. Jedním z nejdůležitějších budoucích cílů je však zaměření se na strukturu a morfologii hematolikorové bariéry ovlivněné průběhem AD. Současné poznatky a hypotézy, které vychází z výsledků této práce a dalších výzkumů, jsou rozebrány níže. Jako další potenciální předmět výzkumu se nabízí studie vztahu dysfunkce choroidálního plexu během AD a druhého hlavního patologického nálezu této choroby, neurofibrilárních klubek, tvořených hyperfosforylovaným  $\tau$ -proteinem, který za fyziologického stavu poskytuje stabilitu mikrotubulům v axonových výběžcích neuronů.

Prostředí komplexní a senzitivní centrální nervové soustavy je vysoce kontrolováno a chráněno. Nejedná se však pouze o lebku, mozkové pleny a mozkomíšní mok, které chrání mozek zejména před otřesy a poraněními, ale i o bariéry, které mikroprostředí CNS oddělují od potenciálně škodlivých substancí z krve. Mezi nejpodrobněji popsané patří hematoencefalická bariéra, tvořící rozhraní mezi nervovou tkání a jejími kapilárami, a hematolikorová bariéra, která od sebe v mozkových komorách odděluje mozkomíšní mok a kapiláry (Cipolla, 2009).

Hematoencefalická bariéra obklopuje téměř veškeré kapiláry pronikající do mozkové kůry. Její anatomický základ tvoří specializované endoteliální buňky propojené těsnými spoji, hlavními komponenty HEB, astrocyty, pericyty a okolní nervová tkáň. Role HEB v patogenezi AD byla již ve velkém množství studií rozebrána; podle hypotézy její dysfunkce během choroby znemožňuje transport A $\beta$  agregátů z nervové tkáně do periferního cévního systému (Cipolla, 2009; Cai *et al.*, 2018).

V hlavním zájmu tohoto výzkumu je však hematolikorová bariéra, která se nachází ve všech čtyřech mozkových komorách. Oproti HEB obklopuje fenestrované kapiláry; bariéru hlavně

utváří buněčné spojení epiteliálních buněk choroidálního plexu. Buňky jsou laterálně propojeny těsnými spoji, pomocí transmembránových proteinů ocludinů, claudinů a submembránových proteinů zonulinů, adhezními spoji a mezerovými spoji (bazolaterálně). HLB je oproti HEB mnohem méně prozkoumanou strukturou v rámci výzkumu patogeneze AD, přestože má v CNS velký klinický význam. Za poslední dobu však přibývá stále více důkazů, že HLB vykazuje během AD morfologické a molekulární abnormality, které by mohly hrát roli v progresi tohoto onemocnění (Solár *et al.*, 2020).

Proteiny buněčných spojů epiteliálních buněk choroidálního plexu, které tvoří HLB, spolu s komplexním systémem transportních proteinů přísně regulují propustnost bariéry. Hlavní transportéry A $\beta$ , zahrnující protein související s lipoproteinovým receptorem (LRP1) a receptor pro produkty pokročilé glykace (RAGE), byly rovněž objeveny v epiteliálních buňkách ChP. Navíc byla popsána role transtyreтину (TTR), jež je produkován ChP, jako hlavního proteinu, který váže A $\beta$  a odstraňuje jeho přebytečné množství z CSF (González-Marrero *et al.*, 2015). Je proto nepochybné, že je HLB životně důležitá pro eliminaci A $\beta$  a inhibici jeho agregace a toxicity.

V nejnovějších studiích Brkic *et al.* (2015), Balusu *et al.* (2016) a Čarna *et al.* (2021) byly popsány morfologické změny v epiteliálních buňkách choroidálního plexu, které byly charakteristické vymizením kuboidního tvaru, celkovým snížením objemu a zmenšením jader. Stejně tak byl potvrzen vliv A $\beta$  na permeabilitu a integritu HLB; po 6 hodinách od injekce A $\beta$ 1-42 oligomerů do mozkových komor laboratorních myších se permeabilita bariéry statisticky významně zvýšila; její integrita tedy byla výrazně narušena. Pro lepší pochopení narušení HLB byla navíc prověřena korelace narušení její struktury se změnami proteinů utvářejících těsné spoje v bariéře. Expresce ocludinu se po dvou i šesti hodinách od vystavení A $\beta$  značně snížila, zatímco snížená expresce claudinu-5 byla patrná až po šesti hodinách. Velký pokles po dvou hodinách byl značný v expresi ZO-1; v menší míře byl po dvou hodinách exprimován i claudin-1, avšak po šesti hodinách se hladina expresce navrátila do normálního stavu podobnému kontrolní skupině. Žádnou známku snížené expresce, ale naopak ještě vyšší, vykazoval ZO-3. Genové expresce proteinů v adhezních spojkách nebyly nijak ovlivněny.

Výsledky popisující expresi ocludinu ve společně vytvořeném *in vitro* modelu AD v buňkách Z310 jsou popsány v letošní práci Středoškolské odborné činnosti zpracované Annou Brodeckou v oboru č. 4: Biologie. Její práce se zaměřuje na HLB a její stav v průběhu AD na molekulární úrovni. Její výsledky korelují s výsledky této práce, která se zaměřila na ChP v průběhu AD na klinické úrovni. Po 72hodinové inkubaci s A $\beta$  o koncentraci 5  $\mu$ M dochází ke zvýšené expresi prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$ ; v závislosti na tom klesá hladina expresce ocludinu téměř o polovinu oproti kontrolní skupině. Po 5denní inkubaci, kdy se navýšila expresce protizánětlivého cytokinu IL-10, byla expresce ocludinu v buňkách navrácena do původní hladiny. Tento vztah podporuje myšlenku o protektivním charakteru choroidálního plexu díky jeho expresi protizánětlivých mediátorů, které zapříčiňují navrácení fyziologického stavu HLB. Taková skutečnost však ještě musí být prověřena; po mnohem delším časovém intervalu totiž nejspíš dochází k převládání prozánětlivých cytokinů, které působí toxicky

na proteiny těsných spojů, a tedy zvyšují permeabilitu bariéry. Tento děj pak nakonec pravděpodobně vede k úplné dysfunkci a neschopnosti eliminace A $\beta$  agregátů ChP.

Lepší porozumění role choroidálního plexu a hematolivorové bariéry v průběhu neurodegenerativních onemocnění by mohlo poskytnout nové terapeutické strategie. V současné době je na vzestupu druh léčby využívající genovou manipulaci prostřednictvím virových vektorů. Choroidální plexus se jeví jako slibný cíl díky jeho schopnosti exprimovat různé proteiny za účelem udržení chemického složení CSF. Virální vektory by tak mohly přimět buňky choroidálního plexu produkovat terapeutické proteiny a protizánětlivé cytokiny do CSF. Fágový displej je dalším nástrojem, pomocí kterého by mohla být navržena metoda založená na peptidech tak, aby cílila na ChP za účelem diagnostiky i terapie AD. Patrný je fakt, že i vlastnosti hematolivorové bariéry se dají využít pro léčebné účely. Zvýšení její propustnosti by mohla usnadnit terapeutikům cílený transport do CNS, zatímco posílením integrity by nedocházelo ke vniknutí patogenů nebo periferních imunitních buněk, jejichž činnost může způsobovat rozvoj neurologických onemocnění. V rámci výzkumu terapie AD byl nedávnou studií navržen potenciální léčebný účinek virálních vektorů zaměřujících se na potlačení amyloid- $\beta$  peptidu v ChP (Nardo *et al.*, 2018). Ve studii Bolos *et al.* (2014) byla provedena transplantace ChP v myším modelu AD vykazujícím pokročilou akumulaci A $\beta$  a zhoršení paměti. Po transplantaci došlo k významnému zlepšení, a to k redukci agregace A $\beta$ , zastavení fosforylace  $\tau$ -proteinu a potlačení reaktivity astrocytů. Transplantací bylo taktéž dosaženo úplného behaviorálního zotavení, které bylo prokázáno zlepšenou neprostorovou i prostorou pamětí. Takové zjištění dodatečně posiluje neuroprotektivní potenciál tkání choroidálního plexu a jeho využití v hledání terapeutik k vyléčení Alzheimerovy choroby.

## 8 ZÁVĚR

Alzheimerova choroba je nevratné progresivní neurodegenerativní onemocnění, pro které nebyla do dnešního dne nalezena účinná terapie. Buněčné a molekulární mechanismy patogeneze Alzheimerovy choroby totiž stále nejsou dostatečně pochopeny. Patologické nálezy při probíhající Alzheimerově chorobě zahrnují agregaci amyloid- $\beta$  peptidu a tvorbu hyperfosforylovaných tau proteinů. Choroidální plexus tvořící hematollikvorovou bariéru, klíčovou pro udržování homeostázy CNS, se významně podílí na eliminaci agregátů amyloid- $\beta$  peptidu. Práce je zaměřena na roli choroidálního plexu v průběhu Alzheimerovy choroby a na jeho potenciální vztah s neuroinflamací. Cílem práce bylo nejdříve zjistit agregaci amyloid- $\beta$  peptidu v potkaních epitelálních buňkách choroidálního plexu a následně zkoumat imunitní regulační mechanismy probíhající v buňkách; konkrétně expresi prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a protizánětlivého cytokinu IL-10.

Získané výsledky ukazují, že buňky Z310 reagují na A $\beta$  v průběhu Alzheimerovy choroby. Agregace amyloid- $\beta$  peptidu se projevila při použití všech roztoků o různých koncentracích, a to 1, 5 a 10  $\mu$ M, a po inkubačních dobách 24 h nebo 72 h. Na základě první části experimentu pak byla stanovena koncentrace amyloid- $\beta$  peptidu 5  $\mu$ M pro vytvoření *in vitro* modelu Alzheimerovy choroby v buňkách Z310, na kterém byla v navazujícím experimentu zkoumána exprese prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a protizánětlivého cytokinu IL-10.

Výsledky druhé části experimentu potvrzují přítomnost neuroinflamace v buňkách Z310 v reakci na agregaci amyloid- $\beta$  peptidu. Při pozorování byl zjištěn zajímavý vztah mezi hladinami IL-1 $\beta$  a IL-10, kdy buňky Z310 po 72 h od ovlivnění roztokem amyloid- $\beta$  peptidu ve velké míře exprimovaly IL-1 $\beta$  oproti IL-10. Po 5 d však exprese IL-10 významně vzrostla a hladina IL-1 $\beta$  se jen nepatrně v malé míře navýšila. Popsaná souvislost by mohla potvrzovat myšlenku o protektivním charakteru choroidálního plexu při probíhající neuroinflamaci. Tato hypotéza však ještě musí být v budoucnu upřesněna podrobnější analýzou imunitních regulačních mechanismů odehrávajících se v epitelálních buňkách choroidálního plexu.

Hlavním přínosem této práce jsou nové poznatky v rámci výzkumu patogeneze Alzheimerovy choroby, a to konkrétně popsání přítomných neuroinflamačních mechanismů. Práce navíc naznačuje podíl choroidálního plexu na progresi choroby. Šíření povědomí o choroidálním plexu a jeho významu by mohlo poskytnout nové podněty pro výzkum i jiných neurologických onemocnění, a přispět tak k hledání a vyvíjení nových terapeutik.

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2021. **2021 Alzheimer's disease facts and figures.** *Alzheimer's & Dementia*. 17(3), 327–406. ISSN 1552-5279.  
doi: 10.1002/alz.12328
2. ARANGO DUQUE, Guillermo a Albert DESCOTEAUX, 2014. **Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases.** *Frontiers in Immunology*. 5, 491. ISSN 1664-3224.  
doi: 10.3389/fimmu.2014.00491
3. BUTLER, Ann B. a William HODOS, 2005. **The Vertebrate Central Nervous System.** *Comparative Vertebrate Neuroanatomy*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., s. 49–72. ISBN 978-0-471-73384-3.  
doi: 10.1002/0471733849.ch3
4. BALUSU, Sriram, Marjana BRKIC, Claude LIBERT a Roosmarijn E. VANDENBROUCKE, 2016. **The choroid plexus-cerebrospinal fluid interface in Alzheimer's disease: more than just a barrier.** *Neural Regeneration Research*. 11(4), 534–537. ISSN 1673-5374.  
doi: 10.4103/1673-5374.180372
5. BHATIA, Saurabh, 2019. **Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 3: Animal tissue culture and biopharmaceuticals.** S.I.: IOP Publishing. ISBN 978-0-7503-1347-6.  
doi: 10.1088/2053-2563/aafac0
6. BOLOS, Marta, Desireé ANTEQUERA, Jesús ALDUDO, Henrike KRISTEN, María Jesús BULLIDO a Eva CARRO, 2014. **Choroid plexus implants rescue Alzheimer's disease-like pathologies by modulating amyloid- $\beta$  degradation.** *Cellular and Molecular Life Sciences*. 71(15), 2947–2955. ISSN 1420-9071.  
doi: 10.1007/s00018-013-1529-4
7. BRADL, Monika a Hans LASSMANN, 2010. **Oligodendrocytes: biology and pathology.** *Acta Neuropathologica*. 119(1), 37–53. ISSN 1432-0533.  
doi: 10.1007/s00401-009-0601-5
8. BRKIC, Marjana, Sriram BALUSU, Elien Van WONTERGHEM, Nina GORLÉ, Iryna BENILOVA, Anna KREMER, Inge Van HOVE, Lieve MOONS, Bart De STROOPER, Selma KANAZIR, Claude LIBERT a Roosmarijn E. VANDENBROUCKE, 2015. **Amyloid  $\beta$  Oligomers Disrupt Blood–CSF Barrier Integrity by Activating Matrix Metalloproteinases.** *Journal of Neuroscience*. 35(37), 12766–12778. ISSN 0270-6474, 1529-2401.  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0006-15.2015

9. BUDSON, Andrew E. a Neil W. KOWALL, 2011. **The Handbook of Alzheimer's Disease and Other Dementias**. 1st edition. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-1186-7285-3.
10. BURRY, Richard W., 2010. **Immunocytochemistry: a practical guide for biomedical research**. New York: Springer. ISBN 978-1-4419-1304-3.
11. CAI, Zhiyou, Pei-Feng QIAO, Cheng-Qun WAN, Min CAI, Nan-Kai ZHOU a Qin LI, 2018. **Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease**. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 63(4), 1223–1234. ISSN 1875-8908.  
doi: 10.3233/JAD-180098
12. CALSOLARO, Valeria a Paul EDISON, 2016. **Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions**. *Alzheimer's & Dementia*. 12(6), 719–732. ISSN 1552-5260, 1552-5279.  
doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.010
13. CHAUDHRY, Aiysha, Henry HOULDEN a Mie RIZIG, 2020. **Novel fluid biomarkers to differentiate frontotemporal dementia and dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease: A systematic review**. *Journal of the Neurological Sciences*. 415. ISSN 0022-510X, 1878-5883.  
doi: 10.1016/j.jns.2020.116886
14. CIPOLLA, Marilyn J., 2009. **Barriers of the CNS**. *The Cerebral Circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. ISBN 978-1615047222.
15. CREWS, L. a E. MASLIAH, 2010. **Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease**. *Human Molecular Genetics*. 19(R1), R12–R20. ISSN 0964-6906, 1460-2083.  
doi: 10.1093/hmg/ddq160
16. CROSSGROVE, Janelle S., G. Jane LI a Wei ZHENG, 2005. **The Choroid Plexus Removes  $\beta$ -Amyloid from Brain Cerebrospinal Fluid**. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. 230(10), 771–776. ISSN 1535-3702.

17. ČARNA, Maria, Isaac G. ONYANGO, Stanislav KATINA, Dušan HOLUB, Marketa NEZVEDOVA, Durga JHA, Zuzana NEDELSKA, Valentina LACOVICH, Thijs Vande VYVERE, Ruben HOUBRECHTS, Krystine GARCIA-MANSFIELD, Ritin SHARMA, Victoria DAVID-DIRGO, Martin VYHNALEK, Kateřina TEXLOVA, Hernan CHAVES, Nadine BAKKAR, Lucia PERTIERRA, Mojmir VINKLER, Hana MARKOVA, Jan LACZO, Kateřina SHEARDOVA, Jan FRICĚ, Giancarlo FORTE, Petr KAŇOVSKY, Silvie BELAŠKOVA, Jiri DAMBORSKY, Jakub HORT, Nicholas T. SEYFRIED, Robert BOWSER, Gustavo SEVLEVER, Robert A. RISSMAN, Richard A. SMITH, Marian HAJDUCH, Patrick PIRROTTE, Zdeněk SPAČIL, Eric B. DAMMER, Clara LIMBÄCK-STOKIN a Gorazd B. STOKIN, 2021. **Failure of the choroid plexus in Alzheimer's disease.**  
doi: 10.1101/2021.07.29.21260696
18. DAMKIER, Helle H., Peter D. BROWN a Jeppe PRAETORIUS, 2013. **Cerebrospinal Fluid Secretion by the Choroid Plexus.** *Physiological Reviews.* 93(4), 1847–1892. ISSN 0031-9333, 1522-1210.  
doi:10.1152/physrev.00004.2013
19. DERMIETZEL, Rolf a David C. SPRAY, 1993. **Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why?** *Trends in Neurosciences.* 16(5), 186–192. ISSN 01662236.  
doi: 10.1016/0166-2236(93)90151-B
20. DOBRUCKI, Jurek W. a Ulrich KUBITSCHECK, 2017. **Fluorescence Microscopy.** *Ulrich KUBITSCHECK, ed. Fluorescence Microscopy.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, s. 85–132. ISBN 978-3-527-68773-2.  
doi: 10.1002/9783527687732.ch3
21. DOTIWALA, Ary K., Cassidy MCCAUSLAND a Navdeep S. SAMRA, 2021. **Anatomy, Head and Neck, Blood Brain Barrier.** *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID 30137840.
22. E. VANDENBROUCKE, Roosmarijn, 2016. **A Hidden Epithelial Barrier in the Brain with a Central Role in Regulating Brain Homeostasis. Implications for Aging.** *Annals of the American Thoracic Society.* 13(5), 407–410. ISSN 2329-6933, 2325-6621.  
doi: 10.1513/AnnalsATS.201609-676AW
23. EMERICH, Dwaine F., Alfred V. VASCONCELLOS, Robert B. ELLIOTT, Stephen J. M. SKINNER a Cesario V. BORLONGAN, 2004. **The choroid plexus: function, pathology and therapeutic potential of its transplantation.** *Expert Opinion on Biological Therapy.* 4(8), 1191–1201. ISSN 1471-2598, 1744-7682.  
doi: 10.1517/14712598.4.8.1191



24. ENGELHARDT, Britta, Karen WOLBURG-BUCHHOLZ a Hartwig WOLBURG, 2001. **Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation.** *Microscopy Research and Technique*. 52(1), 112–129. ISSN 1059-910X, 1097-0029. doi: 10.1002/1097-0029(20010101)52:1<112::AID-JEMT13>3.0.CO;2-5
25. ESTEVES, Madalena, Armando ALMEIDA a Hugo LEITE-ALMEIDA, 2020. **Insights on nervous system biology and anatomy.** *Handbook of Innovations in Central Nervous System Regenerative Medicine*. Amsterdam: Elsevier, s. 1–28. ISBN 978-0-12-818084-6. doi: 10.1016/B978-0-12-818084-6.00001-5
26. GONZÁLEZ-MARRERO, Ibrahim, Lydia GIMÉNEZ-LLORT, Conrad E. JOHANSON, Emilia María CARMONA-CALERO, Leandro CASTAÑEYRA-RUIZ, José Miguel BRITO-ARMAS, Agustín CASTAÑEYRA-PERDOMO a Rafael CASTRO-FUENTES, 2015. **Choroid plexus dysfunction impairs beta-amyloid clearance in a triple transgenic mouse model of Alzheimer’s disease.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9, 17. ISSN 1662-5102. doi: 10.3389/fncel.2015.00017
27. HAINES, D.E., J.J. CORBETT, M.D. ARD a J.A. LANCON, 2013. **The ventricles, choroid plexus, and cerebrospinal fluid.** *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*. 4th edition. Philadelphia: Elsevier, s. 82–94. ISBN 978-0-323-51224-4.
28. HAVRDOVÁ, Eva, 2001. **Neuroimunologie.** Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-85912-24-1.
29. HONG, H. S., E. M. HWANG, H. J. SIM, H.-J. CHO, J. H. BOO, S. S. OH, S. U. KIM a I. MOOK-JUNG, 2003. **Interferon gamma stimulates beta-secretase expression and sAPPbeta production in astrocytes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 307(4), 922–927. ISSN 0006-291X. doi: 10.1016/s0006-291x(03)01270-1
30. HU, Xiaoyan, Scott L. CRICK, Guojun BU, Carl FRIEDEN, Rohit V. PAPPU a Jin-Moo LEE, 2009. **Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(48), 20324–20329. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.0911281106
31. ITAGAKI, S., P. L. MCGEER, H. AKIYAMA, S. ZHU a D. SELKOE, 1989. **Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease.** *Journal of Neuroimmunology*. 24(3), 173–182. ISSN 0165-5728. doi: 10.1016/0165-5728(89)90115-x
32. JAVED, Kinaan, Vamsi REDDY a Forshing LUI, 2021. **Neuroanatomy, Choroid Plexus.** *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID 30844183.

33. JENNES, L., 2017. **Chapter 1 - Cytology of the Central Nervous System.** *P. Michael CONN, ed. Conn's Translational Neuroscience.* San Diego: Academic Press, s. 1–10. ISBN 978-0-12-802381-5.  
doi: 10.1016/B978-0-12-802381-5.00001-4
34. JOVANOVA-NESIC, K., D. KORUGA, D. KOJIC, V. KOSTIC, L. RAKIC a Y. SHOENFELD, 2009. **Choroid Plexus Connexin 43 Expression and Gap Junction Flexibility Are Associated with Clinical Features of Acute EAE.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1173(1), 75–82. ISSN 00778923.  
doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04658.x
35. KINNEY, Jefferson W., Shane M. BEMILLER, Andrew S. MURTISHAW, Amanda M. LEISGANG, Arnold M. SALAZAR a Bruce T. LAMB, 2018. **Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease.** *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions.* 4(1), 575–590. ISSN 2352-8737.  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
36. KIVISÄKK, Pia, Don J. MAHAD, Melissa K. CALLAHAN, Corinna TREBST, Barbara TUCKY, Tao WEI, Lijun WU, Espen S. BAEKKEVOLD, Hans LASSMANN, Susan M. STAUGAITIS, James J. CAMPBELL a Richard M. RANSOHOFF, 2003. **Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100(14), 8389–8394. ISSN 0027-8424.  
doi: 10.1073/pnas.1433000100
37. KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ, 2006. **Klinická cytogenetika I : úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice.** 1. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 80-246-1069-8.
38. KORÁBEČNÝ, Jan, Ondřej SOUKUP a Martin VALIŠ, 2020. **Alzheimerova nemoc: patofyziologie, klinika, farmakoterapie.** Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-643-6.
39. KOUKOLÍK, František a Roman JIRÁK, 1998. **Alzheimerova nemoc a další demence.** Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-7169-615-5.
40. KRABBE, Grietje, Annett HALLE, Vitali MATYASH, Jan L. RINNENTHAL, Gina D. EOM, Ulrike BERNHARDT, Kelly R. MILLER, Stefan PROKOP, Helmut KETTENMANN a Frank L. HEPPNER, 2013. **Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology.** *PLoS One.* 8(4), e60921. ISSN 1932-6203.  
doi: 10.1371/journal.pone.0060921

41. KRATZER, Ingrid, Alexandre VASILJEVIC, Catherine REY, Michelle FEVRE-MONTANGE, Norman SAUNDERS, Nathalie STRAZIELLE a Jean-François GHERSI-EGEA, 2012. **Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier.** *Histochemistry and Cell Biology*. 138(6), 861–879. ISSN 1432-119X.  
doi: 10.1007/s00418-012-1001-9
42. KRZYŻANOWSKA, Agnieszka a Eva CARRO, 2012. **Pathological Alteration in the Choroid Plexus of Alzheimer’s Disease: Implication for New Therapy Approaches.** *Frontiers in Pharmacology*. 3. ISSN 1663-9812.  
doi: 10.3389/fphar.2012.00075
43. LATERRA, John, Richard KEEP, Lorris A. BETZ a Gary W. GOLDSTEIN, 1999. **Blood—Cerebrospinal Fluid Barrier.** *George J. SIEGEL et al., ed. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven. ISBN 0-397-51820-X.
44. LUN, Melody P., Edwin S. MONUKI a Maria K. LEHTINEN, 2015. **Development and functions of the choroid plexus–cerebrospinal fluid system.** *Nature reviews. Neuroscience*. 16(8), 445–457. ISSN 1471-003X.  
doi: 10.1038/nrn3921
45. MANOVÁ, Blanka, 2011. **Interakce amyloidu  $\beta$  s proteiny neuronálních membrán.** Praha. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie. Vedoucí práce RNDr. Vladimír Rudajev, Ph.D.
46. MARQUES, Fernanda, João Carlos SOUSA, Maria Alexandra BRITO, Jens PAHNKE, Cecilia SANTOS, Margarida CORREIA-NEVES a Joana Almeida PALHA, 2017. **The choroid plexus in health and in disease: dialogues into and out of the brain.** *Neurobiology of Disease*. 107, 32–40. ISSN 09699961.  
doi: 10.1016/j.nbd.2016.08.011
47. MURUGESAN, Nivetha, Debayon PAUL, Yen LEMIRE, Bandana SHRESTHA, Shujun GE a Joel S PACHTER, 2012. **Active induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by MOG35-55 peptide immunization is associated with differential responses in separate compartments of the choroid plexus.** *Fluids and Barriers of the CNS*. 9(1), 15. ISSN 2045-8118.  
doi: 10.1186/2045-8118-9-15
48. NARDO, Ariel Di, Kenneth Lee MOYA, Karen ARNAUD a Alain PROCHIANTZ, 2018. **Inhibition of the synthesis of beta-app or the activity of the A- $\beta$  peptide in the choroid plexus.** United States. Patent, *US9868783B2*. 16. leden 2018.
49. NEVŠÍMALOVÁ, Soňa, Jiří TICHÝ a Evžen RŮŽIČKA, 2002. **Neurologie.** Praha: Galén Karolinum. ISBN 978-80-7262-160-6.

50. NIKOLAI, Tomáš, 2013. **Neuropsychologická diagnostika kognitivního deficitu u Alzheimerovy choroby.** Praha: Psychiatrické centrum. ISBN 978-80-87142-25-7.
51. NOVÁKOVÁ, Renata, 2020. **Alzheimerova choroba.** Pardubice. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Chemicko-technologická fakulta. Vedoucí práce Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.
52. ODELL, Ian D. a Deborah COOK, 2013. **Immunofluorescence Techniques.** *Journal of Investigative Dermatology.* 133(1), 1–4. ISSN 0022202X.  
doi: 10.1038/jid.2012.455
53. PEŠÁK, Lukáš, 2013. **Molekulární příčiny Alzheimerovy choroby.** Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce prof. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.
54. POVOVA, Jana, Petr AMBROZ, Michal BAR, Veronika PAVUKOVA, Omar SERY, Hana TOMASKOVA a Vladimír JANOUT, 2012. **Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: A review.** *Biomedical Papers.* 156(2), 108–114. ISSN 12138118, 18047521.  
doi: 10.5507/bp.2012.055
55. POVOVÁ, Jana, Hana TOMÁŠKOVÁ, Omar ŠERÝ, Petr AMBROZ, Kateřina VAŘECHOVÁ a Vladimír JANOUT, 2013. **Alzheimerova choroba a její rizika pro další generace.** 58(3). ISSN 1802-6281.  
doi: 10.21101/hygiena.a0974
56. POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER, 2011. **Obecná patologie.** Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-773-8.
57. QUERFURTH, Henry W. a Frank M. LAFERLA, 2010. **Alzheimer's Disease.** *New England Journal of Medicine.* 362(4), 329–344. ISSN 0028-4793, 1533-4406.  
doi: 10.1056/NEJMra0909142
58. RABOCH, Jiří, Pavel PAVLOVSKÝ, Jiří BERAN a Eva CESKOVÁ, 2012. **Psychiatrie.** Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2712-0.
59. REDZIC, Zoran, 2011. **Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences.** *Fluids and Barriers of the CNS.* 8(1), 3. ISSN 2045-8118.  
doi: 10.1186/2045-8118-8-3
60. ROGERS, J., J. LUBER-NAROD, S. STYREN a W. H. CIVIN, 1988. **Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: Relationship to the pathology of Alzheimer's disease.** *Neurobiology of Aging.*  
doi: 10.1016/S0197-4580(88)80079-4

61. ROSSI, Devora a Albert ZLOTNIK, 2000. **The Biology of Chemokines and their Receptors.** *Annual Review of Immunology*. 18(1), 217–242. ISSN 0732-0582, 1545-3278. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.217
62. RUBIO-PEREZ, Jose Miguel a Juana Maria MORILLAS-RUIZ, 2012. **A Review: Inflammatory Process in Alzheimer’s Disease, Role of Cytokines.** *The Scientific World Journal*. 2012, e756357. ISSN 2356-6140. doi: 10.1100/2012/756357
63. SANTOS, Cecília R.A., Ana Catarina DUARTE, Telma QUINTELA, Joana TOMÁS, Tânia ALBUQUERQUE, Fernanda MARQUES, Joana Almeida PALHA a Isabel GONÇALVES, 2017. **The choroid plexus as a sex hormone target: Functional implications.** *Frontiers in Neuroendocrinology*. 44, 103–121. ISSN 00913022. doi: 10.1016/j.yfrne.2016.12.002
64. SASTRE, Magdalena, Jochen WALTER a Steve M. GENTLEMAN, 2008. **Interactions between APP secretases and inflammatory mediators.** *Journal of Neuroinflammation*. 5(1), 25. ISSN 1742-2094. doi:10.1186/1742-2094-5-25
65. SEGERITZ, Charis-P. a Ludovic VALLIER, 2017. **Cell Culture.** *Morteza JALALI et al., Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Amsterdam: Elsevier. 151–172. ISBN 978-0-12-803077-6. doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
66. SCHELTENS, Philip, Bart DE STROOPER, Miia KIVIPELTO, Henne HOLSTEGE, Gael CHÉTELAT, Charlotte E TEUNISSEN, Jeffrey CUMMINGS a Wiesje M VAN DER FLIER, 2021. **Alzheimer’s disease.** *The Lancet*. 397(10284), 1577–1590. ISSN 01406736. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4
67. SCHWAB, Claudia a Patrick L. MCGEER, 2008. **Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders.** *Journal of Alzheimer’s disease: JAD*. 13(4), 359–369. ISSN 1387-2877. doi: 10.3233/jad-2008-13402
68. SCHWARTZ, Michal, Anat LONDON a Jana KOČIČKOVÁ, 2016. **Neuroimunita: jak udržovat mozek zdravý a mladý.** Praha: BizBooks. ISBN 978-80-265-0522-8.
69. SNELL, Richard S., 2009. **Clinical Neuroanatomy.** 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-0-7817-9427-5.
70. SOLÁR, Peter, Alemeh ZAMANI, Lucie KUBÍČKOVÁ, Petr DUBOVÝ a Marek JOUKAL, 2020. **Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease.** *Fluids and Barriers of the CNS*. 17(1), 35. ISSN 2045-8118. doi: 10.1186/s12987-020-00196-2

71. STRAZIELLE, Nathalie a Jean-Francois GHERSI-EGEA, 2000. **Choroid Plexus in the Central Nervous System: Biology and Physiopathology**. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 59(7), 561–574. ISSN 0022-3069, 1554-6578.  
doi: 10.1093/jnen/59.7.561
72. ŠERÝ, Omar, Jana POVOVÁ, Ivan MÍŠEK, Lukáš PEŠÁK a Vladimír JANOUT, 2013. **Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer`s disease: a review**. 51(1). ISSN 1641-4640.  
doi: 10.5114/fn.2013.34190
73. ŠIMKOVÁ, Kateřina, 2010. **Alzheimerova choroba: péče a její vliv na životy rodinných pečujících**. Brno. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Filozofická fakulta. Vedoucí práce doc. PhDr. Dana Knotová, Ph.D.
74. TAIPA, Ricardo, Sofia P. DAS NEVES, Ana L. SOUSA, Joana FERNANDES, Claudia PINTO, Ana P. CORREIA, Ernestina SANTOS, Pedro S. PINTO, Paula CARNEIRO, Patricio COSTA, Diana SANTOS, Isabel ALONSO, Joana PALHA, Fernanda MARQUES, Sara CAVACO a Nuno SOUSA, 2019. **Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer`s disease and their correlation with cognitive decline**. *Neurobiology of Aging*. 76, 125–132. ISSN 01974580.  
doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.12.019
75. TALANTOVA, Maria, Sara SANZ-BLASCO, Xiaofei ZHANG, Peng XIA, Mohd Waseem AKHTAR, Shu-ichi OKAMOTO, Gustavo DZIEWCZAPOLSKI, Tomohiro NAKAMURA, Gang CAO, Alexander E. PRATT, Yeon-Joo KANG, Shichun TU, Elena MOLOKANOVA, Scott R. MCKERCHER, Samuel Andrew HIRES, Hagit SASON, David G. STOUFFER, Matthew W. BUCZYNSKI, James P. SOLOMON, Sarah MICHAEL, Evan T. POWERS, Jeffery W. KELLY, Amanda ROBERTS, Gary TONG, Traci FANG-NEWMAYER, James PARKER, Emily A. HOLLAND, Dongxian ZHANG, Nobuki NAKANISHI, H.-S. Vincent CHEN, Herman WOLOSKER, Yuqiang WANG, Loren H. PARSONS, Rajesh AMBASUDHAN, Eliezer MASLIAH, Stephen F. HEINEMANN, Juan C. PIÑA-CRESPO a Stuart A. LIPTON, 2013. **A $\beta$  induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(27), E2518–E2527. ISSN 0027-8424, 1091-6490.  
doi: 10.1073/pnas.1306832110

76. TOZAKI-SAITOH, Hidetoshi, Makoto TSUDA a Kazuhide INOUE, 2011. **Chapter 15 - Role of Purinergic Receptors in CNS Function and Neuroprotection.** *Kenneth A. JACOBSON a Joel LINDEN, ed. Advances in Pharmacology.* Cambridge, Massachusetts, USA: Academic Press, *Pharmacology of Purine and Pyrimidine Receptors*, s. 495–528. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00015-1
77. VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ, 2018. **Lékařská histologie II.: Mikroskopická anatomie.** Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3827-0.
78. VARGAS, Teo, Cristina UGALDE, Carlos SPUCH, Desiree ANTEQUERA, María J. MORÁN, Miguel A. MARTÍN, Isidro FERRER, Felix BERMEJO-PAREJA a Eva CARRO, 2010. **Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis.** *Neurobiology of Aging.* 31(9), 1569–1581. ISSN 1558-1497. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.017
79. VERCELLINO, Marco, Barbara VOTTA, Cecilia CONDELLO, Chiara PIACENTINO, Alberto ROMAGNOLO, Aristide MEROLA, Elisabetta CAPELLO, Giovanni Luigi MANCARDI, Roberto MUTANI, Maria Teresa GIORDANA a Paola CAVALLA, 2008. **Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study.** *Journal of Neuroimmunology.* 199(1–2), 133–141. ISSN 0165-5728. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.035
80. VORBRODT, Andrzej W. a Danuta H. DOBROGOWSKA, 2003. **Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view.** *Brain Research Reviews.* 42(3), 221–242. ISSN 01650173. doi: 10.1016/S0165-0173(03)00177-2
81. WALTERS, Anna, Emma PHILLIPS, Rui ZHENG, Maya BIJU a Tarun KURUVILLA, 2016. **Evidence for neuroinflammation in Alzheimer's disease.** *Progress in Neurology and Psychiatry.* 20(5), 25–31. ISSN 1931-227X. doi: 10.1002/pnp.444
82. WOLBURG, Hartwig a Werner PAULUS, 2010. **Choroid plexus: biology and pathology.** *Acta Neuropathologica.* 119(1), 75–88. ISSN 0001-6322, 1432-0533. doi: 10.1007/s00401-009-0627-8
83. WORLD HEALTH ORGANIZATION a ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2012. **Dementia: a public health priority.** Švýcarsko: World Health Organization. ISBN 978-92-4-156445-8.

84. WOSTYN, Peter, Kurt AUDENAERT a Peter Paul DE DEYN, 2011. **Choroidal Proteins Involved in Cerebrospinal Fluid Production may be Potential Drug Targets for Alzheimer's Disease Therapy.** *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 5, 11–17. ISSN 1177-391X.  
doi: 10.4137/PMC.S6509
85. YAARI, Roy a Jody COREY-BLOOM, 2007. **Alzheimer's Disease.** *Seminars in Neurology*. 27(1), 032–041. ISSN 0271-8235, 1098-9021.  
doi: 10.1055/s-2006-956753
86. ZHANG, Fengjin a Linlan JIANG, 2015. **Neuroinflammation in Alzheimer's disease.** *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 11, 243–256. ISSN 1176-6328.  
doi: 10.2147/NDT.S75546
87. ZHENG, Wei a Qiuqu ZHAO, 2002. **Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus.** *Brain research*. 958(2), 371–380. ISSN 0006-8993.  
doi: 10.1016/s0006-8993(02)03683-1
88. ZVĚŘOVÁ, Martina, 2017. **Alzheimerova demence.** Praha: Grada. ISBN 978-80-271-0561-8.



## 10 SEZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

- (URL 1) **Meninges and cerebrospinal fluid.** *Biology Ease* [online]; [cit. 26. 12. 2021]  
Dostupné z: <https://biologyease.com/meninges-and-cerebrospinal-fluid/>
- (URL 2) **Servier medical art.** *Servier* [online]; [cit. 27. 12. 2021]  
Dostupné z: <https://smart.servier.com/>
- (URL 3) **BioRender.** [online]; [cit. 16. 1. 2022]  
Dostupné z: <https://biorender.com/>
- (URL 4) **Immunofluorescence a simple overview.** *ONI* [online]; [cit. 11. 11. 2021]  
Dostupné z: <https://oni.bio/nanoimager/super-resolution-microscopy/immunofluorescence/>

## 11 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1: Komorový systém mozku</b>	
<i>Upraveno podle (Santos et al., 2017).</i>	12
<b>Obrázek 2: Formování choroidálního plexu</b>	
<i>Upraveno podle (Waxman, 2017).</i>	13
<b>Obrázek 3: Cirkulace CSF</b>	
<i>Upraveno podle (URL 1).</i>	14
<b>Obrázek 4: Hematolikvorová bariéra</b>	
<i>Vytvořeno podle (Solár et al., 2020), (URL 2) a (URL 3).</i>	15
<b>Obrázek 5: Buněčné spoje epitelálních buněk choroidálního plexu</b>	
<i>Vytvořeno podle (Solár et al., 2020) a (URL 2).</i>	16
<b>Obrázek 6: Patologie AD</b>	
<i>Vytvořeno podle (Chaudhry et al., 2020) a (URL 3).</i>	19
<b>Obrázek 7: Mechanismus aktivace neuroglií</b>	
<i>Vytvořeno podle (Brown a Bal-Price, 2003).</i>	23
<b>Obrázek 8: Neuroglie</b>	
<i>Vytvořeno podle (Snell, 2009) a (URL 3).</i>	24
<b>Obrázek 9: Mikroglióza</b>	
<i>Vytvořeno podle (Calsolaro a Edison, 2016) a (URL 3).</i>	25
<b>Obrázek 10: Role astrocytů v aktivaci mikroglíí během neuroinflamace</b>	
<i>Vytvořeno podle (Calsolaro a Edison, 2016) a (URL 3).</i>	25
<b>Obrázek 11: Buněčná linie Z310</b>	
<i>Foto Alemeh Zamani, Ph.D., Anatomický ústav LF MU.</i>	28
<b>Obrázek 12: Růstová křivka</b>	
<i>Upraveno podle (Bhatia, 2019) a (Kočárek et al., 2006).</i>	32
<b>Obrázek 13: Imunocytochemická detekce antigenů</b>	
<i>Upraveno podle (Burry, 2011) a (URL 4).</i>	35
<b>Obrázek 14: Epifluorescenční mikroskop</b>	
<i>Upraveno podle (Dobrucki a Kubitscheck, 2017).</i>	37
<b>Obrázek 15: Agregace A<math>\beta</math> v buňkách Z310</b>	
<i>Vytvořeno v GraphPad Prism 8 autorkou.</i>	39
<b>Obrázek 16: Snímky z epifluorescenčního mikroskopu zobrazující agregaci A<math>\beta</math> v buňkách Z310</b>	
<i>Vytvořeno ve FIJI a Adobe Photoshop 11 autorkou.</i>	40
<b>Obrázek 17: Porovnání agregace A<math>\beta</math> v buňkách Z310 vzhledem k inkubační době</b>	
<i>Vytvořeno v GraphPad Prism 8 autorkou.</i>	41
<b>Obrázek 18: Snímky z epifluorescenčního mikroskopu porovnávající agregaci A<math>\beta</math> v buňkách Z310 vzhledem k inkubační době</b>	
<i>Vytvořeno ve FIJI a Adobe Photoshop 11 autorkou.</i>	41
<b>Obrázek 19: Exprese cytokinů v buňkách Z310</b>	
<i>Vytvořeno v GraphPad Prism 8 autorkou.</i>	43

<b>Obrázek 20: Snímky z epifluorescenčního mikroskopu zobrazující expresi cytokinů v buňkách Z310</b>	
<i>Vytvořeno ve FIJI a Adobe Photoshop 11 autorkou. ....</i>	44
<b>Obrázek 21: Porovnání exprese cytokinů v buňkách Z310 vzhledem ke kontrolním skupinám</b>	
<i>Vytvořeno v GraphPad Prism 8 autorkou. ....</i>	44
<b>Obrázek 22: Porovnání exprese cytokinů v buňkách Z310 vzhledem ke kontrolním skupinám</b>	
<i>Vytvořeno ve FIJI a Adobe Photoshop 11 autorkou. ....</i>	45

## 12 SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1: Seznam použitých reagensí</b>	29
<b>Tabulka 2: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek</b>	30
<b>Tabulka 3: Seznam použitého laboratorního vybavení</b>	30
<b>Tabulka 4: Seznam použitých softwarů</b>	31
<b>Tabulka 5: Shrnutí použitých koncentrací buněčných suspenzí, inkubačních dob a koncentrací roztoků A<math>\beta</math> v provedených experimentech</b>	34
<b>Tabulka 6: Hodnoty intenzity fluorescence mikroskopických snímků experimentální skupiny: agregace A<math>\beta</math> při ovlivnění různými roztoky A<math>\beta</math> po inkubační době 24 h</b>	68
<b>Tabulka 7: Hodnoty intenzity fluorescence mikroskopických snímků experimentální skupiny: agregace A<math>\beta</math> při ovlivnění různými roztoky A<math>\beta</math> po inkubační době 72 h</b>	69
<b>Tabulka 8: Hodnoty intenzity fluorescence mikroskopických snímků experimentální skupiny: exprese IL-1<math>\beta</math> při ovlivnění 5 <math>\mu</math>M roztokem A<math>\beta</math> po různých inkubačních dobách</b>	70
<b>Tabulka 9: Hodnoty intenzity fluorescence mikroskopických snímků experimentální skupiny: exprese IL-10 při ovlivnění 5 <math>\mu</math>M roztokem A<math>\beta</math> po různých inkubačních dobách</b>	71

## 13 PŘÍLOHY

Z pořízených mikroskopických snímků byla určena intenzita fluorescence a následně byl vypočítán aritmetický průměr. Ze získaných dat byly poté sestaveny grafy.

<b>Agregace A<math>\beta</math></b>		
<b>24 h</b>		
<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>5 <math>\mu</math>M</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>
6216,462	4781,24	5431,1965
4516,86125	4052,852667	5455,0805
9232,0865	3203,501	16529,4485
3722,0715	2824,157	8040,162
4850,864	1629,06	3639,188
3528,512	1528,241	9573,101
6139,374	5590,195	8124,306
3292,55	7358,742333	3283,0005
2724,194	6441,772667	2665,047
4182,272	8729,756	5539,924
3103,03	3356,4665	7657,8475
3552,425	6053,654	6164,2215
4201,57	3035,499	
6470,003333	6652,6115	
2366,392	6817,96	
4909,125	11958,478	
5092,116333		
<b>4594,112289</b>	<b>5250,886667</b>	<b>6841,876917</b>

**Tabulka 6: Hodnoty intenzity fluorescence mikroskopických snímků experimentální skupiny: agregace A $\beta$  při ovlivnění různými roztoky A $\beta$  po inkubační době 24 h**

<b>Agregace A<math>\beta</math></b>		
<b>72 h</b>		
<b>1 <math>\mu</math>M</b>	<b>5 <math>\mu</math>M</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>
6350,8665	22389,652	15271,813
7619,824	10469,104	17734,095
3644,782	11308,227	6300,415
2144,257	10592,573	17995,561
5412,238	8272,665	13509,238
6303,725	13791,414	11731,933
3724,1195	5345,913	17539,275
8023,027	5287,8285	24409,548
5360,652	3700,558	12705,399
8017,397	5544,969	7047,923
10690,562	8731,257	7766,501
5827,9	17002,382	
5454,019	12049,929	
6071,411	20575,232	
11035,7635	12148,41	
8013,042	12039,982	
	13974,25	
	15695,048	
	7675,551	
	13170,981	
	14937,676	
	8334,444	
<b>6480,849094</b>	<b>11501,72934</b>	<b>13819,24555</b>

**Tabulka 7: Hodnoty intenzity fluorescence mikroskopických snímků experimentální skupiny: agregace A $\beta$  při ovlivnění různými roztoky A $\beta$  po inkubační době 72 h**

<b>Expres IL-1<math>\beta</math></b>			
<b>72 h</b>		<b>5 d</b>	
<b>Experiment</b>	<b>Kontrolní skupina</b>	<b>Experiment</b>	<b>Kontrolní skupina</b>
50771,18082	4636,185928	53786,35713	3185,688733
39332,61367	5180,898436	50909,80598	3156,208481
46566,63637	4837,194682	52237,47585	2541,302988
47360,8698	8946,615739	42143,12476	6296,58149
39859,35252	6095,393803	30611,02152	6556,637084
44888,06889	10297,68967	48882,51639	4089,075772
32086,65412	4181,234233	36108,18683	3205,690713
29884,86954	3484,227464	38124,80949	2060,373971
38700,44999	4487,527689	32935,92449	3389,148093
25954,97316		43851,76158	
32646,56469		45487,87226	
35549,50904		45790,7197	
38660,14057		54120,21324	
25234,92089		45206,47053	
34149,94962		43895,60376	
33749,15908			
65993,67639			
50899,357			
37342,85828			
<b>39454,3055</b>	<b>5794,107516</b>	<b>44272,7909</b>	<b>3831,189703</b>

**Tabulka 8: Hodnoty intenzity fluorescence mikroskopických snímků experimentální skupiny: exprese IL-1 $\beta$  při ovlivnění 5  $\mu$ M roztokem A $\beta$  po různých inkubačních dobách**

<b>Expres IL-10</b>			
<b>72 h</b>		<b>5 d</b>	
<b>Experiment</b>	<b>Kontrolní skupina</b>	<b>Experiment</b>	<b>Kontrolní skupina</b>
19341,558	3136,339	28971,632	4457,134333
8161,001333	3063,21	22773,651	4475,858333
18014,84167	2744,708	27446,867	2146,584333
10231,623	2649,111	43971,5065	1712,434
13329,14	3599,026	37034,185	2153,304
13617,428	4019,08	30137,1455	2644,734
7266,618	3822,147333	24106,3215	2879,163667
13190,442	1574,962	44296,56333	1702,363667
10487,10733	3192,28	26843,72733	3004,361667
12793,83533	3373,784	26268,28467	
9026,7515	2225,641	29199,927	
12336,0395	3916,288667	17574,108	
8327,773	1595,884667		
17866,751	3474,816333		
9917,1205	3731,118667		
17203,1905			
<b>12569,45129</b>	<b>3074,559778</b>	<b>29885,32657</b>	<b>2797,326444</b>

**Tabulka 9: Hodnoty intenzity fluorescence mikroskopických snímků experimentální skupiny: exprese IL-10 při ovlivnění 5  $\mu$ M roztokem A $\beta$  po různých inkubačních dobách**