

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Sledování imunitní odpovědi u transgenního miniprasečího modelu Huntingtonovy nemoci

Zdeňka Olšovcová

Ústecký kraj

Lovosice 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

**Sledování imunitní odpovědi u transgenního
miniprasečího modelu Huntingtonovy nemoci**

**Monitoring of the immune response in a transgenic
minipig model of Huntington's disease**

Autoři: Zdeňka Olšovcová

Škola: Gymnázium Lovosice, Sady pionýrů 600/6, 41002 Lovosice

Kraj: Ústecký kraj

Konzultanti: doc. MUDr. Jiří Klempíř, Ph.D., Mgr. Ivona Valeková,
Ph.D.

Lovosice 2025

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 Lovosicích dne 27.2

Zdeňka Olšovcová

Poděkování

Zde bych chtěla poděkovat těm, kteří se mi věnovali při bádání, bloudění a následnému porozumění problematiky Huntingtonovy nemoci a její imunitní odpovědi. Zejména velké díky patří doc. MUDr. Jirí Klempíři, Ph.D. a Mgr. Ivoně Valekové, Ph.D. za neuvěřitelnou trpělivost, ochotu a dobrou spolupráci.

Vážím si i pomoci, kterou mi poskytla moje třídní učitelka Ing. Andrea Drašnarová, Ph.D. a mojí rodině za psychickou podporu

Anotace

Tato práce se zabývá problematikou spjatou s Huntingtonovou nemocí (HN). HN je autozomálně dominantní dědičné onemocnění s fatálním průběhem, které se projevuje hybnými a psychickými poruchami a demencí. Cílem této práce je poukázat na význam metod, kterými je HN studována na transgenních zvířecích modelech. Mezi tyto metody patří Luminex a průtoková cytometrie.

Tyto metody byly aplikovány a poukazují na aktivovanou imunitní odpověď. Využitím Luminexu jsme pozorovali zvýšené hladiny u prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů. Pomocí průtokové cytometrie jsme charakterizovali imunitní buňky, což přispívá k lepšímu pochopení imunitní reakce v průběhu HN.

Klíčová slova

Huntingtonova nemoc, transgenní miniprasečí model, Luminex, průtoková cytometrie, cytokiny, imunitní buňky

Annotation

This work deals with issues related to Huntington's disease (HD). HD is an autosomal dominant neurodegenerative disease with a fatal course, which is manifested by motor, psychiatric disorders, and dementia. The aim of this study is to highlight the importance of methods used to investigate HD in transgenic animal models. These methods include Luminex and flow cytometry.

These methods have been performed and indicate an activated immune response. Using Luminex, we observed increased levels of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Flow cytometry was used to characterize immune cells populations.

Keywords

Huntington's disease, transgenic minipig model, Luminex, flow cytometry, cytokines, immune cells

Obsah

1	Úvod	12
2	Huntingtonova nemoc.....	13
2.1	Historie nemoci a první diagnostika.....	13
2.2	Epidemiologie	14
2.3	Etiologie	15
2.4	Huntingtin a centrální nervový systém	17
2.5	Příznaky.....	18
2.6	Průběh Huntingtonovy nemoci.....	19
2.7	Formy HN	19
2.7.1	Klasická forma	19
2.7.2	Juvenilní forma	19
2.7.3	Forma s pozdním počátkem	20
2.8	Výzkum	20
2.9	Zvířecí modely	20
2.9.1	Myší modely	21
2.9.2	Ovčí model.....	24
2.9.3	Model pro primáty	24
2.9.4	Prasečí model	25
2.9.5	Proteomické studie u Huntingtonovy nemoci.....	26
3	Imunologie a neuroimunologie.....	28
3.1	Historie imunologie a počátky neuroimunologie	28
3.2	Imunitní systém pacientů s Huntingtonovou nemocí.....	29
3.3	Neuroglie	30

3.3.1	Mikroglie.....	31
3.3.2	Astrocyty.....	33
3.3.3	Oligodendrocyty	34
3.4	Cytokiny.....	35
3.4.1	Prozánětlivé cytokiny.....	35
3.4.2	Protizánětlivé cytokiny	35
3.4.3	Cytokiny a Huntingtonova nemoc	36
4	Praktická část.....	37
4.1	Experiment číslo 1.....	37
4.1.1	Metody a soubory	37
4.1.2	Stanovení hladiny cytokinů.....	52
4.1.3	Statistická analýza.....	52
4.1.4	Výsledky analýzy mozkomíšního moku.....	53
4.1.5	Interpretace výsledků detekce cytokinů v mozkomíšním moku a diskuse ...	56
4.1.6	Výsledky analýzy plazmy	57
4.1.7	Detekce cytokinů v plazmě a interpretace jejich výsledků.....	58
4.1.8	Shrnutí.....	58
4.1.9	Badatelský výhled.....	59
4.2	Experiment číslo 2.....	60
4.2.1	Metody a soubory	60
4.2.2	Průtoková cytometrie a její specifika pro praktickou práci	69
4.2.3	Analýza výsledků.....	70
4.2.4	Výsledky průtokové cytometrie.....	72
4.3	Interpretace výsledků	79

5.2.6	Shrnutí.....	81
5.2.7	Badatelský výhled	81
5	Závěr.....	82
6	Použitá literatura a zdroje	83
7	Seznam obrázků.....	94
8	Seznam tabulek.....	97

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
HN	Huntingtonova nemoc
CNS	Centrální nervový systém
CAG	Cytozin-adenin-guanin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DZNE	German Center for Neurodegenerative Diseases
Htt	Huntingtin
fHtt	Fyziologický huntingtin
mHtt	Mutovaný huntingtin
M1	Fenotyp mikroglíí číslo 1 tzv "klidové mikroglie"
M2	Fenotyp mikroglíí číslo 2 tzv "aktivované mikroglie"
ROS	Oxidativní stres
PU1 enhancer	One-part-unit enhancer
CCAT enhancer	Colon Cancer Associated Transcript enhancer
NF- κ B signalizace	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

JAK/STAT signalizace	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
DAMs	Disease associated mikroglia
MGnD	Mikroglial neurodegenerative phenotype
RAM	Proliferative associated mikroglia
pH	Potential of Hydrogen (potenciál vodíkových iontů)
GFAP	Glialního fibrilárního acidického proteinu
TNF	Tumor necrosis factor
TGB- β	Transforming growth factor β
INF-x	Interferon x
IL-x	Interleukin x
PBMCs	Izolace mononukleárních buněk periferní krve
CSF	Mozkomíšní mok
WT	Wild type (kontrolní vzorek)
TG-HD	Transgenní model Huntingotonovy nemoci
STD 0	Standardizovaný kalibrační lyofilizát

QC1, QC2	kontroly
PE	Fykoerythrin
FITC	Fluorescein isothiocyanate
AF647	Alexa Fluor 647
NK buňky	Natural killer cells
PBS	Fosfátový pufr
DMEM-F12	Kultivační médium
FBS	fetálním bovinním sérem
RBCs	Granulocyty a erytrocyty
CDx	Cluster of Differentiation, Surface markers of cellular differentiation
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

1 ÚVOD

Vždycky jsem se zajímala o biologii a přemýšlela jsem, jaká by měla být oblast, na kterou bych se chtěla v budoucnu zaměřit. Zjistila jsem, že se chci alespoň částečně podílet na výzkumu, který může mít zásadní vliv na kvalitu života velkého množství lidí po celém světě. Když se mi naskytla možnost spolupracovat s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. v oblasti imunologie, neváhala jsem.

Imunologie je dynamický vědní obor, který se zabývá imunitní odpovědí organismů. Ta představuje imunitní procesy, které probíhají fyziologicky. Imunitní procesy se podílejí na patofyziologii různých onemocnění. Tyto procesy hrají roli i u neurodegenerativních onemocnění. Mezi neurodegenerativní nemoci se řadí i Huntingtonova nemoc. Huntingtonova nemoc je závažné geneticky přenosné onemocnění s fatálním průběhem. Dnes neumíme přes pokročilou úroveň vědeckého výzkumu progresi nemoci ovlivnit, pouze tlumit některé příznaky pacientů. Pro studium nejen těchto typů onemocnění často využíváme zvířecí modely, které umožňují studium patofyziologie a hledání nových terapeutických postupů.

Hlavním cílem je sledování imunitní odpovědi modelových organismů pro HN, která je významná pro hlubší pochopení mechanismů HN. Funkce a procesy, do kterých se protein Htt zapojuje, jsou klíčové pro vývoj vhodné terapie pro osoby s HN.

Dalším cílem mé středoškolské odborné činnosti je naučit se vědeckým postupům. Vyzkoušet si přípravu biologických vzorků (plazma, sérum, mozkomíšní mok), izolovat imunitní buňky, diferenciovat cytokinové subpopulace a analýzu dat.

K dosažení těchto cílů byly stanoveny následující kroky experimentální části:

- Příprava plazmy, séra
- Zpracování mozkomíšního moku
- Izolace imunitních buněk z krve
- Charakterizace imunitních buněk
- Interpretace a diskuze výsledků

2 HUNTINGTONOVA NEMOC

„Huntingtonova nemoc (HN) je autozomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění s fatálním průběhem“ [1]. HN postihuje dominantně centrální nervový systém (CNS).

HN je způsobena mutací pro protein huntingtin (Htt). Fyziologicky je Htt důležitý pro vývoj CNS, krvetvorbu a embryonální vývoj. Při mutaci dochází k nadměrnému zmnožení počtu CAG tripletů, což vede k vzniku mutovaného proteinu s odlišnými vlastnostmi. HN se projevuje nejčastěji ve 4. dekádě života zejména mimovolnými pohyby, poruchami řízení cílené hybnosti, chováním a změnami intelektu [8].

2.1 Historie nemoci a první diagnostika

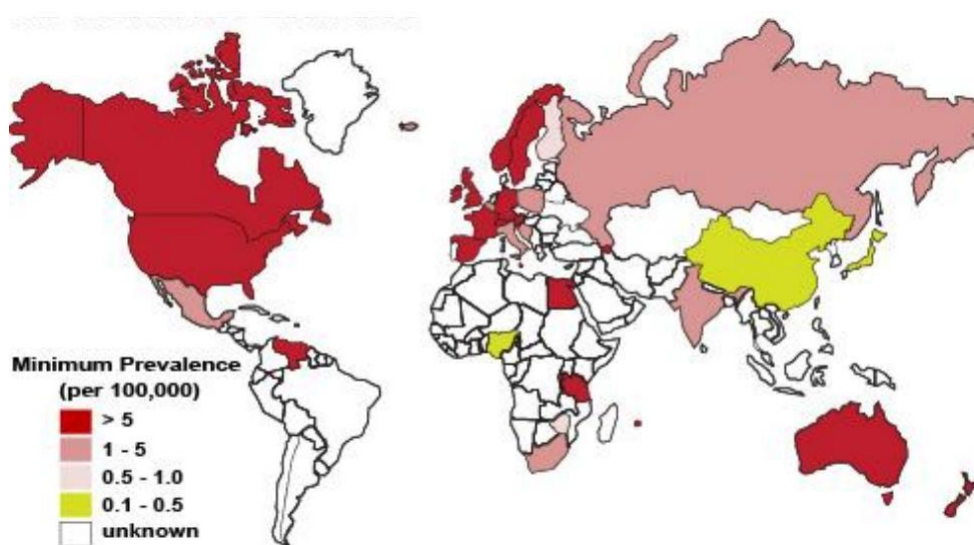
Za oficiálním uznáním této nemoci stála publikace 22letého praktického lékaře Jamese Huntingtona. Ten ve svém díle popsal základní charakteristiku onemocnění, které se vyskytovalo v okolí East Hampton, Long Island. Jeho rodinní příslušníci se v dané oblasti po dvě generace věnovali lékařské činnosti, a právě díky jejich záznamům měl James Huntington k dispozici nejen své poznatky, ale i dostatečně velké množství materiálů z posledních 78 let. Tyto zdroje poté využil k shrnutí symptomů HN. Ve své práci z roku 1872 poukazuje na dědičný ráz nemoci, fatální průběh, počátek v dospělosti, poruchu hybnosti, změny chování a demenci. Nejedná se však o první zmínku HN. Jeho předchůdci psali, i když ne tak detailně, o této chorobě několik desetiletí před Jamesem Huntingtonem. Roku 1860 norský lékař, Johan Christian Lund, publikoval své poznatky s obdobnými příznaky. Jeho dílo se bohužel nerozšířilo, protože bylo vydáno v norštině. Za nejstarší záznam můžeme považovat publikovaný dopis z roku 1842, kde se Charles Oscar Water věnuje nemoci, která značně připomíná HN [1].

Chceme-li se podívat do hlubších dějin této nemoci, tak se dostaneme až do 15. století, kde nalézáme původ slova, které je užíváno hojně v rámci terminologie spjaté s HN. Hovoříme zde o slovu chorea. Chorea je odborný pojem, který poprvé použil Paracelsus při popisu nekoordinovaného pohybu končetin a trupu připomínající tanec. Svou definicí spíše referoval na úkaz zvaný tanec sv. Víta. Svou prací poukazoval na „taneční mánii“ ze 14. století, při kterých se z neznámých důvodů zejména obyvatelé měst uchýlili k tanci, s kterým nemohli přestat. Údajně se někteří občané utančili k smrti. Pojem byl později používán mylně, díky Paracelsusovu popisu, i pro osoby s neurodegenerativními nemocemi a zůstal s nimi spjat i do současnosti. Proto se někdy setkáváme s pojmem tanec sv. Víta i u HN. Dnes se experti domnívají, že je velmi pravděpodobné díky pohybovým projevům nemoci, že lidé s HN byli oběťmi procesů s čarodějnicemi nebo rituálů vymítání d'ábla [1]. Existují teorie, že v 15. století došlo k rozšíření nemoci právě migrací několika osob z Východní Anglie do USA. Daný předpoklad byl potvrzen. Do dalších oblastí se následně měla HN dostat v rámci přesunu vězňů

do Austrálie [12]. První zmínka o jiných manifestaci HN (juvenilní formě HN) pochází z roku 1883 od neurologa Karla Friedricha Westphala a 1888 došlo k zpřesnění její charakteristiky díky neurologovi Hoffmanovi [11]. Jelgersma v 20. století pozoroval atrofii mozku. O několik let později se poprvé objevuje myšlenka o autozomálně dominantním přenosu choroby od Davenporta [12]. Experti považují za přelomový okamžik ve výzkumu HN 50. léta 20. století, kdy praktický lékař Americo Negrette objevil v Jižní Americe ohnisko HN. Jednalo se o malé izolované společenství s populací cca 10 000 obyvatel u jezera Maracaibo, kde se zaznamenalo potvrzených 1000 osob s HN. Ze vzorků krve z této oblasti byla poprvé v roce 1983 lokalizována a 1993 izolována genetická mutace způsobující tuto chorobu [12].

2.2 Epidemiologie

Celosvětový výskyt je udáván okolo 5 – 10:100 000 obyvatel. Na poměry ostatních nemocí se jedná o malé číslo, ale je důležité zmínit, že četnost jedinců s HN je globálně velmi různorodá. V některých oblastech Asie, kde nedocházelo a dodnes nedochází k masivnímu globálnímu mísení z kulturních důvodů, pozorujeme výskyt podstatně snížený. Mezi tyto země spadá například Japonsko a Čína. S obdobným jevem se setkáváme v Africe [12].



Obr. 1. Prevalence výskytu HN ve světě; převzato [7].

Nejproblematictější se jeví Evropa, Austrálie, Jižní i Severní Amerika (viz Obr.č.1).

Tomuto rozšíření se přisuzuje původ v přenosu mutace z Východní Anglie v souvislosti s migrací, která byla pravděpodobně zapříčena ekonomickou a politickou situací dané země. Historický předpoklad je podpořen pozorováním v průměrné délce řetězce nukleotidů. Například v západní Evropě, kde je průměrný řetězec rozšířen o 15 – 20 CAG tripletů, se nacházejí lokality, kde se hovoří i o četnosti 15:100 000 [12]. Naopak v Německu se

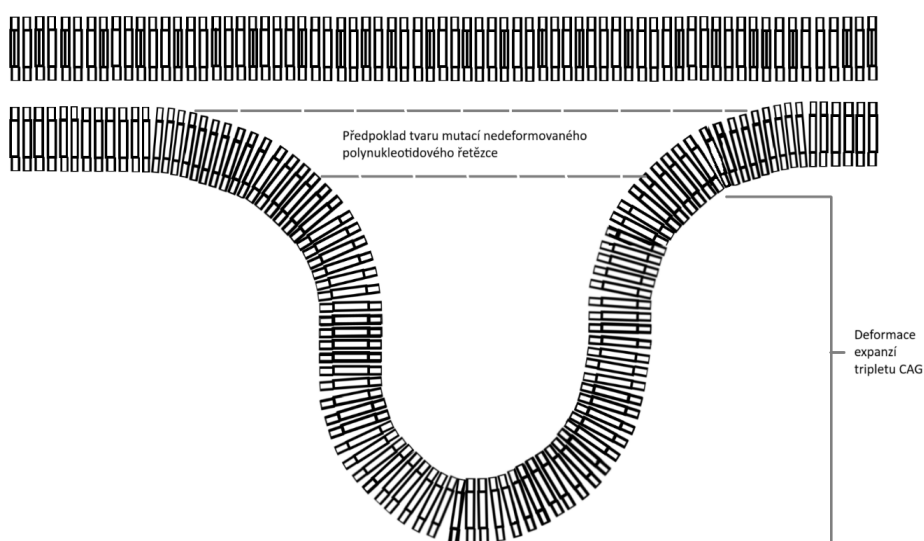
pravděpodobnost k výskytu nemoci značně snížila právě vlivem genetické čistky za druhé světové války.

Největší hustota výskytu HN se nachází v Jižní Americe, ve státě Venezuela. V dané části kontinentu se nachází u jezera Maracaibo epicentrum HN. Jedná se o souhrn malých vesniček rozestých kolem daného jihoamerického jezera. V této uzavřené společnosti, kde žije přibližně 1000 lidí s klinickými projevy HN a 3000 dalších se jich nachází v presymptomatickém stádiu, se nemoc rozsáhle rozšířila, kvůli sociální izolovanosti dané oblasti, chudobě, nedostatečné zdravotní péči a strachu z nemoci, který vedl k uzavírání manželských sňatků mezi rodinnými příslušníky [12]. Původ rozšíření v této oblasti přisuzujeme námořníkovi, který zde žil v roce 1830 [12]. Četnost HN se obecně bude dle odborníků jen zvyšovat. Tento jev můžeme přisuzovat autozomálně dominantnímu charakteru nemoci. Kvůli celosvětově stoupající populaci a schopnosti, předávat se geneticky u zasažených rodin s pravděpodobností 50 % jak u muže, tak i u ženy, můžeme očekávat větší celosvětovou prevalenci.

Na našem území se prevalence odhaduje okolo 700 – 1 000 nemocných s HN a přes 4 000 – 5 000 osob v riziku onemocnění [14]. Tyto čísla jsou ovšem v ČR jen orientační.

2.3 Etiologie

HN je geneticky vázané onemocnění, které je způsobeno mutací genu pro protein huntingtin (Htt) na krátkém raménku 4. chromozomu. Podstata mutace spočívá v nadměrném opakování tripletu obsahující cytozin-adenin-guanin (CAG), v tzv. zmnožení nebo expanzi CAG tripletu (viz obr. č. 2). Při hodnotách 40 a více CAG repetice dochází obvykle k rozvoji HN. Kombinace CAG v DNA kóduje aminokyselinu glutamin. Díky nadměrnému zmnožení CAG nazýváme HN polyglutaminovým onemocněním. Změna v uskupení DNA způsobí negativní změny u navazujících biochemických procesů. Například běžná syntéza bílkovin produkuje pozměněné, špatně smotané proteiny, které mají toxický charakter. U HN je tímto způsobem ovlivněn

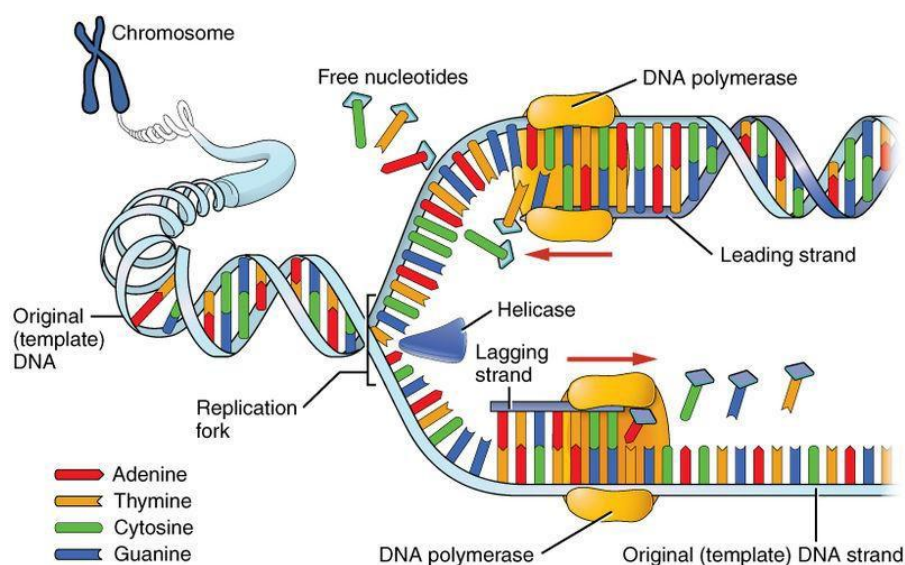


Obr. 2. Model řetězce a mutací; vlastní tvorba

protein, který se nazývá fyziologický huntingtin [15]. V mutované formě huntingtin oligomerizuje a agreguje v neuronech. Produkty těchto procesů narušují buněčné funkce v mozku. Mezi procesy, které jsou zásadně ovlivněny, patří například transport proteinů, oprava buňky, degradace a regulace tvorby proteinů. Tyto změny následně narušují komunikaci mezi

jednotlivými nervy. Další následky zahrnují mitochondriální toxicitu a zhoršení axonálního transportu, za který je fHtt zodpovědný [15]. Mechanismus celkové choroby nelze jednoznačně popsat. Dodnes máme pouze nejasnou představu o reálném principu choroby

Princip vzniku genetické mutace leží v procesu zvaném replikace DNA, kdy dochází k přerušení vodíkových můstků mezi bázemi nukleotidů (Adenin (A), Guanin (G), Cytosin



Obr. 3. Model replikace DNA; převzato [39].

(C) a Thymin (T)) díky enzymu helikáza. Rozpletení vazeb vytvoří dvě samostatná dceřiná vlákna, která slouží jako templát, předloha. Podle této předlohy se začne vystavovat komplementární báze z volně vyskytujících se nukleotidů [3]. Na jednotlivých polynukleotidových řetězcích se tedy pomocí enzymu DNA polymeráza začne vytvářet druhé komplementární vlákno [2]. (Viz obr. č. 3)

V tomto momentu, za normálních podmínek, dochází k téměř přesnému zkopírování celé DNA. V případě HN se však dopustí enzym DNA polymeráza chyby. Z nám dodnes nejasných důvodů se totiž při replikaci enzym DNA polymeráza zacyklí a opakovaně připojuje jeden triplet na vznikající polynukleotidový řetězec. Toto prodloužení řetězce vede k chybám v navazujících biochemických procesech.

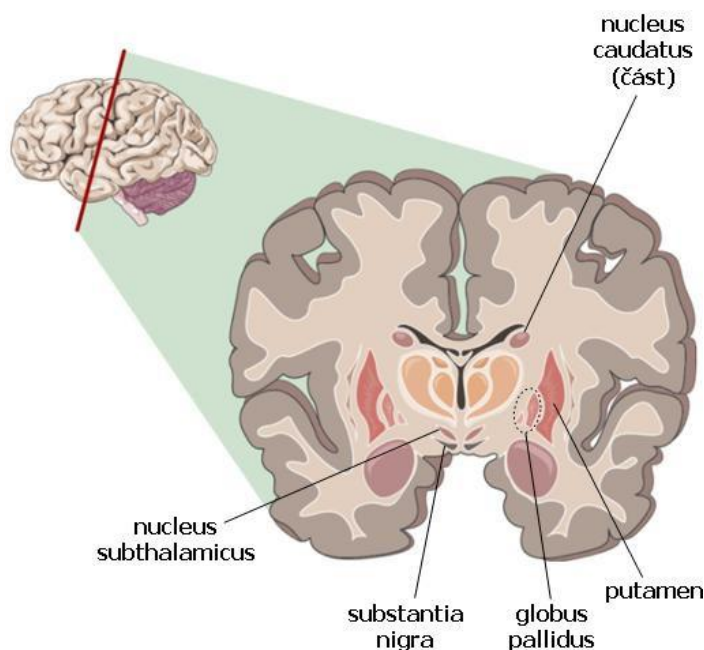
Během exprese mHtt dochází k akumulaci dvou řetězcových zlomků v nervových buňkách, což zapříčiňuje degenerativní procesy v CNS jedince [91]. Tyto zlomky představují cytotoxického činitele v CNS. Jejich působení přispívá v patogenezi HN.

Huntingtin

Huntingtin je protein s 3144 aminokyselinami o hmotnosti 350 kDa, který najdeme ve všech tkáních lidského těla [16,18]. Fyziologický huntingtin (fHtt) je velmi významný pro nervové buňky [17]. Jeho přesná role v nervové soustavě nám bohužel ještě není známa, ale vědci se domnívají, že se podílí na axonálním transportu, což je proces, při kterém se šíří vzruch na neuronech. Tento děj hraje zásadní roli při výživě buňky, udržování organel a váčků v buňce [95]. Zasahuje také do transportu látek a přichycení proteinů, ochrany buňky před sebezničením, tzv. apoptóze [17, 7, 74]. Mutovaný huntingtin (mHtt) má odlišné strukturální a funkční vlastnosti. U HN dochází k změně uskupení a vlastností tohoto proteinu. Mutovaný huntingtin je považován za toxický a kumuluje se v nervových buňkách, což zapříčiňuje degenerativní procesy v CNS jedince.

2.4 Huntingtin a centrální nervový systém

Huntingtin (Htt) se fyziologicky vyskytuje ve všech buňkách lidského těla, avšak mutovaný



Obr. 4. Anatomický obrázek bazálních jader; převzato [19].

huntingtin (mHtt) přednostně postihuje centrální nervový systém [99, 85]. První morfologické a funkční změny probíhají v tzv. bazálních gangliích. Jsou to skupiny nervových buněk uložených v hloubi mozkových hemisfér (viz obr. č. 4). [20]. Bazální ganglia lze anatomicky rozdělit na tři základní části: *Nucleus caudatus*, *putamen* a *globus pallidus* [19]. *Globus pallidus* se skládá z vnitřních a vnějších segmentů [32]. *Putamen* tvoří vnější část bazálních ganglií a je od *nucleus caudatus* odděleno bílou hmotou (nervovými drahami). Proto na řezech mozku jsou patrné šedavé a bílé proužky. *Putamen* společně s *nucleus caudatus* tvoří *striatum* [22].

Významnou částí bazálních ganglií je tzv. *substantia nigra*, které se skládá ze dvou podjednotek. První úsek se nazývá *substantia nigra pars compacta*. Obsahuje nervové buňky produkující neurotransmitter dopamin, který je klíčový pro motorické funkce. Druhý úsek, *substantia nigra reticulata*, obsahuje GABAergické neurony, které jsou silně ovlivněny degenerativními procesy u HN. Ve striatu tvoří GABAergní neurony 90 % z celkového počtu neuronů [32]. Pojem *nucleus lentiformis* se souhrnně používá pro *putamen* a *globus pallidus*. *Nucleus caudatus* je jádro podkovovitého tvaru, které zastává mnoho důležitých funkcí [21]. Obecně můžeme jeho funkce vztáhnout k zajištění komunikaci mezi mozkovou kůrou a mozkovým kmenem. Jeho degenerace negativně ovlivňuje svalové napětí, koordinaci pohybů, vzpřímený postoj, chování a kognitivní funkce.

2.5 Příznaky

HN se projevuje poruchami chování, hybnosti a intelektu. [4]. Psychiatrické příznaky jsou rozmanité a projevují se mnohem dříve než motorické projevy [8]. Prvním symptomem bývá často změna osobnosti. Mnohdy se jedná o změně zájmů a priorit. Může se jednat o polarizaci koníčků nebo o náhlý obrat v pečování, ve vlastních zájmech a potřebách. Nemocní se často

začínají projevovali tzv. sobecky vůči ostatním. Běžné je zanedbávání péče o svůj vzhled nebo o své zaměstnání. S postupem nemoci se více zvyrazňují negativní rysy osobnosti, jako je podrážděnost, která může přerůst ve slovní až fyzickou agresi. Vzácný není také nikotinismus a abusus dalších návykových látek, zejména alkoholu [1]. Někteří pacienti se dopouštějí drobných kriminálních deliktů (krádeže, rvačky). Někteří nedorozumění a konflikty vznikají, protože nemocní mají problémy s rozpoznáním negativních emocí a výrazů v tvářích ostatních osob. U pacientů s Huntingtonovou nemocí se běžně vyskytují úzkostné a depresivní stavy. Deprese je rizikovým faktorem pro sebevražedné myšlení a jednání. Sebevraždy jsou u nemocných s HN častější v porovnání s běžnou populací. [9]. V raných stádiích HN se občas můžeme setkat s hypersexualitou a sexuálně provokativním chováním. V pokročilých stádiích se mohou vyskytnout i halucinace, bludy a stavy dezorientace (delirium).

Nemoc ovlivňuje i kognitivní funkce. V počátečních stádiích se projevuje poruchami soustředění, paměti, schopností učit se nové dovednosti, zapomínáním, nezvládnutím více činností současně. Tyto kognitivní deficity často vedou k pocitům frustrace a společně s poruchami chování ke ztrátě zaměstnání a k problémům v rodinných vztazích. Z neurologického hlediska je nejvýznamnějším příznakem chorea. Chorea je typický pojem spojený s HN, který označuje mimovolní cukavé pohyby připomínající tanec. Název pochází z řeckého slova „choros“ (tanec) a latinského „chorea“ [7]. Pro HN jsou typické rychlé, náhodné a mimovolní záškuby kosterního svalstva. Protože připomínají tanec, nazýváme je choreou. Tyto pohyby bývají pro pacienty mnohdy velmi invalidizující, přičemž nejvíce zasahují schopnost řídit cílené motorické činnosti. Projevují se jako poruchy srozumitelnosti řeči, obtížemi s polykáním a dýcháním, neobratností rukou, poruchami stability stoje a chůze.

2.6 Průběh Huntingtonovy nemoci

Neurodegenerativní procesy u nositelů mutace HN probíhají velmi pomalu. Bylo prokázáno, že k prvním změnám v mozku dochází až patnáct i více let před nástupem motorických poruch. Změny osobnosti, poruchy chování a kognitivních funkcí se rovněž objevují dříve než poruchy hybnosti. Z počátku mohou poruchy hybnosti připomínat pouze nešikovnost a nervozitu. S progresí nemoci se vyčerpávají kompenzační mechanismy a pacient se stává více a více závislým na pomoci druhých osob. Ve velmi pokročilých stádiích jsou pacienti ležící, nekomunikující a trpí těžkou demencí. Nejčastější příčinou úmrtí je zápal plic.

2.7 Formy HN

HN se vyskytuje ve třech formách [30]. Bylo prokázáno, že počet CAG tripletů v genu Htt může výrazně ovlivňovat věk nástupu a charakter progresse nemoci. Obecně lze konstatovat, že vyšší počet tripletů je spojen s dřívějším nástupem nemoci a rychlejším průběhem její progresse.

2.7.1 Klasická forma

Za nejčastější formu HN považujeme tu, která začíná mezi 35. a 50. rokem života. Jedná se o formu, kdy se na krátkém raménku 4. chromozomu nachází 42 až 45 repetitivních CAG tripletů. Tato hranice je jen orientační. Po propuknutí motorických poruch se průměrná délka přežití odhaduje na 15–20 let [12]. Demence se obvykle objevuje až v pozdním stádiu onemocnění.

2.7.2 Juvenilní forma

V méně častých případech dojde k extrémnější expanzi (více než 50 CAG tripletů), která vede k urychlení projevů nemoci. Větší počet tripletů se častěji dědí po otcích. Uvádí se, že se HN v těchto případech projeví před dosažením 21 let a označuje se jako juvenilní forma HN, někdy také jako Westphalova varianta [10]. U této formy nemocní většinou nemají choreatické pohyby; z mimovolných pohybů se objevuje tzv. dystonie, která zahrnuje pomalé stereotypní pohyby nebo nepřírozené polohy trupu a končetin. Cílené pohyby jsou zpomalené. Mohou se vyskytovat epileptické záchvaty. Kognitivní schopnosti se velmi rychle zhoršují, což často znemožňuje pokračování ve studiu. Spolu s poruchami chování (halucinace, bludy) mohou příznaky svým charakterem připomínat schizofrenii. Juvenilní forma HN představuje přibližně 8–10 % všech pacientů s HN [11].

2.7.3 Forma s pozdním počátkem

Tato forma HN je charakteristická pozdním nástupem. Prvotní symptomy se začínají projevovat po 60. roku života, ale je možné předpokládat, že začátky drobných příznaků mají mnohem dřívejší počátek. Progrese onemocnění je velmi mírná. Nemocní se dožívají průměrného věku zdravé populace [1]. Hlavní příznak představuje chorea, která je méně intenzivní, ale jinak podobná jako u klasické formy HN. Pacienti jsou omezeni v každodenních aktivitách jen minimálně. Rozvoj demence je ve srovnání s ostatními dvěma formami mnohem méně výrazný [7]. Tento pomalejší průběh je odůvodňován nízkým počtem CAG tripletů (36-40).

2.8 Výzkum

Celosvětové úsilí prozkoumat buněčnou degeneraci a patologické mechanismy HN zatím přineslo jen omezené výsledky. Vědci doposud nevyvinuli kauzální terapii, protože přesný mechanismus onemocnění stále není detailně popsán. Odpovědi na tyto otázky jsou však zásadní pro statisíce pacientů po celém světě. Naději přináší výzkum patofyziologických mechanismů nemoci na zvířecích modelech, který může přispět k vývoji nových terapeutických přístupů.

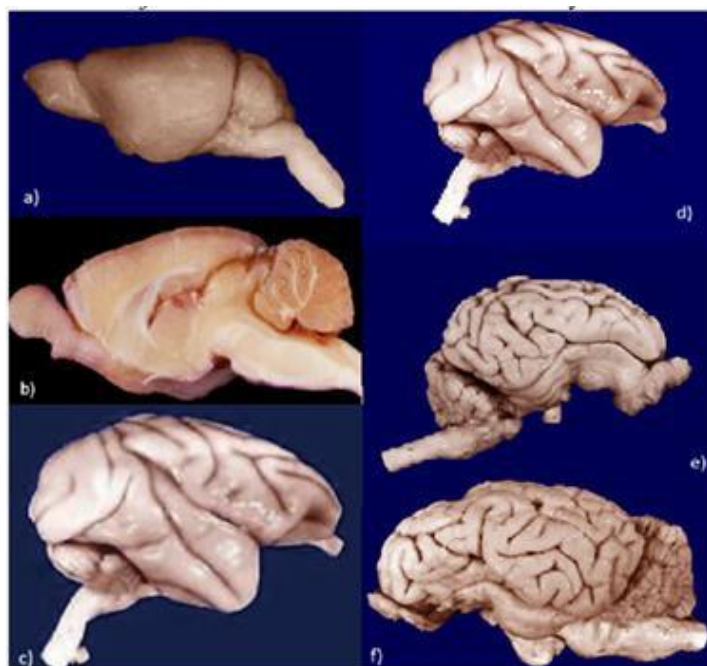
2.9 Zvířecí modely

Velmi důležitým aspektem k vytváření modelů HN je téměř neměnný charakter fHtt [23]. Pro studium HN jsou používány různé druhy zvířecích modelů. Z nižších organismů jsou

nejčastěji používány háďátka (*C. elegans*) a octomilky (*Drosophilla melanogaster*). Existují však i buněčné modely, které umožňují detailnější zkoumání jednotlivých mechanismů a zároveň doplňují *in vivo* výsledky [90]. Jako velmi perspektivní se jeví savčí modely. Přesto se nemůžeme zcela spoléhat na výsledky ze zvířecích modelů. Výsledky z těchto modelů nelze přenášet přímo, protože ontogeneze jednotlivých savčích druhů se výrazně liší (viz obr.č.5, 6).

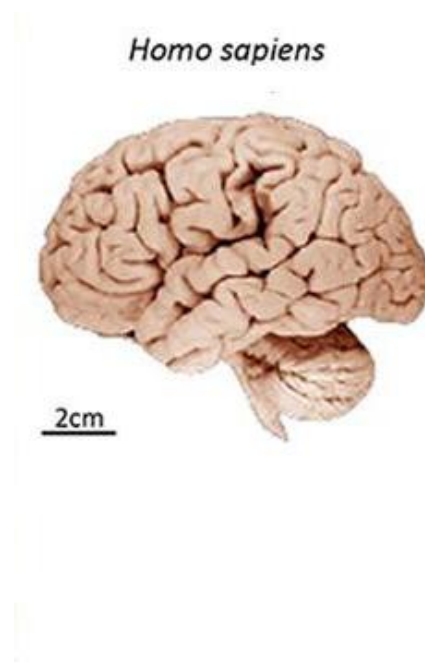
Informace získané z výzkumu na zvířecích modelech jsou však nepostradatelné jak pro pochopení principů nemoci, tak pro vývoj léčiv. Na celém světě se vyskytují nesčetné instituty a výzkumné programy zabývající se touto tematikou. Mezi nejvýznamnější patří například Harvard Medical School a Johns Hopkins University v USA. V Německu se této otázce věnuje German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) a Max Planck Institute of Neurobiology. Španělský Institute of Neurosciences v Barceloně nebo australská Univerzita v Melbourn současně patří na seznam pracovišť, které se zajímají o HN. V České republice se rovněž nachází specializovaná střediska. Jedním z nich je Ústav živočišné fyziologie a genetiky

Akademie věd České republiky v Liběchově, který se zaměřuje na výzkum pomocí zvířecích modelů a sídlí ve Středočeském kraji [24].



Obr.5

Obr. 6. Porovnání mozků zvířat, u kterých existují předpoklady, že by se mohly použít pro modely neurodegenerativních nemocí: a) myš domácí (*Mus musculus*), b) potkan (*Rattus norvegicus*), c) kosman bělovousý (*Callithrix jacchus*), d) makak rhesus (*Macaca mulatta*)



Obr.6

Obr. 5. Mozek člověka; převzato a upraveno [70].

2.9.1 Myší modely

Tvorba genetických zvířecích modelů pro HN pomocí transgenní technologie, při které je do genomu zvířete vložen nový gen nebo fragment genu (mHtt) náhodně, představuje efektivní přístup. Tento model umožňuje rychlou tvorbu zvířecích modelů s vloženým genem, ale regulace exprese vloženého genu může být méně přesná, což může ovlivnit biologické procesy a projevy nemoci. Naopak, knock-in technologie umožňuje vložení mutovaného genu přímo na specifické místo v genomu myši, což poskytuje lepší kontrolu nad expresí genu a přirozenější regulaci.

Používání myších modelů má ovšem své omezení. Genetickou povahou se HN liší, přičemž lidský mozek je na mnohem vyšší vývojové úrovni než myši. Životný cyklus hlodavců je mnohem kratší a progres nemoci mnohem rychlejší než u lidí. U myši se průměrná délka života pohybuje okolo 1,5 roku a v zajetí činí 2 až 4 roky [29]. Například v ČR je průměrná délka života mužů okolo 76let a u žen 82let [28]. Navzdory těmto omezením poskytují myší modely cenné informace o mechanismech nemoci.

Linie R6/2

Nejstarším a zároveň nejpoužívanějším transgenním modelem k výzkumu HN se stal model R6/2. Jedná se o model, který byl vytvořen v roce 1996, za využití lidského genu IT15 [23]. Základ konstrukce R6/2 modelu spočívá v začlenění 3 kopií fragmentu, které obsahovaly informace o exonu 1 lidského mutovaného mHtt [25]. Ze vzniklého řetězce se poté odstranily dvě okrajové kopie. Konečný lineární úsek následně tvořil gen s repetitivní sekvencí obsahující 144 tripletů o velikosti 1,9 kb [23] (viz obr.č.7). Díky masivní expanzi genu v tomto modelu dochází k urychlení progresu HN. Nástup prvních příznaků se projevil kolem 9.-10. týdnu života. K mortalitě myši docházelo mezi 10.-13. týdnem jejich života. Vzhledem k tomu, že myši nedosáhly dospělosti, můžeme jejich stav přirovnat k juvenilní formě HN. Typickými projevy nemoci u R6/2 myši jsou specifické motorické poruchy. Objevuje se zde chorea, třes, mimovolné pohyby, dyskineze při držení předmětů [25]. Zajímavostí je také výskyt epilepsie a v pozdějších stádiích i diabetes [25]. Neurodegenerace začíná v *striatum* a postupně se rozšíří do *globus pallidus*. V průběhu degenerace neuronů dochází ke tvorbě intranukleárních inkluzí v buňkách zasažených částí bazálních ganglií. Myši modelu R6/2 se chovají obezřetně, zvýšeně opatrně a zvědavě. Taktéž se zde projevuje významný úbytek váhy R6/2 myši. Ve srovnání s jejich zdravými sourozenci se může jednat o 60-70% celkové hmotnosti [25].



Obr. 7. R6/2 myší model; červeně zvýrazněná část určuje genom s 144 CAG expanzí; převzato [25].

Linie R6/1

Myší model R6/1 byl vytvořen na stejném principu jako R6/2, ale s menším počtem repetitivních tripletů CAG a jen s jednou kopií fragmentu obsahujícího exon 1 lidského mHtt. Tentokrát prodloužení genu činilo jen 116 tripletů CAG (viz obr.č.8). Propuknutí nemoci je v důsledku snížení počtu repetitivních tripletů později. První příznaky se projevují v 4. měsíci jejich života a průběh nemoci je pomalejší. Myši se dožívají vyššího věku. Ve *striatu* nedochází k tak rozšířené degeneraci. Obdobně jako u R6/2 myším modelem dochází k tvorbě inkluzí v buňkách bazálních ganglií a počet roste přímo úměrně k vyššímu věku. Příznaky u modelu R6/1 jsou stejné jako u modelu R6/2 [25].



Obr. 8. R6/1 myší model; genom s expanzí 116 CAG tripletů; převzato [25].

2.9.1.1.1 N171-82Q myší model

Mezi další významné myší linie transgenních modelů patří model N171-82Q. Tento model je připraven inzercí prvních 171 aminokyselin z N-terminálního konce lidského Htt obsahujícího exon 1 a 2 do genomu myši. Exprese je řízená myším promotorem. Vložená část obsahuje 82 CAG tripletů [23]. Průběh nemoci je pomalejší, právě díky sníženému počtu repetitivních tripletů CAG. Myši s tímto modelem žijí několik měsíců zcela bez symptomů. Toto presymptomatické období poskytuje prostor pro vývoj vhodné terapie pro bezpříznakové pacienty. Mezi první příznaky spadá klidový třes, hypokineze, ataxie a abnormální chůze [26]. Symptomy u N171-82Q myši jsou obdobné jako u R6 linie modelu, ale nezahrnují hyperkineze. Degenerativně je hlavně postiženo *striatum*. V 16. týdnu došlo k úbytku 20% mozkové hmoty a k smrti došlo u 25 % neuronů ve *striatu* [25]. K mortalitě docházelo kolem 5. a 6. měsíce [26].

2.9.1.1.2 Knock-in modely

Jedná se o skupinu modelů, která je významná pro výrazný odklad v propuknutí nemoci [27]. Může se jednat o výraznou část života hlodavce. Princip knock-in modelů spočívá v inzerci kopie genu z lidského mHtt s nadměrným zmnožením CAG repetice do myšího genu [25,27]. Výsledkem vložení je linie o zvýšené expanzi CAG repetitivních tripletů. U vzniklé linie se setkáváme s označením Hdh^{CAG} (počet tripletů pro daný model). Nástup neurologických symptomů a poruch chování je většinou výrazně opožděn, progres je tedy přímo úměrná počtu repetitivních tripletů.

2.9.1.1.3 Kondicionální model myši

V roce 2000 Ai Yamamoto a kolektiv sestavili tento model v rámci výzkumu Univerzity v Columbii [23]. Někdy se zde setkáváme s pojmem „gene on and gene off model“. Model zastává vlastnost inaktivace mutovaného genu tetracyklinem podaným v potravě [12]. Po aplikaci tetracyklinu bylo zaznamenáno zlepšení klinického stavu zvířete. Taktéž byl pozorován úbytek již vzniklých agregátů mHtt.

2.9.2 Ovčí model

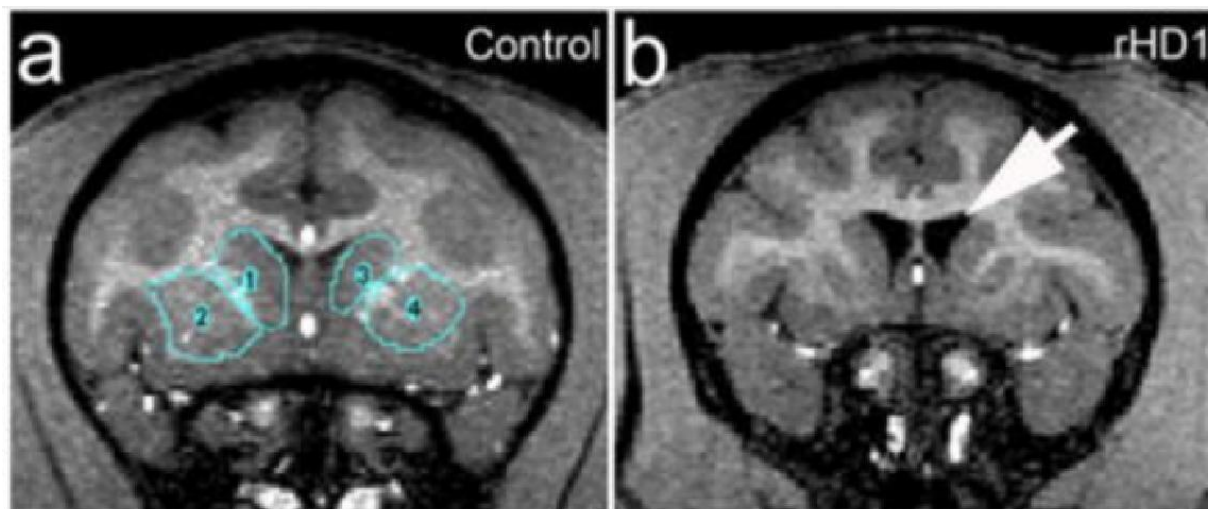
V roce 2009 byl vyvinut první transgenní ovčí HN model [23]. Jedná se o dokonalejší model pro analogickou morfologii ovčích bazálních ganglií v porovnání s lidským uspořádáním bazálních jader [25]. Oproti myším modelům poskytují ovce výhodu díky větší podobnosti v tělesné hmotnosti a organizaci tělesných soustav. Právě díky těmto vlastnostem jsou využívány při řešení nesčetných otázek v mnohých oborech. U studie HN tomu není jinak. Díky dlouhodobé paměti ovcí a schopnosti učit se, můžeme sledovat nejen časné stádium HN, ale celý její průběh. Kognitivní schopnosti ovcí jsou užitečné pro vývoj testů, které jsou podobné těm, jež se používají u lidí. Degenerativní charakter HN je u tohoto modelu taktéž dobře pozorovatelný. Například u pětiletých transgenních ovcí byl zaznamenán úbytek až 35 % až 39 % receptorů v *nucleus caudatus*, což odpovídá paralelnímu poklesu receptorů v lidských bazálních gangliích. Dalším příznakem podobným lidem bylo přerušení cirkadiálního rytmu. Ovce s HN měly problémy se spánkem stejně jako lidští pacienti [31].

2.9.3 Model pro primáty

Primáti jsou velmi významná skupina pro výzkum HN. Vzhledem k blízké příbuznosti opic s člověkem se může tento zvířecí model jevit jako nejvýhodnější. Mají podobnou stavbu mozku a genomu. Díky této blízkosti s člověkem se nám nabízí unikátní možnost zkoumání průběhu nemoci, symptomatiky a prostor pro preklinické studie. Průběh a příznaky HN u opic odpovídají těm, které pozorujeme u člověka. Nicméně i přes mnohé výhody, které vychází z podobnosti člověka a opice, se v dnešní době nachází jen několik center věnujících se tomuto výzkumu.

Jedním z hlavních důvodů, proč tomu tak je, vychází ze samotného chovu opic. Opice jsou sociální zvířata a jejich dlouhodobá izolace přináší stres, který se může projevat mnohými způsoby a ovlivnit výsledky experimentů. Dalším problémem je finanční náročnost udržování stabilního chovu těchto zvířat. Přes blízkou evoluční příbuznost existují některá omezení, která se musí brát v potaz. U nejperspektivnějšího druhu primátů pro model HN, *Macaca mulatta*, je problematické množství nesené CAG repetice. Tento druh primátů nese pouze 10-11 CAG repetic. V porovnání se zdravým člověkem, který má obvykle až 35 repetic, musíme konstatovat, že jsou zde značné rozdíly, které vedou k otázkám o průkaznosti experimentálních výsledků, což činí modely u makaků méně vhodnými pro studium HN. Z těchto důvodů v roce 2018 bylo oficiálně dokumentováno pouze 8 transgenních opic s HN [32]. Tři z nich musely být po narození usmrceny, protože byly těžce motoricky postižené [32]. Pitevní analýza prokázala vysoké hladiny agregátů mHtt a v celé mozkové hmotě se našly jaderné inkluze [35]. Tyto tři transgenní opice, rHD3-5, se v průběhu jejich krátkého života potýkaly s mnohými abnormalitami. Projevila se u nich dystonie, dysfagie, chorea a potíže s dýcháním už při narození [35]. U zbylých pěti opic (rHD1-2 a rHD6-8) byly provedeny první kognitivní testy ve dvou letech. Výsledky ukázaly, že dané opice disponují lepšími výsledky než kontrolní skupina opic stejného věku. První motorické poruchy se dostavily okolo 16. měsíce, přičemž dystonií byly zasaženy hlavně dolní končetiny. V 22 měsíci byly

prokázány epileptické záchvaty u opice rHD1. Psychiatrické symptomy u opic se skládaly z úzkosti, agresivity, podrážděnosti. Některé opice vykazovaly také známky sebepoškozování. Magnetickou rezonancí byl prokázán výrazný úbytek mozkové hmoty ve srovnání se zdravými kontrolními jedinci. Porovnání transgenní opice rHD1 a kontrolního jedince ilustruje tento pokles mozkové tkáně.



Obr. 9. Srovnání MR kontrolní opice (a) a transgenní opice rHD1 (b). Převzato [35].

2.9.4 Prasečí model

Prasata představují velmi užitečný model pro výzkum Huntingtonovy nemoci z několika důvodů. Prasata totiž disponují velmi podobnou fyziologií jako lidé [34]. Jsou považována za inteligentní a mají početný vrh, který mohou mít dvakrát do roka [33]. Prasata patří taktéž mezi všežravce a jsou považována za dlouhověká. Vhodnými pro studie se stala také díky jejich anatomii a uspořádání orgánů. Mozek prasat, včetně bazálních ganglií, je dost podobný lidskému, což činí tento model relevantním pro výzkum neurodegenerace (viz. obr.č.5, 6). Prasata začala být díky těmto vlastnostem, dostupnosti a menší finanční náročnosti pro pracoviště, hojně upřednostňována před ovci a jinými většími savci. Přestože jsou preferována ve výzkumu s modely pro větší savce, je důležité zmínit jejich hmotnost. Prasata totiž přibírají celý život a často se stává, že narostou do velikostí, které je činí nevhodnými pro experimentální účely. Z těchto důvodů se vědci obrátili na práci s miniprasaty. Hmotnost miniprasete se může pohybovat okolo 20-50 kg [73].

Za vznikem modelu HN u miniprasat stojí Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie České republiky v Liběchově. Tento model byl vytvořen za použití lentivirového vektoru, retroviru, s N-terminálním fragmentem lidského mHtt pod kontrolou lidského promotoru, který byl zanesen injekčně do jednoho buněčného embrya miniprasete [36]. Do genomu miniprasete byla zavedena pouze 1 kopie mutovaného genu na chromozóm 1 [37]. V následujících generacích dochází k vertikálnímu přenosu mHtt ve všech tkáních [38]. Nejvyšší koncentrace mHtt byly zjištěny v mozku a varlatech těchto zvířat [38].

2.9.5 Proteomické studie u Huntingtonovy nemoci

„Proteomika představuje systematické studium proteinů v buňce a tkáních. Umožňuje sledovat změny v exprimovaných proteinech, jejich posttranslační modifikace a vzájemné interakce v průběhu nemoci“ [90].

Proteiny jsou zásadními aktéry v biochemických reakcích a procesech. Mezi tyto procesy řadíme například stahy svalů nebo regulaci exprese genů [88, 89]. Pro HN je zásadní porozumět roli Htt a dalších proteinů, které vystupují v patologii HN. Mezi hlavní oblasti proteomického výzkumu u HN patří sledování změn v expresi proteinů. To je prováděno porovnáváním proteomu zdravých a HN zasažených mozků. Tímto způsobem sledujeme změny v *striatum*, kortexu anebo v CSF. Tato pozorování vedou k odhalení proteinů, které jsou spojeny se synaptickým přenosem, energetickým metabolismem, regulací proteomu a zánětlivými procesy. Další významnou částí výzkumu je studování procesů, v kterých vystupuje mHtt. Mezi tyto procesy patří posttranslační modifikace mHtt, fosforylace, acetylace, agregace mHtt a jeho působení na buňky.

Například studie fosforylace p53¹ potvrdily, že dochází k interakci s prolyl-izomerázou a disociaci inhibitorů apoptózy nejen při přetrvávajícím stresu, ale i při expresi mHtt [91]. Výsledek fosforylace zapříčiní apoptózou. To vede k atrofii určitých částí CNS.

Dále se tyto studie věnují proteinové interakční síti. fHtt interaguje s řadou proteinů. Ve své mutované formě tomu není jinak. mHtt je součástí komunikace s proteiny, které jsou zapojené do regulace transkripce, intercelulárního transportu (např. v rámci mitochondrií) a organizace cytoskeletu [90, 91].

¹ „p53 je tumor supresorovým proteinem, který hraje významnou roli v buněčné odpovědi na stres, poškození, v regulaci buněčného cyklu a apoptóze. Tyto funkce jsou důležité pro udržení genetické integrity a brání vzniku nádorových buněk.“ [91]. (Potvrzují zdroje [92], [93]) Tento jaderný protein vystupuje v apoptických procesech u HN [91].

Biomarkery

V CSF nebo krvi se hledají proteinové biomarkery korelující s progresí nemoci (např. změny v cytokinech apod.).

Pro tyto studie používáme např. LC-MS/MS (kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií) anebo 2D-DIGE (dvourozměrná elektroforéza s diferenčním značením²) [90]. Tyto metody jsou považovány za nejčastěji využívané. Je možné se setkat i s dalšími postupy, které napomáhají porozumění patologii HN.

Právě tímto se zabývají proteomické studie na transgenních modelech.

Nesledují tedy Htt jen v CNS a jeho význam v mitochondriálních procesech, ale věnují se všem proteinům vystupujícím v patologii HN [86, 90, 91].

² Tato metoda je modifikace vysoce efektivní cesty, jak separovat z komplikovaných směsí stovky různých proteinů [96, 97].

3 IMUNOLOGIE A NEUROIMUNOLOGIE

Imunologie je dynamicky se vyvíjející vědní obor, který se zabývá imunitním systémem. Ten chápeme jako soustavu tkání, buněk a molekul, které se podílejí na imunitní odpovědi. Tyto součásti spolu vzájemně interagují, komunikují a spolupracují. Tyto interakce představují: 1) kontakt dvou membrán buněk, při kterém si předávají informaci nebo 2) produkci signálních molekul [44]. V imunologii se často pro výzkum používají transgenní zvířecí modely.

V souvislosti s neurodegenerací u HN se zaměříme na neuroimunologii, která studuje interakci mezi nervovým a imunitním systémem. Při výzkumu v neuroimunologii používáme různé metody. Nejčastěji jde o detekci koncentrací různých látek v těle. U HN sledujeme především látky, které vznikají v rámci agregace mHtt, zánětlivých reakcí a probíhajících degenerativních procesů v mozku [85,90]. Jedním z klíčových ukazatelů jsou cytokiny, které hrají důležitou roli v imunitní odpovědi a mohou ovlivnit průběh onemocnění. Důležitá je také aktivita reaktivní mikroglie a astrocytů. Jsou to buňky podílející se na zánětlivých procesech v centrální nervové soustavě. V současné době se výzkum HN zaměřuje i na zkoumání toho, jak se imunitní procesy podílejí na patofyziologii HN [85].

Je možné, že ovlivněním těchto imunitních procesů by mohlo dojít ke zpomalení progresu nemoci [85]. Sledování spektra a intenzity imunitních reakcí se může ukázat být užitečné nejen pro sledování progresu nemoci, ale také pro hodnocení účinnosti případných léčebných intervencí, které by se zaměřovaly na modulaci imunitní odpovědi.

3.1 Historie imunologie a počátky neuroimunologie

Kořeny imunologie sahají do starověku [45, 46]. V té době lidé získávali poznatky o imunologii díky empirickým zkušenostem. Mezi ty patřila zkušenost s osobami, které onemocněly morem. Tito lidé po překonání nemoci znovu černou smrtí neonemcněli [46]. Díky tomu poté mohli pečovat o nemocné. Přestože byl uskutečněn tento poznatek, nedokázali jej aplikovat v praktické medicíně [45].

První pokusy o imunizaci pochází z Číny a Turecka z 15. století [45]. Různé zdroje doporučovali zvýšení odolnosti proti pravým neštovicím pomocí tzv. variolace. Tato metoda spočívala v zavádění strupů do těla různými způsoby. Mezi tyto varianty patří vložení strupu pod kůži nebo vdechnutí strupu. Na začátku 18. století paní Montagu provedla imunizující pokusy na svých dětech [45, 49]. Údajně pozitivně ovlivnila obranyschopnost svých dětí právě variolací.

Této metodě se později důkladně věnoval anglický lékař, Jenner [45, 50]. Jenner v roce 1798 pozoroval, že telata, která byla kojena krávami s kravskými neštovicemi, nikdy neonemocněla pravými neštovicemi [50]. Tento jev se pokusil odůvodnit. Nakonec přišel s myšlenkou, že tekutina z vředů dojných krav imunizuje telata. Tuto teorii poté použil úspěšně v praxi. Reálný mechanismus, proč tomu tak je, nebyl objeven dalších 100 let [45]. V roce 1879 Louis Pasteur objevil očkování na drůbeží choleru a roku 1881 očkoval ovce proti sněti [51]. O 4 roky později poprvé očkuje člověka, malého chlapce. Devítiletý chlapec byl očkován proti vzteklině [51]. Pasteur vymyslel tato řešení, aniž by rozuměl, proč tomu tak je. V následujících letech se objevila nová léčiva a prevence nemocí. Až v roce 1890 byl pochopen princip imunitního systému [45]. V roce 1901 bylo zjištěno, jak neutralizovat toxiny [45]. V roce 1883 byly poprvé pozorovány bílé krvinky, leukocyty [45]. V 40. letech minulého století bylo dokázáno, že je možné zvýšit imunitu přenosem bílých krvinek [45]. V 50. letech byly nalezeny lymfocyty, které byly později rozděleny na B a T-lymfocyty [45]. Od té doby imunologie zažívá významné objevy různých protilátek, očkování a metod podpory imunitního systému [52]. Neuroimunologie má kořeny v 19. století, kdy došlo k objevu CNS buněk, které se později ukázaly jako součást imunitní odpovědi [57]. Objev těchto buněk učinil německý vědec, Rudolf Vichrow [57, 58]. Jejich léčebný potenciál byl objeven až v druhé polovině 20. století [58].

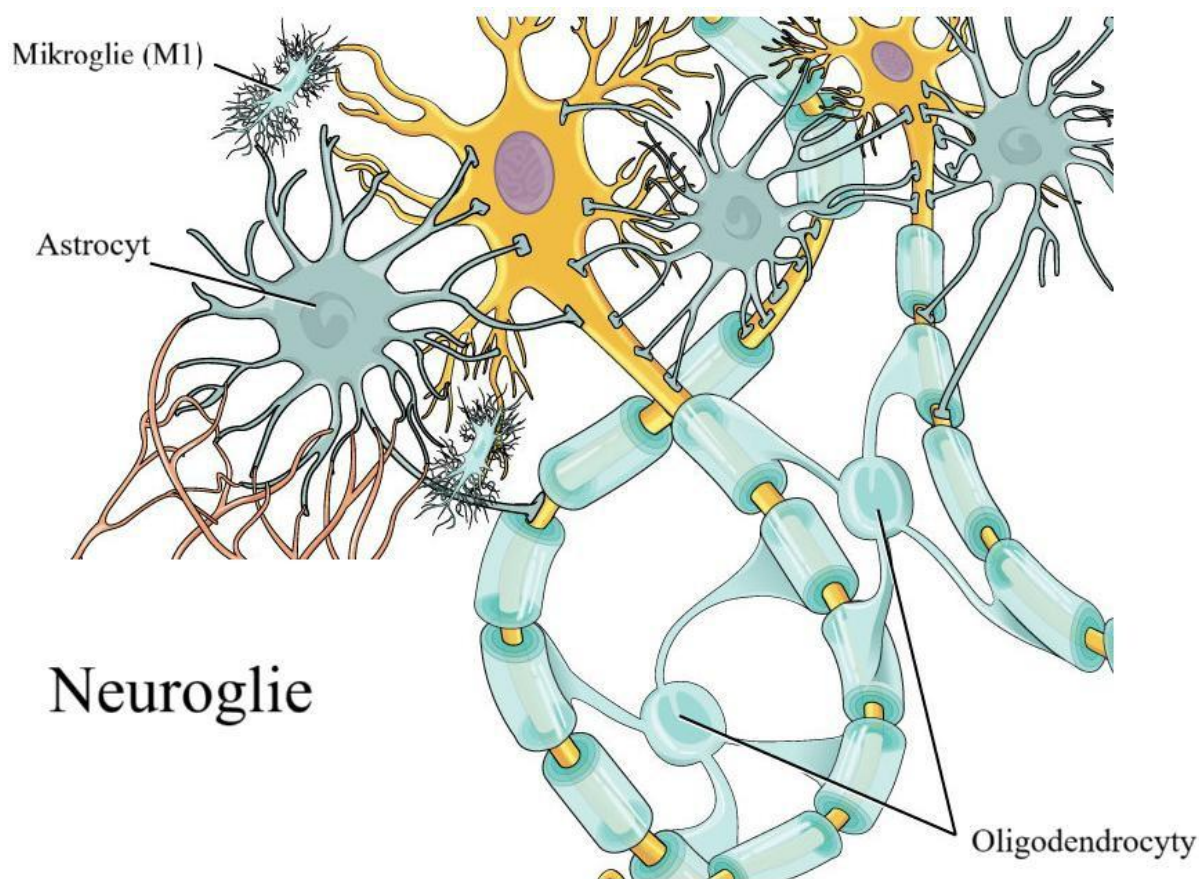
V 50. a 60. letech 20. století u nás začaly vznikat instituty pro studii imunologie [48]. Vznik neuroimunologie v našich zemích spadá do přelomu 80.- 90. let 20. století [47].

3.2 Imunitní systém pacientů s Huntingtonovou nemocí

Odpověď imunitního systému na propuknutí zánětu obvykle zahrnuje aktivaci T- a B-lymfocytů a dalších obranných mechanismů, které pomáhají tělu bojovat proti infekcím a poškození. U HN dochází neurodegeneraci, která indukuje zánětlivou odpověď. Na neurozánětu se podílí neuroglie (viz. kapitola 3.3). Diferenciace těchto buněk a látek, které se jednoznačně podílejí na imunitní odpovědi u HN, je důležitá pro výzkum mechanismu HN [85].

3.3 Neuroglie

Neuroglie jsou buňky, které tvoří neuronům podpůrný systém (obr.č.10) [58]. Zastávají široké spektrum vlastností a funkcí [58]. Tyto buňky nalezneme v periferním nervovém systému a v CNS. Ve spojitosti s HN se zaměříme na neuroglie v CNS. Zjednodušeně tyto neuroglie dělíme na makroglie a mikroglie, které můžeme rozdělit do dalších podskupin. Mezi ně spadají například astrocyty a oligodendrocyty [54, 58].



Obr. 10. Zobrazení podpůrného systému neuronů. Převzato a upraveno [53].

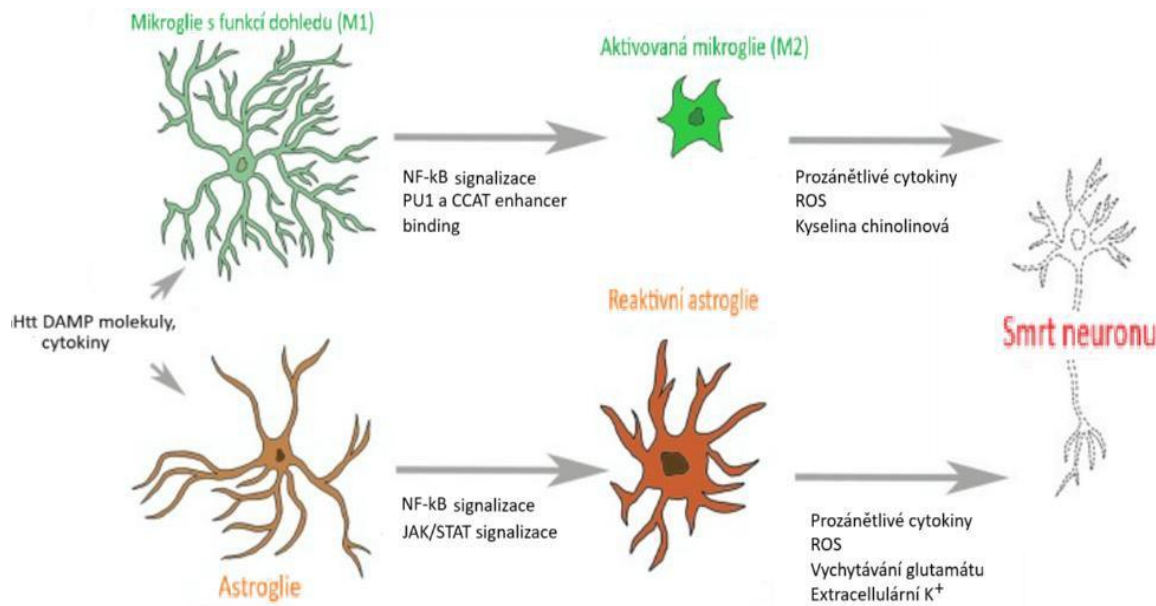
Ve spojitosti s HN jsou pro nás nejvýznamnější mikroglie a astrocyty.

3.3.1 Mikroglie

Mikroglie nalezneme v celé CNS, kde tvoří 5 – 10 % všech buněk [55]. Jejich chování je unikátní a vysoce závislé na místě výskytu, fyziologických procesech, okolním prostředí a dalších faktorech. Historicky byly považovány za pasivní výplň mozku, která držela vše pohromadě. Později bylo objeveno, že tyto buňky zasahují do imunitní odpovědi a účinkují v mnoha procesech, které hrají významnou roli ve fyziologii člověka [41, 85, 90]. Tento objev vedl k intenzivnímu studiu mikroglie.

Při studiu jejich imunitních funkcí byly mikroglie klasifikovány do dvou fenotypů. První fenotyp se označuje M1 a je spojen s prozánětlivými procesy. Klidové mikroglie se podílejí na udržování synapsí, eliminaci nežádoucích struktur a synaptickém prořezávání [41]. Tento fenotyp mikroglíí sleduje své okolí a udržuje homeostázu CNS. Díky schopnosti modulovat nervovou aktivitu a ovlivňovat strukturu okolí hrají zásadní roli v normální funkci [40]. Druhý fenotyp M2 je spojený s protizánětlivými procesy a vzniká při iniciaci imunitní odpovědi [85]. V ten moment mikroglie mění svůj stav z klidového na aktivovaný a dochází k produkci cytokinů. Tento proces byl nazván aktivace [40].

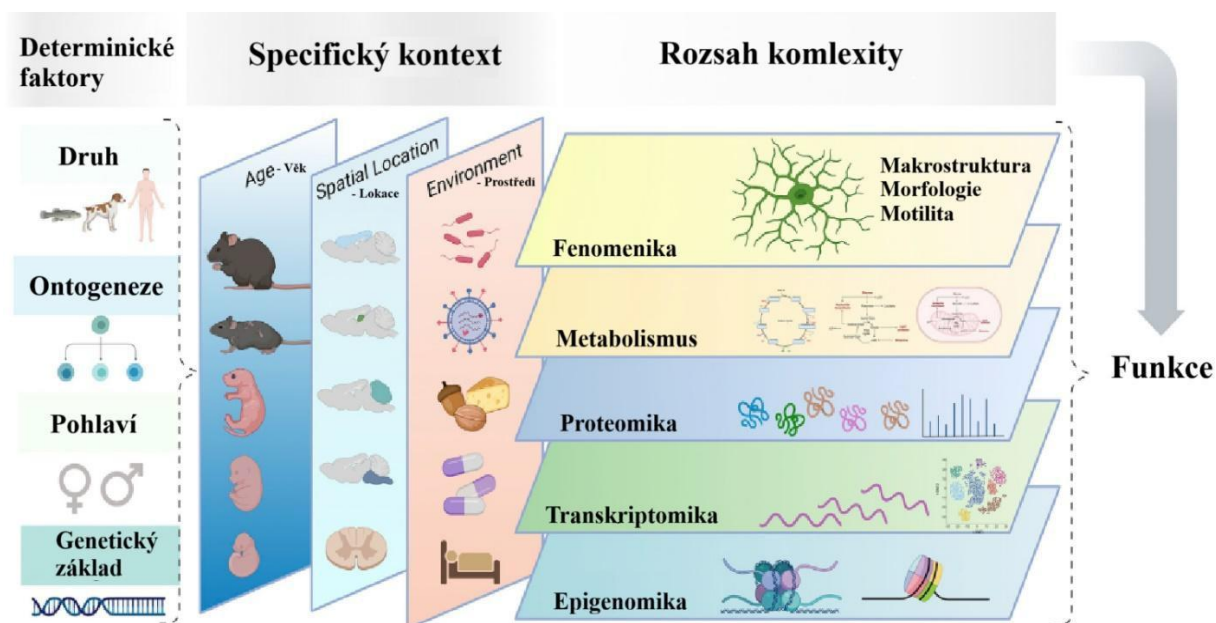
Při transformaci z M1 na M2 dochází k morfologickým změnám, kdy mikroglie přechází z rozvětvené klidové podoby do amébovitého tvaru (viz obr.č.11) [40]. Procesy, na kterých se M1 podílely, se morfologickou změnou přerušily. M2 reagují na zánětlivý podnět a zúčastňují se protizánětlivých procesů. Aktivované mikroglie se naopak podílely na neuronové smrti.



Obr. 11. Morfologická změna mikroglíí a astrocytů na jejich pozměněné formy. Převzato a upraveno [40]. ROS: oxidativní stres; PU1 enhancer: one-part-unit enhancer; CCAT enhancer: CCAAT binding-protein enhancer; NF-kB signalizace: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; JAK/STAT signalizace: Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription

Tato představa byla částečně vyvrácena. U mikroglíí totiž skutečně dochází k morfologické změně. Tato změna byla nesčetněkrát potvrzena v nezávislých studiích [41, 85]. Bylo také popsáno velké spektrum funkcí, které mikroglie zastávají. V roce 2005 byl objeven nový způsob zkoumání buněk, který vedl k hlubšímu pochopení, co vlastně mikroglie jsou [56]. Tento pokrok se stal prvním krokem k charakteristice mikroglíí. Dnes považujeme mikroglie za extrémně dynamické buňky, které se nepřetržitě nacházejí v tzv. aktivovaném stavu i bez přítomnosti patogenu. U mikroglíí bylo také potvrzeno, že bedlivě sledují své okolí a interagují s ním [56]. Tyto buňky se snaží dosáhnout určité homeostázy. To provádí dynamickou reorganizací mikroglíálních procesů [40]. Tyto procesy mohou mikroglie regulovat podle potřeby. U mikroglíí je důležité zmínit komplexy různých parametrů (viz obr.č.12), které ovlivňují jejich funkce. Mikroglíální chování může být ovlivněno nesčetnými faktory (viz obr.č.12).

U HN je nejvýznamnějším faktorem genetika. Mikroglie u zdravých jedinců exprimují fHtt. Mikroglie u zvířecích modelů s HN exprimují mHtt ve zvýšeném množství [55]. Tento jev je často označován jako sekundární exprese mHtt. V mnoha studiích se ovšem setkáváme s různými výsledky dle typu modelu a druhu, na kterém byl model zkoumán. Obecně můžeme tvrdit, že u organismů s HN můžeme pozorovat nadměrně zvýšené množství specificky aktivovaných mikroglíí [55]. Tento jev je viditelný nejen v modelech *in vitro*, ale i v patologickém rozboru lidských tkání.



Obr. 12. Parametry, které ovlivňují funkce mikroglie. Převzato a upraveno z článku *Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads* [56].

V závislosti na kontextu situace mohou mikroglie dynamicky měnit své funkce, což lavinovitě ovlivňuje procesy, na kterých se dříve podílely. Mezi procesy, na kterých se mikroglie podílejí, spadá například eliminace agregátů proteinů, mikrobů, odumřelých buněk, buněčných zbytků nebo produkce cytokinů [55]. U některých mikroglíích, za určitých okolností, pozorujeme i negativní účinky. Mezi procesy takových mikroglíí může patřit indukce oxidačního stresu, což

spouští proces fagocytózy. Při této fagocytóze dochází k zvýšení aktivity některých enzymů, které metabolizují různé látky na neurotoxiny. Mezi takové produkty řadíme například kyselinu chinolinovou. Produkce těchto látek mikroglie přispívá k rozvoji neurozánětu, jenž je charakteristickým rysem HN.

Podle různých funkcí, reakcí a procesů, do kterých se mikroglie zapojuje, lze tyto buňky rozdělit do několika skupin. Pro HN jsou významné tři podskupiny mikroglie. Mezi ně patří: Disease associated mikroglia (DAMs); mikroglial neurodegenerative phenotype (MGnD); proliferative associated mikroglia (RAM) [56].

Mikroglie mají velmi dobrou mitotickou aktivitu. Bylo pozorováno, že po působení toxinu nebo antagonisty došlo k úspěšné repopulaci i při ztrátě až 99 % buněk [56]. Tato schopnost obnovy ukazuje na vysokou plasticitu mikroglie a jejich potenciál pro regeneraci v průběhu patologických procesů. Současný výzkum mikroglie se zaměřuje na používání markerů, které umožňují bližší zkoumání těchto buněk. Tyto markery pomáhají definovat transkripční identitu mikroglie [56]. Vědci se jimi pokouší vizualizovat mikroglie a specifikovat, jak s nimi dále manipulovat.

3.3.2 Astrocyty

Astrocyty, někdy označovány jako astroglie, jsou nejčastější neuroglie v CNS savců (obr.č.10). Mají charakteristický hvězdicovitý tvar s dlouhými výběžky, kterými se připojují na bazální membrány endoteliálních buněk a pericytů. Ty se nacházejí v síti krevních cév, kde jsou součástí hematoencefalické bariéry. Zásobují mozek kyslíkem a živinami. V posledním desetiletí bylo prokázáno, že se astrocyty zásadně podílejí na optimální funkci mozku nejen s ohledem na jejich návaznost na mozkovou vaskulaturu. Mezi hlavní funkce astrocytů patří regulace a tvorba synapsí, udržování stálého pH a homeostáza neurotransmiterů a gliotransmiterů [40].

Gliotransmitery jsou látky, které ovlivňují komunikaci mezi neurony. Jejich uvolňování a rovnováha v mozku poukazuje na nové poznatky o komplexní roli astrocytů [98]. Ty byly dříve považovány pouze za strukturální a podpůrné makroglie, tvořící významnou síť drah v CNS.

Astrocyty se vyznačují unikátní organizací, kdy jejich výběžky vytvářejí nepřekrývající se oblasti. Spoje mezi nimi jsou zprostředkovány přes mezerové spoje tzv. „gap junctions“, které využívají ionty vápníku nebo jiné lokální vazoaktivní látky k vytvoření rychlého signálního spoje. Tento spoj vniká adhezí molekul nebo uvolněním vazoaktivní látky [40]. Elevace a rozšíření těchto látek se podílí na rychlé a přesné regulaci přísunu krve do mozku [40]. Význam astrocytů se ukazuje i v souvislosti s patologií u HN. Astrocyty totiž hrají zásadní roli v progresi HN. Tato role spočívá v imunitní odpovědi na neuroinflamaci. Při zánětu mozku se astrocyty morfologicky změní (viz obr.č.11). Jejich genetická exprese je pozměněna. Tento proces se

nazývá reaktivní astroglióza. V této fázi se astrocyty zvětšují a produkují nadměrné množství gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP), který je součástí jejich cytoskeletu. V této formě astrocyty produkují látky, které zesilují imunitní odpověď. Zvýšené množství GFAP pozitivních astrocytů bylo u zvířecích modelů HN přímo úměrné závažnosti nemoci a korelovalo se ztrátou neuronů v bazálních gangliích [55]. Astrocyty se podílejí jak na ochraně neuronů, tak na patofyziologii HN.

3.3.3 Oligodendrocyty

Oligodendrocyty představují specializované buňky, které vytvářejí lipoproteinové pochvy kolem axonu neuronů [59]. Jedná se o tzv. myelinovou pochvu [58]. Tato pochva zajišťuje izolaci axonu neuronu [59,60]. V dnešní době vědci studují jejich role v podpoře neuronů, izolaci a jejich zapojení v mechanismech spojených s vnímáním bolesti [59].

3.4 Cytokiny

Cytokiny představují rozsáhlou skupinu malých organických molekul, které se podílejí na většině biologických reakcí. Cytokiny jsou malé proteiny, glykoproteiny anebo peptidy [44]. Jejich molekulová hmotnost se může pohybovat v rozmezí přibližně 6 – 70 kDa [61]. Tyto signální molekuly mohou být přítomny na povrchu cílových buněk nebo rozpuštěné v tkáňových tekutinách. Cytokiny byly objeveny v 60. letech minulého století a dříve se označovaly jako lymfokiny a monokiny. [44]

Cytokiny zajišťují komunikaci mezi imunitními buňkami a dalšími buňkami těla [62]. Pro signalizaci používají několik strategií. Mezi ně patří autokrinní, parakrinní a endokrinní signalizace [62, 63]. Zastávají velké množství funkcí a vlastností. Cytokiny mohou připomínat hormony [44]. Hranice mezi nimi není zcela jasná [44]. Některé hormony se totiž chovají jako cytokiny [44]. Cytokiny zajišťují adaptivní imunitní odpověď, regeneraci tkání, diferenciaci buněk a kontrolu buněčného růstu. Cytokiny vykazují pleiotropismus a redundanci [64]. Jinými slovy tyto molekuly mohou zastávat více odlišných funkcí a jejich účinky se mohou překrývat. Cytokiny působí na leukocyty selektivními receptory [42]. Cytokiny můžeme dělit do pěti základních tříd na: interleukiny, nádorové nekrotické faktory (tumor necrosis factor, TNF), interferony, transformující růstové faktory, kolonie stimulující faktory, chemokiny. Kombinací tříd cytokinů vznikají různé biochemické odpovědi. Podle ní se dělí na prozánětlivé, protizánětlivé a na cytokiny, které se uplatňují na humorální a buněčné imunitě.

3.4.1 Prozánětlivé cytokiny

Prozánětlivé cytokiny zvyšují intenzitu zánětlivých procesů a hrají klíčovou roli v patogenezi zánětlivých onemocnění [43]. Přispívají ke zhoršení poškození zasažené tkáně a přitahují leukocyty do zánětem postižené oblasti [44]. Do této skupiny patří TNF, interleukiny 1, 8, 12, 17 a interferon γ .

3.4.2 Protizánětlivé cytokiny

Protizánětlivé cytokiny se podílejí na potlačení šíření a intenzity zánětu. Do této skupiny spadají významné cytokiny jako je například interleukin 4, 10, 11 a transforming growth factor β (TGF- β).

3.4.3 Cytokiny a Huntingtonova nemoc

U osob s HN byly pozorovány zvýšené hodnoty cytokinů ještě před propuknutím onemocnění [72]. Tyto cytokiny pocházejí z aktivovaných mikroglií, které mají převážně prozánětlivý charakter. Jejich zvýšená koncentrace navíc koreluje s progresí onemocnění [72].

Cytokiny jsou sledovány jako potenciální bioindikátory aktivace imunitního systému. Zvýšené hladiny těchto molekul mohou sloužit k predikci rozvoje HN, což naznačuje jejich možné využití v diagnostice či monitorování onemocnění [72]

4 PRAKTICKÁ ČÁST

Experimenty byly realizovány od ledna po únor roku 2025, kdy byly analyzovány výsledky měření. Na začátku ledna byly prováděny metody sledující imunitní buňky periferní krve. V únoru byly zjišťovány hladiny cytokinů v plazmě a mozkomíšním moku.

4.1 Experiment číslo 1

V prvním experimentu jsem se věnovala imunologické analýze cytokinů v biologickém vzorku, konkrétně v plazmě a mozkomíšním moku. V některých pracích se můžeme také setkat se zpracováním krevního séra, proto se i jemu věnuji v podkapitole 5.1.1 Metody a soubory. Cytokiny jsou následně měřeny na zařízení zvaném Luminex.

4.1.1 Metody a soubory

V rámci výzkumu imunologie máme několik základních metod, které jsou zakomponovány ve všech pokročilejších zpracováních dat. Zásadní součást výzkumu tvoří nejen samotné metody, ale také kvalita a množství použitých materiálů. V této části práce se zaměřuji především na krev a mozkomíšní mok. Jejich kvalita a množství ovlivňuje celkové výsledky práce. Správný odběr vzorků, stejně jako následná manipulace, skladování a další laboratorní podmínky hrají zásadní roli pro úspěšnost výsledků analýz.

Tab. 1. Přehled metod a souborů pro experiment číslo 1

Metoda	Materiály
Izolace mononukleárních buněk periferní krve (PBMCs)	Prasečí krev (5ml) WT, TG-HD
	Antikoagulační činidlo EDTA
	Ficoll-Paque (11,25 ml)
	Pufr 1x PBS (100 ml)
Příprava séra - centrifugace	Prasečí krev (5 ml)
Příprava plazmy - centrifugace	Prasečí krev (5 ml)
	Antikoagulační činidlo EDTA
Luminex	CSF: WT (n = 4) a TG-HD (n = 4) ve věku 48 měsíců
	Plazma: WT (n = 4) a TG-HD (n = 4) ve věku 48 měsíců
	sady: 1.MILLIPLEX MAP Porcine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (MILLIPLEX®PCYTMG-23K-PX13, Millipore); 2.Swine Cytokine Magnetic 7-Plex Panel (TMLSC0001M, Thermo Fisher Scientific)
	deionizovaná voda
	Sheath fluid 100 µl

Odběr krve a příprava séra

Sérum je tekutá složka krve, která zůstane po sražení a odstranění krevních buněk a sraženiny. Na rozdíl od plazmy neobsahuje fibrinogen, ani další koagulační faktory.

Příprava séra je důležitá pro studium složení krve a její další zpracování. Sérum hraje zásadní roli v imunologii díky obsahu důležitých molekul, jako jsou proteiny, hormony, protilátky a další biomarkery. Tyto složky poskytují cenné informace o stavu imunitního systému, což z něj činí nepostradatelný vzorek pro diagnostické a výzkumné účely. Příprava zabrala přibližně 100 minut.

Postup přípravy séra:

1. Odběr krve – miniprase (provádí veterinář)

Odběr krve u prasat se provádí z dolní duté žíly (*vena cava caudalis*) [68]. Zvíře je nutné bezpečně fixovat. Místo vpichu se očistí a dezinfikuje, následně se použije sterilní jehla pro odběr.

2. Koagulace (dále vlastní práce)

Vzorek byl uchován při teplotě cca. 20 °C po dobu jedné hodiny a byl nechán se koagulovat.

3. Centrifugace

Sražený vzorek byl vložen do centrifugy a odstředován při 1500 x g po dobu

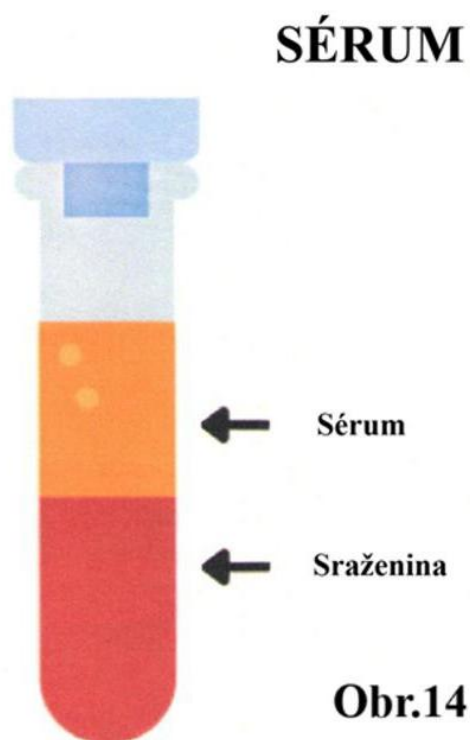
10 minut, 4 °C. Při rotaci vzorku došlo díky působení odstředivých a dostředivých sil k oddělení séra a sraženého shluku (viz. obr.13).

4. Separace

Po centrifugaci byl vyjmut vzorek a bylo odpipetováno sérum, které se oddělilo od sraženiny. Sérum bylo znova centrifugováno (1500 x g. 10 min., 4 °C). Následně bylo sérum rozalíkováno a uchováno při teplotě -80 °C pro následné použití.



Obr. 13. Ukázka centrifugovaného vzorku - krevní sérum; vlastní fotografie



Obr. 14. Nákres s teoretickým znázorněním vzorku séra po centrifugaci; převzato a upraveno[65]

Příprava plazmy

Plazma je tekutá složka krve, která zůstane po odstranění krevních buněk. Tato tekutina má ale koagulační faktory, jako například fibrinogen.

Při přípravě plazmy dbáme na rychlé zpracování odebraného vzorku. Jinak se můžeme setkat se znehodnocením celého následujícího postupu. U plazmy je důležité zmínit, že tato složka krve obsahuje všechny složky krve, včetně koagulačních faktorů, proteinů.

Po provedení odběru krve trvala příprava 23 minut.

Postup přípravy plazmy:

1. Získání vzorku krve (provádí veterinář)

Zde by postup stejný viz. příprava séra. V tento moment došlo k jedné změně. Díky výskytu koagulačních proteinů, jako je například fibrinogen, bylo nutné krev odebírat rovnou do zkumavky s antikoagulačním činidlem. Toto činidlo má zamezit sražení krve.

2. Promíchávání (dále vlastní práce)

Po odběru krve byla zkumavka promíchána, aby se antikoagulační činidlo řádně smísilo s krví. Toto promíchávání představovalo jemné otáčení (hlavně netřepat) vzorkem. Tímto se vědci pokoušejí vyvarovat sražení krve a hemolýze.

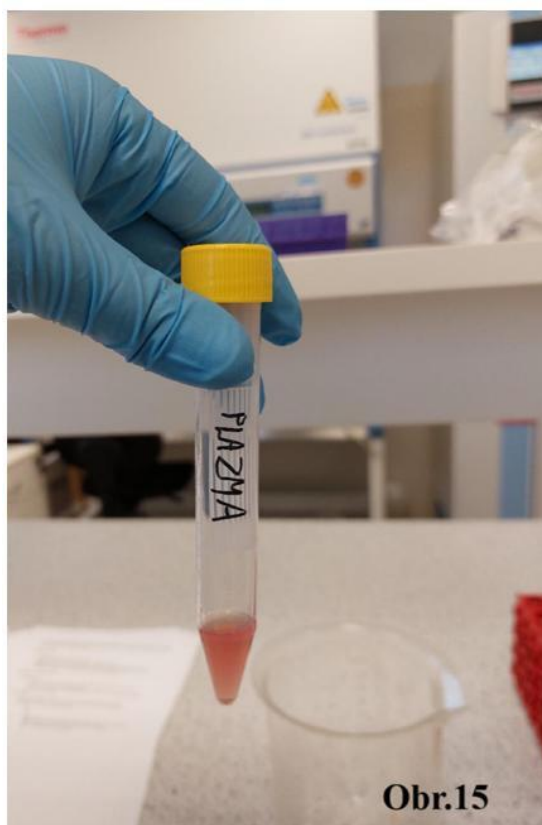
3. Centrifugace

Krev byla umístěna do centrifugy a odstředována při 1500 x g po dobu 10 minut, 4 °C.

4. Separace

Po centrifugaci se oddělila plazma od zbytku vzorku. Vzorek plazmy byl odebrán pipetou. Následně byla plazma rozalíkovávána a uchována při teplotě

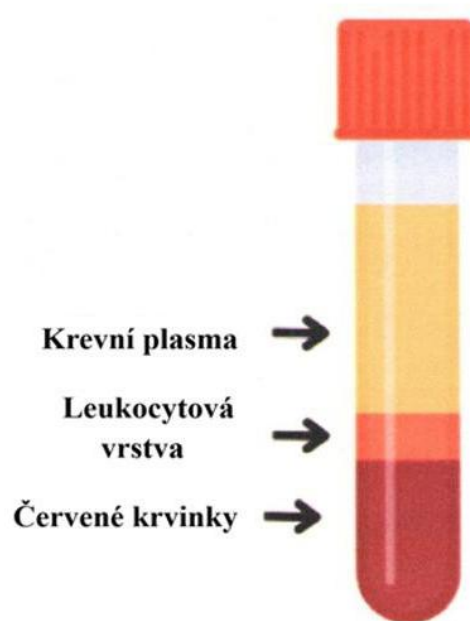
-80 °C pro následné použití.



Obr.15

Obr. 15. Separovaná plazma; vlastní fotografie

PLASMA



Obr.16

Obr. 16. Nákres s teoretickým znázorněním vzorku plazmy po centrifugaci; převzato a upraveno [65]

Odběr a příprava mozkomíšního moku(CSF)

CSF představuje čirou, bezbarvou tekutinu, která se nachází v CNS [75, 74]. Po kvalitativní stránce se tato tekutina podobá plazmě [74]. Po převzetí vzorku příprava CSF trvala 15 minut.

Postup přípravy CSF:

1. Získání vzorku CSF – lumbální punkce (provádí veterinář)

Prase bylo uvedeno do laterální polohy. Bederní oblast miniprasete byla mírně prohnuta. Jehla byla zavedena mezi obratle L4–L6 (v závislosti na velikosti zvířete). Po průniku do subarachnoidálního prostoru bylo CSF odebráno.

2. Centrifugace (dále vlastní práce)

CSF byla umístěna do centrifugy a dvakrát odstředována při 1500 x g po dobu 10 minut, 4 °C.

3. Separace

Po centrifugaci se oddělila čistá CSF od případného zbytku vzorku, který se usadí na dně zkumavky a vytvoří peletu. Čisté CSF bylo poté odebráno pipetou. Následně bylo CSF rozaliquotováno a uchováno při teplotě -80 °C pro následné použití.

Příprava pro měření na stroji Luminex

Luminex je multiplexní analytická technologie, která umožňuje současnou detekci a kvantifikaci více biomolekul v jednom vzorku. Tato metoda je založena na principu fluorescenční detekce pomocí kuliček (beads), které jsou pokryty specifickými protilátkami a označeny různými fluorescenčními barvivy.

Při této metodě můžeme vycházet z přípravy plazmy, séra a CSF. Jak plazmu, tak sérum je možné použít pro tuto metodě. V této práci byla metoda aplikovaná na plazmu a CSF. K provedení experimentu byla použita sada MILLIPLEX®PCYTMG-23K-PX13 a MILLIPLEX® Magnetic Bead 7-plex Kit.

Příprava CSF a příprava vzorku pro měření na přístroji Luminex trvala 4-6 hodin (na jednu dávku vzorků).

Postup:

1. Příprava plazmy a CSF

Postup přípravy plazmy/CSF byl stejný jako v podkapitole 5.1.2/5.1.3. Vzorky byly rozmrazeny v ledové lázni o teplotě 4 °C, cca 1 h.

2. Příprava vzorků na analýzu

Po rozmražení vzorku bylo nutné odstranit nečistoty a rozrušit shluky větších proteinů, které by mohly ovlivnit následné analýzy.

2.1 Vortexace

Tato metoda zahrnuje mechanické rozrušení větších proteinových agregátů, které mohou zastínit menší, sledované proteiny. Toto se provádí na zařízení, které je nazývané vortex mixer (viz obr.č.17). Princip přerušení interakcí spočívá v rozpohybování obsahu zkumavky určitou frekvencí, která narušuje proteinové interakce a napomáhá jejich lepší disperzi.

2.2 Sonikace

Sonikace je metoda, která pomocí ultrazvuku taktéž rozbíjí vazby mezi většími proteinovými shluky.



Obr.17

Obr. 17. Vortex mixer; vlastní fotografie



Obr.18

Obr. 18. Ultrazvuková čistička; vlastní fotografie

2.3. Centrifugace

Vzorky byly vloženy do centrifugy a odstředěny při 16 000 x g po dobu 10 minut, 4 °C.

3. Příprava Sérum matrix, kontrol kvality a kalibračních standardů

3.1 Sérum matrix

Do lahve s lyofilizovaným Sérum matrix, byl přidán 1 ml deionizované vody. Po důsledném promíchání byl ponechán po dobu 10 minut odstát.

3.2 Kontroly kvality

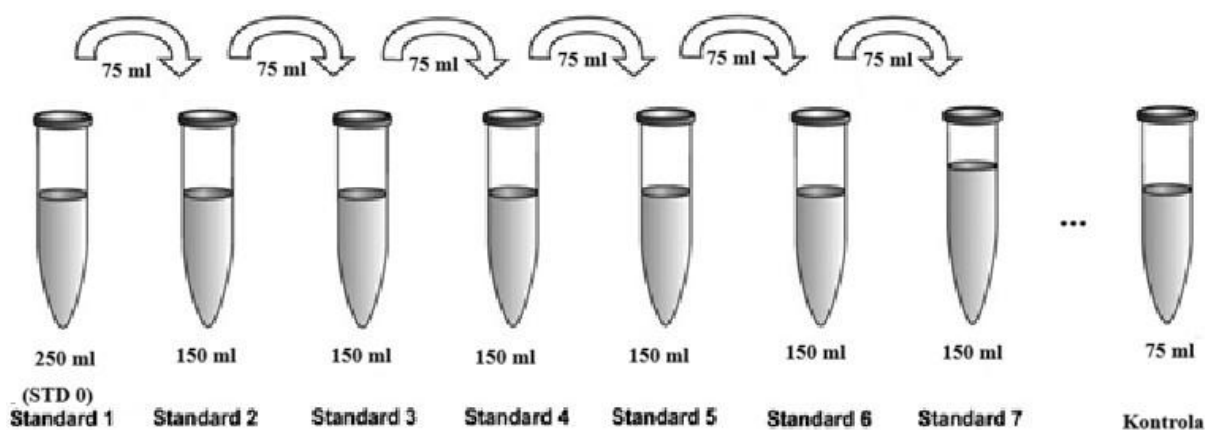
Kontroly kvality 1 a 2 byly vyjmuty ze sady pro imunologický rozbor a rozmíchány v 250 µl deionizované vody. Následně byla vialka několikrát obrácena a vortexována, aby se řádně promíchala směs. Kontroly se následně nechali odstát po dobu 10 minut.

3.3 Příprava kalibračních standardů

Ze sady byl vyjmut standardizovaný kalibrační lyofilizát (STD 0). Ten byl následně rozpuštěn v 250 µl deionizované vody. Následně byl STD 0 několikrát otočen ve vialce, vortexován a ponechán ve vialce po dobu 10 minut odstát. Poté byl STD 0 ředěn podle znázornění na obr.č.19 a tabulky 2.

Tab. 2. Přehled markerů, protilátek a jejich funkce

STD	Předchozí standard	Assay buffer	STD 0 v 250 μl	Ředění
1	75 μl	150 μl		3x
2	75 μl	150 μl		3x
3	75 μl	150 μl		3x
4	75 μl	150 μl		3x
5	75 μl	150 μl		3x
6	75 μl	150 μl		3x
7	75 μl	75 μl		2x
8	75 μl	75 μl		2x
9	75 μl	75 μl		2x
10	75 μl	75 μl		2x
11	75 μl	75 μl		2x



Obr. 19. Schématické znázornění ředění standardů; převzato a upraveno [67]

4. Příprava promývacího pufru (1x Wash Buffer)

10x Wash Buffer byl temperován na pokojovou teplotu (RT), aby se soli v roztoku plně rozpustily. Poté byl připraven požadovaný 1x Wash Buffer smícháním 30 ml 10x Wash Bufferu s 270 ml deionizované vody.

5. Příprava 96 jamkové destičky

Do každé jamky bylo napipetováno 200 μ l Assay Bufferu. Destička byla míchaná na třepáče destiček (plate shaker) při 450 x rpm po dobu 10 min. při RT. Pufř byl poté vylit vyklepnutím a osušen na buničině.

6. Samotné pipetování standardů, kontrol a vzorků

Do 96 jamkové destičky byly napipetovány předpřipravené standardy (STD1 až STD11), pufř pro background a kontroly (QC1, QC2) podle tabulky 3. Do jednotlivých jamek pro standardy, background a kontroly bylo napipetováno 25 μ l Serum matrix. Do jamek pro vzorky bylo pipetováno 25 μ l Assay Bufferu.

Centrifugovaná plazma a CSF z jednotlivých zkumavek byla napipetována v technických duplikátech do destičky. Do příslušných jamek bylo napipetováno 25 μ l vzorku.

Tab. 3. Přehled 96 jamkové destičky se vzorky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P-STD1	P-STD5	P-STD9	P-WT1	P-TG-HD1	P-QC1	C-STD1	C-STD5	C-STD9	C-WT1	C-TG-HD1	C-QC1
B	P-STD1	P-STD5	P-STD9	P-WT1	P-TG-HD1	P-QC1	C-STD1	C-STD5	C-STD9	C-WT1	C-TG-HD1	C-QC1
C	P-STD2	P-STD6	P-STD10	P-WT2	P-TG-HD2	P-QC2	C-STD2	C-STD6	C-STD10	C-WT2	C-TG-HD2	C-QC2
D	P-STD2	P-STD6	P-STD10	P-WT2	P-TG-HD2	P-QC2	C-STD2	C-STD6	C-STD10	C-WT2	C-TG-HD2	C-QC2
E	P-STD3	P-STD7	P-STD11	P-WT3	P-TG-HD3		C-STD3	C-STD7	C-STD11	C-WT3	C-TG-HD3	
F	P-STD3	P-STD7	P-STD11	P-WT3	P-TG-HD3		C-STD3	C-STD7	C-STD11	C-WT3	C-TG-HD3	
G	P-STD4	P-STD8	P-BKG	P-WT4	P-TG-HD4		C-STD4	C-STD8	C-BKG	C-WT4	C-TG-HD4	
H	P-STD4	P-STD8	P-BKG	P-WT4	P-TG-HD4		C-STD4	C-STD8	C-BKG	C-WT4	C-TG-HD4	

7. Příprava magnetických kuliček

Lahvička s premixed magnetic beads byla sonikovaná po dobu 30 sekund a vortexovaná po dobu 1 minuty. Následně bylo 25 µl magnetických kuliček napipetováno do každé jamky.

8. Inkubace

Vzorky byly inkubovány na třepačce destiček při 450 x rpm, při 4 °C přes noc (16-18 hodin).

9. Promývání

Destička se vzorky byla po inkubaci položena na magnet na 60 sekund. Tento magnet se používá k rychlému a efektivnímu odstranění supernatantu (tekutiny) z kuliček po inkubaci s vzorky nebo reagensy. Poté byly vzorky slity a osušeny. Následně byla destička sundána z magnetu a promyta 200 µl wash buffrem. Tento proces byl zopakován a destička byla 3x promyta.

10. Detection antibodies

Detekční protilátky byly do všech jamek napipetovány v 50 µl.

11. Inkubace

Destička s detekčními protilátkami byla inkubovaná po dobu 2 hodin při pokojové teplotě na třepačce.

12. Streptavidin-Phycoerythrin

Do všech jamek s detekčními protilátkami bylo napipetováno 50 µl streptavidinu-phykoerythrinu.

13. Inkubace

Destička byla po dobu 30 minut inkubována při pokojové teplotě na třepačce.

14. Promývání

Destička byla třikrát promyta za pomoci magnetu viz. 9.

15. Sheath Fluid

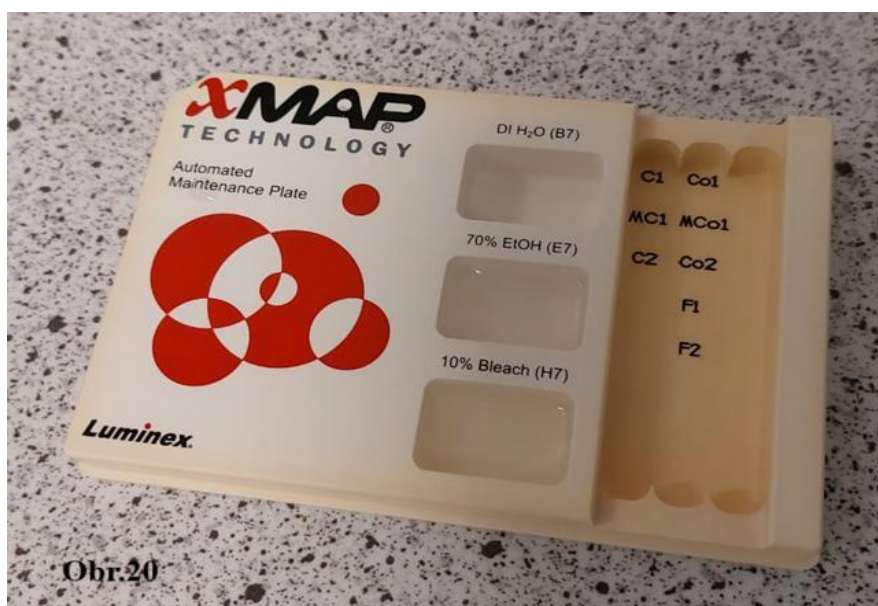
Do destičky bylo napipetováno 100 μ l sheath fluid a destička byla vložena na 5 minut na třepačku.

16. Čištění a kalibrace

Před měřením byl přístroj pro Luminex 200 se softwarem xPONENT 3.1.871.0 (Luminex Corp., Austin, TX) nakalibrován podle instrukcí výrobce a bylo jeho provedeno čištění.

17. Měření na přístroji Luminex

Měření a následně čtení výsledků zabralo cca 1 hodinu.



Obr. 21. Destička pro čištění a kalibraci Luminex; vlastní fotografie



Obr. 20. Luminex 200; vlastní fotografie

4.1.2 Stanovení hladiny cytokinů

V rámci metody Luminex byla stanovena hladina cytokinů u miniprasat s HN (n=4) (TG-HD) a kontrolních miniprasat (n=4) (WT) v plazmě a mozkomíšním moku (CSF). Tyto zvířata byla ve věku 48 měsíců.

4.1.3 Statistická analýza

K vypracování statistické analýzy cytokinů a pro tvorbu grafů byl použit program Prism ve verzi 6 (software GraphPad). Statisticky významné rozdíly byly posuzovány na hladině významnosti $p < 0,1$, což představuje mírně uvolněné kritérium, které umožňuje identifikaci trendů při menším vzorku dat.

Cytokiny, u kterých p-hodnota překročila stanovenou hranici 0,1, byly považovány za statisticky nevýznamné. Pro vyhodnocení výsledků byl použit nepárový t-test.

4.1.4 Výsledky analýzy mozkomíšního moku

Detekce cytokinů v mozkomíšním moku

V CSF TG-HD a WT byly pozorovány signifikantní rozdíly u Interleukin 1 β a Interferonu α .

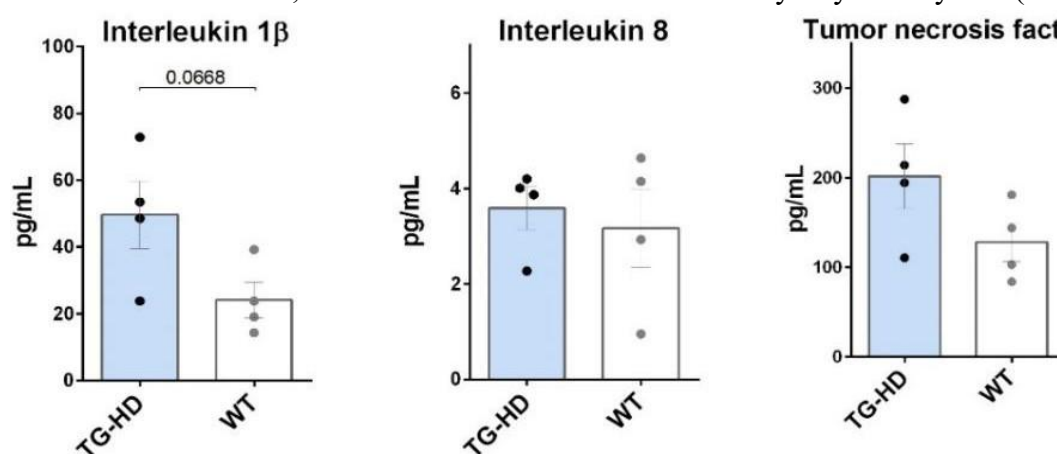
V této CSF byly také sledovány koncentrace několika dalších důležitých cytokinů: Interleukin 8, Tumor Necrosis Factor α , Interleukin 4, Interleukin 10 a Interferon γ . Tyto cytokiny byly vybrány jako zástupci různých skupin cytokinů, které hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi. Mezi tyto skupiny spadají prozánětlivé, protizánětlivé cytokiny a interferony. Tyto však nevykazovaly statisticky významné hodnoty. Byly pozorovány jen určité trendy.

Prozánětlivé cytokiny v mozkomíšním moku 1

Interleukin 1 β (IL-1 β) vykazuje statisticky významný rozdíl mezi skupinami TG-HD a WT ($p = 0,0668$).

Interleukin 8 (IL-8) nevykazuje statistický významný rozdíl mezi TG-HD a WT v daném časovém intervale² (viz. obr.č.22).

Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) vykazuje vizuálně zvýšený trend v koncentracích u TG-HD ve srovnání s WT, ale tento rozdíl není statisticky významný³ (viz. obr.č.22).



Obr. 22. Výsledky CSF – prozánětlivé cytokiny

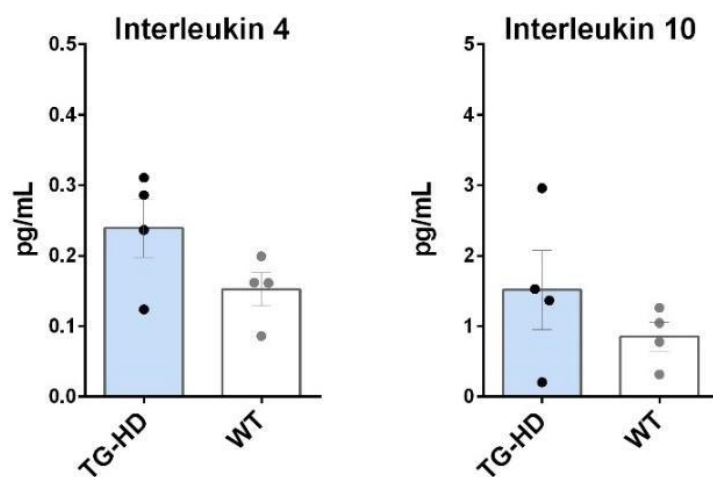
¹ Interleukin 1 β , Interleukin 8 a Tumor Necrosis Factor α spadají do skupiny prozánětlivých cytokinů. Jejich hladiny nám poskytují cenné informace o imunitní odpovědi a zánětlivých procesech v organismu.

², ³ Absence statistické významnosti může být způsobena malým počtem vzorků.

Protizánětlivé cytokiny v mozkomíšním moku

Interleukin 4 (IL-4) nevykazuje statisticky významný rozdíl mezi TG-HD a WT, i když je hladina IL-4 vyšší u TG-HD v porovnání s WT (viz. obr.č.23).

Interleukin 10 (IL-10) se nejeví jako statisticky významný⁴³ (viz. obr.č.23).



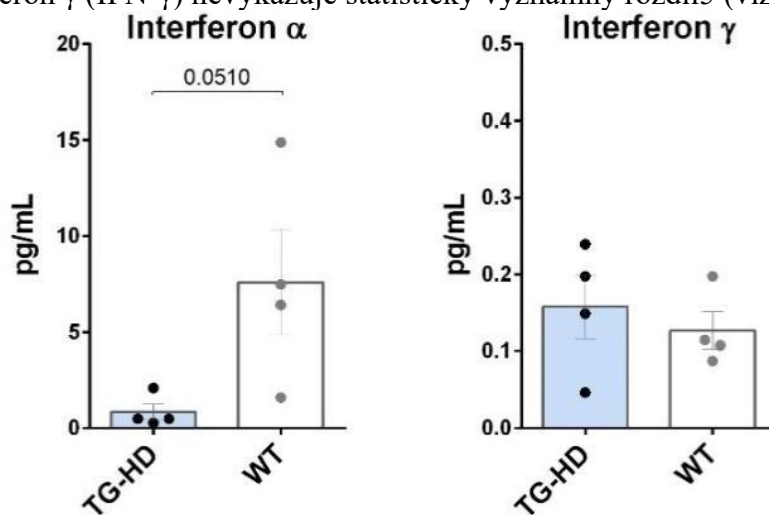
Obr. 23. Výsledky CSF – protizánětlivé cytokiny

⁴ Absence statistické významnosti může být způsobena malým počtem vzorků.

Interferony v mozkomíšním moku

Interferon α (IFN- α) vykazuje statisticky významný rozdíl mezi zvířaty TG-HD a WT skupin ($p = 0,0510$) (viz. obr.č.24).

Interferon γ (IFN- γ) nevykazuje statisticky významný rozdíl⁵ (viz. obr.č.24).



Obr. 24. Výsledky CSF – interferony

⁵ Absence statistické významnosti může být způsobena malým počtem vzorků.

4.1.5 Interpretace výsledků detekce cytokinů v mozkomíšním moku a diskuse

Interleukin 1 β

Zvýšená koncentrace IL-1 β u TG-HD může indikovat vyšší neurozánětlivou aktivitu (viz. obr.č.22).

Signifikantně zvýšené hladiny prozánětlivého cytokinu interleukinu 1 β v mozkomíšním moku, mohou být spojené s neurozánětlivými procesy, s kterými se setkáváme v patogenezi HN. IL-1 β je významný pro svou roli v imunitní signalizaci, přispívá k vytvoření zánětlivého prostředí, které zhoršuje funkce neuronů a podporuje neurodegeneraci [82]. Zároveň se podílí na aktivaci mikroglií, které představují hlavní imunitní buňky CNS [82]. Takto zvýšené hladiny IL-1 β v mozkomíšním moku u TG-HD miniprasat lze považovat za biomarker zánětu spojeného s HN. Zvýšené hladiny IL-1 β byly pozorovány u myšího modelu HN i u pacientů s HN [80, 81,83].

TNF- α

Zvýšení (nesignifikantní) hodnot TNF- α u TG-HD zvířat naznačuje potenciální zapojení do imunitní odpovědi. TNF- α se podílí na zánětlivé odpovědi a stimuluje aktivaci mikroglií. Ty následně uvolňují prozánětlivé faktory, jako je IL-1 β . Zvýšené koncentrace TNF- α mohou přímo přispívat k neurálnímu poškození prostřednictvím apoptózy a zvýšeného oxidačního stresu. Je otázkou, zda u starších zvířat nebo při větším množství testovaných jedinců bychom nedospěli k průkaznějším výsledkům.

Interferon α

Interferon α hraje klíčovou roli nejen při antivirové imunitní odpovědi, ale také při zánětlivých procesech v nervovém systému. IFN- α má schopnost modulovat aktivaci mikrogliie a dalších imunitních buněk v CNS, což může mít vliv na průběh neurozánětu. Snížené hodnoty IFN- α u TG-HD naznačují dysregulaci imunitní odpovědi, a také potvrzují přítomnost neurozánětu, který je naznačen zvýšenými hladinami IL-1 β a TNF- α [85]. TG-HD ve věku 48 měsíců vykazuje signifikantně snížené hodnoty interferonu α v porovnání s WT miniprasaty. Tento jev může negativně ovlivnit obranyschopnost organismu proti zánětu a poškození.

Interferon γ

Prozánětlivý cytokin interferon γ , který je produkovaný natural killer (NK) buňkami, vykazuje mírně zvýšený trend u TG-HD prasat. Tento trend u TG-HD reflektuje aktivaci imunitní odpovědi na mechanismy, které jsou spojené neurodegenerativními procesy [83].

Cytokiny IL-4 a IL-10

Protizánětlivé cytokiny IL-4 a IL-10 neprokázaly významné rozdíly, ale z jejich mírně vyšších hladin u TG-HD můžeme usuzovat, že se jedná o pokus organismu o kompenzaci zánětlivé reakce indukované prozánětlivými cytokiny.

Studie a výsledky průzkumů vědců jsou rozporuplné. Některé naznačují, že IL-4 by se měl signifikantně snížit [84]. Naopak se jevil v jiných studiích jako signifikantně zvýšená hodnota [81].

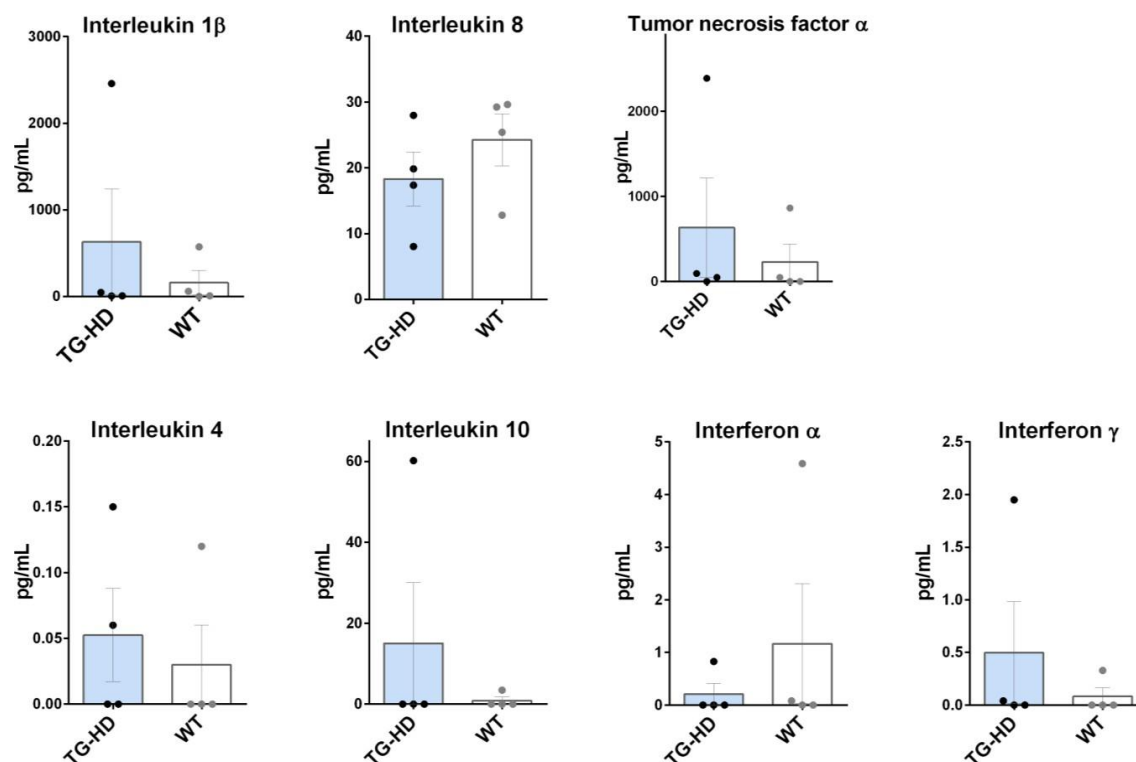
Studie IL-10 vypovídali o zásadně zvýšených hodnotách [83].

Absence statistické významnosti může být způsobena malým počtem vzorků, což omezuje sílu analýzy. I přesto mohou být tyto trendy biologicky relevantní.

4.1.6 Výsledky analýzy plazmy

Detekce cytokinů v plazmě

V plazmě 48měsíčních TG-HD prasat a jejich WT kontrol byly měřeny koncentrace cytokinů: IL-1 β , IL-8, TNF α , IL-4, IL-10, IFN- α a IFN- γ (viz. obr.č.25).



Obr. 25. Grafy s výsledky analýzy cytokinu v plazmě

Mezi skupinami TG-HD a WT nebyly detekovány statisticky významné rozdíly. Přesto zde sledujeme zvyšující se trendy koncentrací u IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-10 a IFN- γ u TG-HD.

V klinických studiích se setkáváme s IL-1 β , IL-10 mají signifikantně větší hodnotu u TG-HD [83].

U TNF α , IFN- γ jsou pozorovány nesignifikantní změny v plazmě [83].

Naopak u WT jsou zvýšené koncentrace u IFN- α . Tento jev může naznačovat přítomnost jiné zánětlivé imunitní odpovědi například v souvislosti s infekcí.

Absence statistické významnosti může být způsobena omezeným počtem zvířat nebo variabilitou v individuálních odpovědích.

4.1.7 Detekce cytokinů v plazmě a interpretace jejich výsledků

V plazmě 48měsíčních TG-HD miniprasat a jejich WT kontroly jsme pomocí technologie Luminex diferencovali 7 cytokinů. Žádný z nich nevykazoval signifikantně zvýšené hodnoty, což naznačuje, že mezi TG-HD a WT nebyly zásadní statistické rozdíly. Přesto lze tyto výsledky interpretovat jako zřetelné trendy.

U TG-HD pozorujeme zvýšený trend cytokinů IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-10 a IFN γ . Naopak u WT kontroly vykazoval zvýšenou hladinu IFN α .

Tyto výsledky mohou být způsobeny omezeným počtem zvířat nebo variabilitou v jednotlivých odpovědích. Přítomnost těchto trendů naopak poukazuje na biologický potenciál. Ten je v momentálním stavu si možné vykládat několika způsoby.

Z mého pohledu je nejpravděpodobnější, že se jedná o indikaci zánětlivé aktivity.

4.1.8 Shrnutí

Některé vzorky nemohly být použity, protože byly zkresleny respiračním infektem u daných TG-modelů.

Zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů, jako je IL-1 β (signifikantně) a TNF- α (v uvedeném vzorku mírně zvýšen), potvrzují přítomnost zánětlivých změn v mozkomíšním moku TG-HD zvířat. U HN hraje neuroinflamace klíčovou roli v progresi neurodegenerace. Signifikantně snížená koncentrace IFN- α v mozkomíšním moku TG-HD zvířat ukazuje na možnou dysregulaci imunitní odpovědi, což může přispívat k patologii HN.

Zánětlivé procesy hrají významnou roli v patogenezi Huntingtonovy choroby a mohou se stát cílem terapeutických intervencí. IL-1 β a IFN α by mohly být užitečnými potenciálními biomarkery pro sledování zánětlivých změn v CSF spojených s Huntingtonovou chorobou. Cytokinový profil v CSF naznačuje aktivaci zánětlivých drah u TG-HD, což podporuje hypotézu o zapojení imunitního systému do patogeneze HD.

Přestože statisticky významné rozdíly nebyly mezi cytokiny v plazmě TG-HD a WT prasaty pozorovány, grafická vyobrazení naznačovala zřetelné trendy zvyšování prozánětlivých a regulačních cytokinů. Naopak pozorované snížené hodnoty u interferonu α u TG-HD může naznačovat dysfunkci obranyschopnosti organismu.

4.1.9 Badatelský výhled

Studium cytokinů zapojených do zánětlivé odpovědi poskytuje komplexní pohled na dysregulaci imunitního systému u HN. Luminex je moderní imunologická metoda pro analýzu hladin cytokinů, které vypovídají o stavu obranyschopnosti organismu. Longitudinálním sledováním cytokinů na větším souboru chceme prokázat, že hladiny cytokinů se mění s progresí onemocnění a jsou vhodným markerem pro sledování aktivity onemocnění.

4.2 Experiment číslo 2

Tento experiment představuje zpracování mononukleárních buněk periferní krve. Tyto buňky budou následně charakterizovány a diferencovány na stroji, který se nazývá průtokový cytometr.

4.2.1 Metody a soubory

V rámci experimentu číslo 2 máme také základní zpracování, které musí vzorek podstoupit, než dojde k samotnému měření. V tomto případě se jedná o izolaci mononukleárních buněk z periferní krve. Následně můžeme vzorek změřit na průtokovém cytometru BD FACS Aria™ II Cell Sorter.

Každý krok – od odběru přes zpracování až po skladování – musí být optimalizován pro daný typ analýzy. Celkově je pečlivé zacházení se vzorky nezbytné pro dosažení spolehlivých a reprodukovatelných výsledků.

Tab. 4. Přehled metod a souborů pro experiment číslo 2

Metoda	Materiály
Příprava mozkomíšního Moku	Mozkomíšní mok (1-5 ml)
Průtoková cytometrie	PBMCs: 2x WT, 1x TG-HD ve věku 36 měsíců
	Protilátky: CD14; CD163; SLA-DR; CD172a; CD3ε; CD25; CD11c; CD45
	Fluorescenční barvy: Fykoerythrin (PE); Fluorescein isothiocyanate (FITC); Alexa Fluor 647 (AF647)
	Stanovení viability: Propidium jodid

Izolace mononukleárních buněk periferní krve

Mononukleární buňky periferní krve (PBMCs) představují populaci bílých krvinek s jádrem, které byly izolovány z periferního krve. Jedná se o buňky, které se podílejí na imunitní odpovědi. PBMCs zahrnují lymfocyty a monocyty. Mezi lymfocyty spadají jak B-lymfocyty a T-lymfocyty tak také tzv. přirození zabíječi (NK buňky). NK buňky se podílejí především na eliminaci nádorových buněk. PBMCs se izolují z krve pomocí separačního média a hustotní gradientové centrifugace, což umožňuje jejich efektivní oddělení od ostatních krevních buněk.

Postup:

1. Získání vzorku krve (provádí veterinář)

Krev je odebírána do zkumavek s antikoagulačním činidlem, aby se zabránilo jejímu sražení.

2. Příprava hustotního gradientu (dále vlastní práce)

2.1 Prvním krokem bylo připravit hustotní separační médium Ficoll-Paque. Odpipetovalo se 11,25 ml Ficollu a přeneslo do prázdné zkumavky.

2.2 Poté probíhala příprava vzorku krve. Krev o objemu 5 ml byla naředěna v 10 ml fosfátovém pufru (1x PBS).

2.3 Naředěná krev byla následně pomalu přidávána do zkumavky obsahující Ficoll.

3. Centrifugace

Směs krve a Ficollu byla vložena do centrifugy a centrifugována při 400 x g po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Rotor centrifugy byl předem nastaven na mód plynulého zastavení bez použití brzdy.

4. Izolace PBMCs

5. Po centrifugaci se oddělily vrstvy: plazma, PBMCs, Ficoll, erytrocyty a granulocyty (viz obr.č.26, 27). Z příslušné vrstvy byly odpipetovány PBMCs. Promytí a centrifugace

5.1 Odebraný vzorek PBMCs byl promyt 1x PBS.

5.2 Následně byl vzorek znovu centrifugován při $300 \times g$ po dobu 5 minut, čímž došlo k odstranění zbytků Ficollu z PBMCs.

5.3 Po dokončení centrifugace byl vzorek vyjmut z přístroje a znovu byla peleta promyta 1x PBS.

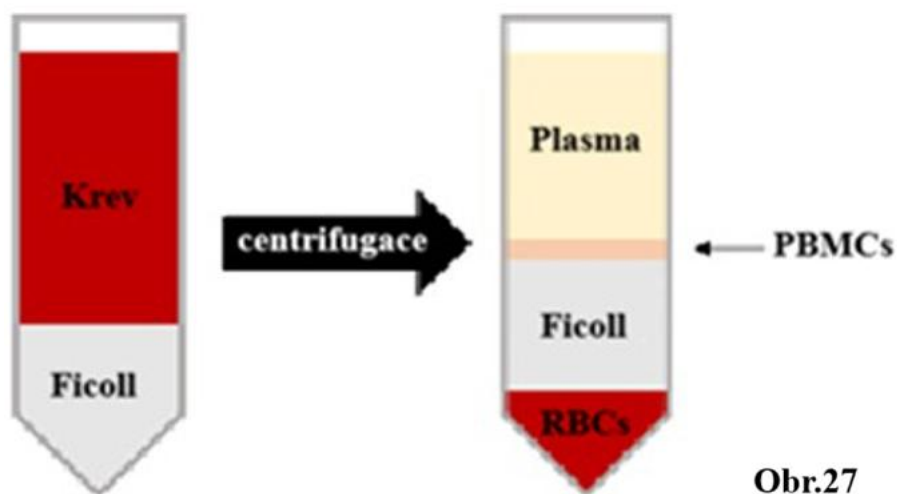
5.4 Po promytí byl vzorek naposledy vložen do centrifugy ($200 \times g$, 12 min.). Tímto došlo k odstranění případných krevních destiček.

6. Počítání a úprava koncentrace

V tento moment byl vzorek předpřipraven pro spočítání buněk. To je provedeno pomocí automatického počítadla Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer (*Beckmann Coulter*).

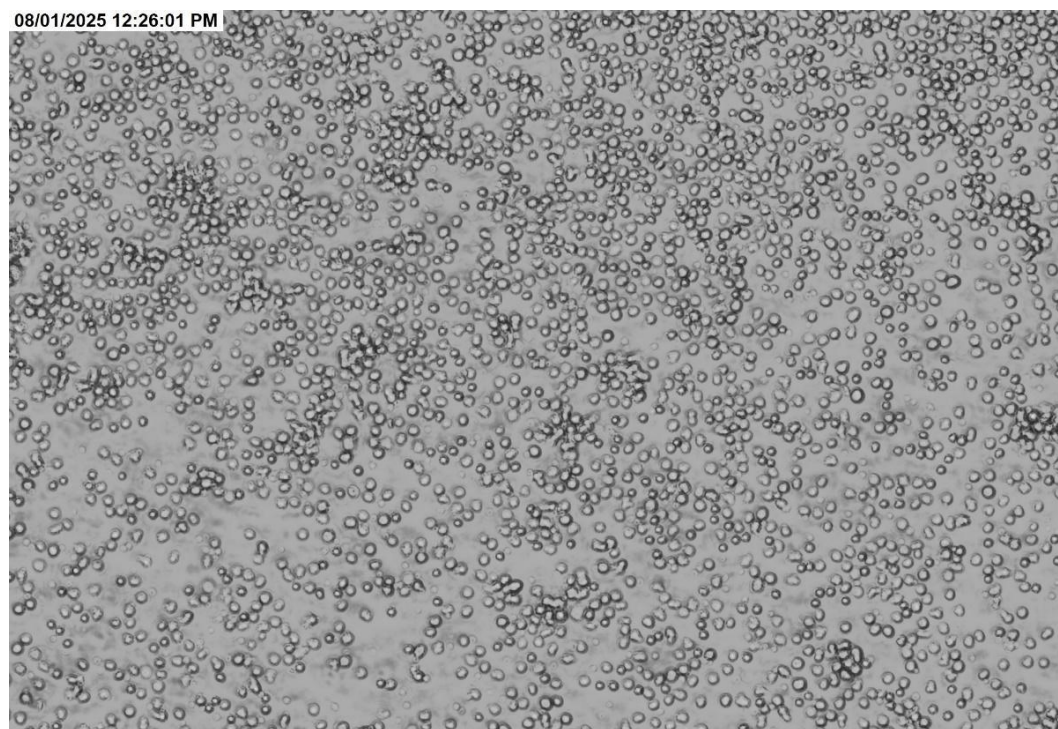
7. Světelná mikroskopie

Buněčná suspenze PBMCs byla následně přenesena do kultivační Petriho misky obsahující kultivační médium DMEM-F12 doplněné 10 % fetálním bovinním sérem (FBS). K vizualizaci buněk byl použit invertovaný světelný mikroskop Olympus IX73 s celkovým zvětšením $100\times$ a $200\times$ (viz. obr.č.28,29).

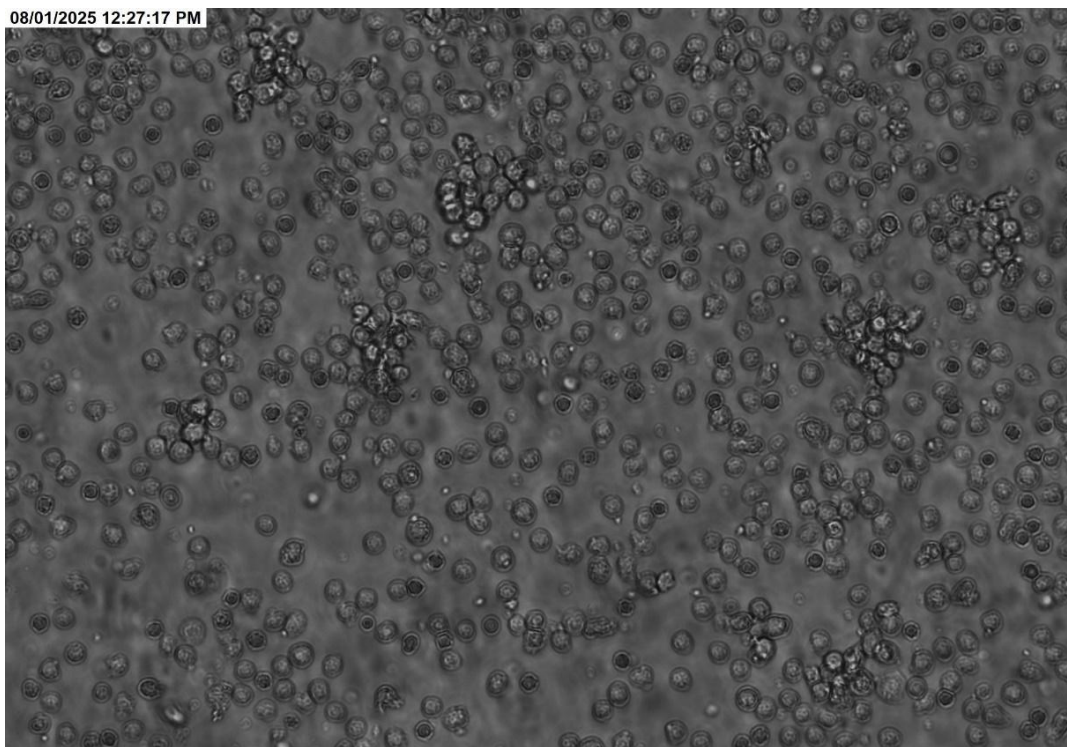


Obr. 27. Frakce krve po centrifugaci na separačním médiu; vlastní fotografie

Obr. 26. Teoretické schéma centrifugace směsi krve a Ficollu; RBCs označuje erythrocyty; převzato a upraveno [66].



Obr. 28. Snímek izolovaných PBMCs; zvětšení 100×; vlastní fotografie



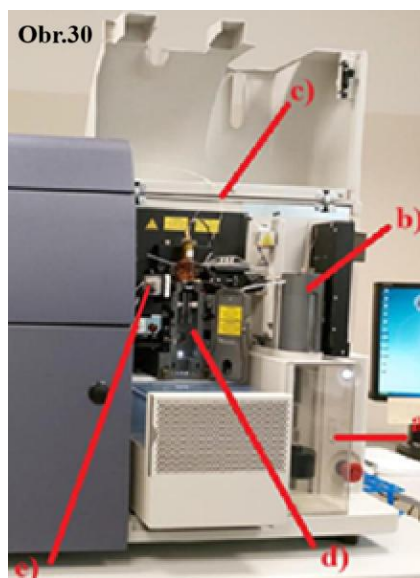
Obr. 29. Snímek izolovaných PBMCs; zvětšení 200×; vlastní fotografie

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je fluorescenční metoda umožňující kvantifikaci a charakterizaci buněk [76]. V této práci se zaměřujeme na buňky zapojené do imunitní odpovědi, mezi něž patří lymfocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Jedná se o rychlou a přesnou metodu, která umožňuje současné měření více parametrů u velkého množství buněk, což ji činí efektivním nástrojem pro imunologické analýzy.

Pro tuto metodu potřebujeme přístroj, který nazýváme průtokový cytometr. Tento typ cytometru se skládá z optické části, elektroniky, fluidního systému a laserové aparatury [77].

Princip měření spočívá v tom, že do cytometru je zaveden vzorek, kde je nasáván přes kapiláru do fluidního systému, kterým protéká neutrální tekutina. V té se vzorek naředí. Fluidní systém rozvede koncentrát s buňkami do místa, kde se usměřňuje množství protékající kapaliny. Tento proces redukuje průtok, tzv. flow, na jednotlivé kapky (viz obr.č.30). Toto je zajištěno tlakem [76]. V každé kapce je přístrojem kontrolovaná koncentrace měřeného materiálu. Tyto kapky jsou následně vedeny do rozšířeného válcovitého prostoru, kde dochází k protnutí kapek s lasery. Zaměření laserů, v tomto případě modrého a červeného, způsobí, že na optické aparatuře vznikne stín, který vzniká přímým rozptylem (forward scatter) a bočním rozptylem (side scatter) světla. Tento stín je zaznamenán a na základě velikosti a tvaru stínu jsou záznamy třízeny do různých skupin. Tyto skupiny jsou poté ohraničeny, určeny a charakterizovány. Pro stanovení viability buněk je klíčové pochopit nejen vlastnosti sledovaných buněk, ale i barviva a markerů, které se používají k označení specifických charakteristik, jež je třeba analyzovat.



*Obr. 30. Popis průtokového cytometru:
a) komora; b) místo zavedení vzorku do
hadičkového systému; c) hadičkový
systém; d) místo průtoku vody; e) místo
průchodu laserů; vlastní fotografie a
popis*



Obr. 31. Průtokový cytometr; vlastní fotografie

Postup:

1. Izolace PBMCs

Z krve byly izolovány PBMCs.

2. Blokace nespecifických vazeb

K vzorku PBMCs bylo napipetováno 10% Goat sérum, které odblokuje nespecifické vazby. Tento vzorek byl inkubován po dobu 15 minut, 4 °C.

3. Značení primární protilátkou

Vzorek byl označen primárními protilátkami. V našem případě byly použity protilátky CD14, CD3ε, CD172a, CD11c, CD25, CD163, SLA IIDR a CD45.

Následně je vzorek inkubován při 4 °C po dobu 30 minut.

4. Promytí

Po 30 minutách byl vzorek vyjmut z lednice a dvakrát promyt 1% Goat sérem.

5. Značení sekundární protilátkou

Do promytého vzorku byla přidána sekundární protilátka, která slouží jako fluorescenční indikátor.

6. Inkubace

Vzorek se sekundárními protilátkami byl inkubován po dobu 30 minut za stejných podmínek jako u první inkubace.

7. Promytí

Po inkubaci byl vzorek promyt 1% Goat sérem. Následně byl vzorek promyt 1x PBS.

8. Přidání markeru viability

Do vzorku byl přidán propidium jodid, který nám rozlišil mrtvé a živé buňky.

9. Měření na průtokovém cytometru

Po přípravě vzorku bylo provedeno měření na průtokovém cytometru FACS ARIA II v programu BD FACSDiva. Data byla následně analyzována pomocí softwaru FlowJo, pomocí tzv. gatingové strategie.

4.2.2 Průtoková cytometrie a její specifika pro praktickou práci

Pomocí průtokové cytometrie jsme stanovovali charakteristiku imunitních buněk u TG-HD a WT. V našem případě jsme využili strategii umožňující charakterizaci více parametrů na jednu vitální buňku.

Při tomto multiparametrickém měření jsme použili několik markerů pro jednotlivé parametry. Pro tyto účely jsme aplikovali markery (viz tab.č.4) a propidium jodid (PI), který funguje na principu detekce membránové integrity. Ta určuje neprůchodnost některých fluorescenčních značek cytoplazmatickou membránou živých buněk.

Tab. 5. Přehled protilátek použitých k charakterizaci buněk.

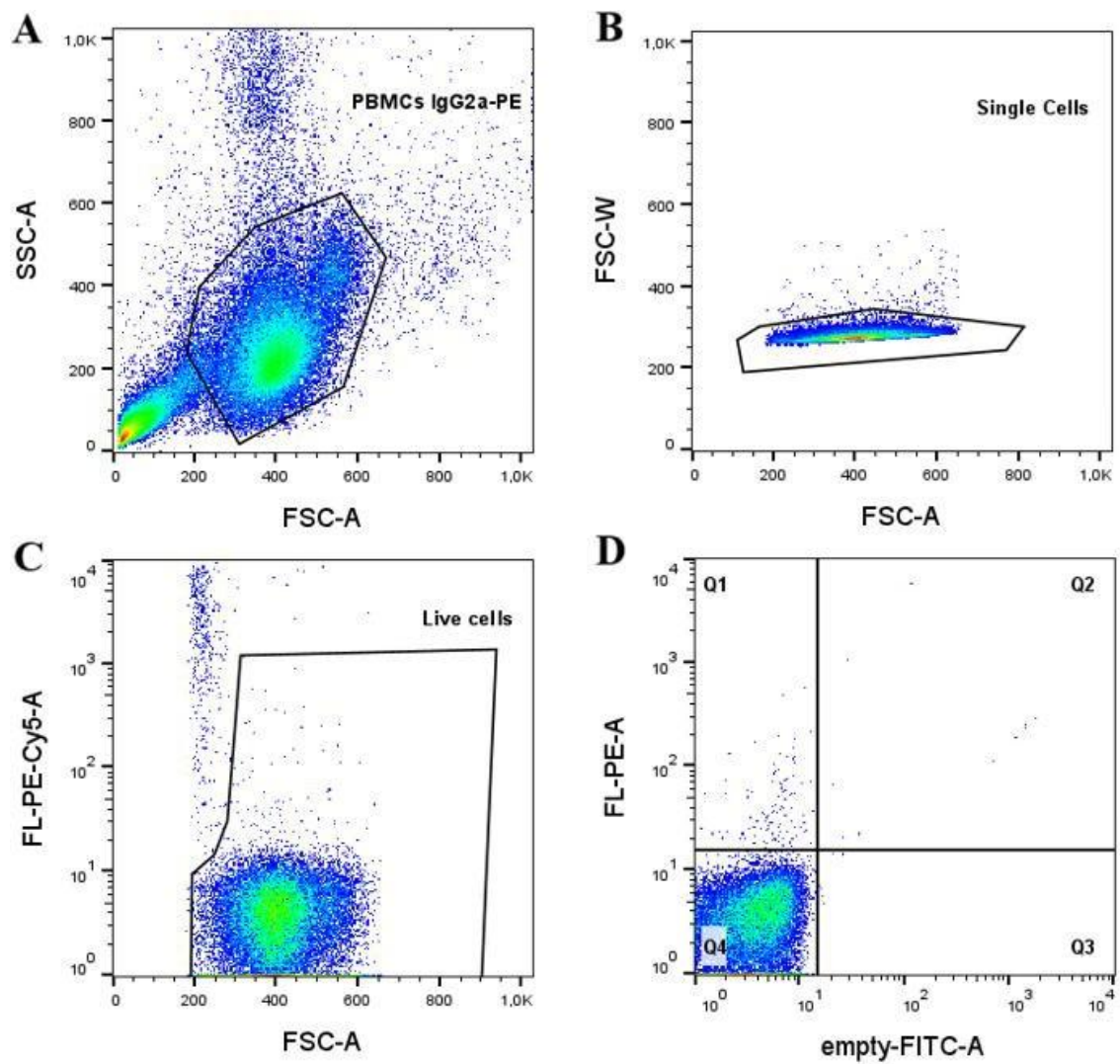
Marker	Konjugát	Izotyp	Klon	Objem na 100 µL	Dodavatel	Kat. číslo
CD3ε	AF647	IgG2a, k	BB23-8E6-8C8	0.5 µL	BD Bioscience	561476
CD11c	-	IgG1	3A8	3 µL	BIO-RAD	MCA6150G A
CD14	-	IgG2a, k	TUK4	5 µL	Santa Cruz Biotechnolog y	sc-19588
CD25	-	IgG1	K231.3B2	1 µL	BIO-RAD	MCA1736G A
CD45	FITC	IgG1	K252.1E4	10 µL	BIO-RAD	MCA1222F
CD163	FITC	IgG1	2A10/11	10 µL	BIO-RAD	MCA2311F
CD172a	-	IgG1	BL1H7	2 µL	BIO-RAD	MCA2312
SLA CLASS II DR	FITC	IgG2b	2E9/13	10 µL	BIO-RAD	MCA2314F

4.2.3 Analýza výsledků

Po dokončení měření vzorků získáme výsledky v standardizované formě. Pro jednotlivé markery, které charakterizují dané buňky, je nutno vybrat správnou část buněčné populace a zajistit, že software zaměřil analýzu právě na tuto populaci. Toto dosahujeme pomocí tzv. gating strategie. Tzv. gating (vymezení oblastí zájmu) umožňuje selektivní analýzu sledované populace a zajišťuje vysokou kvalitu výsledků tím, že eliminuje zkreslení způsobené mrtvými buňkami, dublety a nežádoucími buněčnými populacemi. Abychom ověřili, že se nejedná o nespecifické interakce mezi protilátkami při průtokové cytometrii, je nutné provést izotypovou kontrolu. K tomu používáme protilátku, která má stejný izotyp a není specifická pro daný antigen.

Po provedení úprav měření, ověření nespecifické vazby protilátek pomocí izotypové kontroly a specifikace použitých protilátek v softwaru získáme finální výsledky, které lze následně analyzovat.

Celková příprava a analýza vzorků trvala 3,5 až 4 hodiny.



Obr. 32. Příklad gatingové strategie s izotypovou kontrolou IgG2a-PE; A gate „PBMCs IgG2a“ označuje hlavní populaci buněk PBMCs; B – gate „Single cells“ slouží na odstranění dubletů a zachování pouze jednotlivých buněk; C – gate „Live cells“ umožňuje vyloučení mrtvých buněk pomocí barvení propidium jodidem; D – gate vymezuje specifickou buněčnou populaci, která je předmětem našeho zájmu.

4.2.4 Výsledky průtokové cytometrie

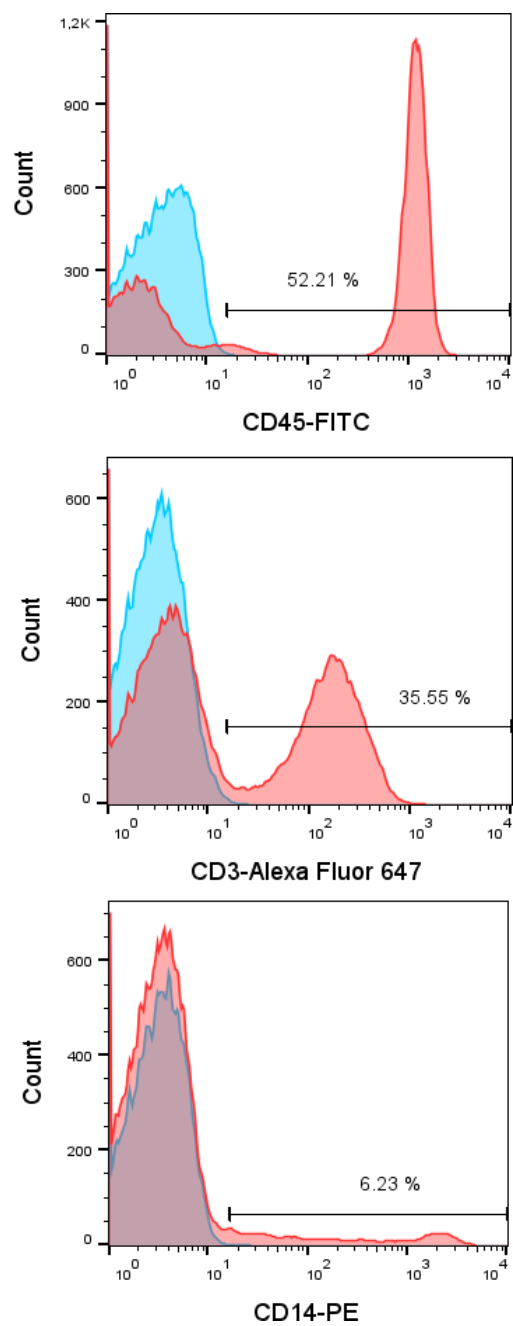
Charakterizace imunitních buněk – Jednoparametrická průtoková cytometrie

Imunitní buňky (PBMCs) byly izolovány z plné krve a charakterizovány pomocí monoklonálních protilátek proti CD45, CD3 ϵ a CD14. Analýza umožnila stanovit procentuální zastoupení PBMCs v populaci imunitních buněk. Na základě těchto markerů byly získány základní informace o hlavních imunitních subpopulacích.

Použité markery:

CD45 je marker, který je exprimovaný všemi leukocyty. Pomocí něho určujeme celkové procento imunitních buněk ve vzorku. CD3 ϵ marker je specifický pro T-lymfocyty. Tento

marker nám tedy říká, kolik procent z celkové populace buněk tvoří T-lymfocyty. CD14 je marker monocytů a makrofágů a podává informace o jejich zastoupení ve vzorku.



Obr. 33. Histogramy znázorňují zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací v krvi. Modrý vrchol – izotypová kontrola. Červený vrchol – sledovaná populace buněk značená specifickou protilátkou (CD45, CD3ε, CD14).

Charakterizace imunitních buněk – Multiparametrická analýza

Pro detailnější analýzu imunitních buněk bylo použito dvojité barvení, které umožňuje současnou detekci dvou markerů na jedné buňce. Tím lze lépe rozlišit jednotlivé subpopulace leukocytů a jejich zastoupení ve vzorku.

Pro správné pochopení výsledků této práce je nutno popsat jednotlivé kombinace parametrů.

CD3/CD25

Pomocí markerů CD3 a CD25 byla celková populace imunitních buněk rozdělena do tří hlavních subpopulací.

Subpopulace:

CD3+ CD25+

Tato subpopulace zahrnuje aktivované T-lymfocyty a regulační T-lymfocyty (Tregs) s vysokou expresí IL-2 receptoru. Tyto buňky jsou aktivované, což naznačuje, že byly stimulovány cytokiny jako IL-2.

CD3+ CD25-

Subpopulace zahrnuje naivní nebo neaktivované T-lymfocyty, které se nacházejí v klidovém stavu, bez stimulace IL-2. Tyto buňky jsou ve fázi, kdy ještě neprošly aktivací.

CD3- CD25+

Tato subpopulace zahrnuje aktivované imunitní buňky, kromě T-lymfocytů. Tuto skupinu tvoří tedy monocyty, NK buňky a B-lymfocyty. Tyto buňky mají vysokou expresi IL-2 receptoru, což naznačuje, že jsou aktivované nebo připravené na aktivaci.

CD14/CD163

CD14 a CD163 nám označují z celkové populace monocytů a makrofágy. Marker CD163 se váže na protizánětlivé, alternativně aktivované makrofágy a monocyty s protizánětlivým charakterem.

Subpopulace

CD14+ CD163+

Jedná se o část populace monocytů, která byla alternativně aktivována mohou mít protizánětlivý charakter.

CD14+ CD163-

Tato subpopulace zahrnuje klasické prozánětlivé monocyty.

CD14- CD163+

Subpopulace reprezentuje alternativně aktivované makrofágy, které se podílejí na protizánětlivé odpovědi.

CD11c/SLA II DR

Marker CD11c je používán pro identifikaci dendritických buněk. SLA II DR je (Swine Leukocyte Antigen II DR) specifický marker pro prasata, který je klíčový pro rozeznání antigen prezentujících buněk.

Subpopulace

CD11c+ SLA II DR+

Těmito markery byly označeny subpopulace aktivovaných dendritických buněk. Jedná se tedy o buňky, které jsou schopny prezentovat antigeny regulujícím T-lymfocytům prostřednictvím SLA II DR. Tento jev je významným krokem v adaptivní imunitní odpovědi, kdy dendritické buňky hrají roli ve stimulaci T-lymfocytů.

CD11c+ SLA II DR-

Tato subpopulace zahrnuje dendritické buňky bez exprese SLA II DR, respektive nezralé nebo migrující dendritické buňky.

CD11c- SLA II DR+

Subpopulace zahrnuje jiné antigen-prezentující buňky, které ale nejsou označeny markerem CD11c. Jedná se o monocyty, makrofágy anebo B- lymfocyty.

CD172a/SLA II DR

CD172a známý také jako SIRP α , je marker pro dendritické buňky a makrofágy. Díky SLA II DR zde rozlišujeme aktivované dendritické buňky a makrofágy které se podílejí na prezentaci antigenů a aktivaci T-lymfocytů.

Subpopulace

CD172a+ SLA II DR+

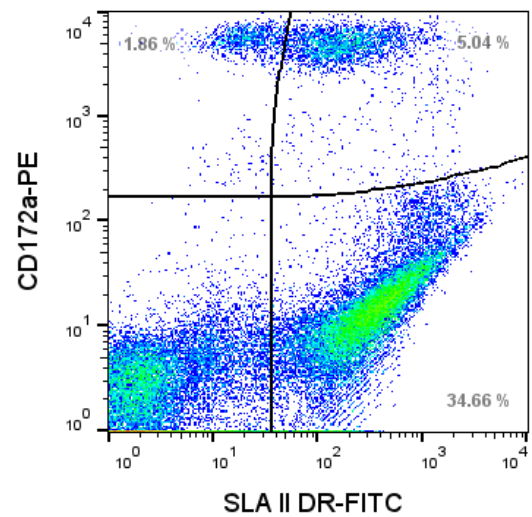
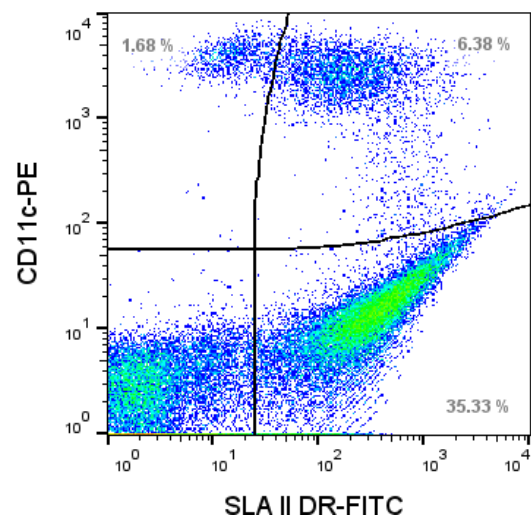
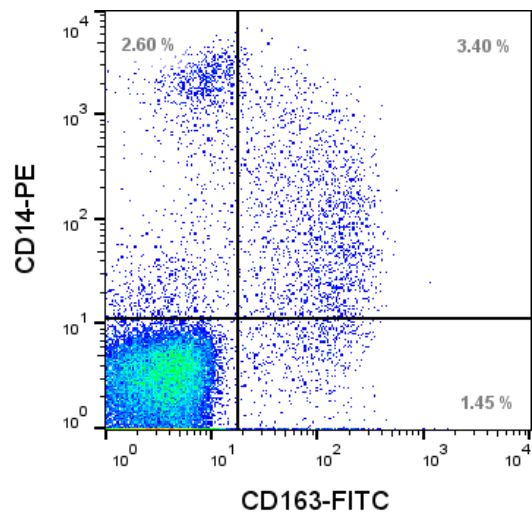
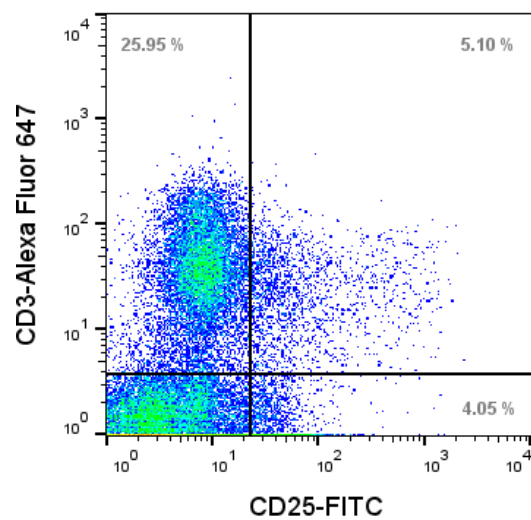
Tato subpopulace zahrnuje aktivované makrofágy nebo dendritické buňky, které se podílí na imunitní odpovědi a prezentují antigeny T- lymfocytům.

CD172a+ SLA II DR-

Subpopulace obsahuje neaktivované makrofágy nebo dendritické buňky, které ještě neprezentují antigeny anebo nejsou aktivně zapojené do imunitní odpovědi.

CD172a- SLA II DR+

Tato část populace představuje jiné antigen-prezentující buňky, jako například B-lymfocyty a aktivované T-lymfocyty.



Obr. 34. Charakterizace miniprasečích PBMCs pomocí FACS

Tab. 6. Přehled výsledků průtokové cytometrie

Marker	Zastoupení buněk v populaci		
	TG-HD	WT1	WT2
CD45+	52.21 %	56.98 %	64.30 %
CD3ε+	35.55 %	33.5 %	33.10 %
CD14+	6.23 %	8.26 %	7.40 %
CD3ε+ CD25-	25.95 %	25.50 %	-
CD3ε+ CD25+	5.10 %	4.02 %	-
CD3ε- CD25+	4.05 %	4.12 %	-
CD14+ CD163-	2.60 %	2.15 %	2.94 %
CD14+ CD163+	3.40 %	6.08 %	4.71 %
CD14- CD163+	1.45 %	2.68 %	3.43 %
CD11c+ SLA II DR-	1.68 %	2.24 %	-
CD11c+ SLA II DR+	6.38 %	8.45 %	-
CD11c- SLA II DR+	35.33 %	26.20 %	-
CD172a+ SLA II DR-	1.86 %	1.97 %	2.38 %
CD172a+ SLA II DR+	5.04 %	7.59 %	7.11 %
CD172a- SLA II DR+	34.66 %	26.30 %	54.10 %

4.3 Interpretace výsledků

CD45+ buňky

U TG-HD (52,21 %) prasete byl pozorován trend s mírně sníženými procenty než u WT (56,98 a 64,30 %). Tento trend může naznačovat možné rozdíly v imunitní odpovědi.

CD3+ buňky

V obou skupinách je podobné zastoupení T-lymfocytů. Tento jev naznačuje, že T-lymfocyty nejsou zásadně zasaženy.

CD14+ buňky

U TG-HD modelu byly pozorovány nižší hodnoty než u WT. U modelu TG-HD tvořily tyto buňky 6,23 %. U WT se jednalo o 8,26 a 7,40 %. Tento rozdíl by mohl vyplývat ze zánětlivých procesů HN. Naznačuje to také dysfunkční charakter monocytů. Problematické může být špatná diferenciaci nebo může jít o smísení různých subpopulací monocytů.

CD14+ CD163+

V případě populace CD14+ CD163+ se jedná o razantnější rozdíl mezi počtem alternativně aktivovaných monocytů. U TG-HD tvoří tato populace je 3,40 % naopak u WT jde o 6,08 a 4,71 %.

CD14- CD163+

U subpopulace CD14- CD163+ bylo pozorováno snížení hodnot u TG-HD (1,45 %) než u WT (2,68 a 3,43 %). Tento rozdíl může vycházet u TG-HD z podpory neurozánětu.

CD11c+ SLA II DR-

U TG-HD pozorujeme menší zastoupení nezralých nebo migrujících dendritických buněk (1,68 %) oproti WT (2,24 %). Tento je můžeme přisuzovat odlišné imunitní regulaci.

CD11c+ SLA II DR+

U TG-HD jsou populace CD11c+ SLA II DR+ nižší než u WT. Toto může naznačovat oslabenou antigen prezentující schopnost.

CD172a+ SLA II DR+

U modelu TG-HD je snižená populace aktivovaných dendritických buněk a makrofágů (5,04 %) v porovnání s WT (7,59 a 7,11 %). Tyto hodnoty mohou naznačovat rozdíly v aktivaci myeloidních buněk.

5.2.6 Shrnutí

Ze shromážděných dat je patrné, že se u mnohých hodnot objevují trendy, které mohou naznačovat počátky zánětlivých procesů a dysfunkci imunitního systému. Tyto výsledky slouží jako předběžná data a je nutné je ověřit na větším souboru vzorků. Rozdíly mezi TG-HD a WT mohou být způsobeny individuálními rozdíly mezi těmito zvířaty, nejen genetickou modifikací. Pro spolehlivé závěry z tohoto měření budeme pokračovat v analýze většího počtu vzorků v každé skupině a provedeme statistické zhodnocení.

5.2.7 Badatelský výhled

Průtoková cytometrie je neustále vyvíjející metoda, která má velký význam pro imunologické analýzy [76]. Dnes je využívána k řešení otázek komplexního chování imunitních buněk, hodnocení účinků léčiv, stanovení viability a třídění na základě charakteristiky buněk [76]. Velký potenciál představuje třídění na základě specifických parametrů, protože se může jednat o unikátní možnost, jak izolovat kmenové buňky [76]. Multiparametrická charakterizace může být využita v klinické diagnostice u nádorových onemocnění, jako je například leukémie [78, 79].

5 ZÁVĚR

V této práci jsem pozorovala různé prozánětlivé aktivity, a to v mozkomíšním moku, plazmě a v agranulocytech. Získané výsledky poukazují na to, že HN je nejen neurodegenerativní onemocnění, ale má i systémovou odpověď. Monitorování zánětlivých změn v periferní krvi může být užitečné, protože je neinvazivní a mohlo by být použito v humánní medicíně.

Sledování inflamatorních změn může sloužit k monitorování progresu nemoci a sledování potenciálního účinku experimentální léčby. Protizánětlivá terapie by také mohla zpomalovat neurodegeneraci. Tyto změny jsou jak u pacientů, tak u našeho zvoleného animálního modelu velmi podobné. Stejnou podobnost ostatní zvířecí modely nevykazují. Právě proto může být tento model užitečný v dalším výzkumu.

Během experimentální části bohužel došlo k rozšíření respiračního onemocnění mezi pokusná zvířata, což znemožnilo vyhodnocení značného množství vzorků, kvůli ovlivnění výsledků sledování imunitní odpovědi. I přes tyto komplikace vnímám seznámení s těmito postupy jako velmi přínosné, tato práce mi totiž otevřela dveře do světa vědy. Stanovených cílů se mi podařilo dosáhnout. Prohloubila jsem své znalosti imunologie, cytologie a genetiky. Naučila jsem se pracovat s odbornou literaturou, citačními programy, zacházet s laboratorními přístroji a interpretovat a diskutovat získané výsledky. Z výše zmíněných důvodů bych se chtěla i nadále zabývat vědeckou činností.

Svou účast na středoškolské odborné činnosti a své působení ve Výzkumném středisku živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd v ČR, v Liběchově, považuji za velmi přínosné.

6 POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

- [1] ROTH, CSC., doc. MUDr. Jan; KLEMPÍŘ, PH.D, MUDr. Jiří a UHROVÁ, MUDr. Tereza. Psychiatrie pro praxi: *Současné terapeutické možnosti u Huntingtonovy nemoci*. Online, publikace vědeckého výzkumu – přehledový článek, vedoucí doc. MUDr. Jan Roth, CSc., MUDr. Jiří Klempíř, Ph.D., MUDr. Tereza Uhrová. číslo 5, 2009. Dostupné z: [02.pdf](#).
- [2] PŘISPĚVATELÉ WIKISKRIPT, *Replikace DNA*. Online, c2024, Datum poslední revize 1.05.2024, 09:11 UTC, dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Replikace_DNA&oldid=475875
- [3] ŠMARDA, doc. RNDr. Jan. *Replikace DNA*. Online, přednáška kurzu Bi4010 Základy molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2019. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2019/Bi4010/um/Prednaska_3.pdf
- [4] VESIN. *Huntingtonova nemoc*. Online. Vesin.zdraví. Dostupné z: <https://vesin.ayeso.com/huntingtonova-nemoc>.
- [5] KLINICKALOGOPEDIE.CZ. *Dysartrie*. Online, Asociace klinických logopedů České republiky. Dostupné z: <https://www.klinickalogopedie.cz/index.php?pg=verejnost--co-je-to--dysartrie>.
- [6] VYMAZAL, prof. MUDr. Josef, D.Sc.; HAVRÁNKOVÁ, MUDr. Petra, Ph.D. *MR zobrazování u extrapyramidových onemocnění*. Online, odborný článek, vedoucí prof. MUDr. Josef Vymazal, D.Sc., MUDr. Petra Havránková, Ph.D. 2018. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2018/04/04.pdf>.
- [7] PETRUŽELOVÁ, Šárka. *HUNTINGTONOVA CHOREA A CÍLENĚ ZAMĚŘENÁ REHABILITACE*. Online, Bakalářská práce, vedoucí prof. MUDr. Jaroslav Opavský, CSc. Theses.cz: Univerzita Palackého v Olomouci Fakulta tělesné kultury, 2016. Dostupné z: <https://theses.cz/id/2psv5h/18215389>.
- [8] HOJGROVÁ, MUDr. Marie; VÍCHOVÁ, Mgr. Monika; USTOHAL, PH.D., MUDr. Bc. Libor a MAYEROVÁ, MUDr. Michaela. *Kazuistika pacienta s Huntingtonovou chorobou*. Online. Psychiatrie pro praxi. 2017, roč. 2017, č. 1, article 18, s. 4. Dostupné z: <https://www.psychiatriepropraxi.cz/pdfs/psy/2017/01/08.pdf>.

[9] VAN DUIJN, E., CRAUFURD, D., HUBERS, A. A., GILTAY, E. J., BONELLI, R., RICKARDS, H., ANDERSON, K. E., VAN WALSEM, M. R., VAN DER MAST, R. C., ORTH, M., LANDWEHRMEYER, G. B.; *European Huntington's Disease Network Behavioural Phenotype Working Group. Neuropsychiatric symptoms in a European Huntington's disease cohort (REGISTRY)*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry [online]. 2014, 85(12), 1411–1418 [cit. 2025-02-08]. DOI: 10.1136/jnnp-2013-307343. PMID: 24828898.

[10] ROTH, doc. MUDr. Jan, CSc. *Juvenilní forma Huntingtonovy nemoci*. Online, obecně přehledný článek, vedoucí doc. MUDr. Jan Roth, CSc. Dermatologie pro praxi: Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd, UK v Praze, 1. LF a VFN v Praze, 2012. Dostupné z: https://www.dermatologiepropraxi.cz/artkey/neu-201203-0004_Juvenilni_forma_Huntingtonovy_nemoci.php.

[11] UHROVÁ, Tereza. *Psychosociální aspekty Huntingtonovy nemoci*. Online, Disertační práce, vedoucí Doc.MUDr.Jan Roth, CSc. Digitální repozitář UK: Univerzita Karlova v Praze 1. lékařská fakulta, 2011. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/34991/140004041.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

[12] KLEMPÍŘ, MUDr. Jiří. *Huntingtonova nemoc: analýza souvislostí mezi klinickými, funkčními a morfometrickými nálezy*. Online, Dizertační práce z oboru neurovědy, vedoucí doc. MUDr. Jan Roth, Csc. Digitální repozitář UK: Univerzita Karlova 1. lékařská fakulta, 2007. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/12862/140024599.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

[13] PŘISPĚVATELÉ WIKISKRIPT, *Myoklonus/PGS/diagnostika*. Online, c2015, Datum poslední revize 24. 01. 2015, 13:36 UTC, dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Myoklonus/PGS/diagnostika&oldid=302172>.

[14] ŽIVOT S HUNTINGTONOVOU CHOROBOU. Online, *Informativní odborný zdroj pro rodiny s Huntingtonovou chorobou*, vedoucí PharmDr. Zdeňka Vondráčková, Mgr. Monika Baxa, Zuzana Maurová. Společnost pro pomoc při Huntingtonově chorobě, 2014. Dostupné z: <https://www.vfn.cz/wp-content/uploads/2020/06/NEU-huntingtonova-choroba-informace-pro-rodiny.pdf>.

- [15] PAVÓN-REALPE, VH, JARAMILLO-KOUPERMANN, G., LÓPEZ-CORTÉS, A., et al. *Stav mutace genu IT-15 (HTT) v ekvádorských rodinách s Huntingtonovou chorobou*. Arch Neuroscience. 2014;19(2):73-78.
- [16] WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. (2024, August 26). *Huntingtin*. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 07:33, December 11, 2024, from <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Huntingtin&oldid=1242286944>.
- [17] MEDLINEPLUS. National Library of Medicine. Online. MEDLINE. *HTT gene*. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/htt/>.
- [18] CHDI. HTT Structure & Function MFA. Online. CHDI FOUNDATION. *Accelerating therapeutic development for Huntington's disease*. Dostupné z: <https://chdifoundation.org/htt-structurefunction-mfa/>.
- [19] STEFAJIR.CZ. *Bazální ganglia*. Online. STEFAJIR.CZ. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK*. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/bazalni-ganglia>.
- [20] NZIP.CZ. *Bazální ganglia*. Online. NZIP.CZ. *Národní zdravotnický informační portál*. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/5148>.
- [21] NAN.UPOL.CZ. *Nuclei basales*. Online. NAN.UPOL.CZ. *Ústav normální anatomie*. 2008. Dostupné z: <https://www.nan.upol.cz/neuro/cd764.html>.
- [22] RADIOPAEDIA.ORG. *Corpus striatum*. Online. RADIOPAEDIA.ORG. *Radiopaedia*. 10 May 2022. Dostupné z: <https://radiopaedia.org/articles/corpus-striatum>.
- [23] PALLOVÁ, Daniela; ELLEDEROVÁ, Zdenka; VACHÚTOVÁ, Dominika a VOCHYÁNOVÁ, Klára. *Huntingtonova choroba a zvířecí choroby*. ŽIVA. 2014, č. 6, s. 262-265. ISSN 0044-4812
- [24] AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY AV ČR, V. V. I. *Pigmod*. Online. Dostupné z: <https://www.iapg.cas.cz/cs/laboratore/pigmod/vyzkum/>.
- [25] ŽIŽKOVÁ, Martina. *Biomedicínské modely Huntingtonovy choroby*. Online, *Bakalářská práce*, vedoucí Jan Motlík. Digitální repozitář UK: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, 2011. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/36548/130025060.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- [26] SCHILLING, G., BECHER, M. W., SHARP, A. H., JINNAH, H. A., DUAN, K., et al. *Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin*. Human Molecular Genetics [online]. 1999, 8(3), 397–407. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/hmg/8.3.397>
- [27] BIOPROSPECT. Online. 2015, roč. 25, č. 1. VENICE Praha, s.r.o. Za Hanspaulkou 13/875 160 00 Praha 6: BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST, 2015. ISSN 1210-1737. Dostupné z: <https://www.iapg.cas.cz/export/sites/uzfg/cs/laboratore/pigmod/galerie-souboru/Bioprospect.pdf>.
- [28] PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE, *Naděje dožití* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, c2024, Datum poslední revize 15. 12. 2024, 16:20 UTC, dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Naděje_dožití&oldid=24486064
- [29] ELIX, dr. Jiří a TOMAN, dr. Jan. *Přírodou krok za krokem*. Praha: ARTIA, 1978. ISBN 37-004-79
- [30] NĚMEČKOVÁ, Zdeňka. *SPECIFIKA OŠETŘOVATELSKÉ PÉČE U NEMOCNÉHO S HUNTINGTONOVOU CHOROBOU*. Online, Bakalářská práce, vedoucí Mgr. Ivana Balejová. Plzeň: ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ, 2022. Dostupné z: https://otik.uk.zcu.cz/bitstream/11025/48780/1/Nemeckova_Zdenka_VSK_BP.pdf.
- [31] OLIVOVÁ, Jana. *Ovce pomáhají zkoumat neurodegenerativní onemocnění*. Online. ČESKÝ ROZHLAS. Český rozhlas. 2014. Dostupné z: <https://vltava.rozhlas.cz/ovce-pomahaji-zkoumat-neurodegenerativni-onemocneni-5098116>.
- [32] GÓMEZ-SANTOS, C., a G. L. PÉREZ. *Gene therapy in Huntington's disease: The role of transgenic monkey models*. Frontiers in Neuroscience. 2018, roč. 12, čl. 612. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00612>
- [33] PŘÍSPĚVATELÉ WIKIPEDIE, *Prase domácí* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, c2024, Datum poslední revize 19. 12. 2024, 18:58 UTC, dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Prase_domácí&oldid=24497597
- [34] JAROŠOVÁ, Rea. *Mimoprodukční využití prasat*. Online, BAKALÁŘSKÁ PRÁCE, vedoucí Ing. Zdeněk Hadaš, Ph.D. Theses.cz: Mendelova univerzita v Brně Agronomická fakulta, 2015. Dostupné z: https://theses.cz/id/6th5hs/zaverecna_prace.pdf.

- [35] YANG, S. H., CHENG, P. H., BANTA, H., PIOTROWSKA-NITSCHKE, K., YANG, J. J., CHENG, E. C., SNYDER, B., LARKIN, K., LIU, J., ORKIN, J., FANG, Z. H., SMITH, Y., BACHEVALIER, J., ZOLA, S. M., LI, S. H., LI, X. J., CHAN, A. W. (2008). *Towards a transgenic model of Huntington's disease in a nonhuman primate*. *Nature*, 453(7197), 921–924. DOI: 10.1038/nature06975. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature06975>
- [36] ARDAN, T., BAXA, M., LEVINSKÁ, B., SEDLÁČKOVÁ, M., NGUYEN, T. D., KLÍMA, J., JUHÁŠ, Š., JUHÁSOVÁ, J., ŠMATLÍKOVÁ, P., VOCHOZKOVÁ, P., MOTLÍK, J., ELLEDEROVÁ, Z. (2019). *Transgenic minipig model of Huntington's disease exhibiting gradually progressing neurodegeneration*. *Disease Models & Mechanisms*, 12(12), dmm.041319. DOI: 10.1242/dmm.041319. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31645369/>
- [37] MAČÁKOVÁ, M., BOHUSLAVOVÁ, B., VOCHOZKOVÁ, P., PAVLOK, A., SEDLÁČKOVÁ, M., VIDIŇSKÁ, D., VOCHYANOVÁ, K., LIŠKOVÁ, I., VALEKOVÁ, I., BAXA, M. et al. (2016). *Mutated huntingtin causes testicular pathology in transgenic minipig boars*. *Neurodegenerative Diseases*, 16, 245–259. DOI: 10.1159/000443665
- [38] IDINSKÁ, D., VOCHOZKOVÁ, P., ŠMATLÍKOVÁ, P., ARDAN, T., KLÍMA, J., JUHÁŠ, Š., JUHÁSOVÁ, J., BOHUSLAVOVÁ, B., BAXA, M., VALEKOVÁ, I. et al. (2018). *Gradual phenotype development in Huntington disease transgenic minipig model at 24 months of age*. *Neurodegenerative Diseases*, 18, 107–119. DOI: 10.1159/000488592
- [39] ČERNÝ, Jiří. *Historicky první videozáznam replikace DNA přinesl nečekané odhalení*. Online. In: ŽIVĚ.CZ. ŽIVĚ. 19.6 2017. Dostupné z: <https://vtm.zive.cz/bleskovky/historicky-prvni-videozaznam-replikace-dna-prinesl-necekane-odhaleni/sc-871-a-188194/default.aspx>.
- [40] PALPAGAMA, T. H., WALDVOGEL, H. J., FAULL, R. L. M., & KWAKOWSKY, A. (2019). *Úloha mikroglíí a astrocytů u Huntingtonovy choroby*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 258. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2019.00258>.
- [41] CHAFER, D. P., & STEVENS, B. (2015). *Microglia function in central nervous system development and plasticity*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, a020545. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020545>.
- [42] BAGGIOLINI, M. (1998). *Chemokiny a leukocytární transport*. *Nature*, 392(6676), 565–568. <https://doi.org/10.1038/33340>.
- [43] PALOMINO, D. C. T., & MARTI, L. C. (2015). *Chemokiny a imunita*. *Einstein (Sao Paulo)*, 13(3), 469–473. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>.

- [44] STŘÍŽ, Ilja, HOLÁŇ, Vladimír. *Cytokiny v klinické medicíně*. Praha: Maxdorf, 2015. ISBN 978-80-7345-427-2. [cit. 7. 1. 2025]. Dostupné z: <https://eshop.maxdorf.cz/user/documents/upload/data/dl/Cytokiny-v-klin-medicine.pdf>
- [45] ZAJONCOVÁ, Ludmila. *Úvod do imunologie a imunochemie, historie*. [online]. Materiály k přednášce. Univerzita Palackého v Olomouci. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-IMCH_01_Uvod_do_imunologie_a_imunochemie_historie.pdf
- [46] BERAN, Jiří. *Diabetes a další obory (infekce, dermatovenerologie a revmatologie)*. Hradec Králové: Klinika infekčních nemocí Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, Subkatedra tropické a cestovní medicíny IPVZ, Praha, 2005
- [47] PÍTHA, Jiří, HAVRDOVÁ, Eva. *Historie neuroimunologie v České Republice*. [online]. Neurologická klinika FNKV a 3. LF UK, Neurologická klinika VFN a 1. LF UK Praha. Dostupné z: <https://www.czech-neuro.cz/sekce/sekce-klinicke-neuroimunologie-a-likvorologie/historie/>
- [48] ČESKÁ IMUNOLOGICKÁ SPOLEČNOST. *Historie*. [online]. Česká imunologická společnost. Dostupné z: <https://cis.mbu.cas.cz/o-spolecnosti/historie>
- [49] GEARON, Eamonn. *Who was Lady Mary Wortley Montagu?* [online]. Swindon: National Trust, [cit. 2025-04-26]. Dostupné z: <https://www.nationaltrust.org.uk/discover/history/people/who-was-lady-mary-wortley-montagu>
- [50] BROLÍK, Tomáš. *Edward Jenner očkuje proti pravým neštovicím 14. května 1796*. Online. *Prespekt*. 2021. Dostupné z: https://www.respekt.cz/tydenik/2021/20/edward-jenner-ockuje-proti-pravym-nesstovicim?srltid=AfmBOorgNNigQdH_zUsxAF5KKmerGYyV50v3iVXOwYCWzrbAhUL_Vauss
- [51] BORDENAVE, Guy. Recenze: *Na ramenou obrů: Louis Pasteur (1822–1895). Mikrobi a infekce*, 2003, roč. 5, č. 6, s. 553–560. [online]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457903000753>
- [52] KREJSEK, Jan a KOPECKÝ, Otakar. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-X
- [53] NZIP.CZ. *Národní zdravotnický informační portál*. Online. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/o-nzip>

- [54] UNIVERZITA KARLOVA. *Glie*. Online. UNIVERZITA KARLOVA. 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy. Dostupné z: <https://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/bp/1.4.htm>.
- [55] FIELD, S. E., CURLE, A. J., & BARKER, R. A. (2024). Inflammation and Huntington's disease – a neglected therapeutic target? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 33(5), 451–467. <https://doi.org/10.1080/13543784.2024.2348738>.
- [56] PAOLICELLI, R. C., SIERRA, A., STEVENS, B., TREMBLAY, M.-E., AGUZZI, A., AJAMI, B., AMIT, I., AUDINAT, E., et al. (2022). States of microglia and nomenclature: A crossroads in the field. *Neuron*, 110(21), 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
- [57] CHVÁTAL, A. (2016, 1. července). *Gliové buňky známé i neznámé*. Akademie věd České republiky. Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i. <https://www.avcr.cz/cs/onas/aktuality/Gliove-bunky-zname-i-nezname>
- [58] VERKHRATSKY, A., HO, M. S., ZOREC, R., & PARPURA, V. (2020). Koncept neuroglie. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1175, 1–13. doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_1. K dispozici v PubMed Central (PMC) na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7188601/>.
- [59] KIM, W., & ANGULO, M. C. (2024). Rozluštění role oligodendrocytů a myelinu při bolesti. *Journal of Neurochemistry*, 169(1), e16206. <https://doi.org/10.1111/jnc.16206>
- [60] NÁRODNÍ ZDRAVOTNICKÝ INFORMAČNÍ PORTÁL. Myelinová pochva [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2025 [cit. 14. 1. 2025]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3380>. ISSN 2695-0340
- [61] LIU, C., CHU, D., KALANTAR-ZADEH, K., GEORGE, J., YOUNG, H. A., & LIU, G. (2021). Cytokiny: Od klinického významu ke kvantifikaci. *Advanced Science (Weinh)*, 8(15), 2004433. <https://doi.org/10.1002/adv.202004433>.
- [62] OSMOSIS. (2020, listopad 18). Cytokines [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=TAqO0Mq19JQ&list=PLVCuHZitSe8LFDOjpIb9F6DphTrF9P4Ln&index=11>.
- [63] FEIN, A. M., & ABRAHAM, E. M. (2000). Can we make sense out of cytokines? *Chest*, 117(4), 932–934. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.932>.

- [64] DINARELLO, C. A. (2008). Historické poznatky o cytokinech. *European Journal of Immunology*, 38(4), 1097-1101. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>.
- [65] MOORE, M. (2023). Serum or Plazma: What are their uses, and which is better for research purposes? *Helvetica Health Care*. Dostupné z: <https://www.HelveticaHealthCare.com>.
- [66] LUTY, Wini. (2018, 3. červenec). What Really is a Buffy Coat? *BioIVT*. Dostupné z: <https://www.bioivt.com/blogs/what-really-is-a-buffy-coat>.
- [67] VALEKOVÁ, I., SKALNIKOVA, H., JARKOVSKÁ, K., MOTLIK, J., & KOVÁŘOVÁ, H. (2014). Multiplex Immunoassays for Quantification of Cytokines, Growth Factors, and Other Proteins in Stem Cell Communication. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1212, 1-14. https://doi.org/10.1007/7651_2014_94
- [68] VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO. *Prasata*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2025. Dostupné z: https://www.vfu.cz/files/2390_58_vystup_4_Prasata.pdf
- [69] MORTON, A. *Large-Brained Animal Models of Huntington's Disease: Sheep*. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2018, roč. 1780, s. 221–239. ISBN 978-1- 4939-7824-3. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7825-0_12
- [70] MURRAY, S. J. a MITCHELL, N. L. *The Translational Benefits of Sheep as Large Animal Models of Human Neurological Disorders*. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022, roč. 9, čl. 831838. DOI: 10.3389/fvets.2022.831838. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.831838>
- [71] NEUROGRAPHICAL. *Rat brain gallery* [online]. 1. srpna 2017 [cit. 2025-01-26]. Dostupné z: <https://neuroscience-graphicdesign.com/2017/08/01/post-1-rat-brain-gallery/>.
- [72] VÁLEKOVÁ, I., VOCHOZKOVÁ, P. (2015). *Role imunitního systému při Huntingtonově nemoci*. *Biopropect*, roč. 25, č. 1. Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie České republiky v Liběchově
- [73] ZOOPARK. (n.d.). *Göttingenské miniprase*. ZOOPARK Želčín. Získáno z <https://www.zooparkzelcin.cz/prase>

[74] FIALOVÁ, L., & VEJRAŽKA, M. Základní vyšetření mozkomíšního moku. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy. Online.

Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/5138/01mozkomisni-mok-1112ak.pdf>

[75] ČERMÁKOVÁ, Zdeňka. *Základní anatomické a fyziologické poznatky*. Online, 2017.

Dostupné

z:

https://is.muni.cz/el/1411/podzim2017/BLKLK051c/um/vysetreni_mozkomisniho_moku/pages/01-anatomicke-fyziologicke-poznatky.html

[76] ČERNÝ, Jan a MALINSKÁ, Nikola. *50 let průtokové cytometrie*. Živa. 2025, roč.

LXXIII, č. 1, s. 21-24. ISSN 0044-4812

[77] BERNARD, Vladan. *Průtoková cytometrie*. Biofyzikální ústav Lf, MU, [online]. 2025.

Dostupné

z:

https://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.pdf

[78] MARINOV, Iuri. *Laboratoř průtokové cytometrie*. Ústav hematologie a krevní transfuze, [online].

Dostupné z: <https://www.uhkt.cz/laboratore/komplement-laboratori/klinicky-usek/laborator-prutokove-cytometrie>

[79] FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO. *Laboratoř pro flowcytometrii* [online]. [cit. 2025-02-08].

Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/laborator-pro-flowcytometrii/t1294>

[80] HSIAO, H. et al. (2014). Primary glia isolated from HD mice (R6/2) presented significantly elevated levels of proinflammatory cytokines (e.g., iNOS, IL-1 β , IL-6, and TNF- α) following LPS treatment. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/xxxxxx>.

[81] BJÖRKQVIST, M. et al. (2008). *This increase in cytokines was also observed in the striatum of HD patients*. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/xxxxxx>.

[82] FIELD, S. E., CURLE, A. J. & BARKER, R. A. (2024). *Inflammation and Huntington's disease – a neglected therapeutic target? Expert Opinion on Investigational Drugs*, 33(5), 451-467. DOI: 10.1080/13543784.2024.2348738.

- [83] SOLTANI KHABOUSHAN, A., MOEINAFSHAR, A., ERSI, M. H., TEIXEIRA, A. L., MAJIDI ZOLBIN, M. & KAJBAFZADEH, A. M. (2023). Circulating levels of inflammatory biomarkers in Huntington's disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neuroimmunology*, 385, 578243. Available online: 13 November 2023. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2023.578243.
- [84] DU, G., DONG, W., YANG, Q., YU, X., MA, J., GU, W., et al. (2020). Altered gut microbiota related to inflammatory responses in patients with Huntington's disease. *Frontiers in Immunology*, 11, 603594. DOI: 10.3389/fimmu.2020.603594.
- [85] VALEKOVÁ, I. (2025). Ústní konzultace; Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. Liběchov
- [86] ONSKÝ, I., VODIČKA, P., VODIČKOVÁ KEPKOVÁ, K., HANSÍKOVÁ, H. *Mitofágie u Huntingtonovy choroby*. In: *Neurochemistry International*, říjen 2021, roč. 149, čl. 105147. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018621001935?via%3Dihub>
- [87] STAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY AV ČR. Výzkum – Laboratoř aplikovaných proteomových analýz. In: [iapg.cas.cz](https://www.iapg.cas.cz/cs/laboratore/lab-aplikovanych-proteomovych-analyz/vyzkum/) [online]. [cit. 18. 4. 2025]. Dostupné z: <https://www.iapg.cas.cz/cs/laboratore/lab-aplikovanych-proteomovych-analyz/vyzkum/>
- [88] UNQUEIRA, L. Carlos, CARNEIRO, José, KELLEY, Robert O. *Základy histologie*. Přeložil Richard Jelínek. 7. vyd., vyd. v ČR 1. Jinočany: H & H, 1997. VI, 502 s. ISBN 80-85787-37-7
- [89] LITERÁK, I. *Expres genů a její regulace*. In: *Biologie 4* [online]. 2022/2023. Dostupné z: [PowerPoint Presentation](#)
- [90] VALEKOVÁ, I. (2025). konzultace; Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. Liběchov
- [91] VACHOVÁ, Veronika. *Odpověď na poškození DNA u Huntingtonovy choroby = DNA damage response in Huntington's disease*. Praha, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, obor Molekulární biologie a biochemie organismů. Vedoucí práce RNDr. Mgr. Petr Šolc, Ph.D.

- [92] ULDRIJAN, Stjepan. *Nádorový supresor p53: Co to je a jak nás chrání před rakovinou* [online přednáška]. Brno: Biologický ústav LF MU, 10. listopadu 2021, 16:00–17:00. Dostupné z: [Nádorový supresor p53: Co to je a jak nás chrání před rakovinou? | Juniorská akademie | MED MUNI](#)
- [93] MÜLLER, P., NENUTIL, R. a VOJTĚŠEK, B. *Význam proteinu p53 a jeho mutací pro nové strategie léčby nádorových onemocnění*. Časopis lékařů českých, 2004, 143(5), s. 313–317
- [94] ŠONSKÝ, Ivan. *Modulation of Mitophagy in Huntington Disease = Modulace mitofagie u Huntingtonovy choroby*. Praha, 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, obor Buněčná a vývojová biologie. Vedoucí práce RNDr. Hana Hansíková, CSc., konzultant Mgr. Petr Vodička, Ph.D.
- [95] FEOLÉ, Monica. *Axonal transport of neurodegenerative-disease linked proteins*. Brno, 2024. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Ph.D. Gorazd Bernard Stokin. Dostupné z: [Axonal transport of neurodegenerative-disease linked proteins – Monica Feole, M.Sc.](#)
- [96] MASARYKOVA UNIVERZITA. *SD-PAGE – finální verze*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/C4700/um/SD-PAGE-fin.pdf>
- [97] VÍTÁMVÁS, Pavel, Klára KOSOVÁ, Zbyněk ŠKODÁČEK a Ilja Tom PRÁŠIL. *The Method of Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis and Its Application in Proteomics*. Chemické listy. 2010, roč. 104, č. 10, s. 671–676. ISSN 0009-2770. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/289885315>
- [98] HARADA, Kazuki, Taichi KAMIYA a Takashi TSUBOI. *Uvolňování gliotransmiteru z astrocytů: funkční, vývojové a patologické důsledky v mozku*. Frontiers in Neuroscience [online]. 12. leden 2016, roč. 9, s. 499. DOI: 10.3389/fnins.2015.00499. ISSN 1662-4548. Dostupné z: [Uvolňování gliotransmiterů z astrocytů: funkční, vývojové a patologické důsledky v mozku - PMC](#)
- [99] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. HTT huntingtin [Homo sapiens (human)]. NCBI Gene [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2025 Apr 7 [cit. 2025 Apr 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064>

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Prevalence výskytu HN ve světě; převzato [7].....	14
Obr. 2. Model řetězce a mutací; vlastní tvorba.....	15
Obr. 3. Model replikace DNA; převzato [39].....	16
Obr. 4. Anatomický obrázek bazálních jader; převzato [19].	17
Obr. 5. Mozek člověka; převzato a upraveno [70].	21
Obr. 6. Porovnání mozků zvířat, u kterých existují předpoklady, že by se mohly použít pro modely neurodegenerativních nemocí: a) myš domácí (<i>Mus musculus</i>), b) potkan (<i>Rattus norvegicus</i>), c) kosman bělovousý (<i>Callithrix jacchus</i>), d) makak rhesus (<i>Macaca mulatta</i>	21
Obr. 7. R6/2 myší model; červeně zvýrazněná část určuje genom s 144 CAG expanzí; převzato [25].....	22
Obr. 8. R6/1 myší model; genom s expanzí 116 CAG tripletů; převzato [25].	22
Obr. 9. Srovnání MR kontrolní opice (a) a transgenní opice rHD1 (b). Převzato [35].	25
Obr. 10. Zobrazení podpůrného systému neuronů. Převzato a upraveno [53].	30
Obr. 11. Morfologická změna mikroglíí a astrocytů na jejich pozměněné formy. Převzato a upraveno [40]. ROS: oxidativní stres; PU1 enhancer: one-part-unit enhancer; CCAT enhancer: CCAAT binding-protein enhancer; NF-kB signalizace: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; JAK/STAT signalizace: Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription	31
Obr. 12. Parametry, které ovlivňují funkce mikroglie. Převzato a upraveno z článku Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads [56].	32
Obr. 13. Ukázka centrifugovaného vzorku - krevní sérum; vlastní fotografie	40
Obr. 14. Nákres s teoretickým znázorněním vzorku séra po centrifugaci; převzato a upraveno[65].....	40
Obr. 15. Separovaná plazma; vlastní fotografie	42

Obr. 16. Nákres s teoretickým znázorněním vzorku plazmy po centrifugaci; převzato a upraveno [65].....	42
Obr. 17. Vortex mixer; vlastní fotografie	45
Obr. 18. Ultravioleká čistička; vlastní fotografie	45
Obr. 19. Schématické znázornění ředění standardů; převzato a upraveno [67].....	48
Obr. 20. Luminex 200; vlastní fotografie	51
Obr. 21. Destička pro čištění a kalibraci Luminex; vlastní fotografie.....	51
Obr. 22. Výsledky CSF – prozánětlivé cytokiny.....	53
Obr. 23. Výsledky CSF – protizánětlivé cytokiny.....	54
Obr. 24. Výsledky CSF – interferony.....	55
Obr. 25. Grafy s výsledky analýzy cytokinu v plazmě.....	57
Obr. 26. Teoretické schéma centrifugace směsi krve a Ficollu; RBCs označuje granulocyty a erytrocyty; převzato a upraveno [66].....	63
Obr. 27. Frakce krve po centrifugaci na separačním médiu; vlastní fotografie.....	63
Obr. 28. Snímek izolovaných PBMCs; zvětšení 100×; vlastní fotografie.....	63
Obr. 29. Snímek izolovaných PBMCs; zvětšení 200×; vlastní fotografie	64
Obr. 30. Popis průtokového cytometru: a) komora; b) místo zavedení vzorku do hadičkového systému; c) hadičkový systém; d) místo průtoku vody; e) místo průchodu laserů; vlastní fotografie a popis	66
Obr. 31. Průtokový cytometr; vlastní fotografie.....	66
Obr. 32. Příklad gatingové strategie s izotypovou kontrolou IgG2a-PE; A gate „PBMCs IgG2a“ označuje hlavní populaci buněk PBMCs; B – gate „Single cells“ slouží na odstranění dubletů a zachování pouze jednotlivých buněk; C – gate „Live cells“ umožňuje vyloučení mrtvých buněk pomocí barvení propidium jodidem; D – gate vymezuje specifickou buněčnou populaci, která je předmětem našeho zájmu.....	71

Obr. 33. Histogramy znázorňují zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací v krvi. Modrý vrchol – izotypová kontrola. Červený vrchol – sledovaná populace buněk značená specifickou protilátkou (CD45, CD3ε, CD14).....73

Obr. 34. Charakterizace miniprasečích PBMCs pomocí FACS77

8 SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Přehled metod a souborů pro experiment číslo 1	38
Tab. 2. Přehled markerů, protilátek a jejich funkce	47
Tab. 3. Přehled 96 jamkové destičky se vzorky	49
Tab. 4. Přehled metod a souborů pro experiment číslo 2	60
Tab. 5. Přehled protilátek použitých k charakterizaci buněk.....	69
Tab. 6. Přehled výsledků průtokové cytometrie	78