

**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni**

Studijní program: Fyziologie a patologická fyziologie

**EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE MECHANISMŮ
NEURODEGENERACE ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK**

**EXPERIMENTAL STUDY OF MECHANISMS OF
NEURODEGENERATION IN DIFFERENT CONDITIONS**

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. František Vožeh, CSc.

Plzeň 2018

MUDr. Zdeňka Purkartová

Poděkování

Tato disertační práce vznikla na Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy.

Děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Františku Vožehovi, CSc. za laskavé vedení, pomoc při výběru tématu a cenné rady při tvorbě práce. Děkuji také pracovníkům Ústavu patologické fyziologie za pomoc při provedení pokusů, zejména za přípravu histologických preparátů a za technickou asistenci při operacích. Děkuji zvláště za významnou pomoc Doc. MUDr. Janu Cendelínovi, Ph.D.

Tato práce byla podporována grantem č. 716217 Grantové agentury Univerzity Karlovy, Národním programem udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytnutým Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, Výzkumným projektem Univerzity Karlovy (projekt č. Q39) a projektem Specifického studentského výzkumu Univerzity Karlovy č. 260 394.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Plzni dne 11.12.2018

MUDr. Zdeňka Purkartová

1. OBSAH

1. Obsah	4
2. Seznam zkratk	7
3. Souhrn	8
4. Summary	9
5. Úvod	10
5.1. Mozeček a jeho struktura a funkce	10
5.1.1. Struktura mozečku	10
5.1.2. Funkce mozečku	11
5.2.2. Příčiny mozečkových poruch	13
5.3. Dědičná degenerativní onemocnění mozečku	14
5.3.1. Autosomálně recesivní mozečkové ataxie	14
5.3.2. Autosomálně dominantní mozečkové ataxie	15
5.3.3. Mozečkové ataxie vázané na chromosom X	15
5.3.4. Mozečkové ataxie s mitochondriální dědičností	16
5.4. Zvířecí modely hereditárních cerebelárních degenerací	16
5.4.1. Myši typu Lurcher	16
5.4.2. Myši Purkinje cell degeneration	20
5.4.3. Myši Weaver	21
5.4.4. Myši Staggerer	22
5.4.5. Myši Nervous	22
5.4.6. Myši Reeler	22
5.4.7. Myši Hotfoot	23
5.4.8. Myši SCA1	23
5.4.9. Myši SCA2	24
5.4.10. Myši SCA3	25
5.4.11. Myši SCA6	25

5.4.12. Myši SCA7	26
5.4.13. Myši SCA17	26
5.4.14. Myši SCA23	26
5.4.15. Model Niemann-Pickovy nemoci	27
5.4.16. Model Friedreichovy ataxie	27
5.5. Význam myších modelů v experimentální terapii cerebelárních degenerací	27
5.6. Neurotransplantační terapie mozečkových degenerací	28
6. Východisko	32
7. Cíl práce	33
8. Materiál a metody	34
8.1. Uspořádání pokusů	34
8.2. Hodnocení dynamiky morfologických změn v mozečkové kůře myší typu Lurcher	34
8.2.1. Pokusná zvířata	34
8.2.2. Příprava mozečkových řezů	35
8.2.3. Dvojitě fluorescenční barvení	35
8.3. Neurotransplantační terapie myší s cerebelární degenerací	36
8.3.1. Základní metody	36
8.3.1.1. Transplantace embryonální mozečkové tkáně	36
8.3.1.2. Dárce transplantátu	37
8.3.1.3. Odběr transplantátu, příprava suspenze embryonálních buněk	37
8.3.1.4. Aplikace transplantátu	38
8.3.1.5. Testování motorických schopností	39
8.3.1.6. Histologické zpracování	40
8.3.1.7. Hodnocení objemu transplantátu	41
8.3.1.8. Statistické analýzy	42
8.3.2. Pokus 1	43
8.3.3. Pokus 2	44
9. Výsledky	46

9.1. Hodnocení dynamiky morfologických změn v mozečkové kůře myší typu Lucher	46
9.1.1. Myši typu wild	46
9.1.2. Myši typu Lurcher.....	48
9.2. Neurotransplantační terapie myší s cerebelární degenerací	53
9.2.1. Pokus 1	53
9.2.1.1. Přežívání transplantátu a jeho struktura.....	53
9.2.1.2. Objem transplantátu	59
9.2.1.3. Test na rotarodu.....	60
9.2.2. Pokus 2	61
9.2.2.1. Přežívání transplantátu a jeho struktura.....	61
9.2.2.2. Objem transplantátu	67
9.2.2.3. Test na rotarodu.....	68
10. Diskuse	70
10.1. Hodnocení dynamiky morfologických změn v mozečkové kůře myší typu Lurcher	70
10.2. Neurotransplantační terapie.....	73
10.2.1. Přežívání a morfologie transplantátu.....	74
10.2.2. Funkční dopad transplantace na motorické schopnosti vyšetřovaných myší.....	78
10.2.3. Mechanismy působení transplantátu	80
10.2.4. Význam myších modelů pro výzkum mozečkových degenerací	82
11. Závěry	83
12. Literatura	85
13. Přílohy: přehled publikační činnosti	104

2. SEZNAM ZKRATEK

Anti-GFAP.... anti-glial fibrillary acidic protein
BDNF....brain-derived neurotrophic factor
CNS....centrální nervový systém
D....den testování na rotarodu
DRPLA....dentatorubro-pallidoluyziánská atrofie
E....den embryonálního vývoje
EA....epizodická ataxie
EGFP....enhanced green fluorescent protein
FXTAS....fragile X tremor ataxia syndrome
GDNF....glial cell-derived neurotrophic factor
GFAP....glial fibrillary acidic protein
GluR δ 2.... δ 2 podjednotka glutamátového receptoru
Grid2^{Lc}....mutace Lurcher
Lc....Lurcher (+/Lc)
NT-3....neurotrophin-3
Obr.....obrázek
P....postnatální den
pcd....Purkinje cell degeneration
S.E.M.....standard error of the mean
SCA....spinocerebelární ataxie
SCA1....spinocerebelární ataxie typu 1
SCA2.... spinocerebelární ataxie typu 2
SCA3.... spinocerebelární ataxie typu 3
SCA6.... spinocerebelární ataxie typu 6
SCA7.... spinocerebelární ataxie typu 7
SCA17.... spinocerebelární ataxie typu 17
SCA23.... spinocerebelární ataxie typu 23
Tab.....tabulka
vs.....versus
WT....wild typ (+/+)

3. SOUHRN

Mozeček je významná struktura uplatňující se v koordinaci pohybů a v řadě dalších funkcí včetně procesů kognitivních a emočních. K závažným onemocněním mozečku patří velká skupina mozečkových hereditárních degenerací s různým typem dědičnosti, odlišnou patogenezi a pestrými fenotypovými projevy. K výzkumu těchto onemocnění i možností jejich léčby lze využít mnoho typů myších modelů. Jedná se o myši trpící spontánní mutací či myši geneticky modifikované.

Cílem naší práce bylo analyzovat dynamiku morfologických změn během mozečkové degenerace u myši typu Lurcher za použití dvojitého fluorescenčního barvení. Dále jsme se věnovali transplantaci embryonální mozečkové tkáně ve formě suspenze u dospělých myši typu Lurcher kmene B6CBA, myši pcd kmene B6.BR a myši typu wild obou těchto kmenů s dvouměsíčním přežíváním příjemců po operaci a transplantaci identické suspenze u dospělých myši typu Lurcher kmenů B6CBA a C3H a myši typu wild obou těchto kmenů se šestiměsíčním přežíváním příjemců po operaci.

Prokázali jsme tyto hlavní charakteristiky degenerujících Purkyňových buněk u mutantů Lurcher: narušenou kontinuitu řady Purkyňových buněk, přítomnost tmavých skvrn v buněčných jádrech, fragmentaci jadérek a nerovnoměrné barvení cytoplasmu. Později došlo k deformaci těl i jader Purkyňových buněk, k jejich sraštění a rozpadu dendritů.

V neurotransplantačních experimentech se nám podařilo prokázat, že embryonální mozečkový transplantát přežívá velmi dobře po dobu dvou i šesti měsíců u myši zdravých i u mozečkových mutantů typu Lurcher a pcd a je zároveň bohatým zdrojem Purkyňových buněk.

Hlavní a nejzřetelnější rozdíl byl nalezen v integraci transplantátu do mozečku hostitele. U mutantů Lurcher byl transplantát většinou ostře ohraničen a oddělen od mozečkové tkáně hostitele, zatímco u mutantů pcd i myši zdravých vykazoval dobrou integraci včetně prorůstání vláken směrem k mozečkovým jádrům. Tento nálezní ukazuje, že zřejmě existují dosud nepoznané faktory specifické pro určitý typ degenerace, které výrazně limitují vývoj a schopnost integrace transplantátu.

Neurotransplantační terapie neměla vliv na výkon mutantních myši v testu na rotarodu. Nepodařilo se nám tedy prokázat funkční efekt transplantátu.

4. SUMMARY

The cerebellum is an important structure involved in motor coordination and many other functions including cognitive and emotional processes. Severe cerebellar diseases include a wide group of cerebellar hereditary degenerations with different types of heredity, different pathogenesis and diverse phenotypic manifestation. Many types of mouse models can be used to investigate these diseases and their therapy. These mice carry spontaneous mutations or are genetically modified.

The aim of this work was to analyse the dynamics of morphological changes of cerebellar degeneration in Lurcher mice using fluorescent double staining. We also performed transplantation of embryonic cerebellar tissue suspension in adult Lurcher B6CBA mice, B6.BR mice and wild-type mice of both strains with two-month survival after surgery and transplantation of identical suspension in adult Lurcher B6CBA mice and C3H mice and wild-type mice of both these strains with six-month survival after surgery.

We have confirmed these main characteristics of the degenerating Purkinje cells in Lurcher mutants: the disrupted continuity of the Purkinje cell layer, the presence of dark spots in the cell nuclei, the fragmentation of nuclei and the non-homogenous staining of the cytoplasm. Later, the bodies and the nuclei of the Purkinje cells were deformed, including their shrinkage and disintegration of dendrites.

In neurotransplantation experiments, we have shown that the embryonic cerebellar graft survived very well for two or six months in healthy mice and cerebellar mutants of the *pcd* and Lurcher type respectively and is also a rich source of Purkinje cells.

The main and most marked difference was found in integration of the graft into the host's cerebellum. In Lurcher mutants, the graft was mostly sharply limited and separated from the host's cerebellar tissue, whereas in *pcd* mutants and healthy mice the grafts exhibited good integration, including fibre sprouting to the cerebellar nuclei. This finding suggested that there are potentially unidentified disease-specific factors significantly limiting development and integration of the cerebellar grafts.

Neurotransplantation therapy did not influence the performance of mutant mice in the rotarod test. Therefore, we failed to demonstrate the functional effect of the cerebellar graft.

5. ÚVOD

5.1. Mozeček a jeho struktura a funkce

5.1.1. Struktura mozečku

Mozeček (*cerebellum*) je součástí centrálního nervového systému (CNS), nachází se v zadní jámě lební dorsálně od mozkového kmene. Tvoří jej vermis, tj. střední nepárová část a dvě laterálně uložené hemisféry. Mozeček má vrstevnatou strukturu, povrchová šedá hmota je silně zvrásněná jemnými záhyby, které jsou pravidelně a souběžně orientované. Pod kůrou ležící bílá hmota obsahuje nervová vlákna a neuroglii. V její hloubce jsou pak uložena mozečková jádra – *nucleus dentatus*, *emboliformis*, *fastigii* a *globosus*.

Mozečková kůra se vyznačuje větším počtem nervových buněk než je počet neuronů v kůře velkého mozku (Glickstein, 1992). Novější výzkumy ukázaly, že množství neuronů mozečku představuje 80 % všech mozkových nervových buněk (Herculano-Houzel, 2010). Kůra mozečku je histologicky členěna do tří vrstev. Zevně se nachází vrstva molekulární (*stratum moleculare*) obsahující malé množství neuronů, dále vrstva ganglionární (*stratum gangliosum*) s jednou vrstvou velkých Purkyňových buněk, jejichž dendrity se bohatě větví ve vrstvě molekulární a axony pak tvoří jediný výstup z kůry mozečku. Purkyňovy buňky jsou tedy jediným typem projekčního neuronu mozečkové kůry. Nejhlouběji je pak uložena vrstva granulózní (*stratum granulosum*) s velkým počtem buněk granulózních, jež jsou excitačními interneurony a s několika dalšími méně četnými typy excitačních i inhibičních interneuronů.

Z mikroskopického hlediska vykazuje mozečková kůra velmi pravidelnou strukturu díky opakování morfologicky i funkčně identických jednotek. Centrem každé této jednotky je jedna Purkyňova buňka. Jako mediátor používají tyto buňky kyselinu gama aminomáselnou, tedy inhibiční neurotransmitter. Výstupní informace z těchto funkčních jednotek prochází přes buňky mozečkových jader. Aferentní informace se do kůry mozečku dostávají dvěma typy excitačních vláken – šplhavými a mechovými. Šplhavá vlákna jsou axony buněk *nucleus olivaris inferior*. Tato vlákna nejprve uvnitř mozečku vysílají kolaterálu k buňkám mozečkových jader, pak stoupají až do molekulární vrstvy kortexu a zde vytvářejí asi 300 synaptických kontaktů s dendrity každé Purkyňovy buňky. Mechová vlákna též vysílají kolaterálu k buňkám mozečkových jader, ale poté stoupají pouze do granulózní vrstvy kortexu, kde tvoří synapse s dendrity granulózních buněk a dalších interneuronů granulózní vrstvy. Axony granulózních buněk pak stoupají do molekulární vrstvy, kde se rozvětvují na

obě strany ve tvaru písmene T a probíhají jako tzv. paralelní vlákna, která se spojují s dendrity Purkyňových buněk (Králíček, 2011).

Kromě buněk Purkyňových a granulárních existují v kůře mozečku ještě další typy neuronů. Jedná se o tři druhy inhibičních interneuronů – buňky košíčkové, hvězdicovité a buňky Golgiho. Košíčkové a hvězdicovité buňky jsou aktivovány paralelními vlákny molekulární vrstvy a jejich úkolem je zajistit tzv. laterální inhibici sousedních Purkyňových buněk. Jako mediátor využívají kyselinu gama aminomáselnou. Golgiho buňky jsou též stimulovány paralelními vlákny. Na rozdíl od buněk košíčkových a hvězdicovitých však tlumí buňky granulární místo buněk Purkyňových. Jako inhibiční neurotransmitery pak využívají kyselinu gama aminomáselnou a některé glycin. Kromě těchto klasických typů buněk obsahuje kůra mozečku ještě další, tzv. netradiční neurony. Jedná se o buňky unipolar brush (Altman a Bayer, 1977; Harris a spol., 1993; Mugnaini a Floris, 1994), buňky Lugarovy (Sahin a Hockfield, 1990; Laine a Axelrad, 1996, 1998) a buňky candelabrum (Laine a Axelrad, 1994). Všechny zmíněné netradiční neurony jsou interneurony.

Kromě specifických aferentních spojů tvořených šplhavými a mechovými vlákny dostává mozečková kůra též difuzní aferentaci ze dvou skupin jader retikulární formace mozkového kmene: jader *raphe* a *locus coeruleus*. Axony vycházející z jader *raphe* jsou serotoninergní a končí ve vrstvě granulární a molekulární. Vlákna z *locus coeruleus* jsou noradrenergní a končí ve všech třech vrstvách mozečkového kortexu. Tyto neurony plní neuromodulační funkci, facilitují nebo inhibují úroveň informačního přenosu na synapsích mozečkové kůry (Králíček, 2011).

5.1.2. Funkce mozečku

Mozeček lze z hlediska funkčního i fylogenetického rozdělit na tři oblasti: vestibulární, spinální a cerebrální.

Vestibulární mozeček (*vestibulocerebellum*, *archicerebellum*) je fylogeneticky nejstarší část. Morfologicky zahrnuje *pars nodulofloccularis*. Základní funkcí této partie je udržování vzpřímené polohy těla při stoje a chůzi a dále se podílí na řízení automatických očních pohybů.

Spinální mozeček (*spinocerebellum*, *paleocerebellum*) zahrnuje vermis a paravermální oblast mozečkových hemisfér. Jedná se o fylogeneticky mladší část mozečku. Tato část dostává kopii povelových vzorců, které motorická kůra vysílá během realizace pohybů k motoneuronům. Tuto informaci pak spinální mozeček porovnává se skutečným stavem

pohybu příslušné tělesné partie, detekuje vzniklou diskrepanci a zásahem do aktivity neuronů sestupných motorických drah upravuje vzniklý rozdíl. Vermální oblast kontroluje ventromediální systém motorických drah (spinální motoneurony axiálního a pletencového svalstva). Paravermální oblast naopak kontroluje dorzolaterální systém motorických drah (spinální motoneurony distálních končetinových svalů).

Cerebrální mozeček (*cerebrocerebellum*, *neocerebellum*) zahrnuje laterální partie mozečkových hemisfér a jedná se o fylogeneticky nejmladší část, která se společně s mozkovým kortexem a bazálními ganglii účastní plánování a programování volných pohybů (Králíček, 2011).

Výše uvedené motorické funkce mozečku jsou již známy delší dobu. Nověji se však ukazuje, že mozeček hraje významnou roli také v motorickém učení (Marr, 1969), kognitivních a emočních procesech (pro přehled viz Koziol a spol., 2014) a významně též zasahuje do řečových funkcí (pro přehled viz Marien a spol., 2014).

5.2. Poruchy mozečku

5.2.1. Projevy mozečkového poškození

Při poruchách funkce mozečku se setkáváme se dvěma odlišnými typy syndromů: iritačním a zánikovým. Iritační mozečkový syndrom je vzácný a svými příznaky připomíná parkinsonismus; je zde hypokineze, klidový třes, zvýšený plastický tonus flexorů a flekční držení trupu i končetin.

Častěji vede poškození mozečku k zánikovému mozečkovému syndromu. Jeho hlavními příznaky jsou ataxie, intenční tremor a pasivita, které spolu vytvářejí motorický mozečkový syndrom. Ataxie znamená poruchu koordinace pohybů, ale volní hybnost je v zásadě zachována. Projevuje se asynergií, kdy chybí plynulá návaznost elementárních pohybů, každý dílčí pohyb začíná příliš brzy, nebo naopak příliš pozdě. Dalším projevem mozečkové ataxie je adiadochokineze, tj. neschopnost provádět rychle za sebou alternující pohyby, a dále hypermetrie, kdy vykonávané pohyby nejsou přiměřené; mají příliš velkou amplitudu a přestřelují cíl pohybu (obecněji můžeme hovořit o dysmetrii, která zahrnuje i méně častou hypometrii, tj. nedotažené pohyby). Intenční tremor se projevuje jako oscilace končetiny kolem zamýšleného cíle pohybu, přičemž v klidu tento třes mizí. Pasivita znamená mírný pokles svalového tonu zejména končetin se zvýšeným rozsahem pohybu v kloubech. Na rozdíl od běžné hypotonie z jiných příčin však pasivita není patrná při palpačním vyšetření svalu.

Z těchto základních motorických projevů zánikového mozečkového syndromu pak vyplývá škála dalších potíží. Jedná se především o ataxii stoje a chůze, kdy postižený vykazuje stoj o široké bázi, při chůzi titubuje a případně padá všemi směry nezávisle na poloze hlavy. Asynergie a adiadochokineze orofaciálního svalstva se projevuje jako tzv. skandovaná řeč. Ataxie svalů ruky pak způsobuje velké kostrbaté písmo - makrografii. Mohou se též přidat poruchy koordinace očních pohybů včetně nystagmu (Králíček, 2011).

Příznaky poškození mozečku se mohou lišit tehdy, jde-li o převažující lézi jen některé jeho části. Při postižení archicerebela a paleocerebela (mediální léze) dominuje ataxie stoje a chůze. Naopak neocerebelární syndrom (laterální léze) zahrnuje především ataxii končetin, tj. poruchu cílených pohybů, přestřelování, intenční tremor. Nejčastěji se však můžeme setkat s globálním mozečkovým syndromem, kdy poškození přesahuje hranice funkčních mozečkových oblastí a kombinují se příznaky syndromu paleocerebelárního i neocerebelárního (Králíček, 2011).

Později poznanou součástí zánikového mozečkového syndromu je pak tzv. kognitivně-afektivní syndrom nazývaný též syndrom Schmahmannův (Schmahmann a Sherman, 1998, Schmahmann, 2004). Tento syndrom je vyjádřen především při postižení zadního laloku a případně vermis mozečku. Zahrnuje celou škálu projevů jako zhoršení pracovní a prostorové paměti, visuospeciální desintegrace, poruchy pozornosti, oploštění afektivity, disinhibice, dětské chování, ale také obsedantně-kompulsivní rysy chování. Vyskytují se i řečové problémy; jedná se o tzv. telegrafickou řeč až cerebelární mutismus, dysprosodii a agramatismus.

5.2.2. Příčiny mozečkových poruch

Příčiny poruch mozečku obecně jsou obdobné těm jako v jiných oblastech centrálního nervového systému. Jsou to vývojové vady, traumata, vaskulární poruchy jako ischemie nebo hemoragie, nádory, zánětlivá a autoimunitní onemocnění, intoxikace (např. etanolem, insekticidy, herbicidy, ale i mnoha dalšími látkami), onemocnění metabolická a endokrinní. Zvláště se pak klasifikují mozečková onemocnění s nejasnou etiologií, sporadická degenerativní onemocnění a velká skupina mozečkových hereditárních degenerací, kterým bude věnována samostatná kapitola.

5.3. Dědičná degenerativní onemocnění mozečku

Hereditární ataxie představují velmi rozsáhlou a heterogenní skupinu neurodegenerativních onemocnění. Postihují mozeček, jeho spoje, ale i další části nervového systému, např. periferní nervy, páteřní míchu, mozkový kmen nebo bazální ganglia. Na rozdíl od jiných neurodegenerací, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba, je jejich výskyt mnohem vzácnější, ale ne zanedbatelný. Obvykle se začínají manifestovat v dětství nebo v produktivním věku, výrazně zhoršují kvalitu života, často vedou k invalidizaci pacienta a mohou (někdy i významně) zkracovat život.

Klasifikace cerebelárních degenerací vychází z typu dědičnosti. Jsou rozlišovány choroby autosomálně recesivní, autosomálně dominantní, X vázané gonosomálně dědičné a choroby s dědičností mitochondriální.

5.3.1. Autosomálně recesivní mozečkové ataxie

Jedná se o skupinu onemocnění, která patří k nejčastějším dědičným ataxiím, příkladem je Friedreichova ataxie, ataxia teleangiectasia a ataxie s izolovaným deficitem vitamínu E.

Friedreichova ataxie je autosomálně recesivně dědičné neurodegenerativní onemocnění, jehož příčinou je expanze GAA tripletů v genu pro protein frataxin na 9. chromozomu. Jedná se o nejběžnější hereditární ataxii s udávanou incidencí 3-4/100 000 obyvatel (Schulz a spol., 2009). Mutace vede k dysfunkci mitochondrií a k poruše transportu železa uvnitř mitochondrií (Babcock a spol., 1997). Poškozená funkce frataxinu též vede k následnému mitochondriálnímu oxidativnímu stresu (Marmolino a spol., 2010). První klinické příznaky se manifestují nejčastěji koncem druhé poloviny první dekády života, ale jsou i pacienti s prvními obtížemi ve druhé nebo třetí dekádě. Dochází k progredující ataxii, areflexii dolních končetin, dysartrii, poruše vnímání vibrací a svalové slabosti. Kromě neurologických projevů se také vyskytuje kardiomyopatie a diabetes mellitus (Harding, 1981). Toto onemocnění obvykle brzy pacienta zcela invalidizuje a kardiomyopatie bývá hlavní příčinou předčasného úmrtí (Harding, 1998).

Ataxia teleangiectasia je progresivní multiorgánové onemocnění. Příčinou je mutace v genu ATM (ataxia teleangiectasia mutated) uloženém na 11. chromozomu, která vede k nestabilitě DNA (Ball a spol., 2005). Nemoc se projevuje typicky progredující mozečkovou ataxií, teleangiektáziemi na kůži a spojivkách, imunodeficiencí v oblasti buněčné i humorální

imunity a predispozicí ke vzniku nádorových onemocnění (pro přehled viz Teive a spol., 2015).

Ataxie s izolovaným deficitem vitamínu E je způsobena mutací v genu pro α -tocopherol transfer protein. Klinický obraz je podobný Friedreichově ataxii, přidružuje se nízká hladina vitamínu E (α -tokoferol) v krvi bez poruchy jeho vstřebávání ve střevě (Ben Hamida a spol., 1993).

5.3.2. Autosomálně dominantní mozečkové ataxie

Do této kategorie patří rozsáhlá skupina spinocerebelárních ataxií (SCA) a epizodické ataxie (EA) (pro přehled viz Taroni a spol., 2013).

Spinocerebelární ataxie tvoří velmi početnou skupinu nemocí. Díky moderní genetické diagnostice jejich počet stále stoupá. V současné době je popsáno více než 40 typů. Jednotlivé typy se označují čísly, výjimku představuje dentatorubrální palidolusická atrofie (DRPLA) a SCA3, která je kromě čísla také označována jako Machado-Josephova nemoc (Manto, 2005; Taroni a spol. 2013).

Podstatou mutace řady SCA (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12, SCA17, DRPLA) je patologická expanze trinukleotidových sekvencí-repeatů CAG, následkem je tedy prodloužení polyglutaminového traktu v molekule příslušného proteinu. Čím vyšší počet opakování sekvencí se vyskytuje, tím obvykle dochází k dřívějšímu nástupu a rychlejší progresi onemocnění. Typický je též fenomén anticipace, v každé další generaci nastupují příznaky choroby v časnějším věku a vedou k závažnějšímu stavu pacientů (pro přehled viz Taroni a spol., 2013).

Epizodické ataxie tvoří nesourodou skupinu sedmi chorob. Společnými znaky jsou paroxysmální výskyt ataxie a dalších většinou přidružených mozečkových symptomů. Paroxysmy ataxie mohou trvat od několika sekund až po několik dnů (pro přehled viz Taroni a spol., 2013).

5.3.3. Mozečkové ataxie vázané na chromosom X

Opět se jedná o heterogenní skupinu nemocí. Společný je typ dědičnosti a výskyt ataxie. Příkladem je **syndrom fragilního chromosomu X s tremorem/ataxií (FXTAS)**. Podstatou této choroby je elongace CGG tripletů přesahující počet 200 v genu FMR1. Mezi

charakteristické příznaky onemocnění patří kromě tremoru a ataktické chůze demence, parkinsonský syndrom, neuropatie a autonomní dysfunkce (Hagerman a spol., 2001).

5.3.4. Mozečkové ataxie s mitochondriální dědičností

Jedná se o velmi vzácná onemocnění vykazující maternální přenos. Vedou obvykle k poruše funkce mitochondrií a způsobují proto zpravidla multisystémové postižení projevující se širokou škálou symptomů. Patří mezi ně často právě mozečková nebo senzorická ataxie (pro přehled viz Di Donato a spol., 2013).

5.4. Zvířecí modely hereditárních cerebelárních degenerací

Existuje mnoho kmenů laboratorních myší trpících dědičnými degenerativními onemocněními mozečku (pro přehled viz Cendelin, 2014). Tato zvířata mohou sloužit jako biologické modely daných onemocnění a jsou používána k výzkumu mozečkových funkcí, ke sledování následků poškození mozečku i ke studiu patogeneze degenerativních mozečkových chorob. Jsou významným objektem výzkumu možností terapeutického ovlivnění degenerativních procesů a jejich funkčních dopadů. Jedná se o spontánní, přirozené myši mutanty, dále o kmeny s mutacemi indukovanými a též o myši transgenní. Spontánní mutace, které se u člověka nevyskytují, jsou většinou pouze obecnějšími modely mozečkových poruch nebo neurodegenerativních chorob. Transgenní myši nesoucí vložené lidské mutované geny jsou pak spíše považovány za modely lidských onemocnění, patologický fenotyp se však mnohdy od průběhu lidského onemocnění liší.

Jednotlivé myši modely hereditárních cerebelárních degenerací se od sebe odlišují typem dědičnosti, mechanismy zániku různých typů mozečkových buněk, postižením dalších struktur nervového systému mimo mozeček, ale i funkčními projevy onemocnění.

Mezi nejvýznamnější přirozené mutanty trpící mozečkovou degenerací patří myši Lurcher, Purkinje cell degeneration, Weaver, Staggerer, Nervous, Hotfoot a Reeler.

5.4.1. Myši typu Lurcher

Mutantní myši Lurcher patří k nejčastěji zkoumaným a používaným typům mozečkových mutantů. Jedná se o přirozený model geneticky podmíněné olivocerebelární degenerace. Tato spontánní mutace byla objevena v roce 1954, poprvé však byla popsána

v roce 1960 (Phillips, 1960). Jedná se o mutaci *Grid2^{Lc}* v genu *Grid2* lokalizovaném na 6. myším chromozomu, který kóduje $\delta 2$ podjednotku glutamátového receptoru (GluR $\delta 2$). Mutace vede k záměně aminokyseliny alaninu za threonin na konci třetí transmembránové domény $\delta 2$ podjednotky (Zuo a spol., 1997). Typ dědičnosti je semidominantní. Heterozygotní jedinci (+/Lc) jsou životaschopní, trpí však olivocerebelární degenerací, která zahrnuje téměř kompletní ztrátu Purkyňových buněk a dále redukci interneuronů kůry mozečku, mozečkových jader i neuronů dolní olivy (Caddy a Biscoe, 1979; Zanjani a spol., 2006). Homozygoti (Lc/Lc) životaschopní nejsou, umírají brzy po narození. V průběhu intrauterinního vývoje u nich dochází k masivnímu zániku neuronů mozkového kmene, což vede k následné neschopnosti sát mateřské mléko (Resibois a spol., 1997; Cheng a Heintz, 1997). Homozygoti – nepostižení jedinci, myši typu wild (+/+), jsou zcela zdraví a představují ideální kontrolní zvířata.

Ionotropní receptor GluR $\delta 2$ je exprimován převážně v Purkyňových buňkách mozečku, méně pak v některých neuronech mozkového kmene (Araki a spol., 1993). To vysvětluje právě zánik především buněk Purkyňových a neuronů mozkového kmene. V důsledku této mutace se receptor mění v prakticky trvale otevřený kanál, kdy transmembránový proud kationtů způsobuje permanentní depolarizaci membrány Purkyňových buněk (Zuo a spol., 1997). To je pak považováno za přímou příčinu zániku těchto neuronů a přímý důsledek mutace *Grid2^{Lc}*, která je tedy svou podstatou tzv. gain-of-function mutací (Wetts a Herup, 1982a, b).

První známky degenerace mozečku heterozygotních myší Lurcher se začínají objevovat již 3. – 4. den po narození. Jedná se o změny Purkyňových buněk, kdy se v molekulární vrstvě mozečku objevují pyknotické buňky (Swisher a Wilson, 1977). Redukce počtu Purkyňových buněk je pak patrná mezi 8. a 10. dnem života (Caddy a Biscoe, 1979). Degenerace poté postupuje velmi rychle; 26. den života zbývá již jen 9 % Purkyňových buněk, 63. den 3 % a v 91. dnu života již prakticky žádné Purkyňovy buňky nenacházíme. Ojedinele mohou být nalezeny i v pozdějším věku ještě v oblasti *paraflocculu*, *flocculu* a nodulární zóně mozečku (Duffin a spol., 2010). Sekundárně ubývá granulárních buněk mozečku, přežívá jich jen asi 10 %. Úbytek se týká též neuronů dolní olivy v důsledku ztráty cíle jejich axonů, jímž jsou Purkyňovy buňky (Wetts a Herrup, 1982a,b), po 3 měsících života jich zbývá asi 30% (Caddy a Biscoe, 1979). Dále dochází také k úbytku dalších buněk mozečkové kůry, buněk hvězdicových, košíčkových a Golgiho (Zanjani a spol., 2006). Axony Purkyňových buněk jsou jediným výstupem kůry mozečku, jejich zánik tedy znamená

prakticky funkční dekortikaci mozečku. Mozečková jádra jsou postižena jen mírnou degenerací (Heckroth, 1994a,b; Sultan et al., 2002).

U heterozygotních mutantů Lurcher vykazují Purkyňovy buňky morfologické změny typické pro zanikající buňky. Jedná se především o zmenšení buněk, otok axonů, kondenzaci jader, změny mitochondrií a nepravidelnosti plasmatické i jaderné membrány (Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1992; Dusart a spol., 2006; Norman a spol., 1995). Typický znak zanikající Purkyňovy buňky je výskyt více primárních kmenových dendritů ve věku přibližně 14 dnů (Caddy a Biscoe, 1979).

Mechanismus smrti Purkyňových buněk u heterozygotních mutantů Lurcher nebyl dosud jednoznačně vysvětlen. Některými autory je označován jako apoptóza, nekróza, autofagie nebo i jejich možná kombinace. Za excitotoxickou apoptózu jako následek nadměrné depolarizace považují smrt Purkyňových buněk Zuo a spol. (1997). Norman a spol. (1995) popsali změny v Purkyňových buňkách, které též naznačují, že mechanismem smrti je apoptóza. Jedná se o typické otoky axonů, kondenzaci chromatinu, změny buněčné a jaderné membrány, apoptotická tělíška pohlcená gliemi a též nepřítomnost infiltrace leukocyty.

Některé morfologické známky však mohou svědčit i pro podíl nekrózy jako mechanismu zániku buněk, například axonální otoky, perinukleární shluky chromatinu, zvětšené mitochondrie s dilatovanými kristami (Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1992; Dusart a spol., 2006).

Yue a spol. (2002) naopak předpokládají jako mechanismus smrti Purkyňových buněk autofagii, tj. degradaci vlastních součástí buňky. Pro autofagii by svědčila přítomnost autofagosomů v axonech Purkyňových buněk mutantů Lurcher (Wang a spol., 2006).

Zánik Purkyňových buněk je také možno vysvětlit kombinací výše uvedených mechanismů, čemuž nasvědčují nálezy dalších studií (Nishiyama a Yuzaki, 2010; Nishiyama a spol., 2010).

U myši Lurcher má olivocerebelární degenerace mnoho funkčních následků. Od konce druhého týdne života se začíná projevovat mozečková ataxie, chůze je vratká a vrávoravá, kroky jsou kratší, je zvýrazněna flexe zadních končetin při posunu vpřed. Kroky jsou též variabilnější včetně proměnlivosti vzájemného časového sledu došlapů končetin, kyčel se posouvá výše, myši nejsou schopny plynulé chůze bez klopýtání (Fortier a spol., 1987). Mutanti Lurcher vykazují zhoršené motorické schopnosti a výsledky v rozmanitých motorických testech, např. v testu na rotarodu a rotující mřížce (Lalonde a spol., 1992; Thullier a spol., 1997; Hilber a Caston, 2001; Porrás-García a spol., 2005; Markvartova a spol., 2010). Při volném dopadu na podložku nejsou schopni dopadnout na všechny čtyři

končetiny (Porras-Garcia a spol., 2005). I když se výrazně projevuje motorický deficit, myši Lurcher mají zachovanou jistou míru schopnosti motorického učení, jejich výkony v motorických testech se vylepšují během opakování úkolu, schopnost tohoto učení však klesá s postupujícím věkem (Lalonde, 1994; Lalonde a Thifault, 1994; Lalonde a spol., 1995, 1996a; Hilber a Caston, 2001, Křížková a Vožeh, 2004).

Mutanti Lurcher mají též narušeny kognitivní funkce, což ukazují mnohé testy orientace a prostorového učení. Například v testu v klasickém Morrisově vodním bludišti se skrytým ostrůvkem dosahovali mutanti opakovaně delších latencí nalezení cíle než jedinci nepostižení (Lalonde a spol., 1988; Porras-Garcia a spol., 2005). Jistá schopnost učení je však zachována. Při opakování pokusu docházelo v tomto bludišti postupně ke zkracování latencí dosažení ostrůvku (Porras-Garcia a spol., 2005; Tuma et al., 2017). Porucha dlouhodobé paměti se pak ukázala v testu retence provedeném po sedmi dnech po základním tréninku v Morrisově vodním bludišti. Myši Lurcher částečně zapoměly již naučenou pozici ostrůvku (Hilber a spol., 1998). Změny u těchto mutantů se ukázaly i v klasickém podmiňování mrknutí (Porras-Garcia a spol., 2005, 2010).

Myši Lurcher vykazují vyšší excitabilitu centrálního nervového systému (Cendelin a Vožeh, 1999), vyšší spontánní pohybovou aktivitu (Caston a spol., 1998), větší citlivost k neurotoxickým vlivům (Caddy a Vožeh, 1997) a také odlišnou reaktivitu na bolest (Vožeh a spol., 2001b). Tito mutanti též vykazují četné změny chování, jejichž podstata zatím nebyla zcela vysvětlena. Jde o snížené behaviorální projevy anxiety zdokumentované např. ve vyvýšeném křížovém bludišti (Monnier a Lalonde, 1995; Hilber a spol., 2004). Zde se však spíše může jednat o tzv. behaviorální disinhibici, která se projevuje zejména ve stresových situacích a souvisí s poruchou regulace osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin (Frederic et al., 1997; Hilber a spol., 2004; Tuma et al., 2017). Snížená inhibice u myší Lurcher se projevuje také sníženou schopností prepulsní inhibice akutní úlekové reakce (tzv. startle response) (Porras-Garcia a spol., 2005). S behaviorální disinhibicí zřejmě též souvisí vysoká incidence mateřské infanticidy a kanibalismu u samic mutantů Lurcher (Tuma a spol., 2013). Ztráta Purkyňových buněk nejspíše souvisí také s postižením kognitivních procesů vyšší úrovně, které bývají popisovány u autismu (Dickson a spol., 2010), proto se v posledních letech některé rysy chování mutantů Lurcher přirovnávají k poruchám typickým pro autismus (autism spectrum disorders).

Další abnormality pak byly nalezeny v imunitním a endokrinním systému. Jedná se o předčasnou involuci thymu ve věku 3 měsíců, ve věku 1 měsíce je však thymus ještě nezměněný (Mandřáková a spol., 2003, 2005). Zjištěny byly též drobné strukturální změny

nadledvin (Beranova a spol., 2002) a zvětšení objemu dřene a *zona fasciculata* a *zona glomerularis* kůry nadledvin (Tuma a spol., 2017), tedy těch částí, které se podílejí na stresové reakci. Zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů moduluje dále neurodegenerativní proces, imunitní i endokrinní funkce (Vogel a spol., 2007).

Mutantní myši typu Lurcher se vyskytují v několika kmenech. V našich experimentech na Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni jsou využívána zvířata kmene B6CBA a C3H. U obou těchto kmenů se jedná o stejnou mutaci a stejný typ olivocerebelární degenerace. Genetický základ a kmenově specifické vlastnosti mohou ale modifikovat některé jejich charakteristiky a ovlivňovat výsledky v testech. Velmi důležitou vlastností kmene C3H je autosomálně recesivně dědičná retinální degenerace postihující jedince nesoucí homozygotní kombinaci alely *rd1* (Chang a spol., 2002), vedoucí k zániku fotoreceptorů a slepotě. Mezi kmeny též existují rozdíly v reakci na bolest a v excitabilitě CNS (Vožeh a spol., 2001b) a ve výkonu v Morrisově vodním bludišti i po vyloučení jedinců s retinální degenerací (Cendelin et al., 2014).

Analogická mutace *Grid2* byla nedávno objevena též u lidí trpících cerebelární degenerací a ataxií (Coutelier et al., 2015). Ač jsou tedy myši Lurcher přirozenými mutanty, lze je dnes považovat za model lidského onemocnění.

5.4.2. Myši Purkinje cell degeneration

K velmi často používaným modelům mozečkové degenerace patří myši *pcd* (Purkinje cell degeneration). Jedná se o autosomálně recesivně dědičnou mutaci *Agtpb 1* v genu kódujícím protein CCP1 (cytosolic carboxypeptidase-like protein) (Mullen a spol., 1976). CCP1 je metalopeptidáza, která má významnou funkci při obměně proteinů v buňce (Berezniuk a spol., 2010) a je též důležitá pro fungování mitochondrií a energetický metabolismus buňky (Chakrabarti a spol., 2010). U zdravých myši je tento gen intenzivně exprimován zejména v Purkyňových buňkách mozečku, fotoreceptorech sítnice a v mitrálních buňkách čichového bulbu (Fernandez-Gonzalez a spol., 2002). To vysvětluje, proč mutanti *pcd* během postnatálního života ztrácejí prakticky všechny Purkyňovy buňky, trpí pomalu progredující degenerací retiny a mitrálních buněk čichového bulbu.

Mozečková degenerace u myši *pcd* spočívá v masivním zániku Purkyňových buněk mezi 3. a 4. týdnem života, v 7. týdnu života přežívají již jen ojedinělé Purkyňovy buňky (Mullen a spol., 1976; Landis a Mullen, 1978, Baltanas a spol., 2013). Zánik Purkyňových buněk se odehrává mechanismem apoptózy a aktivace kaspázy 3 (Kyuhou a spol., 2006).

Degeneraci Purkyňových buněk doprovází též aktivace mikroglie, astrocytů a apoptotický zánik mozečkových oligodendrocytů (Baltanas a spol., 2013; Kyuhou a spol., 2006). Později se přidává degenerace granulárních buněk a mozečkových jader, která je považována za sekundární následek zániku buněk Purkyňových (Lalonde a Strazielle, 2007). Od 3. týdne života také postupně ubývá neuronů dolního olivárního jádra, tato degenerace je rovněž považována za sekundární, způsobenou ztrátou cílů jejich axonů, Purkyňových buněk (Ghetti a spol., 1987).

Od 13. týdne života postupuje degenerace vláken čichového bulbu i traktu, starší myši pak ztrácejí mitrální buňky čichového bulbu (Mullen a spol., 1976). Myši pcd dále postihuje degenerace thalamu (O’Gorman a Sidman, 1985) a postupná retinální degenerace (Chang a spol., 2002). Myši pcd mají nižší tělesnou hmotnost a celkově horší zdravotní stav (Mullen a spol. 1976).

Mutanti pcd mají těžce postiženou motoriku, při chůzi se dotýkají břichem podložky (Triarhou a spol., 1996), mozečková ataxie je patrná od 3. týdne života (Mullen a spol., 1976). Dosahují špatných výsledků v testu na rotarodu, výkon na hranolovém a válcovém stabilním břevnu je dobrý (Le Marec a Lalonde, 1997). Výrazně narušena je i schopnost prostorového učení, myši pcd selhávají v Morrisově vodním bludišti se skrytým ostrůvkem, v testu s viditelným ostrůvkem ale dosahují dobrých výsledků. Z toho je patrné, že se jedná o poruchu prostorové navigace, ne o důsledek motorické dysfunkce (Goodlett a spol., 1992).

5.4.3. Myši Weaver

Myši typu Weaver jsou postiženy semidominantní mutací v genu kódujícím G-protein spřažený s tzv. inward rectifying potassium kanálem (Patil a spol., 1995). Tato mutace vede k dezorganizaci mozečkové struktury, ale i některých dalších oblastí mozku (Hirano a Dembitzer, 1973; Rakic a Sidman, 1973). Na rozdíl od myši Lurcher a pcd je ztráta Purkyňových buněk mozečku jen mírná, zanikají především v přední části vermis, výrazná je ale ztráta buněk granulárních (Hirano a Dembitzer, 1973). Relativně nepostižená zůstává dolní oliva (Blatt a Eisenmann, 1985a), k degeneraci ale dochází v pars compacta substantia nigra (Schmidt a spol., 1982).

Mutanti Weaver jsou postiženi ataxií, dosahují horších výsledků v testech motorické koordinace (Lalonde 1987c; Strazielle a spol., 2006) a špatné výsledky měli též v testech prostorové navigace ve vodních bludištích (Lalonde a Botez, 1986).

5.4.4. Myši Staggerer

Myši typu Staggerer trpí autosomálně recesivní mutací v genu, který kóduje tzv. retinoid-related orphan receptor alfa na 9. chromozomu (Hamilton a spol., 1996). Postižení těchto mutantů se projevuje zejména vrávoravou chůzí, hypotonií, třesem a též menší tělesnou velikostí (Sidman a spol., 1962). V jejich mozečku dochází k degeneraci Purkyňových buněk a sekundárnímu úbytku buněk granulárních a neuronů dolního olivárního jádra (Herrup, 1983; Blatt a Eisenmann, 1985b).

U myši Staggerer se projevují mnohé změny chování i motorických funkcí. Jejich mozeček vykazuje abnormality již při narození, motorické potíže mají již myši novorozené; typická je také nižší tělesná hmotnost (Heuze a spol., 1997). Chůze je nestabilní, jsou popsány kratší latence pádu z břevna a mřížky (Lalonde, 1987a) a myši selhávají i v testu na rotarodu (Caston a spol., 1995).

5.4.5. Myši Nervous

Mutace *nervous* je lokalizována na 8. chromozomu, typ dědičnosti je autosomálně recesivní a vede k degeneraci Purkyňových buněk (Campbell a Hess, 1996; De Jager a spol., 1998). Zánik Purkyňových buněk nastává ve 3. až 8. týdnu života a je doprovázen sekundárním zánikem granulárních buněk (Sotelo a Triller, 1979; Wassef a spol., 1987). V 15 dnech života se v Purkyňových buňkách objevují mitochondrie abnormálního tvaru, následují degenerativní změny drsného endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu a polysomů (Landis, 1973). Část neuronů dolní olivy pak podléhá retrogradní degeneraci jako následek ztráty Purkyňových buněk (Zanjani a spol., 2004), dále je u těchto mutantů popsána degenerace dorzálního kochleárního jádra (Berrebi a Mugnaini, 1988) a pomalu progredující retinální degenerace (Mullen a LaVail, 1975).

Myši Nervous trpí mozečkovou ataxií a hyperaktivitou (Lalonde a Strazielle, 2003). Selhávají v motorických testech i v testu prostorového učení v Morrisově vodním bludišti se skrytým ostrůvkem. V témže testu s ostrůvkem viditelným jsou však jejich výsledky dobré (Lalonde a Strazielle, 2003).

5.4.6. Myši Reeler

Myši Reeler jsou nositeli autosomálně recesivní mutace na 5. chromosomu (Beckers a spol., 1994). Mutovaný gen kóduje protein extracelulární hmoty reelin, který je významný při

adhezi a migraci neuronů během vývoje centrálního nervového systému (D'Arcangelo a spol., 1995). Důsledkem je dezorganizace některých struktur mozku a ektopická lokalizace neuronů. Změny se týkají též mozečku a postiženy jsou hlavně buňky granulární (Caviness a Rakic, 1978). Mutanti Reeler vykazují špatné výsledky v Morrisově vodním bludišti a to se skrytým i viditelným ostrůvkem (Lalonde a Strazielle, 2007).

5.4.7. Myši Hotfoot

Myši Hotfoot jsou nositelé recesivní mutace v genu kódujícím glutamátový receptor (GluR $\delta 2$) lokalizovaném na 6. chromozomu (Lalouette a spol., 1998). Jde tedy o mutaci alelickou k mutaci myši Lurcher. V tomto případě se však jedná o tzv. loss-of-function mutaci, neboť receptor zůstává v endoplasmatickém retikulu a nedostává se na povrch buňky (Matsuda et al., 2002). Hlavní abnormalitou těchto mutantů jsou Purkyňovy buňky s ektopickými dendritickými trny a chybějící presynaptickou inervací (Guastavino a spol., 1990; Liu a Shio, 2008). Postižení se projevuje sníženým držením těla, ataxií, širokou bází a trhavými pohyby zadních končetin (Guastavino a spol., 1990); typická je také porucha prostorového učení (Lalonde a spol., 1996b).

Podobná mutace rušící funkci GluR $\delta 2$ a působící mozečkovou patologií byla objevena i u lidí (Hills et al. 2013). Onemocnění se projevuje recesivně dědičnou ataxií a mimovolnými tonickými pohyby očních bulbů, které lze pozorovat i u mutantních myši Hotfoot a u geneticky modifikovaných myši s vyřazeným genem *Grid2* (Hills a spol., 2013).

Mnohé modely konkrétních lidských onemocnění mozečku vznikly technologiemi vkládání transgenů a jako indukované a cílené mutace (Brown a Nolan, 1998; Nolan a spol., 2000). K nejčastěji používaným a zkoumaným modelům patří myši SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA23, modely Niemann-Pickovy nemoci a Friedreichovy ataxie.

5.4.8. Myši SCA1

Myši SCA1 jsou nositelé lidského mutovaného genu, který kóduje ataxin-1 a působí autosomálně dominantní spinocerebelární ataxií typu 1 (SCA1). Podstatou poruchy je nadměrné opakování CAG tripletu a prodloužená polyglutaminová sekvence ve výsledném proteinu. Běžná délka této sekvence u zdravých jedinců kolísá mezi 6 a 35 opakováními. U lidských pacientů postižených SCA1 se pak jedná o prodloužení na 39 – 83 repetice (Taroni a

spol., 2013). Mozeček těchto myší se vyznačuje tenčí molekulární vrstvou kůry, Purkyňovy buňky jsou sraštelé, s chudším větvením dendritických stromů a nižším počtem trnů (Clark a spol., 1997; Lalonde a Strazielle, 2007). Míra postižení však závisí na počtu opakování CAG tripletu.

5.4.9. Myši SCA2

Jedná se o transgenní myši nesoucí lidský gen pro ataxin-2 s prodlouženou sekvencí opakování CAG tripletu a slouží jako model lidské spinocerebelární ataxie typu 2 (SCA2). Normální ataxin-2 obsahuje většinou 22 – 23 glutaminů v řadě, lidé trpící SCA2 jich mívají 32-77 (Taroni a spol., 2013). Myši SCA2 byly vytvořeny v několika liniích s různou délkou sekvence opakujících se CAG tripletů a tudíž s různou tíží onemocnění.

Myši SCA2 s 58 opakováními CAG v genu pro ataxin-2 (Q58) vznikly ve 3 liniích (Q58-5B, Q58-11, Q58-19), DNA tohoto modelu obsahuje promotor Purkinje-cell-specific (Pcp2). Je zde progresivní funkční deficit mozečku spojený s úbytkem až vymizením Purkyňových buněk (Yamada a spol., 2008). Při testování motoriky těchto myší oproti zdravým bylo zjištěno, že držení na hrazdě je výrazně kratší a v pozdějším věku se postižení jedinci nedokáží hrazdy zachytit vůbec. Analýza chůze u myší linie Q58-19 prokázala zkrácení kroku již ve věku 8 týdnů, a to se s postupujícím věkem zvyrazňovalo. U myší linie Q58-5B a Q58-11 pak bylo zkrácení kroku signifikantní v 16 týdnech života. Motorický deficit byl zjištěn i na akcelerujícím rotarodu. U myší šestitýdenních rozdíl mezi postiženými a zdravými nalezen nebyl, v pozdějším věku se však rozdíly projeví a ještě i prohlubovaly. U heterozygotních zvířat se latence pádu z rotarodu zkrátily ve věku 26 týdnů, u homozygotních pak již v 16 týdnech života (Huynh a spol., 2000).

Další myší model SCA2 byl vytvořen inzercí genu obsahujícího 75 CAG tripletů pod regulací vlastního SCA2 promotoru (Aguiar a spol., 2010). Projevuje se obdobným motorickým postižením, které bylo zjištěno v testu na rotarodu a s věkem se zvyrazňuje. U nemocných myší Purkyňovy buňky degenerují, což se projevuje chyběním dendritických stromů a zmenšením jejich buněčného těla (Aguiar a spol., 2010).

Nejnovější myší model SCA2 nese gen se 127 opakováními CAG tripletu, který je rovněž pod kontrolou promotoru Pcp2 (Hansen a spol., 2013). Motorické schopnosti těchto myší se začínají výrazně zhoršovat již od 8. týdne věku a snižování počtu Purkyňových buněk je pozorovatelné od 12. týdne. Vyšetřením různě starých myší této linie (12 – 40 týdnů) se zjistilo, že dochází k postupnému ztenčování molekulární vrstvy mozečkové kůry (Hansen a

spol., 2013). Dále bylo zjištěno, že 4 týdny staří mutanti se lišili od stejně starých kontrolních myši přítomností perinukleárního ataxinu-2 v Purkyňových buňkách ve formě inkluzí, jejichž počet narůstal s věkem. Jinde v cytoplasmě přítomnost tohoto proteinu zjištěna nebyla (Hansen a spol., 2013). Charakteristická je též snížená exprese genů specifických pro Purkyňovy buňky a nižší frekvence akčních potenciálů těchto buněk (Hansen a spol., 2013).

Projevy onemocnění SCA2 jsou závažnější u myších modelů s delším polyglutaminovým traktem v ataxinu-2. Tento jev je ve shodě s projevy u lidských pacientů, kde se projevuje negativní korelace mezi délkou CAG sekvence a věkem nástupu prvních příznaků choroby (Riess a spol., 1997).

5.4.10. Myši SCA3

Spinocerebelární ataxie typu 3 (SCA3, Machado-Josephova nemoc) je degenerativní onemocnění s pozdním nástupem, způsobené expanzí CAG tripletu v genu kódujícím ataxin-3. Normální počet opakování CAG v alelách je od 12 do 44. Pacienti trpící SCA3 mívají 52 – 86 CAG repetice (Taroni a spol., 2013).

Transgenní myši SCA3 byly vytvořeny jako model nesoucí alely obsahující sekvence o 64, 67, 72, 76 a 84 opakování CAG (Cemal a spol., 2002). Myši jsou postiženy ztrátou neuronů v jádrech pontu, mírnou degenerací Purkyňových buněk a v závislosti na počtu kopií transgenu se zvyšuje i počet reaktivních astrocytů v nucleus dendatus a bílé hmotě mozečku (Cemal a spol., 2002).

5.4.11. Myši SCA6

Spinocerebelární ataxie typu 6 (SCA6) je způsobena expanzí CAG repetice v genu, který kóduje napěťově závislý vápníkový kanál alfa 1A (Zhuchenko a spol., 1997). Normální alely obsahují 4 – 6 opakování CAG, alely způsobující onemocnění však mají 20 – 33 těchto repetice (Taroni a spol., 2013). Myší model SCA6 nesoucí sekvenci 84 glutaminů je postižen agregací patologického proteinu a vyvíjí se proto u něho progresivní motorický deficit (Watase a spol., 2008).

5.4.12. Myši SCA7

Spinocerebelární ataxie typu 7 (SCA7) je další z neurodegenerativních onemocnění způsobených prodloužením sekvence opakujících se tripletů CAG v genu kódujícím ataxin-7. Normální počet repetice je 7 – 19, patologické alely obsahují obvykle 37 – 400 CAG tripletů. Hlavními projevy tohoto onemocnění je těžká forma ataxie a ztráta zraku jako následek makulární degenerace (Taroni a spol., 2013). Myší model nesoucí sekvenci 90 glutaminů a exprimující mutantní ataxin-7 vykazuje výskyt jaderných inkluzí mutantního ataxinu-7 v Purkyňových buňkách mozečku a ve fotoreceptorech sítnice. Hlavními projevy choroby jsou pak poruchy motorické koordinace a zraku (Yvert a spol., 2000).

5.4.13. Myši SCA17

Spinocerebelární ataxie typu 17 (SCA17) je degenerativní porucha s pozdním nástupem, která je způsobena expanzí polyglutaminových sekvencí v proteinu TBP (TATA-box-binding protein). Nemoc je charakterizována progresivní ataxií, křečemi, kognitivními poruchami a neuropsychickými příznaky. Zatímco zdraví lidé mají 23-43 CAG tripletů, postižení pacienti vykazují zvýšení počtu až na 45-63 repeatů. Byly vyvinuty 2 myší modely tohoto typu onemocnění (Friedman a spol., 2007; Chang a spol., 2011) a navíc, jako u jediného typu SCA ještě i potkaní model. Právě tento model se ukázal jako velmi výhodný a podobně jako myši SCA17 i tyto potkani vykazují těžké neurologické defekty včetně ataxie, poruchy posturálních reflexů, hyperaktivitu, která je později vystřídána hypoaktivitou, úbytkem tělesné hmotnosti a předčasnou smrtí (Kelp a spol., 2013).

5.4.14. Myši SCA23

Typ SCA23 spinocerebelární ataxie je extrémně zřídka se vyskytující a relativně v pozdním věku nastupující neurodegenerativní onemocnění charakterizované postupující ataxií patrnou na chůzi i na horních končetinách, s dalšími variabilními příznaky včetně periferní neuropatie a dysartrie (Bakalkin a spol., 2010). Podstatou je mutace v genu pro prodynorfin (Verbeek a spol., 2004). Myši s vyřazeným genem pro prodynorfin jsou citlivější k noxiózním podnětům, ale vykazují normální odpovědi na běžné stimuly (Wang a spol., 2001); navíc mutantní dynorfinové proteiny zvyšují neopioidní excitační aktivity, které mohou podmiňovat vývoj SCA23 (Watanabe a spol., 2012).

5.4.15. Model Niemann-Pickovy nemoci

Niemann-Pickova nemoc je střádavá choroba s autosomálně recesivní dědičností. Jedná se o patologickou akumulaci cholesterolu a glykosfingolipidů, vyskytuje se ve třech různých typech (A, B, C). Projevy jsou rozmanité, postižení je typické i mimo nervový systém. K úbytku Purkyňových buněk mozečku dochází u varianty C. Existují myší kmeny s mutací způsobující podobné onemocnění, vytvořeny byly ale též transgenní modely Niemann-Pickovy choroby typu C (Maue a spol., 2012).

5.4.16. Model Friedreichovy ataxie

Friedreichova ataxie je nejčastější lidská autosomálně recesivně dědičná mozečková ataxie (viz výše). Bylo pro ni vytvořeno již několik transgenních myších modelů. Jedná se například o model vykazující výskyt vakuol v neuronech ganglií zadních míšních kořenů, demyelinizaci axonů, poruchy koordinace a sníženou pohybovou aktivitu (Al-Mahdavi a spol., 2006).

5.5. Význam myších modelů v experimentální terapii cerebelárních degenerací

Lidský mozek disponuje pouze omezeným regeneračním potenciálem i kapacitou neurogeneze. Masivní zánik neuronů při neurodegenerativních onemocněních proto obvykle vede k ireverzibilnímu funkčnímu deficitu. V současné době neexistuje skutečně účinná kauzální terapie těchto onemocnění, která by dokázala zastavit, nebo alespoň významně zpomalit progresi onemocnění a případně také obnovit poškozené funkce. To platí též pro většinu hereditárních degenerativních chorob mozečku. Základem jejich léčby je dnes rehabilitace a fyzikální terapie, která do jisté míry dokáže vylepšit pohybové schopnosti pacienta, pomáhá pacientům udržet co nejdéle určitou schopnost sebeobsluhy a facilituje kompenzační mechanismy (Ilg a spol., 2010; Miyai a spol., 2012). Neřeší však progresi degenerace.

Výzkumy na myších modelech dědičných ataxií ukazují směry, které by v budoucnu mohly vést k vývoji účinné terapie. Jedním z nich je zásah do patogeneze nemoci, který by zpomalil nebo dokonce zastavil její progresi. Takovou terapii je ovšem nutné zahájit dříve,

než dojde k zániku buněk a k nevratným poškozením nervového systému. Další nadějnou možností jsou neurotransplantace.

Výzkum možných zásahů do patogenetického procesu onemocnění je zatím ve stadiu pokusů na zvířatech, kde se uplatňují především transgenní myší modely konkrétních degenerací mozečku.

Tam, kde se předpokládá škodlivý vliv hromadícího se patologického proteinu, by podstatou terapie mohlo být utlumení exprese mutovaného genu nebo podpora eliminace hromadícího se proteinu. Například u transgenních myší SCA3 způsobilo zastavení exprese ataxinu-3 zmírnění funkčního deficitu i neuropatologických změn (Nobrega a spol., 2013). Podobná situace byla zjištěna u myšího modelu SCA7, kdy 50% redukce exprese mutovaného genu zahájená měsíc po vzniku ataxie dokázala zastavit rozvoj motorické poruchy nebo ji dokonce zvrátit (Furrer a spol., 2013). Dalším příkladem je terapie interferonem beta, která u transgenních myší SCA7 podpořila degradaci patologického ataxinu-7, omezila množství jeho intranukleárních inkluzí a též zmírnila motorickou poruchu postižených myší (Chort a spol., 2013). Nevýhodou těchto postupů je nutnost zahájit terapii dříve, než dojde k zániku většího množství neuronů. U degenerativních chorob s pozdním nástupem a pozvolnou progresí by toto bylo možné díky genetické diagnostice, u chorob s časným nástupem však může být záchrana zanikajících buněk obtížná. Problematické u lidských pacientů by také mohly být i postupy vyžadující genetickou modifikaci.

V současné době se též ukazuje jako nadějná možnost podpory funkce mozečku pomocí neinvazivní transkraniální magnetické stimulace nebo transkraniální stimulace stejnosměrným proudem (Grimaldi a Manto, 2013; Grimaldi a spol., 2014). Tyto metody jsou zatím ve stadiu výzkumu, ale představují do budoucna jistou možnost využití u lidských pacientů postižených mozečkovými degeneracemi (Grimaldi a spol., 2014).

5.6. Neurotransplantační terapie mozečkových degenerací

Metody neurotransplantace zůstávají v současné době stále ve stadiu experimentálních studií. K výzkumu transplantační terapie poškození mozečku byly využity některé typy mutantních myší, které postihuje dědičná cerebelární degenerace. K transplantaci je možné využít odlišné typy buněk: embryonální (fetální) nervovou tkáň, embryonální nebo dospělé neurální kmenové buňky, embryonální kmenové buňky, též mesenchymální kmenové buňky, indukované pluripotentní kmenové buňky respektive neurální (neuronální) progenitory

připravené *in vitro* částečnou diferenciací kmenových buněk. Smyslem tohoto výzkumu je dosáhnout funkčního zlepšení a zmírnění dalších příznaků degenerace. Experimenty také přinášejí poznatky o přežívání a vývoji transplantovaných buněk různých typů a o faktorech, které vývoj transplantátu ovlivňují. Mezi hlavní faktory ovlivňující transplantát patří vlastnosti samotných transplantovaných buněk, ale i vlastnosti hostitelské tkáně. Patologické změny probíhající při daném degenerativním onemocnění mohou dále měnit neurogeničnost tkáně hostitele; např. zánětlivé procesy, změny struktury tkáně, zmnožení a aktivace glie (pro přehled viz Rossi a Cattaneo, 2002). V úvahu též připadají další faktory jako změny mikrocirkulace nebo oxidační stres provázející neurodegenerativní poruchy (Andersen, 2004; Kolinko a spol., 2015).

K výzkumu neurotransplantací byly zatím nejčastěji využívány myši **pcd**, jsou považovány za vhodný model pro tento účel. Dárcovské Purkyňovy buňky jsou u těchto myší schopné opustit embryonální mozečkový štěp, migrovat do své přirozené pozice v molekulární vrstvě (Sotelo a Alvarado-Mallart, 1987a, b) a synapticky se integrovat do mozečkové kůry příjemce (Sotelo a Alvarado-Mallart, 1986, 1991). Sotelo a Alvarado-Mallart (1987a) vyslovili domněnku, že defektní molekulární vrstva mutantů **pcd** může selektivně neurotroficky působit na neurony chybějící kategorie. Také Carletti a Rossi (2005) prokázali, že mozeček myší **pcd** poskytuje signály pozitivně působící na transplantované Purkyňovy buňky. Za určitých okolností byla popsána i možná obnova kortikonukleárních projekcí (Sotelo a Alvarado-Mallart, 1987b; Triarhou a spol., 1992; Keep a spol., 1992). Je však nutné, aby se transplantované Purkyňovy buňky nacházely v blízkosti mozečkových jader (Keep a spol., 1992). Granulární vrstva mozečkové kůry totiž představuje bariéru, která brání prorůstání vláken z molekulární vrstvy do hloubky. Purkyňovy buňky pocházející z transplantátu a nacházející se ve své přirozené pozici (na hranici vrstvy molekulární a granulární) mají proto minimální možnost vytvoření kontaktů s mozečkovými jádry (Carletti a spol., 2008). Naopak Purkyňovy buňky transplantované přímo do jader mozečku mají dokonce schopnost vytvořit s jejich neurony synaptické kontakty a poté stoupat do mozečkové kůry (Triarhou a spol., 1992). Dalším významným zjištěním bylo, že transplantace suspenze fetálních buněk mozečku do oblasti mozečkových jader vedla ke zlepšení motoriky myší **pcd** (Triarhou a spol., 1995, 1996).

Opakovaně byly k neurotransplantacím použity také myši typu **Lurcher**. Tomey a Heckroth (1993), kteří využili k transplantaci suspenzi embryonálních mozečkových buněk, udávají přežívání transplantátu u poloviny mladých, ale i dospělých myší **Lurcher**. Po transplantaci embryonálních mozečkových buněk se na povrchu hostitelského mozečku

vytvořily shluky transplantovaných buněk, které vykazovaly organotypickou strukturu, a transplantované buňky pronikaly do molekulární vrstvy mozečku hostitele (Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1993; Heckroth a spol., 1998; Tomey a Heckroth, 1993). Migrace buněk pocházejících z transplantátu do molekulární vrstvy byla také pozorována po transplantaci solidního embryonálního transplantátu (Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1993). Transplantované Purkyňovy buňky však neměly typické plošné uspořádání dendritických stromů, tento jev může být vysvětlen nedostatkem paralelních vláken nezbytných k formování dendritů Purkyňových buněk (Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1993; Tomey a Heckroth, 1993). Včasná transplantace normálních embryonálních Purkyňových buněk však může zabránit degeneraci buněk granulárních a neuronů dolní olivy. To dokládá, že zánik těchto typů buněk je sekundárního charakteru (Heckroth a spol., 1998). Po transplantaci mesenchymálních kmenových buněk novorozným myším Lurcher došlo i ke zlepšení v testech motoriky. Zde transplantované buňky dokázaly migrovat do hostitelského mozečku a usídlit se poblíž buněk Purkyňových, kde došlo k produkci neurotrofických faktorů (BDNF, NT-3, GDNF) a vlastní Purkyňovy buňky hostitele lépe přežívaly (Jones a spol., 2010).

U novorozných myší typu **Nervous** transplantace neurálních kmenových buněk předešla zániku Purkyňových buněk a též zlepšila koordinaci pohybů (Li a spol., 2006a). Transplantované buňky byly schopny vytvořit kontakty s Purkyňovými buňkami hostitele, podpořily funkci jejich mitochondrií, růst dendritů a synaptogenezi (Li a spol., 2006a). Také Jaderstad a spol. (2010) popsali, že neurální kmenové buňky transplantované myším **Nervous** se nedokázaly plně diferencovat v neurony, ale vytvořily s buňkami hostitele kontakty typu gap junction.

U myšího modelu **Weaver** transplantovaná tkáň vytvořila typické uspořádání trojvrstevné struktury kůry mozečku. Buňky odpovídající granulárním buňkám dokázaly proliferovat, migrovat z místa aplikace a vytvořit synaptické kontakty (Kohsaka a spol., 1988, Takayama a spol., 1987, 1988).

U myšího modelu **SCA1** transplantace suspenze buněk embryonálního mozečku způsobila zlepšení motorických funkcí (Kaemmerer a Low, 1999). Transplantace neurálních prekursorových buněk myším **SCA1** vylepšila motorické schopnosti, podpořila přežívání Purkyňových buněk a způsobila normalizaci jejich membránového potenciálu; transplantované buňky však nejevily známky diferenciaci v buňky Purkyňovy (Chintawar a spol., 2009). Intrathekální injekce mesenchymálních kmenových buněk u myší **SCA1** zmírnila dezorganizaci mozečku a normalizovala koordinaci pohybů (Matsuura a spol., 2013).

Chang a spol. (2011) popsali u myšího modelu **SCA2**, že intravenózní aplikace lidských mesenchymálních kmenových buněk zvýšila přežívání vlastních Purkyňových buněk, oddálila nástup projevů onemocnění a zlepšila motorické funkce myši. Při aplikaci intrakraniální však k podobným účinkům nedošlo (Chang a spol., 2011).

U myšího modelu **Niemann-Pickovy nemoci typu C** byly využity mesenchymální kmenové buňky pocházející z kostní dřene. Jejich transplantace v postiženém mozečku utlumila aktivaci astrocytů a mikroglie (Bae a spol., 2005). Tato léčba zvýšila počet přežívajících Purkyňových buněk. Elektricky aktivní Purkyňovy buňky vznikly fúzí těch stávajících s transplantovanými mesenchymálními kmenovými buňkami a navíc došlo i ke zlepšení motorických schopností postižených myši (Bae a spol., 2007). Transplantace kmenových buněk získaných z tukové tkáně rovněž ochránila Purkyňovy buňky před degenerací, zmírnila zánětlivou reakci a obnovila schopnost motorické koordinace u těchto zvířat (Bae a spol., 2010).

Neurotransplantační terapie již byla využita i v klinických zkouškách u **lidských pacientů** s cerebelární degenerací (Tian a spol., 2009; Lee a spol., 2012). Některé výsledky mohou být nadějně, ale v humánní medicíně zatím mozečkové transplantace rozhodně nelze považovat za rutinní léčebnou metodu. Problematická je též velká variabilita lidských hereditárních mozečkových ataxií a případně odlišné přístupy k neurotransplantační terapii.

Zatím ani výsledky studií neurotransplantačí na myších modelech nejsou jednotné, i když některé práce poukazují na funkční zlepšení postižených zvířat. Toto zlepšení navíc bylo doloženo jen u některých typů mutantů, některých typů transplantátu a je zde také závislost na fázi vývoje příslušné degenerace. Navíc stále není jasné, jakými mechanismy neurotransplantace vede k nápravě nervových funkcí v konkrétních případech, který typ transplantátu je vhodný u určitého onemocnění, případně ve které jeho fázi, a zda vůbec můžeme očekávat funkční zlepšení u všech typů cerebelárních degenerací. Je proto nutné pokračovat v dalších studiích k hlubšímu pochopení této problematiky.

6. VÝCHODISKO

1. Hereditární mozečkové ataxie jsou širokou skupinou závažných onemocnění, u nichž zatím neexistuje skutečně účinná terapie. Vhodným nástrojem pro výzkum patogeneze i experimentální léčby těchto chorob jsou mnohé myší modely.
2. Mutantní myši typu Lurcher reprezentují přirozený model geneticky podmíněné olivocerebelární degenerace. Tyto myši trpí progresivní postnatální ztrátou Purkyňových buněk mozečku, úbytkem buněk granulárních a neuronů dolní olivy. Zdraví sourozenci, wild typy, nám slouží jako kontroly. I přes dlouholetý výzkum těchto mutantů není jednotný názor na mechanismy zániku Purkyňových buněk a průběh degenerace zatím není znám do všech detailů. Dvojité fluorescenční barvení umožňuje sledovat vývoj časných změn v mozečkové kůře myši Lurcher ve srovnání se zdravými wild typy.
3. Jednou z možností léčby hereditárních mozečkových degenerací je neurotransplantace. Přes dlouholetý výzkum neurotransplantací dosud nebyla prokázána jejich univerzální použitelnost a zdá se, že mohou mít odlišnou úspěšnost u různých typů onemocnění mozečku, včetně různých typů mozečkových degenerací. Proto je potřeba zkoumat neurotransplantace u různých animálních modelů představujících odlišné patologické podmínky.
4. Široká škála myších mutantních modelů cerebelárních degenerací odráží pestrost lidských dědičných cerebelárních degenerací. Jednotlivé modely však obvykle mají zároveň různý genetický základ, který může potenciálně též ovlivňovat výsledky experimentů. Posouzení případného vlivu genetického pozadí dané mutace umožňuje srovnání různých myších kmenů nesoucích identickou mutaci zapříčiňující degeneraci mozečku.
5. Mozečkoví mutanti typu Lurcher a pcd jsou vhodným modelem ke studiu neurotransplantační terapie. Tyto typy mutantů mají velmi podobný průběh mozečkové degenerace, ač je její patogeneze zcela odlišná, a oba byly v minulosti opakovaně využity k experimentálním neurotransplantacím. Přesto zatím ani u jednoho z nich nebyl dostatečně zkoumán objem, morfologie a funkční dopad embryonálního mozečkového transplantátu na motorické schopnosti myší odvozených od různých typů kmenů. Neexistuje přímé srovnání vývoje transplantátu u těchto mutantů za identických experimentálních podmínek.

7. CÍL PRÁCE

1. Analýza dynamiky morfologických změn v průběhu mozečkové degenerace u myší typu Lurcher kmene C3H a B6CBA za použití dvojitého fluorescenčního barvení.

2. Neurotransplantační terapie u myších modelů mozečkových degenerací:

Porovnat přežívání, objem, morfologii a funkční efekt embryonálního mozečkového transplantátu aplikovaného ve formě buněčné suspenze u:

a) dospělých myší typu Lurcher kmene B6CBA, myší pcd kmene B6.BR a myší typu wild obou těchto kmenů s dvouměsíčním pooperačním přežíváním příjemců.

Hypotéza: Sledované parametry se liší v závislosti na typu degenerace.

b) dospělých myší typu Lurcher kmenů B6CBA a C3H a myší typu wild obou těchto kmenů se šestiměsíčním přežíváním příjemců po operaci.

Hypotéza: Mutace Lurcher a kmen laboratorní myši budou mít vliv na sledované parametry transplantátu.

8. MATERIÁL A METODY

8.1. Uspořádání pokusů

Za účelem splnění vytýčených cílů práce jsme provedli dvě studie. V první jsme zkoumali rozvoj morfologických změn v mozečkové kůře myší Lurcher. Druhá studie, sestávající z několika dílčích pokusů, byla zaměřena na neurotransplantační terapii důsledků neurodegenerativního onemocnění mozečku myší Lurcher a pcd.

Práce s experimentálními zvířaty byla v souladu s platnou legislativou České republiky a Evropské unie. Bylo vyvinuto maximální úsilí k minimalizaci utrpení pokusných zvířat.

8.2. Hodnocení dynamiky morfologických změn v mozečkové kůře myší typu Lurcher

V první studii jsme hodnotili dynamiku morfologických změn v mozečkové kůře u mutantních myší typu Lurcher a myší zdravých, odvozených od dvou kmenů (C3H a B6CBA) během 8. – 21. dne jejich postnatálního života. K tomuto účelu bylo použito dvojité fluorescenční barvení mozečkových řezů, které dobře zobrazuje Purkyňovy buňky.

Klasické metody jako barvení dle Nissla, impregnace dle Golgiho doplněné elektronovou mikroskopií byly použity v několika původních pracích popisujících kvantitativní změny v mozečkové kůře a dolní olivě, včetně typických charakteristik Purkyňových buněk, u mutantů Lurcher (Caddy a Biscoe, 1979). Později, využití především imunohistochemie anti-calbindinem umožnilo objevit další cenné poznatky týkající se morfologických změn mozečku myší Lurcher (Dumesnil-Bousez and Sotelo, 1992; Doughty et al., 2000; Norman et al., 1995).

Dvojité fluorescenční barvení nám poskytlo nové informace především o morfologických změnách jader a jadérek a také o formování tvaru Purkyňových buněk v raném stadiu postnatálního života pokusných myší.

8.2.1. Pokusná zvířata

Celkem jsme v této studii použili 56 myší obou pohlaví ve věku 8 – 21 dní (36 zvířat kmene C3H, 20 zvířat kmene B6CBA). Vždy jsme popisovali dva až tři páry myší – Lurcher a wild typu v 6 časových periodách během 8. až 21. dne postnatálního života. Jednalo se o

myši z konvenčního chovu Ústavu patologické fyziologie LF UK v Plzni, které byly získány křížením samic typu wild (+/+) a samců typu Lurcher (+/Lc) daných kmenů. Myši byly chovány ve standardních podmínkách v plastových klecích s drátěným víkem při teplotě 22-24 °C, vlhkosti vzduchu 50 %, periody světla a tmy se pravidelně střídaly po 12 hodinách. Voda a potrava byly zvířatům dostupné *ad libitum*.

8.2.2. Příprava mozečkových řezů

Pokusná zvířata byla hluboce anestetizována thiopentalem aplikovaným intraperitoneálně a následně transkardiálně perfundována fosfátovým pufrům (pH 7,4) a 4% paraformaldehydem (pH 7,4). Mozky myši byly izolovány a postfixovány 2 hodiny ve 4% paraformaldehydu (pH 7,4) při teplotě 4 °C. Sagitální mozečkové řezy (150 μm) byly nakrájeny pomocí vibratomu (Leica).

8.2.3. Dvojité fluorescenční barvení

K histologickému vyšetření mozečků bylo použito dvojité fluorescenční barvení popsané Krögerem a Wagnerem (1998). Mozečkové řezy byly nejprve inkubovány v 0,2% roztoku LuciferYellow (Lucifer Yellow CH dilithium salt, LY, Sigma L-0259) ve fosfátovém pufru po dobu 1 hodiny, dále promyty 5 minut ve fosfátovém pufru a postfixovány 30 minut v paraformaldehydu. Dalším krokem byla dehydratace řezů postupně v 50, 70, 90 a 100% etanolu (vždy 10 minut) a inkubace v DiD (1,1'-Diocadecyl - 3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Sigma 42364, 0,2% roztok v etanolu) po dobu 5 minut. Následovalo propláchnutí 100% etanolem a rehydratace 90% (5 min), 70% (10 min) etanolem a fosfátovým pufrům (10 min). Poté byly mozečkové řezy na podložním skle převrstveny médiem pro fluorescenční barvení FluorSave Reagent (Calbiochem 345789) a překryty krycím sklem. Preparáty byly hodnoceny za využití konfokálního laserového mikroskopu Olympus Fluoview FV 10i (Olympus Corporation).

8.3. Neurotransplantační terapie myší s cerebelární degenerací

Sledovali jsme vývoj a funkční efekt embryonálního mozečkového transplantátu u několika myších modelů mozečkových degenerací a odpovídajících zdravých kontrolních myší. V rámci této neurotransplantační studie jsme provedli následující dílčí experimenty:

- Pokus 1: Transplantace embryonální mozečkové tkáně ve formě suspenze u dospělých myší typu Lurcher kmene B6CBA, myší pcd kmene B6.BR a myší typu wild obou těchto kmenů s dvoutříměsíčním přežíváním příjemců po operaci

Cílem této části práce bylo porovnat vývoj embryonálního mozečkového transplantátu u dospělých myší Lurcher kmene B6CBA a myší pcd kmene B6.BR a jim odpovídajících zdravých myší. Byly hodnoceny motorické schopnosti experimentálních zvířat, přežívání transplantátu, jeho struktura a objem 2 měsíce po transplantaci.

- Pokus 2: Transplantace embryonální mozečkové tkáně ve formě suspenze u dospělých myší typu Lurcher kmenů B6CBA a C3H a myší typu wild obou těchto kmenů se šestitříměsíčním přežíváním příjemců po operaci

Cílem této části práce bylo vyhodnotit objem a morfologii transplantátu i funkční dopad transplantace embryonální mozečkové suspenze na motorické schopnosti mutantů Lurcher a zdravých kontrol kmenů B6CBA a C3H. Přežívání těchto myší po transplantaci bylo 6 měsíců.

Pro oba tyto experimenty byly společné následující metodické postupy: příprava a aplikace transplantátu, testování pokusných myší na rotarodu, histologické zpracování mozečků příjemců, hodnocení objemu transplantátu a statistické zpracování výsledků. Tyto základní metody proto budou popsány společně. K jednotlivým experimentům pak budou zvlášť popsána pouze jejich specifika.

8.3.1. Základní metody

8.3.1.1. Transplantace embryonální mozečkové tkáně

Pokusným myším byla transplantována embryonální mozečková tkáň ve formě buněčné suspenze. Manipulace s embryi i disekce mozečků byly prováděny v roztoku, který

byl též použit pro skladování transplantátu (transplantace proběhla do 6 hodin po odběru embryí) a jako vehikulum při vlastní aplikaci. Tento roztok byl připraven rozpuštěním 9 g chloridu sodného a 6 g glukózy v 1 litru deionizované vody. Roztok byl sterilizován pomocí sterilizačních filtrů Steritop (Millipore) s průměrem pórů 0,22 μm .

8.3.1.2. Dárce transplantátu

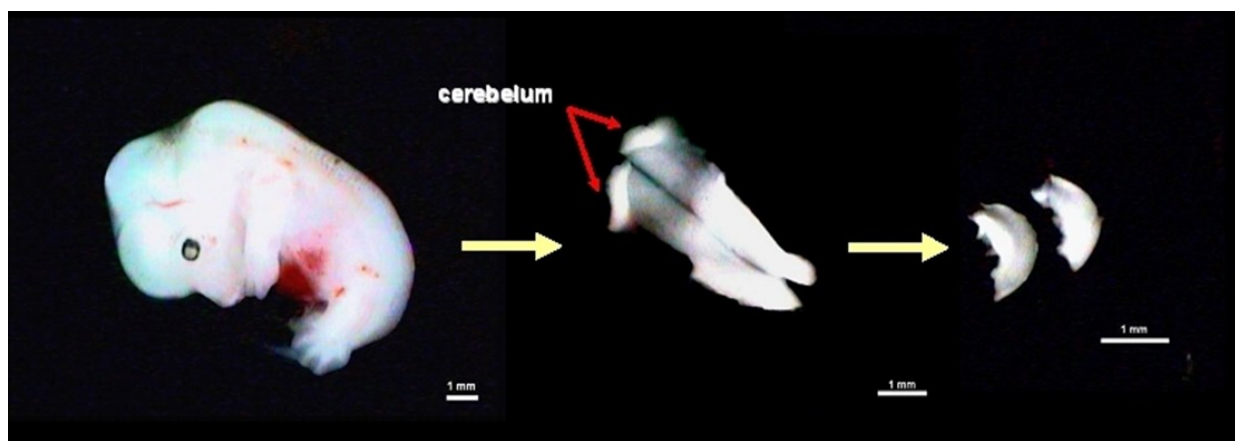
Dárce tkáně transplantátu byla embrya nesoucí gen pro posílený zelený fluoreskující protein (*Enhanced green fluorescent protein*; EGFP). Embrya byla získána křížením samice téhož kmene, ze kterého pocházel i příjemce tkáně, a EGFP pozitivního samce kmene C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Os/J. Gestační stáří embryí při odběru transplantátu bylo 12 dní (E12), bylo určeno dle data vložení samce do chovné klece k dárcovské samici. Samec byl z klece odstraněn následující den dopoledne a tento den byl počítán jako nultý. Gravidní samice pak byly spolehlivě identifikovány podle výrazného vzestupu jejich tělesné hmotnosti v posledních dnech před plánovaným odběrem embryí.

8.3.1.3. Odběr transplantátu, příprava suspenze embryonálních buněk

Gravidní dárcovské samice byly hluboce anestetovány thiopentalem a byla provedena důkladná dezinfekce břicha ajatinem. Dalším krokem bylo otevření břišní dutiny a vysunutí dělohy. Vyjmutí embryí z dělohy bylo prováděno tak, aby embrya byla co nejdéle zásobena krví přes placentu, tj. od horních pólů rohů dělohy směrem kaudálním. Embrya byla vložena do Petriho misky s chladným roztokem – vehikulem (viz výše), byla dekapitována a hlavy byly přeneseny do Petriho misky s čistým roztokem. EGFP pozitivní embrya byla určena podle zelené fluorescence za osvitů ultrafialovou lampou, tato embrya byla pro další použití přenesena do misky s novým roztokem.

Vlastní odběr embryonálního mozečku byl proveden pod stereoskopickým mikroskopem. Z mozkového kmene byly nejprve odstraněny meniny, pak byl oddělen základ mozečku v podobě dvou srpkovitých částí tkáně nacházejících se po stranách budoucí 4. mozkové komory (Obr. 1). Tyto kusy embryonálních mozečků byly shromažďovány ve zkumavce s vehikulem, poté následovala příprava suspenze. Mozečková tkáň byla inkubována po dobu 10 minut v trypsinu při teplotě 37 °C, poté opakovaně promyta roztokem – vehikulem k odstranění trypsinu a suspendována opakovaným nasáváním pipetou. Koncentrace buněk v suspenzi pak byla upravena na hodnotu 50 000 buněk/ μl . Tato suspenze

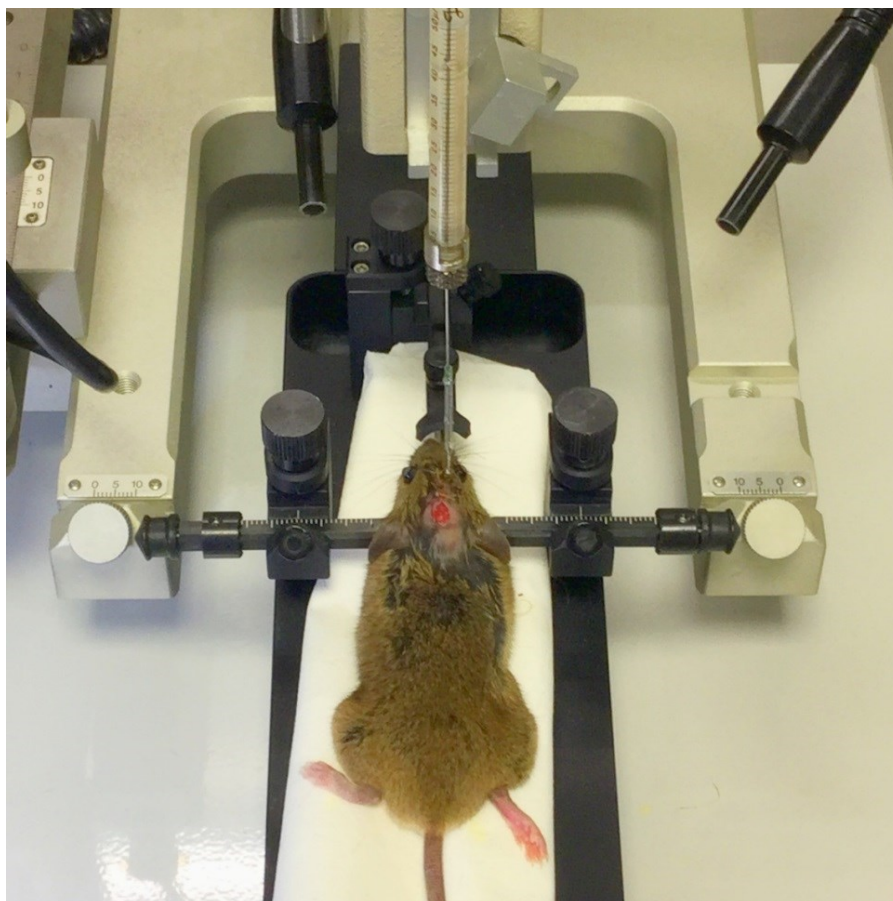
byla dále uchovávána až do doby transplantace příjemci v plastové zkumavce umístěné v ledové tříšti. Maximální doba uchovávání buněčné suspenze nepřesáhla 6 hodin.



Obr. 1: Odběr základu embryonálního mozečku.

8.3.1.4. Aplikace transplantátu

Příjemci transplantátu byli anestetizováni intraperitoneální aplikací ketaminu (100 mg/kg) a xylazinu (16 mg/kg). Po nástupu celkové anestezie byla myši ostříhána srst v parietální a okcipitální oblasti hlavy a tato oblast byla dezinfikována ajatinem. Hlava myši byla upevněna do stereotaktického aparátu (Stoelting). Poté bylo operační pole znovu vydezinfikováno. Oční rohovky myši byly ošetřeny gelem Vidisic jako prevence osychání. Skalpelem byl veden asi 1 cm dlouhý kožní řez ve střední čáře v parietální a okcipitální oblasti. Bilaterálně v příslušných bodech okcipitální kosti (stereotaktické souřadnice viz níže pro jednotlivé experimenty) jsme vyvrtali otvory o průměru cca 2 mm. Buněčná suspenze byla aplikována do mozečku hostitele bilaterálně pomocí mikroinfusní pumpy (Stoelting) a skleněné mikrokapiláry uchycené v rameni stereotaktického přístroje (objem 3 μ l do každé strany). Rychlost aplikace byla 0,5 μ l/min (Obr. 2).



Obr. 2: Myš-příjemce upevněná do stereotaktického aparátu. Pomocí mikroinfusní pumpy probíhá aplikace embryonální buněčné suspenze.

Po aplikaci suspenze byl ještě hrot mikrokapiláry ponechán 5 minut v otvoru, poté byl pozvolna vysunut. Rána byla uzavřena několika jednotlivými stehy v jedné vrstvě vstřebatelným šicím materiálem. Myš byla uvolněna z držáku stereotaktického přístroje, rána dezinfikována. Myš byla nejprve položena na vyhřívanou podložku, po objevení spontánní motorické aktivity pak vrácena do chovné klece. Kontrolním myším byla provedena kontrolní operace, jejíž postup byl zcela shodný s průběhem transplantace s tím rozdílem, že místo suspenze embryonálních buněk bylo aplikováno pouze samotné vehikulum.

8.3.1.5. Testování motorických schopností

Motorické dovednosti byly testovány na akcelerujícím rotarodu (RotaRod Advanced, TSE Systems GmbH) v příslušném časovém odstupu od transplantace (2 nebo 6 měsíců). V tomto testu byl průměr válce 3,5 cm a šířka tyče 8 cm. Rychlost otáčení plynule akcelerovala z 0 na 60 otáček za minutu během 6 minut. Poté byl pokus ukončen. Byly vyhodnoceny latence pádu. Test byl opakován v pěti po sobě následujících dnech (D1 – D5),

každý den proběhly čtyři pokusy pro každou myš v 16 minutových intervalech. Hodnoty latencí byly následně zprůměrovány pro jednotlivé dny testu. Z myší, kterým byl aplikován transplantát, byly k vyhodnocení výsledků testu použity pouze ty, u kterých transplantát přežil (hodnoceno histologicky po ukončení pokusu).

8.3.1.6. Histologické zpracování

K histologickému zpracování mozečků myší, kterým byl aplikován transplantát, se přistoupilo po ukončení testu na rotarodu. Pokusné myši byly hluboce anestetizovány intraperitoneálně aplikovaným thiopentalem a transkardiálně perfundovány Ringerovým roztokem a 4% roztokem paraformaldehydu (pH 7,4). Mozky byly vyjmuty a na 2 hodiny vloženy do 4% paraformaldehydu k postfixaci. Následovalo uložení na 16-20 hodin do roztoku sacharózy k zajištění kryoprotekce, poté byly mozky zamrazeny. Jednotlivé mozečky byly později nakrájeny na frontální 40 μm silné řezy. Tyto řezy byly uloženy do 24 jamkových mikrotitračních destiček naplněných fosfátovým pufrem (pH 7,4).

Přítomnost transplantátu, jeho lokalizace a interakce mezi transplantátem a hostitelskou tkání byly hodnoceny v nativních řezech pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX41 (Olympus Corporation). Buňky pocházející od dárce a také buňky vzniklé jejich dělením exprimují EGFP, proto byly tyto zeleně fluoreskující buňky považovány za buňky transplantátu nebo buňky vzniklé jejich proliferací. Ne fluoreskující tkáň pak byla považována za tkáň hostitele. Byla provedena fotografická dokumentace všech nativních řezů s transplantátem.

Myš, u které byla nalezena zeleně fluoreskující tkáň, byť jen několik buněk, byla považována za jedince, u kterého transplantát přežil. Přežívání transplantátu pak bylo hodnoceno jako podíl (procento) zvířat, u nichž byl transplantát nalezen, z celkového počtu zvířat, kterým byl aplikován.

Ve vybraných mozečkových řezech byly imunohistochemicky identifikovány Purkyňovy buňky pomocí anti-calbindinu a astrocyty pomocí barvení anti-GFAP (anti-glial fibrillary acidic protein).

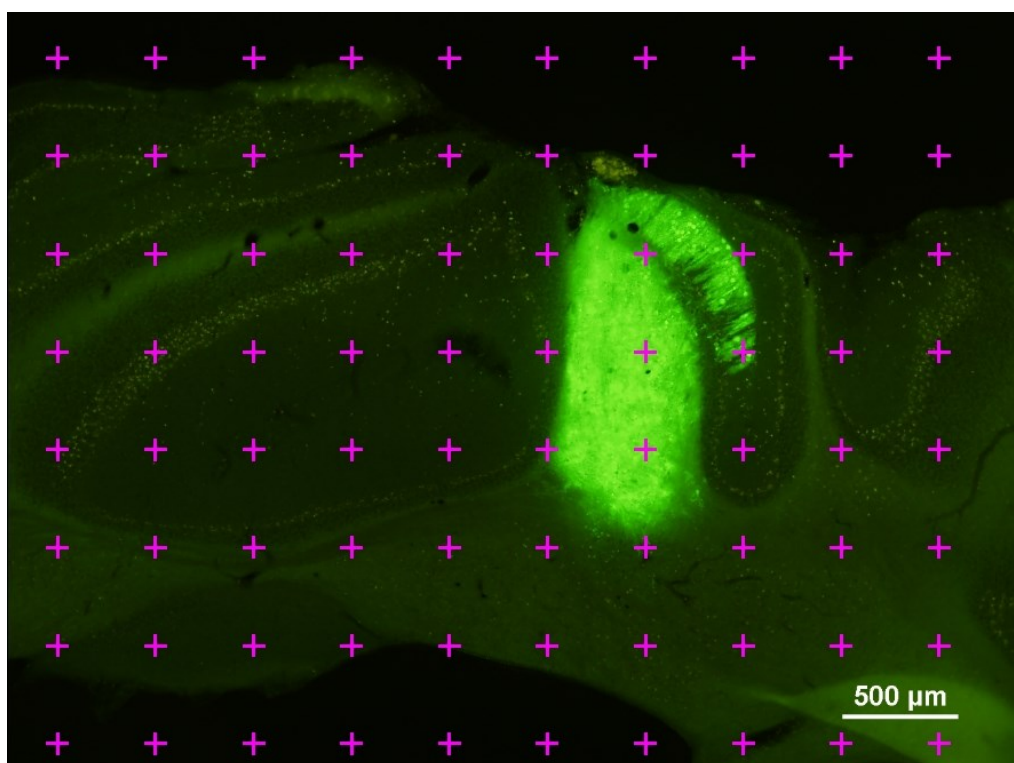
Při barvení anti-calbindinem byly řezy nejprve na 1 hodinu vloženy do blokačního roztoku obsahujícího normální oslí sérum (ab 7475, Abcam, Cambridge, UK), dále inkubovány s primární protilátkou (ab 11426, Abcam, Cambridge, UK; ředění 1:1000) po dobu cca 20 hodin (přes noc) při pokojové teplotě. Po promytí řezů ve fosfátovém pufru (pH 7,4) následovala inkubace se sekundární protilátkou AlexaFluor[®] 594 (ab 150076, Abcam,

Cambridge, UK; ředění 1:400) po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Pro barvení astrocytů byly mozečkové řezy inkubovány s anti-GFAP primární protilátkou (G-A-5 Cy3, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, ředění 1:800) přes noc při teplotě 4 °C. Na závěr obou typů barvení byly řezy 3x promyty fosfátovým pufrém, poté napnuty na podložní skla a po zaschnutí zafixovány pomocí montovacího média Fluoroshield (ab104135, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

Mozečkové řezy byly vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX41 (Olympus Corporation) a konfokálního laserového mikroskopu Olympus Fluoview FV 10i (Olympus Corporation). Fotografie pro vyhodnocování objemu transplantátu byly pořízeny za použití fluorescenčního mikroskopu Olympus BX41, objektivu UPlanF1 4x/0,13 a digitální kamery Olympus DP70 (Olympus Corporation).

8.3.1.7. Hodnocení objemu transplantátu

Pro hodnocení objemu transplantátu jsme vždy použili pouze myši, u kterých byly dobře hodnotitelné všechny zobrazené řezy, nebo případně chyběly pouze jednotlivé řezy. Celkový objem EGFP-fluoreskující oblasti transplantátu byl odhadován za použití metody bodové mřížky (point grid) a Cavalieriho principu (Howard a Reed, 2004; Mouton, 2011). Jednomu bodu mřížky odpovídal objem 3,46 nm³ (Obr. 3). Používali jsme software ImageJ. Objem transplantátu v ojedinělých chybějících řezech byl odhadnut za použití řezu předchozího. Abychom ověřili, že jsme vyšetřovali dostatečné množství tkáně, odhadovali jsme koeficient chyby objemu (CE) pomocí metody navržené Gundersenem a spol. (1999). Podle tohoto principu hodnota koeficientu chyby závisí na počtu bodů mřížky nad hodnoceným transplantátem v jednotlivých řezech, počtu bodů nad celým transplantátem, počtu hodnocených řezů a koeficientu charakterizujícím nepravidelnost tvaru transplantátu (Gundersen a spol., 1999; Ziegel a spol., 2011).



Obr. 3: Hodnocení objemu transplantátu metodou bodové mřížky. Jednomu bodu mřížky odpovídá objem $3,46 \text{ nm}^3$.

8.3.1.8. Statistické analýzy

Vzhledem k povaze dat, kdy kvalitativní data vykazovala binomické rozložení a data kvantitativní nevykazovala normální rozložení, jsme zvolili použití neparametrických testů. Statistické analýzy byly provedeny v softwaru R (R Core team, 2017) a byly doplněny permutačními testy (10 000 Monte-Carlo permutací). Permutační verze použitých analýz nevyžadují normální distribuci reziduálů a jsou robustnější vůči odlehlým hodnotám.

Opakovaná měření latence na rotarodu byla analyzována permutačním testem zobecněných nejmenších čtverců (Generalised least squares; GLS) s AR1 autokorelační strukturou modelující sériové autokorelace reziduálů (Pekar a Brabec, 2016). K analýze byl využit balíček *nlme* v programu R (Pinheiro a spol., 2014). Jelikož reziduály původního modelu vykazovaly nevyrovnané rozptyly, data byla transformována odmocninovou transformací. Post-hoc srovnání bylo provedeno permutačním t-testem následovaným Benjamini-Hochbergovou korekcí pro mnohonásobná porovnání (Benjamini a Hochberg, 1995).

Efekt faktorů mozečkové degenerace, kmene a jejich interakce ve vztahu k objemu transplantátu byly analyzovány pomocí permutačního testu ANOVA. Jako post-hoc test byl

použit permutační t-test následovaný Benjamini-Hochbergovou korekcí (Benjamini a Hochberg, 1995).

Data kvalitativního charakteru s binomickou distribucí (ano/ne) byla vyhodnocena permutační verzí zobecněných lineárních modelů (Generalized linear model; GLM) s quasibinomiální distribucí a logit-link funkcí. Post-hoc testy byly provedeny permutačním testem rozdílů mezi koeficienty jednotlivých hladin faktoru v GLM (randomizace probíhaly uvnitř právě porovnávaného páru hladin faktoru), následovaným Benjamini-Hochbergovou korekcí pro mnohočetná porovnání (Benjamini a Hochberg, 1995).

Výsledky byly prezentovány jako počty myši a procenta pro kvalitativní data (přežívání transplantátu, přítomnost určitých vlastností transplantátu) a jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (S.E.M.) pro data kvantitativní (objem transplantátu, rotarod). Ve všech případech bylo za statisticky významné považováno $P < 0,05$.

8.3.2. Pokus 1 – Transplantace embryonální mozečkové tkáně ve formě suspenze u dospělých myši typu Lurcher kmene B6CBA, myši pcd kmene B6.BR a myši typu wild obou těchto kmenů s dvouměsíčním přežíváním příjemců po operaci - specifické metodické údaje

V tomto pokusu byly použity myši Lurcher a wild kmene B6CBA a myši pcd a wild kmene B6.BR (samci a samice přibližně v poměru 1:1). Celkem se jednalo o 191 myši. Transplantace EGFP-pozitivní embryonální mozečkové suspenze byla provedena ve věku 90-120 dní. Stereotaktické souřadnice pro tento experiment vztahované k bregmatu byly následující: předozadní – 6,3 mm, laterální 1,6 mm, vertikální 3,1 mm. Počty zvířat v jednotlivých skupinách byly následující:

Myši B6CBA Lurcher: $n = 17$

Myši B6CBA wild: $n = 18$

Myši B6.BR pcd: $n = 20$

Myši B6.BR wild: $n = 20$

Abychom mohli porovnat vliv transplantace na motorické schopnosti vyšetřovaných myši, použili jsme také skupinu věkově odpovídajících myši Lurcher kmene B6CBA a myši pcd kmene B6.BR, které byly podrobeny kontrolní (slepé) operaci:

Myši B6CBA Lurcher: $n = 17$

Myši B6.BR pcd: $n = 17$

Dále byly vytvořeny analogické skupiny myši zcela intaktních:

Myši B6CBA Lurcher: n = 20

Myši B6CBA wild: n = 22

Myši B6.BR pcd: n = 21

Myši B6.BR wild: n = 19

Myši obou kmenů byly chovány v plastových chovných klecích s drátěným víkem s identickými podmínkami teploty (22-24 °C), vlhkosti (50 %), periody světla a tmy se střídaly pravidelně po 12 hodinách. Voda a potrava byly dostupné *ad libitum*. Dárcovská embrya byla získána křížením EGFP pozitivního samce kmene C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Os/J a samice typu wild příslušných kmenů dle typu příjemce (B6CBA nebo B6.BR).

8.3.3. Pokus 2 – Transplantace embryonální mozečkové tkáně ve formě suspenze u dospělých myší typu Lurcher kmenů B6CBA a C3H a myší typu wild obou těchto kmenů se šestiměsíčním přežíváním příjemců po operaci - specifické metodické údaje

V této studii byly použity myši Lurcher a wild kmenů B6CBA a C3H (samci a samice přibližně v poměru 1:1), celkem 126 myší. Mutanti Lurcher a zdravé kontroly byly podrobeny transplantaci EGFP-pozitivních embryonálních buněk ve formě buněčné suspenze. Věk operovaných zvířat byl 90 – 120 dnů. Stereotaktické souřadnice v tomto experimentu vztažené k bregmatu byly následující: předozadní – 6,3 mm, laterální 1,7 mm, vertikální 3,3 mm. Počty zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách byly následující:

Myši B6CBA Lurcher: n = 18

Myši B6CBA wild: n = 19

Myši C3H Lurcher: n = 16

Myši C3H wild: n = 19

Pro kontrolní (slepou) operaci byly také použity:

Myši B6CBA Lurcher: n = 16

Dále do experimentu byly zařazeny skupiny intaktních myší:

Myši B6CBA Lurcher: n = 20

Myši B6CBA wild: n = 18

Myši kmene C3H nebyly funkčním testům motoriky podrobeny, protože se u nich rozvíjí retinální degenerace, která může interferovat s jejich schopnostmi v daných situacích patřičně reagovat (Chang a spol, 2002).

Byly použity myši typu Lurcher (+/Lc) a typu wild (+/+) odvozené od kmenů C3H a B6CBA z konvenčního chovu Ústavu patologické fyziologie LF UK v Plzni. Obě pohlaví byla zastoupena přibližně v poměru 1:1. Myši obou kmenů byly chovány v plastových chovných klecích s drátěným víkem s identickými podmínkami teploty (22-24 °C), vlhkosti (50 %), periody světla a tmy se střídaly pravidelně po 12 hodinách. Voda a potrava byly dostupné *ad libitum*. Dárcovská embrya byla získána křížením EGFP pozitivního samce kmene C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Os/J a samice typu wild příslušných kmenů dle typu příjemce (B6CBA nebo C3H).

9. VÝSLEDKY

9.1. Hodnocení dynamiky morfologických změn v mozečkové kůře myši typu Lucher

Za využití dvojitého fluorescenčního barvení jsme sledovali dynamiku postnatálních morfologických změn mozečku myši Lucher a jejich zdravých sourozenců. Výhodou tohoto barvení je, že umožňuje popsat lokalizaci, velikost, morfologii a též barvitelnost Purkyňových buněk mozečkové kůry. Dvojitě fluorescenční barvení také umožňuje velmi dobře rozlišit jednotlivé vrstvy mozečkové kůry, kde Purkyňovy buňky jsou lokalizovány v kontinuální řadě mezi vrstvou granulární a molekulární. Buněčné struktury obarvené Lucifer Yellow zeleně jsou hydrofilní (jádro, jádérko, cytoplasma), naopak lipofilní, (buněčná a jaderná membrána, membránové organely) barvené DiD, se zobrazují červeně.

9.1.1. Myši typu wild

Nejmladší myši byly vyšetřované 8. postnatální den. V tomto věku již byla zřetelně patrná kontinuální řada Purkyňových buněk s ostře ohraničenými jádry, hranice cytoplasmy zatím zůstávaly neostře (Obr. 4). V jádrech byly viditelné kontury 1-3 jadérek. Průměrný počet jadérek v Purkyňově buňce byl 1,40. Dendritické stromy však zatím viditelné nebyly.

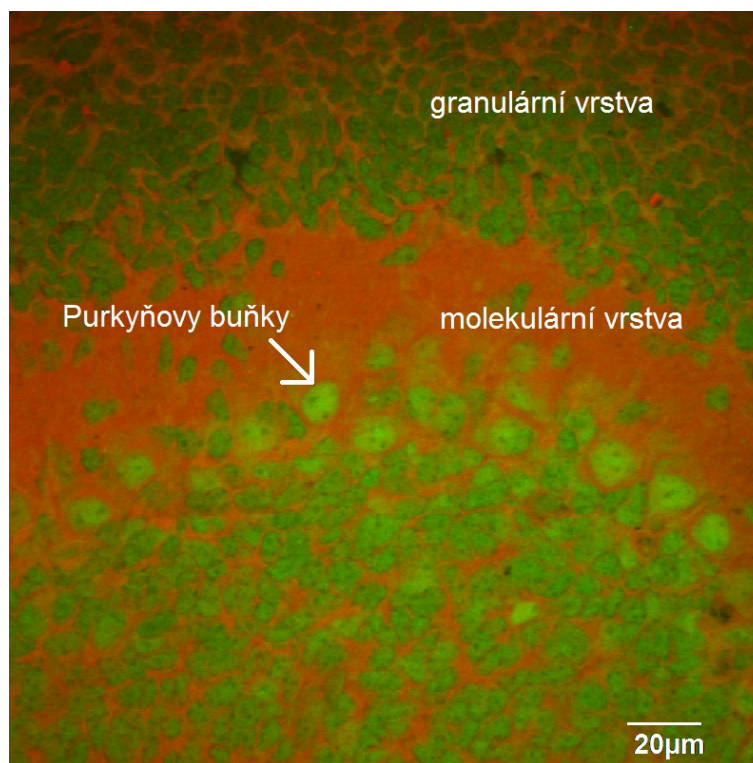
V 9. – 10. postnatálním dni cytoplasma nabývala jasných zelených kontur a okrouhlá jádra i nadále obsahovala 1-3 jadérka (průměrný počet jadérek 1,33). Řada Purkyňových buněk byla kontinuální a jejich dendrity se stále ještě nebarvily.

V 11. – 12. dni byla dobře patrna jádra Purkyňových buněk s jadérky, jejichž průměrný počet zůstával 1,33. Cytoplasma se barvila více světle červeně, měla ostré okraje. Dendrity Purkyňových buněk stále nebyly zřetelné (Obr. 5).

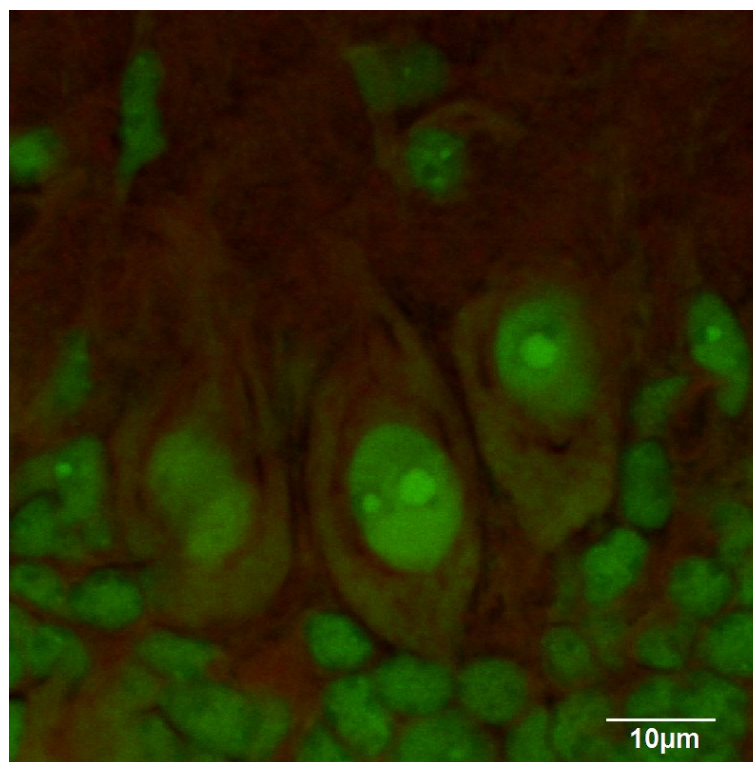
13. – 14. postnatální den nabývala těla Purkyňových buněk kapkovitého tvaru a hlavní kmenový dendrit již zřetelně promínoval z užšího pólu buňky. Buněčná těla i jádra měla zřetelné hladké okraje. V některých oblastech molekulární vrstvy mozečkové kůry již bylo viditelné zeleně se barvící dendritické větvení. Průměrný počet jadérek v jádrech klesl na 1,30.

U starších mláďat v 15. – 21. dni života zůstávaly tvar a zbarvení těla Purkyňových buněk stejné, ale větvení dendritů se stávalo stále zřetelnějším. Buněčná jádra byla typicky

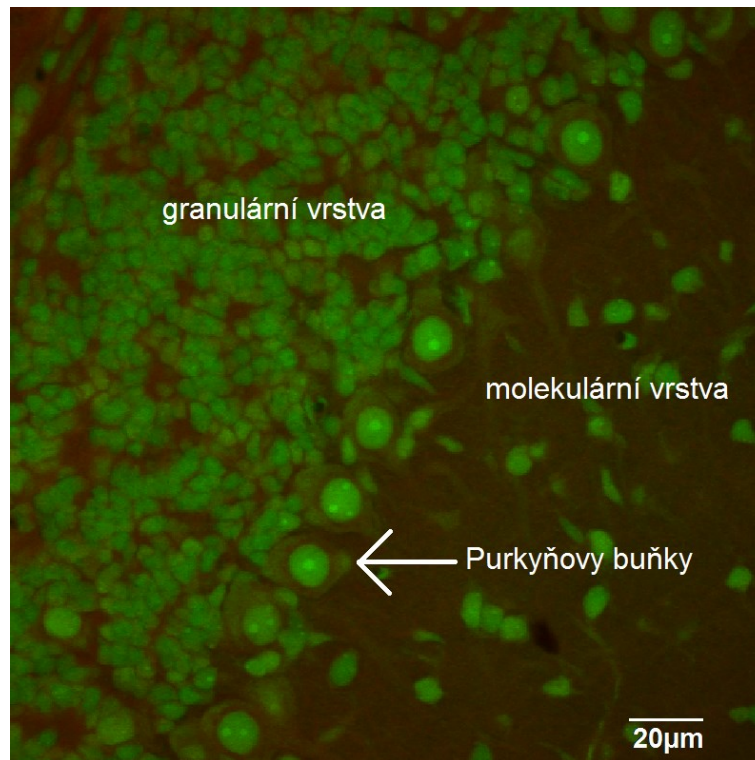
světle zelená. 1 – 2 jádérka byla ostře ohraničena (průměrný počet jadérek byl 1,12). Cytoplasma se zabarvovalo více červeně se zelenými okraji (Obr. 6).



Obr. 4: Mozečková kůra myši typu wild 8. postnatální den.



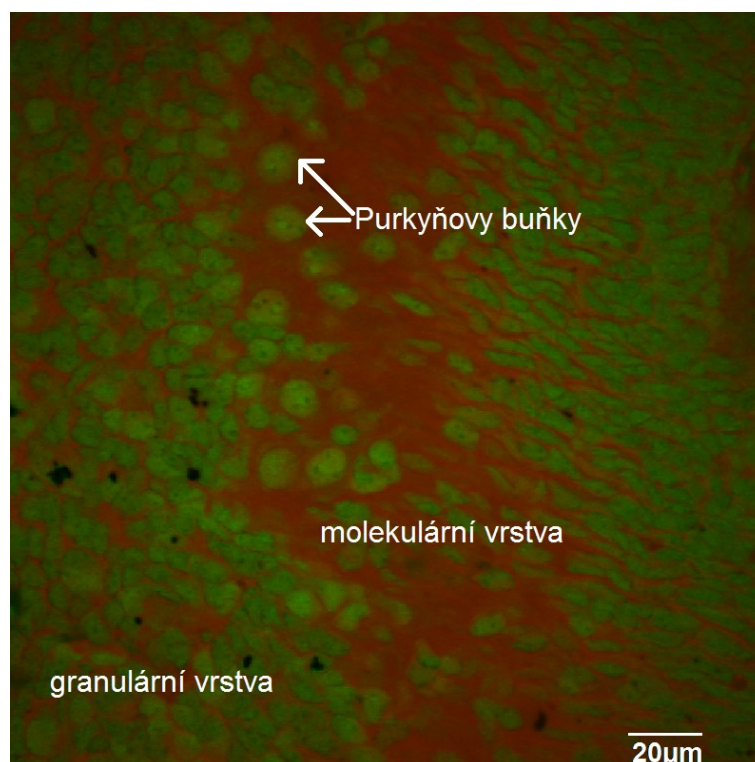
Obr. 5: Purkyňovy buňky myši typu wild 12. postnatální den.



Obr. 6: Mozečková kůra myši typu wild 20. postnatální den.

9.1.2. Myši typu Lurcher

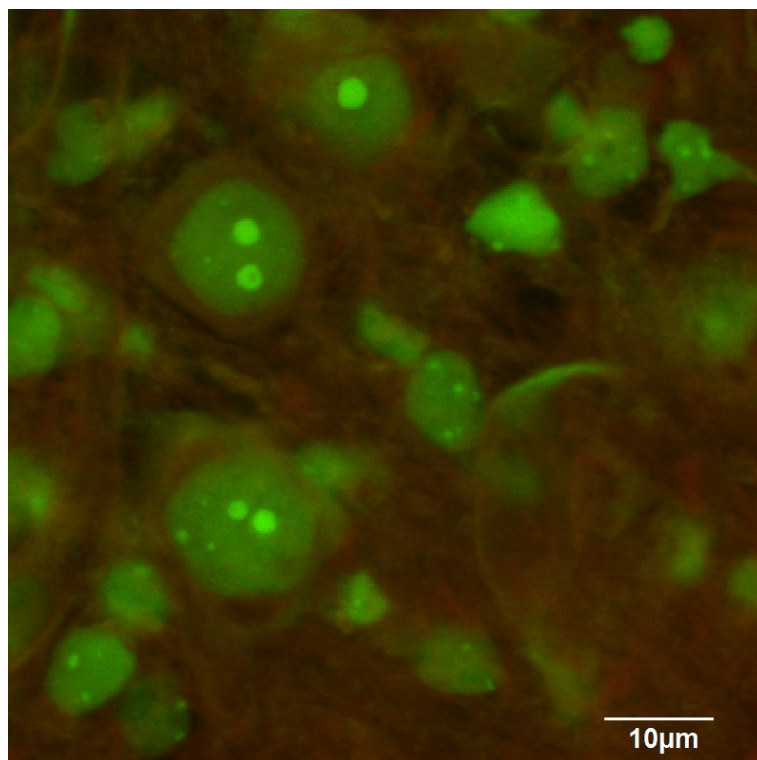
V 8. dni postnatálního života již byla v mozečku myši Lurcher patrná těla Purkyňových buněk okrouhlého tvaru. Netvořily však kontinuální řadu jako v případě zdravých mláďat, byly nerovnoměrně rozprostřeny mezi vrstvou granulární a molekulární (Obr. 7). Každé jádro obsahovalo 1 – 3 jadérka, která se barvila jasně až zářivě zeleně. Průměrný počet jadérek v jádře byl 1,6. Stejně jako u myši typu wild v tomto věku větvení dendritů Purkyňových buněk dosud patrné nebylo.



Obr. 7: Mozečková kůra myši typu Lurcher 8. postnatální den. Řada Purkyňových buněk již postrádá kontinuitu.

Mezi 9. – 10. postnatálním dnem byla jádra Purkyňových buněk stále ještě pravidelně okrouhlá, ale uvnitř se objevovalo vždy několik tmavých skvrn. Průměrný počet jadérek v jádře stoupl na 1,70. Cytoplasma se barvila velmi nepravidelně, její hranice byly většinou zelené, neostře ohraničené. Kontinuita řady Purkyňových buněk byla výrazně narušena.

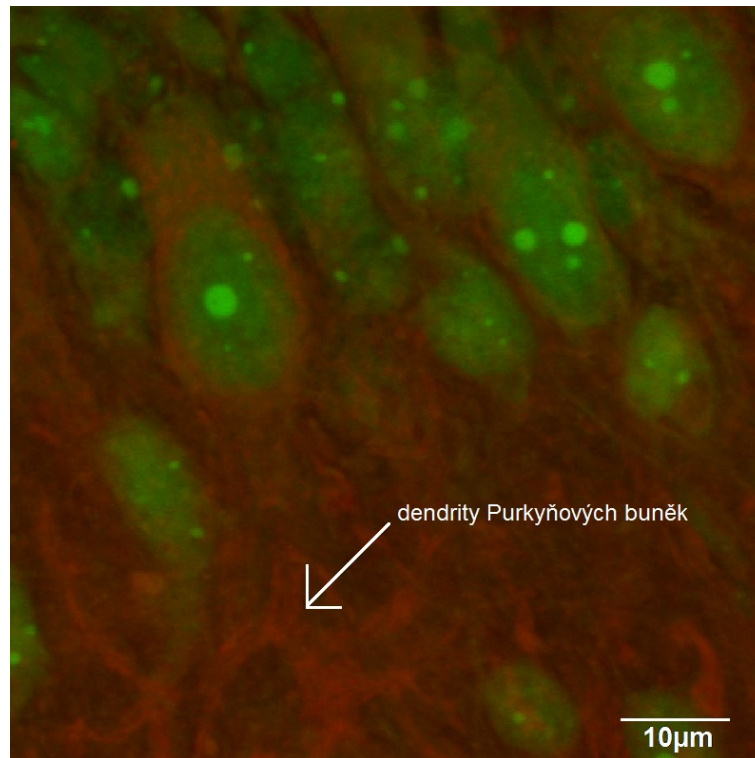
V 11. – 12. dni života mnoho buněčných jader již měnilo svůj tvar. Jádra byla spíše oválná a více protáhlá. Jadérka měla jasně zářivě zelenou barvu a v jádře jejich počet dosahoval až pěti. Průměrný počet tak byl v tomto období 2,6 (Obr. 8). Mnoho těl Purkyňových buněk bylo výrazně dislokováno mimo původní řadu směrem do vrstvy molekulární. Cytoplasma se začínala barvit více dočervena a její okraje již byly neostře. Dendritické větvení stále ještě nebylo viditelné.



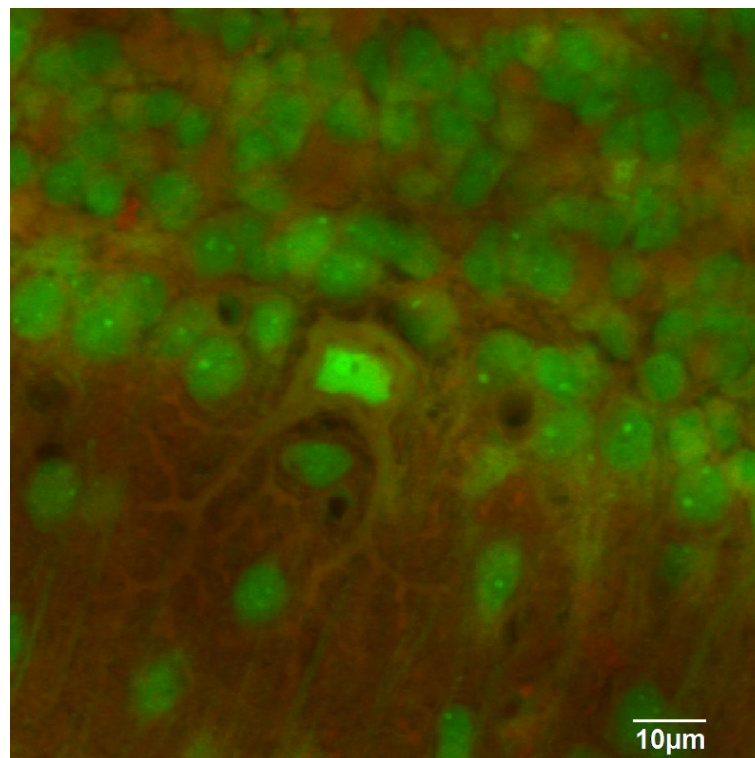
Obr. 8: Purkyňovy buňky myši typu Lurcher 12. postnatální den. Je již patrná fragmentace jadérek.

13. – 14. postnatální den se v mozečku myši Lurcher stále nacházely některé Purkyňovy buňky normálního tvaru, ale mohli jsme již pozorovat i další stadia degenerace. Okraje buněčných těl i jader byly neostré, jevíly se jako roztřepené, barvení bylo výrazně nehomogenní. V jádrech bylo mnoho tmavých oblastí. Cytoplasma se barvila jasně červeně. Jádérka byla fragmentovaná. V některých buňkách jsme viděli 5 – 6 drobných jasně zeleně zářících objektů (průměrný počet v jádře 2,70). Dendrity počínaly být viditelné, nebyly však kontinuální a vykazovaly nerovnoměrnou tloušťku i povrch. V tomto stadiu degenerace se dendrity obvykle barvily červeně (Obr. 9).

Mozečková kůra myši Lurcher ve věku 15 – 18 dní vykazovala širokou škálu stadií degenerace Purkyňových buněk. V některých oblastech jsme nacházeli téměř normální zdravé buňky, jinde již i buňky v terminálním stadiu degenerace. Pro ně byly typické tyto znaky: výrazná deformace tvaru buněčného těla i jádra, v jádře viditelné jasně zelené fragmenty jadérek, přítomnost dvou hlavních kmenových dendritů vyrůstajících z těla buňky (Obr. 10). Řada Purkyňových buněk již byla zcela rozpadlá.

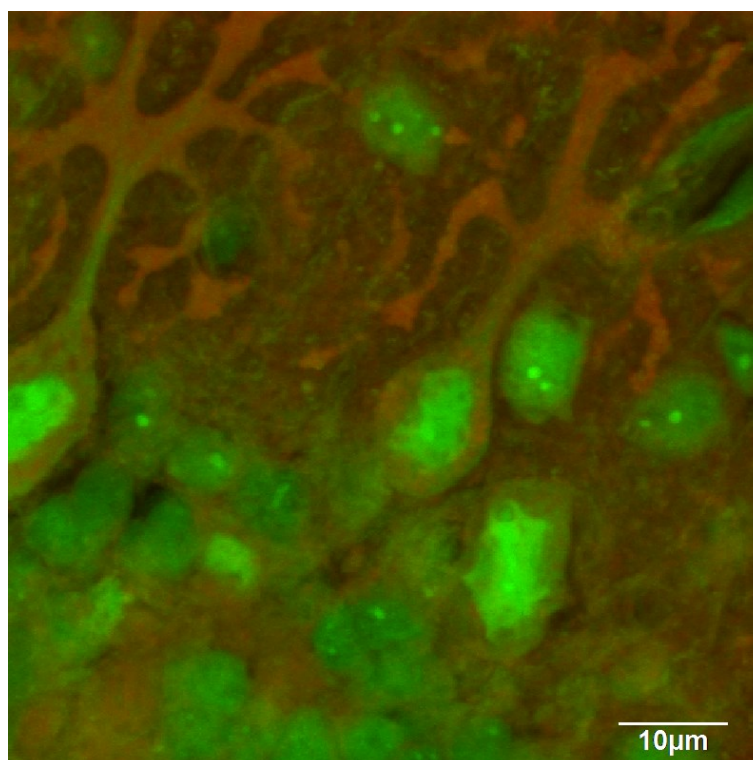


Obr. 9: Purkyňovy buňky myši typu Lurcher 14. postnatální den. Je zde výrazná fragmentace jadérek, cytoplasma se barví červeně, viditelné ztlustělé a fragmentované dendrity.



Obr. 10: Purkyňova buňka myši Lurcher 17. postnatální den s deformací buněčného těla a dvěma kmenovými dendrity.

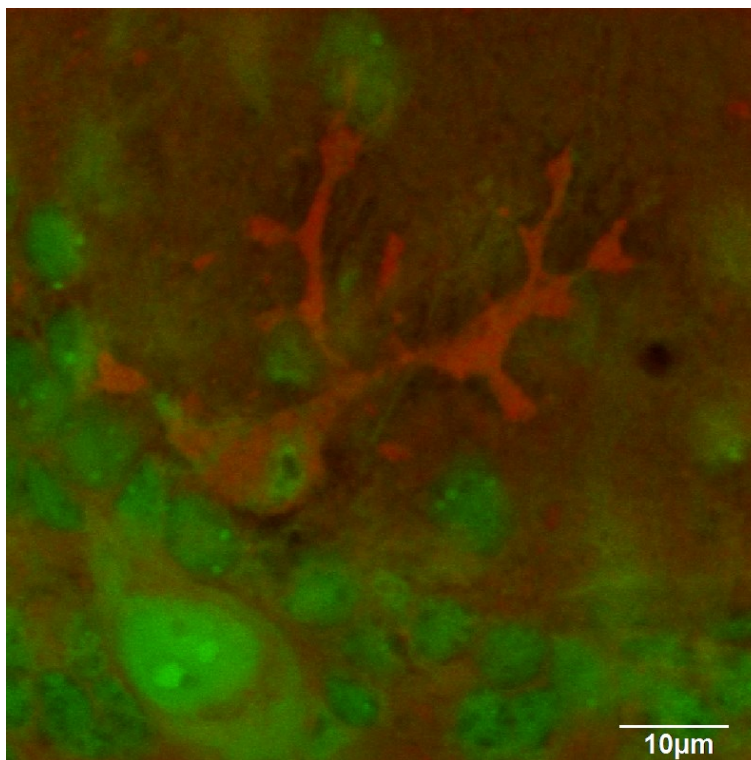
Intenzita zbarvení Purkyňových buněk se během procesu degenerace typicky měnila. Jejich jádra se barvila světle zeleně, zůstávaly zde však tmavé skvrny; cytoplasma a dendrity byly jasně červené barvy (Obr. 11). V dalším stadiu degenerace se měnil poměr velikosti jádra a cytoplasmy, cytoplasma tvořila jen úzký lem kolem jádra. Okraje jader i cytoplasmy počínaly být neostré a barvení bylo nehomogenní. Některé dendrity byly stále ještě rovné a kontinuální, jiné vykazovaly známky smršťování a fragmentace a byly zde typické okrsky ztlustění.



Obr. 11: Myš typu Lurcher 17. postnatální den. Výrazně červeně se barvící dendrity Purkyňových buněk.

Mezi 19. – 21. postnatálním dnem již u myší Lurcher prakticky nebylo možné nalézt Purkyňovu buňku bez známek degenerace. Na hranici granulární a molekulární vrstvy kůry se sporadicky vyskytovaly Purkyňovy buňky v různém stupni zániku. Většina z nich měla buněčná těla i jádra svraštělá a ta byla tmavě zelená s tmavými šedými skvrnami. Jen ojediněle byly ještě patrné jasně zeleně svítící fragmenty jadérek. Červeně se barvící cytoplasma tvořila jen úzký nerovnoměrný proužek okolo jádra. Později jádra buněk zcela mizela a zůstávala jen červeně se barvící svraštělá cytoplasma. Kontinuální dendrity jsme již nenacházeli, byly zde pouze jejich chaoticky uspořádané jasně červené fragmenty. Tyto fragmenty dendritů byly patrné dokonce i po kompletním zániku buněčných těl (Obr. 12).

Mezi jedinci odvozenými od kmenů C3H a B6CBA jsme nenalezli žádné morfologické rozdíly u myši Lurcher, ani wild.



Obr. 12: Myš typu Lurcher 20. postnatální den. Purkyňova buňka v pokročilém stadiu degenerace se sraštlým tělem i jádrem, fragmentace dendritů.

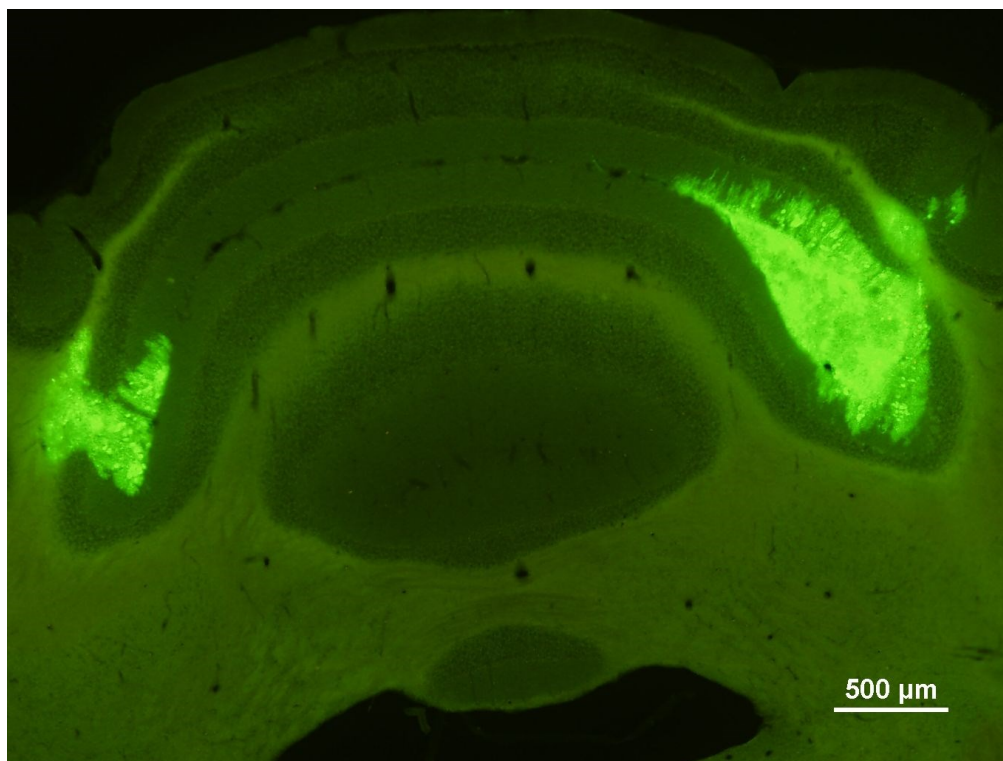
9.2. Neurotransplantační terapie myši s cerebelární degenerací

9.2.1. Pokus 1: Transplantace embryonální mozečkové tkáně ve formě suspenze u dospělých myši typu Lurcher kmene B6CBA, myši pcd kmene B6.BR a myši typu wild obou těchto kmenů s dvouměsíčním přežíváním příjemců po operaci

9.2.1.1. Přežívání transplantátu a jeho struktura

Transplantát přežíval u většiny myši a též u většiny z nich byl nalezen bilaterálně (Tab. 1, Obr. 13). Pouze u jedné myši typu wild kmene B6.BR nebyla nalezena žádná EGFP-pozitivní tkáň. U jedné myši typu pcd byl transplantát lokalizován na mozkovém kmeni a neměl žádný kontakt s mozečkem hostitele. Nenalezli jsme žádné signifikantní rozdíly ve frekvenci přežívání transplantátu. Nicméně pro bilaterální přežívání transplantátu byl nalezen

signifikantní efekt degenerace ($F_{(1,71)} = 4,216$, $P < 0,04$) a konkrétně bilaterálně přežíval transplantát v nižším procentu u myší pcd kmene B6.BR než u myší B6.BR typu wild ($P = 0,037$).

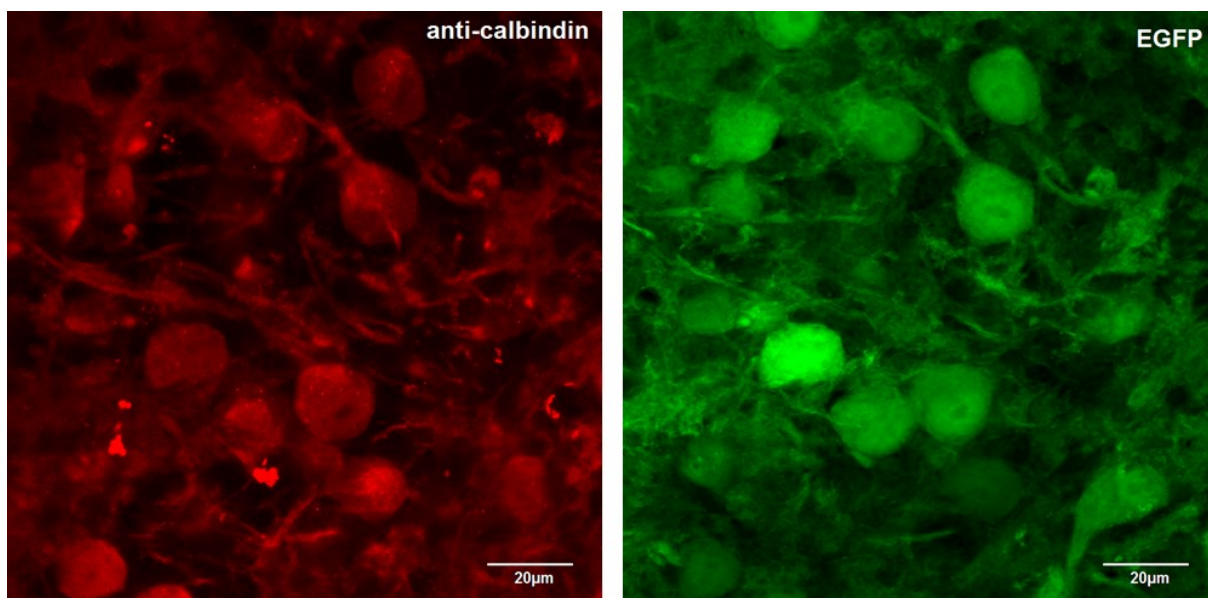


Obr. 13: Bilaterálně přežívající transplantát v mozečku hostitele. Myš typu wild kmene B6CBA. Nativní preparát.

Tab. 1: Přežívání transplantátu uvnitř hostitelského mozečku nebo v kontaktu s hostitelským mozečkem (bilaterální nebo unilaterální přítomnost transplantátu je hodnocena jako přežívající transplantát), počet a procento myší s bilaterálně přežívajícím transplantátem. U jedné myši typu B6.BR pcd byl transplantát lokalizován na mozkovém kmeni a neměl žádný kontakt s mozečkem hostitele.

	Počet vyšetřených myší	Počet myší s přežívajícím transplantátem	% přežívání transplantátu	Počet myší s bilaterálně přežívajícím transplantátem	% bilaterálně přežívajícího transplantátu
B6CBA Lurcher	17	17	100	14	82,4
B6CBA wild typ	18	18	100	15	83,3
B6.BR pcd	20	19	95	12	60
B6.BR wild typ	20	19	95	19	95

U převážné většiny myší transplantáty obsahovaly buňky, které vykazovaly tvar a velikost charakteristické pro buňky Purkyňovy (Tab. 2). Na vybraných řezech jsme pak imunohistochemicky potvrdili pozitivitu těchto buněk pro calbindin (Obr. 14). Nenalezli jsme žádné signifikantní rozdíly v přítomnosti EGFP-pozitivních Purkyňových buněk mezi jednotlivými experimentálními skupinami myší.



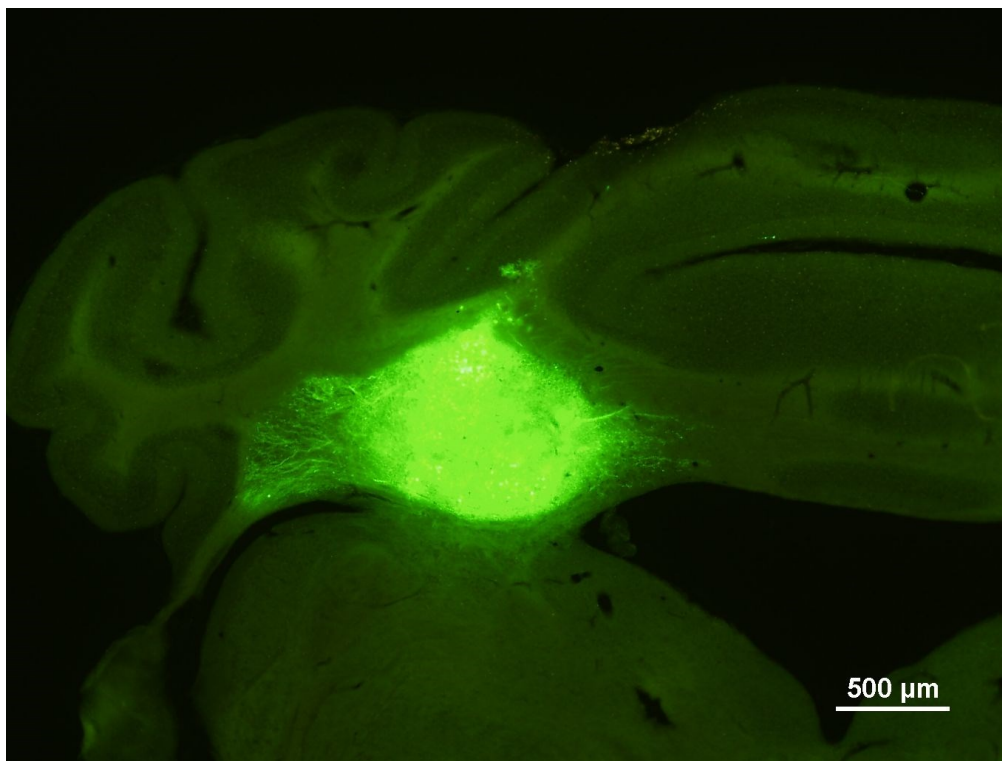
Obr. 14: Myš typu pcd kmene B6.BR. Identická zorná pole. Vlevo imunohistochemie anti-calbindinem, vpravo EGFP fluorescence v nativním řezu. Barvení potvrzuje přítomnost Purkyňových buněk odvozených z transplantátu.

Tab. 2: Přítomnost EGFP-pozitivních (odvozených z transplantátu) Purkyňových buněk (PB) v transplantátu.

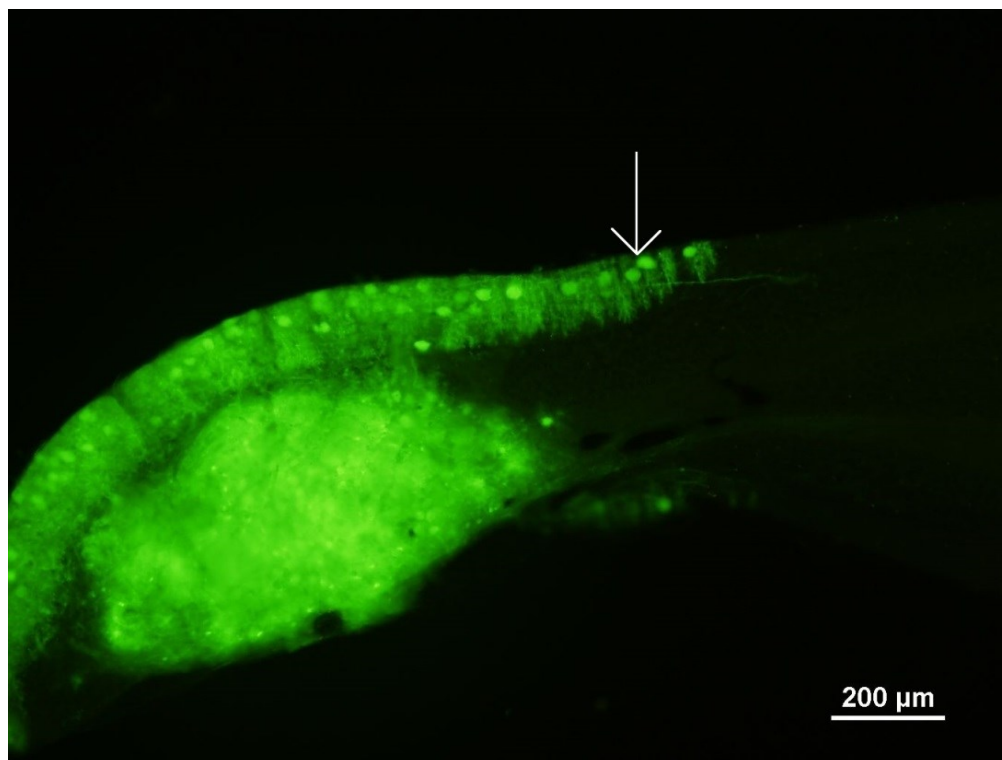
	Počet vyšetřených myší	Přítomnost PB odvozených z transplantátu	% přítomnosti PB odvozených z transplantátu
B6CBA Lurcher	17	16	94,1
B6CBA wild typ	18	15	83,3
B6.BR pcd	20	20	100
B6.BR wild typ	19	19	100

Pozorovali jsme prorůstání EGFP-pozitivních vláken z transplantátu do hostitelského mozečku (Obr. 15) a kolonizaci kůry mozečku hostitele EGFP-pozitivními buňkami majícími velikost a tvar Purkyňových buněk (Obr. 16). Alespoň jeden z těchto dvou fenoménů jsme pozorovali u 14 (77,8 %) myší B6CBA typu wild, 19 (100 %) myší B6.BR typu pcd a 19

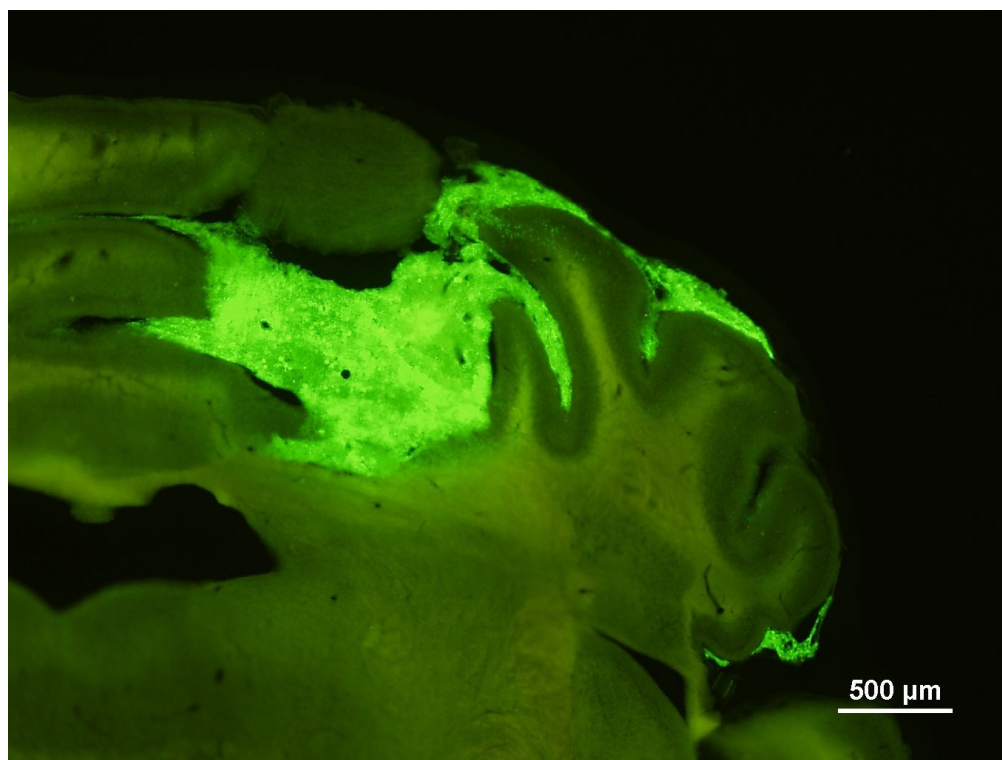
(100%) myši B6.BR typu wild. U většiny myši typu Lurcher byl však transplantát ostře vymezen a ohraničen vůči mozečkové tkáni hostitele (Obr. 17), určité prorůstání do hostitelské tkáně bylo patrné jen u 5 (29,4 %) myši Lurcher kmene B6CBA. Pro přehled viz tabulka 3.



Obr. 15: Prorůstání EGFP-pozitivních vláken do mozečku hostitele. Myš pcd kmene B6.BR. Nativní preparát.



Obr. 16: Šipka označuje kolonizaci kůry mozečku hostitele EGFP-pozitivními buňkami majícími velikost a tvar Purkyňových buněk. Myš typu pcd kmene B6.BR. Nativní preparát.



Obr. 17: Transplantát u myši typu Lurcher ostře vymezený vůči mozečkové tkáni. Nativní preparát.

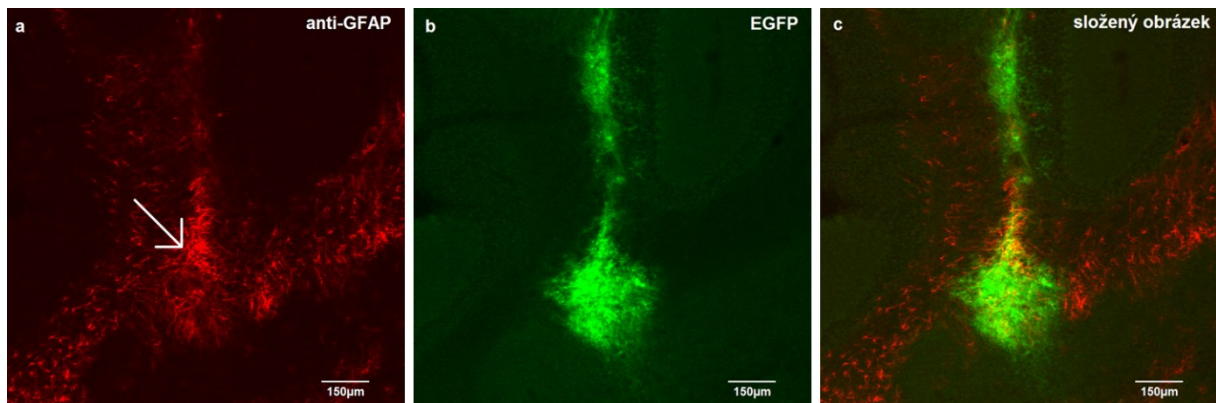
Tab. 3: Přítomnost interakcí transplantátu a hostitelské tkáně: počet a procento myší, u kterých prorůstají EGFP-pozitivní vlákna z transplantátu, kolonizace hostitelského mozečku EGFP-pozitivními Purkyňovými buňkami (PB); počet a procento myší, u kterých byly nalezeny oba tyto jevy. Vyšetřeny myši s transplantátem v kontaktu s mozečkem hostitele.

	Počet vyšetřených myší	Prorůstání vláken	Kolonizace PB	Prorůstání vláken i kolonizace PB
B6CBA Lurcher	17	2 (11,8 %)	5 (29,4 %)	2 (11,8 %)
B6CBA wild typ	18	5 (27,8 %)	14 (77,8 %)	5 (27,8 %)
B6.BR pcd	19	19 (100 %)	19 (100 %)	19 (100 %)
B6.BR wild typ	19	5 (26,3 %)	19 (100 %)	5 (26,3 %)

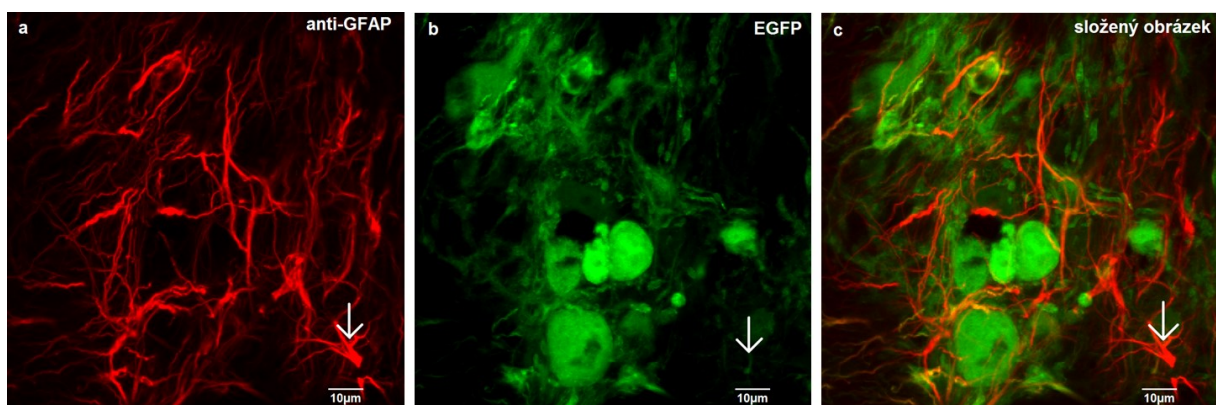
Na rozdíl od myší typu wild B6CBA a BR.BR bylo prorůstání vláken z transplantátu do hostitelského mozečku zřejmé u všech myší B6.BR typu pcd, u kterých byl transplantát v kontaktu s mozečkem. Nalezli jsme tedy signifikantní efekt degenerace ($F_{(1, 69)} = 9,523$, $P = 0,002$) a kmene ($F_{(1, 69)} = 20,535$, $P < 0,001$) i jejich interakce ($F_{(1, 69)} = 26,223$, $P < 0,001$). Frekvence výskytu prorůstání vláken byla významně vyšší u myší B6.BR typu pcd než u myší B6.BR typu wild ($P < 0,001$) a myší kmene B6CBA typu Lurcher ($P < 0,001$). Rozdíl ve frekvenci prorůstání vláken mezi myšmi typu Lurcher a wild nebyl signifikantní.

Kolonizace hostitelského mozečku Purkyňovými buňkami odvozenými z transplantátu byla signifikantně závislá na přítomnosti degenerace ($F_{(1, 69)} = 11,039$, $P = 0,002$) a na kmeni myší ($F_{(1, 69)} = 62,121$, $P < 0,001$), ale nikoli na jejich interakci. Tento fenomén byl mnohem méně častý u myší B6CBA typu Lurcher ve srovnání s jejich zdravými sourozenci ($P = 0,024$), stejně tak i ve srovnání s B6.BR mutanty pcd ($P < 0,001$).

U všech myší do transplantátu prorůstalo mnoho astrocytů. Většina z nich pocházela z hostitelské tkáně, jelikož u nich nebyla prokázána EGFP-pozitivita (Obr. 18, 19).



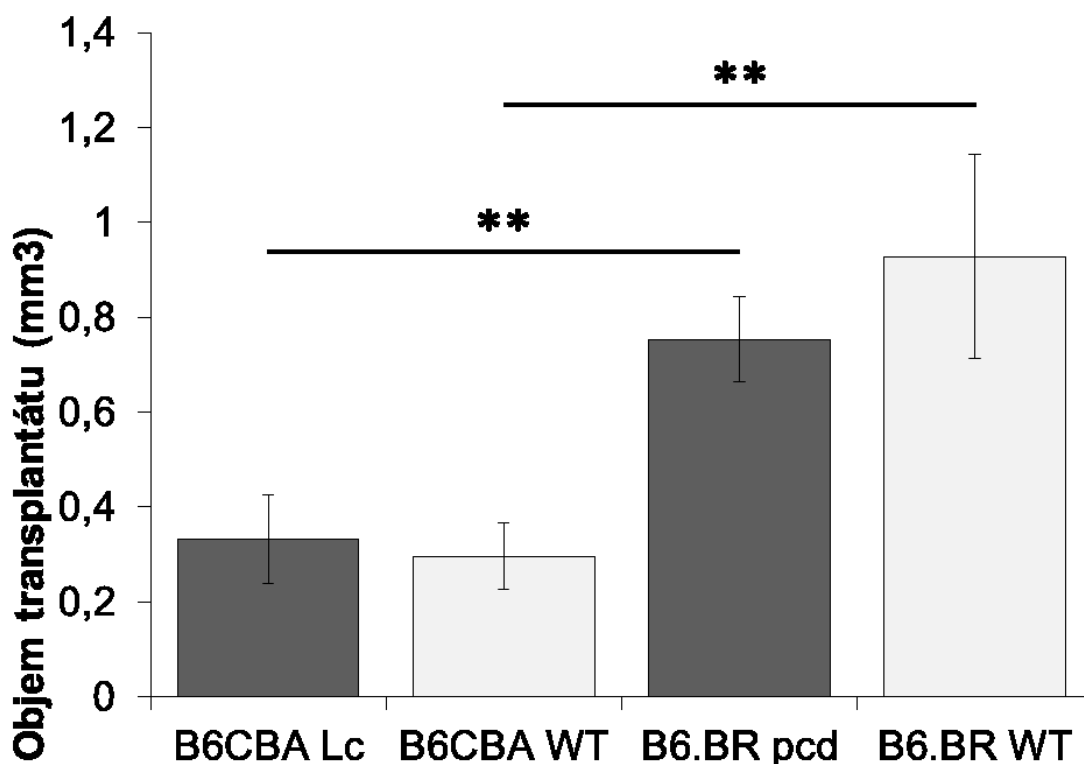
Obr. 18: Anti-GFAP imunofluorescence (a), nativní EGFP fluorescence (b) a složený obrázek (c). Identická zorná pole z transplantátu. Hostitelská myš typu wild kmene B6CBA. Šipka označuje akumulaci astrocytů v oblasti transplantátu.



Obr. 19: Anti-GFAP imunofluorescence (a), nativní EGFP fluorescence (b) a složený obrázek (c). Identická zorná pole z transplantátu. Hostitelská myš typu wild kmene B6.BR. Šipka označuje příklad EGFP-negativního astrocytu, pochází z tkáně hostitele, nikoliv z transplantátu.

9.2.1.2. Objem transplantátu

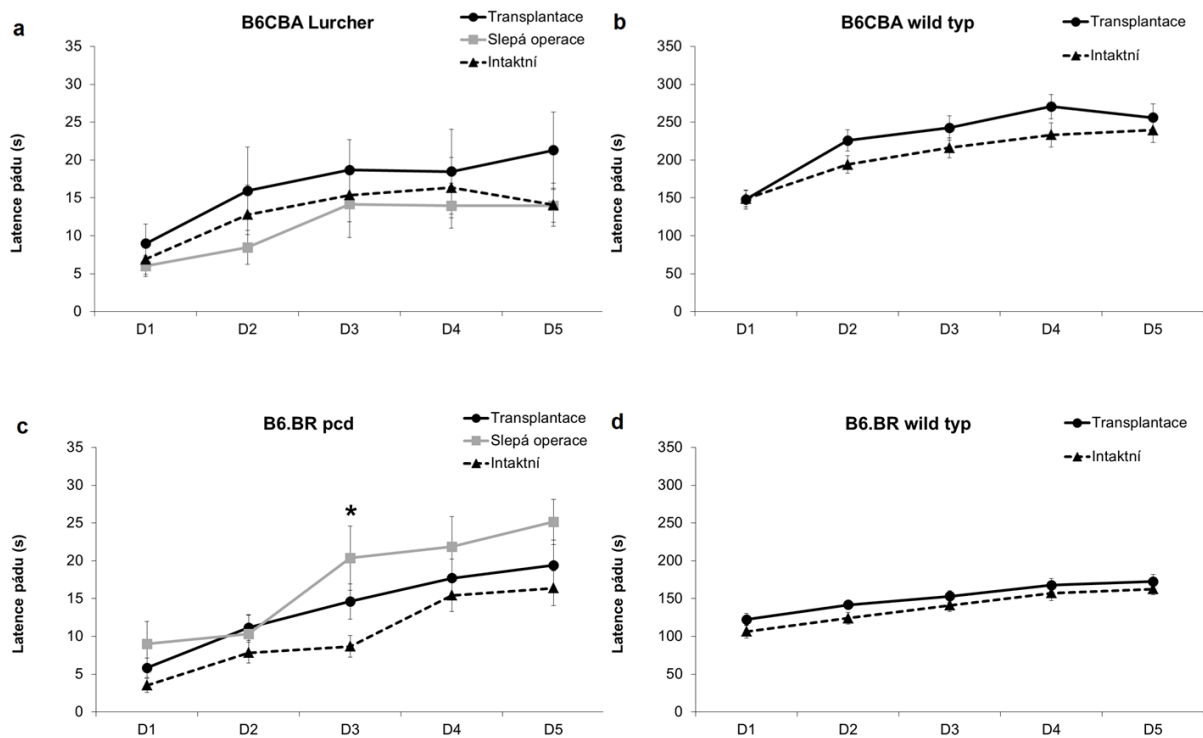
Na objem transplantátu měl signifikantní vliv faktor myšího kmene ($F_{(1, 50)} = 18,279$, $P = 0,001$), ale nikoliv faktor degenerace. Myši typu Lurcher i wild kmene B6CBA měly menší objem transplantátu než jejich protějšky kmene B6.BR (Obr. 20). Avšak nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi mozečkovými mutanty a jejich sourozenci typu wild (Obr. 20). Koeficient chyby objemu CE byl následující: pro B6CBA myši Lurcher 0,145, pro B6CBA myši wild 0,106, pro B6.BR myši pcd 0,072, pro B6.BR myši wild 0,075.



Obr. 20: Průměrný objem transplantátu u myši Lurcher (Lc) kmene B6CBA, myši wild (WT) kmene B6CBA, myši pcd kmene B6.BR a myši wild kmene B6.BR. Chybové úsečky představují střední chybu průměru. ** P < 0,01.

9.2.1.3. Test na rotarodu

Latence pádů v testu na rotarodu byly signifikantně závislé na druhu experimentální skupiny ($F_{(9, 815)} = 183,699$, $P < 0,001$), dni testu ($F_{(4, 815)} = 45,503$, $P = 0,001$) stejně jako na jejich interakci ($F_{(36, 815)} < 5,688$, $P = 0,001$). Test na rotarodu potvrdil výrazný motorický deficit u mutantů typu Lurcher i pcd ve srovnání s kontrolami typu wild (pro neléčené, intaktní myši: kmen B6CBA pro všechny dny $P < 0,001$; kmen B6.BR pro všechny dny $P < 0,001$; viz Obr. 21, srovnání Obr. 21a s Obr. 21b; Obr. 21c s Obr. 21d). Nebyl pozorován žádný efekt transplantace (Obr. 21). Pouze myši pcd po kontrolní operaci dosahovaly mírně delších latencí pádů než myši intaktní (Obr. 21c).

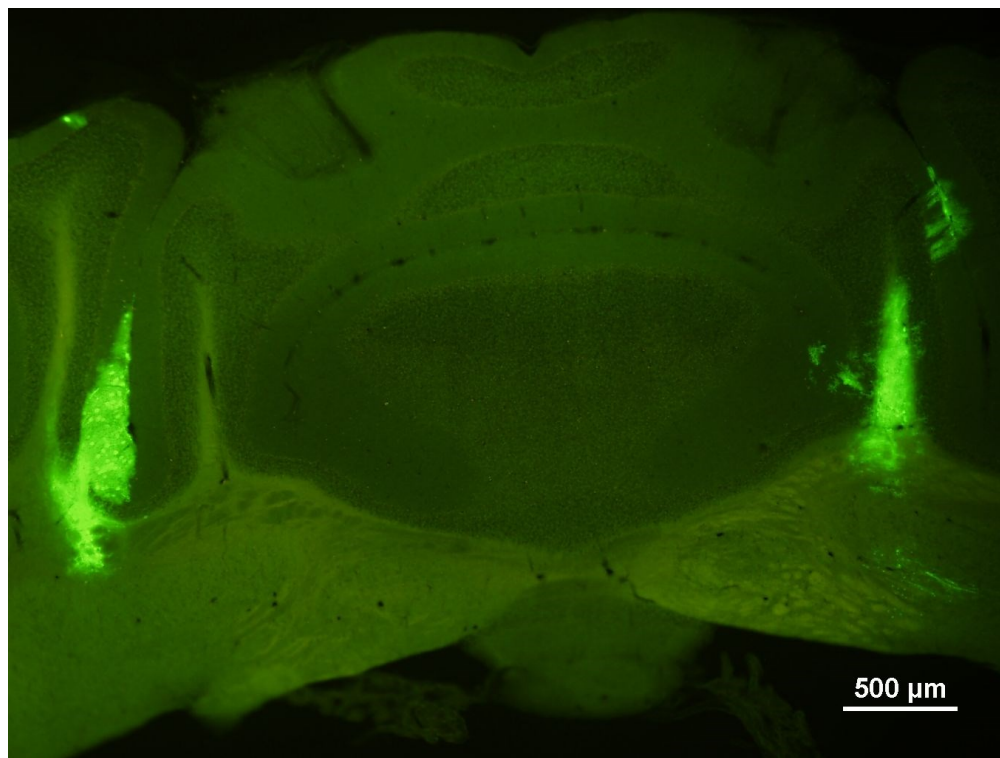


Obr. 21: Průměrné latence pádu v testu na rotarodu (den testování D1-D5) u myši a) B6CBA typu Lurcher (Lc), b) B6CBA typu wild (WT), c) B6.BR typu pcd a d) B6.BR typu wild (WT). Chybové úsečky představují střední chybu průměru. * $P < 0,05$ pro myši po slepé operaci vs. myši intaktní.

9.2.2. Pokus 2: Transplantace embryonální mozečkové tkáně ve formě suspenze u dospělých myši typu Lurcher a wild kmenů B6CBA a C3H se šestiměsíčním přežíváním příjemců po operaci

9.2.2.1. Přežívání transplantátu a jeho struktura

U většiny myši přežíval transplantát v mozečku bilaterálně (Obr. 22). Pouze u ojedinělých myši přežíval transplantát jen jednostranně nebo zcela zanikl (Tab. 4). Nebyly zde tedy žádné statisticky signifikantní rozdíly v přežívání transplantátu. Ve všech případech se transplantát nacházel uvnitř mozečku hostitele nebo případně na jeho povrchu s alespoň částečným kontaktem s mozečkovou tkání. U většiny myši všech experimentálních skupin s přežívajícím transplantátem bylo možno identifikovat EGFP-pozitivní (tj. z transplantátu pocházející) buňky, jejichž tvar i velikost byly typické pro buňky Purkyňovy (Obr. 23, Tab. 5). Imunohistochemická vyšetření provedená na vybraných řezech pak potvrdila pozitivitu na calbindin, což naznačuje, že se opravdu jedná o Purkyňovy buňky (Obr. 23).



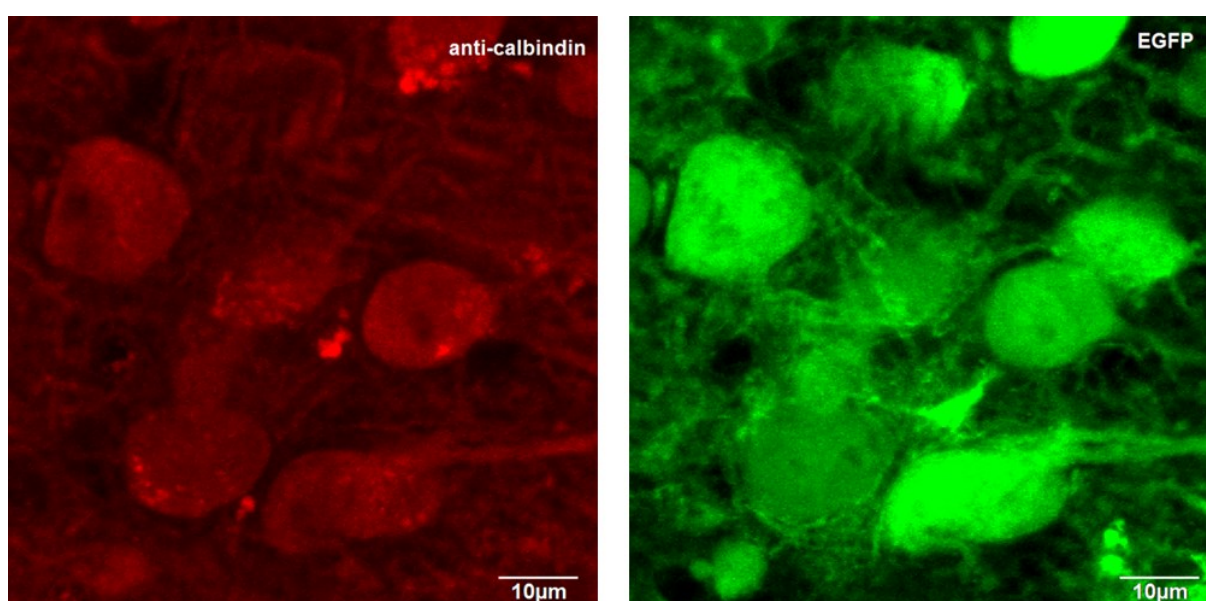
Obr. 22: Bilaterálně přežívající transplantát v mozečku hostitele. Myš typu wild kmene B6CBA. Nativní preparát.

Tab. 4: Přežívání transplantátu. Počet vyšetřených myší, počet a procento myší s přítomností EGFP-pozitivní tkáně (bilaterální a unilaterální přítomnost transplantátu) a počet a procento myší s bilaterálně přežívajícím transplantátem.

	Počet vyšetřených myší	Počet myší s přežívajícím transplantátem	% přežívání transplantátu	Počet myší s bilaterálně přežívajícím transplantátem	% bilaterálně přežívajícího transplantátu
B6CBA Lurcher	18	17	94,4	15	83,3
B6CBA wild typ	19	19	100	19	100
C3H Lurcher	16	16	100	14	87,5
C3H wild typ	19	18	94,7	17	89,5

Tab. 5: Přítomnost EGFP-pozitivních (pocházejících z transplantátu) Purkyňových buněk (PB) u myši s přežívajícím transplantátem.

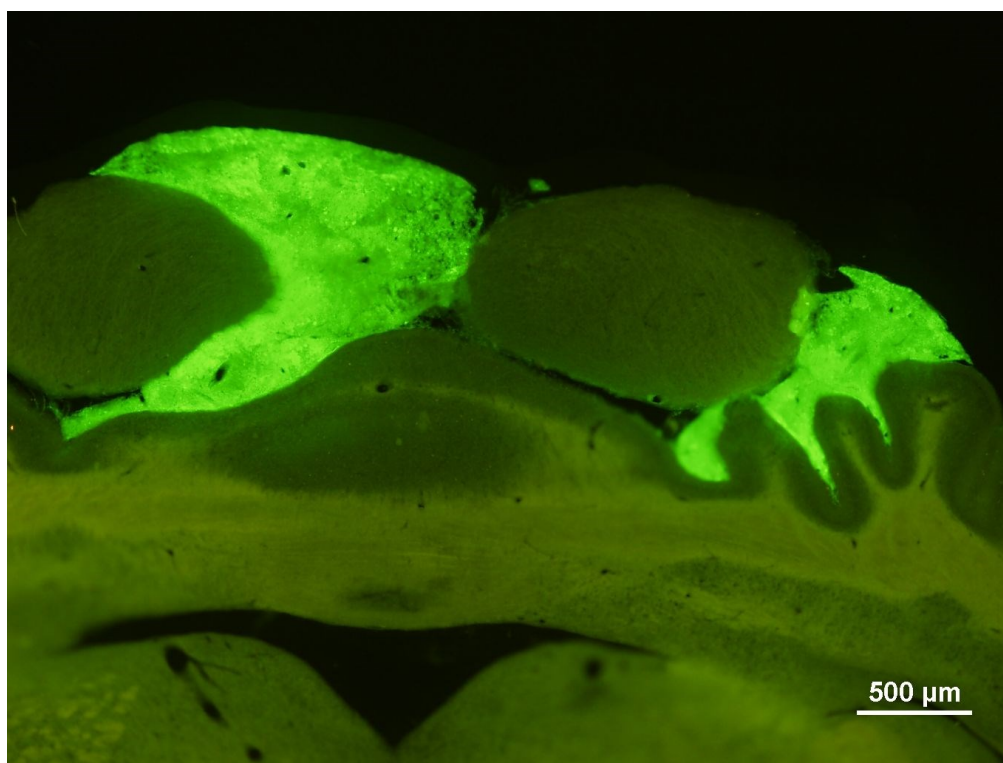
	Počet vyšetřených myší	Přítomnost PB	% přítomnosti PB
B6CBA Lurcher	17	17	100
B6CBA wild typ	19	19	100
C3H Lurcher	16	14	87,5
C3H wild typ	18	18	100



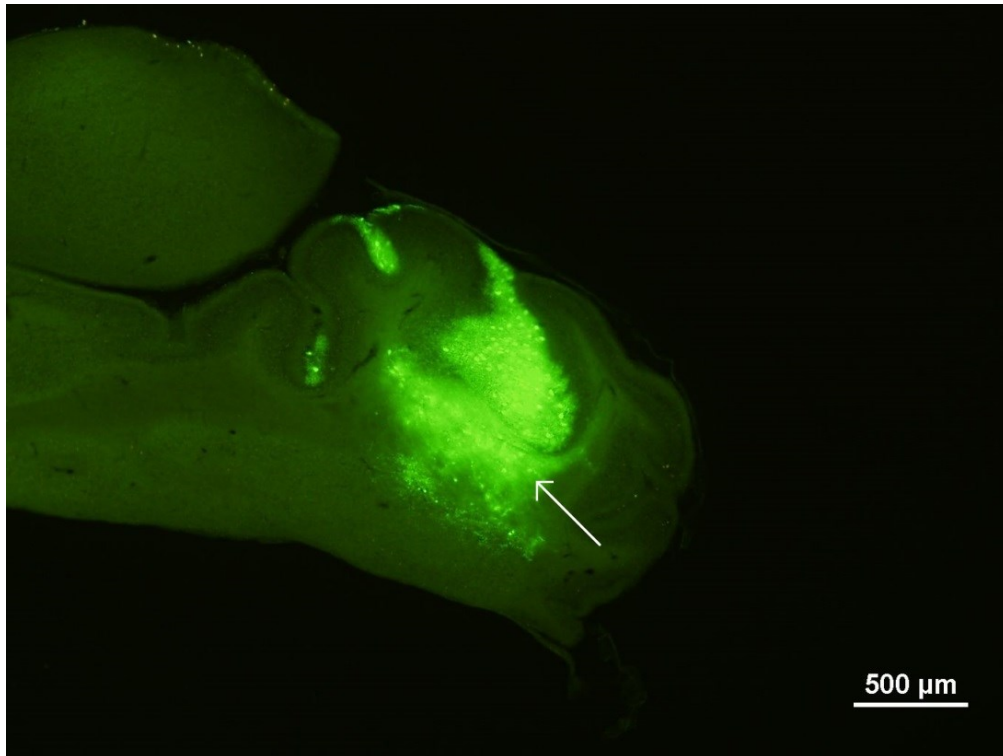
Obr. 23: Myš typu wild kmene C3H. Identická zorná pole. Vlevo imunohistochemie anti-calbindinem, vpravo EGFP fluorescence v nativním řezu. Barvení potvrzuje přítomnost Purkyňových buněk odvozených z transplantátu.

U většiny mutantů Lurcher byl transplantát ostře vymezen a ohraničen vůči mozečkové tkáni hostitele. Většinou zde také nebyla zaznamenána EGFP-pozitivní vlákna prorůstající z transplantátu a buňky připomínající buňky Purkyňovy neměly tendenci k prorůstání mimo hlavní masu transplantátu (Obr. 24). Pouze u 7 (41,2 %) myši Lurcher kmene B6CBA a 4 (25 %) myši Lurcher kmene C3H byl zaznamenán alespoň jeden z těchto dvou fenoménů (Obr. 25, 26). Na druhé straně, kolonizace mozečku mnoha EGFP-pozitivními buňkami majícími tvar buněk Purkyňových (Obr. 27) byla pozorována u všech zdravých myši kmene B6CBA i C3H. Tyto buňky ovšem byly uspořádány většinou chaoticky se spleť dendritických stromů, v žádném případě se nejednalo o typické uspořádání v řadě se správnou a jednotnou orientací. U několika myši typu wild jsme pozorovali svazky EGFP-

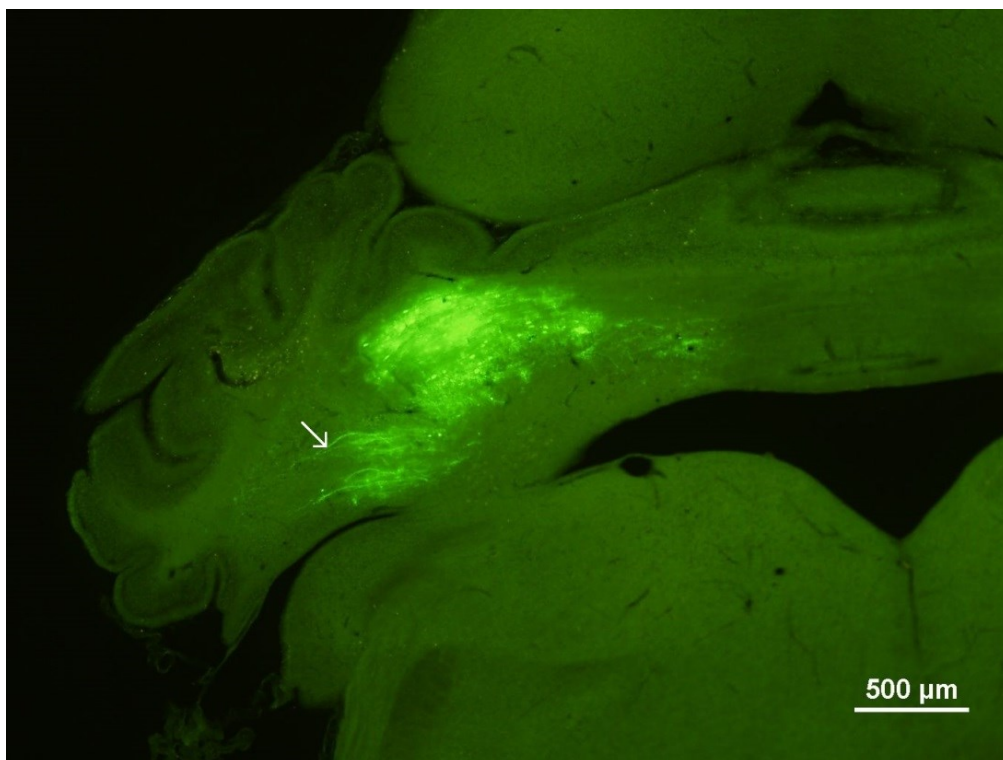
pozitivních vláken vyrůstajících z hlavní hmoty transplantátu na vzdálenost několika set μm , které připomínaly axony, stejně tak byly patrné též EGFP-pozitivní dendritické stromy. Frekvence výskytu striktně ohraničeného transplantátu proti mozečkové tkáni hostitele byla signifikantně závislá na přítomnosti degenerativního procesu mozečku ($P < 0,0001$). Nebyl zde však žádný signifikantní efekt myšího kmene ani kombinace faktoru kmen/degenerace. Přítomnost ostře vymezeného transplantátu byla signifikantně vyšší u mutantů Lurcher ve srovnání s myši typu wild. U myší zdravých byla patrna mnohem častější kolonizace mozečku hostitele EGFP-pozitivními Purkyňovými buňkami (pro kmen B6CBA $P = 0,0001$, pro kmen C3H $P < 0,0001$, Tab. 6). Nebyly zde ale žádné signifikantní rozdíly mezi myši typu Lurcher a wild ve výskytu prorůstajících EGFP-pozitivních vláken z transplantátu do mozečku hostitele (Tab. 6). Nezaznamenali jsme ani žádné signifikantní kmenové rozdíly v prorůstání vláken nebo buněk odvozených z transplantátu.



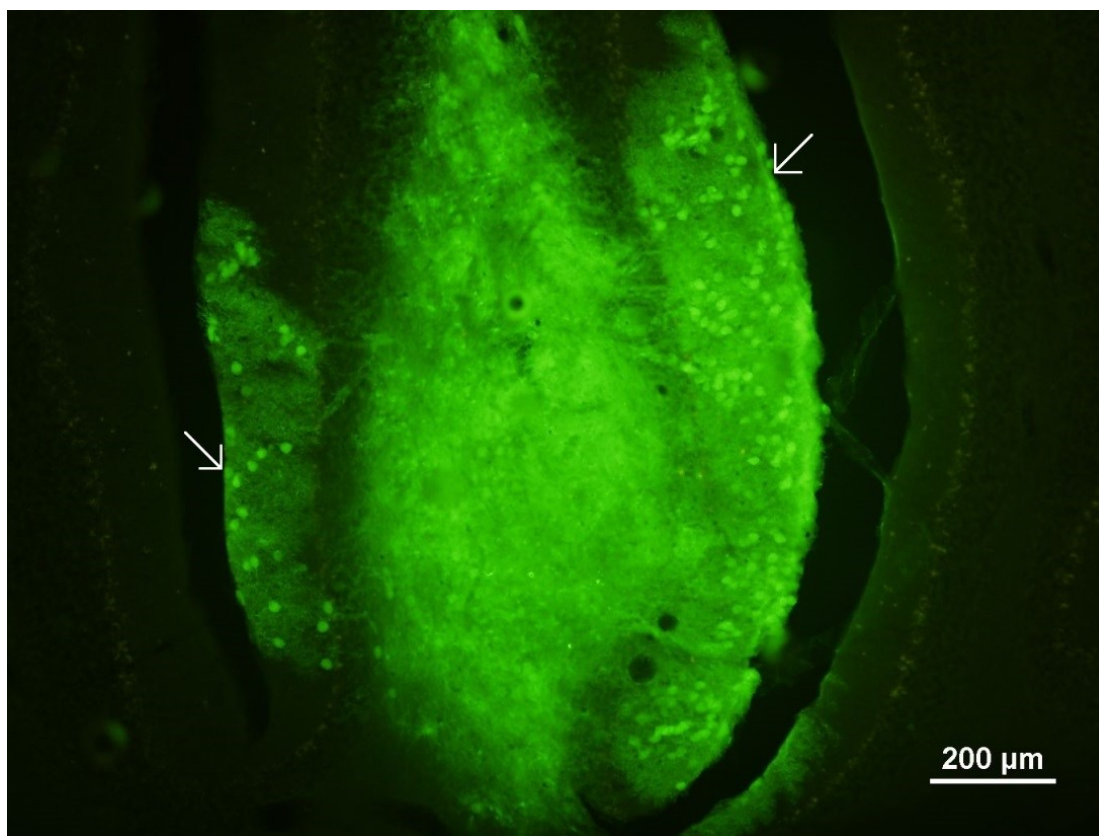
Obr. 24: Myš typu Lurcher kmene C3H. Bilaterální transplantát je ostře vymezen a ohraničen vůči mozečkové tkáni hostitele. Nativní preparát.



Obr. 25: Šipka označuje buňky připomínající buňky Purkyňovy prorůstající mimo hlavní masu transplantátu. Myš typu Lurcher kmene C3H. Nativní preparát.



Obr. 26: Šipka označuje EGFP-pozitivní vlákna vyrůstající z transplantátu směrem k mozečkovým jádrům. Myš typu Lurcher kmene C3H. Nativní preparát.



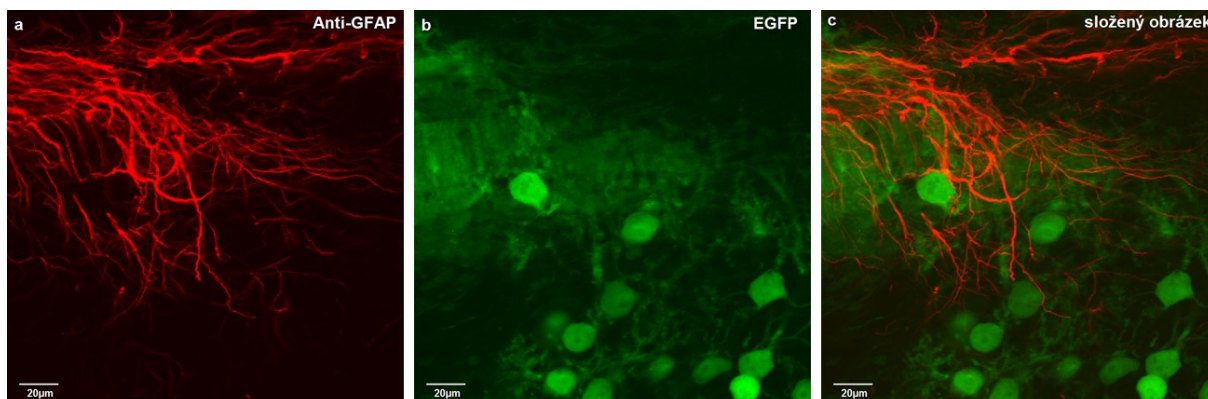
Obr. 27: Šipky označují EGFP-pozitivní buňky připomínající buňky Purkyňovy kolonizující mozeček hostitele. Myš typu wild kmene C3H. Nativní preparát.

Tab. 6: Přítomnost interakcí transplantátu a hostitelské tkáně: počet a procento myší, u kterých prorůstají EGFP-pozitivní vlákna z transplantátu, kolonizace hostitelského mozečku EGFP-pozitivními Purkyňovými buňkami (PB); počet a procento myší, u kterých byly nalezeny oba tyto jevy.

	Počet vyšetřovaných myší	Prorůstání vláken	Kolonizace PB	Prorůstání vláken i kolonizace PB
B6CBA Lurcher	17	5 (29,4 %)	7 (41,2 %)	5 (29,4 %)
B6CBA wild typ	19	2 (10,5 %)	19 (100 %)	2 (10,5 %)
C3H Lurcher	16	1 (6,3 %)	4 (25,0 %)	1 (6,3 %)
C3H wild typ	18	1 (5,6 %)	18 (100 %)	1 (5,6 %)

Transplantáty obsahovaly mnoho GFAP-pozitivních buněk s morfologií odpovídající astrocytům (Obr. 28). Většina z nich nebyla současně EGFP-pozitivních, to tedy znamená, že

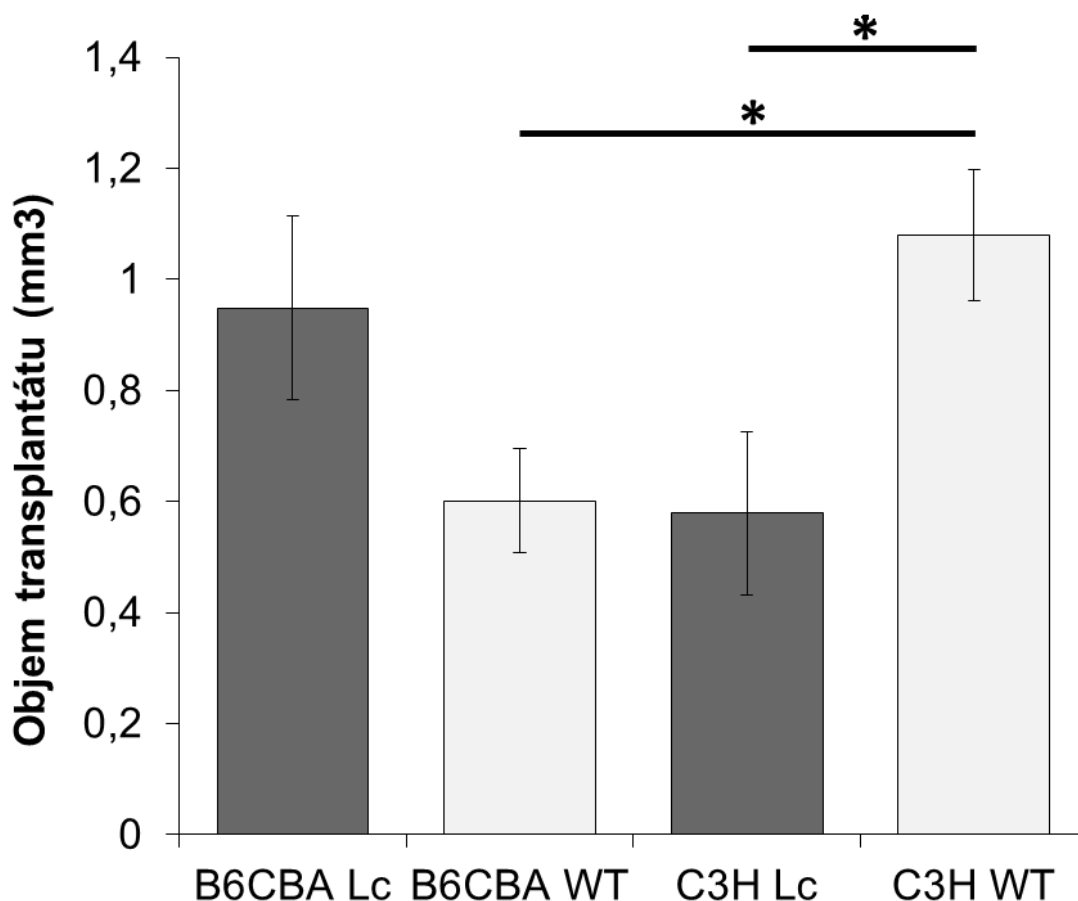
jejich původ nebyl z transplantátu, ale jednalo se o invazi do tkáně transplantátu z okolní mozečkové tkáně hostitele.



Obr. 28: Anti-GFAP imunofluorescence (a), nativní EGFP fluorescence (b) a složený obrázek (c). Identická zorná pole z transplantátu. Hostitelská myš typu Lurcher kmene B6CBA.

9.2.2.2. Objem transplantátu

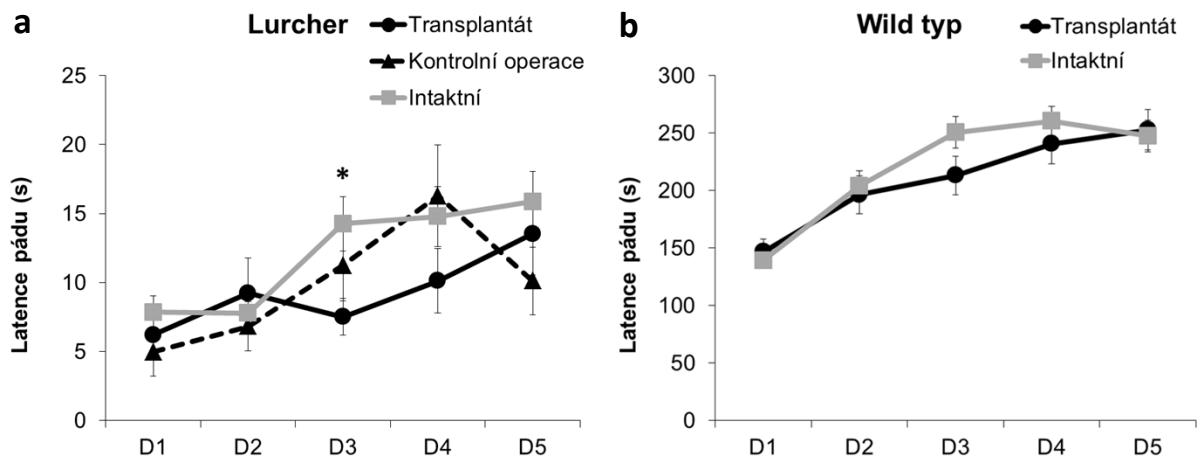
Objem transplantátu byl signifikantně závislý na interakci faktorů degenerace/kmen ($F_{(1,50)} = 9,165$, $P < 0,005$), ne však na těchto faktorech samostatných. Transplantát byl signifikantně větší u myši wild kmene C3H oproti mutantům Lurcher C3H (Obr. 29). U myši kmene B6CBA nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi myši typu Lurcher a wild. U zdravých myši byl naopak zjištěn kmenový rozdíl, kdy myši C3H typu wild měly transplantát větší než myši wild kmene B6CBA (Obr. 29). Koeficient chyby objemu CE byl 0,067 pro B6CBA myši Lurcher, 0,076 pro B6CBA myši wild, 0,11 pro C3H myši Lurcher a 0,078 pro C3H myši wild.



Obr. 29: Průměrný objem transplantátu u myši Lurcher (Lc) kmene B6CBA, myši wild (WT) kmene B6CBA, myši Lurcher kmene C3H a myši wild kmene C3H. Chybové úsečky představují střední chybu průměru. * $P < 0,05$.

9.2.2.3. Test na rotarodu

Latence pádu v testu na rotarodu byly signifikantně závislé na dni testu ($F_{(4, 405)} = 39,327$, $P < 0,0005$), experimentální skupině ($F_{(4, 405)} = 390,735$, $P < 0,0005$) a interakci obou faktorů ($F_{(16,405)} = 7,035$, $P < 0,0005$). Myši Lurcher vykazovaly významně kratší latence pádu než myši wild (pro všechny dny testování D1-D5: $P < 0,0001$, pro srovnání Obr. 30a a 30b). Myši Lurcher léčené transplantací měly kratší latence pádu 3. den tréninku než intaktní myši Lurcher (Obr. 30). U myši typu wild nebyl pozorován žádný signifikantní efekt neurotransplantace na výkon v testu na rotarodu (Obr. 30).



Obr. 30: Průměrné latence pádu v testu na rotarodu (den testování D1-D5) u myši kmene B6CBA typu Lurcher (a) a typu wild (b). Chybové úsečky představují střední chybu průměru. * $P < 0,05$ pro myši léčené transplantací vs. myši intaktní.

10. DISKUSE

10.1. Hodnocení dynamiky morfologických změn v mozečkové kůře myši typu Lurcher

Metoda dvojitého fluorescenčního barvení nám umožnila nově popsat vývojové změny morfologie Purkyňových buněk mozečku u zdravých myši a myši postižených mozečkovou degenerací. Studie tak přinesla nový vhled do změn těchto buněk již dříve popsaných několika autory při použití klasických histologických metod jako barvení dle Nissla, impregnační metoda Golgi-Cox a Golgi-Cox like metoda doplněná elektronovou mikroskopií.

Dvojitě fluorescenční barvení mozečkových řezů zobrazilo granulární vrstvu kůry mozečku jako husté nahromadění malých tmavě zelených buněk, kde nelze pozorovat probíhající axony Purkyňových buněk. Těla Purkyňových buněk s některými viditelnými intracelulárními strukturami jsou lokalizována v řadě na hranici vrstvy granulární a molekulární.

U myši typu wild byly zdravé Purkyňovy buňky s typickou morfologií včetně dendritického stromu rozpoznatelné dvojitým fluorescenčním barvením až od 14. dne postnatálního života. Těla buněk měla kulatý nebo kapkovitý tvar, jejich jádra byla okrouhlá, homogenně se barvící, těla i jádra měla hladké a ostré okraje. Snadno bylo možné rozeznat 1 – 3 jádérka též okrouhlého tvaru, průměrný počet jáderek v jádře pak postupně klesal z 1,30 (13. – 14. postnatální den) na 1,12 (15. – 21. postnatální den). Z užšího pólu buněčného těla vystupoval jeden hlavní dendrit, v některých oblastech byla již viditelná zeleně se barvící dendritická větvení. Nicméně, kompletní bohaté větvení dendritů patrně zatím nebylo. Tyto výsledky potvrzují a doplňují to, co popsali Dumesnil a Sotelo (1992) na mozečkových řezech zdravých myši při použití imunohistochemického značení anti-calbindinem a sice, že v rozmezí 8. – 16. postnatálního dne dendrity nejprve rostou do šířky, poté výhradně do délky. Dendritické větvení podobného tvaru jako u dospělých myši je vyvinuto až v 16. dni života. Naše zjištění též korespondují s nálezy autorů Caddyho a Biscoa (1979), které pozorovali na mozečkových řezech barvených metodou Golgi-Cox za použití světelného i elektronového mikroskopu. V 15. dni života popsali Purkyňovy buňky jako největší neurony v mozečku s bohatě vyvinutým dendritickým stromem a velkým bledým jádrem, obsahujícím elektrondenzní jádérko. Normální zdravé Purkyňovy buňky též mají jen jeden primární kmenový dendrit. U myši mladších 14 dnů ve dvojitém fluorescenčním barvení dendritické

větvení ještě nebylo patrné, ale kontinuita řady těl Purkyňových buněk byla již zřetelná. Jádra buněk byla ostře ohraničena a obsahovala kontury 1-3 jadérek. Vývoj průměrného počtu jadérek sledovaný v naší studii koresponduje s výsledky Soloveie a spol. (2004), kteří kvantifikovali počet jadérek Purkyňových buněk u zdravých myší kmene C57B1/6 v prvních 21 dnech postnatálního života. U novorozenech myší byla popsána 2-4 malá jadérka a jejich počet postupně klesal na 1-2 jadérka v 6. postnatálním dnu. Jádra Purkyňových buněk dospělých myší pak obsahovala obvykle jen jedno velké jadérko. Proto tedy naše nálezy mohou být ve shodě s Marshakem a spol. (1992) a Soloveiem a spol. (2004), kteří považují počet jadérek za kritérium zralosti zdravých Purkyňových buněk.

Podobně jako u zdravých myší jsou naše nálezy, týkající se myší typu Lurcher, ve shodě s předchozími pracemi. Dvojitě fluorescenční barvení nám ale umožnilo získat některé nové a dosud nepublikované poznatky. Již dříve někteří autoři (Caddy a Biscoe, 1979; Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1992; Norman a spol., 1995) potvrdili, že Purkyňovy buňky u mutantů typu Lurcher začínají vykazovat morfologické známky degenerace již v 8. postnatálním dnu a zanikají od druhého týdne života. Proces zániku je pak velmi rychlý a masivní.

Jedna z prvních změn provázejících proces degenerace popsaná již dříve (Dumesnil-Bousez a Sotelo 1992, Norman a spol. 1995), je přítomnost hojných varikozit podél axonů Purkyňových buněk. Tito autoři předpokládají, že varikozity pozorovatelné již 8. postnatální den vznikají jako následek poškozeného axoplasmatického transportu při změnách metabolismu Purkyňových buněk. Za využití elektronové mikroskopie popsali na mozečkových řezech mutantů Lurcher 15. den života výrazné otoky axonů též Caddy a Biscoe (1979). Jak již bylo zmíněno, ve dvojitě fluorescenčním barvení jsme axony nemohli pozorovat z důvodu jejich překrytí granulárními buňkami. Ve shodě s těmito autory (Caddy a Biscoe, 1979, Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1992) jsme popsali již 8. den života mutantů Lurcher změny v jádrech buněk ve smyslu mnoha tmavých skvrn, což by odpovídalo jimi popsaným shlukům chromatinu lokalizovaným především při vnitřním okraji jaderné membrány. Dumesnil-Bousez a Sotelo (1992) též na mozečkových histologických řezech v 10. postnatálním dnu pozorovali ektopická těla Purkyňových buněk umístěná ve vrstvě molekulární. Naše pozorování se s jejich nálezy shodují a potvrzují jak dislokaci buněčných těl, tak i výrazně porušenou kontinuitu řady buněk, což se zvyrazňovalo 11. - 12. den života.

Počínaje 12. postnatálním dnem, Purkyňovy buňky vykazují přítomnost více primárních dendritů, dendrity jsou deformovaného tvaru a výrazně ztlustělé (Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1992). Tyto abnormality dendritů u mutantů Lurcher jsme pozorovali ve

dvojitým fluorescenčním barvením později, většinou od 13. -14. dne života. V tomto věku se též cytoplasma i dendrity začínaly barvit více dočervena, tj. byly více lipofilní. Tento nález nepochybně koresponduje s dřívějším nálezem většího zastoupení lipidových kapének v tělech i dendritech Purkyňových buněk (Caddy a Biscoe, 1979; Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1992; Norman a spol., 1995), které indikují ireverzibilní známky nekrózy společně se stoupajícím počtem lysozomů a poškozených mitochondrií. Až do 15. dne života jsme však mezi mnoha abnormálními Purkyňovými buňkami v různých stádiích degenerace mohli pozorovat ještě i výskyt těchto buněk poměrně normálních. Tento nález, spolu se skutečností, že konečný zánik Purkyňových buněk je rozložen do téměř 3 měsíců (Caddy a Biscoe, 1979), dokládá nerovnoměrnost progresu degenerativních změn v jednotlivých buňkách. Rychlost zániku Purkyňových buněk se však liší i mezi různými částmi mozečku myší typu Lurcher, kdy ojedinělé Purkyňovy buňky přežívající do pozdějšího věku se nacházejí téměř výlučně v oblasti *flocculu* a *paraflocculu* (Duffin et al., 2010). V pokročilém stadiu degenerace buňky se výrazně měnil poměr mezi objemem buněčného jádra a cytoplasmy, cytoplasma postupně tvořila jen velmi úzký lem kolem jádra. Okraje těla i jádra buněk byly neostré a barvily se nehomogenně. Dendrity se naopak barvily výrazně a byly signifikantně ztlustělé, některé ještě rovné, jiné svraštělé a fragmentované.

Ve věku 19-21 dní již u mutantů Lurcher nebylo možné najít Purkyňovy buňky bez známek degenerace, byť pokročilost změn jednotlivých buněk nebyla zcela jednotná. V obvyklém místě kontinuální řady těchto buněk jsme je nacházeli již jen ojedinělé a vykazující výrazně svraštělá buněčná těla. Buněčná jádra se barvila tmavě zeleně, s mnoha tmavšími skvrnami, tvar jader byl nepravidelný, uvnitř se pak v některých jádrech objevovala jasně zeleně zbarvená jádérka nebo jejich fragmenty. Červeně se barvící cytoplasma tvořila kolem jádra jen úzký nepravidelný lem. Později zeleně se barvící buněčná jádra mizela a zůstávala pouze scvrklá cytoplasma. Z dendritického větvení zbývaly již jen chaoticky uspořádané fragmenty stále se barvící jasně červeně, které jsme pak mohli pozorovat i po kompletním zániku těl Purkyňových buněk.

Zcela novým zjištěním naší práce, zabývající se mozečkovou degenerací myší typu Lurcher v porovnání s vývojem normálních zdravých Purkyňových buněk myší typu wild, byly významné změny ve výskytu a počtu jadérek.

Ve srovnání s myšmi typu wild v 8. dni života, s průměrným počtem jadérek v jádře Purkyňových buněk 1,40, jsme u mutantů Lurcher téhož věku zjistili průměrný počet jadérek vyšší (1,60). Naše další pozorování pak odhalila opačný trend v počtu jadérek Purkyňových buněk v raném stadiu postnatálního vývoje u myší wild a Lurcher. Zatímco u zdravých myší

počet jadérek postupně klesal (na průměrný počet 1,12 mezi 15. -21. dnem života), u mutantů Lurcher v tomto období naopak stoupal až na průměrný počet 2,70 jadérek či menších jadérek podobných objektů. Od 18. - 21. postnatálního dne života myši Lurcher jsme však již jadérka vůbec pozorovat nemohli. Pokud jde o změny počtu jadérek u myši typu wild, jsou naše nálezy ve shodě s pracemi Marshaka a spol. (1992) a Soloveie a spol. (2004), u myši typu Lurcher však zatím vývoj počtu jadérek sledován nebyl. Naše nálezy do značné míry korespondují s výsledky Baltanase a spol. (2011), kteří pozorovali fragmentaci až rozpad jadérek u myši typu pcd odvozených od kmene C57BL/6J (samci) a DBA/2J (samice) ve 20. dni života. I přes odlišné genetické pozadí degenerace Purkyňových buněk u těchto myši se též jedná o kompletní ztrátu tohoto typu buněk a progresivní mozečkovou ataxii podobnou jako v případě myši Lurcher. Zůstává otevřenou otázkou, jaké mechanismy se na rozpadu jadérek podílejí. Dle Baltanase a spol. (2011) rozpad jadérek a také Cajalových tělísek naznačuje, že se jedná o časný a citlivý ukazatel poškození DNA indukované neuronální degenerací Purkyňových buněk, ale i jiných typů neuronů. Lim a spol. (2006) se domnívají, že u cerebelárních ataxií změny na úrovni jadérek mohou nastat i bez přímého poškození DNA a to na podkladě patologické interakce jaderných proteinů.

Naše nálezy primárně vyššího počtu jadérek, jejich skutečného nebo jen zdánlivého dělení a následné fragmentace jsou nepochybnými charakteristickými znaky degenerace jader Purkyňových buněk u myši Lurcher. Do jaké míry se jedná o proces poškození DNA, tvorbu abnormálních proteinových sítí nebo o jiné mechanismy však zatím zůstává neobjasněno. Můžeme ale s jistotou konstatovat, že na popsané charakteristiky mozečkové degenerace u myši Lurcher výchozí kmen, ze kterého byli příslušní mutanti odvozeni (C3H nebo B6CBA), vliv neměl.

10.2. Neurotransplantační terapie

Neurotransplantační experimenty u sledovaných myších modelů mozečkových degenerací nám umožnily vyhodnotit přežívání, objem a morfologii embryonálního mozečkového transplantátu. Jednoduchými metodami jsme též mohli posoudit funkční přínos neurotransplantace.

10.2.1. Přežívání a morfologie transplantátu

V provedených experimentech se nám podařilo prokázat, že embryonální mozečkový transplantát přežívá velmi dobře po dobu dvou i šesti měsíců u myší zdravých i u mozečkových mutantů typu Lurcher a pcd. Již v předchozích pokusech jsme však ukázali, že jak solidní mozečkový transplantát, tak i suspenze mozečkových embryonálních buněk mohou přežívat v hostitelské tkáni po dobu šesti měsíců (Cendelin a spol., 2012; Babuska a spol., 2015). Ač přesné procento přežívání transplantátu řada starších prací neuvádí, vážnější problémy s přežíváním embryonálního mozečkového transplantátu neudávají ani nejstarší průkopnické práce (např. Sotelo a Alvarado-Mallart, 1986, 1987a, b, c, 1991; Tomey a Heckroth, 1993; Triarhou a spol., 1995, 1996). To tedy naznačuje, že přežívání mozečkového transplantátu není problematické, dokonce ani u mozečkových mutantů, a že mozečková degenerace významně neovlivňuje celkovou míru přežívání transplantátu. Dlouhodobé přežívání transplantátu je důležité, protože poskytuje dostatek času pro jeho vývoj, případné zapojení do nervových okruhů hostitele, a tedy pro funkční přínos, který je hlavním cílem neurotransplantační terapie. Jak poukázali Rossi a Cattaneo (2002), transplantát je potřeba se naučit používat, k čemuž napomáhá rehabilitace, která je pochopitelně dosti časově náročná. Proto nelze nástup zlepšení nervových funkcí specifickým zapojením transplantátu očekávat okamžitě. Z hlediska experimentálních studií je dlouhodobé přežívání transplantátu rovněž potřeba pro manifestaci dopadu prostředí hostitelské tkáně na něj, a tedy pro možnost zkoumání mechanismů tohoto procesu.

V pokusu č. 1 s dvouměsíčním přežíváním příjemců po transplantaci jsme nezjistili rozdíly v objemu transplantátu mezi mutanty a zdravými zvířaty kmene B6CBA ani kmene B6.BR. Nicméně, jak mutanti, tak zdravé myši kmene B6CBA měli menší objem transplantátu v porovnání s jejich protějšky kmene B6.BR. To tedy znamená, že jsou zde významnější rozdíly kmenové než efekt mozečkové degenerace. Myši kmene B6CBA vykazovaly též nižší míru kolonizace mozečkové tkáně Purkyňovými buňkami odvozenými z transplantátu. U myší zdravých byly tyto rozdíly malé, zatímco u myší postižených výrazné. To znamená, že kolonizace mozečku dárcovskými Purkyňovými buňkami byla u myší Lurcher výrazně horší nejen ve srovnání se zdravými myšmi, ale i s mutanty pcd vykazujícími velmi podobnou morfologii degenerace, avšak zcela odlišnou patogenezi. Dokonce se zdá, že některé stupně integrace transplantátu, jako prorůstání nervových vláken, se objevují u myší pcd ve větší míře než u myší zdravých. To by znamenalo, že oba typy degenerace mají na vývoj transplantátu zcela opačný účinek. Pozitivní působení prostředí mozečku myší pcd

zmiňují též Carletti a Rossi (2005), kteří u myši pcd pozorovali v transplantátu vyšší podíl Purkyňových buněk na úkor jiných mozečkových buněčných fenotypů ve srovnání s jedinci zdravými. Poškození vlastních Purkyňových buněk také zvyšuje frekvenci jejich fúze s transplantovanými mesenchymálními kmenovými buňkami (Kemp a spol., 2011; Diaz a spol., 2012). Na druhou stranu se však v patologicky změněné tkáni může uplatnit řada negativních faktorů (pro přehled viz Rossi a Cattaneo, 2002).

V pokusu č. 2 se šestiměsíčním přežíváním příjemců po transplantaci jsme našli obdobné rozdíly v kvalitativních parametrech týkajících se morfologie transplantátu mezi myšmi typu Lurcher a wild. Prokázali jsme dále, že tyto rozdíly se vyskytují u myši kmene B6CBA i C3H. Dané morfologické rysy transplantátu tedy nejsou kmenově specifické, jsou však charakteristické pro degeneraci postihující myši Lurcher. Rozdíly v objemu transplantátu pak byly patrné pouze u kmene C3H, kde myši typu Lurcher vykazovaly menší objem transplantátu než myši zdravé. Absence rozdílů v objemu transplantátu mezi myšmi Lurcher a zdravými zvířaty u kmene B6CBA je ve shodě s výsledky pokusu číslo 1. Navíc zdravé myši kmene C3H měly větší transplantát než zdravé myši kmene B6CBA. To může naznačovat, že typ kmene ovlivňuje růst transplantátu nebo intenzitu jeho případné destrukce. Kmenové rozdíly mezi kmeny myši C3H a B6CBA byly již zaznamenány dříve při hodnocení přežívání solidního embryonálního mozečkového transplantátu (Cendelin a spol., 2006). Kmenové rozdíly v objemu, případně i přežívání transplantátu mohou být důsledkem odlišné úrovně imunity u různých myších kmenů nebo jednoduše různé míry shody příjemce a dárce transplantátu, který vznikl sice křížením jedince stejného inbredního kmene, z jakého pocházel příjemce, avšak vždy s jedincem kmene C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J.

V obou těchto pokusech bylo opět potvrzeno, že embryonální mozečkový transplantát je bohatým zdrojem Purkyňových buněk (Cendelin a spol., 2012; Purkartova a spol., 2014; Babuska a spol., 2015; Sotelo a Alvarado-Mallart, 1987), které představují hlavní buněčný typ podléhající degeneraci u mutantů Lurcher i pcd. Od určitého stadia ontogenetického vývoje má většina buněk mozečku potenciál se diferencovat téměř výhradně do určitého mozečkového buněčného fenotypu (Carletti a spol., 2002; Leto a spol., 2009; Carletti a Rossi, 2008). Z toho vyplývá, že osud některých embryonálních buněk v transplantátu je již determinován v době transplantace a tyto buňky se pak diferencují ve zralé buňky Purkyňovy. Předpokládáme, že Purkyňovy buňky pozorované v transplantátech našich experimentů pocházejí pouze z transplantované suspenze. Zřejmě se nejedná o splynutí nediferencovaných (nebo diferencovaných, nikoliv však v buňky Purkyňovy) EGFP-pozitivních buněk pocházejících z transplantátu a vlastních přežívajících Purkyňových buněk hostitele, jak

některé práce popisují, např. po transplantaci buněk odvozených z kostní dřeně (Wiemann a spol., 2003). Tento jev je totiž u myši Lurcher i pcd velmi nepravděpodobný, protože transplantace byly v našem případě prováděny ve věku příjemců, kdy vlastní Purkyňovy buňky přežívají již jen ojediněle, nadto jen v určitých oblastech mozečku (Duffin a spol., 2010).

Hlavní a nejzřetelnější rozdíl mezi mutanty Lurcher a myšmi typu wild pozorovaný u obou kmenů (B6CBA i C3H) byl v integraci transplantátu do mozečkové tkáně hostitele. Zatímco u všech zdravých myši jsme pozorovali buňky pocházející z transplantátu prorůstající až rozptýlené i mimo hlavní masu transplantátu, u většiny myši Lurcher byl transplantát ostře ohraničen a oddělen od mozečkové tkáně hostitele. Přestože byla transplantovaná suspenze aplikována do mozečků do oblasti blízké k mozečkovým jádrům, transplantát zůstával u mutantních myši ve většině případů na povrchu mozečku bez zjevné tendence prorůstati dovnitř. Prorůstání vláken z transplantátu do hostitelské tkáně jsme zaznamenali jen v ojedinělých případech, a to jak u mutantů Lurcher, tak u myši typu wild. U zdravých hostitelských myši tedy menší tendence k ohraničení transplantátu byla dána hlavně schopností buněk prorůstati do okolí.

Podobný jev jsme ale nepozorovali u mutantních myši pcd, kde byla dokonce vyšší frekvence prorůstání vláken z transplantátu do okolí než u myši zdravých a Purkyňovy buňky měly tendenci migrovat z transplantátu a kolonizovat mozečkovou tkáň hostitele ve všech sledovaných případech. U mutantů pcd dobrou integraci transplantátu i zlepšení motorických dovedností již v minulosti popsal Triarhou a spol. (Triarhou a spol., 1995; 1996). Také Tomey a Heckroth (1993) zdůraznili rozdíly v míře přežívání transplantátu mezi mutanty typu Lurcher a pcd, které odvodili ze srovnání jejich vlastních výsledků u myši Lurcher (Tomey and Heckroth, 1993) a z výsledků u myši pcd, které publikovali Sotelo a Alvarado-Mallart (1986; 1987b; c). Přímým srovnáním experimentů prováděných za identických podmínek jsme též u obou typů mutantů zjistili vysoké procento přežívání transplantátu. Naše výsledky pak ještě navíc ukázaly zřetelné rozdíly v prorůstání transplantátu do mozečkové tkáně hostitele.

Fakt, že mutanti Lurcher vykazují nižší míru prorůstání transplantátu v mozečkové tkáni hostitele, zatímco jeho přežívání je stejné jako u myši pcd i myši zdravých a ani objem transplantátu se zásadně neliší, naznačuje, že prostředí mozečkové tkáně má odlišný vliv na buňky uvnitř hmoty transplantátu a na jednotlivé buňky a vlákna rozptýlená v hostitelské tkáni. Hlavní hmota transplantátu se vyvíjí ve svém vlastním prostředí, zatímco elementy toto prostředí opouštějící jsou v bezprostředním kontaktu s tkání změněnou neurodegenerativním

procesem. Tento proces tak může snižovat neurogenicitu tkáně a redukovat úroveň signálů přitahujících nezralé buňky k migraci a prorůstání vláken (Rossi a Cattaneo, 2002). Jak již bylo naznačeno výše, pozitivní i negativní modulace vývoje transplantátu podmíněná lokálními tkáňově specifickými signály a též patologickými změnami hostitelské tkáně se zdá nepochybná a byla v minulosti popsána u několika mozečkových myších mutantů (Sotelo a Alvarado-Mallart, 1987a; Carletti a Rossi, 2005; Chintawar a spol., 2009; Houdek a spol., 2012). Srovnání myši Lurcher a myši pcd ukázalo, že relativně podobné mozečkové degenerace mohou mít podstatně odlišný vliv na vývoj transplantátu.

Nezodpovězená však zůstává otázka, v jakém aspektu se liší prostředí mozečků dospělých myši Lurcher, prostředí pcd mutantů a mozečků zdravých. Rossi a Cattaneo (2002) jmenovali celou řadu potenciálních faktorů, které mohou ovlivňovat neurogenní potenciál nejen v mozečku, ale v mozku obecně. Tyto faktory se mohou různou měrou uplatňovat v různých mozkových strukturách za fyziologických podmínek, kdy např. hipokampus patří k vysoce neurogenním strukturám, zatímco mozeček je jednou z nejméně neurogenních oblastí. Neurogenní potenciál dané tkáně se pak může zásadně měnit za patologických podmínek (pro přehled viz Rossi a Cattaneo, 2002). Které z těchto faktorů se uplatňují právě u myši Lurcher není zatím známo. Přesto lze na základě dosavadních studií formulovat různé hypotézy, které mohou napomoci směřování dalšího výzkumu. Některé nálezy byly překvapivé a na první pohled by spíše naznačovaly možnost vyššího neurogenního potenciálu mozečku myši Lurcher.

Mozeček dospělých mutantů Lurcher vykazuje nečekaně vyšší hladinu BDNF faktoru (Babuska a spol., 2015) a vyšší denzitu kapilár (Kolinko a spol., 2016) ve srovnání s mozečkem zdravým. Nicméně zatím není známo, zda tyto změny jsou součástí degenerativního procesu v mozečku nebo zda se jedná o sekundární následky. Navíc vliv těchto faktorů na vývoj transplantátu může být i dvojznačný. Například vyšší denzita kapilár může sice zajišťovat lepší přísun kyslíku a živin, ale může též usnadňovat vstup různých signálních molekul a tak podporovat zánětlivou odpověď na přítomnost cizí tkáně i na mechanické poškození způsobené její aplikací (Kolinko et al., 2015). Zánět a oxidativní stres doprovázející degenerativní proces mohou též hrát významnou roli (Vernet-der Garabedian a spol., 1998; McFarland a spol., 2007). Dalším významným faktorem může být velikost mozečku mutantních myši, tedy anatomické poměry. Mozečky mutantů Lurcher jsou mnohem menší než myši zdravých (Baurle a spol., 2006), zatímco redukce velikosti mozečků u mutantů pcd není tak výrazná.

Přítomnost a úroveň těchto faktorů pak zřejmě determinují úspěch nebo selhání neurotransplantační terapie u jednotlivých typů mozečkových degenerací. Znalost těchto faktorů by měla zcela zásadní význam pro případné klinické využití neurotransplantací k léčbě onemocnění mozečku a jejich následků. Jejich identifikace by mohla v budoucnu pomoci odlišit nemoci léčitelné neurotransplantací od nemocí, u nichž nelze očekávat významný funkční přínos transplantace. Nabízí se zde i možnost potlačení negativních faktorů mozečkové tkáně, podpora jejího neurogenního potenciálu ještě před neurotransplantací a tím zvýšení naděje na úspěch terapie.

V našich předchozích experimentech jsme se také věnovali transplantaci embryonální mozečkové suspenze u myšího modelu SCA2 (použili jsme myši linie Q58-11) s tříměsíčním přežíváním příjemců po operaci (Purkartova a spol., 2014). Embryonální mozečková tkáň transplantovaná do mozečku homozygotních SCA2 myší přežívala velice dobře. Transplantát obsahoval četné Purkyňovy buňky. Pozorovali jsme stejnou frekvenci přežívání i stejnou morfologii transplantátu jako v případě zdravých zvířat (Purkartova a spol., 2014). Výsledky testů motorických funkcí, prostorové orientace, ale též morfologického vyšetření mozečků v naší laboratoři však ukázaly, že patologický fenotyp těchto myší je nevýrazný a neodpovídá dříve popsaným motorickým poruchám a redukci počtu Purkyňových buněk (Huynh a spol., 2000). Uvažovat lze o nestabilitě transgenu a jeho exprese jakož i o nestabilitě původně hybridního kmene, do něhož byl transgen vnesen. Otázkou proto zůstává, zda se vlastně nejednalo o transplantaci do minimálně poškozeného mozečku a jak by byly přežívání transplantátu a jeho další vývoj ovlivněny intenzivnějším patologickým procesem u myší SCA2 linie s výraznějším fenotypovým projevem onemocnění. Naše nálezy (Purkartova a spol., 2014) včetně dosud nepublikovaných dat zpochybňují použitelnost tohoto konkrétního kmene SCA2 myší pro výzkum neurotransplantací.

10.2.2. Funkční dopad transplantace na motorické schopnosti vyšetřovaných myší

Podle předpokladu potvrdil test na akcelerujícím rotarodu těžký motorický deficit u obou typů sledovaných mutantů. Neurotransplantační terapie neměla na výkon mutantních myší v tomto testu vliv.

To je plně ve shodě s naší předchozí studií, ve které jsme našli pouze mírné zlepšení některých parametrů chůze myší Lurcher po transplantaci suspenze buněk embryonálního

mozečku v porovnání s neléčenými kontrolami, ale žádné zlepšení výkonu v klasických testech motoriky (Babuska a spol., 2015). Také dřívější studie naší laboratoře neprokázala funkční zlepšení po transplantaci solidního embryonálního mozečkového transplantátu (Cendelin a spol., 2009). Nepodařilo se nám tedy prokázat funkční efekt transplantátu.

Zlepšení motorických schopností však již bylo posáno u myši pcd po injekční aplikaci suspenze zdravých mozečkových buněk do jader mozečku (Triarhou a spol., 1995; 1996). To tedy znamená, že pcd mutanti mají schopnost zlepšení svých motorických funkcí pomocí určitých specifických nebo nesespecifických mechanismů. Na druhé straně mutanti typu Lurcher nejsou schopni redukovat svůj motorický deficit, jestliže již ke ztrátě Purkyňových buněk došlo. Jediný dosud popsáný terapeutický efekt neurotransplantační terapie u myši Lurcher byl zprostředkován udržením přežívání jejich vlastních Purkyňových buněk pomocí transplantace mezenchymálních kmenových buněk v prvních dnech postnatálního života (Jones a spol., 2010). Zde se ovšem jedná o zcela odlišný mechanismus funkčního působení transplantátu v porovnání s experimenty Triarhou a spol. (1995, 1996) u myši pcd léčených transplantací buněk embryonálního mozečku. Dle Jonese a spol. (2010) se transplantované mezenchymální kmenové buňky dostaly do blízkosti Purkyňových buněk novorozeneých myši Lurcher, zde produkovaly trofické faktory a tím zamezily smrti vlastních Purkyňových buněk hostitele.

Při transplantaci embryonálních mozečkových buněk u dospělých mutantů Lurcher se však očekává řešení situace, kdy naprostá většina Purkyňových buněk již zanikla. Jistým očekáváním je náhrada těchto ztracených neuronů a případná obnova nervových okruhů prostřednictvím transplantovaných buněk. Tento mechanismus připadá v úvahu jako jedno z vysvětlení zlepšení motoriky, které pozoroval u myši pcd Triarhou a spol. (1995, 1996). Sám Triarhou (1996) však již poukázal na možné problémy při rekonstrukci mozečkových okruhů u mutantů Lurcher. Jedná se o významnou redukci počtu granulárních buněk důležitých pro formování dendritů Purkyňových buněk (Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1993; Tomey a Heckroth, 1993). Zde granulární vrstva mozečku, ač značně poškozená a redukována, může dále vytvářet bariéru pro migraci buněk odvozených z transplantátu a pro růst jejich axonů směrem k mozečkovým jádrům, která jsou jejich přirozeným cílem (Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1993). Granulární vrstva může takto negativně působit na integraci transplantátu i u myši pcd (Carletti a spol., 2008).

Limitujícím faktorem funkčního zlepšení po intracerebelární aplikaci transplantátu může být také přítomnost extracerebelárního poškození. Jedná se o sekundární degeneraci dolní olivy u dospělých mutantů Lurcher (Caddy a Biscoe, 1979) a degeneraci dolní olivy,

retiny, mitrálních buněk olfaktorického bulbu a thalamu u mutantů *pcd* (Mullen a spol., 1976; LaVail a spol., 1982; O’Gorman a Sidman, 1985; Blanks a Spee, 1992). Myši *pcd* trpí degenerativními změnami na více místech než myši Lurcher, ale dolní oliva, která je zdrojem šplhavých vláken, je redukována méně a tento proces probíhá pomaleji než u myši Lurcher (Caddy a Biscoe, 1979; Ghetti a spol., 1987). Rovněž degenerace granulární vrstvy je u *pcd* myši pomalejší než u myši Lurcher (Caddy a Biscoe, 1979; Mullen et al., 1976; Triarhou, 2010). Extracerebelární postižení a jeho projevy doprovázejí také některé lidské mozečkové degenerace, jako např. SCA1 a SCA2 (Martins a spol., 2017; Pedroso a spol., 2017).

10.2.3. Mechanismy působení transplantátu

Experimenty využívající různé modely neurologických onemocnění včetně mozečkových degenerací opakovaně ukázaly, že funkční efekt transplantátu se může uskutečnit různorodými mechanismy (pro přehled viz Cendelin a spol., 2018).

Zcela optimální cestou neurotransplantační terapie by byla kompletní náhrada ztracených neuronů. K obnově struktury a funkce poškozené tkáně by ovšem byla nutná i restituce nervových okruhů se správným zapojením transplantovaných buněk. K tomu je zapotřebí přežití a správná diferenciaci dostatečného počtu transplantovaných buněk (nebo buněk vzniklých proliferací transplantovaných kmenových buněk) v příslušný fenotyp, jejich migrace do vhodné pozice a vytvoření adekvátních synaptických kontaktů pro obnovu narušené nervové sítě (Rossi a Cattaneo, 2002). Prvním předpokladem je výběr vhodného zdroje Purkyňových buněk. Jednou možností je embryonální mozečková tkáň (např. Sotelo a Alvarado-Mallart, 1987a, b, c, 1991; Koshaka a spol., 1988; Chang a spol., 1989; Dumesnil-Bousez a Sotelo, 1993; Cendelin a spol., 2012). V humánní medicíně je však tento zdroj transplantátu problematický z více hledisek včetně jeho kvality či hlediska etického. Některé studie např. u myši *pcd* naznačují možnost vyrůstání axonů z transplantovaných buněk do jader mozečku příjemce (Sotelo a Alvarado-Mallart, 1987b; Triarhou a spol., 1992; Keep a spol., 1992) a je zde možná i obnova kortikonukleárních projekcí spojená s pozitivním funkčním efektem (Triarhou a spol., 1995, 1996). Transplantace embryonálních mozečkových buněk byla též úspěšná u myšího modelu SCA1 (Kaemerer a Low, 1999).

Dalším zdrojem transplantátu mohou být neurální prekursor, které je též nutno odebrat z nervového systému dárce (neurální kmenové buňky), nebo připravit diferenciaci z jiných kmenových buněk v podmínkách *in vitro*, embryonální kmenové buňky, adultní

kmenové buňky, indukované pluripotentní kmenové buňky. Neurální prekursorů, respektive buňky, z nichž jsou připraveny, lze zmnožit *in vitro*, což ve srovnání s embryonální (fetální) nervovou tkání do jisté míry zvyšuje jejich dostupnost. Tyto buňky ovšem většinou nemají dostatečnou schopnost dát vznik potřebným buněčným fenotypům a nahradit tak chybějící neurony postiženého mozečku (Chintawar a spol., 2009; Li a spol., 2006a; Sidman a spol., 2007; Jaderstad a spol., 2010). U některých z nich (neurální kmenové buňky, embryonální kmenové buňky) navíc musíme vzít v úvahu etické otázky související s jejich zdrojem. Ani mesenchymální kmenové buňky nejsou vhodné k náhradě chybějících neuronů (Bae a spol., 2007; Jones a spol., 2010; Chang a spol., 2011). I přes některé dílčí úspěchy, např. zdokonalující se protokoly k diferenciaci prekursorů Purkyňových buněk z kmenových buněk *in vitro* (Watson a spol., 2018), je dosažení dokonalé rekonstrukce poškozeného mozečku pomocí transplantovaných buněk zatím nereálné.

Dalším možným mechanismem působení transplantátu je neuroprotektivní efekt, trofická či metabolická podpora degenerujících buněk nebo ovlivnění zánětlivých procesů doprovázejících cerebelární postižení. V tomto případě může transplantát zachovat degenerující buňky nebo alespoň proces degenerace zpomalit a oddálit tak nástup závažného funkčního poškození, jestliže je aplikován v době, kdy patologické změny ještě nejsou ireverzibilní. Tento efekt byl pozorován v případě aplikace mezenchymálních kmenových buněk, které migrovaly do blízkosti degenerujících Purkyňových buněk myši Lurcher a produkcí neurotrofických faktorů této degeneraci zamezily (Jones a spol., 2010). Podobný účinek se ukázal i u myšího modelu Niemann-Pickovy choroby typu C včetně možné modulace zánětu, aktivace glie či apoptózy (Bae a spol., 2005, 2010; Lee a spol., 2010). Dále byla popsána záchrana Purkyňových buněk hostitele myši Nervous a SCA1 vytvořením přímých kontaktů typu gap junctions mezi buňkami odvozenými z transplantátu a buňkami Purkyňovými, které zajistily určitou metabolickou a trofickou podporu (Li a spol., 2006; Chintawar a spol., 2009; Jaderstad a spol., 2010).

Včasná transplantace mezenchymálních kmenových buněk pocházejících z kostní dřeně vedla též k fúzi těchto buněk s buňkami hostitele (Weimann a spol., 2003; Diaz a spol., 2012b) a např. u myšího modelu Niemann-Pickovy nemoci typu C takto vznikly elektricky aktivní Purkyňovy buňky (Bae a spol., 2007). Dle Nerna a spol. (2009) je však fúze hematopoetických buněk s Purkyňovými buňkami za fyziologických okolností pouze přechodný jev. Buněčnou fúzi ale mohou podpořit některé patologické procesy probíhající ve tkáni, např. zánět nebo mírná degenerace (Nern a spol., 2009; Kemp a spol., 2011; Diaz a spol., 2012b).

Transplantovaná nervová tkáň také může produkovat chybějící neurotransmitter a tím normalizovat jeho patologický deficit. Příkladem je uvolňování dopaminu transplantovanými buňkami v terapii Parkinsonovy choroby lidských pacientů (Freed a spol., 2001; Kefalopoulou a spol., 2014). V terapii mozečkových degenerací však tento mechanismus nelze uplatnit.

10.2.4. Význam myších modelů pro výzkum mozečkových degenerací

Experimentální studie využívající různé druhy myších mozečkových mutantů přinesly v posledních desetiletích nový vhled do mozečkových funkcí, patogeneze a projevů mozečkových poškození u degenerativních procesů mozečku. Tento výzkum tak stále přináší nové poznatky o budoucích možnostech léčby cerebelárních degenerací, i když zatím nedospěl k účinné a rutinně využitelné terapii v humánní medicíně. Existuje zde totiž ještě celá řada nezodpovězených otázek.

Myši trpící hereditární cerebelární degenerací vykazují velkou variabilitu týkající se patogeneze, rozsahu mozečkové degenerace i formy a rozsahu postižení ostatních struktur CNS nebo i postižení mimo nervový systém. Toto v podstatě do značné míry odráží existující množství a variabilitu lidských degenerací mozečku (viz Úvod). Některé spontánní mutace nacházející se u myší však nejsou identické s mutacemi způsobujícími analogická onemocnění u lidí. Patogenetické souvislosti onemocnění jsou tedy alespoň částečně odlišné, i když výsledný charakter onemocnění je velmi obdobný. Transgenní myši, cíleně vytvořené modely konkrétních lidských onemocnění, však určitou patologickou lidskou alelu nesou. Ani u těchto modelů ale nemusí být shoda v patogenezi a projevech onemocnění úplná. Limitací myších modelů je také jejich krátká doba dožití. Nemůžeme například hodnotit dlouhodobé přežívání a vliv transplantátu na mozečkovou tkáň hostitele, což je nezbytné pro využití neurotransplantace v humánní medicíně.

I přes různá omezení budou i nadále myší modely mozečkových degenerací významným nástrojem sloužícím k výzkumu funkcí mozečku, jeho onemocnění a možností jejich terapie a nezbytným krokem translačního výzkumu. Dokonalá znalost jednotlivých mutantních myších kmenů je nezbytná pro výběr vhodného modelu pro konkrétní experiment, ale i ke správné interpretaci výsledků a jejich přenosu do humánní medicíny.

11. ZÁVĚRY

1. Hlavní charakteristiky degenerujících Purkyňových buněk u mutantů Lurcher v časném stadiu jsou: narušená kontinuita řady Purkyňových buněk, přítomnost tmavých skvrn v buněčných jádrech, fragmentace jadérek a nerovnoměrné barvení cytoplasmy. Později jsou již těla i jádra Purkyňových buněk deformovaná, svrašťelá, z těla buňky často odstupují dva hlavní dendrity. V konečném stadiu degenerace mají těla i jádra buněk nejasné kontury, dendrity jsou výrazně široké, nerovné, fragmentované. Nenašli jsme žádné rozdíly u myší Lurcher mezi oběma sledovanými kmeny (C3H a B6CBA).
2. Přítomnost ani typ mozečkové degenerace nemají výrazný vliv na přežívání embryonálního mozečkového transplantátu v mozečku hostitele. Ověřili jsme velmi dobrou schopnost přežívání tohoto typu transplantátu u zdravých myší i u mutantních myší Lurcher a pcd po dobu v řádu několika měsíců.
3. Potvrdili jsme, že embryonální mozečkový transplantát je bohatým zdrojem Purkyňových buněk, které představují hlavní buněčný typ podléhající degeneraci u mutantů Lurcher i pcd.
4. Mutanti Lurcher i zdravé myši kmene B6CBA při dvouměsíčním přežívání měli menší objem transplantátu v porovnání s jejich protějšky kmene B6.BR. To znamená, že jsou zde významnější rozdíly kmenové než efekt mozečkové degenerace.
5. Rozdíly v objemu transplantátu mezi mutanty Lurcher a zdravými kontrolami při šestiměsíčním přežívání byly patrné pouze u kmene C3H, kde myši typu Lurcher vykazovaly menší objem transplantátu než myši zdravé. Navíc zdravé myši kmene C3H měly větší transplantát než zdravé myši kmene B6CBA. To ukazuje, že typ kmene ovlivňuje růst transplantátu nebo intenzitu jeho případné destrukce.
6. Dospělý mozeček mutantů Lurcher má výrazně negativní vliv na integraci transplantátu. Mozeček mutantů pcd však toto působení nevykazuje. Existují tedy zřejmě faktory specifické pro určitý typ mozečkové degenerace, které ovlivňují vývoj a integraci transplantátu. Přítomnost a úroveň těchto faktorů pak determinují úspěch nebo selhání neurotransplantační

terapie u jednotlivých typů mozečkových degenerací. Jejich identifikace by mohla v budoucnu pomoci odlišit nemoci neurotransplantací léčitelné od neléčitelných.

7. Neurotransplantační terapie v našich experimentech neměla vliv na výkon sledovaných mutantů v testu na akcelerujícím rotarodu. Nepodařilo se nám tedy prokázat funkční efekt transplantátu.

12. LITERATURA

1. Aguiar J, Fernandez J, Aguiar A, Mendoza Y, Vazquez M, Suarez J, Berlanga J, Cruz S, Guillen G, Herrera L, Velazquez L, Santos N, Merino N: Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self-promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neurosci Lett* 2010, 392:202-206.
2. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Varshney D, Lawrence L, Lowrie MB, Hughes S, Webster Z, Blake J, Cooper JM, King R, Pook MA: GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* 2006, 88:580-590.
3. Altman J, Bayer SA: Time of origin and distribution of a new cell type in the rat cerebellar cortex. *Exp Brain Res* 1977, 29:265-274.
4. Andersen JK: Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004, 10 Suppl: S18-25.
5. Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, Mishina M: Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 197:1267-1276.
6. Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J: Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 1997, 276:1709-1712.
7. Babuska V, Houdek Z, Tuma J, Purkartova Z, Tumova J, Kralickova M, Vozeh F, Cendelin J: Transplantation of Embryonic Cerebellar Grafts Improves Gait Parameters in Ataxic Lurcher Mice. *Cerebellum* 2015, 14:632-641.
8. Bae JS, Carter JE, Jin HK: Adipose tissue-derived stem cells rescue Purkinje neurons and alleviate inflammatory responses in Niemann-Pick disease type C mice. *Cell Tissue Res* 2010, 340:357-369.
9. Bae JS, Furuya S, Ahn SJ, Yi SJ, Hirabayashi Y, Jin HK: Neuroglial activation in Niemann-Pick Type C mice is suppressed by intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett* 2005, 381:234-236.
10. Bae JS, Han HS, Youn DH, Carter JE, Modo M, Schuchman EH, Jin HK: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells* 2007, 25:1307-1316.

11. Bakalian A, Kopmels B, Messer A, Fradelizi D, Delhaye-Bouchaud N, Wollman E, Mariani J. Peripheral macrophage abnormalities in mutant mice with spinocerebellar degeneration. *Res Immunol* 1992, 143:129-39.
12. Bakalkin G, Watanabe H, Jezierska J, Depoorter C, Verschuuren-Bemelmans C, Bazov I, Artemenko KA, Yakovleva T, Dooijes D, Van de Warrenburg BP, Zubarev RA, Kremer B, Knapp PE, Hauser KF, Wijmenga C, Nyberg F, Sinke RJ, Verbeek DS: Prodynorphin mutations cause the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *Am J Hum Genet* 2010, 87: 593-603.
13. Ball LG, Xiao W: Molecular basis of ataxia teleangiectasia and related diseases. *Acta Phamacol Sin* 2005, 26:897-907.
14. Baltanás FC, Berciano MT, Valero J, Gomez C, Diaz D, Alonso JR, Lafarga M, Weruaga E: Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia* 2013, 61:254-272.
15. Baltanás FC, Casafont I, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M. 2011. Nucleolar disruption and Cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje cells. *Brain Pathol* 21(4):374-88.
16. Baurle J, Kranda K, Frischmuth S: On the variety of cell death pathways in the Lurcher mutant mouse. *Acta Neuropathol* 2006, 112: 691-702.
17. Beckers MC, Bar, I, Huynh-Thu T, Dernoncourt C, Brunialti AL, Montagutelli X, Guenet JL, Goffinet AM: A high-resolution genetic map of mouse chromosome 5 encompassing the reeler (rl) locus. *Genomics* 1994, 23: 685-690.
18. Ben Hamida M, Belal S, Sirugo G, Ben Hamida C, Panayides K, Ionannou P, Beckmann J, Mandel JL, Hentati F, Koenig M, Middleton L: Freidreich's ataxia phenotype not linked to chromosome 9 and associated with selective autosomal recessive vitamin E deficiency in two inbred Tunisian families. *Neurology* 1993, 43:2179-2183.
19. Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the false discovery rate: a practical and power approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 1995, 57:289-300.
20. Beranova M, Mandakova P, Sima P, Slipka J, Vozeh F, Kocova J, Cervinkova M, Sykora J: The morphology of the adrenal gland and the lymph organs is impaired in the neurodefecient Lurcher mutant mice. *Acta Vet Brno* 2002, 71:23-28.
21. Berezniuk I, Fricker LD: A defect in cytosolic carboxypeptidase 1 (Nna1) causes autophagy in Purkinje cell degeneration mouse brain. *Autophagy* 2010, 6:558-559.

22. Berrebi AS, Mugnaini E: Effects of the murine mutation "nervous" on neurons in cerebellum and dorsal cochlear nucleus. *J Neurocytol* 1988, 17(4): 465-484.
23. Blanks JC, Spee C: Retinal degeneration in the pcd/pcd mutant mouse: accumulation of spherules in the interphotoreceptor space. *Exp Eye Res* 1992, 54: 637-644.
24. Blatt GJ, Eisenman, LM: A qualitative and quantitative light microscopic study of the inferior olivary complex of normal, reeler, and weaver mutant mice. *J Comp Neurol* 1985a, 232(1): 117-128.
25. Blatt, GJ, Eisenmann, LM: A qualitative and quantitative light microscopic study of the inferior olivary complex in the adult staggerer mutant mice. *J Neurogenet* 1985b, 2(1): 51-66.
26. Brown SD, Nolan PM: Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. *Hum Mol Genet* 1998, 7:1627-1633.
27. Caddy KWT, Biscoe TJ: Structural and quantitative studies on the normal C3H and Lurcher mutant mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1979, 287: 167-201.
28. Caddy, KWT, Vozeh, F.: The effect of 3 - acetylpyridine on the inferior olivary degeneration in the Lurcher mutant and wild type mice. *Europ J Pharmaco* 1997, 330(2-3): 137-142.
29. Campbell DB, Hess EJ: Chromosomal localization of the neurological mouse mutations tottering (tg), Purkinje cell degeneration (pcd), and nervous (nr). *Brain Res Mol Brain Res* 1996, 37:79-84.
30. Carletti B, Grimaldi P, Magrassi L, Rossi F: Specification of cerebellar progenitors after heterotopic-heterochronic transplantation to the embryonic CNS in vivo and in vitro. *J Neurosci* 2002, 22:7132-46.
31. Carletti B, Rossi F: Selective rather than inductive mechanisms favour specific replacement of Purkinje cells by embryonic cerebellar cells transplanted to the cerebellum of adult Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Eur J Neurosci* 2005, 22:1001-1012.
32. Carletti B, Rossi F. Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist* 2008: 14:91-100.
33. Carletti B, Williams IM, Leto K, Nakajima K, Magrassi L, Rossi F: Time constraints and positional cues in the developing cerebellum regulate Purkinje cell placement in the cortical architecture. *Dev Biol* 2008, 317:147-160.
34. Caston J, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J: Motor behavior of heterozygous staggerer mutant (+/sg) versus normal (+/+) mice during aging. *Behav Brain Res* 1995, 72:97-102.

35. Caston J, Chianale C, Delhay-Bouchaud N, Mariani J: Role of the cerebellum in exploration behavior. *Brain Res* 1998, 808: 232-237.
36. Caviness VS, Rakic P: Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annu Rev Neurosci* 1978, 1: 297-326.
37. Cemal CK, Carrol CJ, Lawrence L, Lowrie MB, Ruddle P, Al-Mahdawi S, King RH, Pook MA, Huxley C, Chamberlain S: YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum Mol Genet* 2002, 11:1075-1094.
38. Cendelin J: From mice to men: lessons from mutant ataxic mice. *Cerebellum Ataxias* 2014, 1:4.
39. Cendelin J: Experimental neurotransplantation treatment for hereditary cerebellar ataxias. *Cerebellum Ataxias* 2016, 3:7.
40. Cendelin J, Babuska V, Korelusova I, Houdek Z, Vozech F: Long-term survival of solid embryonic cerebellar grafts in Lurcher mice. *Neurosci Lett* 2012, 515:23-27.
41. Cendelin J, Korelusova I, Vozech F. Comparison of embryonic cerebellar graft survival in adult Lurcher mutant mice of strains C3H and C57Bl/7. *Prague Med Rep* 2006, 107:89-94.
42. Cendelin J, Korelusova I, Vozech F: The effect of cerebellar transplantation and enforced physical activity on motor skills and spatial learning in adult Lurcher mutant mice. *Cerebellum* 2009, 8:35-45.
43. Cendelin J, Mitoma H, Manto M: Neurotransplantation therapy and cerebellar reserve. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2018, 17: 172-183.
44. Cendelin J, Purkartova Z, Kubik J, Ulbricht E, Tichanek F, Kolinko Y: Long-Term Development of Embryonic Cerebellar Grafts in Two Strains of Lurcher Mice. *Cerebellum* 2018, 17(4):428-437.
45. Cendelin J, Vozech F: Assessment of CNS excitability in natural model of cerebellar degeneration. *Homeostasis* 1999, 39(3-4): 115-116.
46. Cendelin J, Tuma J, Korelusova I, Vozech F: The effect of genetic background on behavioral manifestation of Grid2 (Lc) mutation. *Behav Brain Res* 2014 Sep 1; 271:218-27.
47. Clark HB, Burright EN, Yunis WS, Larson S, Wilcox C, Hartman B, Matilla A, Zoghbi HY, Orr HT: Purkinje cell expression of a mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. *J Neurosci* 1997 17(19): 7385-7395.

48. Coutelier M, Burglen L, Mundwiler E, Abada-Bendib M, Rodriguez D, Chantot-Bastaraud S, Rougeot C, Cournelle MA, Milh M, Toutain A, Bacq D, Meyer V, Afenjar A, Deleuze JF, Brice A, Héron D, Stevanin G, Durr A: GRID2 mutations span from congenital to mild adult-onset cerebellar ataxia. *Neurology* 2015, 84:1751-1759.
49. Cvetanovic M, Hu YS, Opal P: Mutant Ataxin-1 Inhibits Neural Progenitor Cell Proliferation in SCA1. *Cerebellum* 2017: 16:340-7.
50. D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T: A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 1995, 374:719-723.
51. De Jager PL, Harvey D, Polydorides AD, Zuo J, Heintz N: A high-resolution genetic map of the nervous locus on mouse chromosome 8. *Genomics* 1998, 48:346-353.
52. Di Donato S, Marmolino D, Taroni F: Mitochondrial disorders. In: Manto M, Gruol DL, Schmähmann JD, Koibuchi N, Rossi F (ed.): Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders. New York: Springer Science+Business Media, 2013, s.2269-2311.
53. Diaz D, Recio JS, Weruaga E, Alonso JR. Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells. *Cell Transplant* 2012, 21:1595-602.
54. Dickson PE, Rogers TD, Del Mar N, Martin LA, Heck D, Blaha CD, Goldowitz D, Mittelman G: Behavioral flexibility in a mouse model of developmental cerebellar Purkinje cell loss. *Neurobiol Learn Mem* 2010, 94:220-228.
55. Doughty ML, De Jager PL, Korsmeyer SJ, Heintz N. 2000. Neurodegeneration in Lurcher mice occurs via multiple cell death pathways. *J Neurosci* 20:3687–3694.
56. Duffin CA, McFarland R, Sarna JR, Vogel MW, Armstrong CL: Heat shock protein 25 expression and preferential Purkinje cell survival in the lurcher mutant mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 2010, 518:1892-1907.
57. Dumesnil - Bousez N, Sotelo C: Early development of the Lurcher cerebellum: Purkinje cell alterations and impairment of synaptogenesis. *J Neurocytol* 1992, 21: 506 – 529.
58. Dumesnil-Bousez N, Sotelo C: Partial reconstruction of the adult Lurcher cerebellar circuitry by neural grafting. *Neuroscience* 1993, 55:1-21.
59. Dusart I, Guenet JL, Sotelo C: Purkinje cell death: Differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. *Cerebellum* 2006, 5:163-173.

60. Fernandez-Gonzalez A, La Spada AR, Treadaway J, Higdon JC, Harris BS, Sidman RL, Morgan JI, Zuo J: Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science* 2002, 295:1904-1906.
61. Fortier P, Smith AM, Rossignol S: Locomotor deficits in the cerebellar mutant mouse, Lurcher. *Exp Brain Res* 1987, 66:271-286.
62. Frederic F, Chautard T, Brochard R, Chianale C, Wollman E, Oliver C, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J: Enhanced endocrine response to novel environment stress and endotoxin in Lurcher mutant mice. *Neuroendocrinology* 1997, 66:341-7.
63. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001, 344:710-719.
64. Friedman MJ, Shah AG, Fang ZH: Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration. *Nat Neurosci* 10, 2007: 1509-1528.
65. Furrer SA, Waldherr SM, Mohanachandran MS, Baughn TD, Nguyen KT, Sopher BL, Damian VA, Garden GA, La Spada AR: Reduction of mutant ataxin-7 expression restores motor function and prevents cerebellar synaptic reorganization in a conditional mouse model of SCA7. *Hum Mol Genet* 2013, 22:890-903.
66. Ghetti B, Norton J, Triarhou LC: Nerve cell atrophy and loss in the inferior olivary complex of „Purkinje cell degeneration“ mutant mice. *J Comp Neurol* 1987, 260:409-422.
67. Glickstein, M.: The cerebellum and motor learning. *Cur Opin Neurobiol* 1992, 2(6): 802-806.
68. Goodlett C R, Hamre KM, West JR: Dissociation of spatial navigation and visual guidance performance in Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Behav Brain Res* 1992, 47(2): 129-141.
69. Grimaldi G, Argyropoulos GP, Boehringer A, Celnik P, Edwards MJ, Ferrucci R, Galea JM, Groiss SJ, Hiaroka K, Kassavetis P, Lesage E, Manto M, Miall RC, Priori A, Sadnicka A, Ugawa Y, Ziemann U: Non-invasive cerebellar stimulation – a consensus paper. *Cerebellum* 2014. 13:121-138.
70. Grimaldi G, Manto M: Anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) decreases the amplitudes of long-latency stretch reflexes in cerebellar ataxia. *Ann Biomed Eng* 2013, 41:2437-2447.

71. Guastavino JM, Sotelo C, Damez-Kinselle I: Hot-foot murine mutation: Behavioral effects and neuroanatomical alteration. *Brain Res* 1990, 523(2): 199-210.
72. Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J: The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J Microsc* 1999, 193: 199-211.
73. Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ: Intention tremor, parkinsonism, and generalised brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 2001, 57(1): 127-130.
74. Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES: Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 1996, 379:736-739.
75. Hansen ST, Meera P, Otis TS, Pulst SM: Changes in Purkinje cell firing and gene expression precede behavioral pathology in a mouse model of SCA2. *Hum Mol Genet* 2013, 22:271-283.
76. Harding AE: Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 1981, 104:589-620.
77. Harris J, Moreno S, Shaw G, Mugnaini E: Unusual neurofilament composition in cerebellar unipolar brush neurons. *J Neurocytol* 1993, 22:1039-1059.
78. Heckroth JA: Quantitative morphological analysis of the cerebellar nuclei in normal and lurcher mutant mice. I. Morphology and cell number. *J Comp Neurol* 1994a 343(1): 173-82.
79. Heckroth JA: A quantitative morphological analysis of the cerebellar nuclei in normal and lurcher mutant mice. II. Volumetric changes in cytological components. *J Comp Neurol* 1994b, 343(1): 183-92.
80. Heckroth JA, Hobart NJH, Summers D: Transplanted neurons alter the course of neurodegenerative disease in Lurcher mutant mice. *Exp Neurol* 1998, 154:336-352.
81. Herculano-Houzel S: Coordinated scaling of cortical and cerebellar numbers of neurons. *Frontiers of Neuroanatomy* 2010, 4: 1-8.
82. Herrup K: Role of staggerer gene in determining cell number in cerebellar cortex I. Granule cell death is an indirect consequence of staggerer gene action. *Dev Brain Res* 1983, 313(2): 267-274.

83. Heuze P, Feron C, Baudoin C: Early behavior development of mice is affected by staggerer mutation as soon as postnatal day three. *Brain Res Dev Brain Res* 1997, 101:81-84.
84. Hilber P, Caston J: Motor skills and motor learning in Lurcher mutant mice during aging. *Neuroscience* 2001, 102(3): 615–623.
85. Hilber P, Jouen F, Delhay-Bouchaud N, Mariani J, Caston J.: Differential roles of cerebellar cortex and deep nuclei in learning and retention of spatial task: studies in intact and cerebellectomized Lurcher mutant mice. *Behav Genet* 1998, 28(4): 299-308.
86. Hilber P, Lorivel T, Delarue C, Caston J: Stress and anxious-related behaviors in Lurcher mutant mice. *Brain Res* 2004, 1003:108-112.
87. Hirano A, Dembitzer HM: Cerebellar alterations in the weaver mouse. *J Cell Biol* 1973, 56(2): 478-786.
88. Houdek Z, Cendelin J, Kulda V, Babuska V, Cedikova M, Kralickova M, Pachernik J, Stefano GB, Vozeh F: Intracerebellar application of P19-derived neuroprogenitor and naive stem cells to Lurcher mutant and wild type B6CBA mice. *Med Sci Monit* 2012, 18:Br174-180.
89. Howard V, Reed M. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy. New York: Garland Science; 2004.
90. Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM: Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet* 2000, 26:44-50.
91. Chakrabarti L, Zahra R, Jackson SM, Kazemi-Esfarjani P, Sopher BL, Mason AG, Toneff T, Ryu S, Shaffer S, Kansy JW, Eng J, Merrihew G, MacCoss MJ, Murphy A, Goodlett DR, Hook V, Bennett CL, Pallanck LJ, La Spada AR: Mitochondrial dysfunction in NnaD mutant flies and Purkinje cell degeneration mice reveals a role for Nna proteins in neuronal bioenergetics. *Neuron* 2010, 66:835-847.
92. Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR: Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 2002, 42(4): 517-525.
93. Chang YC, Lin CY, Hsu CM: Neuroprotective effects of granulocyte colony stimulating factor in a novel transgenic mouse model of SCA17. *J Neurochem* 2011, 118: 288-303.
94. Chang YK, Chen MH, Chiang YH, Chen YF, Ma WH, Tseng CY, Soong BW, Ho JH, Lee OK: Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates motor function deterioration of spinocerebellar ataxia by rescuing cerebellar Purkinje cell. *J Biomed Sci* 2011, 18:54.

95. Cheng SS, Heintz N: Massive loss of mid- and hindbrain neurons during embryonic development of homozygous Lurcher mice. *J Neurosci* 1997, 17:2400-2407.
96. Chintawar S, Hourez R, Ravella A, Gall D, Orduz D, Rai M, Bishop DP, Geuna S, Schiffmann SN, Pandolfo M: Grafting neural precursor cells promotes functional recovery in an SCA1 mouse model. *J Neurosci* 2009, 29:13126-13135.
97. Chort A, Alves S, Marinello M, Dufresnois B, Dornbierer JG, Tesson C, Latouche M, Baker DP, Barkats M, El Hachimi KH, Ruberg M, Janer A, Stevanin G, Brice A, Sittler A: Interferon beta induces clearance of mutant ataxin 7 and improves locomotion in SCA7 knock-in mice. *Brain* 2013, 136:1732-1745.
98. Ilg W, Brötz D, Burkard S, Giese MA, Schols M, Synovzik M: Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease. *Mov Disord* 2010, 25:2239–2246.
99. Jaderstad J, Jaderstad LM, Li J, Chintawar S, Salto C, Pandolfo M, Ourednik V, Teng YD, Sidman RL, Arenas E, Snyder EY, Herlenius E: Communication via gap junctions underlies early functional and beneficial interactions between grafted neural stem cells and the host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107: 5184-5189.
100. Jones J, Jaramillo-Merchan J, Bueno C, Pastor D, Viso-Leon M, Martinez S: Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol Dis* 2010;40:415-423.
101. Kaemmerer WF, Low WC: Cerebellar allografts survive and transiently alleviate ataxia in a transgenic model of spinocerebellar ataxia Type-1. *Exp Neurol* 1999, 158:301-311.
102. Keep M, Alvarado-Mallart RM, Sotelo C: New insight on the factors orienting the axonal outgrowth of grafted Purkinje cells in the pcd cerebellum. *Dev Neurosci* 1992, 14:153-165.
103. Kefalopoulou Z, Politis M, Piccini P, Mencacci N, Bhatia K, Jahanshani M, Widner H, Rehncrona S, Brundin P, Bjorklund A, Lindvall O, Limousin P, Quinn N, Foltynie T: Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA Neurol* 2014, 71: 83-87.
104. Kelp A, Koeppen AH, Petrasch-Parwez E, Calaminus C, Bauer C, Portal E, Yu-Taeger L, Pichler B, Bauer P, Riess O, Nguyen HP: A novel transgenic rat model for spinocerebellar ataxia type 17 recapitulates neuropathological changes and supplies in vivo imaging biomarkers. *J Neurosci* 2013, May 22;33(21):9068-81.

105. Kemp K, Gordon D, Wraith DC, Mallam E, Hartfield E, Uney J, Wilkins A, Scolding N. Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011, 37:166-78.
106. Kolinko Y, Cendelin J, Kralickova M, Tonar Z: Smaller Absolute Quantities but Greater Relative Densities of Microvessels Are Associated with Cerebellar Degeneration in Lurcher Mice. *Front Neuroanat* 2016, 10:35.
107. Kolinko Y, Krakorova K, Cendelin J, Tonar Z, Kralickova M: Microcirculation of the brain: morphological assessment in degenerative diseases and restoration processes. *Rev Neurosci* 2015, 26:75-93.
108. Kohsaka S, Takayama H, Ueda T, Toya S, Tsukada Y: Reorganization of cerebellar cell suspension transplanted into the weaver mutant cerebellum and immunohistochemical detection of synaptic formation. *Neurosci Res* 1988, 6:162-166.
109. Kopmels B, Wollman EE, Guastavino JM, Delhaye-Bouchaud N, Fradelizi D, Mariani J: Interleukin-1 hyperproduction by in vitro activated peripheral macrophages from cerebellar mutant mice. *J Neurochem* 1990: 55:1980-5.
110. Koziol LF, Budding D, Andreasen N, D'Arrigo S, Bulgheroni S, Imamizu H, Ito M, Manto M, Marvel C, Parker K, Pezzulo G, Ramnani N, Riva D, Schmammann J, Vandervert L, Yamazaki T: Concensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition. *Cerebellum* 2014, 13:151-177.
111. Králíček P: Úvod do speciální neurofyziologie. Galén, Praha, 2011.
112. Kröger RHH, Wagner HJ: A fluorescent double stain for visualization of neural tissue by confocal laser scanning microscopy. *J Neurosci Meth* 1998, 84, 87-92.
113. Kyuhou S, Kato N, Gemba H: Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neurosci Lett* 2006, 396:91-96.
114. Laine J, Axelrad H: The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 1994, 339:159-173.
115. Laine J, Axelrad H: Morphology of the Golgi-impregnated Lugaro cell in the rat cerebellar cortex: a reappraisal with a description of its axon. *J Comp Neurol* 1996, 375:618-640.
116. Laine J, Axelrad H: Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 1998, 9:2399-2403.
117. Lalonde R: Exploration and spatial learning in staggerer mutant mice. *J Neurogenet* 1987a, 14(6): 285-291.

118. Lalonde, R: Motor abnormalities in weaver mutant mice. *Exp Brain Res* 1987c, 65(2): 479-481.
119. Lalonde R, Bensoula AN, Filali M: Rotorod sensorimotor learning in cerebellar mutant mice. *Neurosci Res* 1995, 22:423-426.
120. Lalonde R, Botez, MI: Navigational deficits in weaver mutant mice. *Brain Res* 1986, 398(1), 175-177.
121. Lalonde R, Botez MI, Joyal CC, Caumartin M: Motor abnormalities in Lurcher mutant mice. *Physiol Behav* 1992, 51(3): 523-525.
122. Lalonde R, Filali M, Bensoula AN, Lestienne F: Sensorimotor learning in three cerebellar mutant mice. *Neurobiol Learn Mem* 1996a, 65(2): 113-120.
123. Lalonde R, Filali M, Bensoula AN, Monnier C, Guastavino JM: Spatial learning in a Z-maze by cerebellar mutant mice. *Physiol Behav* 1996b, 59(1): 83-86.
124. Lalonde R, Strazielle C: Motor coordination, exploration, and spatial learning in a natural mouse mutation (nervous) with Purkinje cell degeneration. *Behav Genet* 2003, 33(1): 59-66.
125. Lalonde R, Strazielle C: Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: Behavior and neurochemistry. *Brain Res* 2007, 1140: 51-74.
126. Lalonde R, Thifault S.: Absence of an association between motor coordination and spatial orientation in Lurcher mutant mice. *Behav Genet* 1994, 24(6): 497-501.
127. Lalouette A, Guenet JL, Vríz S: Hotfoot mouse mutations affect the delta 2 glutamate receptor gene and are allelic to lurcher. *Genomic* 1998, 50:9-13.
128. Landis SC: Ultrastructural changes in the mitochondria of cerebellar Purkinje cells of nervous mutant mice. *J Cell Biol* 1973, 57(3): 782-797.
129. Landis SC, Mullen RJ: The development and degeneration of Purkinje cells in pcd mutant mice. *J Comp Neurol* 1978, 177(1): 125-144.
130. LaVail MM, Blanks JC, Mullen RJ: Retinal degeneration in the pcd cerebellar mutant mouse. I. Light microscopic and autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 1982, 212, 217-230.
131. Le Marec N, Lalonde R: Sensorimotor learning and retention during equilibrium tests in Purkinje cell degeneration mice. *Brain Res* 1997, 768:310-316.
132. Leto K, Bartolini A, Yanagawa Y, Obata K, Magrassi L, Schilling K, Rossi F. Laminar fate and phenotype specification of cerebellar GABAergic interneurons. *J Neurosci* 2009, 29:7079-91.

133. Li J, Ma Y, Teng YD, Zheng K, Vartanian TK, Snyder EY, Sidman RL: Purkinje neuron degeneration in nervous (nr) mutant mice is mediated by a metabolic pathway involving excess tissue plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006a, 103:7847-7852.
134. Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabó G, Rual JF, Fisk CJ, Li N, Smolyar A, Hill DE, Barabási AI, Vidal M, Zoghbi HY: A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 2006, 125:801-814.
135. Liu QA, Shio H: Mitochondrial morphogenesis, dendrite development, and synapse formation in cerebellum require both Bcl-w and the glutamate receptor delta2. *PLoS Genet* 2008, 4:e1000097.
136. Mandřáková P, Šinkora J, Šíma P, Vožeh F: Reduced primary T lymphopoiesis in 3-month-old Lurcher mice: sign of premature ageing of thymus? *Neuroimmunomodulation* 2005, 12(6): 348-356.
137. Mandřáková P, Virtová M, Šíma P, Beranová M, Slípka J: Congenitally determined neurodegeneration 'Lurcher' induces morphofunctional changes of thymus. *Folia Microbiol* 2003, 48(3): 394-398.
138. Manto MU: The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *The Cerebellum* 2005, (4): 2-6.
139. Marien P, Ackermann H, Adamaszek M, Barwood CH, Beaton A, Desmond J, De Witte E, Fawcett AJ, Hertrich I, Kuper M, Leggio M, Marvel C, Molinari M, Murdoch BE, Nicolson RI, Schmähmann JD, Stoodley CJ, Thurling M, Timmann D, Wouters E, Ziegler W: Consensus paper: Language and the cerebellum: an ongoing enigma. *Cerebellum* 2014, 13:386-410.
140. Markvartova V, Cendelin J, Vožeh F: Changes of motor abilities during ontogenetic development in Lurcher mutant mice. *Neuroscience* 2010, 168:646-651.
141. Marmolino D, Manto M, Acquaviva F, Vergara P, Ravella A, Monticelli A, Pandolfo M: PGC-1 alpha down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia. *PLoS One* 2010, 5:e10025.
142. Marr D: A theory of cerebellar cortex. *J Physiol* 1969, 202:437-470.
143. Marshak TL, Mares V, Pavlik A: The effect of methylazoxymethanol on neuronal differentiation in the murine cerebellum. *Ontogenes* 1993, 24(2):62-9.
144. Martins CR Jr, Martinez ARM, de Rezende TJR, Branco LMT, Pedroso JL, Barsottini OGP, Lopes-Cendes I, Franca MC Jr: Spinal Cord Damage in Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Cerebellum* 2017, 16:792-796.

145. Matsuda S, Yuzaki M: Mutation in hotfoot-4J mice results in retention of delta2 glutamate receptors in ER. *Eur J Neurosci* 2002, 16:1507-1516.
146. Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H: Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cerebellar Pathology in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Cerebellum* 2013, 13: 323-330.
147. Maue RA, Burgess RW, Wang B, Wooley CM, Seburn KL, Vanier MT, Rogers MA, Chang CC, Chang TY, Harris BT, Graber DJ, Penatti CA, Porter DM, Szwergold BS, Henderson LP, Totenhagen JW, Trouard TP, Borbon IA, Erickson RP: A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc 1 mutation comparable to commonly observed human mutations. *Hum Mol Genet* 2012, 21:730-750.
148. McFarland R, Blokhin A, Sydnor J, Mariani J, Vogel MW: Oxidative stress, nitric oxide, and the mechanisms of cell death in Lurcher Purkinje cells. *Dev Neurobiol* 2007, 67, 1032-1046.
149. Mitoma H, Manto M: The physiological basis of therapies for cerebellar ataxias. *Ther Adv Neurol Disord* 2016, 9:396-413.
150. Miyai I, Ito M, Hattori N, et al: Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases. *Neurorehabil Neural Repair* 2012, 26:515–522.
151. Monnier C, Lalonde R: Elevated +-maze and hole-board exploration in Lurcher mutant mice. *Brain Res* 1995, 702:169-172.
152. Mouton P. Unbiased Stereology: a concise guide. Baltimore: JHU Press; 2011.
153. Mugnaini E, Floris A: The unipolar brush cell: a neglect neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 1994, 339:174-180.
154. Mullen RJ, Eicher EM, Sidman RL: Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976, 73(1): 212.
155. Mullen RJ, LaVail MM: Two types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. *Nature* 1975, 258(5535): 528-530.
156. Nishiyama J, Matsuda K, Kakegawa W, Yamada N, Motohashi J, Mizushima N, Yuzaki M: Reevaluation of neurodegeneration in Lurcher mice: constitutive ion fluxes cause cell death with, not by, autophagy. *J Neurosci* 2010, 30:2177-2187.
157. Nishiyama J, Yuzaki M: Excitotoxicity and autophagy: lurcher may not be a model of „autophagic cell death“. *Autophagy* 2010, 6:568-570.
158. Nobrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, Albuquerque D, Hirai H, Deglon N, de Almeida LP: Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. *PLoS One* 2013, 8:e52396.

159. Nolan PM, Peters J, Strivens M, Rogers D, Hagan J, Spurr N, Gray IC, Vizor L, Brooker D, Whitehill E, Washbourne R, Hough T, Greenaway S, Hewitt M, Liu X, McCormack S, Pickford K, Selley R, Wells C, Tymowska-Lalanne Z, Roby P, Glenister P, Thornton C, Thaug C, Stevenson JA, Arkell R, Mburu P, Hardisty R, Kiernan A, Erven A, Steel KP, Voegeling S, Guenet JL, Nickols C, Sadri R, Nasse M, Isaacs A, Davies K, Browne M, Fisher EM, Martin J, Rastan S, Brown SD, Hunter J: A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat Genet* 2000, 25:440-443.
160. Norman DJ, Feng L, Cheng SS, Gubbay J, Chan E, Heintz N: The *lurcher* gene induces apoptotic death in cerebellar Purkinje cells. *Development* 1995, 121:1183–1193.
161. O’Gorman S, Sidman RL: Degeneration of thalamic neurons in “Purkinje cell degeneration” mutant mice. Distribution of neuron loss. *J Comp Neurol* 1985, 234:277-297.
162. Patil N, Cox DR, Bhat D, Faham M, Myers RM, Peterson AS: A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet* 1995, 11:126-129.
163. Phillips RJS: „Lurcher“, new gene in linkage group XI of the house mouse. *J Genet* 1960, 57:35-42.
164. Pedroso JL, Braga-Neto P, Escorcio-Bezerra ML, Abrahao A, de Albuquerque MV, Filho FM, de Souza PV, de Rezende Pinto WB, Borges FR Jr, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB, Barsottini OG: Non-motor and Extracerebellar Features in Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Cerebellum* 2017, 16:34-39.
165. Pekar S, Brabec M: Marginal models via GLS: a convenient yet neglected tool for the analysis of correlated data in the behavioural sciences. *Ethology* 2016, 122:621-31.
166. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. 2014. <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>.
167. Porrás-García E, Cendelin J, Domínguez-del-Toro E, Vožeh F, Delgado-García JM: Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lurcher mice. *Eur J Neurosci* 2005, 21(4): 979-88.
168. Porrás-García E, Sánchez-Campusano R, Martínez-Vargas D, Domínguez-del-Toro E, Cendelin J, Vožeh F, Delgado-García JM: Behavioral characteristics, associative learning capabilities, and dynamic association mapping in an animal model of cerebellar degeneration. *J Neurophysiol* 2010, 104(1):346-65.

169. Purkartova Z, Tuma J, Pesta M, Kulda V, Hajkova L, Sebesta O, Vozeh F, Cendelin J: Morphological analysis of embryonic cerebellar grafts in SCA2 mice. *Neuroscience Letters* 2014, 558:154-158.
170. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2017. <http://www.R-project.org/>.
171. Rakic P, Sidman RL: Weaver mutant mouse cerebellum: defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973, 70:240-244.
172. Resibois A, Cuvelier L, Goffinet AM: Abnormalities in the cerebellum and brainstem in homozygous Lurcher mice. *Neuroscience* 1997, 80(1): 175-190.
173. Ries O, Laccone FA, Gispert S, Schols L, Zuhlke C, Vieira-Saecker AM, Herlt S, Wessel K, Epplen JT, Weber BH, Kreuz F, Chahrokh-Zadeh S, Meindl A, Lunkes A, Aguiar J, Macek M Jr, Krebsova A, Macek M Sr, Burk K, Tinschert S, Schreyer I, Pulst SM, Auburger G: SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients. *Neurogenetics* 1997, 1:59-64.
174. Rossi F, Cattaneo E: Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* 2002, 3:401-409.
175. Sahin M, Hockfiel S: Molecular identification of the Lugaro cell in the cat cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 1990, 301:575-584.
176. Sidman RL, Lane PW, Dickie MM: Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 1962, 137:610-612.
177. Sidman RL, Li J, Stewart GR, Clarke J, Yang W, Snyder EY, Shihabuddin LS: Injection of mouse and human neural stem cells into neonatal Niemann-Pick A model mice. *Brain Res* 2007, 1140:195-204.
178. Schmahmann JD: Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2004, 16(3): 367-378.
179. Schmahmann JD, Sherman JC: The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 1998, 121(4): 561-579.
180. Schmidt MJ, Sawyer BD, Perry KW, Fuller RW, Foreman MM, Ghetti B: Dopamine deficiency in the weaver mutant mouse. *J Neurosci* 1982, 2:376-380.
181. Schulz JB, Boesch S, Burk K, Durr A, Giunti P, Mariotti C, Pousset F, Schols L, Vankan P, Pandolfo M: Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective. *Nat Rev Neurol* 2009, 5:222-234.

182. Solovei I, Grandi N, Knoth R, Volk B, Cremer T: Positional changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development. *Cytogenet Genome Res* 2004, 105:302 – 310.
183. Sotelo C, Alvarado-Mallart RM: Growth and differentiation of cerebellar suspensions transplanted into the adult cerebellum of mice with hereditary degenerative ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83:1135-1139.
184. Sotelo C, Alvarado-Mallart RM: Embryonic and adult neurons interact to allow Purkinje cell replacement in mutant cerebellum. *Nature* 1987a, 327:421-423.
185. Sotelo C, Alvarado-Mallart RM: Cerebellar transplantations in adult mice with hereditary degenerative ataxia. *Ann N Y Acad Sci* 1987b, 495:242-267.
186. Sotelo C, Alvarado-Mallart RM: Reconstruction of the defective cerebellar circuitry in adult Purkinje cell degeneration mutant mice by Purkinje cell replacement through transplantation of solid embryonic implants. *Neuroscience* 1987c, 20:1-22.
187. Sotelo C, Alvarado-Mallart RM: The reconstruction of cerebellar circuits. *Trends Neurosci* 1991, 14:350-355.
188. Sotello C, Triller A: Fate of presynaptic afferents to Purkinje cells in the adult nervous mutant mouse: a model to study presynaptic stabilization. *Brain Res* 1979, 175(1): 11-36.
189. Strazielle C, Deiss V, Naudon L, Raisman-Vozari, R, Lalonde, R: Regional brain variations of cytochrome oxidase activity and motor coordination in Girk2 (Wv) (Weaver) mutant mice. *Neuroscience* 2006, 142(2): 437-49.
190. Sultan F, König T, Möck M, Thier P: Quantitative organization of neurotransmitters in the deep cerebellar nuclei of the Lurcher mutant. *J Comp Neurol* 2002, 452:311-323
191. Swisher DA, Wilson DB: Cerebellar histogenesis in the lurcher (Lc) mutant mouse. *J Comp Neurol* 1977, 173:205-218.
192. Takayama H, Kohsaka S, Shinozaki T, Inoue H, Toya S, Ueda T, Tsukada Y: Immunohistochemical studies on synapse formation by embryonic cerebellar tissue transplanted into the cerebellum of the weaver mutant mouse. *Neurosci Lett* 1987, 79:246-50.
193. Takayama H, Toya S, Shinozaki T, Inoue H, Otani M, Kohsaka S, Tsukada Y: Possible synapse formation by embryonic cerebellar tissue grafted into the cerebellum of the weaver mutant mouse. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1988, 43:154-8.
194. Taroni F, Chiapparini L, Mariotti C: Autosomal dominant spinocerebellar ataxias and episodic ataxias. In: Manto M, Gruol DL, Schmähmann JD, Koibuchi N, Rossi F (ed.):

- Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders. New York: Springer Science+Business Media, 2013, s. 2193-2267.
195. Teive HA, Moro A, Moscovich M, Arruda WO, Munhoz RP, Raskin S, Ashizawa T: Ataxia-teleangiectasia – A historical review and a proposal for a new designation: ATM syndrome. *J Neurol Sci* 2015, 355:3-6.
 196. Thullier F, Lalonde R, Cousin X, Lestienne F: Neurobehavioral evaluation of lurcher mutant mice during ontogeny. *Dev Brain Res* 1997, 100(1): 22-28.
 197. Tomey DA, Heckroth JA: Transplantation of normal embryonic cerebellar cell suspensions into the cerebellum of lurcher mutant mice. *Exp Neurol* 1993, 122:165-170.
 198. Triarhou LC: Biological clues on neuronal degeneration based on theoretical fits of decay patterns: towards a mathematical neuropathology. *Folia Neuropathol* 2010, 48:3-10.
 199. Triarhou LC, Low WC, Ghetti B: Intraparenchymal rafting of cerebellar cell suspensions to the deep cerebellar nuclei of pcd mutant mice, with particular emphasis on re-establishment of a Purkinje cell cortico-nuclear projection. *Anat Embryol (Berl)* 1992, 185(5):409-20.
 200. Triarhou LC, Zhang W, Lee WH: Graft-induced restoration of function in hereditary cerebellar ataxia. *Neuroreport* 1995, 6:1827-1832.
 201. Triarhou LC, Zhang W, Lee WH: Amelioration of the behavioral phenotype in genetically ataxic mice through bilateral intracerebellar grafting of fetal Purkinje cells. *Cell Transplant* 1996;5:269-277.
 202. Tuma J, Cendelin J, Vozeh F: Maternal infanticide and low maternal ability in cerebellar mutants Lurcher. *Neuro Endocrinol Lett* 2013, 34:101-106.
 203. Tuma J, Kolinko Y, Jelinkova D, Hilber P, Cendelin J: Impaired spatial performance in cerebellar-deficient Lurcher mice is not associated with their abnormal stress response. *Neurobiol Learn Mem* 2017 Apr, 140:62-70.
 204. van Dun K, Bodranghien F, Manto M, Marien P: Targeting the Cerebellum by Noninvasive Neurostimulation: a Review. *Cerebellum* 2017, 16:695-741.
 205. Verbeek DS, van de Warrenburg BP, Wesseling P, Pearson PL, Kremer HP, Sinke RJ: Mapping of the SCA23 locus involved in autosomal dominant cerebellar ataxia to chromosome region 20p13-12.3. *Brain* 2004, 127: 2551-2557.
 206. Vernet-der Garabedian B, Lemaigre-Dubreuil Y, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J: Abnormal IL-1beta cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and lurcher. *Brain Res Mol Brain Res* 1998, 62:224-7.

207. Vogel MW, Caston J, Yuzaki M, Mariani J: The Lurcher mouse: Fresh insight form an old mutant. *Brain Res* 2007, 1140: 4-18.
208. Vozech F, Cendelin J, Yamamotoová A, Rokyta R: CNS excitability and pain perception in two strains of mice afflicted with the some type of cerebellar degeneration (Lurcher mutants). *Homeostasis* 2001b, 41(5): 196–199.
209. Wang QJ, Ding Y, Kohtz DS, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, Chait BT, Zhong Y, Heintz MP, Yue Z: Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* 2006, 26:8057-8068.
210. Wang Z, Gardell LR, Ossipov MH, Vanderah TW, Brennan MB, Hochgeschwender U, Hruby VJ, Malan TP Jr, Lai J, Porreca F: Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J Neurosci* 2001, 21:1779-1786.
211. Watanabe H, Mizoguchi H, Verbeek DS, Kuzmin A, Nyberg F, Krishtal O, Sakurada S, Bakalkin G: Non-opioid nociceptive activity of human dynorphin mutants that cause neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *Peptides* 2012, 35:306-310.
212. Watase K, Barrett CF, Miyazaki T, Ishiguro T, Ishikawa K, Hu Y, Unno T, Sun Y, Kasai S, Watanabe M, Gomez CM, Mizusawa H, Tsien RW, Zoghbi HY: Spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant CaV2.1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:11987-11992.
213. Wassef M, Sotelo C, Cholley B, Brehier A, Thomasset M: Cerebellar mutations affecting the postnatal survival of Purkinje cells in the mouse disclose a longitudinal pattern of differentially sensitive cells. *Dev Biol* 1987, 124(2): 379-389.
214. Watson LM, Wong MMK, Vowles J, Cowley SA, Becker EBE: A Simplified Method for Generating Purkinje Cells from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Cerebellum* 2018 Aug;17(4):419-427.
215. Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM: Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* 2003, 5:959-66.
216. Wetts R, Herrup K: Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in Lurcher chimaeric mice. I. Qualitative studies. *J Embryol Exp Morph* 1982a, 68: 87-98.
217. Wetts R, Herrup K: Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in Lurcher chimeric mice. II. Granule cell death. *Brain Res* 1982b, 250(2): 358–362.
218. Yamada M, Sato T, Tsuji S, Takahashi H: CAG repeat disorder models and humen neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008, 115:71-86.

219. Yue Z, Horton A, Bravin M, De Jager PL, Selimi F, Heintz N: A novel protein complex linking the $\delta 2$ glutamate receptor and autophagy: Implications for neurodegeneration in Lurcher mice. *Neuron* 2002, 35:921-933.
220. Yvert G, Lindenberg KS, Picaud S, Landwehrmeyer GB, Sahel JA, Mandel JL: Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Hum Mol Genet* 2000, 9:2491-2506.
221. Zanjani H, Herrup K, Mariani J: Cell number in the inferior olive of nervous and leaner mutant mice. *J Neurogenet* 2004, 18:327-339.
222. Zanjani SH, Selimi F, Vogel MW, Haeberlé AM, Boeuf J, Mariani J, Bailly YJ: Survival of interneurons and parallel fiber synapses in a cerebellar cortex deprived of Purkinje cells: studies in the double mutant mouse Grid2Lc/+;Bax(-/-). *J Comp Neurol* 2006, 497(4):622-35.
223. Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 1997, 15:62-69.
224. Ziegel J, Jensen EBV, Dorph-Petersen KA: Variance estimation for generalized Cavalieri estimators. *Biometrika* 2011, 98:187-198.
225. Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ, Heintz N: Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 1997, 388:769-773.

13. PŘÍLOHY: PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI