

PATOFYZIOLOGIE GLIOVÝCH BUNĚK

Typy gliových buněk - funkce astrocytů, NG2 gliových buněk, oligodendrocytů a mikroglíí v CNS, úloha gliových buněk v průběhu patologických stavů CNS: trauma, ischemie, Alzheimerova choroba - cytotoxický edém mozku a objemové změny astrocytů - reaktivní glióza a změny morfologie a exprese genů u gliových buněk, gliové buňky a regenerace poškozené nervové tkáně.

PATOFYZIOLOGIE GLIOVÝCH BUNĚK

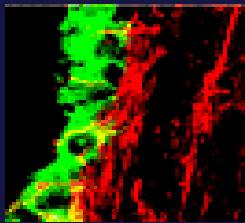
Ing. Miroslava Anděrová, CSc

Gliové buňky (neuroglia)

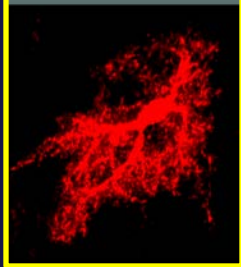
CNS_

PNS

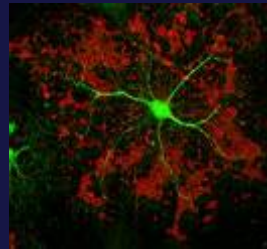
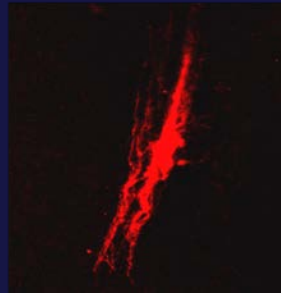
Ependymové
buňky



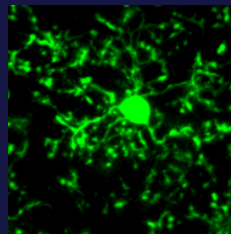
Astrocyty



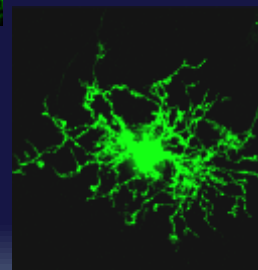
Oligodendrocyty



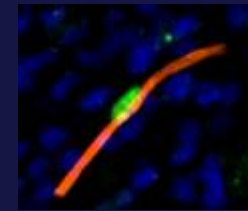
Mikroglie =
Hortegovy
glie



NG2-gliové
buňky



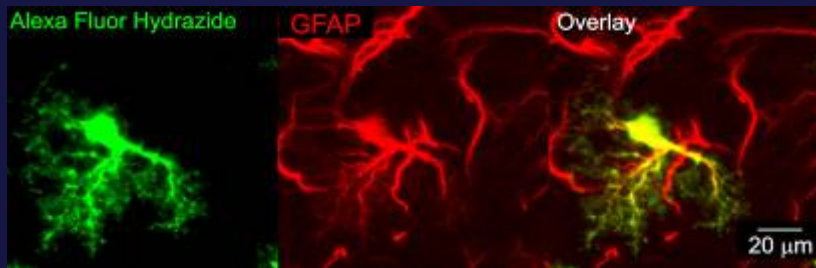
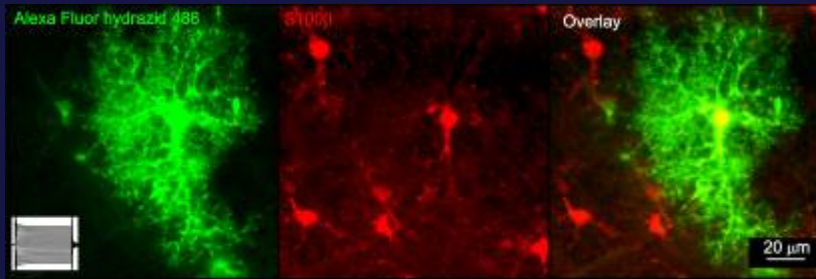
Schwannovy
buňky



Gangliové
(satelitní)
buňky =
amficyty

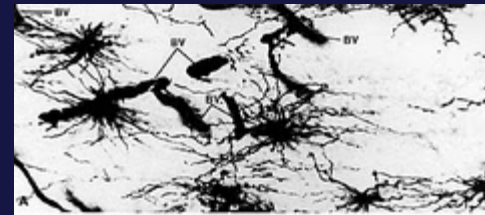
Funkce gliových buněk

Astrocyty



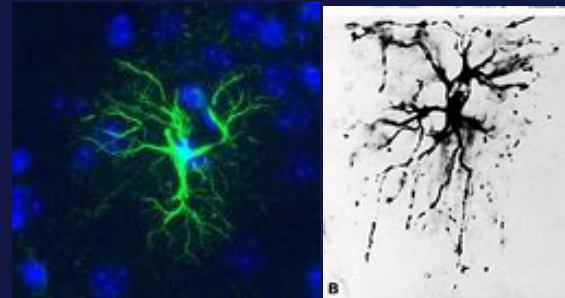
**hvězdicovité buňky s dlouhými výběžky.
výběžky naléhají na stěnu kapiláry a dotýkají
se neuronů**

- fibrilární astrocyty v bílé hmotě



300 μm

- protoplazmatické astrocyty v šedé hmotě

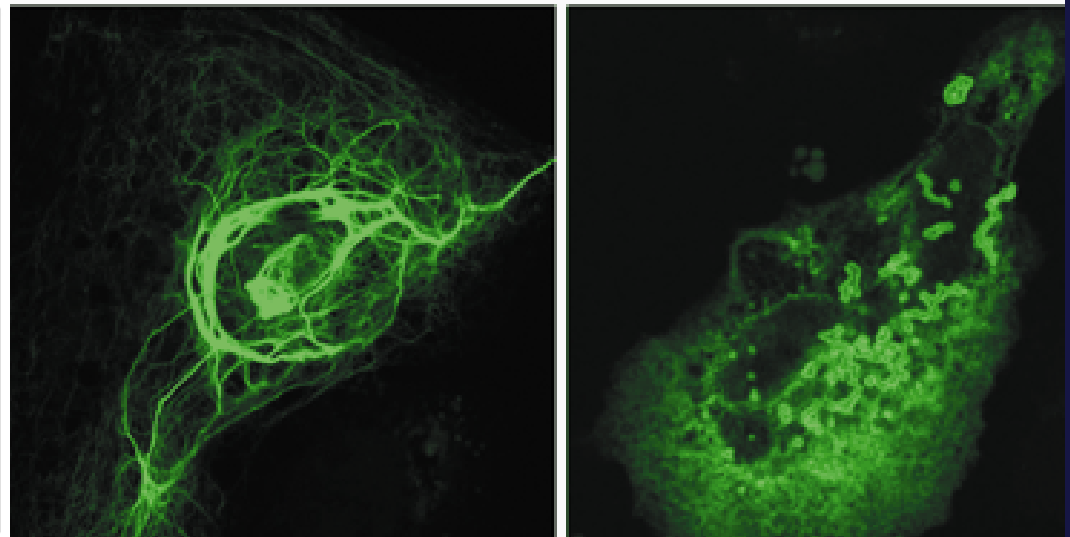
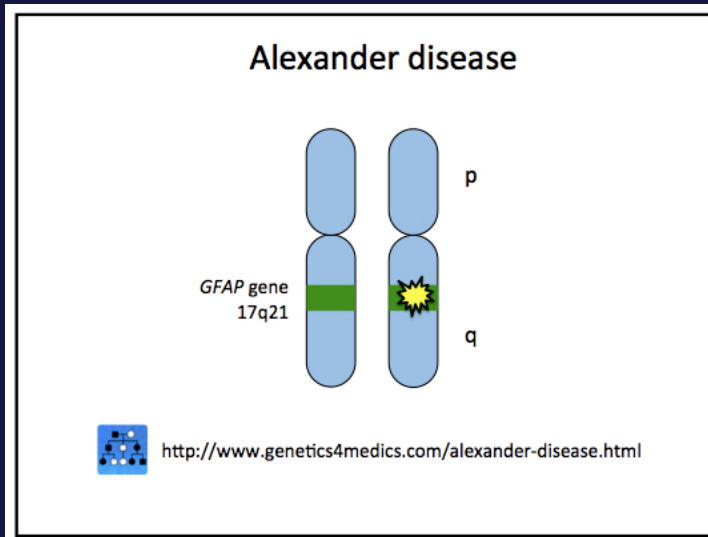


100 μm

Alexandrova choroba – jediná známá primární astrogliopatie

Heterozygotní mutace GFAP genu

GFAP tvoří cytoplasmatické inkluze
Asociace se stressovými proteiny
(beta-krystalin, heat shock proteiny)



Opožděný vývoj
Zvětšení (progresivní) - ruce
Záchvaty
Křeče
Zmatenost
Kognitivní Poruchy

Hsiao et al., Journal of Cell Science 118, 2057-2065 2005

Astrocyty

Základní funkce astrocytů v CNS

1. vývoj

-regulace neurogeneze a gliogeneze (NSCs)

2. strukturní

-tvoří mikroarchitekturu nervového systému

-tvoří syncytium

3. kontrolní

-regulace extracelulárních koncentrací iontů

-odstraňování neurotransmiterů z ECS

- homeostáza vody v CNS

-regulace pH

4. metabolická

-energetické substráty pro neurony

-odstraňování neuronálních metabolitů

5. signální

-modulace synaptického přenosu

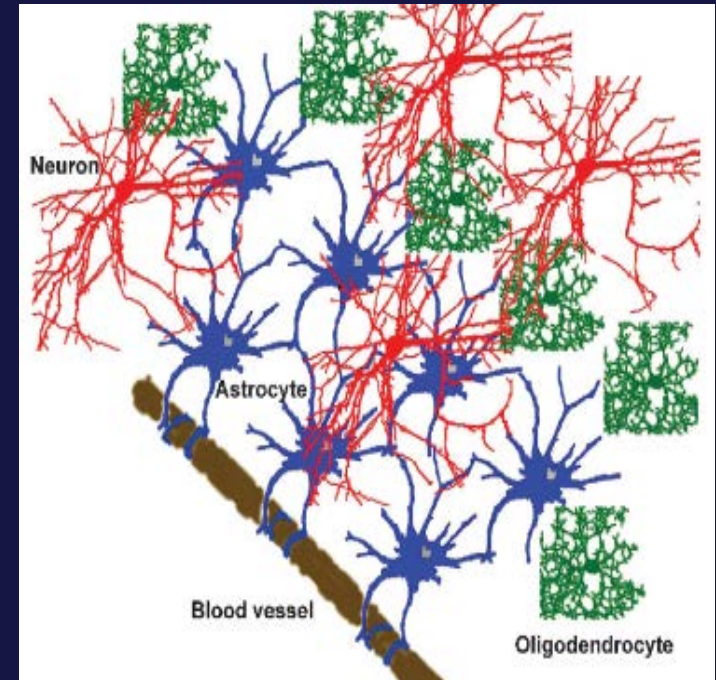
-uvolňování neurotransmiterů

-signalizace uvnitř syncytia

6. vaskulární

- součást BBB

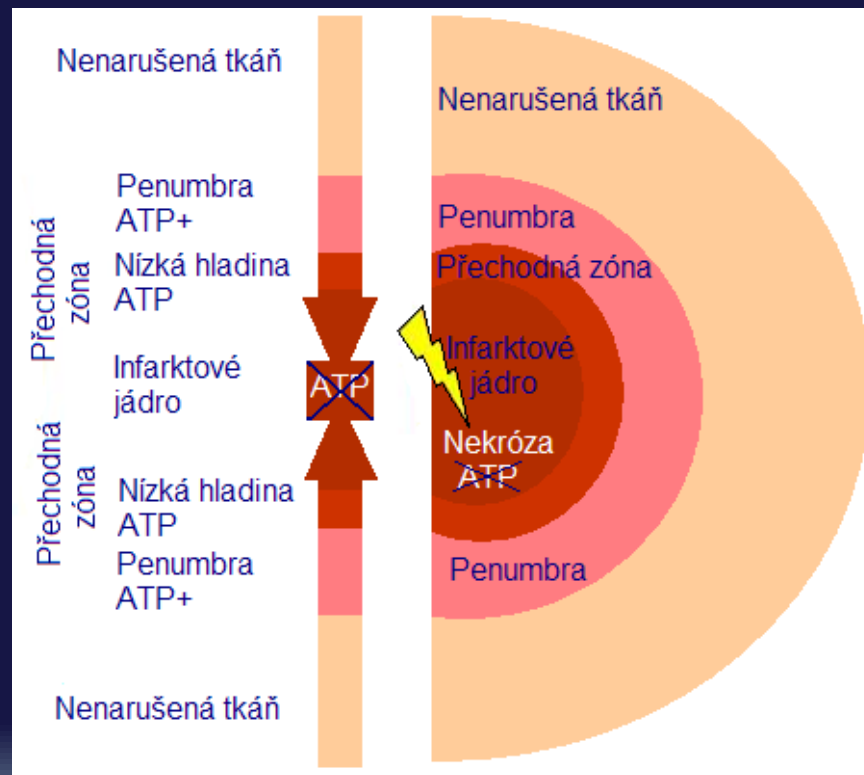
-regulace mikrocirkulace v mozku



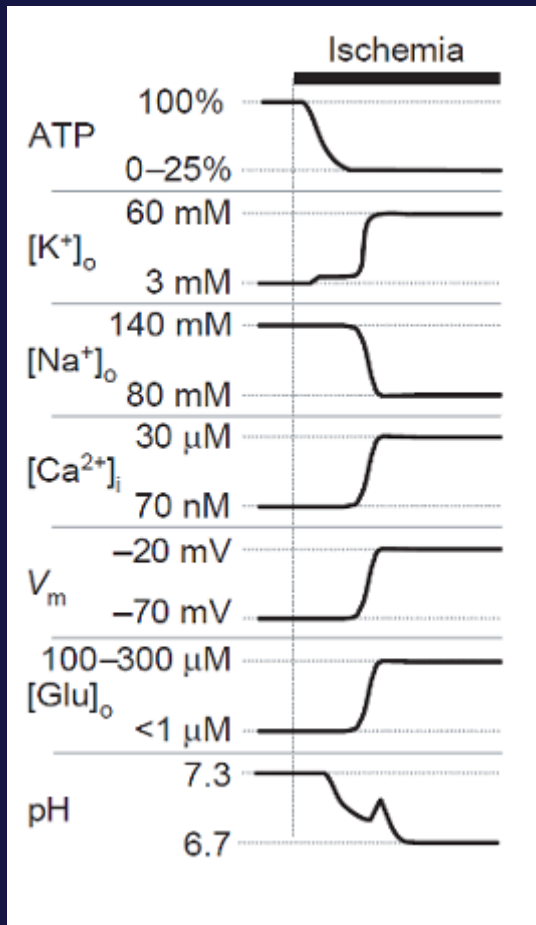
Cerebrální ischemie

Globalní cerebrální ischemie: dochází k redukci průtoku krve v celém mozku, většinou způsobena zástavou srdeční činnosti

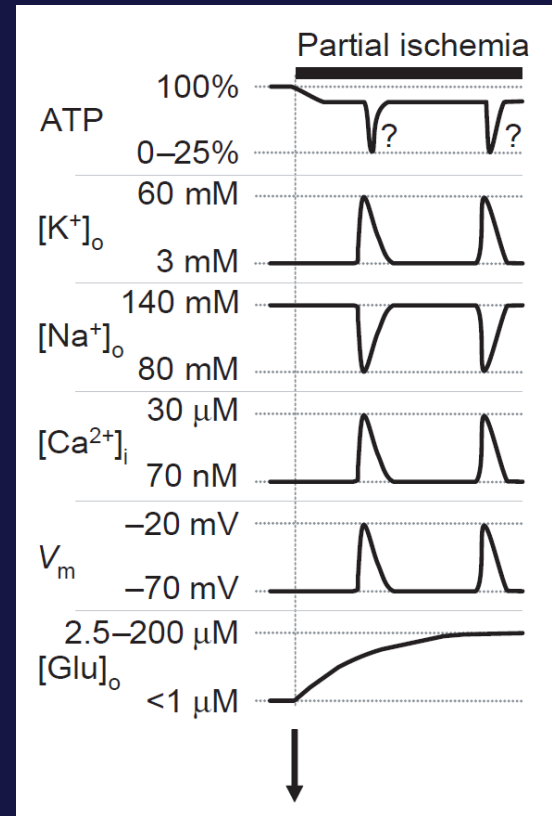
Fokální ischemie: dochází k okluzi cévy krevní sraženinou (trombóza) –redukce průtoku krve v určité oblasti mozku



Globální cerebrální ischemie
Fokální ischemie-jádro



Penumbra



Astrocyty

funkce v poškozené nervové tkáni

Positivní funkce:

- vychytávání glutamátu
- vychytávání K^+ iontů a jejich redistribuce (K^+ -uptake, K^+ spatial buffering)
- energetická zásobárna pro neurony glykogen
- anaerobní metabolismus za hypoxických podmínek – produkce laktátu, alaninu a a-ketoglutarátu
- odstraňování volných radikálů kyslíku - vysoké hladiny antioxidantů (askorbát, glutation)
- reaktivní astroglióza - chrání okolní tkáň
- Proliferace/neurogeneze sub-populace astrocytů-neurosféry

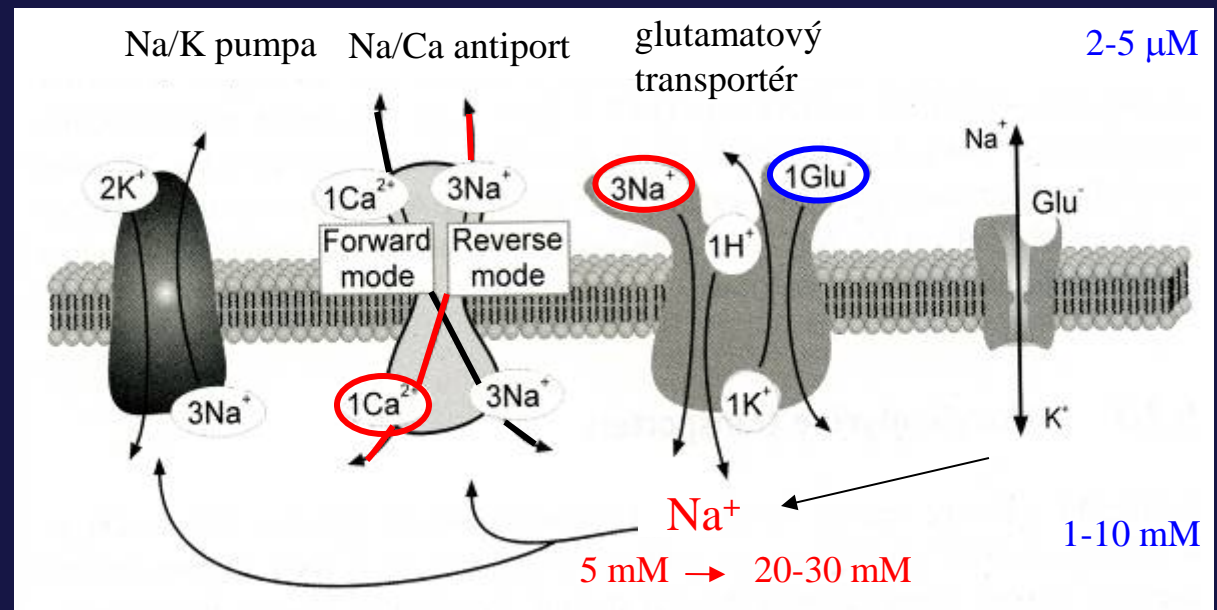
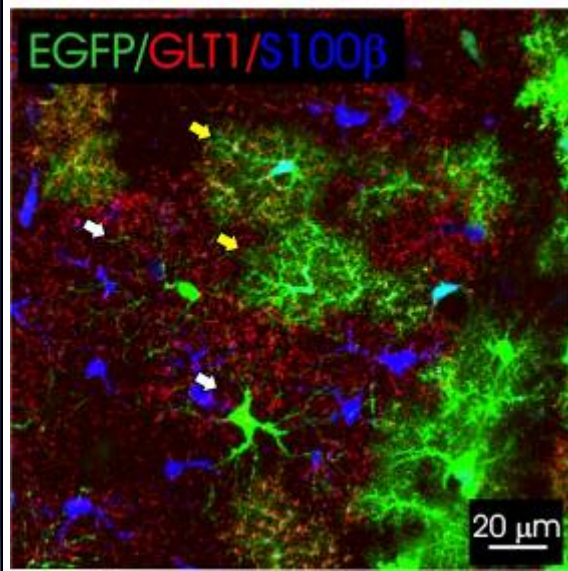
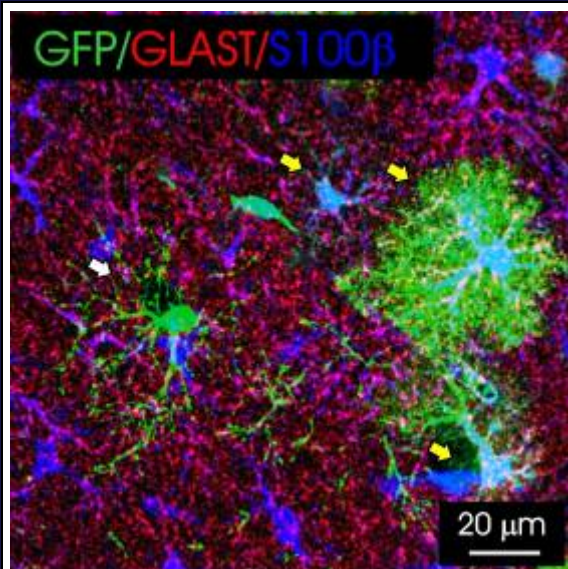
Negativní funkce:

- zvětšování objemu astrocytů - cytotoxický + vasogenní edém
- uvolňování neurotransmiterů - glutamátu, ATP, taurinu..
- Změny v extrasynaptickém přenosu v důsledku zmenšeného/zvětšeného ECS, morfologie astrocytů
- “Spreading depression” - šířící se deprese (opakující se depolarizační vlna doprovázená vysokými koncentracemi K^+ , která se šíří od rozhraní nekrotické oblasti přes penumbry)
- Ca^{2+} vlny – propagace poraněné nervové tkáně
- reaktivní astroglióza brání migraci buněk do místa poškození, limituje prorůstání a regeneraci axonů v poškozeném CNS

Astrocyty

-udržování fyziologických koncentrací glutamátu v extracelulárním prostoru

odstraňování glutamátu transportéry EAAT1 (GLAST) a EAAT2 (GLT1)

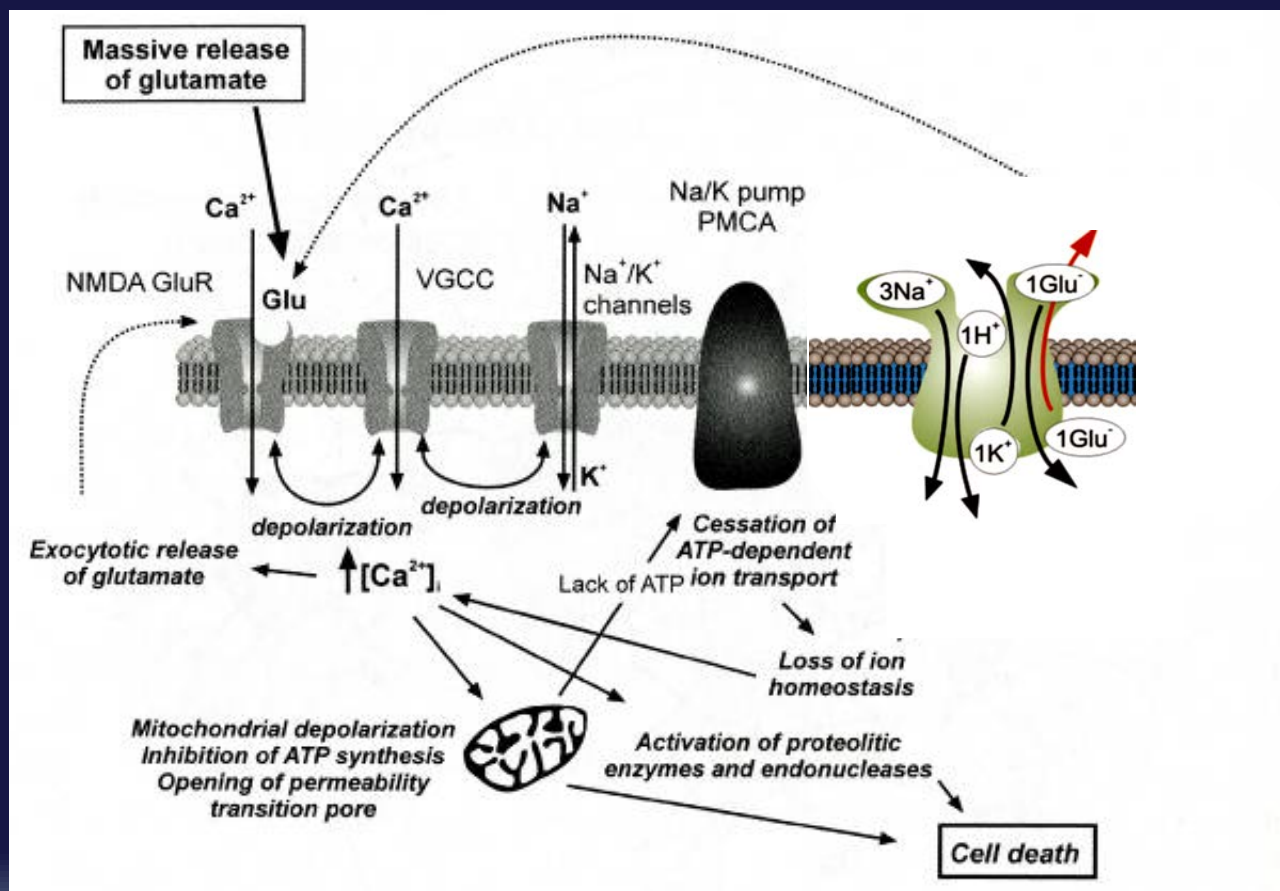


Verkhratsky a Butt, *Glial Neurobiology*, 2007

Obrácené fungování glutamátového transportéru v ischemii: glutamát je uvolňován do extracelulárního prostoru

Astrocyty přispívají k dalšímu poškození nervové tkáně

- excitotoxicita
- depolarizace buňkových membrán
- aktivace Na^+ a Ca^{2+} iontových kanálů
- akumulace Ca^{2+} v cytoplasmě a mitochondriích
- inhibice ATP syntézy v mitochondriích




buněčná smrt

Astrocyty

-udržování fyziologických koncentrací K^+ iontů v extracelulárním prostoru a K^+ redistribuce

Kotransportéry- NKCC1, KCC1

Na^+/K^+ pumpa

Fyziologické podmínky

2.5mM K^+

Neuronální aktivita

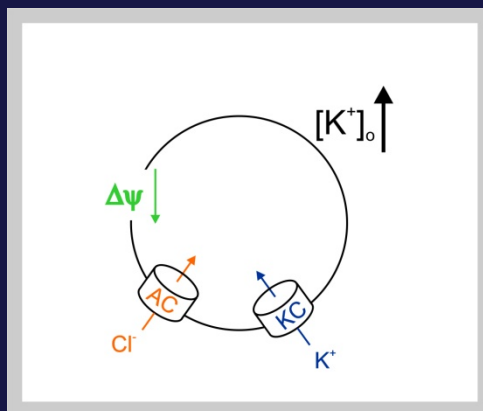
4-4.2 mM

Epilepsie

10-12 mM K^+

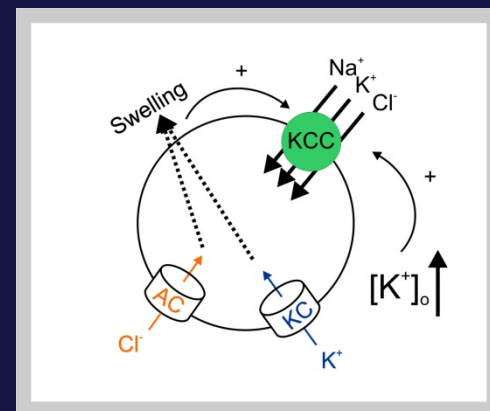
Ischemie/SD

60-70 mM K^+



Astrocytární
 Na^+/K^+ pumpa

Saturace 10-15 mM K^+



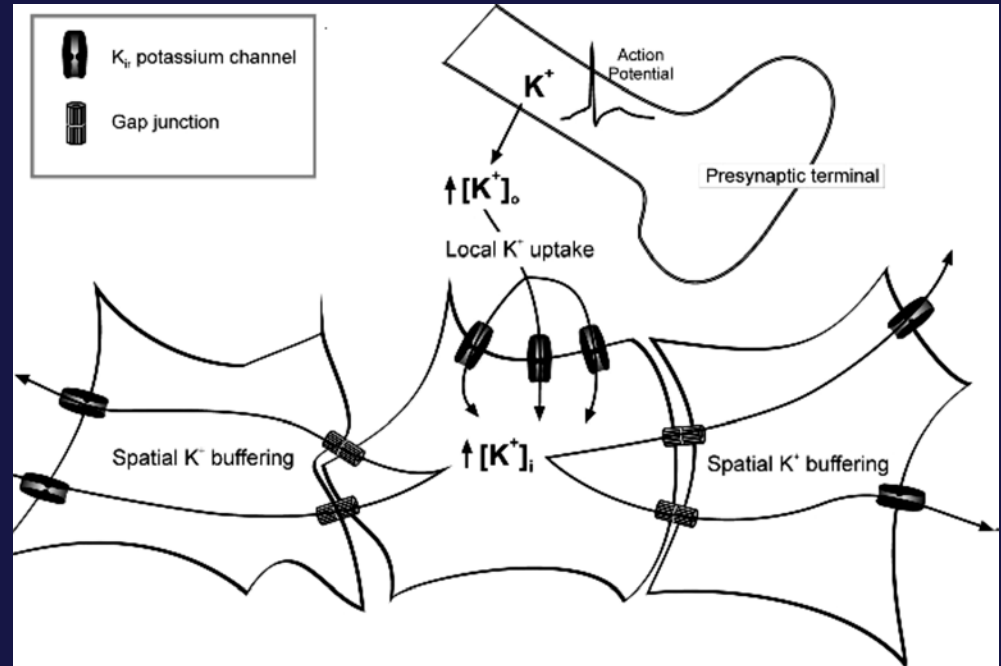
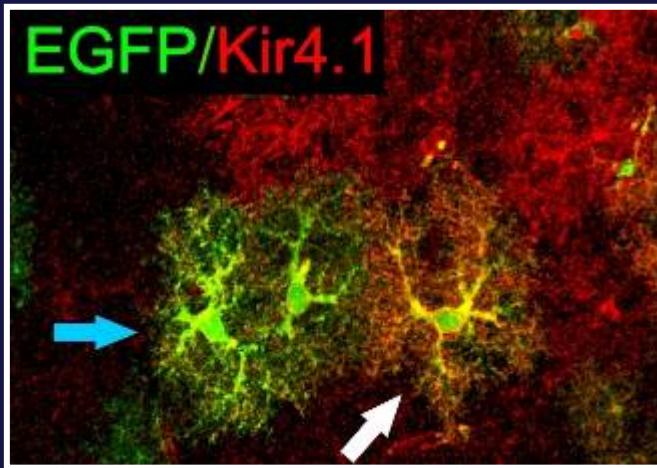
Na/K/Cl kotransport

+H₂O

zvětšování objemu astrocytů

Astrocyty

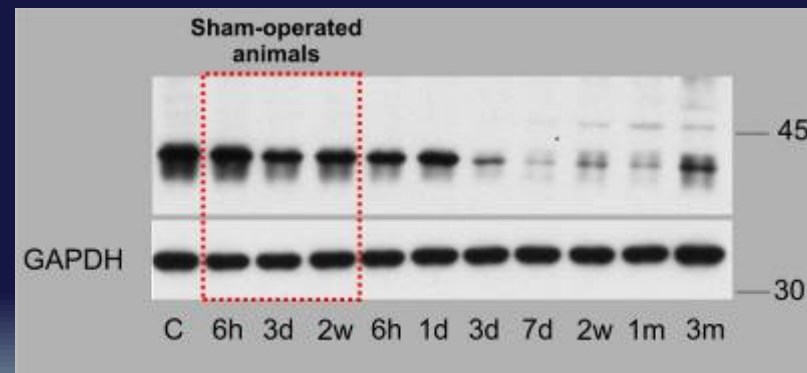
-udržování fyziologických koncentrací K^+ iontů v extracelulárním prostoru a K^+ redistribuce - K^+ iontové kanály



Verkhratsky a Butt, Glial Neurobiology, 2007

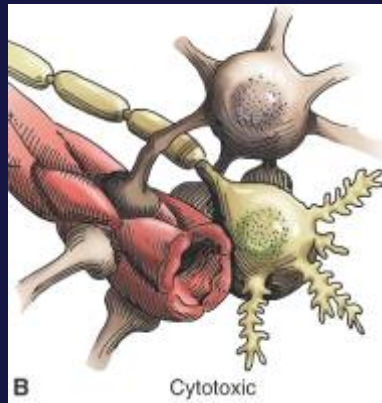
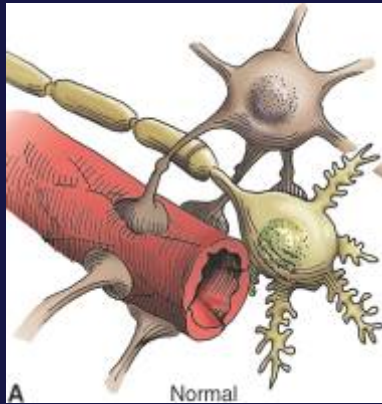
Fyziologické podmínky 2-2,5mM K^+
Zvýšená neuronální aktivita ~4.5 mM K^+

Epilepsie max 20 mM K^+
Ischemie ~70 mM K^+



Astrocyty

objemové změny astrocytů vyvolané patologický stavy CNS



Cytotoxický edém

Zvětšení objemu buněk
Gliové a endotelové buňky,
HEB neporušena



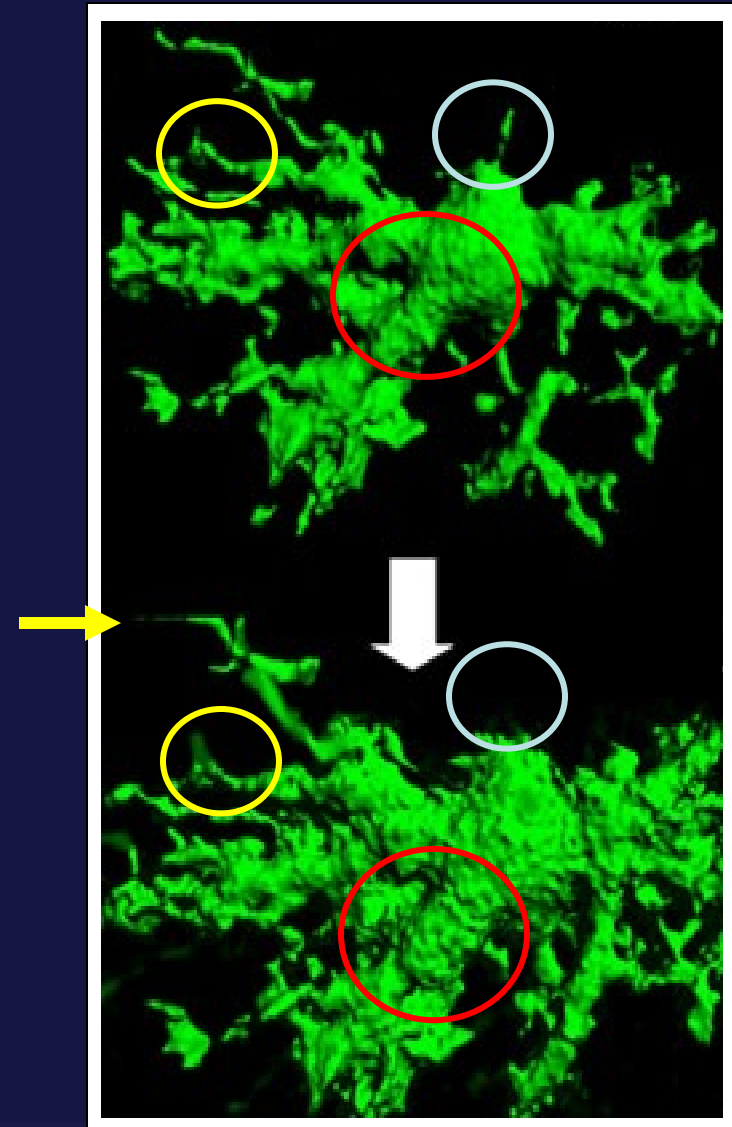
zmenšení extracelulárního
prostoru

Vasogenní edém

Porušení HEB -aktivita
matrix metaloproteináz
makromolekuly do ECP



zvětšení ECP



Následky zvětšování objemu astrocytů

- redukce extracelulárního prostoru
- snížený extrasynaptický přenos
- zvýšení extracelulárních koncentrací K^+ a glutamátu
- depolarizace neuronů
- buněčná smrt neuronů, oligodendrocytů
- stlačení cév-redukce průtoku krve
- aktivace iontových kanálů, které reagují na změnu objemu buňky
- další uvolnění glutamátu, ATP

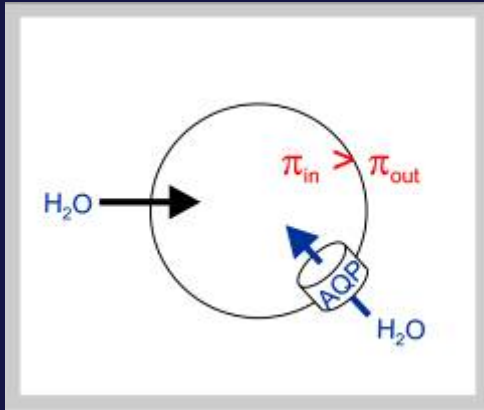
Ischemie

Trauma

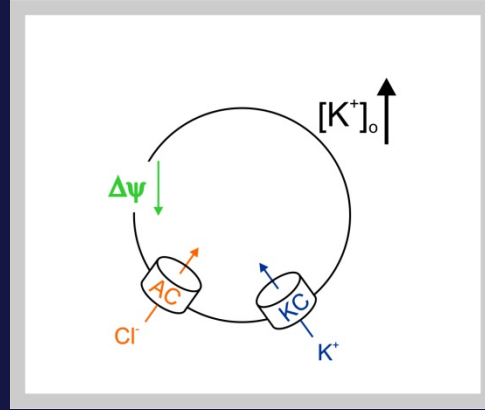
Selhání jater

Hyponatremie

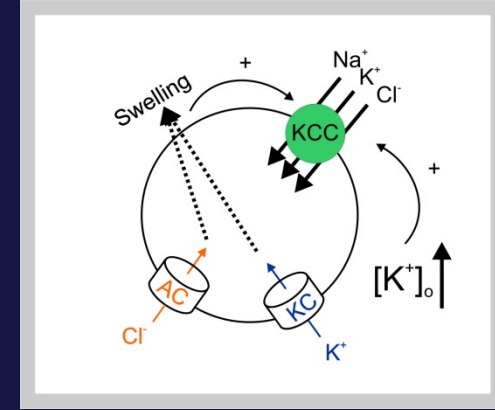
Hypotonický stres



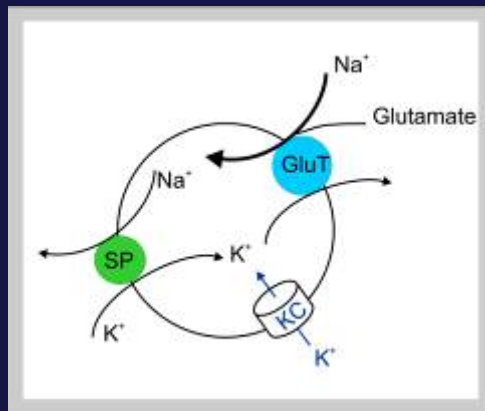
Extracelulární [K⁺]



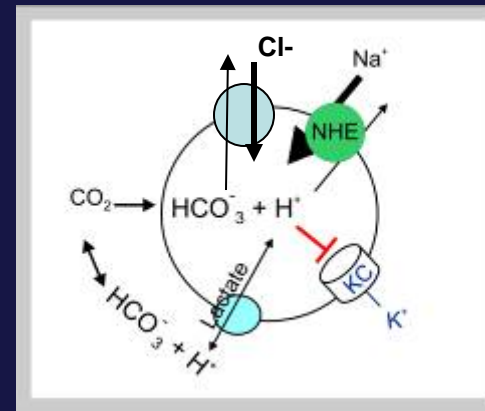
Depolarizace,
aktivace Cl-kanálů,
K⁺ akumulace



Glutamát



Acidifikace



1. Aktivace
antiportu
Na⁺/H⁺
Cl⁻/HCO₃⁻

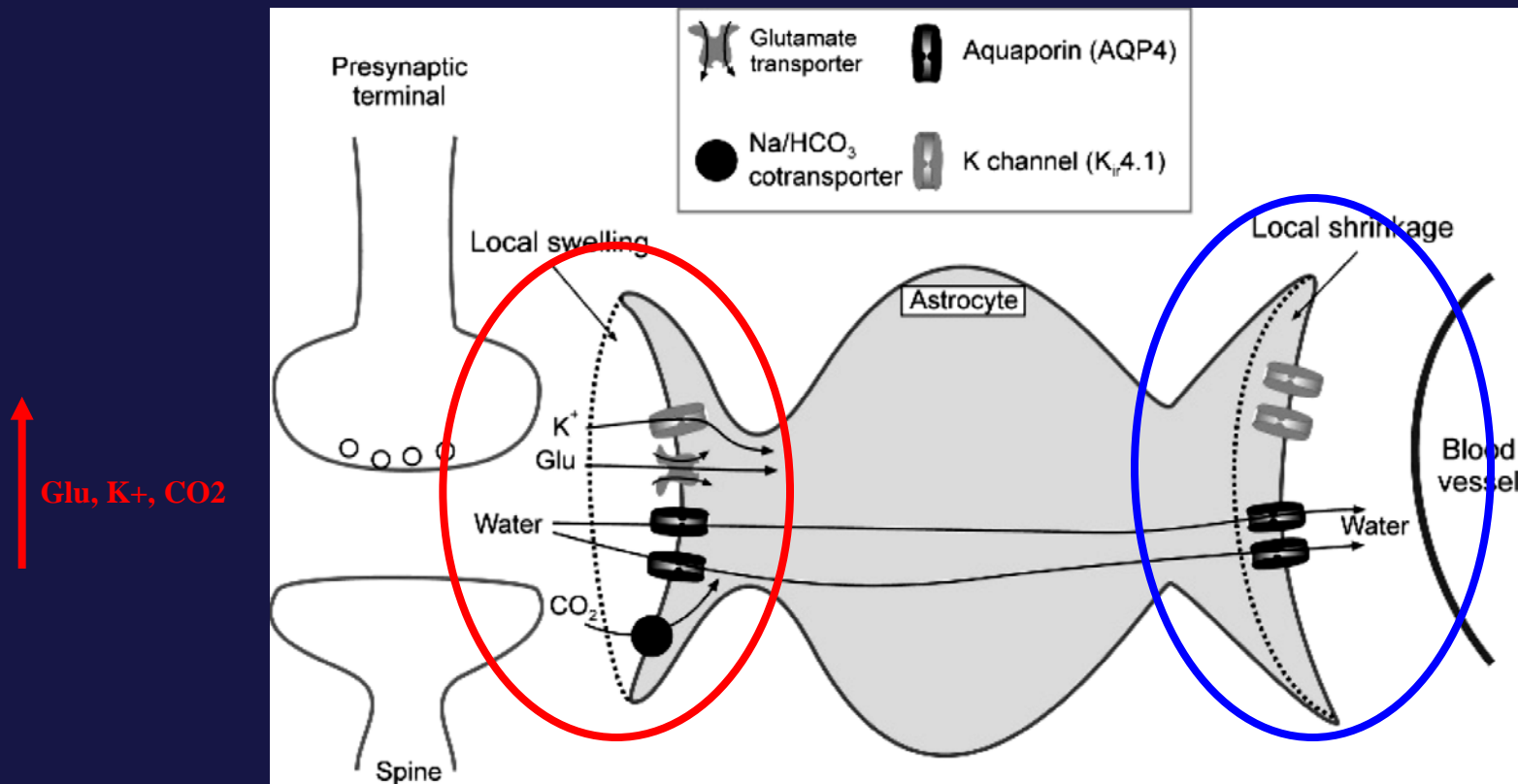
kotransport
Na⁺/HCO₃⁻

2. Inhibice K⁺ kanálů, akumulace K⁺,
inhibice RVD

Astrocyty

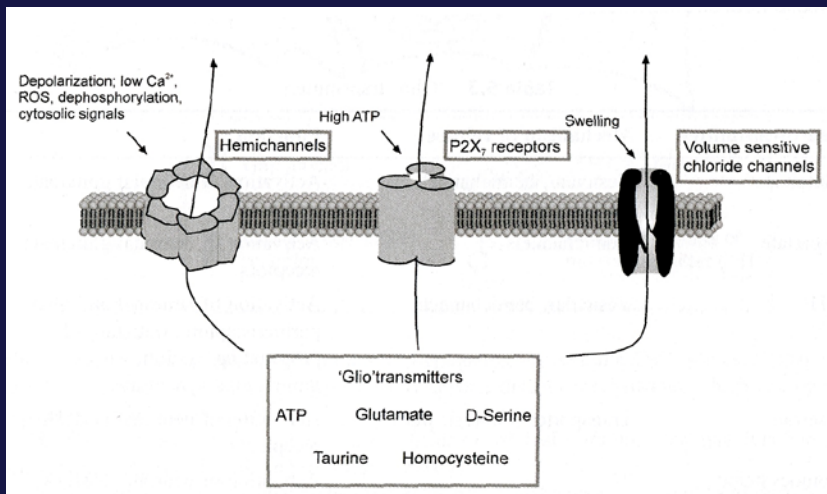
redistribuce vody a regulace ECP

AQP4 a Kir4.1 –kolokalizovány na membráně astrocytů

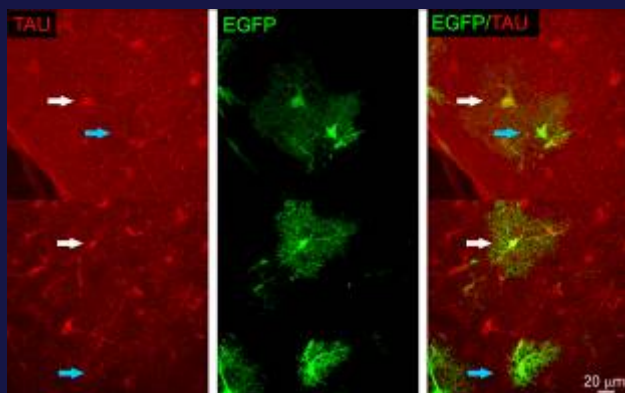


Astrocyty

Transport relativně velkých molecul, až 1kDa



Verkhatsky a Butt, *Glial Neurobiology*, 2007



odlišná schopnost astrocytů regulovat objem závisí i na intracelulární obsahu taurinu

uvolňování neurotransmiterů do extracelulárního prostoru - glutamát, aspartát, taurin, ATP

-**reverzně fungující transportéry** (i u oligodendrocytů) v důsledku zvýšených intracelulárních koncentrací Na⁺ a neurotransmiteru, + depolarizace (K⁺)

-**aniontové kanály** aktivované změnami objemu - Cl⁻

-**konexony** “hemichannels”

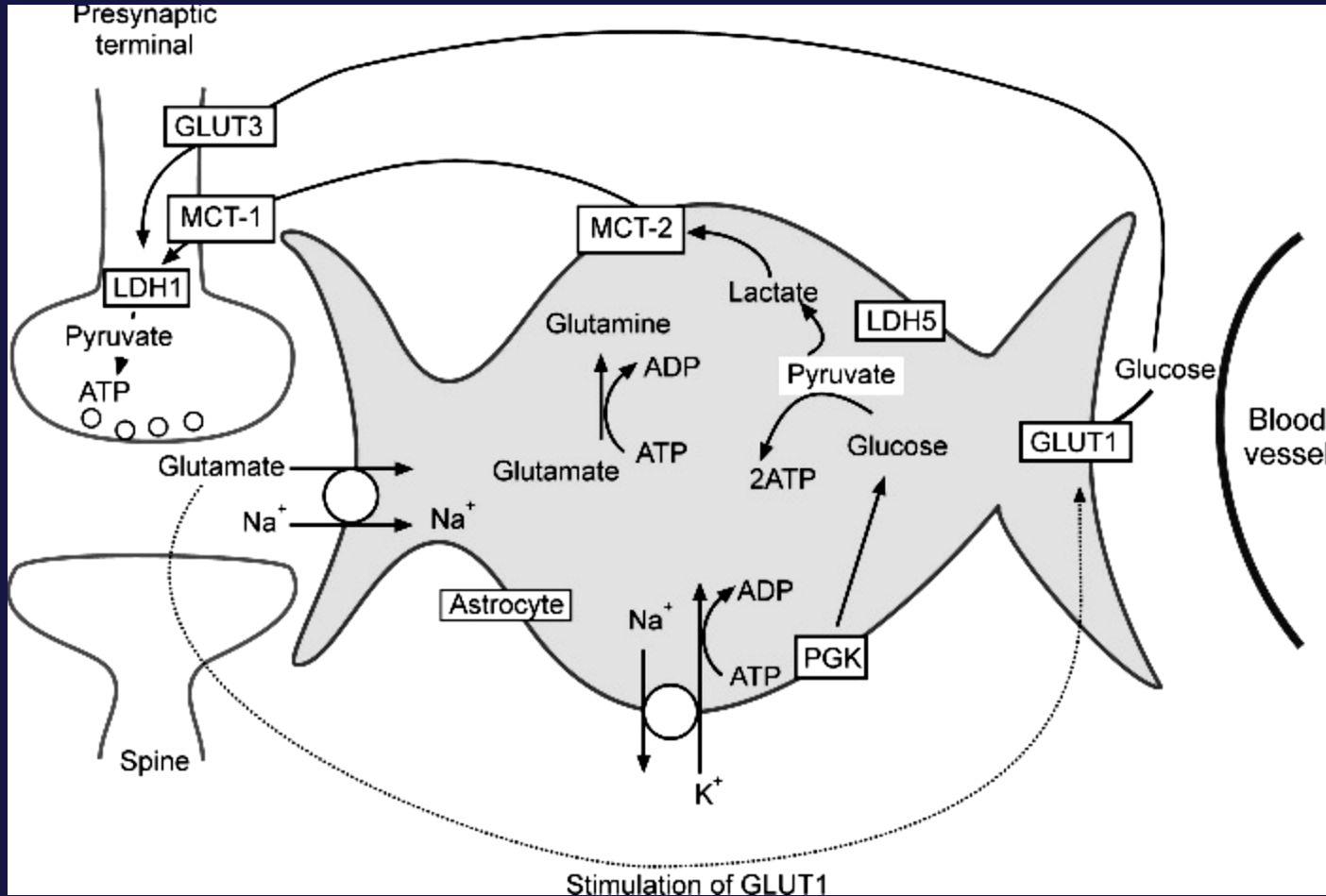
-**ionotropní purinergní receptory** -P2X₇

-**exocytóza** v důsledku zvýšené koncentrace Ca²⁺

Regulatory Volume decrease

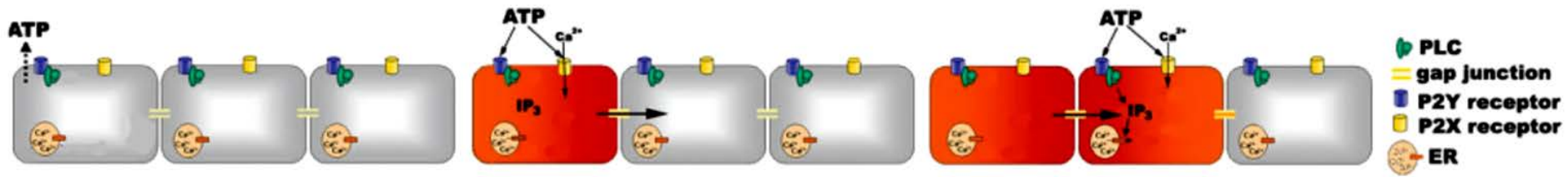
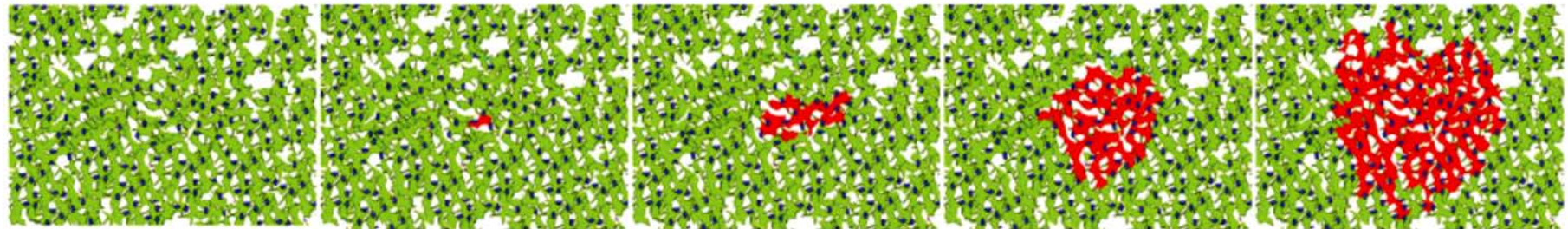
Astrocyty

-anaerobní metabolismus za hypoxických podmínek

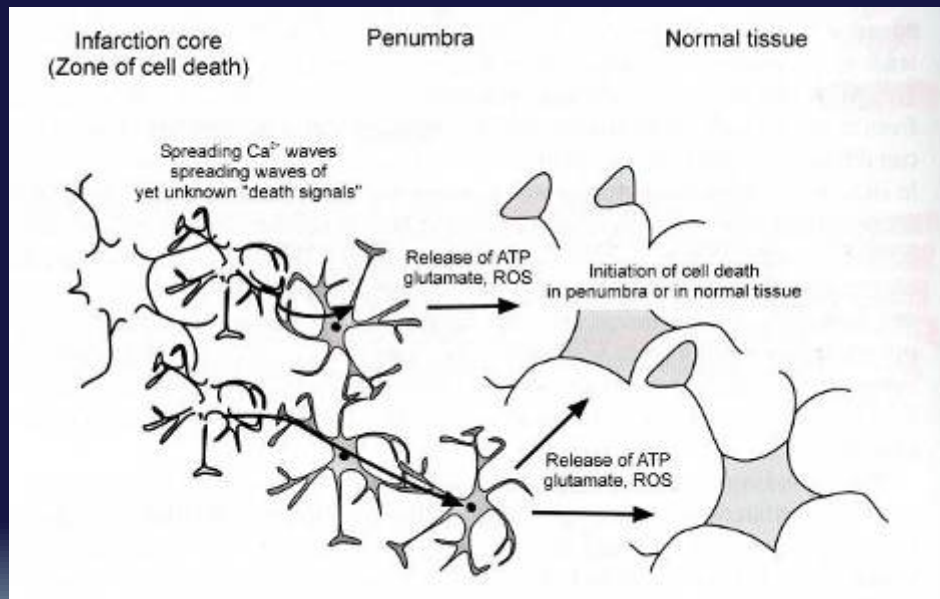


Astrocyty

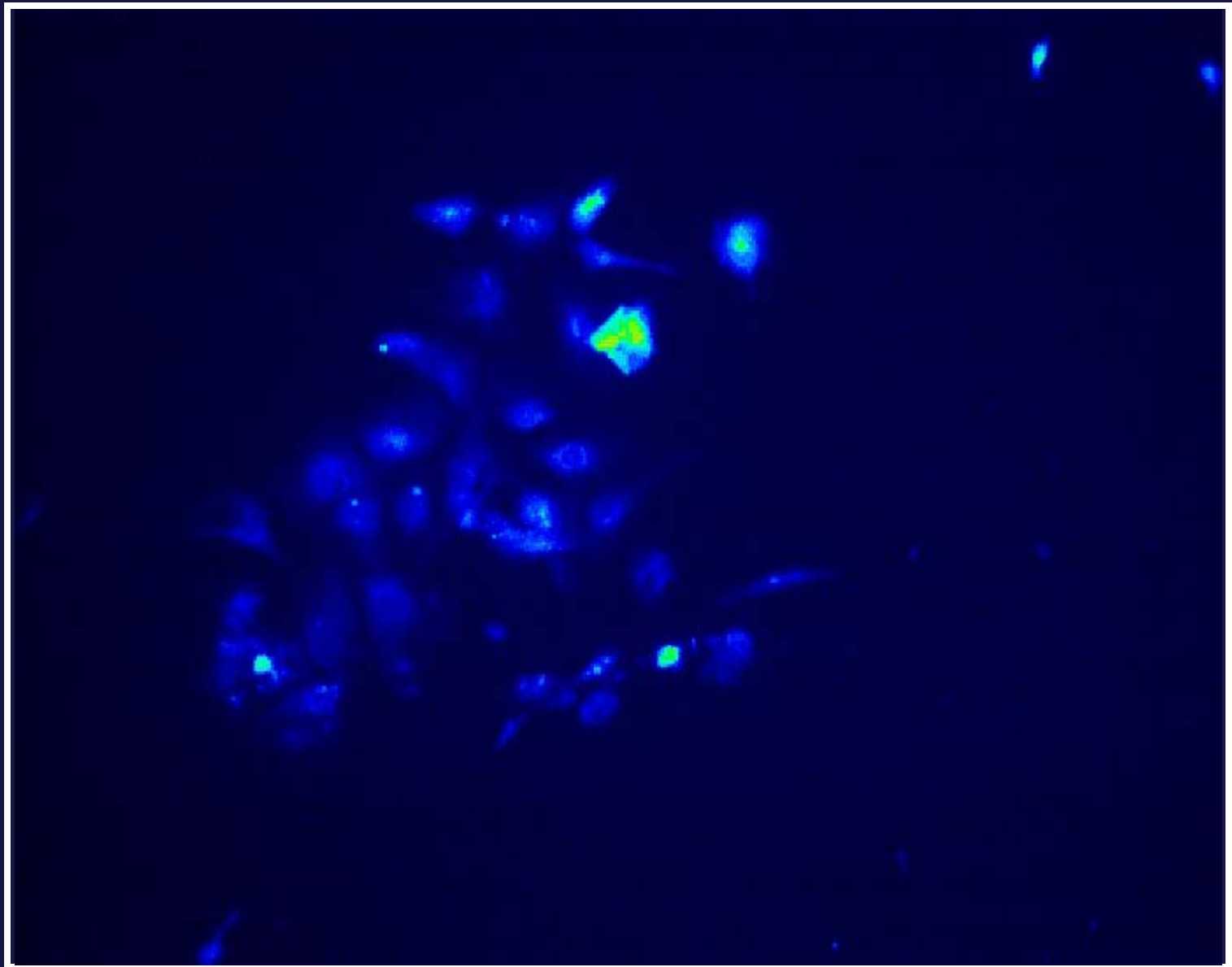
Ca^{2+} vlny = propagace poraněné nervové tkáně



Parpura a Haydon, Astrocytes in Pathophysiology of CNS, 2009



Verkhatsky a Butt, Glial Neurobiology, 2007



Astrocyty

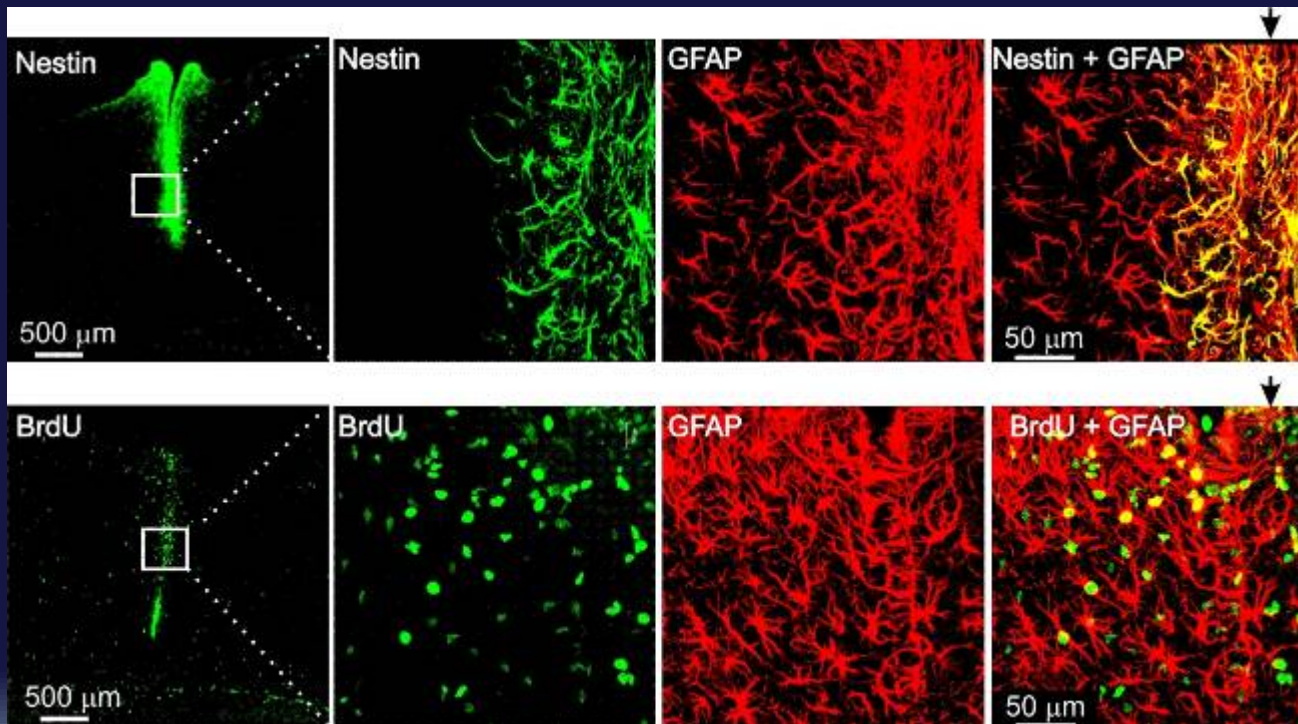
astroglióza

anisomorfní astroglióza

hypertrofované astrocyty
proliferace
permanentní gliální jizva
produkce chondroitinu a keratinu
inhibice regenerace axonů

isomorfní astroglióza

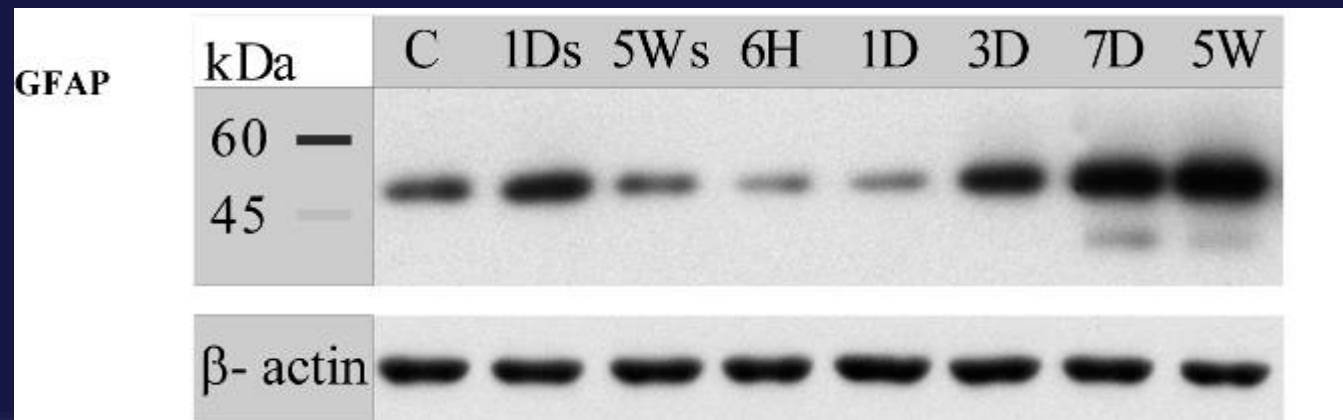
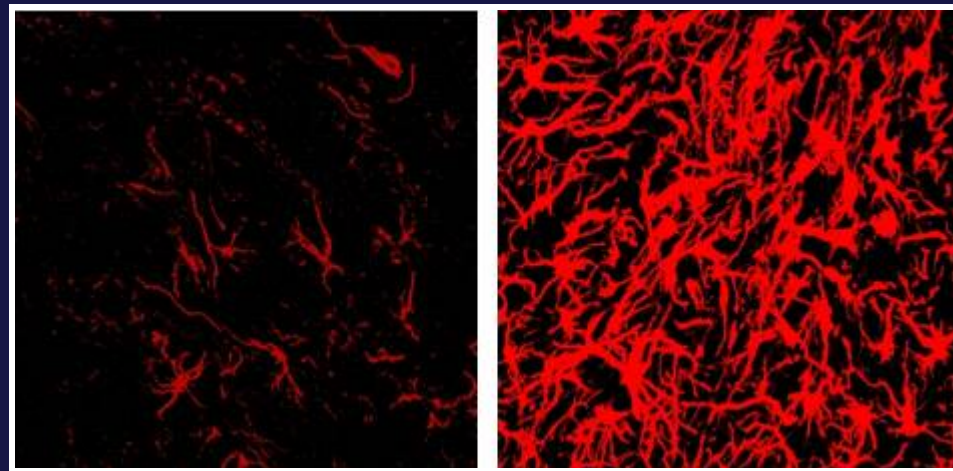
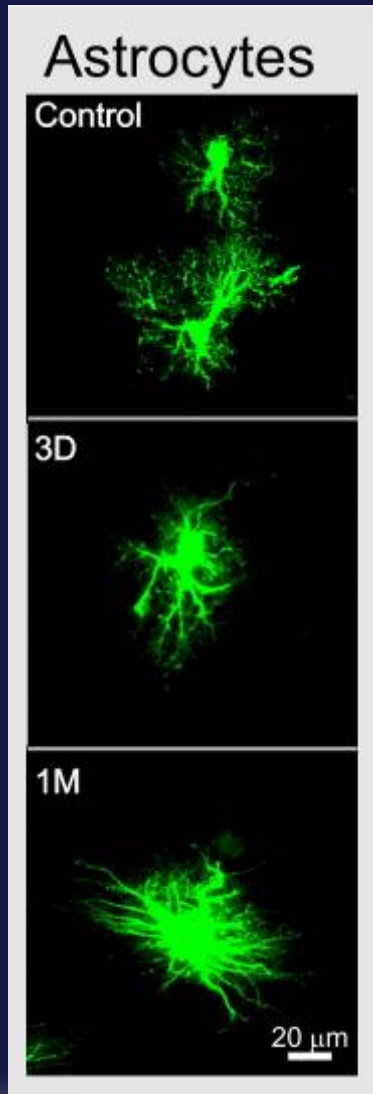
růstové faktory
(NGF, FGF, cytokiny, Shh)
-proteiny extracelulární matrix
-adhézní molekuly
-podpora neuron-astrocyt interakcí
-podpora růstu axonů, synaptogeneze



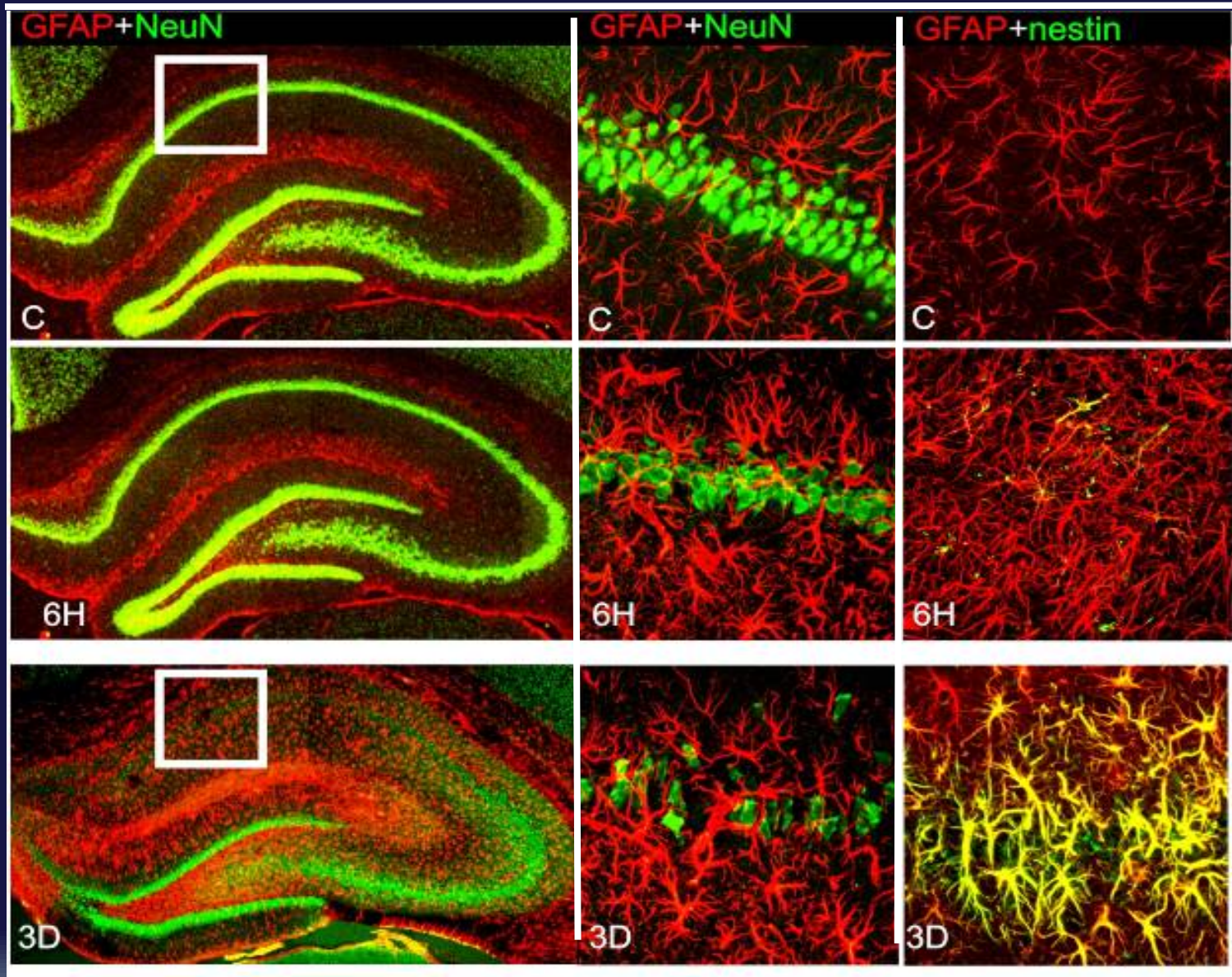
Astrocyty

Morfologie astrocytů a exprese GFAP

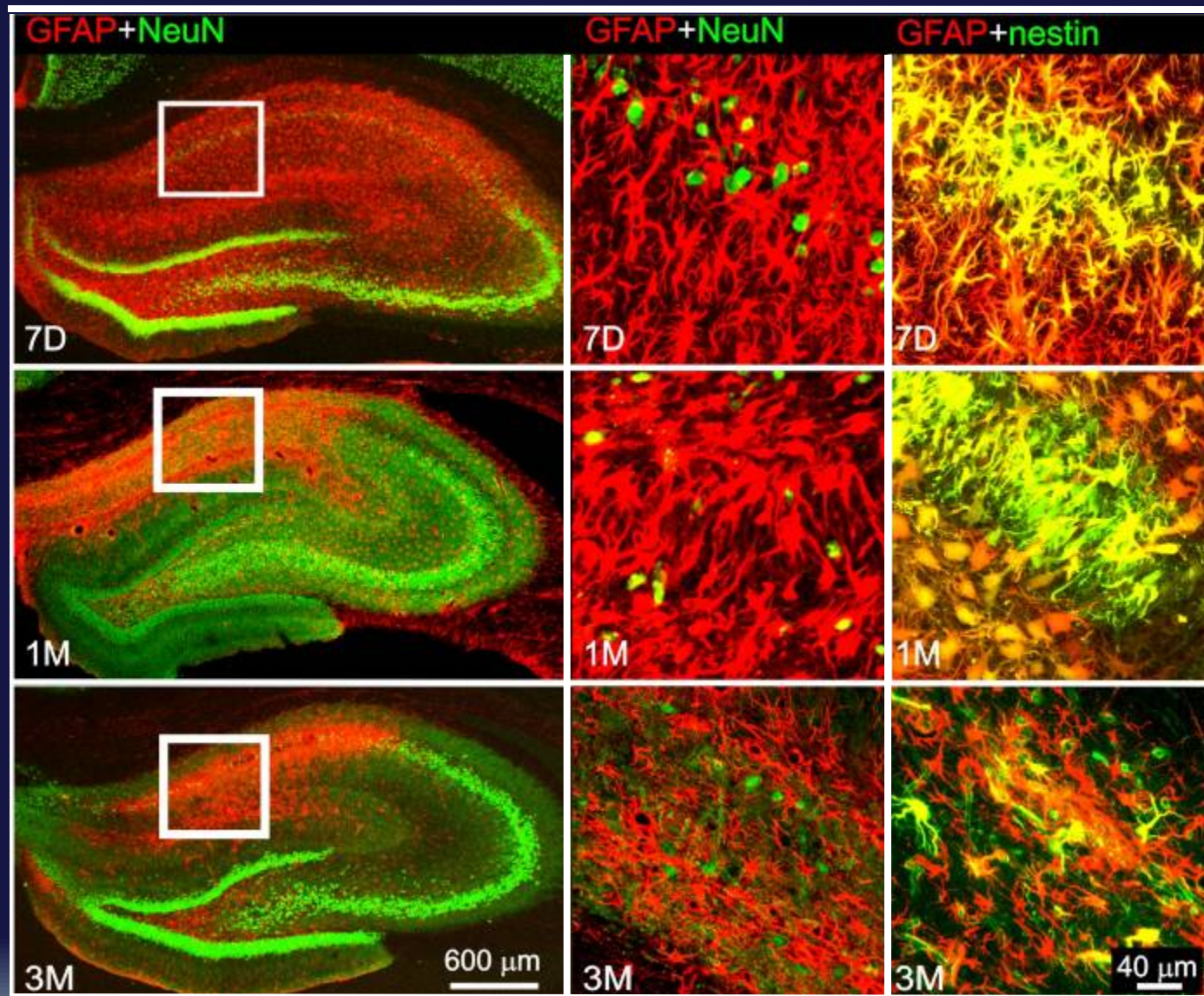
zvýšená exprese GFAP



Hipokampus potkana - GCI

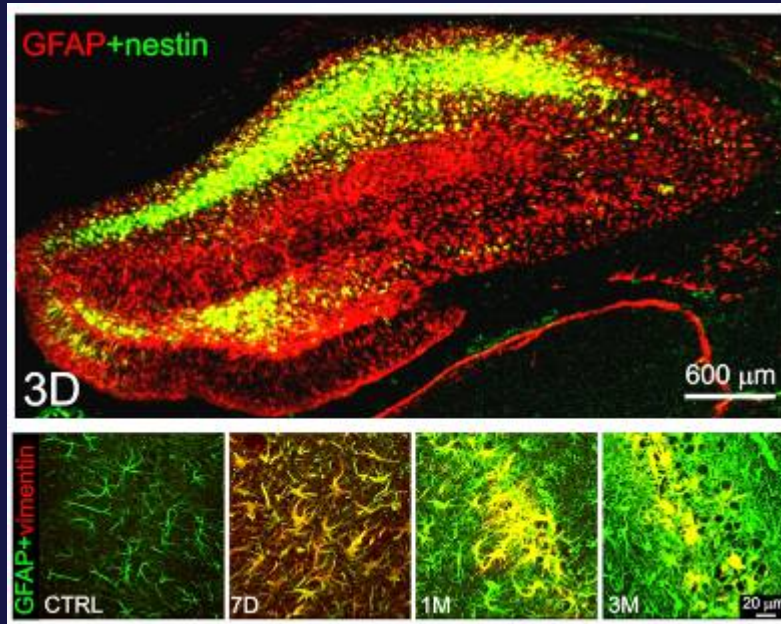


Hipokampus potkana - GCI



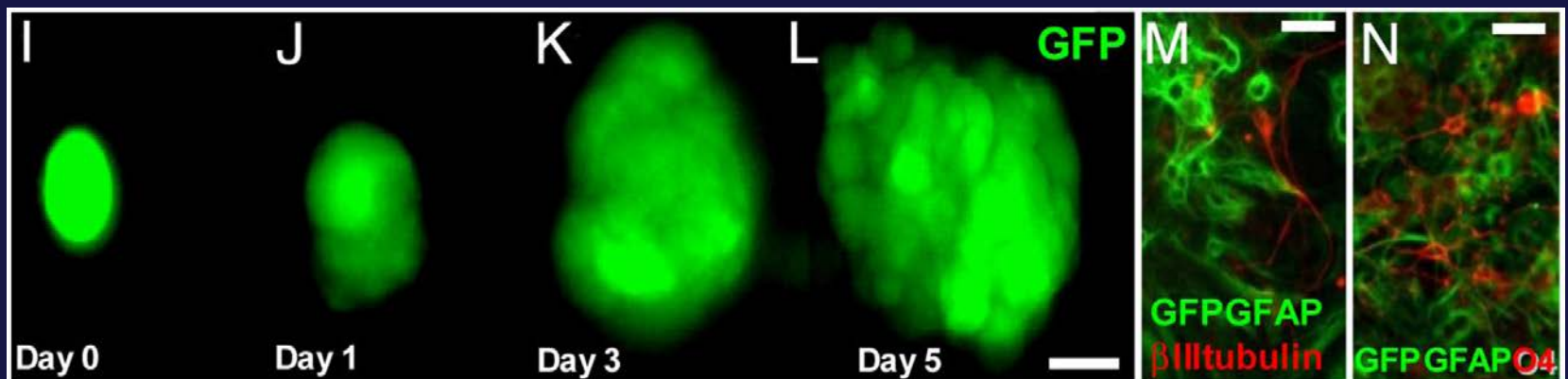
Astrocyty

Reaktivní astrocyty vykazují charakteristiky NSC



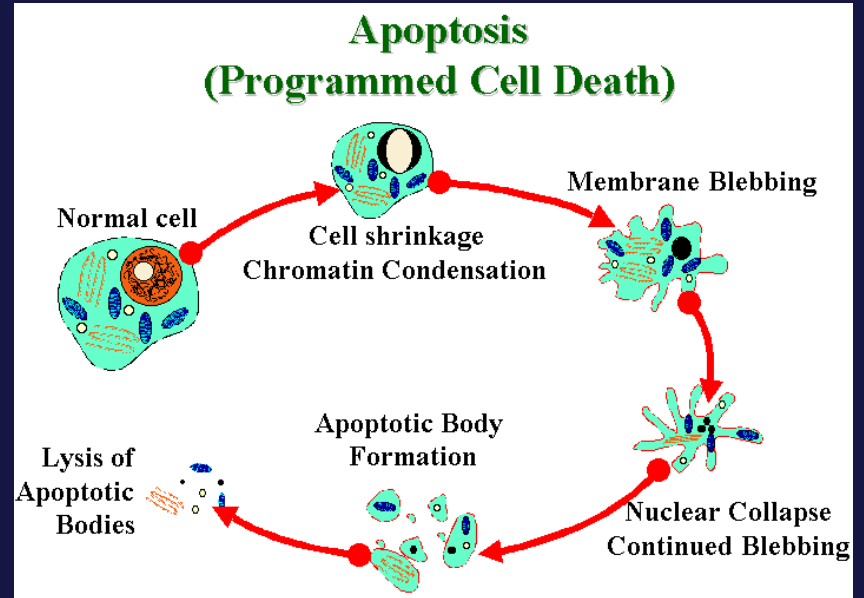
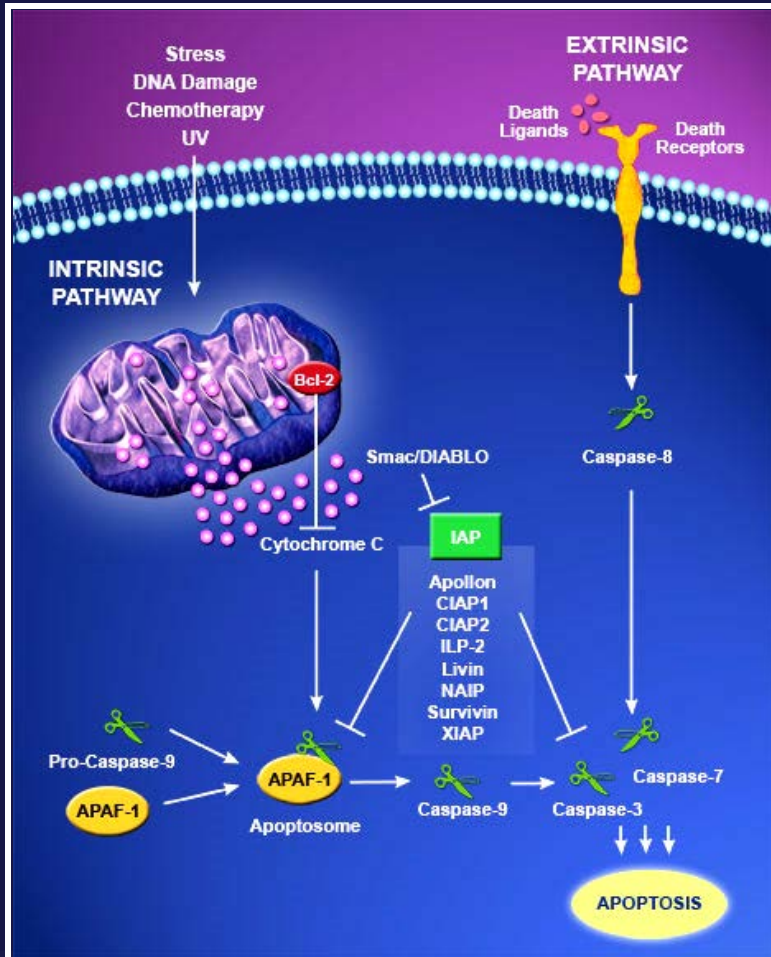
- exprimují markery radiálních glií-vimentin
- v přítomnosti NGF a bFGF –neurosféry
- diferenciace v neurony a oligodendrocyty

Anderova et al., Glia, 2009

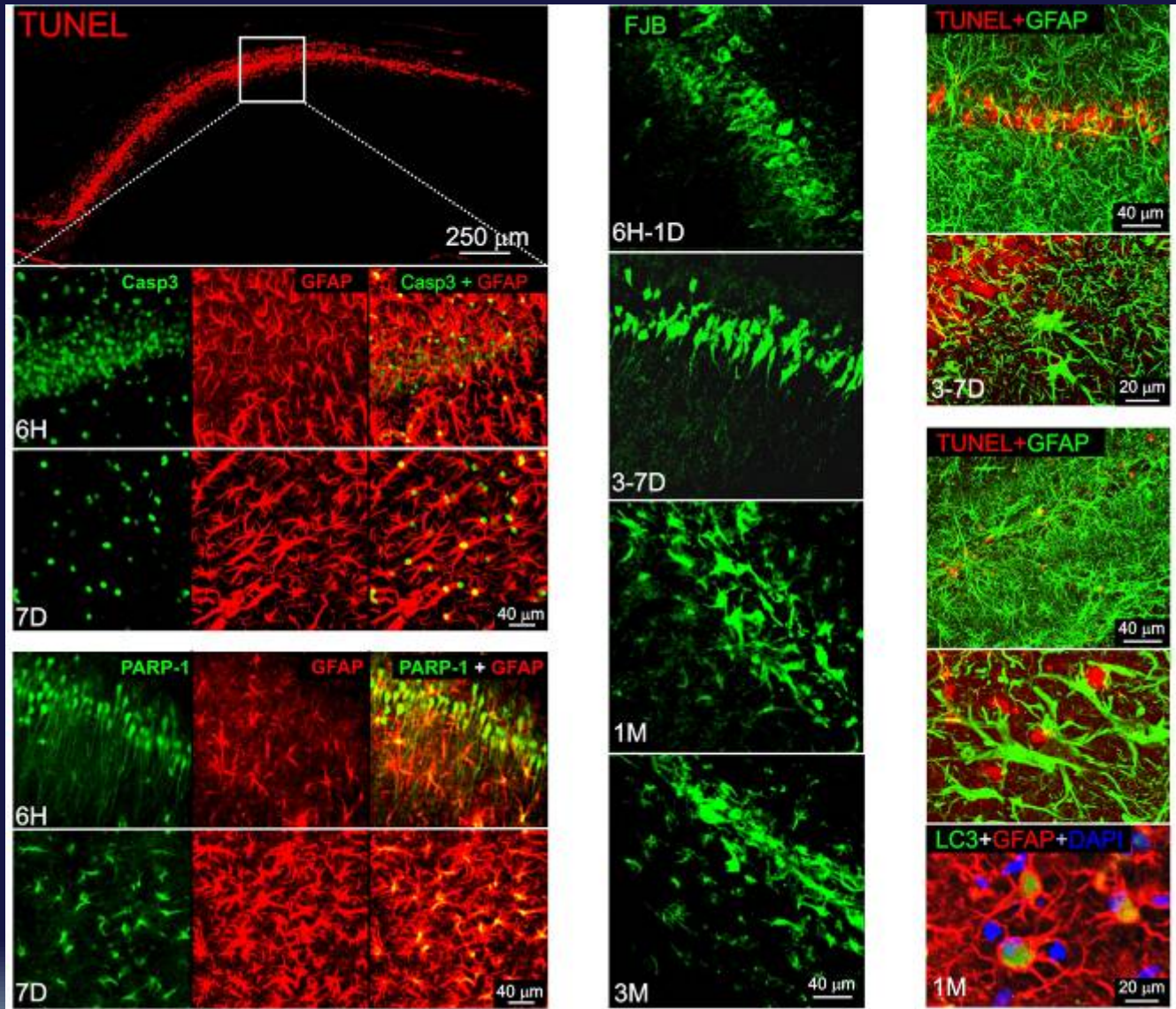


Buffo et al., PNAS, 2007

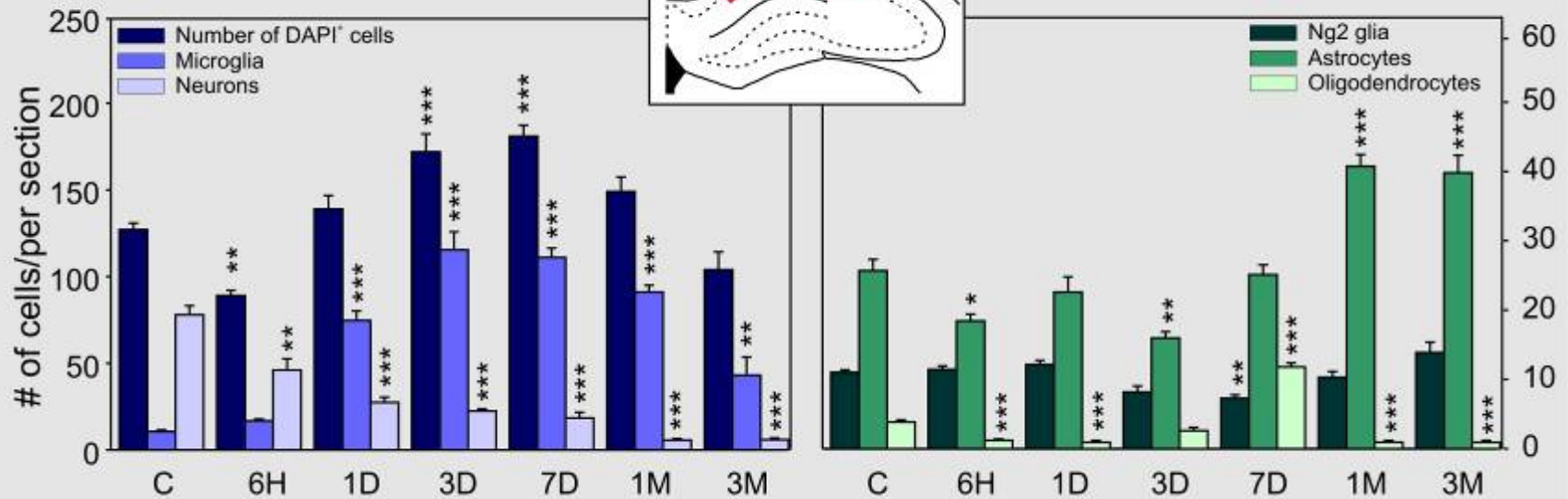
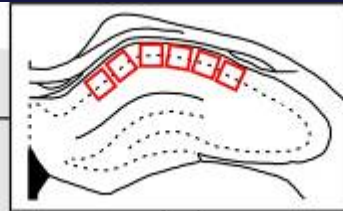
Apoptóza



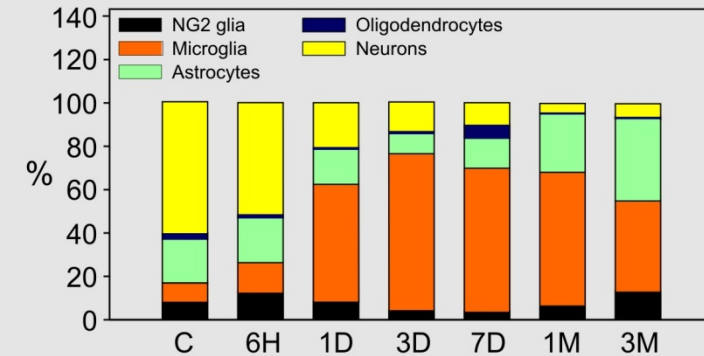
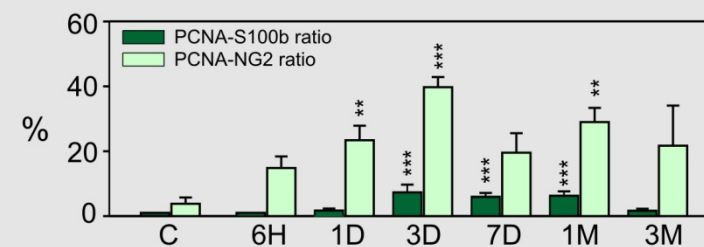
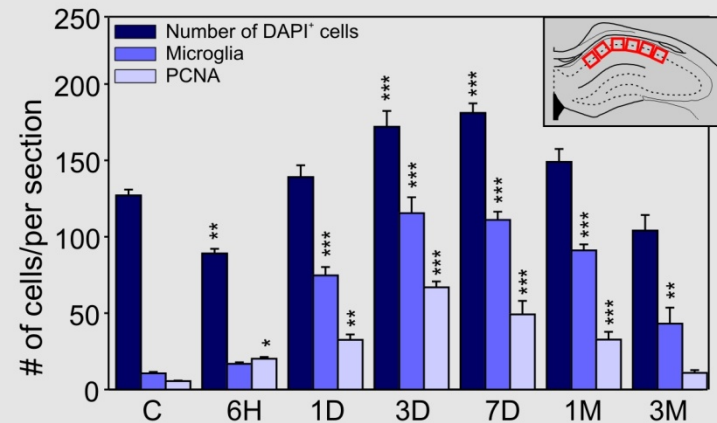
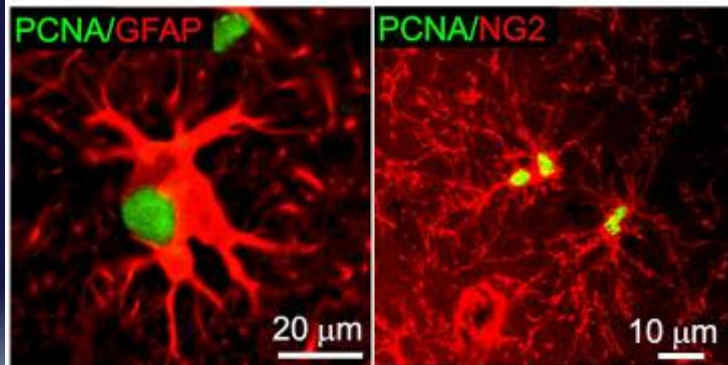
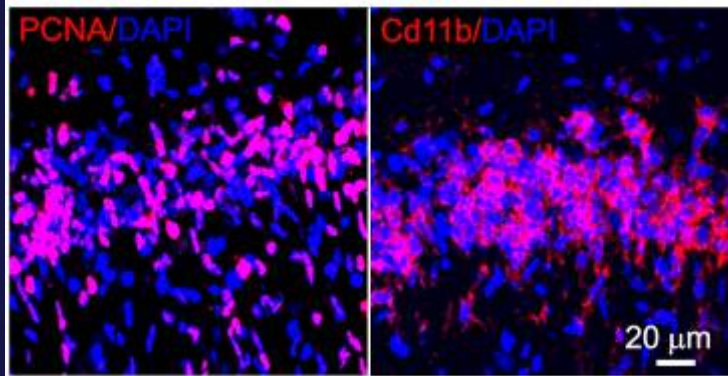
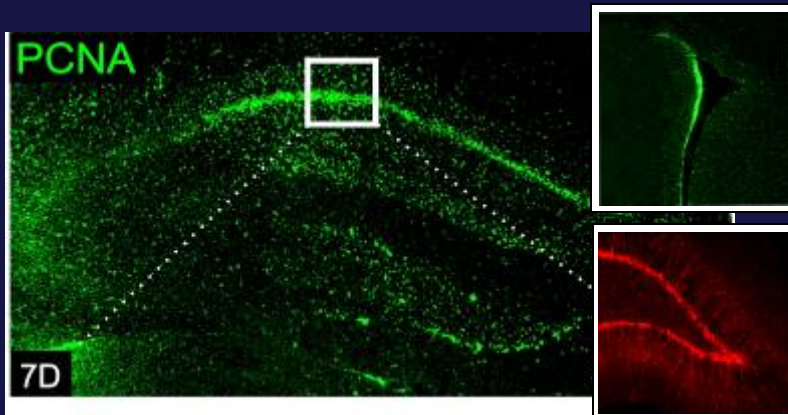
Apoptóza



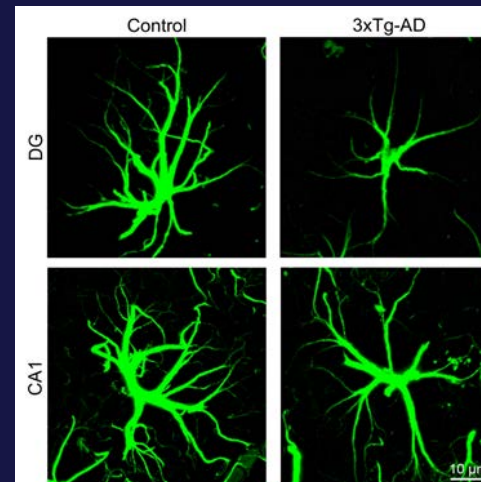
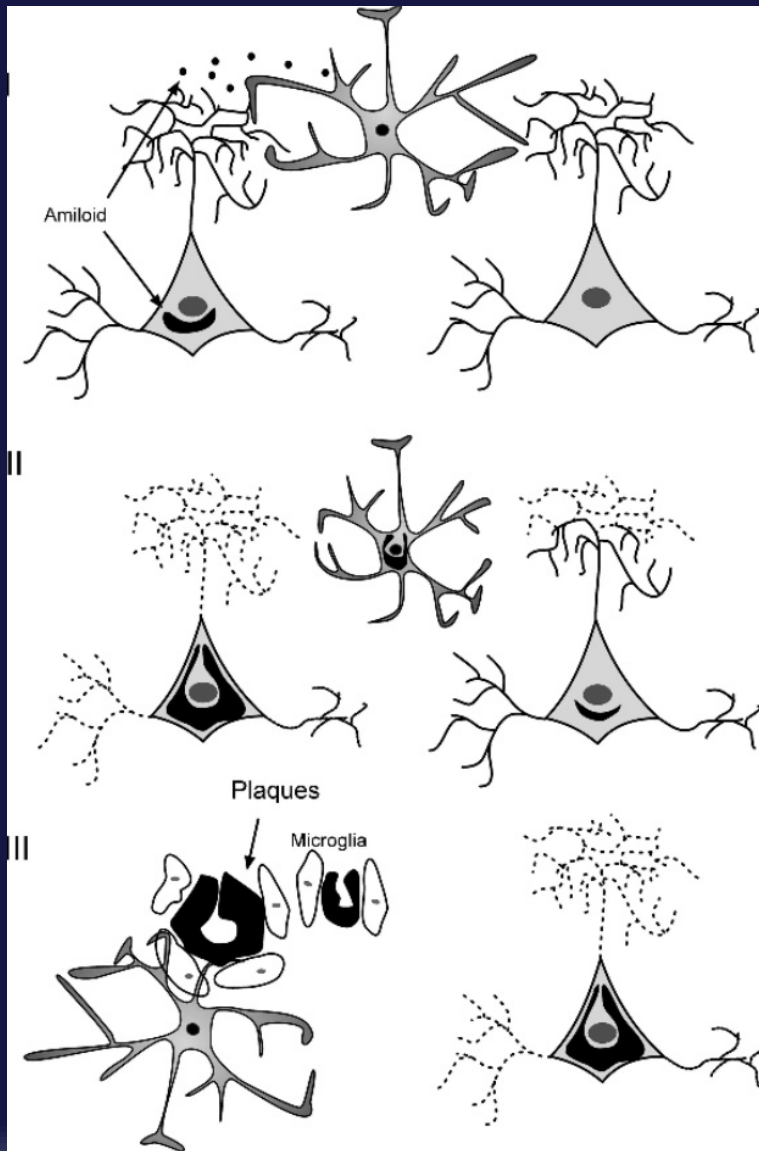
Časově závislé změny v počtu buněk CA1 oblasti hipokampu po GCI



Proliferace-mikroglie, NG2 glie a astrocyty



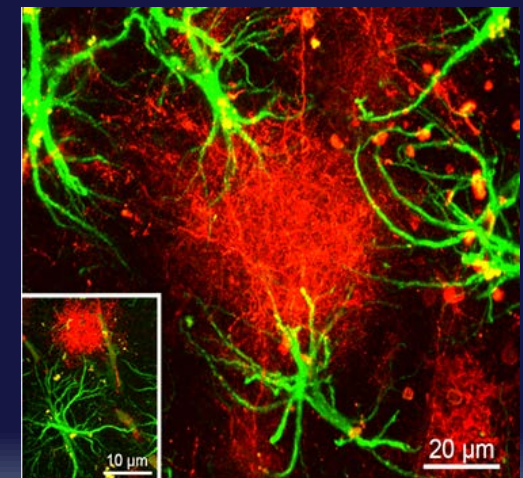
Alzheimerova choroba



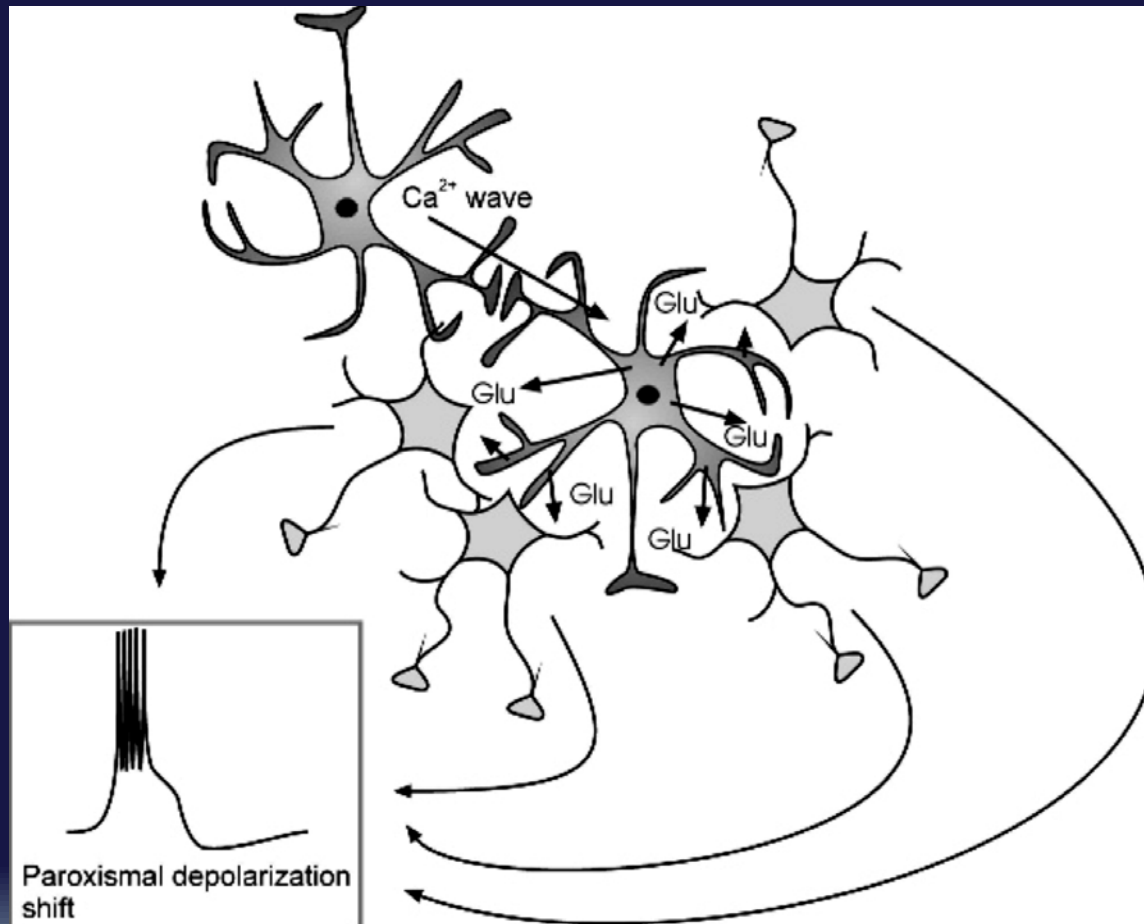
Astrocyty detekují beta-amyloid uvolňovaný neurony, odtažení astrocytárních výběžků od neuronů

Degenerace nervových zakončení v blízkosti atrofovaných astrocytů
Astrocyty akumulují beta-amyloid

Odumírání neuronů a astrocytů,
Aktivace mikroglíí, reaktivní astrocyty- plaky

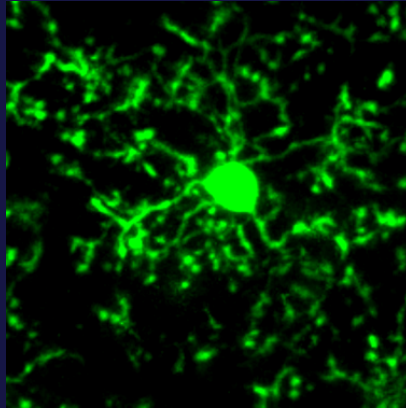


Epilepsie Vápníková vlna může vyvolat synchronizované uvolňování glutamátu
Synchronizovaná depolarizace neuronů = epileptický záchvat



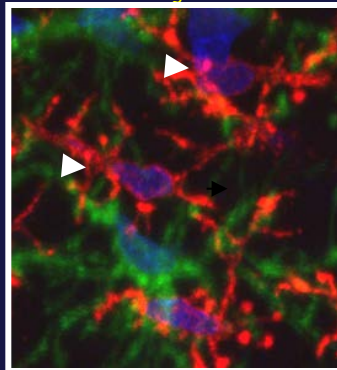
Funkce gliových buněk

Mikroglie

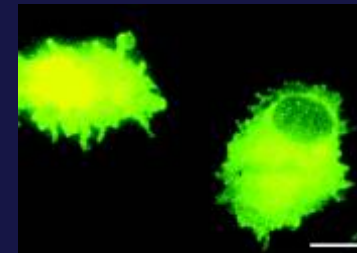
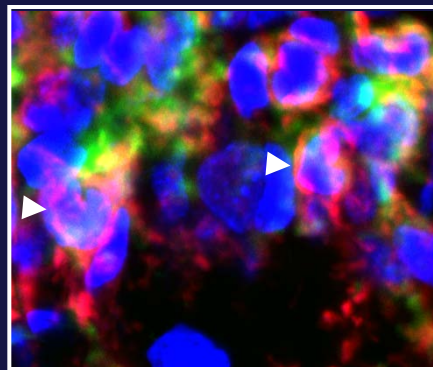


tvoří imunitní systém mozku
10% z gliových buněk
monocytomakrofágového původu
schopnost fagocytovat

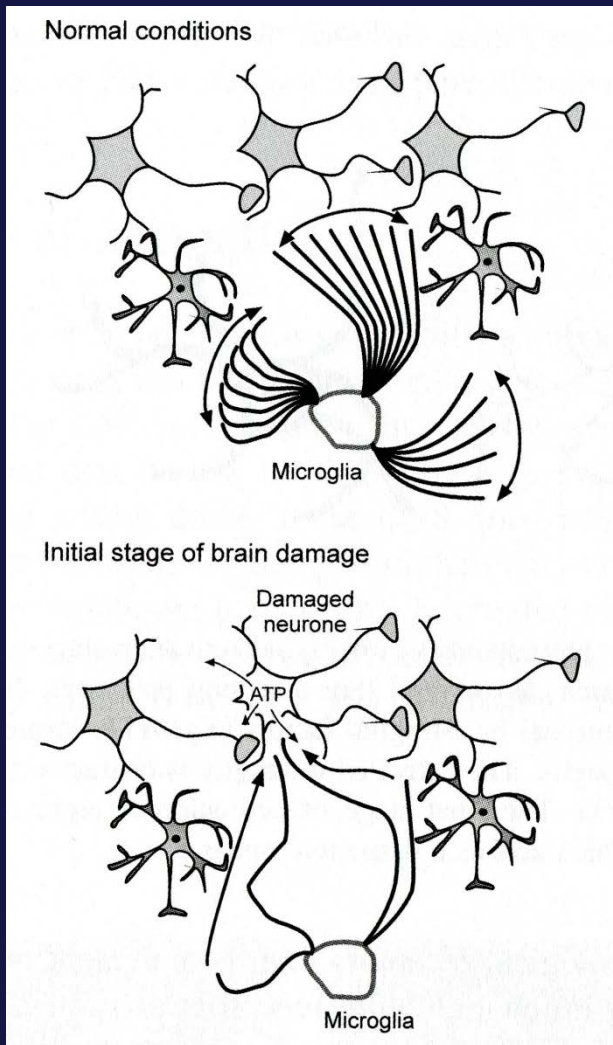
klidový stav



aktivovaná-reaktivní



Mikroglie



Verkhatsky a Butt, *Glial Neurobiology*, 2007

„Klidová mikroglie“ =

buňka neustále kontrolující ECS – nahodilý pohyb výběžků (1.2-1.5 μ m/min), jejich prodlužováním a zkracováním kontroluje oblast CNS v průběhu několika hodin

aktivace:

Signál-ATP uvolněné z astrocytů
-purinerní receptory na mikroglíích

Up-regulace K⁺ kanálů-Kir, vně usměrněné
Aktivace GLT-1

„synaptic stripping“ –selektivní odstranění
glutamerních synapsí

Produkce cytokinů a chemokinů-
NGF, BDNF, NT-3, NT-4

Produkce imunokompetentních molekul-
ILs, TNF α , TGF β (kontrola imunitní
odpovědi)

TGF β –astroglióza

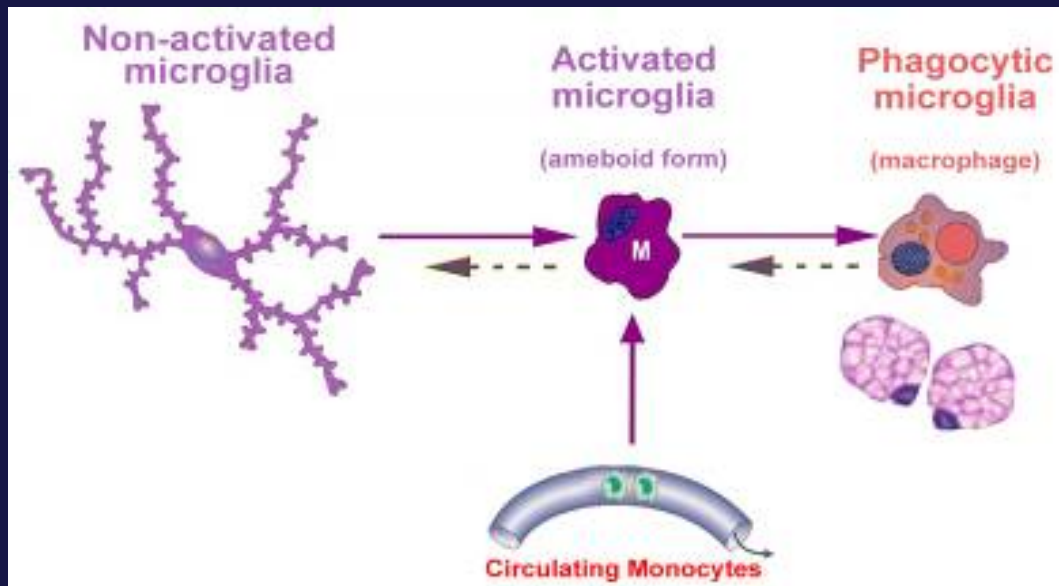
Aktivace mikroglíí

Astrocyty, neurony – ATP, cytokiny

klidová mikroglie

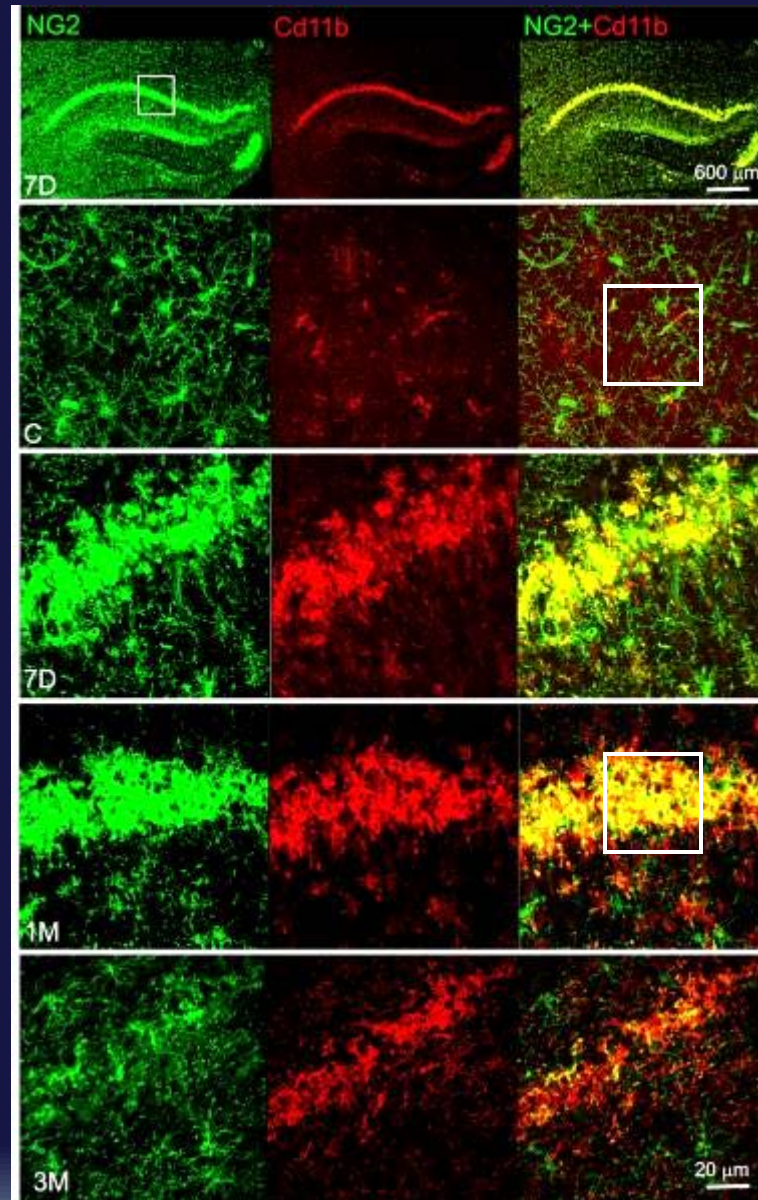


Aktivovaná-reaktivní mikroglie



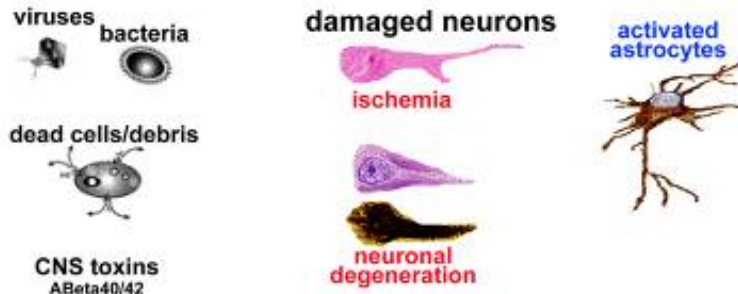
proliferace , migrace, transformace ve fagocyty, buněčná smrt

Aktivace mikroglí-GCI

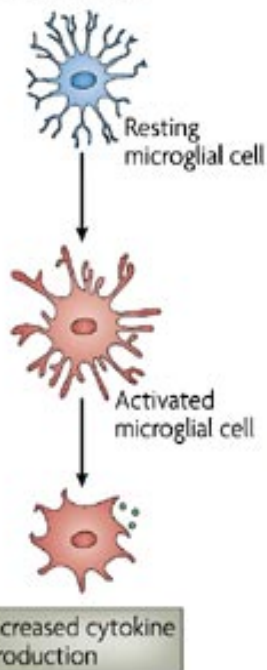


Mikroglie

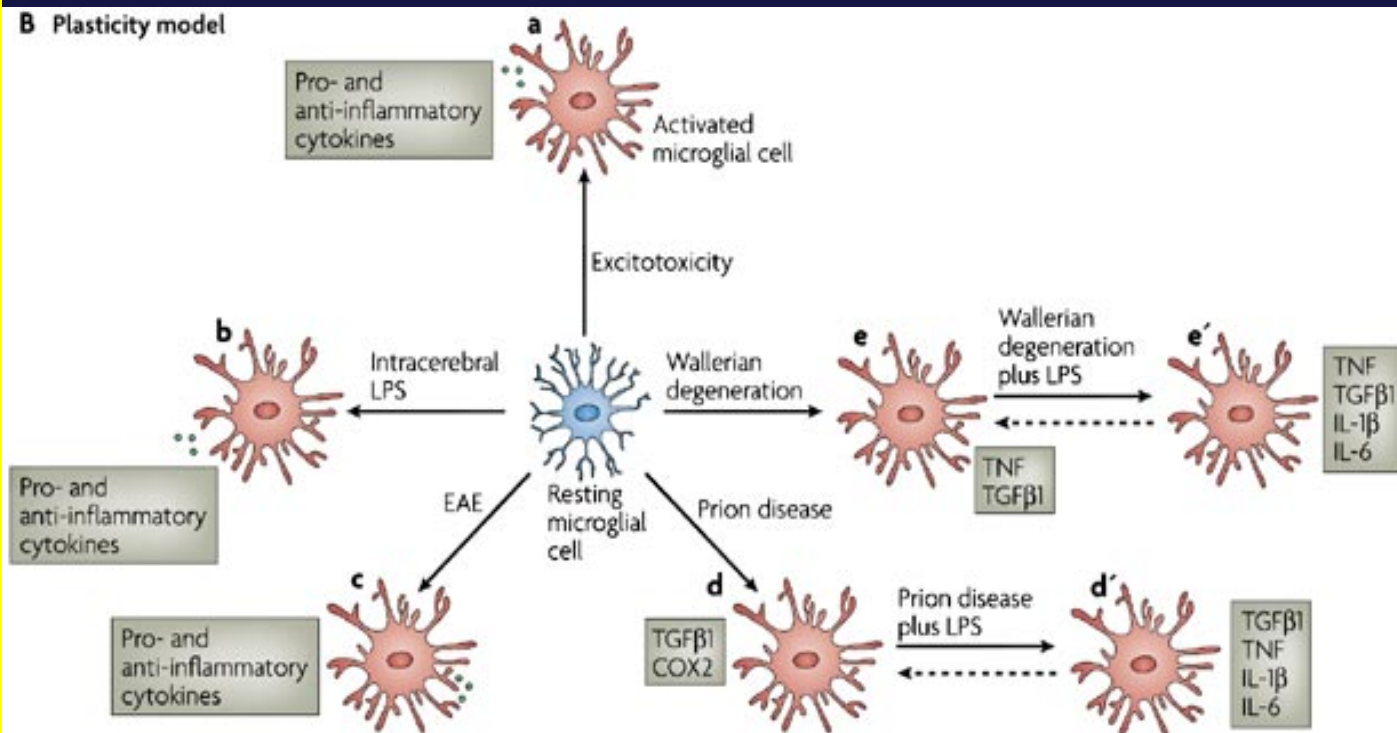
MICROGLIA STIMULATORS



A Linear model



B Plasticity model



Nature Reviews | Immunology

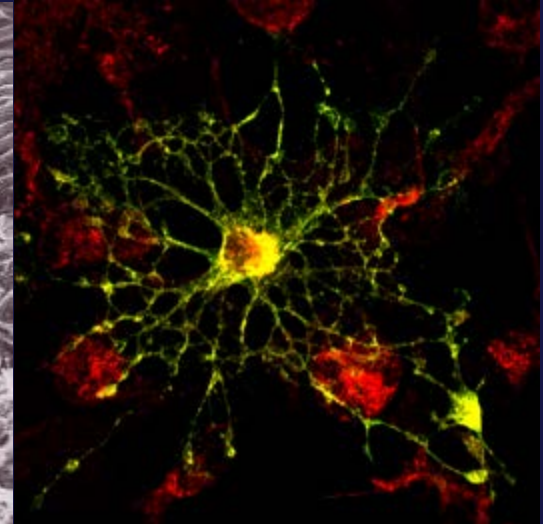
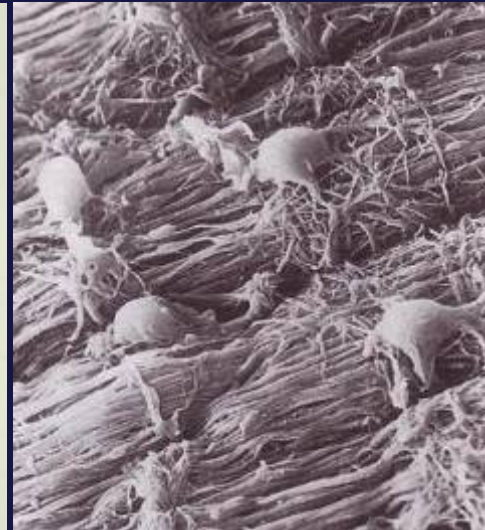
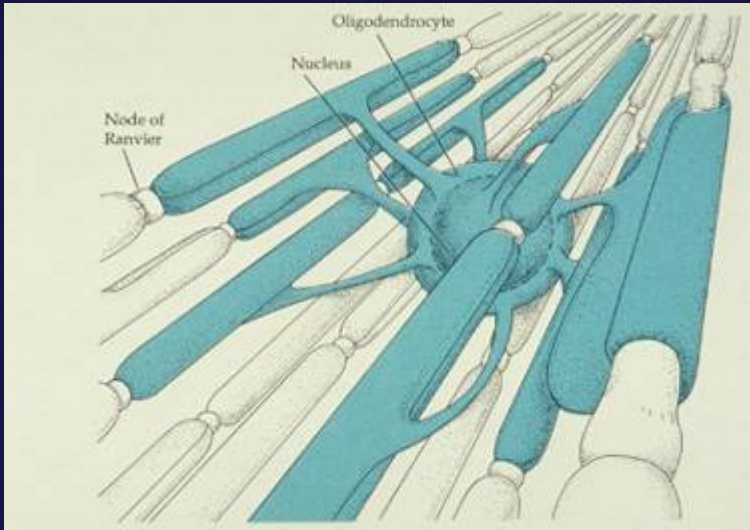
Rozsah poraneni
určuje rozsah morfologických změn
a produkce cytokinů

Charakter poranění, intenzita a trvání stimulu ovlivňují produkci cytokinů

Funkce gliových buněk

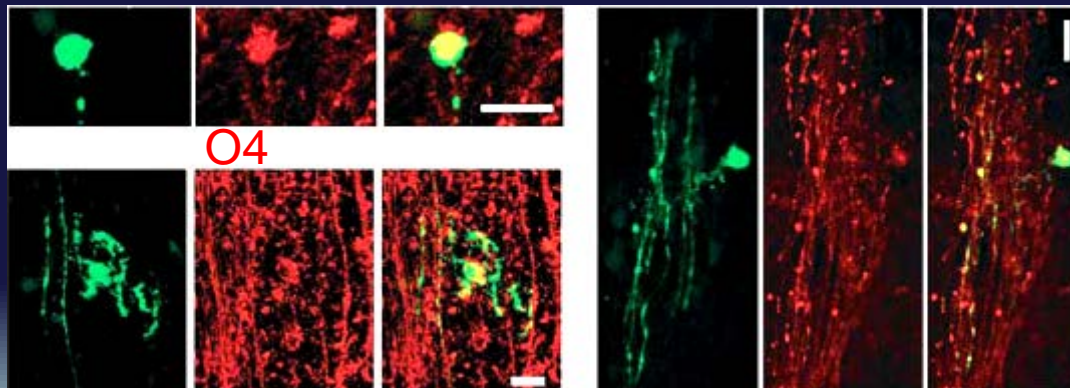
Oligodendrocyty

**obklopují výběžky neuronů
vytvářejí myelinové pochvy axonů
v PNS jsou obdobou Schwanovy buňky**



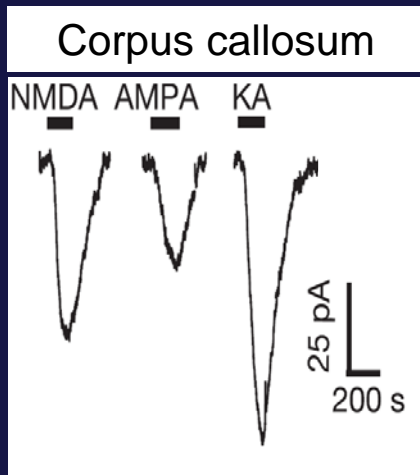
NG2

MBP

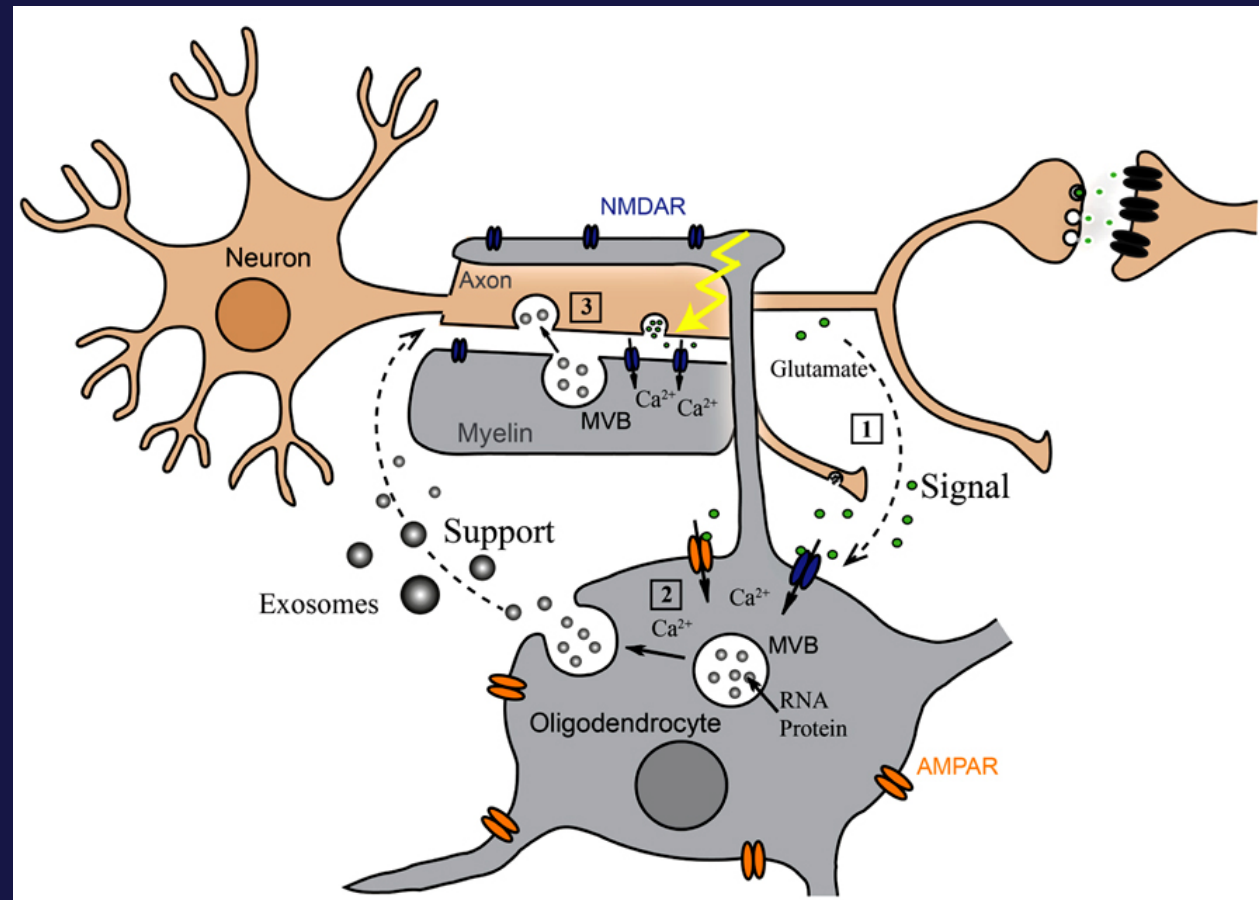


Oligodendrocyty

Mechanismy vedoucí k poškození oligodendrocytů



Karadottir et al., 2005 Nature

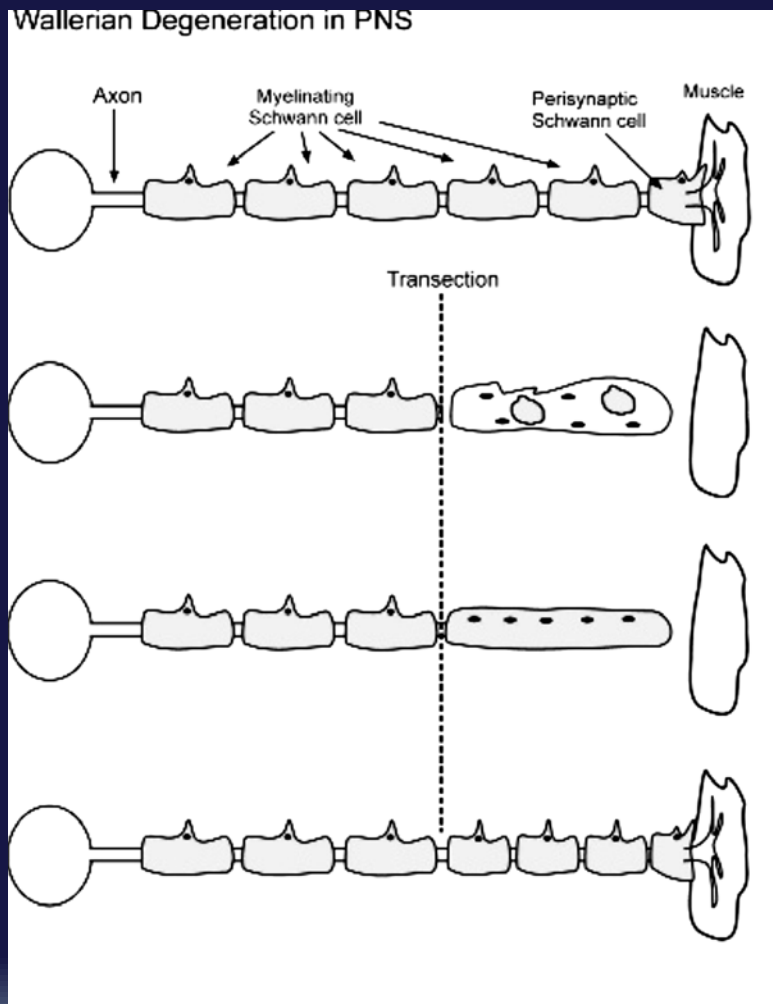


Frühbeis et al., Frontiers in Cell Neurosci (7), 182, 2013

Oligodendrocyty

Wallerova degenerace- po přerušení axonu dochází k odloučení od buněčného těla a k degeneraci jeho distálního pahýlu

Wallerova regenerace: tělo buňky reaguje na oddělení axonu produkcí stavebních proteinů, nový axon roste rychlostí cca 1 mm/den a snaží se spojit s původními efektorů nebo receptory, poté dochází k tvorbě myelinových pochev a funkční regeneraci-PNS



Myelinizovaný axon

Transekce a degenerace axonu

Schwanovy buňky dediferencují

Fragmentace myelinu

Makrofágy odstraňují poškozené buňky

Bazální lamina Schwanových buněk intaktní

Regenerace

axon prorůstá do trubice bazální laminy

Schwanovy buňky –produkce faktorů

Reinervace

axon regeneruje a inervuje svaly

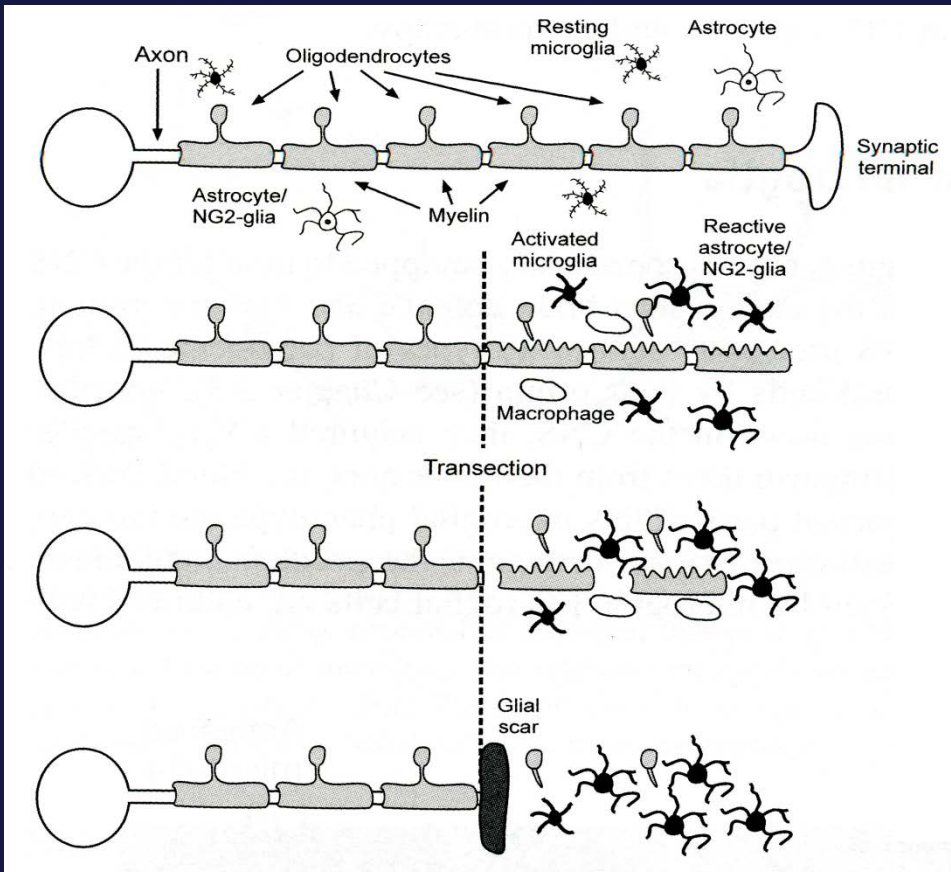
Schwanovy buňky myelinizují axon

Oligodendrocyty

CNS x PNS

Wallerova degenerace- po přerušení axonu dochází k odloučení od buněčného těla a k degeneraci jeho distálního pahýlu

Wallerova regenerace: tělo buňky reaguje na oddělení axonu produkcí stavebních proteinů, nový axon roste rychlostí cca 1 mm/den a snaží se spojit s původními efektory nebo receptory, poté dochází k tvorbě myelinových pochev a funkční regeneraci-PNS



Myelinizovaný axon

Dezintegrace a fragmentace myelinu

Aktivace mikroglíí, astrocytů a NG2 glií

Makrofágy-odstranění buněč. debris

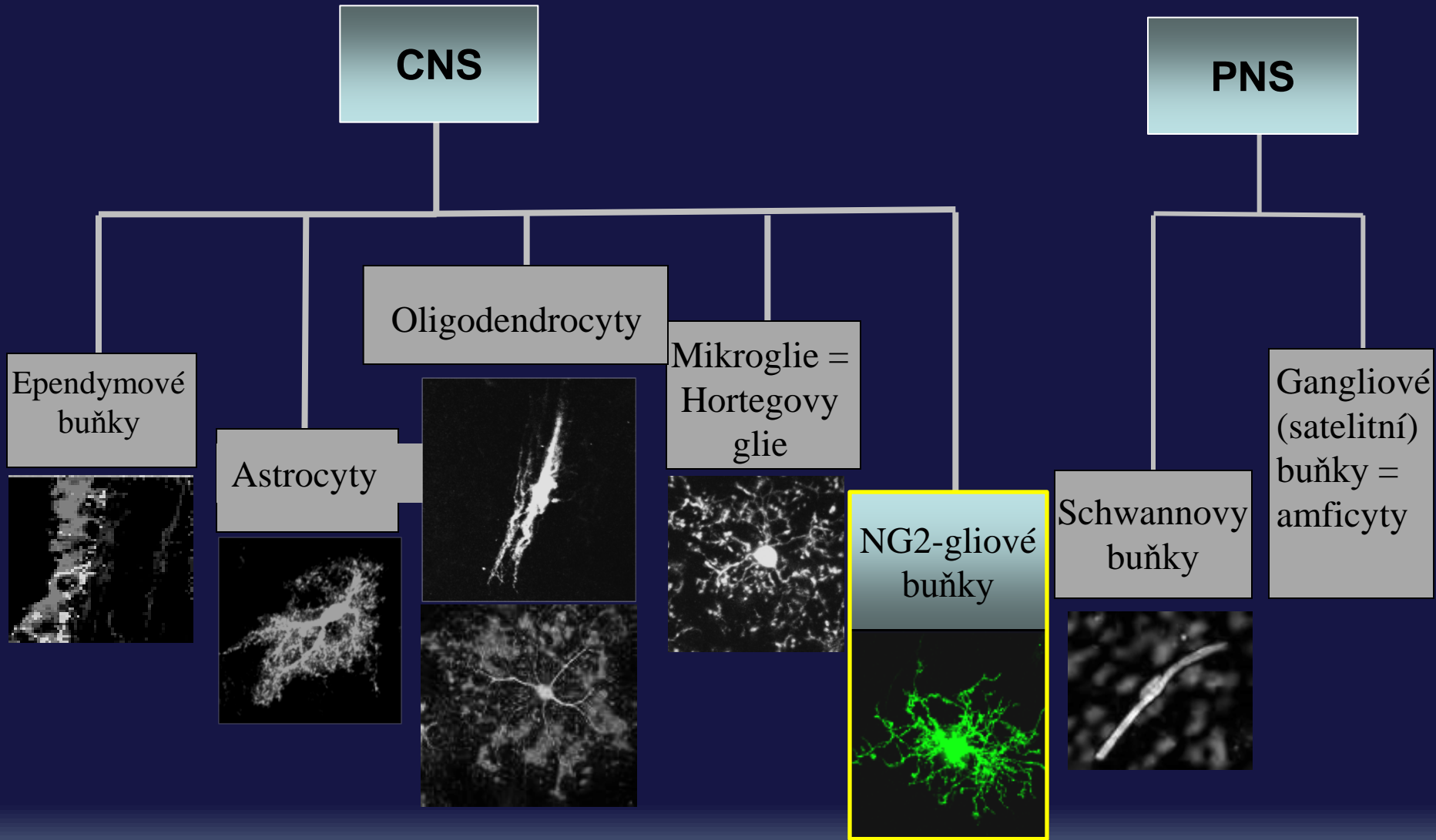
Permanentní gliální jizva

Demyelinizační onemocnění

Vanishing white matter disease ve věku 2-6 let, ztráta myelinu, degenerace bílé hmoty mozkové, cystická BH, kolem cyst ztráta oligodendrocytů, abnormální morfologie oligodendrocytů

Roztroušená skleróza autoimunitní zánětlivé demyelinizační onemocnění CNS
-**primárně progresivní**-smrt oligodendrocytů, neurodegenerace, zánět, bez relapsů, bez remyelinizace OPC,

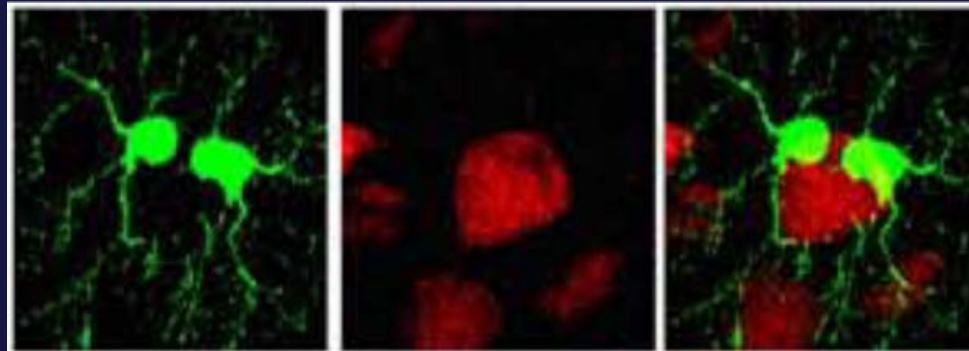
Polydendrocyty a jejich funkce v CNS



Polydendrocyty

5-8 % gliových buněk

Neuron-Glia



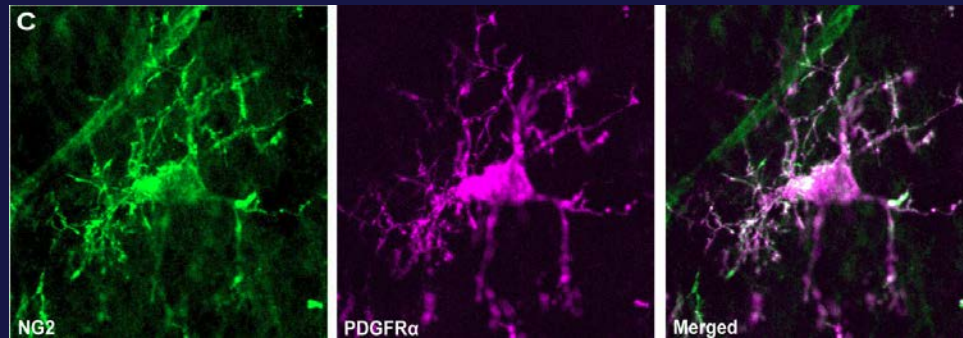
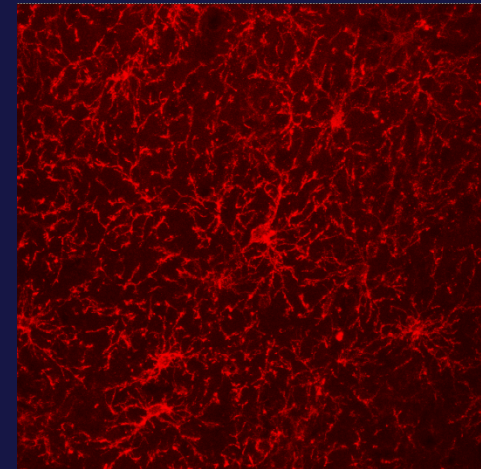
NG2-gliové buňky

Synantocyty-(kontakt)

GluR gliové buňky

Prekurzory oligodendrocytů

Polydendrocyty



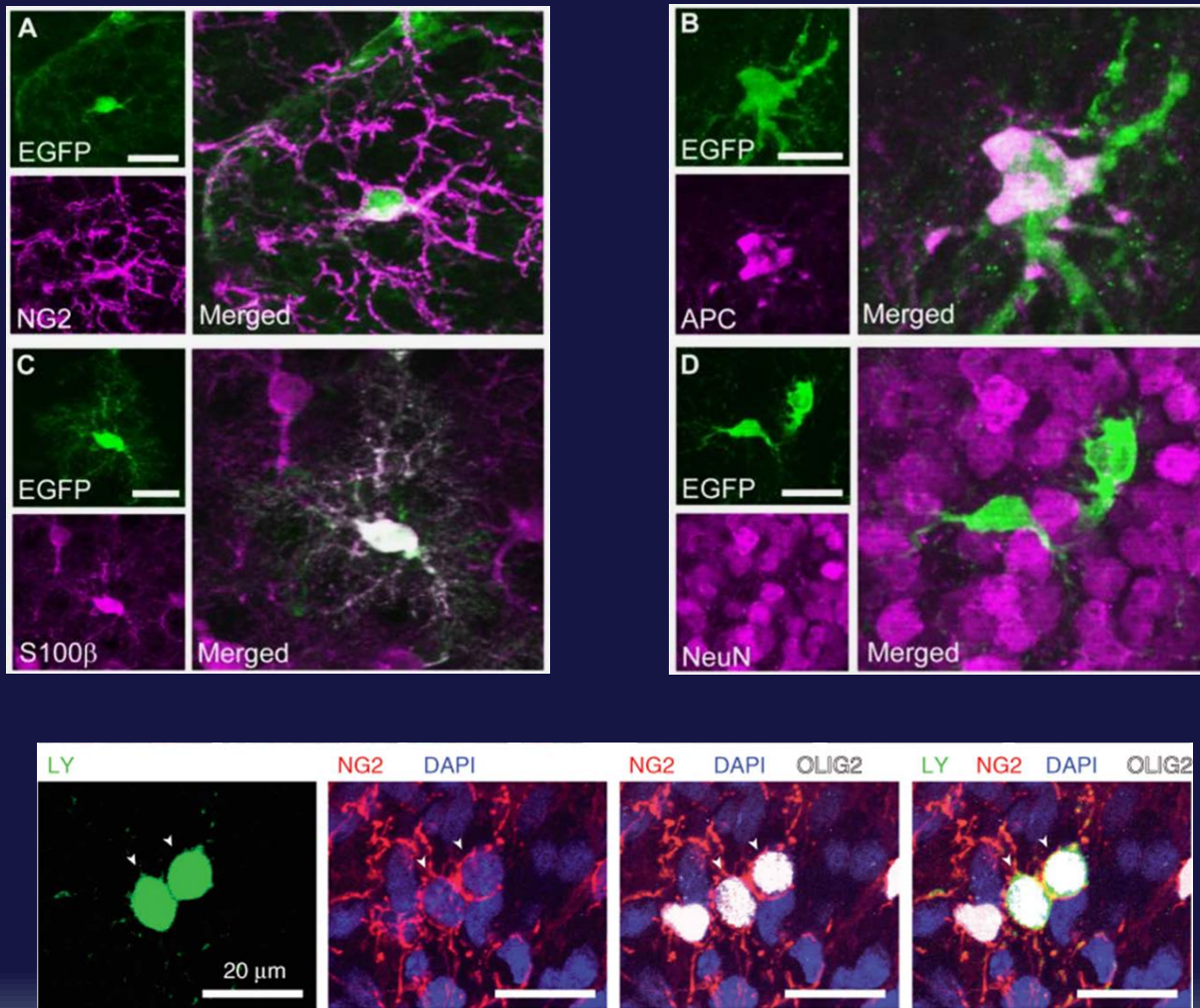
NG2 = chondroitin sulfát
proteoglykan 4

α receptor růstového faktoru
produkt krevních destiček

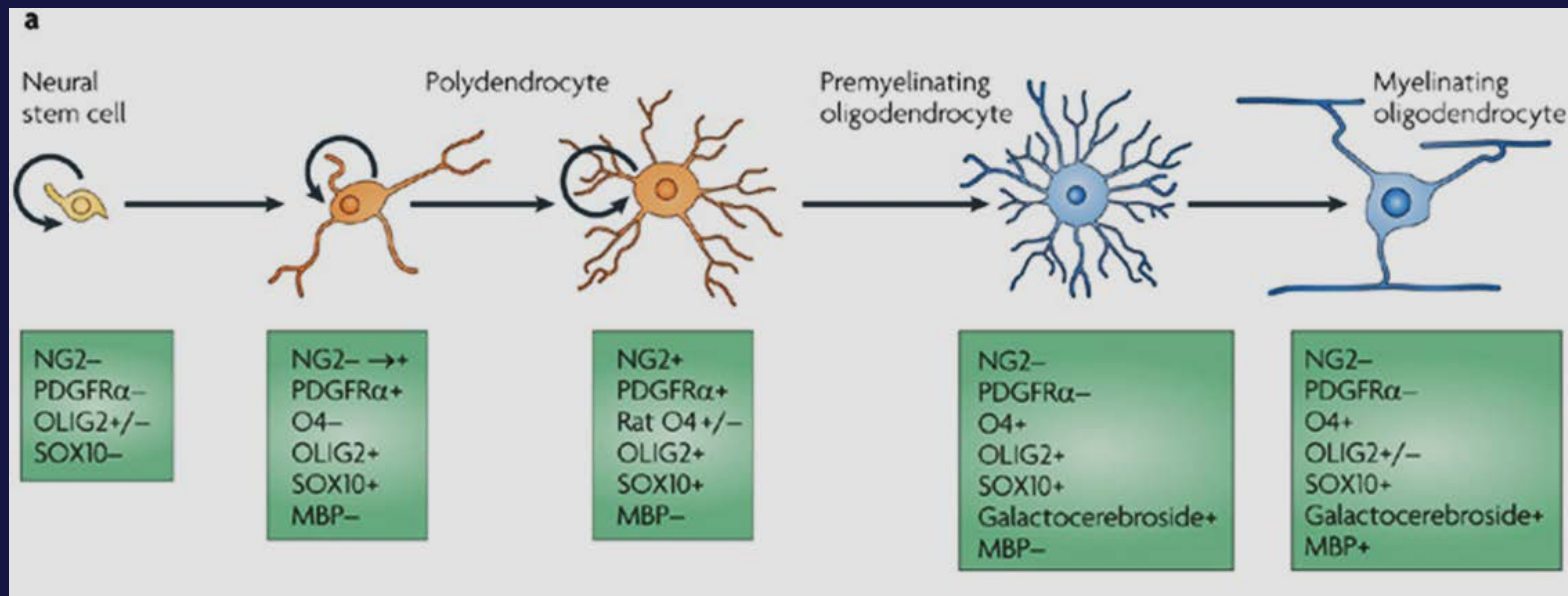
PDGF AA

přežívání
Proliferace
migrace

Polydendrocyty exprimují S100β, transcripční faktor Olig2 a APC



Polydendrocyty-vývoj

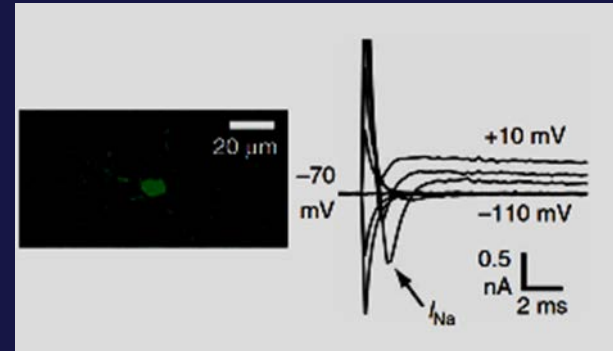
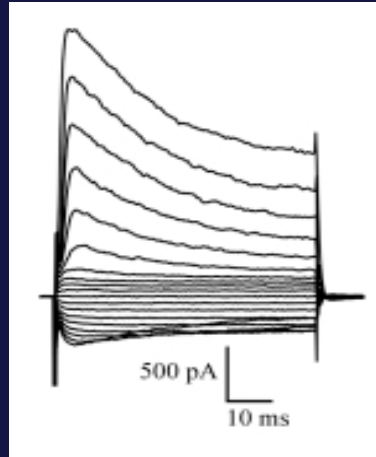
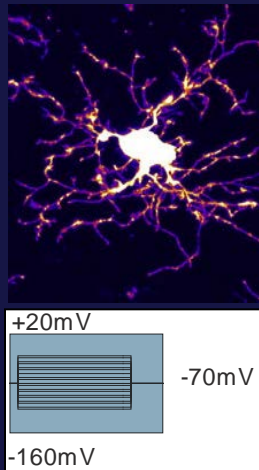


proliferující
progenitorová
buňka

proliferující
polydendrocyt

Membránové vlastnosti polydendrocytů

$V_m \sim -85 - 90 \text{ mV}$
 $IR \sim 200 - 300 \text{ Mohms}$

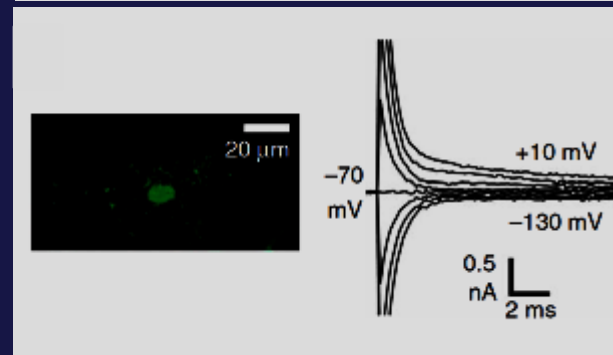
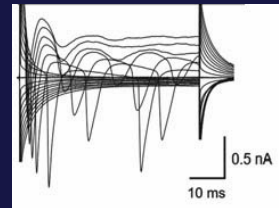
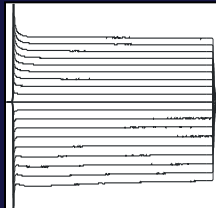
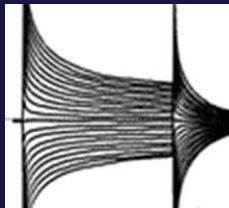


NG2+
 Olig2+
 S100β-

oligodendrocyt

astrocyt

neuron



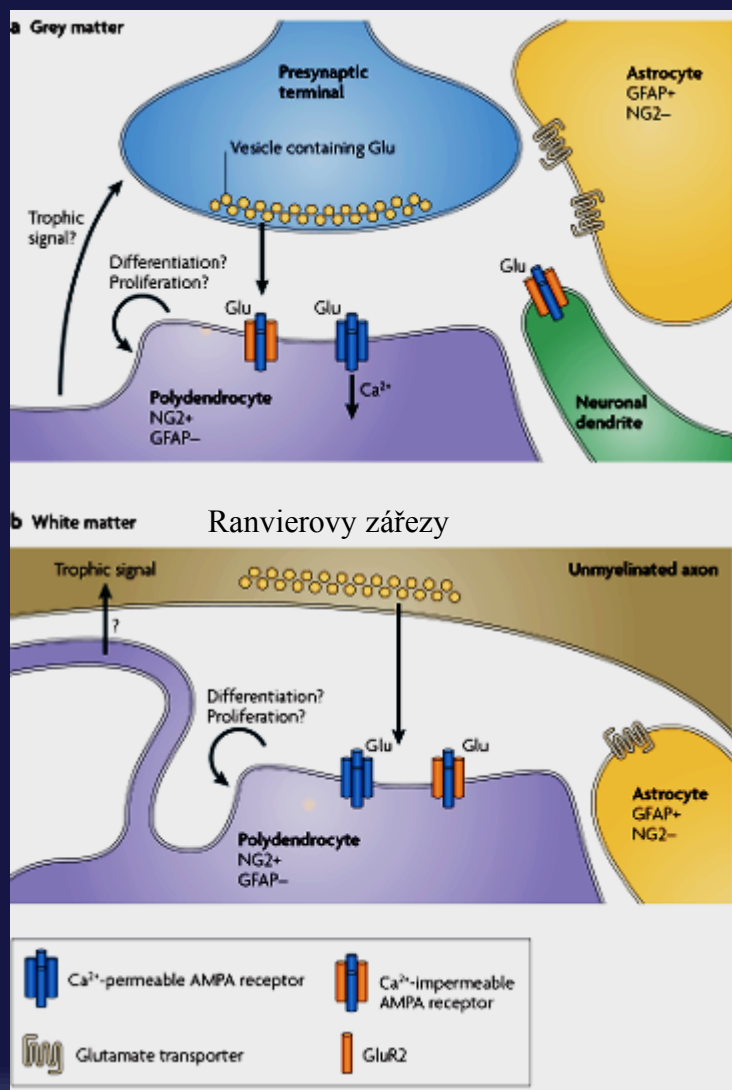
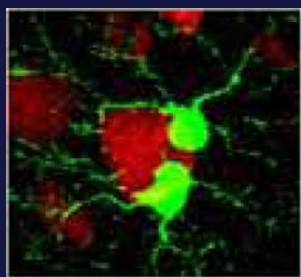
NG2+
 Olig2+
 S100β+

2 typy polydendrocytů

Expresse Na^+ , K^+ , Ca^{2+} kanálů
 Glutamátové a GABA receptory

~~Glutamátové transportéry
 GFAP~~

Polydendrocyty aktivně komunikují s neurony a gliovými buňkami



Tvoří synapse s neurony-
presynaptické zakončení, postsynaptické
zakončení, NG2 glia a astrocyty

Glutamát, ATP...

NG2 glie kontaktují Ranvierovy zářezy
(propagace akčního potenciálu)

-přímá signalizace mezi neurony a NG2
gliovými buňkami
-exocytóza- uvolnění glutamátu-aktivace
AMPA R (depolarizace, Ca²⁺ increase)



proliferace/diferenciace
uvolnění růstových faktorů

Polydendrocyty a jejich úloha v ischemickém poškození mozku

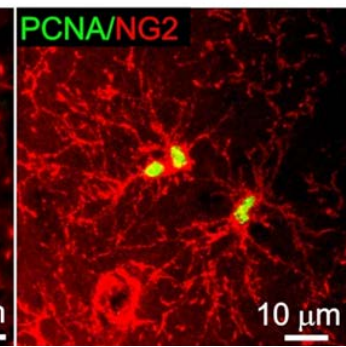
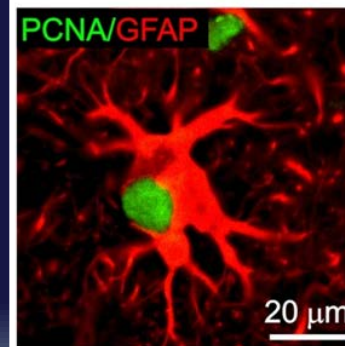
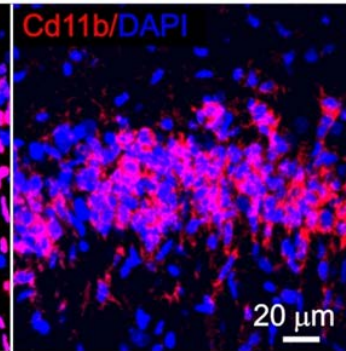
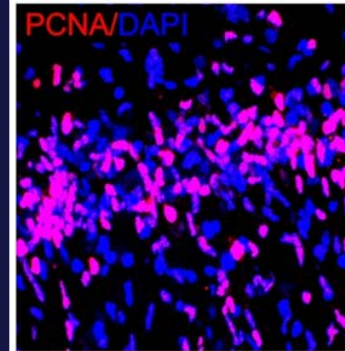
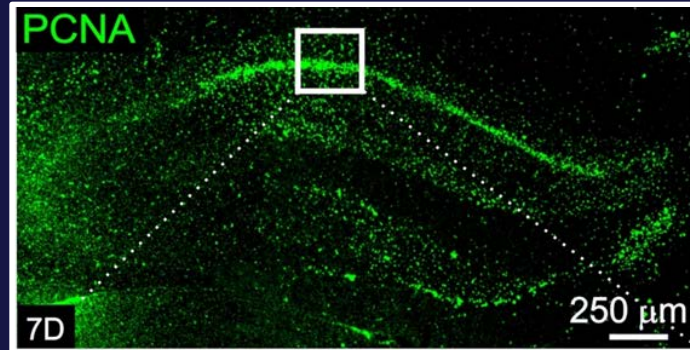
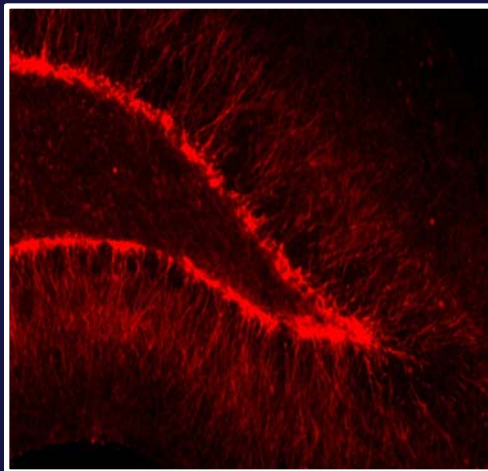
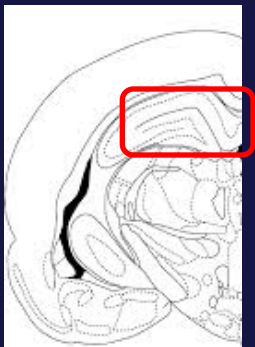
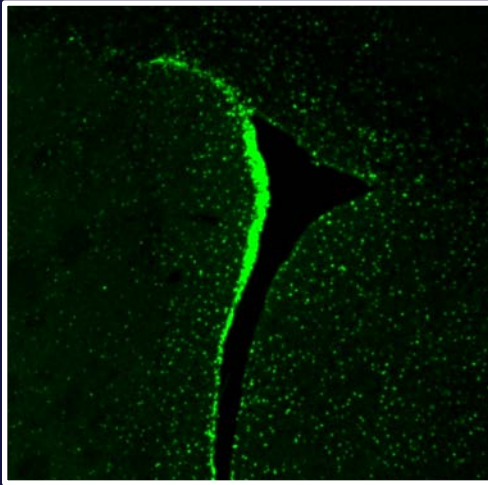
2 modely ischemického poškození mozku

-globální cerebrální ischemie

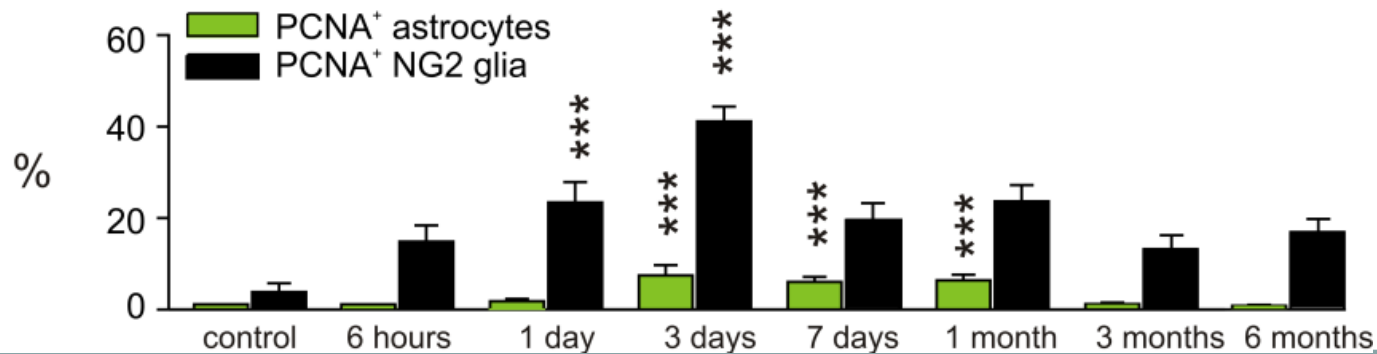
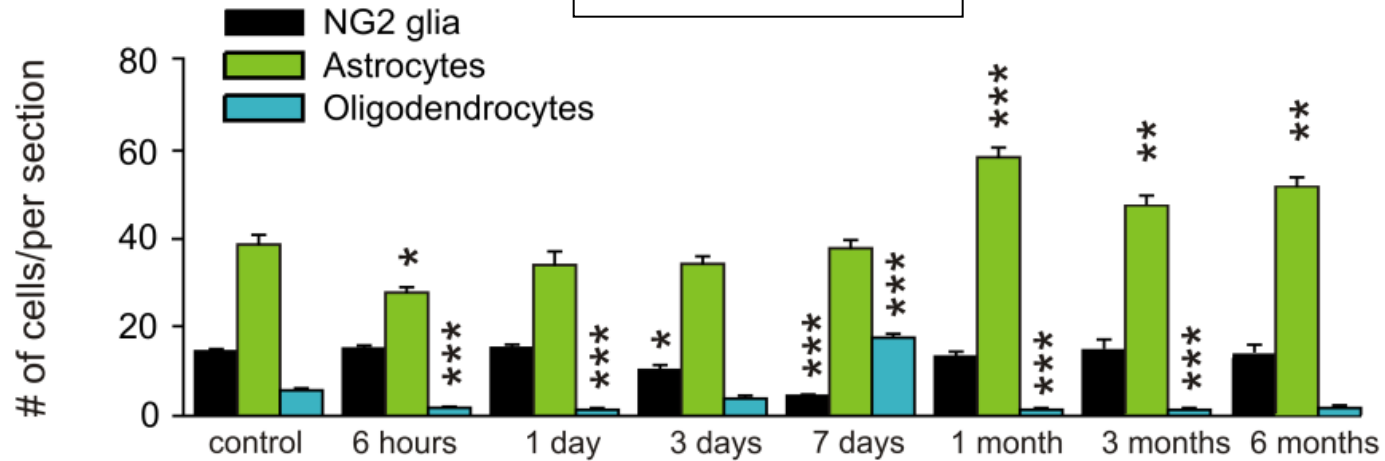
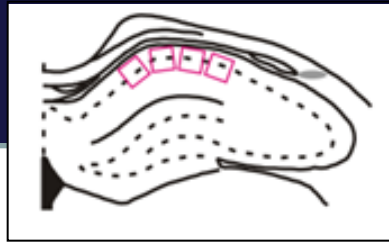
-fokální cerebrální ischemie

- Morfologické změny polydendrocytů
- Membránové vlastnosti polydendrocytů
- Proliferace polydendrocytů v ischemicky poškozené nervové tkáni
- Diferenciační potenciál polydendrocytů in vivo po ischemickém poškození mozku

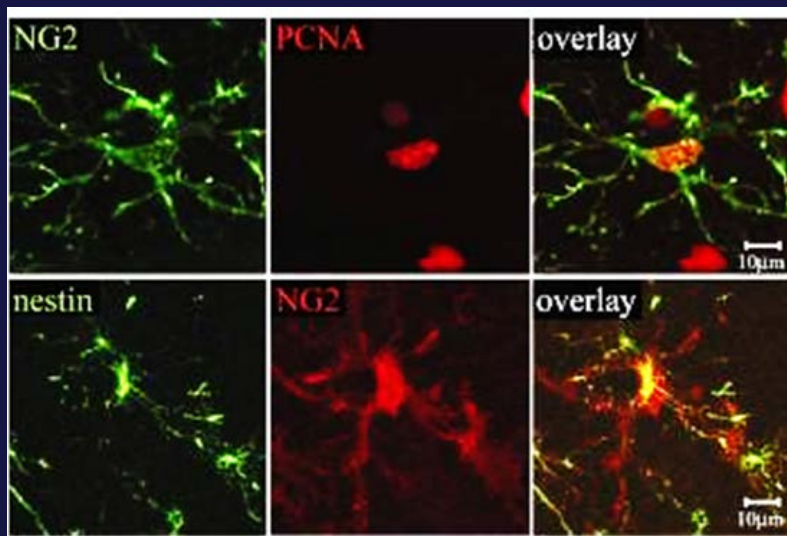
Zvýšená proliferace gliových buněk po GCI



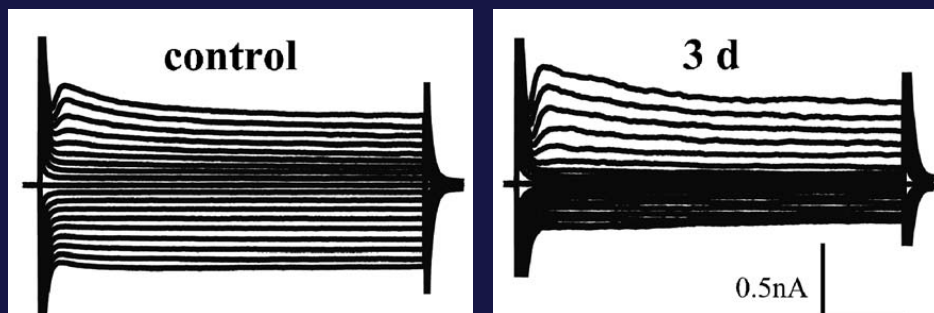
Proliferace-polydendrocyty a astrocyty



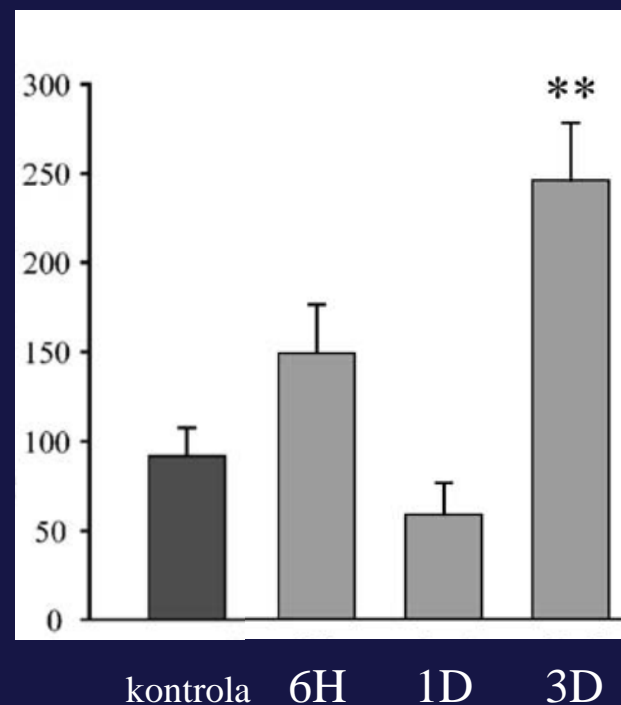
Proliferace a membránové vlastnosti polydendrocytů



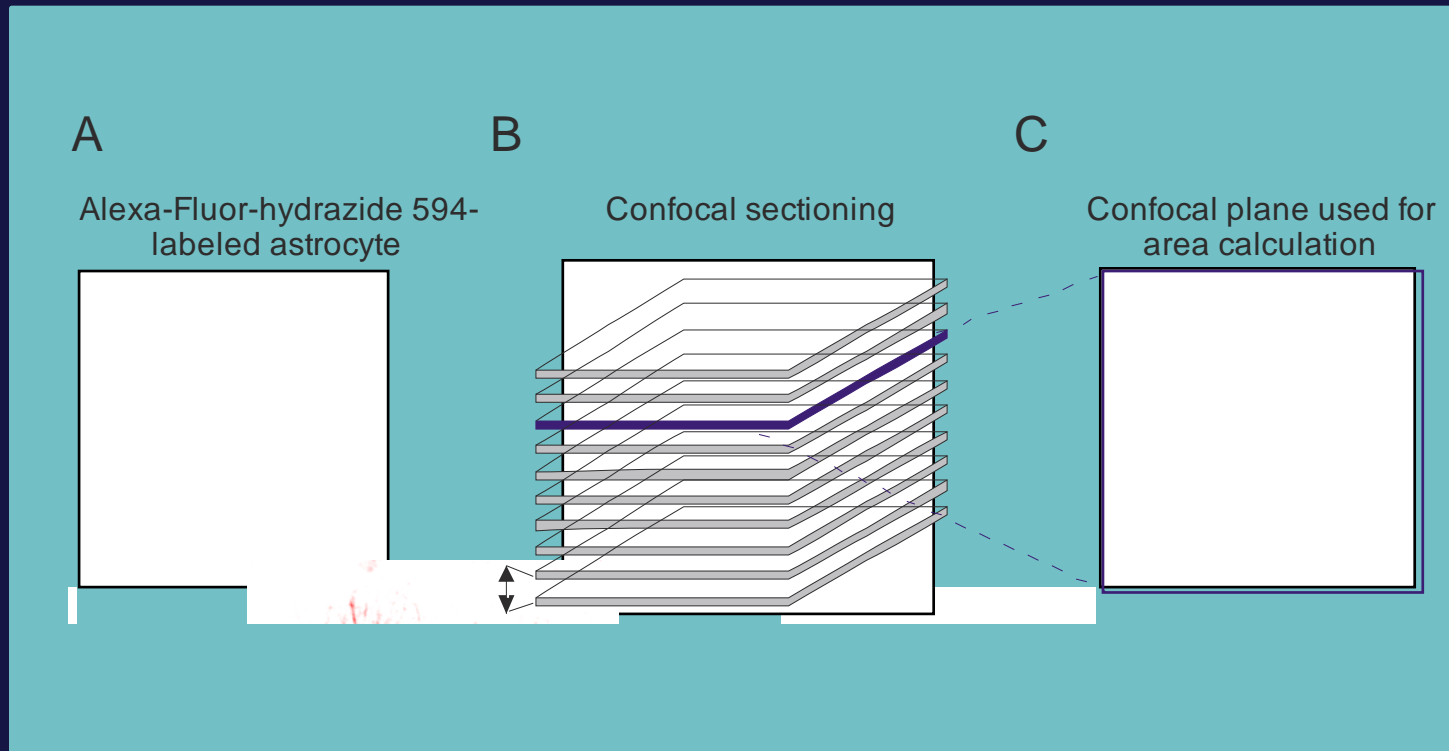
V_m, I_R, proudova hustota



K_A current density (pA/pF)

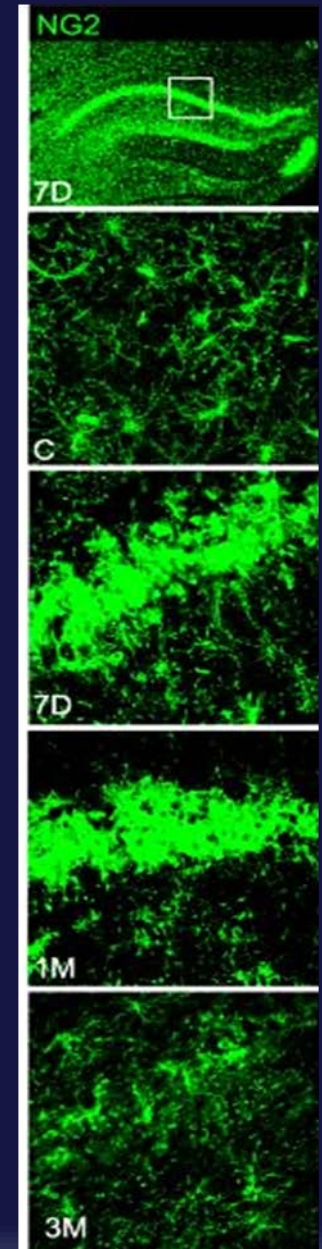
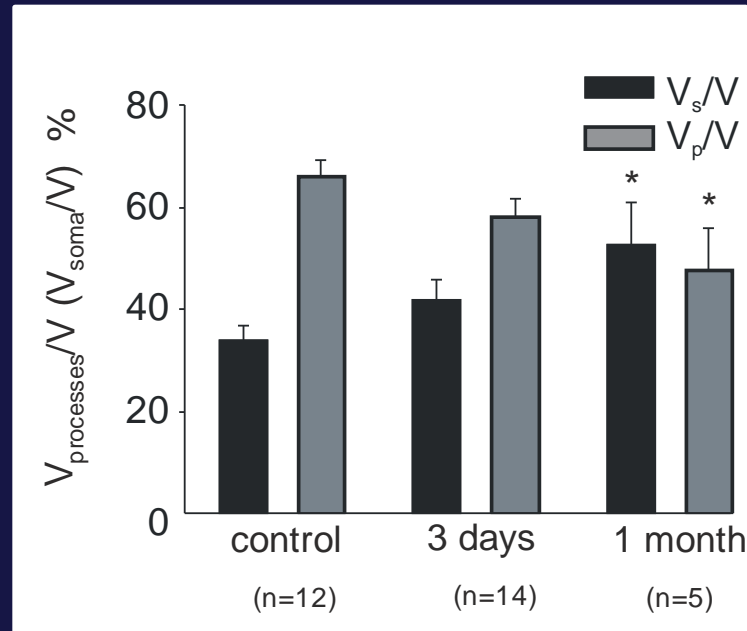
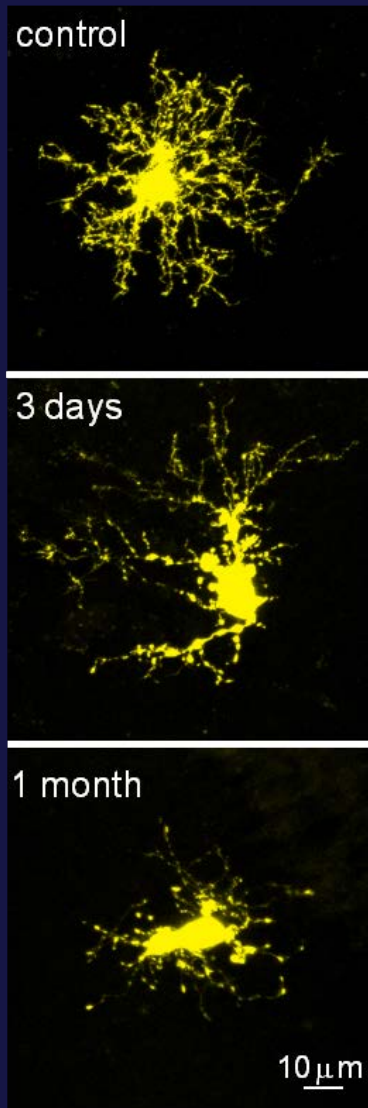


3D morfometrie - morfologické změny polydendrocytů



Změny morfologie NG2-glií po GCI

Součást gliální jizvy



Globální cerebrální ischemie má za následek

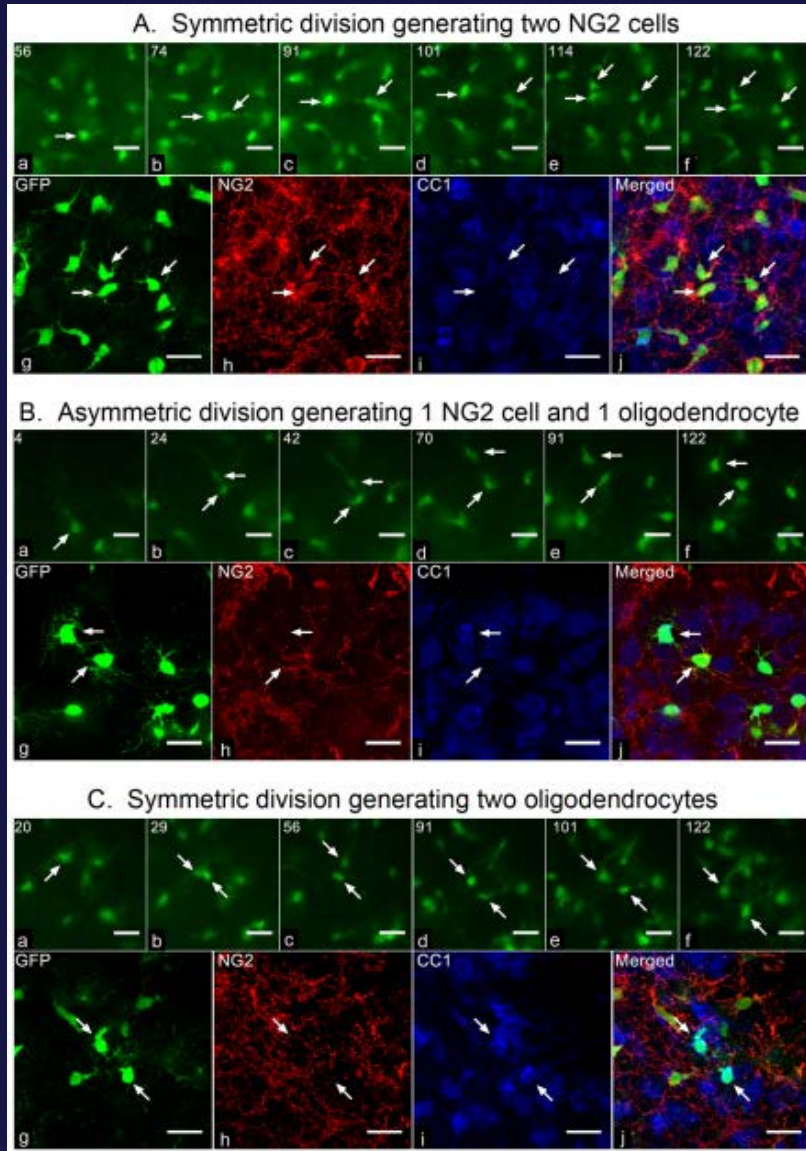
zvýšenou proliferaci polydendrocytů 3-7 den po GCI

*počet polydendrocytů ani oligodendrocytů
v hipokampu po ischemickém poškození nestoupá*

*počet astrocytů významně vzrůstá, i přestože
proliferace astrocytů je nízká*

Proliferace/diferenciace polydendrocytů in situ (P4)

-NG2 glie, oligodendrocyty



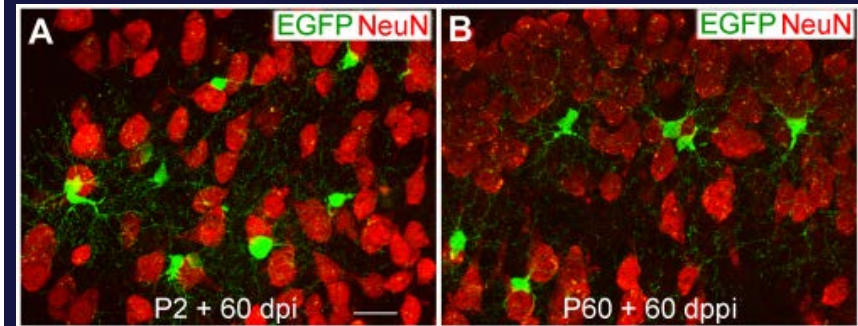
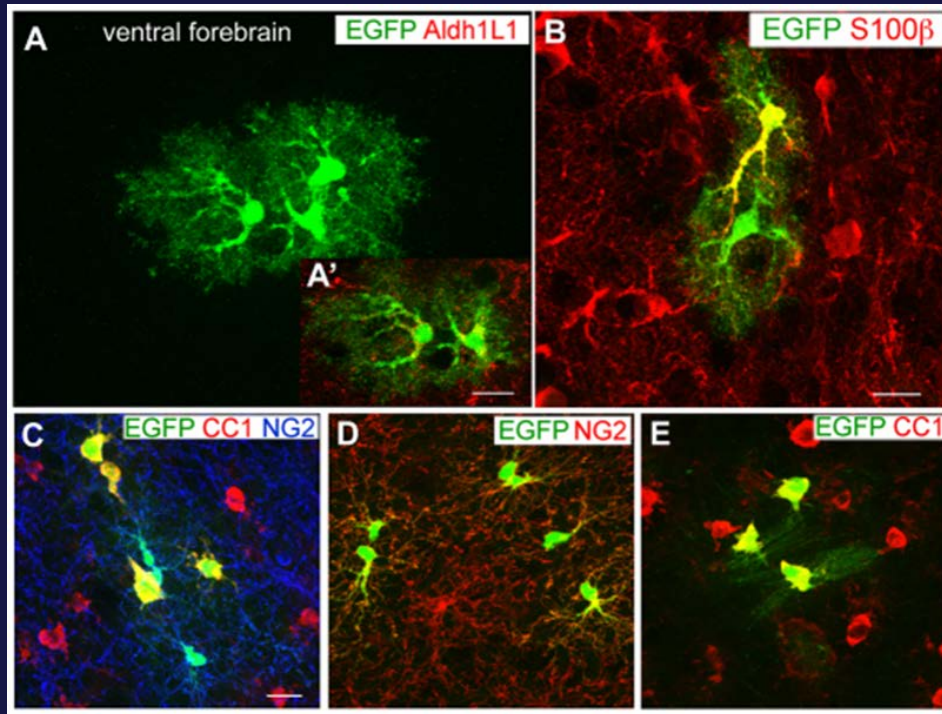
symetrické dělení
-vznik 2 NG2 glií

asymetrické dělení
-vznik 1 NG2 gliea 1 oligodendrocytu

symetrické dělení
-vznik 2 oligodendrocytů

Polydendrocyty dávají vznik subpopulaci astrocytů

NG2creERTM:ZEG P14



Indukce Cre E16.5

Polydendrocyty

heterogenní populace

NG2 glia in GM



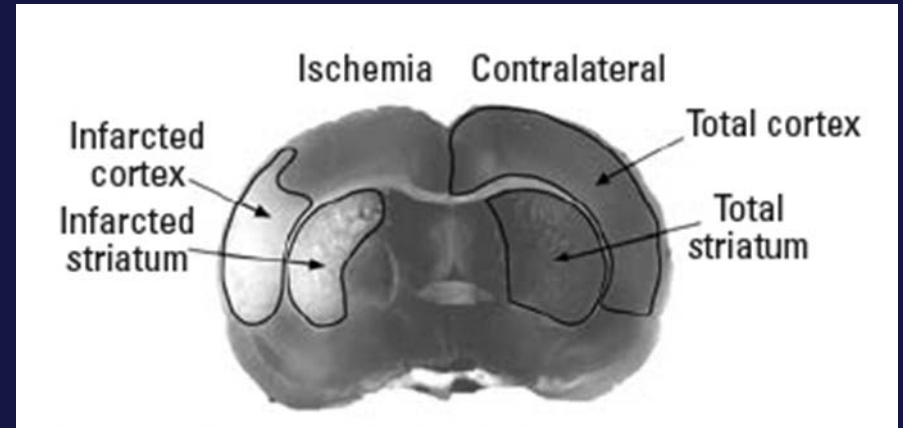
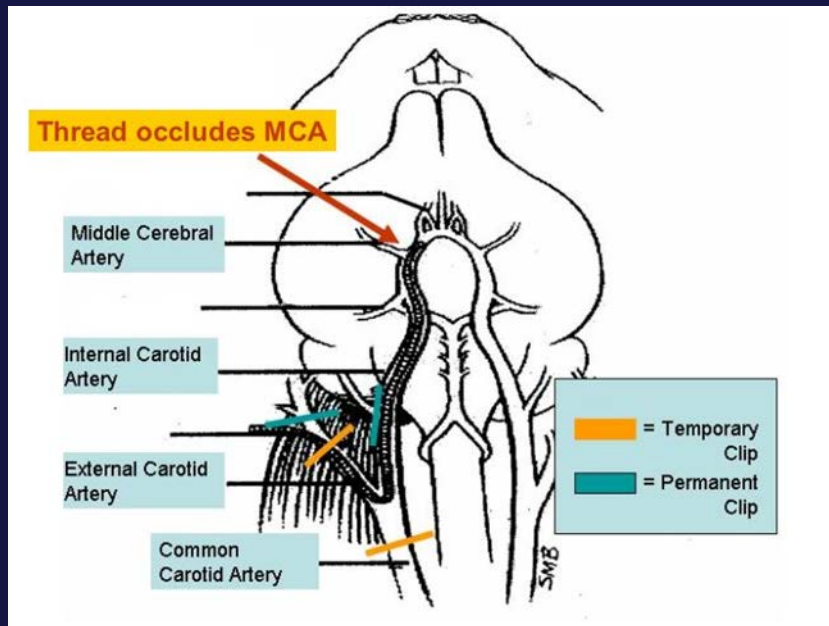
Astrocyty,
Polydendrocyty,
Neurony?

NG2 glia in WM



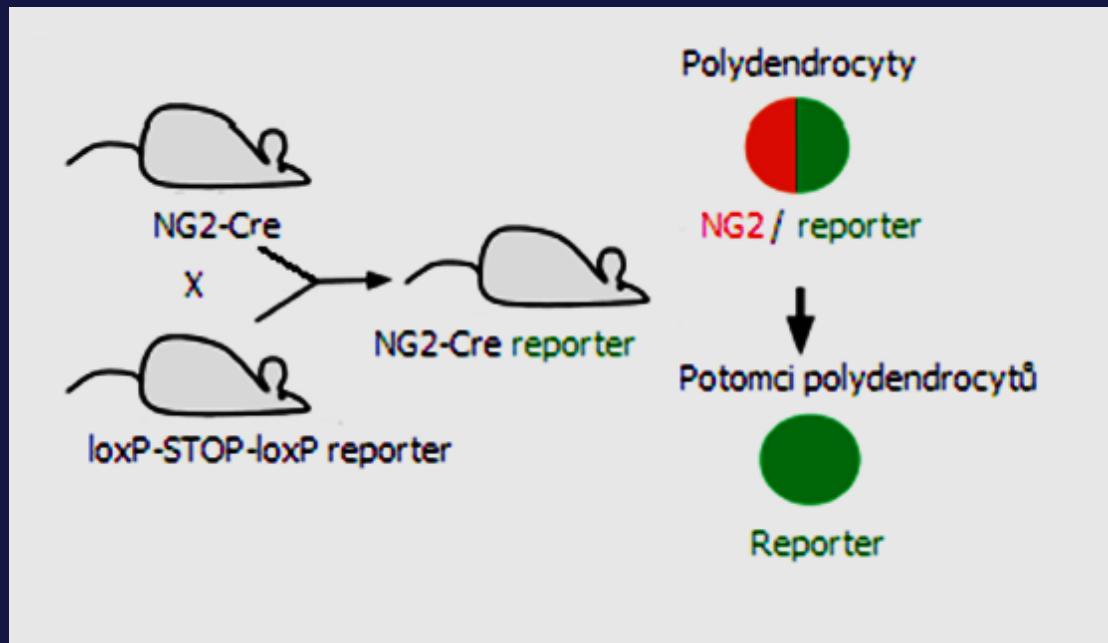
Oligodendrocyty
Polydendrocyty

Middle Cerebral Artery Occlusion

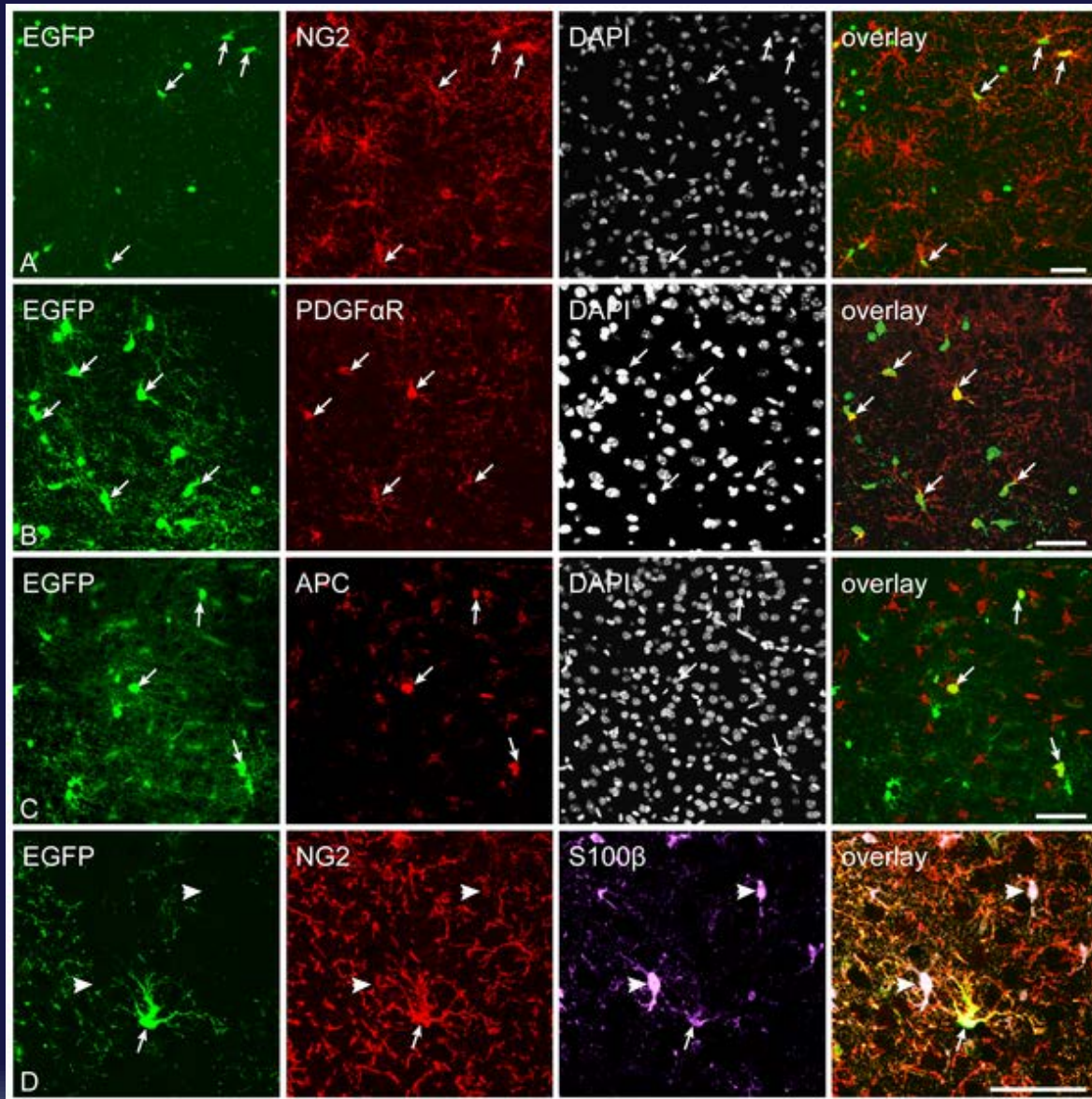


Vizualizace polydendrocytů: *NG2CreBAC:ZEG*

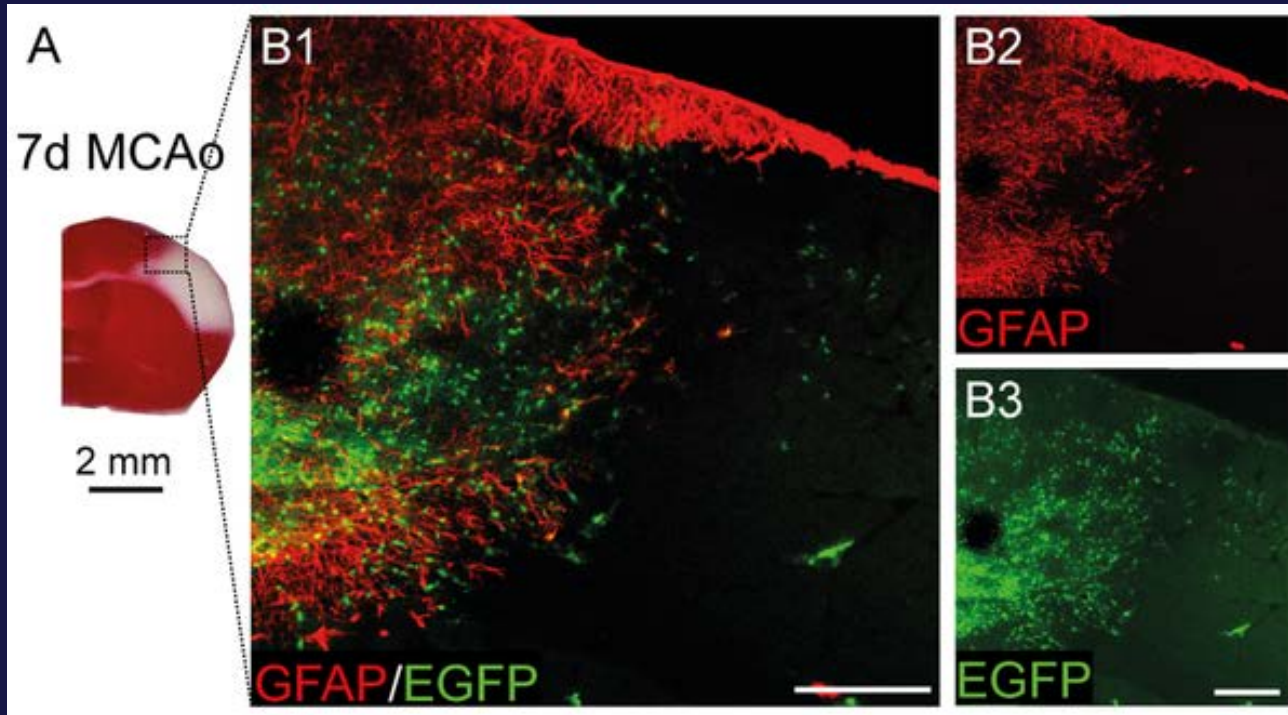
Cre recombináza exprimovaná v polydendrocytech (NG2 gliích) indukuje permanentní expresi EGFP



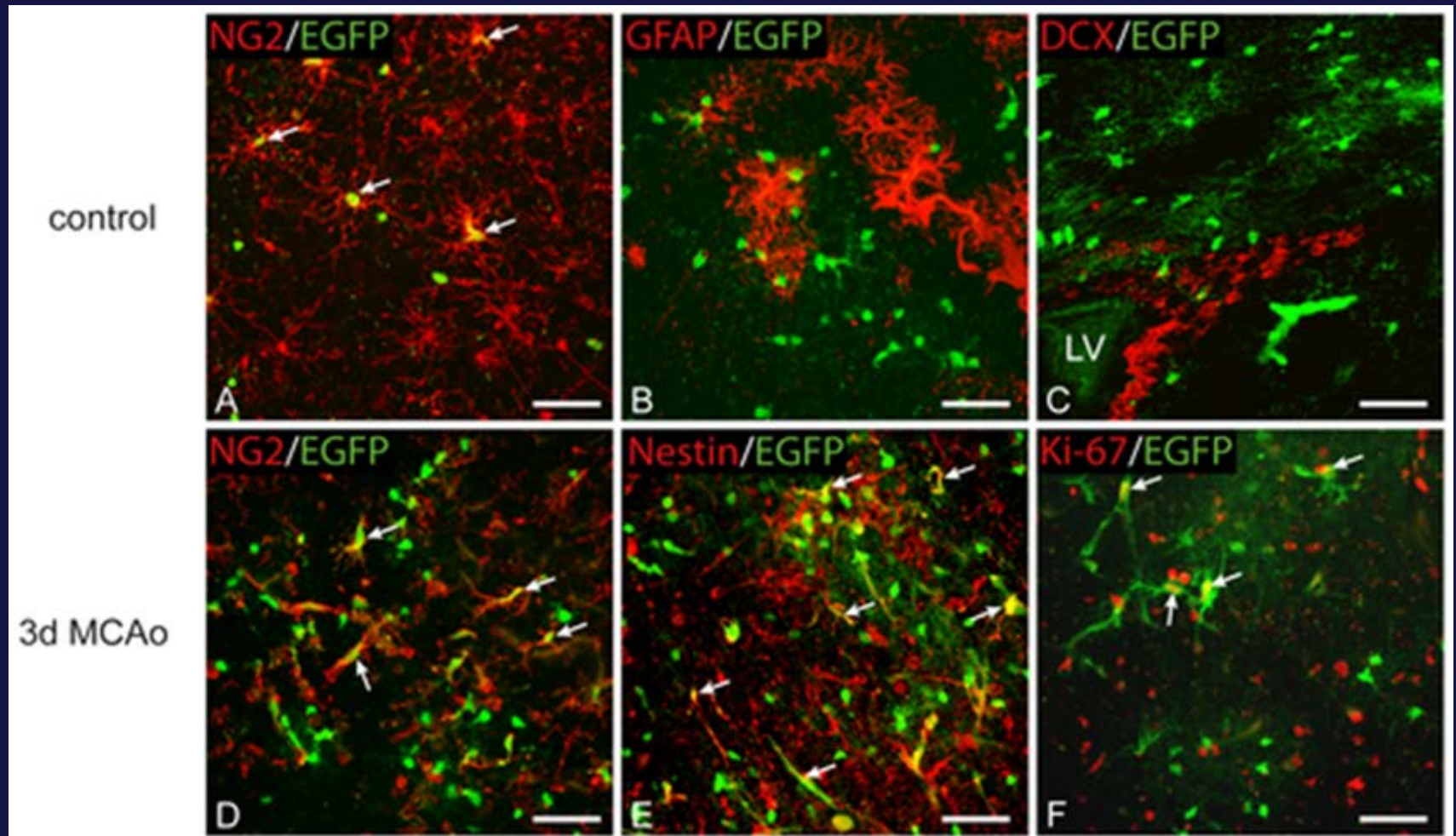
EGFP pozitivní polydendrocyty



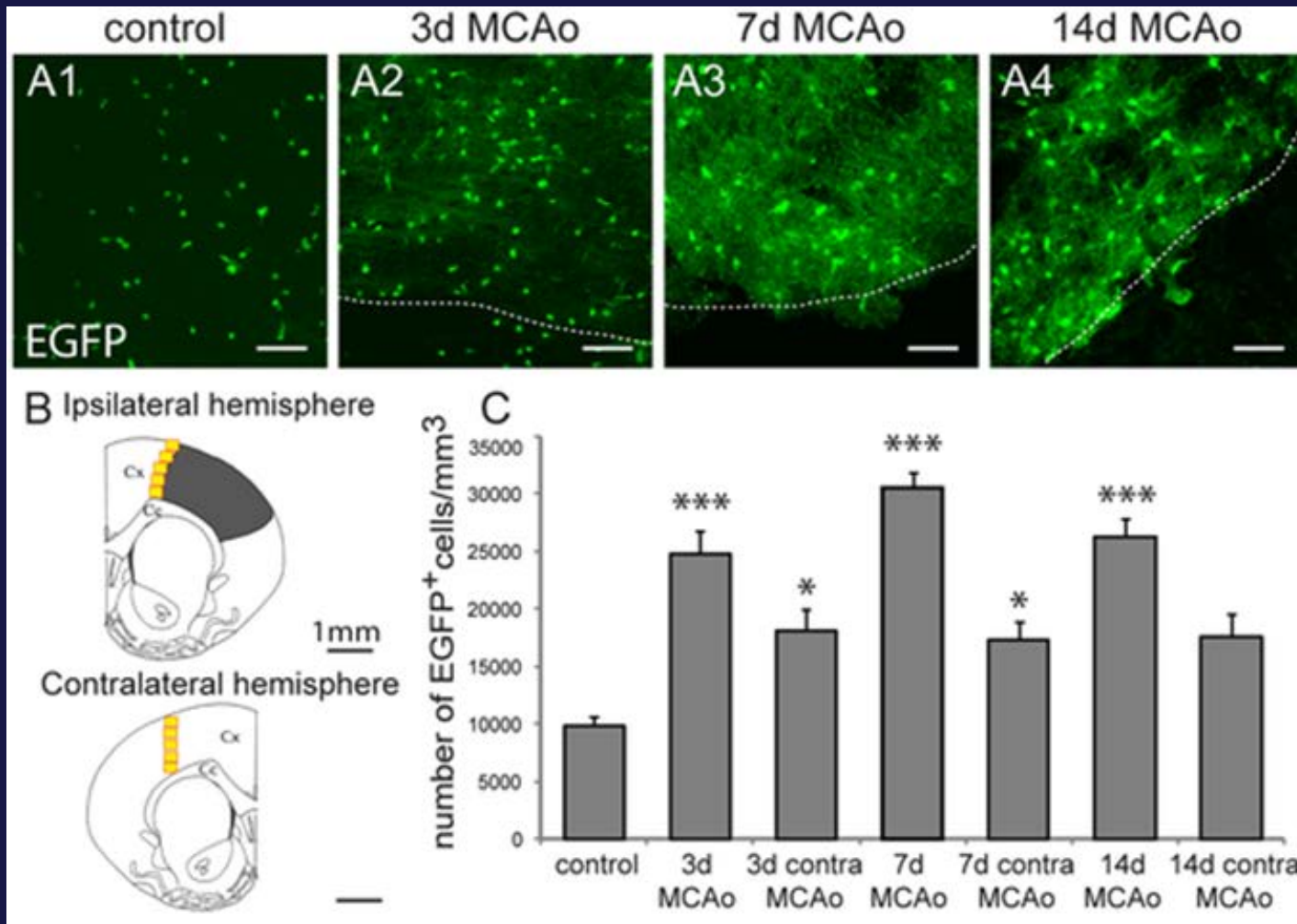
Fokální cerebrální ischemie



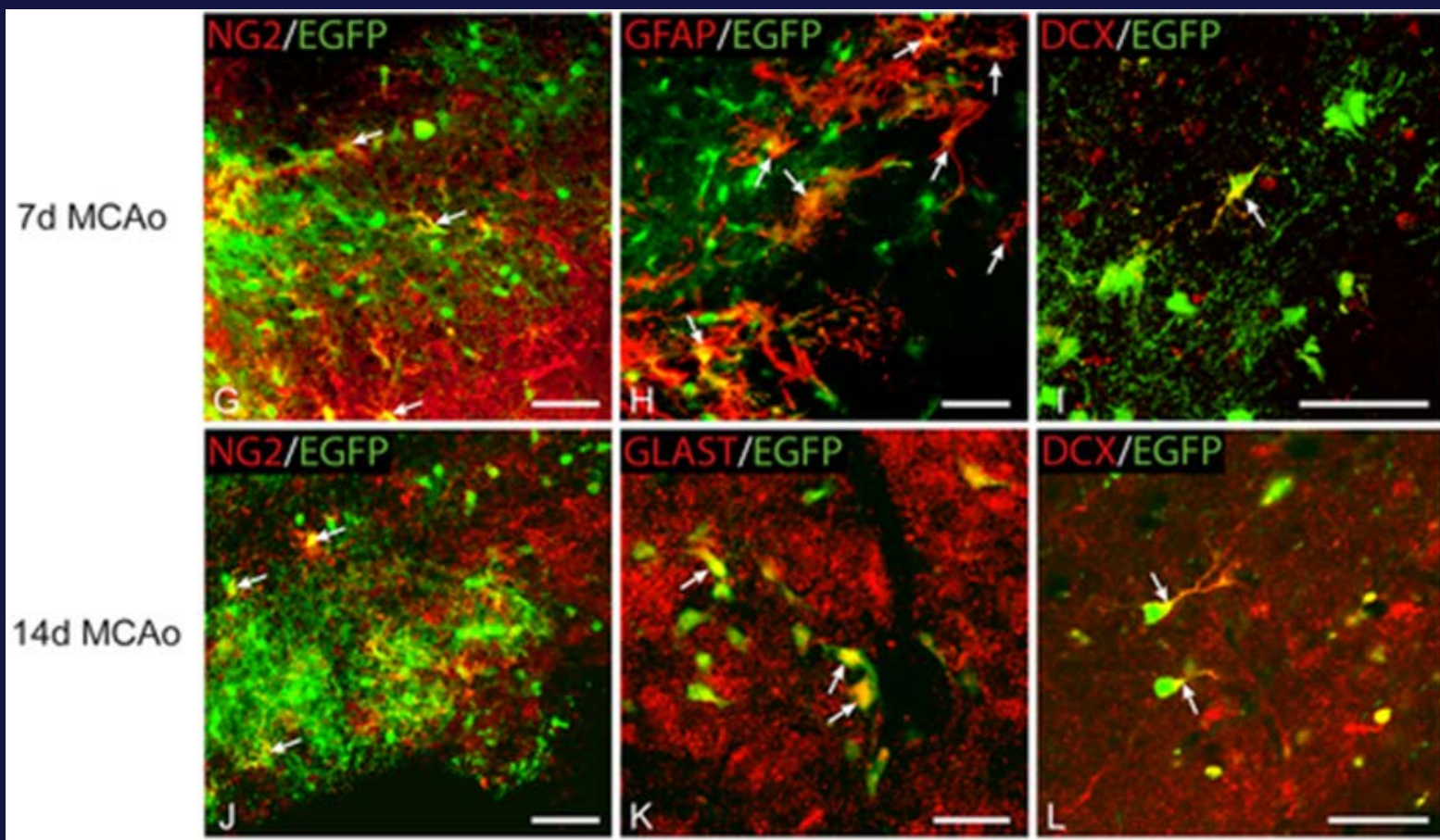
Zvýšená proliferace polydendrocytů 3 dny po FCI



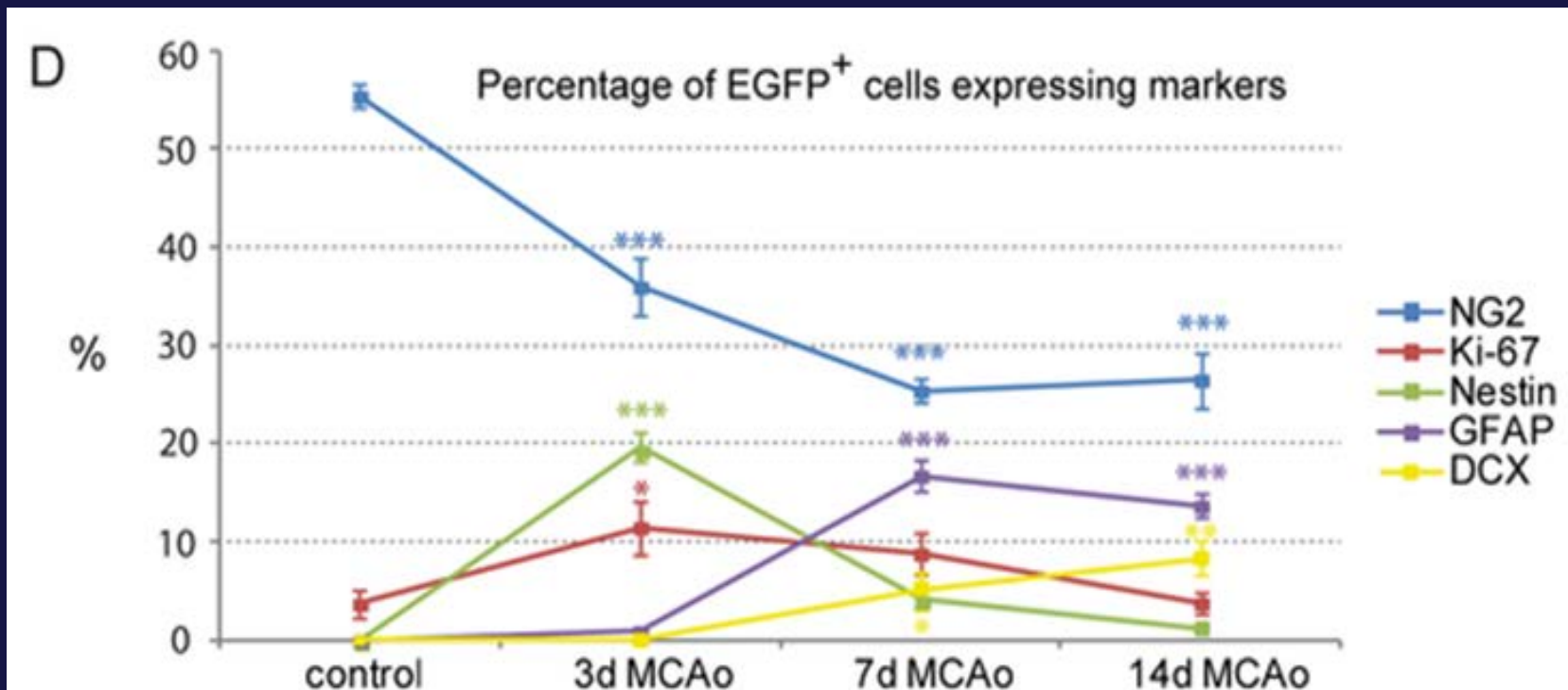
Zvýšená proliferace polydendrocytů po FCI



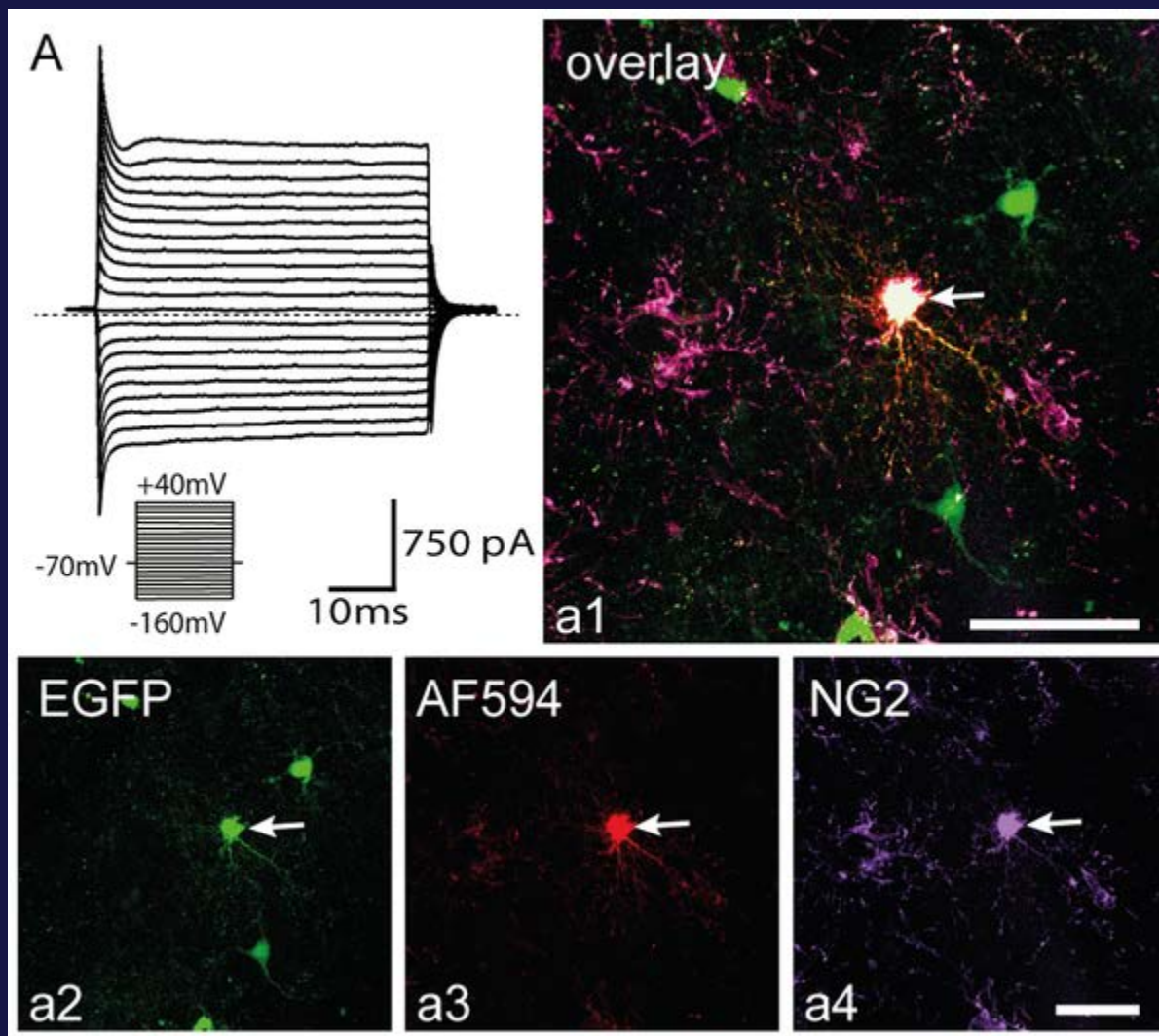
*Polydendrocyty dávajú vznik i astrocytùm a neuronùm
7-14 dní po FCI*



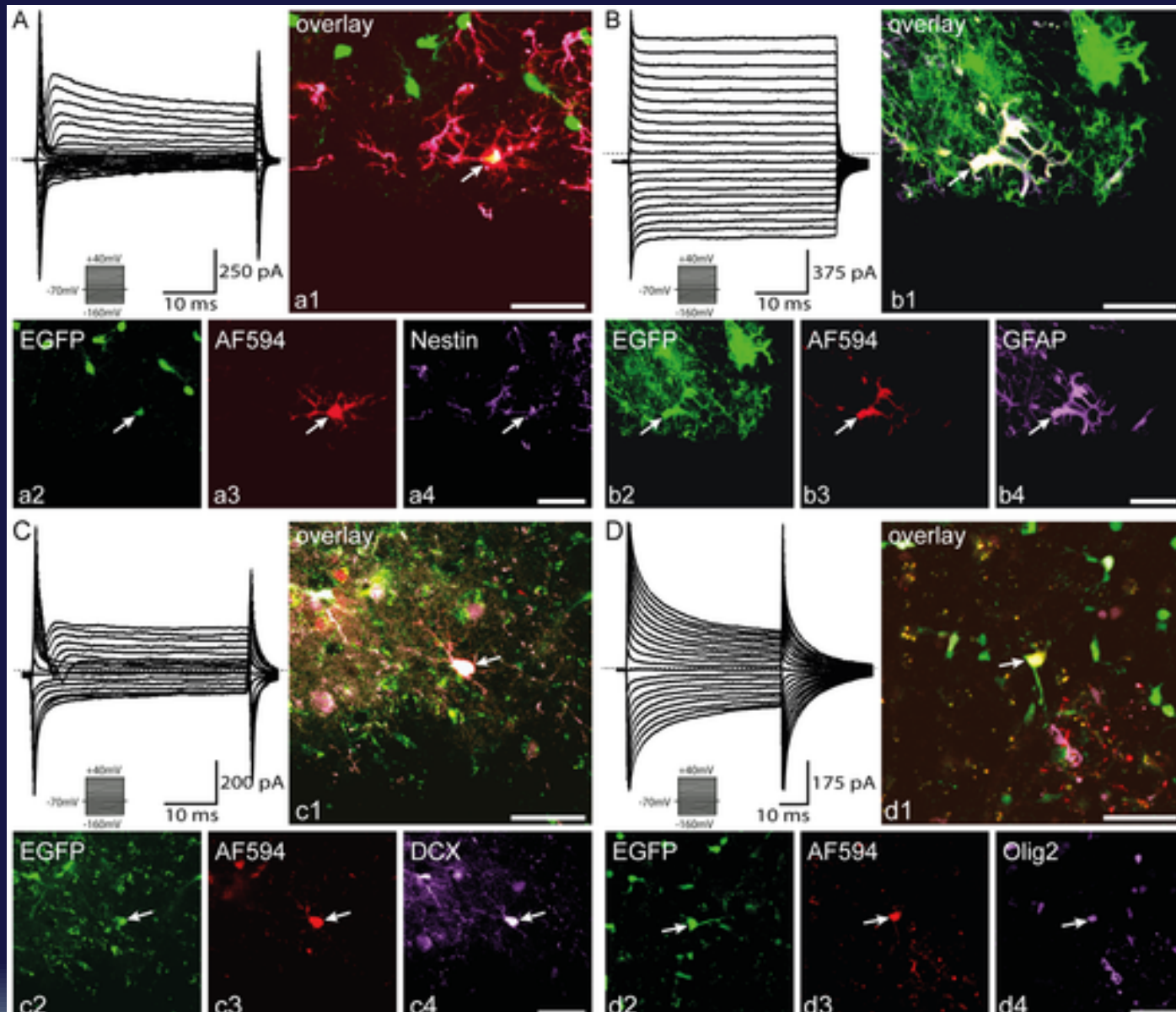
*Polydendrocyty dávají vznik i astrocytům a neuronům
7-14 dní po FCI*

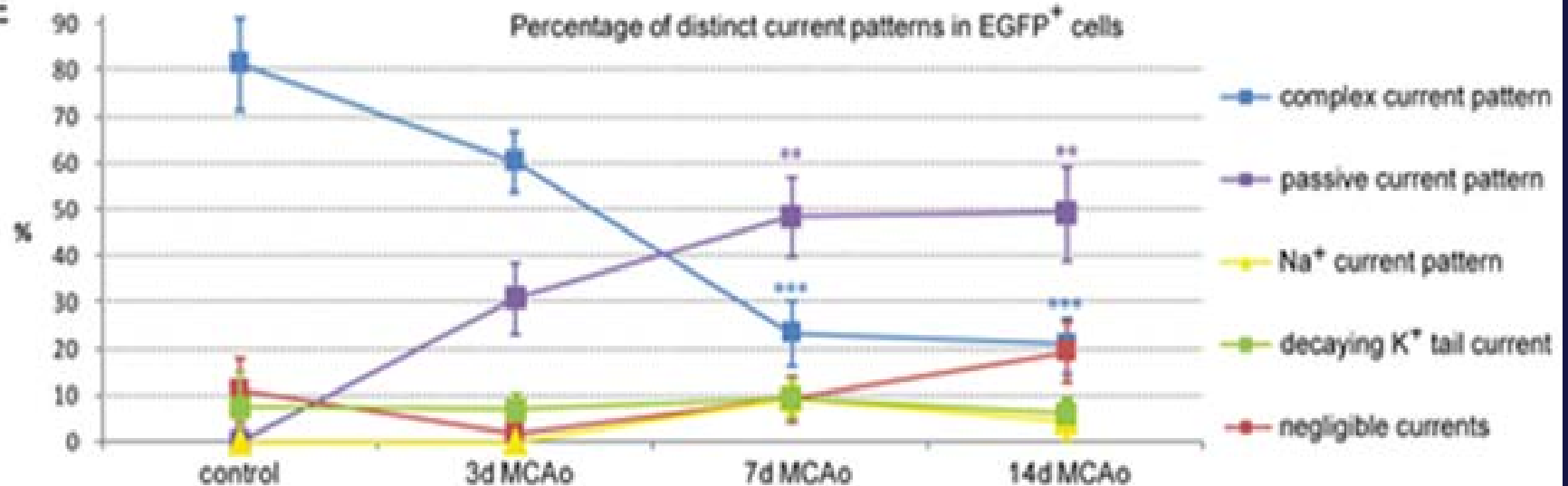


Membránové vlastnosti EGFP+ buněk v nepoškozené nervové tkáni



Membránové vlastnosti EGFP+ buněk po FCI



EPercentage of distinct current patterns in EGFP⁺ cells

Gliomy

- Nekontrolovaná proliferace astrocytů, polydendrocytů, oligodendrocytů
- uvolňování glutamátu, excitotoxicita, buněčná smrt neuronů (expanze gliomu)
- exprese metaloproteináz, destrukce extracelulární matrix v oblasti gliomu
- zmenšování objemu buněk gliomu-snazší migrace, Cl- kanály, aquaporiny 1,4,9

Děkuji za pozornost