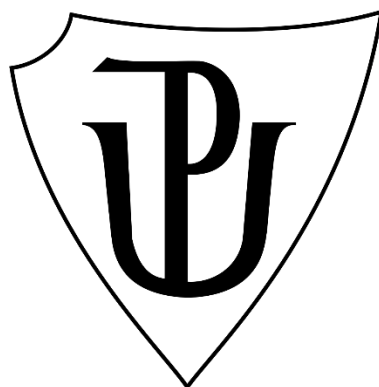


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Regenerace senzorických axonů po míšní lézi

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Lenka Bachanová
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Kateřina Štěpánková
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Podpis studentky

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce diplomové práce Mgr. Kateřině Štěpánkové za trpělivost, obětavost, cenné rady a odborné vedení, které mi věnovala během vypracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala vedoucí Oddělení regenerace nervové tkáně na Ústavu experimentální medicíny AV ČR doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D. a všem členům toho oddělení za pomoc a přátelské prostředí. Tato diplomová práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, č. 320421, a granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (CZ.02.1.01/0.0./0.0/15_003/0000419).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autorky	Bc. Lenka Bachanová
Název práce	Regenerace sensorických axonů po míšní lézi
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.
Vedoucí práce	Mgr. Kateřina Štěpánková
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Poranění páteřní míchy patří mezi nejvíce devastující poranění, která mohou člověka postihnou. Poškozené axony nemohou regenerovat ze dvou hlavních důvodů. Jednak proto, že se okolo léze tvoří gliová / fibrotická jizva, a jednak kvůli nízké regenerační schopnosti neuronů dospělé nervové tkáně. Moderní medicína není v současné době schopna poraněnou míchu léčit. Regenerace sensorických axonů se jeví po experimentální stránce snazší, kvůli uložení sensorických neuronů v dorzálních gangliích, nacházejících se mimo míšní tkáň. Pro léčbu regenerace poraněných sensorických axonů byla zkoumána kombinace genové terapie zprostředkované adeno-asociovanými virovými vektory a aplikace analogu cyklického 3',5'-adenosinmonofosfátu (cAMP) – dibutyryl cAMP – do dorzálních ganglií potkanů. Index regenerace poškozených sensorických axonů naznačil, že kombinace genové terapie a analogu cAMP nevedla k většímu funkčnímu zotavení sensorických axonů než v případě použití samostatných léčebných terapií. Další metody – imunohistochemie, Western blot a kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-qPCR, z angl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*) – byly použity k navržení mechanismu, jakým kombinovaná terapie funguje. Bylo zjištěno, že analog cAMP v kombinaci s genovou terapií snižuje transdukční účinnost virového vektoru. Použitím RT-qPCR bylo zjištěno, že dibutyryl cAMP ovlivňuje genovou expresi virového vektoru již na úrovni transkripce. Kombinace genové terapie a analogu cAMP nebyla dosud zkoumána, proto výsledky této práce mají důležitý význam pro další výzkum zaměřený nejen na terapie sensorických deficitů po poranění míchy, ale i na odvětví genové léčby centrální nervové soustavy.

Klíčová slova	mícha, senzorické dráhy, axon, dorzální ganglion, poranění míchy, gliová / fibrotická jizva, terapie senzorických deficitů, genová terapie, integrin, cAMP, dibutyryl cAMP
Počet stránek	72
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Lenka Bachanová
Title	Regeneration of sensory axons after spinal cord injury
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Experimental Medicine CAS, v. v. i.
Supervisor	Mgr. Kateřina Štěpánková
The year of presentation	2024

Abstract

Spinal cord injury is one of the most devastating injury that can affects a person. Damaged axons can't regenerate for two main reasons. First, because glial / fibrotic scar forms around the lesion, and second, because of the low regenerative capacity of adult neurons. Modern medicine is currently unable to treat the injured spinal cord. Regeneration of sensory axons appears experimentally easier, due to the storage of sensory neurons in dorsal root ganglia located outside the spinal cord tissue. A combination of gene therapy mediated by adeno-associated viral vectors and application of the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP) analogue – dibutyryl cAMP – injected into rat dorsal root ganglia was investigated for the treatment of regeneration of injured sensory axons. An index of regeneration of damaged sensory axons indicated that the combination of gene therapy and the cAMP analogue didn't lead to greater functional recovery of sensory axons than when the separate therapies were used. Other methods – immunohistochemistry, Western blot, and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) – were used to propose a mechanism by which the combination therapy works. The cAMP analogue in combination with gene therapy was found to reduce the transduction efficiency of the viral vector. Using RT-qPCR was found that dibutyryl cAMP affects gene expression of the viral vector already at the transcriptional level. The combination of gene therapy and cAMP analogue hasn't been investigated, therefore the results of this thesis have important implications for further research aimed not only at the therapy of sensory deficits after spinal cord injury, but also at the field of gene therapy of the central nervous system.

Keywords	spinal cord, sensory pathways, axon, dorsal root ganglion, spinal cord injury, glial / fibrotic scar, sensory deficit therapy, gene therapy, integrin, cAMP, dibutyryl cAMP
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	2
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	4
2.1	Pátevní mícha	4
2.2	Senzorické dráhy míchy.....	6
2.2.1	Spinothalamické dráhy.....	6
2.2.2	Dráha zadních míšních provazců	6
2.2.3	Dráhy propioceptivní citlivosti	6
2.3	Typy sensorických neuronů v dorzálních gangliích	7
2.3.1	Klasifikace neuronů podle přenášené informace	8
2.3.2	Klasifikace neuronů podle velikosti.....	8
2.3.3	Klasifikace neuronů podle syntetizující látky	8
2.4	Poranění pátevní míchy	8
2.4.1	Patofyziologie poranění	10
2.5	Limitující faktory regenerace dospělé CNS.....	11
2.5.1	Gliová / fibrotická jizva	12
2.5.1.1	Nebuněčné složení	12
2.5.1.2	Buněčné složení	12
2.5.1.2.1	Astrocyty	13
2.5.1.2.2	Mikroglie.....	13
2.5.1.2.3	Neutrofilly a makrofágy.....	13
2.5.1.2.4	Oligodendrocytové progenitové buňky.....	14
2.5.1.2.5	Fibroblasty a endoteliální buňky.....	14
2.6	Terapie sensorických deficitů po míšní lézi	16
2.6.1	Genová terapie	17
2.6.1.1	Vektory virové	18
2.6.1.1.1	Vektory retrovirové.....	18
2.6.1.1.2	Vektory lentivirové	19
2.6.1.1.3	Vektory adenovirové.....	19
2.6.1.1.4	Vektory adeno-asociované.....	19
2.6.1.2	Vektory nevirové.....	20
2.6.1.3	Využití integrinů v genové terapii	21
2.6.2	Regenerace sensorických axonů pomocí signalizace cAMP	24
2.6.2.1	Signalizace cAMP.....	24
2.6.2.2	Role cAMP v regeneraci dospělé CNS	24

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Materiál	27
3.1.1	Laboratorní zvířata	27
3.1.2	Adeno-asociovaný virový vektor	27
3.1.3	Chemikálie	27
3.1.3.1	Protilátky	28
3.1.4	Připravené roztoky	28
3.1.4.1	Diferenciační roztok	28
3.1.4.2	Luxolová modř	28
3.1.4.3	Odmývací pufr	29
3.1.4.4	Přenosový pufr	29
3.1.4.5	Tris-nepufrovaný fyziologický roztok	29
3.1.4.6	Tris-pufrovaný fyziologický roztok s Tween 20	29
3.1.4.7	Vzorkový pufr	29
3.1.5	Pomůcky	29
3.1.6	Přístrojové vybavení	30
3.1.7	Použitý software	31
3.2	Metody	31
3.2.1	Poranění míchy u laboratorních zvířat	31
3.2.1.1	Laboratorní podmínky	31
3.2.1.2	Chirurgický zákrok	31
3.2.2	Histologické zpracování tkáně	32
3.2.3	Histologické barvení	32
3.2.3.1	Imunohistochemické barvení	32
3.2.3.2	Barvení luxolovou modří	34
3.2.4	Mikroskopie	34
3.2.5	Western blot	34
3.2.6	Polymerázová řetězová reakce	37
3.2.6.1	Izolace RNA	37
3.2.6.2	Přepis RNA do cDNA	37
3.2.6.3	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase	38
4	VÝSLEDKY	39
4.1	Index regenerace poškozených sensorických axonů	39
4.2	Transdukční účinnost virového vektoru	41
4.3	Molekulární vliv db-cAMP na složení jizvy	44
4.4	Ovlivnění genové exprese AVV vektoru v rámci genové terapie	49

5	DISKUSE	51
6	ZÁVĚR	56
7	LITERATURA	58
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	71

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

1. Sepsání literární rešerše zaměřené na anatomii a funkci míchy v těle, sensorické dráhy míchy, míšní poranění, limitující faktory regenerace nervové tkáně po poranění a terapii sensorických deficitů po poranění míchy.

Experimentální část

1. Porovnání regenerační kapacity sensorických axonů po poranění míchy pomocí genové terapie zprostředkované adeno-asociovanými virovými vektory exprimujícími integrin $\alpha 9$ v kombinaci s jeho aktivátorem kindlinem 1 bez a po aplikaci analogu cAMP – dibutyryl cAMP – do dorzálních ganglií potkanů.
2. Stanovení množství inhibičních molekul v míšní lézi po aplikaci adeno-asociovaných virových vektorů / dibutyryl cAMP nebo kombinované léčby do dorzálních ganglií.
3. Ověřit, zda dibutyryl cAMP skutečně ovlivňuje tvorbu jizvy okolo míšní léze.
4. Zjistit, zda je nějakým způsobem ovlivněna exprese genů vnesených adeno-asociovanými virovými vektory v rámci genové terapie.

1 ÚVOD

Poranění míchy (PM) představuje devastující neurologickou změnu ve fungování páteřní míchy, které má přímý dopad na fyzický i psychický stav pacienta. Jedná se o závažný neurologický stav, ve kterém dochází podle lokalizace a rozsahu vzniklé léze k částečné, nebo úplné ztrátě motorických, senzoryckých a vegetativních funkcí v těle (Faltýnková, 2012; Curtis et al., 2018; Kříž et al., 2019). K traumatickému PM nejčastěji dochází přímým mechanickým zásahem do míšňní tkáňe například během autonehod či pádů z výšky (Smith et al., 2005; Hall et al., 2019; Kříž et al., 2019). Mezi netraumatické příčiny PM potom patří například vaskulární nemoci, nádory ale i infekční onemocnění nebo roztroušená skleróza (Amezcuca et al., 2013; New & Marshall, 2014; Ge et al., 2019). Následkem PM dochází ke spuštění série biochemických a imunologických reakcí (Rowland et al., 2008; Wang et al., 2014a; Tran et al., 2018). Jedním z důsledků PM je také vznik gliové / fibrotické jizvy. Tvorba jizvy je dynamický proces, který zahrnuje spolupráci celé řady buněk. Gliová / fibrotická jizva vzniká primárně proto, aby zabránila šíření poškození během rané fáze (několik prvních hodin až dnů) po poranění. S postupem času však jizva vytváří mechanickou ale i biochemickou bariéru pro regenerující axony (Wang et al., 2002; Carbajal et al., 2011). Po PM nemohou axony regenerovat za prvé proto, že prostředí léze inhibuje růst axonů, a za druhé proto, že většina poškozených axonů vyvolá pouze slabou regenerační odpověď (Wang et al., 2002; Day et al., 2004; Dylevský, 2016; Hara et al., 2017). V porovnání s obnovou motorických axonů se regenerace senzoryckých axonů jeví proveditelnější díky uložení senzoryckých neuronů v dorzálních gangliích (DRG, z angl. *dorsal root ganglia*), tedy mimo samotnou míchu (Čihák, 2016). Dalším důvodem potom je, že neurony v DRG mají vyšší regenerační kapacitu v porovnání s míšňními motoneurony (Bolívar & Udina, 2022; Shen et al., 2023). Jedním z možných způsobů, jak senzorycké funkce po PM obnovit, může být genová terapie, například zprostředkovaná pomocí adeno-asociovaných virových (AAV) vektorů. Při AAV genové terapii je do senzoryckých neuronů v DRG vložena sekvence DNA kódující v dospělosti chybějící molekulu zvanou integrin $\alpha 9$, tato sekvence zůstává extrachromosomálně. Integrin $\alpha 9$ je membránový receptor, který se váže na glykoprotein tenascin C, který je vysoce upreagulovaný v oblasti jizvy, díky čemuž umožňuje regenerujícím axonům využít toto inhibiční prostředí ve prospěch regenerace míchy, a tak pomoci k obnově ascendentních senzoryckých drah (Cheah et al., 2016; Štěpánková et al., 2023). Dalším nadějným experimentálním přístupem léčby PM je aplikace analogu

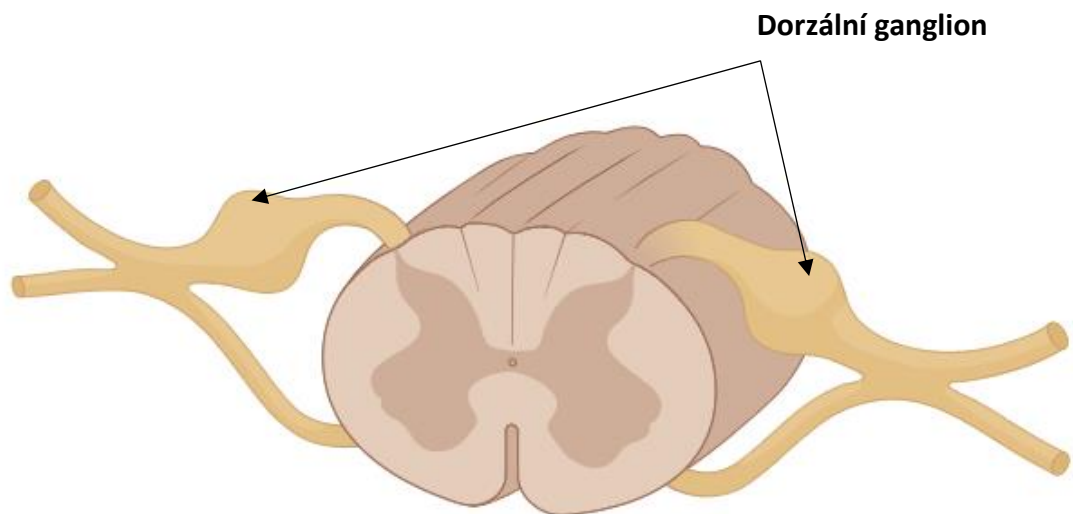
cAMP – dibutyryl cAMP (db-cAMP) – do místa léze ale i do DRG. Mnoho studií podporuje teorii, že aplikací db-cAMP byla podpořena funkční rekonstrukce senzorických drah bez vedlejších účinků ovlivňujících jiné buněčné procesy probíhající v těle (Kajana & Goshgarian., 2008; Lau et al., 2013; Xia et al., 2017).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Páteřní mícha

Centrální nervová soustava (CNS) představuje koordinační a rozhodovací centrum nervové soustavy a je tvořena mozkem a páteřní míchou. Páteřní mícha (lat. *medulla spinalis*) je trubice nervové tkáně, která plynule pokračuje z prodloužené míchy podél páteřních obratlů (Čihák, 2016). Mícha prochází páteřním kanálem a lze ji nalézt v rozmezí od velkého týlního otvoru do úrovně třetího bederního obratle (L, z lat. *vertebra lumbalis*) u novorozenců, u dospělých jedinců do úrovně L1 až L2 (Fiala & Valenta, 2020). Mícha je na svém povrchu obalena vazivovými vrstvami tvořícími míšními obaly, které odpovídají jednotlivým mozkovým obalům. Barva míchy je především ovlivněná svazky myelinizovaných vláken, nacházejících se na jejím povrchu, které dodávají míše bílý až světle nažloutlý odstín (Druga et al., 2011). U člověka se délka míchy pohybuje v rozmezí 40 až 50 cm, široká je přibližně od 10 až 13 mm a váží okolo 30 až 35 g. Mícha je rozdělena na 31 segmentů, mezi jednotlivými segmenty ovšem nejsou patrné ostré hranice. Z každého míšního segmentu vychází nervová vlákna pro jeden pár míšních nervů. U člověka vystupuje z míchy 31 párů míšních nervů - 8 krčních, 12 hrudních, 5 bederních, 5 křížových a 1 kostrční. Z míchy vystupují jednak somatická (motorická a senzitivní) nervová vlákna, a jednak vegetativní nervová vlákna. Z předních míšních kořenů vystupují sestupná (motorická) nervová vlákna, naopak do zadních míšních kořenů vstupují vzestupná (senzitivní) nervová vlákna. V zadních kořenech míšních nervů jsou lokalizována DRG – nervové uzliny větvenitého charakteru, ve kterých se nacházejí perikarya pseudounipolárních neuronů, schopná přenášet signály z nervových zakončení periferních nervů do CNS (Čihák, 2016). Mícha je tvořena bílou hmotou míšní (lat. *substantia alba*) a šedou hmotou míšní (lat. *substantia grisea*), kdy šedá hmota míšní je obklopena bílou hmotou míšní. Ve středu šedé hmoty míšní je uložen úzký míšní kanál vyplněný mozkomíšním mokem. Bílá hmota míšní je tvořena z nervových vláken obalených myelinovou pochvou, zatímco šedá hmota míšní obsahuje těla neuronů. Na příčném řezu míšní tkáně (viz Obr. 1) je patrné, že šedá hmota míšní vybílá kolem míšního kanálku ventrálně a dorzálně, vytváří se tak dva přední a dva zadní rohy míšní tvarem připomínající písmeno H nebo siluetu motýla (Fiala & Valenta, 2020). Příčný řez míšní tkáně je převážně kruhovitěho tvaru, pouze v krčním a horním hrudním úseku je příčný řez míchy oválného charakteru (Čihák, 2016). Mícha zastává v těle dvě funkce, a to převodní a reflexní. Převodní funkce míchy spočívá v nápomoci vedení

signálů z mozku (eferentní neurony) do těla nebo naopak z periferních nervů (aferentní neurony) do mozku. Vedením nervového signálu do receptoru zajišťuje mícha jednoduchou pohybovou aktivitu, která ovlivňuje sympatikus i parasympatikus (Fiala & Valenta, 2020). Páteřní míchou prostupují dvě základní míšné dráhy a jedna doplňková. Mezi základní míšné dráhy se řadí vzestupná (senzitivní) a sestupná (motorická) dráha. Jako doplňková míšná dráha se uvádí propriospinální, která propojuje jednotlivé míšné segmenty. Všechny míšné dráhy jsou tvořeny vlákny bílé míšné hmoty (Druga et al., 2011).



Obr. 1: Příčný řez míchou s detailem na DRG, lokalizovaná mimo míšné tkáň. Vytvořeno v BioRender.com.

2.2 Senzorické dráhy míchy

Informace zachycené smyslovými receptory na periférii (např. v kůži, svalech, šlachách) jsou přenášeny vzestupnými nervovými drahami z bílé hmoty míšni do mozku. Prvním neuronem dráhy je zpravidla pseudounipolární buňka DRG, nebo neuron nacházející se v šedé hmotě míšni, která přijímá primární sensorickou informaci. Existuje mnoho sensorických drah a drah, které přenášejí různé typy smyslových informací z oblasti periferie do mozkové kůry. U člověka mezi hlavní smyslové dráhy patří spinothalamické dráhy, dráhy zadních míšních provazců a propioceptivní citlivosti (Daroff & Aminoff, 2014).

2.2.1 Spinothalamické dráhy

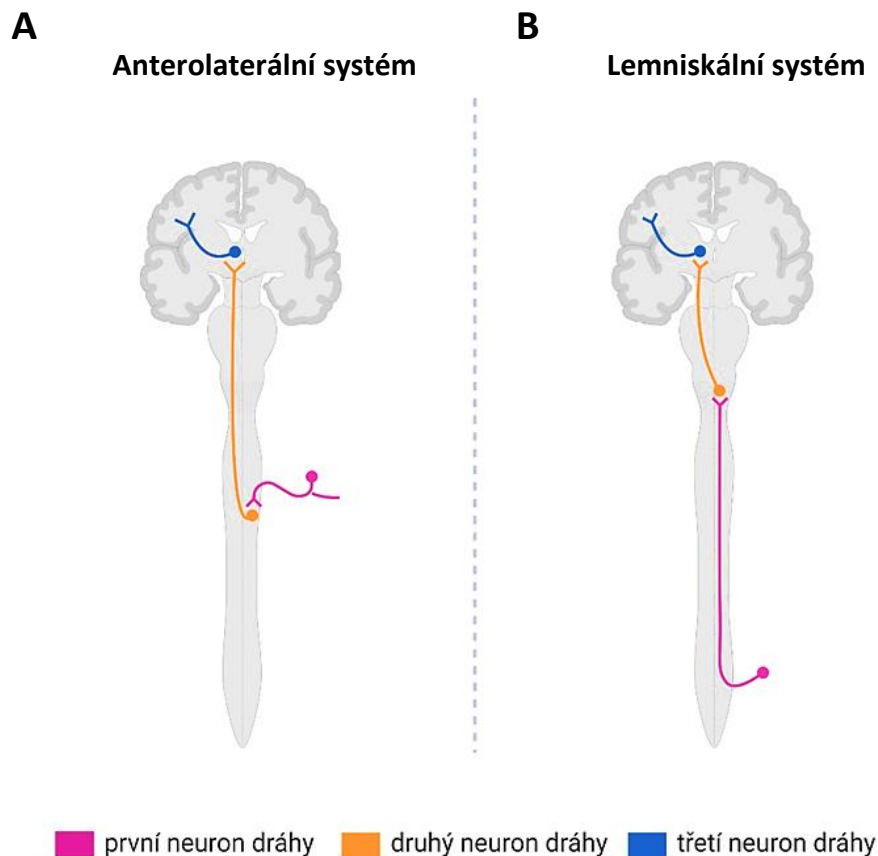
Spinothalamické dráhy (neboli dráhy vedoucí z míchy do thalamu, také nazývány jako anterolaterální systém) jsou řazeny mezi jedny z nejdůležitějších drah nervového systému. Celkově jsou tyto dráhy tři – *tractus spinothalamicus*, *tractus spinoreticularis* a *tractus spinotectalis*. Prvním neuronem všech třech traktů je pseudounipolární buňka DRG, dále se liší pouze průběhem vedení sensorického vstupu. Tyto dráhy se skládají ze tří neuronů (viz Obr. 2 A) a zajišťují vedení informace o dotyku, teple a bolesti (Ganog, 2015).

2.2.2 Dráha zadních míšních provazců

Dráha zadních míšních provazců (také nazývána lemniskální systém) spadá mezi tříneuronové sensorické míšni dráhy (viz Obr. 2 B) přenášející informace z receptorů kůže a pohybového aparátu – dotyk, diskriminační cití, vibrace, statická část propiocepce – tah, tlak, vnímání váhy, polohy a těla v prostoru. Sensorické informace jsou vedeny míchou, mozkovým kmenem a thalamem až do mozkové kůry (Grim & Druga et al., 2014).

2.2.3 Dráhy propioceptivní citlivosti

Dráhy propioceptivní citlivosti (spinocerebelární dráha) přenáší nevědomé propioceptivní informace získané ze svalových vřetének, Golgiho šlachových tělísek a kloubních pouzder do mozečku (Daroff & Aminoff, 2014). Víceméně jde o informace pro mozeček o stavu svalů a šlach. Některá vlákna se vracejí do kosterního svalu (monosynaptický reflex), anebo přímo končí na míšních motoneuronech (Čihák, 2016).



Obr. 2: Schéma mozku a míchy, ukazující rozdíl v senzoričném přepojení prvních třech neuronů anterolaterálního (A) a lemniskálního systému (B). Vytvořeno v BioRender.com.

2.3 Typy senzoričných neuronů v dorzálních gangliích

Buněčná těla senzoričných neuronů se nacházejí v DRG (nebo v trigeminálních gangliích v případě obličeje, kterým v této práci nebude věnována větší pozornost) a označují se jako pseudounipolární buňky. Tyto buňky mají společný úsek dendritu a axonu. Tímto společným úsekem vytvářejí strukturu připomínající tvar písmene T, čímž umožňují rovnou přenášet akční potenciál z dendritu na axon – dendrit inervuje cíle na periférii a axon potom vede informaci do míchy (Lüllmann-Rauch, 2012; Jessell & Siegelbaum, 2021).

Senzoričké neurony v DRG mají svá specializovaná nervová zakončení v kůži, svalech, kloubech a dalších tkáních po celém těle. Při senzoričké stimulaci generují elektrické signály, které se šíří po nervových vláknech do míchy, a poté do mozku, kde jsou smyslové informace zpracovány a interpretovány. Senzoričké neurony v DRG se dají

rozdělit dle několika parametrů – podle přenášené informace, velikosti a syntetizující látky.

2.3.1 Klasifikace neuronů podle přenášené informace

- Nociceptory: Tyto smyslové neurony jsou zodpovědné za detekci a přenos signálů bolesti. Reagují na škodlivé nebo potenciálně škodlivé podněty, jako jsou extrémní teploty, mechanický tlak nebo chemické dráždivé látky.
- Mechanoreceptory: Tyto neurony jsou citlivé na mechanické síly a reagují na dotek, tlak, vibrace a tah. Pomáhají při detekci různých hmatových vjemů a hrají roli v propiocepci.
- Termoreceptory: Tyto neurony se specializují na detekci změn teploty a předávají tyto informace CNS.
- Proprioceptory: Tyto smyslové neurony poskytují informace o poloze a pohybu těla. Podílejí se na vnímání těla a koordinaci pohybů.
- Chemoreceptory: Tyto neurony jsou citlivé na chemické změny v prostředí a mohou detekovat specifické chemické látky (Kaňovský et al., 2022).

2.3.2 Klasifikace neuronů podle velikosti

Podle velikosti buněčných těl neuronů se rozdělují neurony DRG na malé, střední a velké. Malé neurony vedou bolestivé signály z termoreceptorů. Středně velké neurony vedou signál z tlakových a dotykových receptorů, kdežto velké neurony zajišťují vedení signálů z propioceptivních receptorů (Druga et. al., 2011).

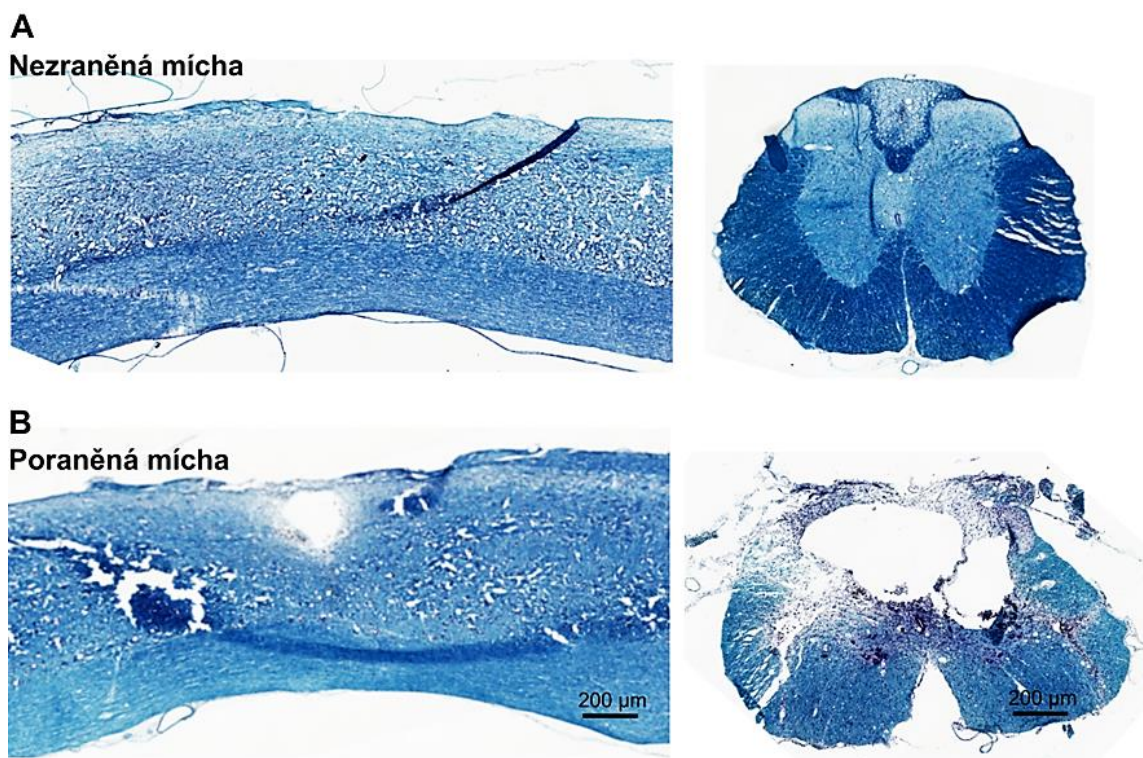
2.3.3 Klasifikace neuronů podle syntetizující látky

DRG obsahují komplexní řadu buněčných těl smyslových neuronů, které mají různé funkce a inervují různé cíle. Mnoho proteinů, jako jsou například kanálové proteiny, je úzce spjato s funkcí neuronů. Metoda, která je schopna identifikovat lokalizaci proteinů ve složitých tkáních s vysokým rozlišením, je imunohistochemie (Mescher, 2008).

2.4 Poranění páteřní míchy

PM představuje jedno z nejzávažnějších poranění, které postihuje každý rok miliony lidí na celém světě (Wyndaele & Wyndaele, 2006). Podle výše a závažnosti PM jsou rozlišovány pentaplegie, tetraplegie, paraplegie, tetraparéza a paraparéza. Obecně lze tvrdit, že čím blíže je míšní léze k oblasti krční páteře, tím jsou dalekosáhlejší důsledky

PM a závažnost ochrnutí pacienta (Kříž et al., 2019). PM se projevuje závažnými problémy a komplexními změnami u pacienta. Léze může vzniknout přímým, nebo nepřímým zásahem do míšní tkáně. Přímým vlivem je mechanickém poškození páteřního obratle a následné poškození páteřního kanálu, ve kterém je mícha uložena. K takovému poškození může dojít vlivem úrazu, pádu či nehody, zapříčiněné například sportovní aktivitou, autohavárií nebo násilnou trestnou činností (Smith et al., 2005; Fassett et al., 2008; shrnuto v Chan et al., 2016; Hall et al., 2019; Kříž et al., 2019). Nepřímo lze míchu poškodit chemickými, fyzickými nebo biologickými vlivy, např. nedostatečným prokrvením tkáně, vzniklou infekcí, nádorem utlačujícím míchu nebo působením radiace (Schultheiss et al., 1986; Hasturk et al., 2009; New & Marshall, 2014; Ge et al., 2019; Kříž et al., 2019; Jaja et al., 2019). Mikroskopické srovnání nezraněné a poraněné míšní tkáně je zobrazeno na Obr. 3. Jestliže u mechanického zásahu dojde k náhlému přerušeni míchy, dochází ke vzniku tzv. míšního šoku. Tento stav je nastává tehdy, když dojde k náhlému přerušeni všech eferentních vzruchů pod úrovní PM. Tento stav se projevuje přechodným vymizením reflexů, hybnosti, sensorického cití ale i k paralýze svalů, zapojených do vylučování a mikce. Míšní šok trvá v rozsahu několika dnů až týdnů a jeho odeznění záleží na rozsahu a lokalizaci míšní léze. Po odeznění míšního šoku postupně dochází, podle závažnosti poranění, k pomalé obnově reflexní činnosti, která někdy přechází až k hyperreflexii. Kromě ztráty motorické, sensorické a autonomní funkce po PM lze u pacienta zaznamenat také vznik psychických traumat (Faltýnková, 2012; Cobo Cuenca et al., 2015; Kříž et al., 2019).



Obr. 3: Mikroskopický snímek, ukazující rozdíl mezi nezraněnou a poraněnou míšní tkání. (A) Nezraněná mícha. Vpravo je ukázán příčný řez a vlevo je ukázán podélný řez nezraněnou míchou. (B) Poraněná mícha. Pravý příčný řez poraněnou míchou ukazuje detail poraněné tkáně a vzniklé kavity. Levý podélný řez poraněnou míchou ukazuje vzniklou kavitu v komplexnosti s nezraněnou tkání. Barveno luxolovou modří. Zvětšení 20 \times .

2.4.1 Patofyziologie poranění

Patofyziologii PM lze klasifikovat do dvou fází – primární a sekundární (McDonald & Sadowsky, 2002; Kříž et al., 2019). V primární fázi dochází k mechanickému poškození míchy, zatímco v sekundární fázi dochází ke sledu biochemických a imunologických reakcí. Dle časové osy lze děje sekundárního poranění rozdělit na akutní (<2 dny), subakutní (2 dny až 2 týdny), střední (2 týdny až 6 měsíců) a chronickou fázi (>6 měsíců). Akutní fáze následuje ihned po primární fázi. Během probíhajících reakcí v akutním stádiu sekundární fáze dochází k infiltraci imunitních buněk (makrofágy, lymfocyty a neutrofily), které iniciují tvorbu zánětlivých cytokinů, jako je tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β nebo IL-6. Navíc dochází díky přítomnosti zánětlivých buněk k iniciaci oxidačního stresu a poškození DNA. V akutní fázi PM dochází také ke zvýšení koncentrace neurotransmiterů, jako je například glutamát. Nárůst koncentrace glutamátu vede k excitotoxicitě, která může vést až k apoptóze buněk, které nebyly poškozeny během samotné primární fáze. Dalšími

klinickými příznaky akutní fáze je edém, zvýšení intracelulárních vápenatých iontů a poškození endotelu cév. Kvůli zvýšenému přísunu vápenatých iontů do buňky dochází k narušení homeostázy, jejímž důsledkem je vznik intracelulární hyperkalcémie. Projevem intracelulární hyperkalcémie je aktivace kalcium – dependentních proteas, které vedou k dysfunkci mitochondrií, následně ke sníženému přísunu kyslíku až k apoptóze buněk nervové tkáně. Pokud přetrvávají reakce akutní fáze, může dojít k přechodu do subakutní fáze. V této fázi probíhá demyelinizace axonů spojené s axonální remodelací, Wallerova degenerace a fagocytóza poškozené tkáně buňkami imunitního systému. Tato fáze je také charakterizována vznikem tzv. gliové / fibrotické jizvy (viz kap. 2.5.1). Ve střední fázi probíhá pokračování dějů ze subakutní fáze v delším časovém rozmezí. Pokud přetrvávají výše zmíněné reakce, dochází k přechodu do chronické fáze. Tato fáze vede k odumírání axonů, tvorbě cystické dutiny a k utvrzení hermetické bariéry gliové / fibrotické jizvy, která brání regeneraci míšní tkáně (Schanne et al., 1979; Hausmann et al., 2003; Pineau & Lacroix, 2007; Rowland et al., 2008; Wang et al., 2014a; shrnuto v Ahuja et al., 2017; Tran et al., 2018).

2.5 Limitující faktory regenerace dospělé CNS

Poškození nervové tkáně je považováno za nejvíce devastující poranění, projevující se v mnoha oblastech života jedince. Při poškození jakéhokoliv typu tkáně se schopnost regenerace odvíjí od řady faktorů. Za stěžejní faktor regenerace lze zmínit genetickou predispozici buněk dělit se a diferencovat v určitý buněčný typ. Dále je regenerace poškozené tkáně závislá dostatečném cévním zásobení tkáně. Ačkoliv je nervová tkáň velmi dobře cévně zásobena, nervové buňky postrádají schopnost dělit se. Kvůli ztrátě základní podmínky regenerace, která vymizí brzy po narození jedince, disponuje nervová tkáň velmi omezeným regeneračním potenciálem. Dojde-li například k poškození axonu, dochází k rozpadu celé struktury nervové buňky a vyplnění prázdného prostoru gliovými buňkami. Navzdory tomu, pokud bude zachována myelinová pochva u poškozených míšních nervů, může dojít k úplnému obnovení funkcí u míšních nervů (Dylevský, 2016). Nerovnováha mikroprostředí v místě poškozené nervové tkáně je dalším limitujícím faktorem, zapříčiňujícím inhibici regenerace. Nerovnováha mikroprostředí po poranění CNS je způsobena enormním nárůstem inhibičních molekul a minimální přítomností růstových faktorů, podporujících regeneraci a obnovu funkce nervové tkáně. V místě poškozené nervové tkáně dochází ke vzniku gliové / fibrotické jizvy.

2.5.1 Gliová / fibrotická jizva

Gliová / fibrotická jizva je název pro kompaktní síťovou strukturu, která tvoří mechanickou a biochemickou bariéru po poranění CNS. Primárním úkolem jizvy je ochránit poškozenou nervovou tkáň před zánětlivými procesy a dále v rané fázi zánětlivé reakce iniciovat proces hojení tkáně. Stejně jako u tvorby jizev v jiných orgánech a tkáních je přítomnost gliové / fibrotické jizvy zcela zásadní pro ochranu neporaněné tkáně. Na druhou stranu představuje jizva v pozdní fázi zánětlivé reakce překážku při regeneraci nervových vláken a znovuobnovení funkční tkáně míchy. Bariéra jizvy je tvořena jednak buňkami, a jednak molekulami extracelulární matrix (ECM), viz Obr. 4 (Snow et al., 1990; Frisén et al., 1995; Preston et al., 2001; Wang et al., 2002; Carbajal et al., 2011).

2.5.1.1 Nebuněčné složení

Nebuněčné komponenty gliové / fibrotické jizvy jsou tvořeny složkami ECM, které představují biochemickou a mechanickou bariéru pro regeneraci nervové tkáně. Mezi složky ECM, podílející se na vzniku jizvy, patří především fibronectin, laminin, kolageny, hyaluronan, chondroitin sulfátové proteoglykany (GSPGs, z angl. *chondroitin sulfate proteoglycans*), tenascin C a mnoho dalších molekul. Jako hlavní inhibitory axonového růstu, které byly nalezeny v myelinu, patří glykoprotein asociovaný s myelinem (MAG, z angl. *myelin-associated glycoprotein*), myelinový glykoprotein oligodendrocytů (OMgp, z angl. *oligodendrocyte myelin glycoprotein*) a Nogo-A. Tato molekulární bariéra utváří strukturu léze a vytváří inhibiční mikroprostředí v jejím okolí, které brání regeneraci axonů (Snow et al., 1990; McKerracher et al., 1994; Colognato et al., 1999; Wang et al., 2002; Day et al., 2004; Yu et al., 2011; Wang et al., 2015; Zhu et al., 2015; Hara et al., 2017).

2.5.1.2 Buněčné složení

Do procesu tvorby jizvy je zapojeno i mnoho buněčných komponent. V hojném počtu jsou zastoupeny především astrocyty a mikroglie, dále například neutrocyty, makrofágy, oligodendrocytové progenitorové buňky (OPCs, z angl. *oligodendrocyte progenitor cells*), fibroblasty a endoteliální buňky (Lein et al., 1991; Frisén et al., 1995; Naik et al., 2003; Carbajal et al., 2011; Sindrilaru et al., 2013; Li et al., 2020).

2.5.1.2.1 Astrocyty

Mezi hlavní buňky, podílející se na vzniku gliové / fibrotické jizvy, patří astrocyty. Díky imunitním buňkám, které produkují chemokiny a cytokiny, dochází k migraci astrocytů do místa poškozené tkáně, kde se dělí a proliferují. V okolí léze dochází k aktivaci astrocytů, které obklopují lézi a hypertrofují – vytvoří mnohem větší a delší astrocytární výběžky, které ohraničí poškozenou tkáň. Reaktivní astrocyty produkují molekuly, které se podílejí na vzniku zánětlivého mikroprostředí jizvy, jako jsou například zánětlivé cytokiny a reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. *reactive oxygen species*) (Frisén et al., 1995; Giulian et al., 1998; Zamanian et al., 2012; Liu et al., 2014). U reaktivních astrocytů dochází také ke zvýšení produkce gliový fibrilárního kyselého proteinu (GFAP, z angl. *glial fibrillary acidic protein*), který se významně podílí na astrocytární syntéze cytoskeletárních vláken a pseudopodií. Zmnožením astrocytárních výběžků vzniká hermetická bariéra, která neumožňuje výměnu neuropřenašečů, trofických faktorů, iontů a dalších látek mezi nezraněnou a poškozenou tkání. Celý proces tvorby gliové jizvy astrocyty se nazývá reaktivní astroglíóza (Eddleston & Mucke, 1993; Frisén et al., 1995).

2.5.1.2.2 Mikroglie

Po astrocytech jsou mikroglie druhou nejzastoupenější buněčnou komponentou v jizvě. Mikroglie představují jediné imunitní buňky v nervovém systému a jejich funkci lze analogicky srovnávat s makrofágy, kteří mají s mikroglie stejny původ. Z pohledu lokalizace vůči lézi jsou makrofágy přítomny v epicentru léze, kdežto mikroglie se koncentrují spíše v periférii léze (Hines et al., 2009). Po poranění nervové tkáně přecházejí mikroglie z klidového stavu do stavu aktivovaného, ve kterém produkují cytokiny, neurotransmitery, neutrofické faktory a fagocytují poškozené buňky i odpadní metabolity buněk (Junqueira & Carneiro, 2005).

2.5.1.2.3 Neutrofilly a makrofágy

Neutrofilly jsou prvními buňkami imunitního systému, které proniknou do místa léze (Beck et al., 2010). V chronické fázi zánětu podporují zánětlivé mikroprostředí léze především produkcí zánětlivých cytokinů, serinových proteas, ROS a reaktivních forem dusíku (Beckman et al., 1990; Nguyen et al., 2007; Kumar et al., 2018). Kdežto v akutní fázi zánětu se neutrofilly spolupodílejí stejně jako makrofágy na fagocytóze poškozených buněk. Pokud dojde ke stimulaci neutrofilů lipopolysacharidy, aktivuje se exprese inhibitorů leukocytárních proteas, které redukují aktivaci jaderného faktoru- κ B a expresi

TNF- α . Potlačením produkce zánětlivých faktorů bude docházet k inhibici zánětlivého mikroprostředí léze, což je žádoucí stav pro iniciaci regenerace funkční tkáně míchy (Ghasemlou et al., 2010).

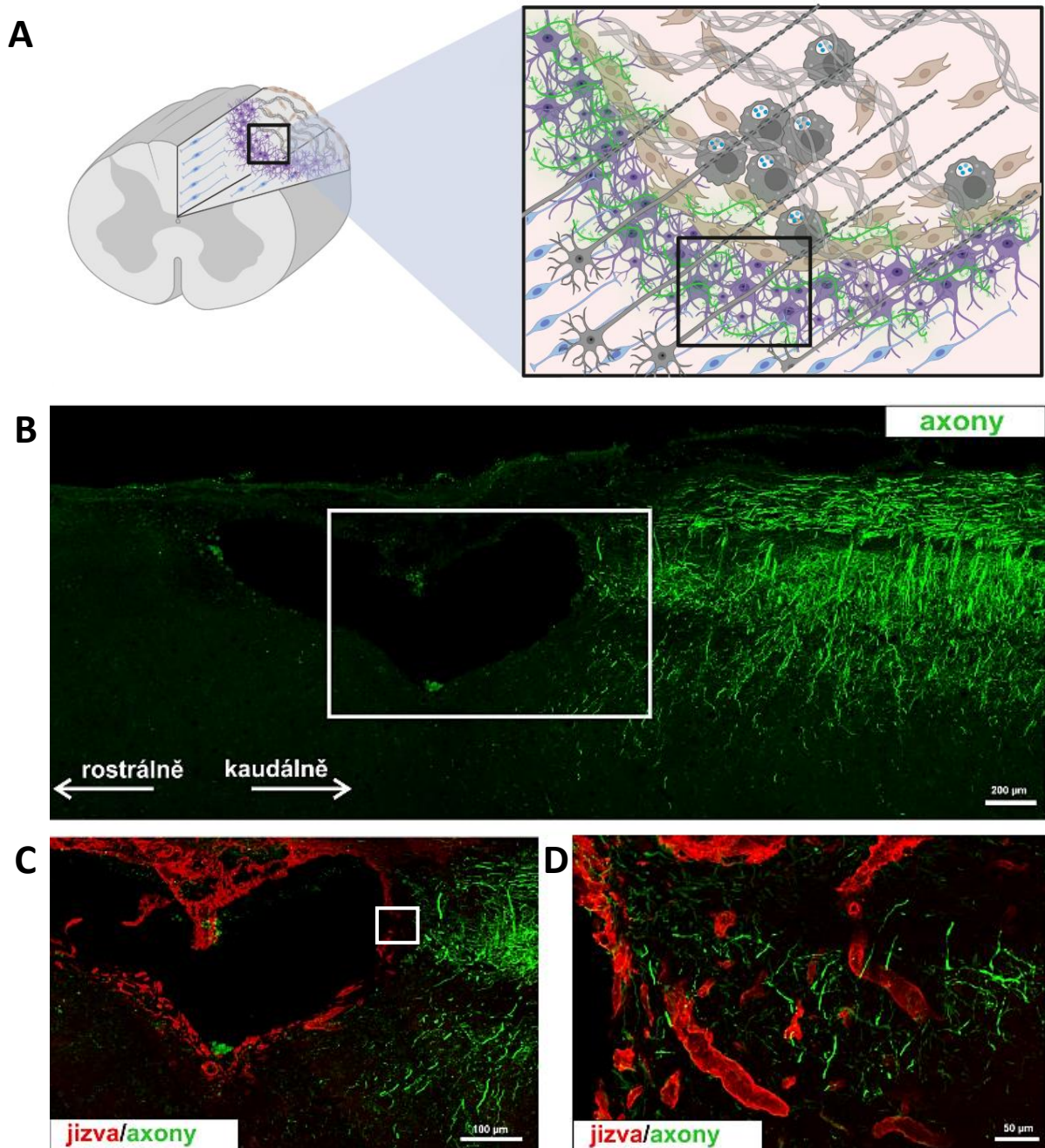
Makrofágy jsou dalšími z imunitních buněk, které se podílejí na reakcích probíhajících v gliové / fibrotické jizvě. Makrofágy vznikají přeměnou monocytů v poškozené tkáni a jsou rozdělovány do dvou hlavních populací, a to M1 a M2. Populace makrofágů M2 se podílí na ochraně poškozené tkáně tím, že fagocytuje apoptotické buňky. Naproti tomu subpopulace makrofágů M1 produkuje zánětlivé cytokiny a ROS, které přispívají k rozvoji zánětu v místě léze (Sindrilaru et al., 2013; Kobashi et al., 2020; Han et al., 2021).

2.5.1.2.4 Oligodendrocytové progenitové buňky

Další buněčnou komponentou, která se významně podílí na tvorbě jizvy, jsou OPCs. Podobně jako u astrocytů dochází i u OPCs v místě léze k hypertrofii a v některých případech dokonce i k diferenciaci OPCs na astrocyty (Rhodes et al., 2006; Hackett et al., 2018). Ve studii Milich et al. (2021) provedli jednobuněčné sekvenování RNA všech typů buněk vyskytujících se v akutní fázi PM u laboratorních myší. V této studii byla zdůrazněna skutečnost, že v okolí léze se v akutní fázi zánětu nachází velké množství OPCs, které produkují GSPGs, což má přímý dopad na změnu struktury léze. Jeden z typů GSPGs, který je exprimován na buněčné membráně OPCs, se nazývá neuron gliový antigen 2 (Nishiyama et al., 1991).

2.5.1.2.5 Fibroblasty a endoteliální buňky

Fibroblasty jsou buňky, které jsou odvozeny od pericytů. Fibroblasty se spolupodílejí na tvorbě jizvy, tím že produkují různé molekuly ECM (např. kolagen, laminin, GSPGs). Aktivita fibroblastů je zodpovědná za vznik velmi husté, nepropustné, vazivové sítě v jizvě (Lein et al., 1991; McKeon et al., 1991; Tang & Goldberg, 2000; Alberts et al., 2002). Endoteliální buňky a adhezivní buňky se spolupodílejí na angiogenezi po poranění míšní tkáně. Díky tomu je oblast léze obohacena o větší množství kapilár, které zásobují tkáň kyslíkem a živinami (Schenkel et al., 2002; Naik et al., 2003).



Obr. 4: Detail inhibiční bariéry gliové / fibrotické jizvy po míšní lézi. (A) Poraněná mícha s gliovou / fibrotickou jizvou. Oblast míchy ve čtverci ukazuje komplexnost buněčného a nebuněčného složení jizvy po míšní lézi. Vytvořeno v BioRender.com. (B) Kavita, oblast jizvy a míšní tkáň. V obdélníku je znázorněna oblast léze, která byla detailně hodnocena na přítomnost inhibičních molekul a rostoucí axony na mikroskopických snímcích C-D. Zeleně jsou zobrazeny axony, které jsou přítomny kaudálně, pod míšní lézí. Měřítko 200 μm . Zvětšení 20 \times . (C) Mikroskopický snímek míšní léze s detailem na inhibiční bariéru jizvy (červeně) a rostoucí axony. V obdélníku je znázorněna oblast jizvy, která je znázorněna na mikroskopickém snímku D. Měřítko 100 μm . Zvětšení 20 \times . (D) Přiblížený mikroskopický snímek míšní léze (C) s detailem na inhibiční bariéru jizvy a axony. Měřítko 50 μm . Zvětšení 63 \times .

2.6 Terapie senzoričkých deficitů po míšní lézi

Kvůli nízké regenerační kapacitě nervové tkáně a vzniku gliové / fibrotické jizvy není v současné době medicína schopná obnovit poškozené funkce po PM. Hlavním cílem léčby akutního PM je snížit rozsah sekundárního poškození a usnadnit neurologickou regeneraci a funkční zotavení tkáně. V klinické praxi je při nadměrném tlaku páteřních obratlů na míchu proveden chirurgický zákrok, který má za cíl dekompresi míchy. Dekompresí míchy se v klinické praxi označuje zákrok, který odstraní všechny mechanické překážky poškozující míchu (Batchelor et al., 2013). V momentě, kdy jsou zahojeny všechny zlomeniny a eliminovány sekundární projevy PM, je zahájena jako doprovodná léčba intenzivní rehabilitace, která má stabilizovat míchu v páteřním kanálu a omezit vznik možných komplikací. Rehabilitace probíhá po dobu několika měsíců a rehabilitační přístup je upraven každému pacientovi podle neurologické úrovně a rozsahu léze. Při rehabilitačním postupu se klade důraz na obnovení nebo maximální zlepšení senzo-motorických funkcí (Kříž et al., 2019). Jako podpůrná asymptomatická terapie jsou po PM podávány kortikosteroidy, kvůli jejich neuroprotektivnímu a protizánětlivému účinku (Bracken et al., 1990; Bracken et al., 1997).

Další možnosti léčby senzoričkých deficitů po PM jsou v současné době zkoumány pouze experimentálně. Neurologické výzkumy se ubírají různými směry. Jedním z experimentálních přístupů je podání neuroprotektivních látek, které mají za cíl zmírnit procesy probíhající v sekundární fázi PM (Hayashi et al., 2005; Kurt et al., 2009; Cabrera-Aldana et al., 2017; Qiao et al., 2023). Dalším přístupem je aplikace neutrofických faktorů, které podporují růst a regeneraci nervových buněk (Siegel et al., 2000; Blesch & Tuszynski, 2003; Wu et al., 2011; Wang et al., 2014b; Anderson et al., 2018; Yamanaka et al., 2019). Na druhé straně se usiluje o snížení nebo odstranění inhibičních molekul v jizvě podáním blokátorů gliové jizvy a protilátek proti inhibitorům axonového růstu (Bradbury et al., 2002; Gonzenbach & Schwab, 2008; Harvey et al., 2009; Khalil et al., 2022; Hirt et al., 2023). Dalším terapeutickým přístupem je transplantace buněk a tkání, která zaznamenala za poslední dvě dekády obrovský rozmach v řadě klinických i medicínských odvětvích. Buněčná terapie nabízí cílenou transplantaci různých druhů buněk do těla experimentálního modelu poranění za účelem obnovy a regenerace buněk a tkání. Buněčná terapie aplikuje po PM do místa léze především kmenové buňky, konkrétně neurální / progenitorové kmenové buňky, mezenchymální kmenové buňky, embryonální kmenové buňky a indukované pluripotentní kmenové

buňky. Kmenové buňky vykazují díky přímému mezibuněčnému kontaktu, parakrinnímu a imunomodulačnímu efektu možnost modulovat vzniklý zánět. Navíc díky vícesměrnému diferenciacímu potenciálu kmenových buněk může dojít k jejich diferenciaci na neurony, což může napomoci funkční rekonstrukci nervové tkáně (Parr et al., 2008; Amemori et al., 2013; Salewski et al., 2015; Fan et al., 2018; shrnuto v Pang et al., 2021; Chang et al., 2021; Cheng et al., 2021; Jones et al., 2021; Wang et al., 2021). Kromě kmenových buněk byly v buněčné terapii zaměřené na léčbu PM také aplikovány Schwannovy buňky a buňky čichového pouzdra. Několik studií ukazuje, že transplantací Schwannových buněk, buněk čichového pouzdra a nervových kmenových buněk byla podpořena myelinizace poškozených axonů (Xu et al., 1997; Sasaki et al., 2006; Salewski et al., 2015). Kromě inhibiční bariéry jizvy představuje kavita, vzniklá po PM, překážku pro regeneraci míšní tkáně. Použití biomateriálů představuje slibnou možnost, jak vzniklou kavitu vyplnit a pomoci regeneraci míšní tkáně (Gupta et al., 2006; Mothe et al., 2013; Slotkin et al., 2017; Altinova et al., 2020). Všechny výše zmíněné experimentální přístupy však podporují více funkční zotavení motorických funkcí než senzoričkových, nebo pouze zmírňují sekundární fázi PM. Jelikož jsou senzoričkové neurony jsou uloženy v DRG, které jsou lokalizovány mimo bílou a šedou hmotu míšní, zdá se být experimentální obnovení senzoričkových funkcí mnohem proveditelnější než obnovení motorických funkcí. Jedním z možných terapeutických přístupů, jak senzoričkové funkce po PM obnovit, se jeví genová terapie a použití analogu cAMP – db-cAMP.

2.6.1 Genová terapie

Genová terapie je považována za moderní léčebný přístup, ve kterém dochází k opravě, nebo vyjmutí mutovaného genu či dokonce nahrazení mutovaného genu genem intaktním (Racek et al., 2021). Dále může být při genové terapii zaveden v dospělosti chybějící gen do buněk, který by tak mohl pomoci v regeneraci nebo v boji proti probíhající nemoci (Andrews et al., 2009; Forbes & Andrews, 2019). Ačkoliv genová terapie vykazuje slibné výsledky u léčby řady onemocnění a defektů, na druhou stranu vyvolává mnoho obav a otázek ohledně jejího bezpečného použití. Současná legislativa povoluje pouze vnesení genů do cílových somatických buněk, protože modifikovaný gen není přenášen na další generace jako je tomu v případě použití genové terapie na zárodečné linie (Kohoutová et al., 2013; shrnuto ve Wirth et al., 2013). Nutno zdůraznit, že genovou terapii nelze použít na léčbu všech geneticky podmíněných onemocnění. Jedná se především o komplexní poruchy a onemocnění spojené s dlouhými geny, které se nevejdou do

vhodného virového vektoru používaného v genové terapii (shrnuje Friedmann, 2009; Chamberlain et al., 2016). Před zahájením léčby pomocí genové terapie je potřeba vědět mnoho aspektů. Zcela zásadní informací je znalost sekvence mutovaného nebo chybějícího genu, jeho přesné umístění, jeho genový produkt a mechanismus účinku. V moment, kdy nám jsou všechny výše zmíněné aspekty známy, může být genová terapie provedena dvěma různými technologiemi – genová terapie zprostředkovaná oligonukleotidy, nebo vektory. První technologie využívá krátké sekvence nukleových kyselin neboli oligonukleotidy k ovlivnění buněčného překladu genů do proteinů. Druhá technologie zahrnuje použití virových a nevirálních vektorů (Kohoutová et al., 2013; Landhuis, 2021).

2.6.1.1 Vektory virové

Ačkoliv viry patří mezi původce mnoha onemocnění, v genové terapii představují díky jejich vysoké účinnosti přenosu inzertu ideální kandidáty pro vnesení genu do somatické buňky. Před vnesením cizího genu do viru musí být upraveny virové částice tak, aby nedošlo k vzniku imunologické nebo patologické reakce v organismu. Aby bylo zabráněno replikaci viru a infekci transfekované buňky virem, je veškerá genetická informace viru odstraněna a na místo toho vložena kopie lidského genu s promotorovými a regulačními oblastmi.

I když vykazují virové vektory velkou účinnost přenosu inzertu do hostitelské buňky, jsou v genové terapii spojeny s mnoha problémy. Jedním z nich je obtížné získání specifických buněk a tkání, dále je to nízká exprese genu po vnesení do organismu a nutnost znát přesnou regulaci vneseného genu, v neposlední řadě je nutno zmínit možný vznik imunitní reakce organismu proti vnesenému virovému vektoru nebo potenciální vznik mutageneze (Kohoutová et al., 2013). V klinické praxi je v genové terapii používáno mnoho druhů virových vektorů (shrnuje Thomas et al., 2003), jako příklad byly vybrány vektory ze skupiny retrovirů, lentivirů, adenovirů a adeno-asociovaných virů.

2.6.1.1.1 Vektory retrovirové

Retroviry jsou poměrně složitě obalené RNA viry s diploidním jednovláknovým RNA genomem. Typickým znakem retrovirů a retrovirových vektorů je jejich schopnost integrace do hostitelské DNA. Virová RNA je reverzibilně přepisována a integrována ve formě proviru. Velmi účinně spolupracují retroviry s enzymy hostitelské buňky

a využívají ji pro vlastní replikaci a dlouhodobou expresi virových proteinů. Vstup viru do hostitelské buňky je závislý na buněčných receptorech. Retrovirové vektory jsou schopné infikovat pouze dělicí se buňky, protože jsou schopné narušit jaderný obal kvůli přístupu k hostitelským chromozomům. Do jádra hostitelské buňky je interagována dvouvláknová komplementární DNA (cDNA, z angl. *complementary DNA*), která vznikla působením reverzní retrovirové transkriptasy. Pomocí DNA technik jsou retroviry modifikovány tak, aby nedošlo při jejich aplikaci v genové terapii k možné replikaci v hostitelské buňce a potenciální infekci (shrnutí v Baum et al., 2006; Kohoutová et al., 2013).

2.6.1.1.2 Vektory lentivirové

Lentiviry patří do rodu retrovirů, které mohou inkorporovat DNA do savčích buněk a způsobit tak závažná onemocnění jako je například syndrom získané imunodeficience (shrnutí v Milone & O'Doherty, 2018). Lentivirové vektory jsou schopny infikovat dělicí se i nedělicí se buňky. Na rozdíl od retrovirů mohou vstupovat do jádra otvory, které se nacházejí v jaderném obalu. Výhodou použití lentivirů v genové terapii je dlouhodobá exprese vneseného genu (Kohoutová et al., 2013; Urbinati et al., 2018).

2.6.1.1.3 Vektory adenovirové

Adenoviry obsahují ve svém genomu dvouvláknovou DNA, která je po vnesení do buňky není začleněna do jejího genomu, ale zůstává lokalizována v jádře. Adenoviry mohou v organismu infikovat dělicí se i nedělicí se buňky. Nejčastěji adenoviry způsobují v přirozených podmínkách infekce dýchacích cest a trávicího systému. Při použití adenovirových vektorů v genové terapii, např. při léčbě cystické fibrosy, jsou adenoviry aplikovány v podobě aerosolu. Tento způsob aplikace adenovirů bývá aplikován vícekrát, kvůli nízké genové expresi vektoru. Nevýhodou opakovaného použití adenovirových vektorů při terapiích je vznik stále silnější imunitní reakce (Kohoutová et al., 2013).

2.6.1.1.4 Vektory adeno-asociované

Genom adeno-asociovaných virů (AAV) je na rozdíl od samotných adenovirů tvořen jednovláknovou DNA. Kvůli malému genomu se vyskytuje možnost vložení pouze 5 kb cizího genomu. Ačkoliv je replikace přirozeně se vyskytujících AAV závislá na přítomnosti pomocného viru, například vir *Herpes simplex* nebo *Varicella zoster*, tak AAV vektory lze účinně vyrobit tak, aby pomocný vir pro genovou terapii nebyl potřeba (Georg-Fries et al., 1984; Matsushita et al., 1998; Kohoutová et al., 2013). AAV vektory

se díky tomu, ale i kvůli nízké imunogenitě, vysoké biologické bezpečnosti a stabilní exprese genů ve velmi rozmanité škále buněčných typů staly velmi atraktivními kandidáty pro tvorbu virových vektorů v genové terapii (shrnutí v Carter et al., 2004).

2.6.1.2 Vektory nevirové

Aplikace virových vektorů v klinické praxi s sebou přináší celou řadu komplikací, které je nutno optimalizovat. V posledních dekádách došlo ve výzkumu k významnému pokroku ve vývoji nevirových vektorů vhodných pro genovou terapii. Použití nevirových vektorů v genové terapii představuje obrovskou výhodu v tom, že nevyvolávají žádnou specifickou imunitní reakci v organismu, jako to bývá v případě použití virových vektorů. Nulová patogenita nevirových vektorů je ale spojena s daleko nižší efektivitou přenosu nukleové kyseliny do somatických buněk. Do somatické buňky je dvouvláknová DNA nesená nevirovými vektory vpravena buď přímo (injekcí do tkáně nebo genovým dělem), nebo nepřímo. Při nepřímém vnesení DNA nevirovými vektory je využívána řada technik, které poruší buněčnou membránu. Mezi tyto techniky spadá buněčná fúze, elektroporace, využití kalcium fosfátu nebo lipozomů (shrnutí v Niidome & Huang, 2002; Kohoutová et al., 2013)

Výše zmíněné nevirové i virové vektory disponují různými výhodami a nevýhodami při použití v genové terapii. Výhody a nevýhody pro použití virových vektorů v genové terapii jsou shrnuty v Tab. 1. Právě kvůli možným nežádoucím účinkům se snaží probíhající výzkumy na virových i nevirových vektorech navrhnout vektory takovým způsobem, aby byly co nejúčinnější pro léčbu konkrétního onemocnění.

Tab. 1: Přehled kladných a záporných efektů vybraných virových vektorů, používaných v genové terapii. Upraveno a převzato od McCarthy et al., 2010.

	Virový vektor	Imunitní reakce	Tropismus	Nevýhoda	Hlavní výhoda
Integrující	Retrovir	Minimální	Dělicí se buňky	Potenciální onkogenita	Dlouhá doba genové exprese v dělicích se buňkách
	Lentivir	Minimální	Dělicí se a nedělicí se buňky	Potenciální onkogenita	Dlouhá doba genové exprese ve většině buněk
Epizomální	Adenovir	Velká	Dělicí se a nedělicí se buňky	Virová kapsida může způsobit imunitní reakci	Účinná transdukce většiny buněk
	AAV	Minimální	Dělicí se a nedělicí se buňky	Malá klonovací kapacita viru	Nevyvolává závažnou a patogenní reakci

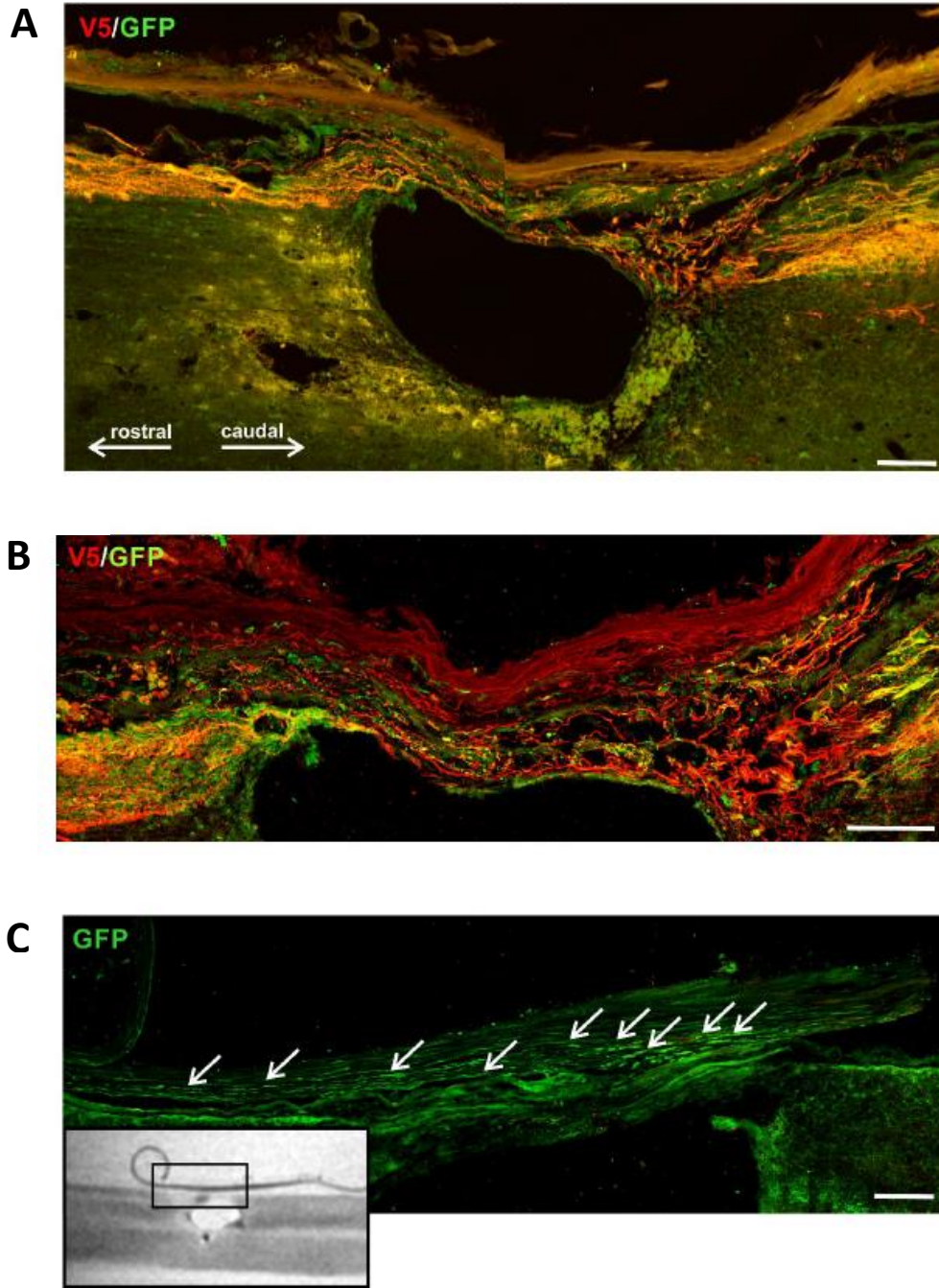
2.6.1.3 Využití integrinů v genové terapii

Integriny jsou skupinou transmembránových receptorů, které interakcí s molekulami ECM a cytoskeletem umožňují přenášet informace z extracelulárního prostoru do buňky a naopak. Jedná se o heterodimerní receptory, které jsou složeny z nekovalentně vázané α a β podjednotky. U savčích integrinů se vyskytuje 18 α a 8 β podjednotek, které se nacházejí u celkem 24 různých typů integrinů. Integriny zajišťují po buněčném poškození adhezi, diferenciaci, proliferaci a migraci buněk (shrnuto v Hynes, 2002; shrnuto v Humphries et al., 2003; Schmid & Anton, 2003; Tate et al., 2004; Andressen et al., 2005).

Stále více studií ukazuje, že integriny by mohly být využity pro regeneraci poškozené nervové tkáně. Růst poškozených axonů je specializovanou formou buněčné migrace a po PM je značně omezen inhibičním prostředím jizvy a vývojovou ztrátou regeneračního potenciálu axonů. Pro jakoukoliv buněčnou migraci je zapotřebí v růstovém vrcholu přítomnost adhezivní molekuly, která rozpoznává specifický ligand v mezibuněčném prostoru a je spojena se signalizačními kaskádami a cytoskeletem. Pro

využití integrinů v genové terapii je nejdříve potřeba aktivovat integriny, aby došlo k vazbě na specifické ligandy, jako jsou molekuly ECM (např. laminin a fibronectin). Zároveň je důležitá aktivace integrinů i z toho hlediska, že nedochází v průběhu chronické fáze PM k inaktivaci integrinu díky inhibičním molekulám v jizvě, jako je Nogo-A a CSPGs. Jako aktivační molekuly integrinů se nejčastěji uplatňují za fyziologických podmínek kindliny a taliny (Tysnes et al., 1996; Bello et al., 2001; Tadokoro et al., 2003; Moser et al., 2008; Tan et al., 2012; shrnuto v Fawcett, 2017). Nedávné studie ukazují, že po PM a obecně CNS je důležitá vazba integrinu $\alpha 9 \beta 1$ (ITG $\alpha 9$) na glykoprotein tenascin C, jednu z látek nacházející se v oblasti gliové / fibrotické jizvy. V dospělé CNS člověka se $\alpha 9$ podjednotka integrinu vlivem vývojové ztráty nevyskytuje, proto je potřeba ITG $\alpha 9$ dodat do poškozené nervové tkáně pomocí genové terapie (Andrews et al., 2009; shrnuto v Fawcett, 2017; Forbes & Andrews, 2019). Ve studii Cheah et al. (2016) bylo zaznamenáno výrazné zlepšení regenerace sensorických axonů po poranění míšního nervu u potkanů. Tato studie dokazuje, že kombinace ITG $\alpha 9$ a jeho aktivátoru kindlinu 1, navázaných na inhibiční molekulu tenascin C v oblasti poranění, vedla k mnohem větší regeneraci sensorických axonů *in vitro* i *in vivo* než při samostatném použití ITG $\alpha 9$ v terapeutické léčbě. Když byla studie z roku 2016 zopakována na potkaním modelu s PM, i poté bylo opět dosaženo regenerace sensorických funkcí, a dokonce i částečné rekonstrukce sensorických drah, viz Obr. 5 (Štěpánková et al., 2023).

Skupina $\alpha 9$ -K1



Obr. 5: Společná exprese ITG $\alpha 9$ a kindlinu 1 podporuje regeneraci senzoričkých axonů. (A) Příklad míšní léze v oblasti desátého hrudního obratle (T, z lat. *vertebra thoracica*) ze skupiny ITG $\alpha 9$ -kindlin 1 ($\alpha 9$ -K1). Mnoho červených axonů (obarvených $\alpha 9$ -V5) se k lézi přibližuje kaudálně (angl. *caudal*). Dochází k náhodnému růstu axonů, když vstupují do mostu přes horní část léze, která je většinou složena z meningeálních buněk. Pak axony znovu vstupují do tkáně CNS a rostou rostrálně (angl. *rostral*). Měřítko: 200 μm . (B) Příklad axonů procházejících jemným vláknem pojivové tkáně. Na rostrálním konci (vlevo) je oblast putujícího růstu, když axony znovu vstupují do tkáně CNS. Měřítko: 100 μm . (C) Axony dosahující bodu, kde se vlákna pojivové tkáně propojují s tkání CNS. Některé axony pokračují v růstu v mozkových plenách kromě tkáně CNS (bílé šipky). Obrázek magnetické rezonance vlevo dole ukazuje, odkud pocházel detail. Měřítko: 50 μm . Převzato a upraveno od Štěpánková et al., 2023.

2.6.2 Regenerace senzorických axonů pomocí signalizace cAMP

2.6.2.1 Signalizace cAMP

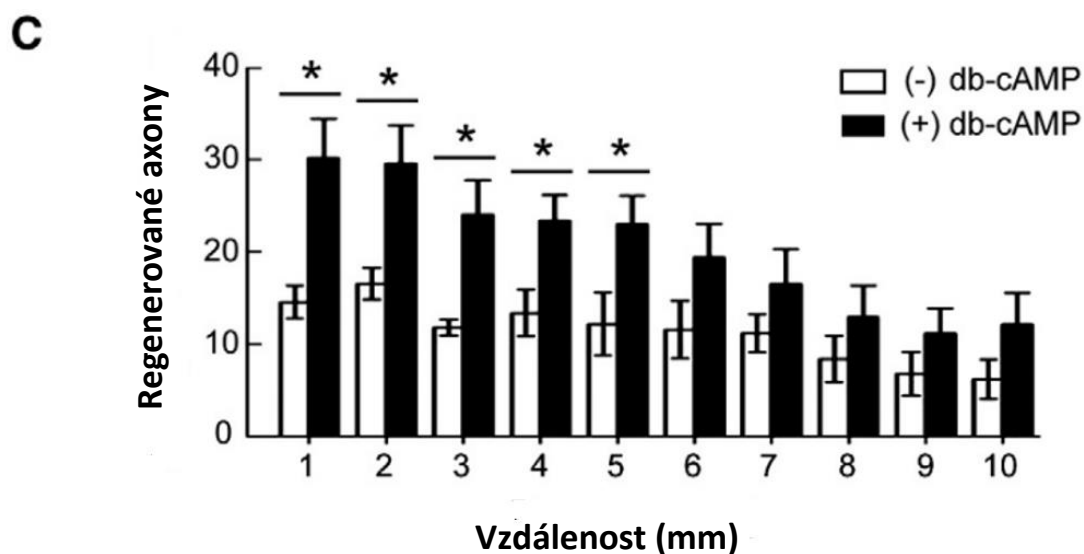
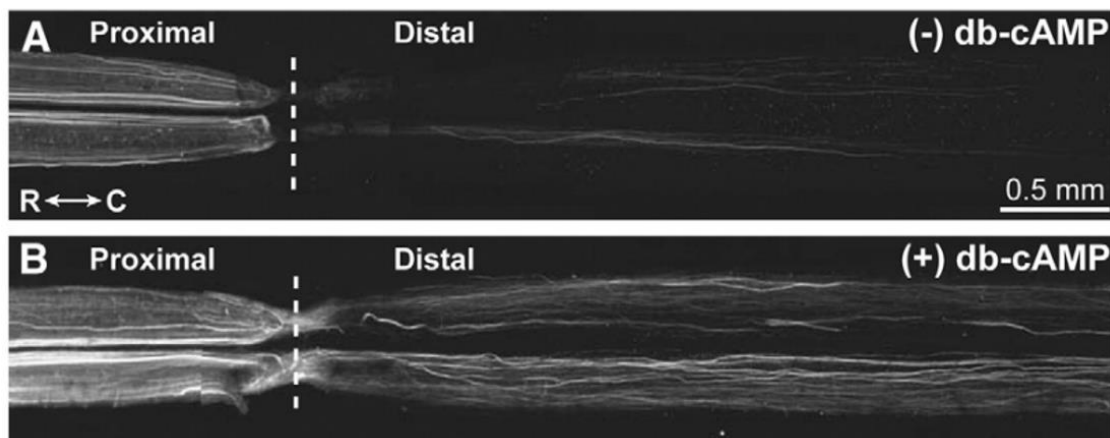
Molekula cAMP je jedním z univerzálních druhých poslů vyskytující se jak v eukaryotických, tak prokaryotických buňkách. Vznik cAMP v organismu je dán rozkladem ATP, reakce katalyzované enzymem adenylátcyklasou (EC 4.6.1.1). Jako jeden z druhých poslů figuruje cAMP v řadě signálních drah, které ovlivňují nespočet buněčných procesů v organismu. Ke spuštění buněčných procesů v těle je nezbytná vazba cAMP na G-proteiny, jež spouští přenos intracelulárních signálů z receptorů spřažených s G-proteiny do buněk (Devlin, 2010). Na množství intracelulárního cAMP je závislý enzym proteinkinasa A (PKA, EC 2.7.11.11). V neaktivním stavu se jedná o heterotetramerní enzym, skládající se ze dvou regulačních a dvou katalytických podjednotek. Pokud dojde k navázání cAMP na regulační podjednotky PKA, vzájemně se oddělí katalytické a regulační podjednotky, čímž je spuštěna enzymová aktivace. Nutno podotknout, že k úplné enzymové aktivaci musí být přítomny 4 molekuly intracelulárního cAMP. Aktivovaná PKA následně reaguje s proteiny – dochází k fosforylaci aminokyselin serinu a threoninu (Koolman & Klaus-Heinrich, 2012). Intracelulární cAMP kontroluje aktivitu genů, jež obsahují ve své regulační oblasti cAMP-regulační element (CRE). Na CRE se pomocí aktivity enzymu PKA váží proteiny (CREBs, z angl. *cAMP response element-binding proteins*), které slouží jako buněčné transkripční faktory – snižují, nebo naopak zvyšují transkripci genů (Devlin, 2010; Koolman & Klaus-Heinrich, 2012).

2.6.2.2 Role cAMP v regeneraci dospělé CNS

Univerzálnost cAMP jako druhého posla vedla k myšlence jeho zapojení v obnově senzorických axonů po PM. Stále více studií poukazuje na to, že zvýšená míra signalizace cAMP po poranění CNS vede k opětovnému růstu nervových buněk. Nutno podotknout, že fyziologická koncentrace cAMP je v dospělé CNS u obratlovců relativně nízká a s přibývajícím věkem nebo po PM je dále snižována (Cai et al., 2001; Shewan et al., 2002; Qiu et al., 2002; shrnuto v Spencer & Filbin, 2004). Studie ukazují, že po zvýšení hladiny intracelulárního cAMP v PM je podpořena regenerace těl neuronů i obnovení axonového růstu. Regenerační kapacita CNS je zesílena signalizací cAMP, která snižuje míru inhibičního prostředí jizvy. Tento pozoruhodný výsledek byl zaznamenán několikrát jak *in vitro*, tak *in vivo* (Nikulina et al., 2004; Pearse et al., 2004; Lau et al., 2013). Mechanismus působení signalizace cAMP na nervové buňky lze rozdělit do dvou fází.

První fáze probíhá v tzv. růstovém kuželu neuronu a není závislá na transkripci. Zatímco druhá fáze probíhá v těle neuronu a jádře, jedná se o fázi závislou na transkripci. V první fázi dochází zvýšením koncentrace cAMP k aktivaci PKA a EPAC (z angl. *exchange proteins directly activated by cAMP*). Tato aktivace vede k inhibici dráhy Rho-ROCK (z angl. *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase pathway*), důsledkem je podpoření obnovy poškozených nervových buněk. Druhá fáze navazuje na děje první fáze, dochází k fosforylaci CREB. Díky tomu je zvýšena genová transkripce, což podporuje rychlejší obnovení nervových buněk (shrnuto v Zhou et al., 2022). Další studie ukázaly, že zvýšení hladin cAMP zpomaluje poškození axonů, tím že brání přetížení napěťově řízených vápenatých kanálů, a to prostřednictvím fosforylace vápenatých iontů aktivovanou PKA (Pearse et al., 2004). Dochází také k aktivaci dráhy MAPK / ERK (z angl. *mitogen-activated protein kinase / extracellular signal regulated kinase pathway*), která zabraňuje buněčné apoptóze míšní tkáně (Trodec et al., 2002). Vliv cAMP byl pozorován i u polarizace makrofágů a mikroglíí. U těchto buněk, byla podpořena změna fenotypu z M1 na M2. Díky tomu bylo ovlivněno mikroprostředí jizvy a zmírněn zánět (Ghosh et al., 2016).

Nutno podotknout, že pozoruhodný výsledek na obnovení axonového růstu byl zaznamenán i u analogu cAMP – db-cAMP. Použití db-cAMP představuje nadějnou strategii při regeneraci CNS, protože oproti cAMP ovlivňuje pouze PKA kaskádu. PKA kaskáda je spojena se zvyšováním schopnosti axonů regenerovat po jejich poranění (Kajana & Goshgarian, 2008). Doane et al. (1992) ve svém výzkumu ukázali, že aplikací db-cAMP do DRG potkanů byla zvýšena hustota neurofilament, čímž byl podpořen růst růstových vrcholů axonů. Lau et al. (2013) ukázali, že po použití db-cAMP došlo k obnovení většího počtu axonů (viz Obr. 6) v oblasti léze a byl zvýšen počet mikroglíí a makrofágů, čímž byla posílena regenerace míchy. Ve studii Xia et al. (2017) zkusili využít kombinovanou léčbu db-cAMP s poly(propylenkarbonátem) a chondroitinasou ABC (EC 4.2.2.4) pro dosažení intenzivnější regenerace axonů. Výsledky ukázaly výrazné podpoření regenerace axonů a snížení tvorby jizvy. Ve srovnání se samostatným použitím db-cAMP byla uvedená kombinace látek při léčbě PM mnohem účinnější.



Obr. 6: Db-cAMP významně zvyšuje regeneraci axonů v míše po 11 týdnech od poranění. (A–B) Konfokální projekce ukazující regenerované axony v míše v nepřítomnosti (A) nebo přítomnosti (B) db-cAMP. Db-cAMP jasně zvyšuje regeneraci axonů. Tečkované čáry označují střed místa léze. Měřítko v A platí také pro B. R = rostrální; C = kaudální. (C) Db-cAMP významně zvýšil počet regenerovaných axonů od 1 do 5 mm distálně od místa léze. Sloupce představují průměr \pm SEM. Hvězdičky označují statistický význam (* $p < 0,05$). Upraveno a převzato od Lau et al., 2013.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Laboratorní zvířata

- Potkani Lister Hooded (Envigo, Nizozemsko)

3.1.2 Adeno-asociovaný virový vektor

AAV vektory poskytl skupina pana doktora Joosta Verhaagena z Nizozemského institutu pro neurovědy AAV, které byly připraveny podle již publikovaného technologického postupu uvedeném v článku Hermens et al. (1999).

3.1.3 Chemikálie

- 1,4-diazabicyklo (2,2,2) oktan (Roth, USA)
- Bromfenolová modř (P Lab, ČR)
- Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA)
- Dithiotreitol (Bio-Rad, USA)
- Dodecylsulfát sodný (Sigma Aldrich, USA)
- Etanol (Supelco, USA)
- Fosfátový pufr (Invitrogen, USA)
- Glycerol (Sigma Aldrich, USA)
- Glycin (Sigma Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (Cell signaling, USA)
- ChemiBLOCKER (Milipore, USA)
- Chlorid sodný (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich, USA)
- Luxolová modř (Roth, USA)
- Metanol (Sigma Aldrich, USA)
- Mléko odtučněné (Cell signaling, USA)
- Mowiol (Roth, USA)
- Phosphatase inhibitor PhosSTOP™ EASYpack (Roche, Švýcarsko)
- Ponceau S (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Protease inhibitor cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Švýcarsko)

- Radioimunoprecipitační testovací pufr (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Sacharosa (Sigma Aldrich, USA)
- Solakryl (Penta, ČR)
- Tissue-Tek® O.C.T. Compound (VWR chemicals, Belgie)
- Tris (hydroxymethyl) aminometan (Sigma Aldrich, USA)
- Triton (Sigma Aldrich, USA)
- Tween 20 (Roth, USA)
- Uhličitan lithný (Sigma Aldrich, USA)
- Xylen (Penta, ČR)

3.1.3.1 Protilátky

- anti- β -aktin (Cell signaling, USA)
- anti-CS-56 (Sigma Aldrich, USA)
- anti-GFAP (Cell signaling, USA)
- anti-GFP (Invitrogen, USA)
- anti-MAG (Cell signaling, USA)
- anti-MAG (R&D, Nizozemsko)
- anti-NogoA (Cell signaling, USA)
- anti-OMgp (R&D, Nizozemsko)
- anti-PKA $C\alpha$ (Cell signaling, USA)
- anti-Tenascin C (Cell signaling, USA)
- anti-V5 (Invitrogen, USA)
- anti-vinkulin (Cell signaling, USA)

3.1.4 Připravené roztoky

3.1.4.1 Diferenciační roztok

Diferenciační roztok byl připraven navážením 0,5 g uhličitanu lithného, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody.

3.1.4.2 Luxolová modř

Roztok se skládal z 10 g luxolové modře, 50 ml 10% kyseliny octové a 950 ml 96% etanolu.

3.1.4.3 Odmývací pufr

Odmývací pufr byl složen z 1,5 g glycinu, 2,9 g chloridu sodného a 100 ml destilované vody. Následně byl pufr upraven na pH 2,8.

3.1.4.4 Přenosový pufr

Pro přípravu přenosového pufru 5x bylo naváženo 15,1 g tris(hydroxymethyl) aminometanu (zkráceně tris) a 72 g glycinu do celkového objemu 1 l destilované vody.

3.1.4.5 Tris-nepufrovaný fyziologický roztok

Tris-nepufrovaný fyziologický roztok 10x (TNS, z angl. *tris-nonbuffered saline*) byl připraven navážením 30 g tris, který byl rozpuštěn do celkového objemu 0,5 l destilované vody. Následně byl roztok upraven na pH 7,6.

3.1.4.6 Tris-pufrovaný fyziologický roztok s Tween 20

Pro přípravu tris-pufrovaného fyziologického roztoku 5x s Tween 20 (TBST, z angl. *tris-buffered saline with Tween 20*) bylo naváženo 12,1 g tris, 146,1 g chloridu sodného a vše bylo rozpuštěno v 700 ml destilované vody. Poté bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 7,5. Následně bylo přidáno 5 ml Tween 20 a roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou vodou.

3.1.4.7 Vzorkový pufr

Nejdříve byl připraven zásobní roztok složený ze 12 g tris, který byl rozpuštěn v 50 ml destilované vody. Poté byl připraven vzorkový pufr 2x obsahující 1,25 ml zásobního roztoku, 4 ml glycerolu, 0,8 g dodecylsulfátu sodného (SDS, z angl. *sodium dodecyl sulfate*) a 0,004 g bromfenolové modře, který byl doplněn do celkového objemu 20 ml destilovanou vodou.

3.1.5 Pomůcky

- Elektroforetická aparatura (Bio-Rad, USA)
- Chirurgické nástroje (Fine Science Tools, Kanada)
- Kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kit Fast Start Universal Probe Master (Roche, Švýcarsko)
- Kit RNeasy Micro (Qiagen, Německo)
- Kit Transcriptor Universal cDNA Master (Roche, Švýcarsko)
- Krycí skříčka (Marienfeld, Německo)

- Kultivační destičky 96jamkové (Cell Culture Supplies, Švýcarsko)
- Laboratorní plast (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní sklo (Vercon, ČR)
- MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Bio-Rad, USA)
- Nerezové nástroje (Medplus, ČR)
- Podložní sklíčka Superfrost Plus™ Gold Adhesion Microscope Slides (Ependia, USA)
- Polyvinylidenfluoridová přenosové membrány (Bio-Rad, USA)
- Squisher™- Single (Zymo Research, USA)
- Taqman CREB1® (Rn00578828_g1, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Taqman GAPDH® (Rn01775763_g1, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Taqman ITGα9® (Rn01746751_m1, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Western blot aparatura (Bio-Rad, USA)

3.1.6 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Vercon, ČR)
- Azure c600 (Azure Biosystems, USA)
- Centrifuga (Hettich, Německo)
- Homogenizátor (Giagen, Nizozemsko)
- Inkubátor EN 120 (Nuve, Turecko)
- Kryostat CryoStar NX70 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kývačka (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Laminární box SmartFAST (Schoeller, ČR)
- Míchačka (P lab, ČR)
- Mikroskop LEICA CTR 6500 (Leica, Německo)
- Mikroskop Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Německo)
- Mikroskop Zeiss LSM 800 (Zeiss, Německo)
- Nano drop (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Pipetboy (Hirschmann, USA)
- Pipety (Eppendorf, Německo)

- QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Spektrofotometr FLUOstar Omega (BMG labtech, Německo)
- Termocyklér T100 (Bio-Rad, USA)
- Vakuová pumpa (Merci, ČR)
- Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

3.1.7 Použitý software

- cSeries Imaging Systems
- GraphPad Prism verze 10
- ImageJ Fiji (Schindelin et al., 2012)
- TissueGnostic Software
- ZEN Microscopy Software

3.2 Metody

3.2.1. Poranění míchy u laboratorních zvířat

3.2.1.1 Laboratorní podmínky

Pro experimenty bylo použito 55 samců potkanů Lister Hooded o hmotnosti 150–175 g. Zvířata byla chována po třech v klecích s 12hodinovým cyklem světlo-tma za standardních podmínek: teplota 22 ± 2 °C a vlhkost $50 \% \pm 5$ %. Zvířata v klecích měla volný přístup k potravě a vodě. Laboratorní podmínky pro zvířata zajišťoval po celou dobu experimentů laboratorní personál Ústavu experimentální medicíny AV ČR. Všechny postupy byly schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR a byly provedeny v souladu se zákonem č. 77/2004 Sb. v České republice (číslo projektu pokusu: AVČR 4386/2022 SOV II). Na základě předchozích studií byl počet zvířat pro jednotlivé pokusy statisticky optimalizován tak, aby bylo dosaženo jejich snížení v souladu se směrnicí Evropské komise 2010/63/EU, a bylo vynaloženo veškeré úsilí k minimalizaci bolesti a utrpení laboratorních zvířat. Každému zvířeti bylo přiděleno číslo a bylo náhodně zařazeno do jedné z kontrolních nebo experimentálních skupin.

3.2.1.2 Chirurgický zákrok

Chirurgický zákrok na zvířatech byl proveden za aseptických podmínek Mgr. Kateřinou Štěpánkovou. Zvířata byla uspána inhalačním anestetikem isofuranem (1,8-2,2 %) za ustavičného proudění $0,3 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ kyslíku a $0,6 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ vzduchu. Všem zvířatům byl

subkutánně podán buprenorfin (0,2 mg na kg tělesné hmotnosti zvířete). Pomocí sterilizovaných chirurgických nástrojů byly na levé straně vyhledány dvě DRG v oblasti L4 a L5, do kterých bylo vstříknuto 1,5 μ l virového vektoru (AAV nesoucí ITG α 9 a kindlin 1) s titrem 2×10^{12} GC \cdot ml $^{-1}$ nebo virového vektoru ve směsi s 10mM db-cAMP pomocí injekční stříkačky Hamilton. Kontrolní skupině potkanů byl vstříknut zelený fluorescenční protein (GFP, z angl. *green fluorescent protein*) nebo GFP s db-cAMP pomocí injekční stříkačky Hamilton. Následně byla provedena laminektomie v oblasti T10. Pomocí inzulínové stříkačkou U100 byl vytvořen malý řez v duře a zadní provazce míšni byly přeříznuty Bonnerovými kleštěmi. Kůže a svaly operovaných zvířat byly ihned po poranění na úrovni míšního segmentu T10 sešity. Zvířata byla po operaci vložena zpět do označených klecí. Po skončení experimentů byla operovaná zvířata buď naperfundována pro imunohistochemické barvení, nebo usmrcena intraperitoneálním podáním letální dávky ketaminu (100 mg \cdot kg $^{-1}$) a xylazinu (20 mg \cdot kg $^{-1}$) a dekapitována pomocí zmenšené gilotiny pro účely Western blotu (WB) a PCR experimentů. Mícha a DRG byla co nejrychleji vyjmuta a uložena na suchý led do jejich dalšího použití.

3.2.2. Histologické zpracování tkáně

S pomocí chirurgických nástrojů byly odebrány vzorky míšní tkáně a DRG od kmene potkanů Lister-Hooded po transkardiální perfúzi pomocí 4% paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (PBS, z angl. *phosphate-buffered saline*). Vzorky byly nadále prosyceny v roztoku sacharosy – 10%, 20% a 30% sacharosa v PBS, roztok byl vždy vyměněn po tom, kdy vzorek míšní tkáně a DRG klesl ke dnu zkumavky. Vzorky byly těsně před krájením zality do Tissue-Tek® O.C.T. Compound. Následně byly vzorky zmrazeny a nakrájeny na kryostatu při cca -20 °C. Tloušťka příčných a podélných řezů byla u DRG 12 μ m a u míchy 20 μ m. Řezy byly ponechány v mrazáku při -20 °C až do jejich dalšího použití.

3.2.3 Histologické barvení

3.2.3.1 Imunohistochemické barvení

Podložní sklíčka s nakrájenými řezy míchy a DRG byla vyjmuta z -20 °C a ponechána při laboratorní teplotě po dobu 8 minut. Následně byla nakrájená míšní tkáň a DRG promyta v PBS (3x 10 minut) a poté byla provedena permeabilizace tkání pro usnadnění vniku protilátky do nakrájených příčných řezů pomocí 0,5% roztoku Triton v PBS po dobu 120 minut. Následně byla provedena imunoblokace, kvůli redukci nespecifických

vazeb protilátek i ostatních složek v roztocích obsahujícím následující komponenty: 0,3 M glycin, chemiBLOCKER (1:10), 0,2% Triton a PBS. Inkubace trvala 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po imunoblokaci byl nanesen na řezy roztok o stejném složení jako pro imunoblokaci, do kterého byly přidány primární protilátky (viz Tab. 2). Inkubace s primárními protilátkami proběhla přes noc v chladové místnosti (4 °C). Poté byly primární protilátky odmyty pomocí PBS (2x 10 min) a 0,2% Triton / PBS (1x 10 minut). Byla přidána vhodná sekundární protilátka na základě původu primární protilátky (viz Tab. 2). Roztok sekundárních protilátek byl připraven ve stejném roztoku jako byla provedena blokace a inkubace s primárními protilátkami. Inkubace trvala 2 hodiny při laboratorní teplotě. Následně bylo provedeno odmytí sekundární protilátky pomocí PBS (3x 10 min), 0,2% Triton / PBS (2x 10 minut), a 1x TNS (1x 30 minut). Poté byly vzorky zamontovány pomocí Mowiol montovacího média, do kterého byl přidán 1,4-diazabicyklo (2,2,2) oktan (DABCO), který brání přirozené redukci signálu.

Tab. 2: Primární a sekundární protilátky, které byly použity pro imunohistochemické experimenty.

Primární protilátka	Epitop	Klonalita	Původ sekundární protilátky	Ředění	Inkubace (h)
Anti-CS-56	GSPGs	monoklonální	myš	1:500	24
Anti-GFAP	GFAP	polyklonální	kuře	1:500	24
Anti-GFP	GFP	polyklonální	kuře	1:800	72
Anti-GFP	GFP	polyklonální	králík	1:800	72
Anti-Nogo A	Nogo A	polyklonální	králík	1:500	24
Anti-OMgp	OMgp	monoklonální	potkan	1:500	24
Anti-Tenascin C	Tenascin C	monoklonální	králík	1:500	24
Anti-V5	V5 značka	monoklonální	myš	1:800	72

3.2.3.2 Barvení luxolovou modří

Část nakájené míšní tkáně byla obarvena luxolovou modří pro pořízení reprezentativních snímků nezraněné a poraněné míšní tkáně. Nakrájené příčné a podélné řezy míšní tkáně byly nejdříve 4x opláchnuty v PBS, vždy po dobu 7 minut. Mezitím byla předem připravená luxolová modř dána v uzavřené kyvetě do inkubátoru nastaveného na 60 °C přes noc. Poté byly řezy míšní tkáně ponechány 5 minut v 70% etanolu a následně byly 2x opláchnuty v destilované vodě. Poté byly postupně umístěny vždy tři řezy do kyvety a byl přidán diferenciační roztok uhličitanu lithného na pár sekund. Řezy byly opláchnuty nejdříve v 70% etanolu a následně 2x v destilované vodě. V následujícím pořadí vždy po dobu 5 minut byl vyměněn roztok 96% etanolu, 100% etanolu a xylenu. Řezy byly nakonec zamontovány solakrylem.

3.2.4 Mikroskopie

Imunohistochemicky označené neurony v DRG, složení bariéry v okolí míšní léze a počet axonů nad a pod lézí byly zaznamenány pomocí konfokálního mikroskopu ZEISS LSM 880. Následně byla provedena kvantifikace jednotlivých parametrů daných pro jednotlivé sety barvení (počet buněk / měření intenzity signálu) pomocí softwaru ImageJ Fiji. Pro spočítání indexu regenerace senzoričtých axonů po míšní lézi byl použit epifluorescenční mikroskop Axioskop s mřížkou 10 x 10 v pravém okuláru mikroskopu. Počet axonů byl počítán manuálně, a to z důvodu, aby se zabránilo nepřesnému prahování při automatickém zpracování obrazu, které by vedlo k nespolehlivým a případně nepřesným výsledkům. Počet axonů byl počítán dvěma nezávislými experimentátory. Reprezentativní snímky nezraněné a poraněné míšní tkáně byly pořízeny na epifluorescenční mikroskopu Leica.

3.2.5 Western blot

Chirurgicky odebrané vzorky míšní tkáně a DRG od kmene potkanů Lister-Hooded, které byly uchovány na suchém ledu, byly zváženy na analytických vahách a pomocí pinzety přeneseny do 15ml centrifugačních zkumavek. Ke každému vzorku byl přidán vychlazený radioimunoprecipitační testovací pufr (RIPA, z angl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) roztok smíchaný s inhibitory proteas a fosfatas (300 µl RIPA na 5 mg míšní tkáně), a pomocí elektrického homogenizátoru byly vzorky DRG a míšní tkáně zhomogenizovány. Následně byla zhomogenizovaná míšní tkáň uchována na ledu a míchána na míchačce po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.

Následně byla provedena centrifugace při $15\,000 \times g$, po dobu 20 minut a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant obsahující proteiny byl pipetou opatrně odebrán a rozalíkvótován do nových mikrozkušavek. Poté byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA, z angl. *bicinchoninic acid protein assay*) z komerčně dostupného kitu, dle návodu od výrobce.

Pro stanovení množství analyzovaných proteinů ve vzorcích míšní tkáně z oblasti léze a DRG byla zvolena metoda WB. Nejdříve byly vzorky připraveny na SDS-PAGE. Na základě spočítaných koncentrací proteinů byl každý vzorek naředěn pomocí destilované vody na stejnou koncentraci $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Naředěné vzorky o objemu $17\text{ }\mu\text{l}$ byly smíchány s $17\text{ }\mu\text{l}$ vzorkového pufru 2x smíchaného s dithiotreitem (DTT) ($425\text{ }\mu\text{l}$ vzorkového pufru 2x a $25\text{ }\mu\text{l}$ DTT). Vzorky byly zvortexovány a inkubovány na termobloku po dobu 5 minut při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byly vzorky zvortexovány a stočeny. Pro separaci proteinů z míšní tkáně byla použita SDS-PAGE na komerčně dostupných gelech BioRAD. Aparatura pro SDS-PAGE byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí a byl nastaven elektrický proud na $15\text{ mA} \rightarrow 30\text{ mA}$ (na jeden gel).

Poté byl proveden přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu. Následně byla sestavena aparatura pro WB. Poté byla v metanolu aktivována PVDF membrána a společně s gelem z proběhlé elektroforézy byly umístěny do WB „sendviče“ mezi 2 filtrační papíry. WB „sendvič“ byl poskládán v nádobě s nalitým přenosovým pufrem. Kazeta byla vložena do WB aparatury tak, aby membrána směřovala k anodě. WB aparatura byla dána na led a byla doplněna přenosným pufrem 1x po značku „Blotting“ na stěně vany WB aparatury. Pro přenos proteinů na PVDF membránu byla WB aparatura připojena ke zdroji stejnosměrného napětí, bylo nastaveno konstantní elektrické napětí na 60 V a elektrický proud na 350 mA po dobu 1 hodiny. Po skončení přenosu proteinů z gelu na PVDF membránu, byla WB aparatura rozebrána, PVDF membrány byly vyjmuty ze „sendviče“ a proteiny na PVDF membráně byly detekovány pomocí Ponceau S. PVDF membrány byly následně promývány v TBST dokud nedošlo k odmytí červené barvy Ponceau S. Dále byla provedena imunoblokace 5% roztokem odtučněného mléka, nebo hovězího sérového albuminu (BSA, z angl. *bovine serum albumin*) podle typu protilátky. PVDF membrány byly 120 minut inkubovány na kývačce při pokojové teplotě. Během imunoblokace PVDF membrán v 5% roztoku odtučněného mléka / BSA byly připraveny roztoky primárních protilátek, viz Tab. 3. Po skončení blokace v 5% roztoku odtučněného

mléka / BSA byly PVDF membrány 3x propláchnuty v TBST po dobu 5 minut. PVDF membrány byly přemístěny do falkon s roztokem primární protilátky a dány do chladové místnosti (4 °C) na kývačku. Druhý den byly PVDF membrány 3x promyty v TBST po 5 minutách a následně inkubovány 60 minut v roztoku se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (ředění 1:10 000 v TBST), viz Tab. 3. Potom byly PVDF membrány 3x promyty po 5 minutách v TBST. Membrány byly vyvolány na přístroji Azure c600 pomocí cSeries Imaging Systems softwaru. Po vizualizaci byly membrány vymazány pomocí odmyvacího pufu a všechny kroky od blokace 5% roztokem odtučněného mléka / BSA byly zopakovány. Bandy na vyvolaných PVDF membránách byly hodnoceny pomocí ImageJ Fiji softwaru.

Tab. 3: Primární a sekundární protilátky, které byly použity pro metodu WB.

Primární protilátka	Epitop	Klonálnost	Původ sekundární protilátky	Ředění	Inkubace (h)
Anti- β -aktin	β -aktin	monoklonální	králík	1:1000	24
Anti-GFAP	GFAP	monoklonální	králík	1:1000	24
Anti-GFP	GFP	polyklonální	kuře	1:1000	24
Anti-MAG	MAG	monoklonální	králík	1:1000	24
Anti-PKA C α	PKA C α	polyklonální	králík	1:1000	24
Anti-Tenascin C	Tenascin C	monoklonální	králík	1:1000	24
Anti-Vinkulin	Vinkulin	monoklonální	králík	1:1000	24

3.2.6 Polymerázová řetězová reakce

3.2.6.1 Izolace RNA

Vyjmutá DRG z dekapitovaných laboratorních zvířat byla manuálně zhomogenizovaná pomocí polypropylenového Squisher™- Single v 1,5 ml zkumavkách. Pro izolaci RNA z DRG byl použit komerční RNeasy Micro Kit, ze kterého byly použity komerční pufrы – RPE, RTL, RW1 – a RNeasy MinElute kolonky. Ke zhomogenizovaným DRG bylo přidáno 350 μ l RTL pufru, poté byl vzorek zvortexován. Do zkumavek bylo přidáno 350 μ l 70% etanolu a lyzát byl pipetováním promíchán. Potom byl obsah zkumavek přenesen do RNeasy MinElute kolonek a byla provedena centrifugace při $12\ 000 \times g$ po dobu 30 sekund. Eluát byl vyhozen do odpadu. Do kolonky RNeasy MinElute bylo přidáno 350 μ l RW1 pufru, vzorek byl opět centrifugován při $12\ 000 \times g$ po dobu 30 sekund. Eluát byl opět vyhozen do odpadu. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 80 μ l roztoku DNasy I, připraveného dle protokolu od výrobce. Zkumavky s kolonkami byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Potom bylo přidáno do kolonek 350 μ l RW1 pufru, vzorky byly zcentrifugovány při $12\ 000 \times g$ po dobu 30 sekund, a následně byl odstraněn eluát. Plastová zkumavka u kolonky RNeasy MinElute byla nahrazena za novou, a bylo přidáno 500 μ l RPE pufru. Vzorek byl opět zcentrifugován při $12\ 000 \times g$ po dobu 30 sekund. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l 80% etanolu a opět byla provedena centrifugace při $12\ 000 \times g$ po dobu 2 minut. Sběrná kolonka byla poté vyhozena do odpadu. Následně byla otevřena kolonka a nechána v laminárním boxu po dobu 15 minut, aby došlo k vyschnutí membrány s vyizolovanou RNA. Kolonka RNeasy MinElute byla dána do nové sběrné zkumavky, následně bylo přidáno 1,4 μ l speciálně upravené vody prosté rnas a byla centrifugována při $16\ 000 \times g$ po dobu 1 minuty. Takto vyizolovaná RNA byla uložena do $-80\ ^\circ\text{C}$ až do dalšího kroku – přepisu RNA do cDNA – vzorek byl v $-80\ ^\circ\text{C}$ uložen maximálně po dobu 5 dní.

3.2.6.2 Přepis RNA do cDNA

Nejdříve byla spektrofotometricky změřena koncentrace RNA, která byla naředěna miliQ vodou na výslednou koncentraci $2\ \mu\text{g}\cdot 15\ \mu\text{l}^{-1}$. Poté byl podle protokolu od výrobce kitu Transcriptor Universal cDNA Master připraven Mastermix – objemy uvedené níže odpovídají přípravě Mastermixu na jeden vzorek (15 μ l):

- 4 μ l transkripčního univerzálního reakčního pufru 5x
- 1 μ l univerzální reverzní transkriptasa 10x

Poté byly vzorky vloženy do termocykléru a inkubovány 5 minut při 25 °C, 10 minut při 55 °C, a poté 5 minut při 85 °C. Po přepisu do cDNA byly vzorky uloženy v –20 °C do jejich dalšího použití.

3.2.6.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

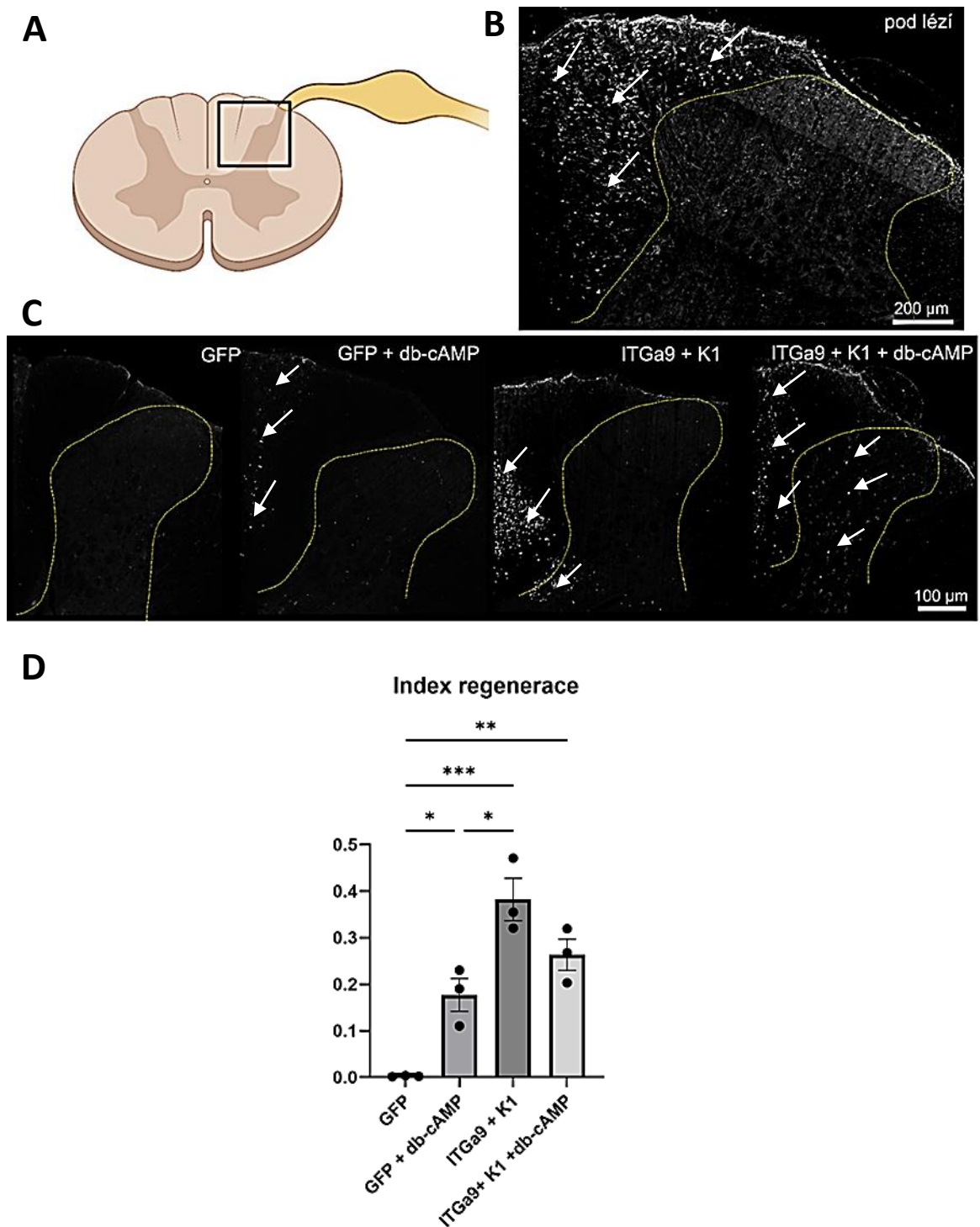
Podle protokolu od výrobce kitu Fast Start Universal Probe Master bylo smícháno 4,5 µl vzorku cDNA, 5 µl Fast Start a 0,5 µl Taqman – pro ITGa9, CREB1 a glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (GAPDH, z angl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, EC 1.2.1.12). Poté byly vzorky napipetovány v dupletech do PCR destičky. Amplifikace byla provedena v qPCR termocykléru. Veškeré reakce probíhaly se stejnými reakčními podmínkami: 2 minuty při 50 °C, 10 minut při 95 °C, následovalo 40 cyklů po 15 sekundách při 95 °C a 1 minutě při 60 °C.

4 VÝSLEDKY

I přes již publikované výsledky efektu upregulace ITG α 9 pomocí genové terapie nebo aplikace db-cAMP do DRG na regeneraci senzoričských axonů po PM, nebylo na základě behaviorálních testů (data nejsou součástí této diplomové práce) pozorováno funkční zlepšení u terapie kombinující tyto dva přístupy v porovnání pouze s jedním nebo druhým léčebným přístupem. Právě kvůli tomu byla tato diplomová práce zaměřena na objasnění toho, proč k funkčnímu zotavení senzoričských funkcí po PM u potkanů nedošlo a co stálo proti regeneraci senzoričských axonů.

4.1 Index regenerace poškozovaných senzoričských axonů

Po tříměsíčním období, kdyby byli potkani s PM testováni pomocí celé řady senzoričských behaviorálních testů, následovalo zpracování míšní tkáně a DRG. Prvním krokem po neúspěšném výsledku senzoričských behaviorálních testů, ve kterém byla testována kombinace léčebných terapií, bylo spočítání indexu regenerace. Toto číslo udává poměr axonů nad a pod lézí, a poskytuje tak číselnou hodnotu, která udává stupeň samotné regenerace axonů po PM. Oblast míšní léze, ve které byl mikroskopicky hodnocen počet axonů, je znázorněna ve čtverci na Obr. 7 A. Mikroskopické snímky, ze kterých byl počet axonů hodnocen, jsou zobrazeny na Obr. 7 B-C. Z výsledků indexu regenerace bylo zjištěno, že kombinace genové terapie exprimující kindlinem 1 aktivovaný ITG α 9 společně s db-cAMP (ITG α 9 + K1 + db-cAMP) nevedla k podpoření regenerace většího množství senzoričských axonů po PM (viz Obr. 7 D) v porovnání s aplikací genové terapie samostatně (ITG α 9 + K1). Zvýšená regenerace však byla pozorována vůči kontrolní skupině (GFP). Ve skupině s aplikovaným db-cAMP byl aplikován i virový vektor nesoucí GFP, a to z důvodu označení vláken pro jejich jednodušší vizualizaci a srovnatelnost z ostatními skupinami. V této skupině byl pozorován signifikantně nižší index regenerace v porovnání s ITG α 9 + K1 skupinou. Na mikroskopických snímcích, ve všech skupinách kromě kontrolní, je vidět, že axony nad lézí nenásledují přesně jejich anatomickou dráhu, která je vidět pod lézí a dokonce se přepojují do šedé hmoty. Toto naznačuje, že léze byla kompletní a jde tedy o skutečnou regeneraci.

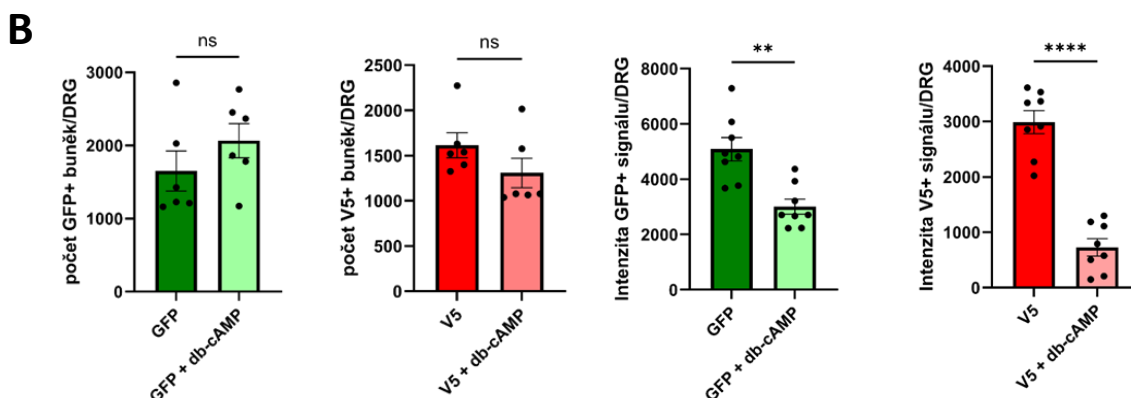
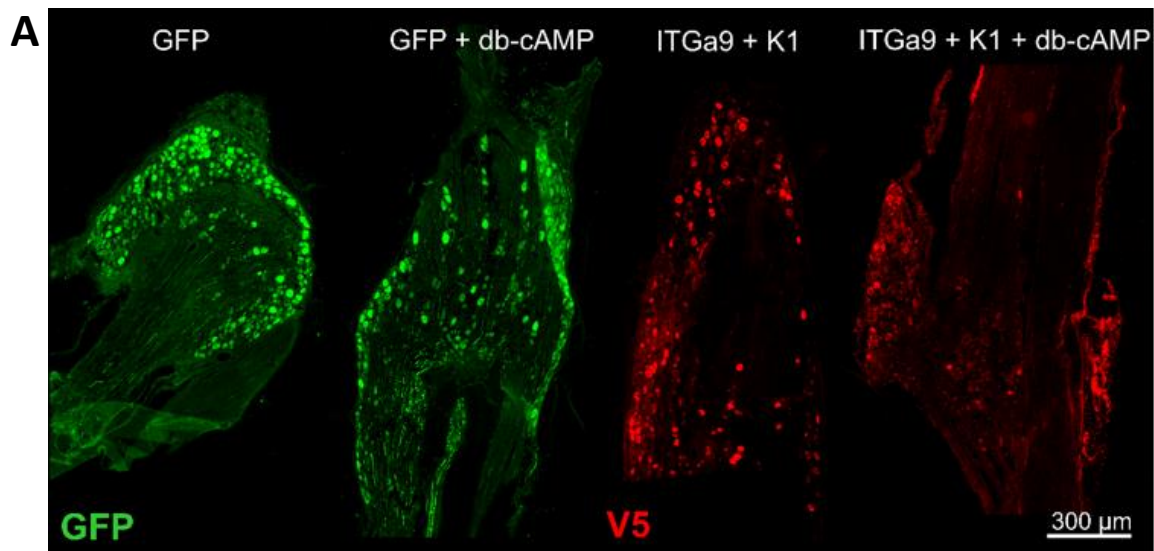


Obr. 7: Regenerace senzoričských axonů po použití genové terapie/db-cAMP nebo jejich kombinace do DRG potkanů. (A) Znárodnění koronárního řezu míchou s DRG. Oblast míchy ve čtverci odkazuje na to, která část míchy byla hodnocena na přítomnost axonů (oblast, kde vedou dráhy zadních provazců míšních). Vytvořeno v BioRender.com. (B) Mikroskopický snímek ukazující oblast míchy pod lézí. Snímek je především zaměřený na dráhy zadních provazců (senzoričské trakty) a zadní roh míšni, kde bylo hodnoceno množství axonů po použití genové terapie/db-cAMP nebo jejich kombinace do DRG. Zvětšení 20×. (C) Mikroskopické snímky oblasti nad míšni lézi ve všech experimentálních skupinách – kontrolní skupiny (GFP), kindlinem 1 aktivovaný ITGα9 (ITGα9 + K1), db-cAMP (GFP + db-cAMP) nebo jejich kombinace (ITGα9 + K1 + db-cAMP) do DRG. Zvětšení 20×. Bílé šipky ukazují na některé

regenerované axony v míše. Žlutá oblast ohraničuje šedou hmotu míšni od bílé. (D) Index regenerace sensorických axonů ukazuje poměr sensorických axonů nad a pod míšní lézí po použití genové terapie/db-cAMP nebo jejich kombinace do DRG. Pro vyhodnocení výsledků z konfokálního mikroskopu byl použit Tukeyho test vícenásobného porovnání, jednocestná ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2 Transdukční účinnost virového vektoru

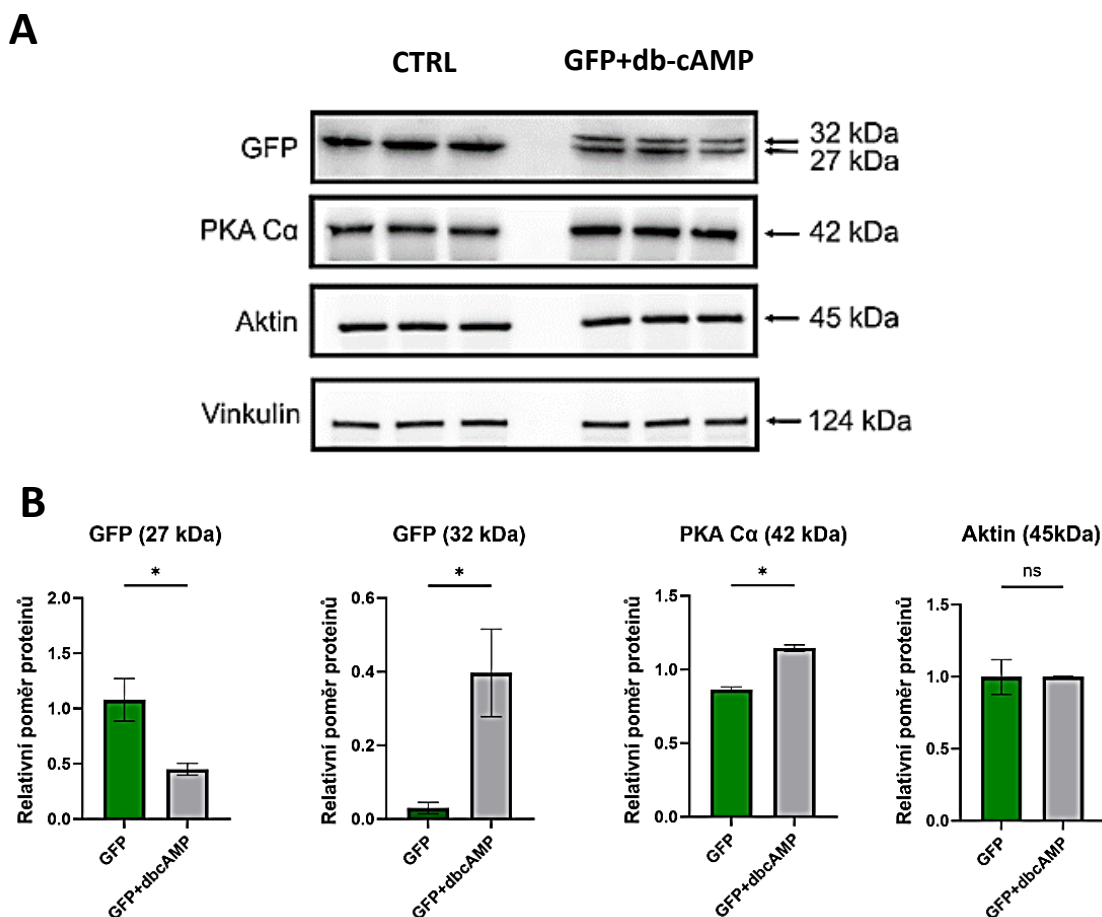
Pomocí fluorescenční mikroskopie byly vizualizovány AAV transfekované sensorické neurony v DRG. Na mikroskopických snímcích byly měřeny dva parametry – počet transfekovaných nervových buněk na řez DRG a intenzita signálu GFP nebo značky V5, která je nesená přímo ITG α 9. Pro kvantifikaci byl v obou testovaných případech použit program ImageJ Fiji. V případě počtu transfekovaných nervových buněk bylo zjištěno, že přibližně stejný počet nervových buněk exprimuje injikovaný virový vektor (Obr. 9 A a B). Každopádně intenzita fluorescenčního signálu GFP / V5 byla pozorována signifikantně nižší v přítomnosti db-cAMP. Tímto výsledkem bylo naznačeno, že aplikace db-cAMP do DRG interaguje s transdukční účinností AAV vektoru.



Obr. 8: Transdukční účinnost AAV vektoru v kombinaci s nebo bez db-cAMP. (A) Senzorické neurony v DRG po aplikaci jednotlivých terapií. Vektory AAV nesoucí buď GFP, nebo ITG α 9 nesoucí značku V5. Zvětšení 20 \times . (B) Kvantifikace výsledků z imunohistochemie. Sloupcové grafy ukazují počet transfekovaných nervových buněk na řez DRG a intenzitu signálu transfekovaných buněk a GFP / V5 v DRG. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (n=6-8 DRG na skupinu; 2-4 řezy na DRG z jednoho zvířete). Pro vyhodnocení byl použit nepárový t-test, ns $p \geq 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Pro ověření výsledků z imunohistochemie o transdukční účinnosti AAV byla použita metoda WB. Pomocí WB byly porovnány DRG po aplikaci GFP v kombinaci s db-cAMP (GFP + db-cAMP) oproti kontrole (CTRL), kde byl aplikován pouze GFP do DRG. Analýzou WB bylo zjištěno, že po aplikaci db-cAMP do DRG došlo k rozdělení bandu pro GFP, viz Obr. 10 A. V tomto případě bylo předpokládáno, že se pravděpodobně jednalo o posttranslační modifikaci GFP zprostředkovanou enzymem PKA, která byla po aplikaci db-cAMP do DRG signifikantně zvýšena. Stanovení množství PKA sloužilo jako potvrzení přítomnosti db-cAMP. Sloupcovými grafy bylo kvantitativně potvrzeno snížení hladiny GFP (27 kDa) v DRG po aplikaci db-cAMP (GFP + db-cAMP), viz Obr. 11 B.

Výsledky z WB byly normalizovány na vinkulin, který představuje housekeeping protein. Kromě vinkulinu bylo zjištěno i množství aktinu, dalšího housekeeping proteinu, pro kontrolu správnosti výsledků z WB.



Obr. 9: Ověření transdukční účinnosti AAV vektoru pomocí WB analýzy. (A) Detekce GFP, PKA C α , aktinu a vinkulinu s hodnotou molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů. Hodnoty molekulových hmotností zkoumaných proteinů byly porovnávány s kontrolou (CTRL), ve které byl do DRG aplikován pouze GFP. (B) Kvantifikace výsledků z WB analýzy. Vyjádření relativního poměru proteinů v bandech z WB po aplikaci db-cAMP do DRG. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (n=6 DRG ze 3 zvířat na skupinu). Pro kvantifikaci výsledků z WB byl použit nepárový t-test, ns $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

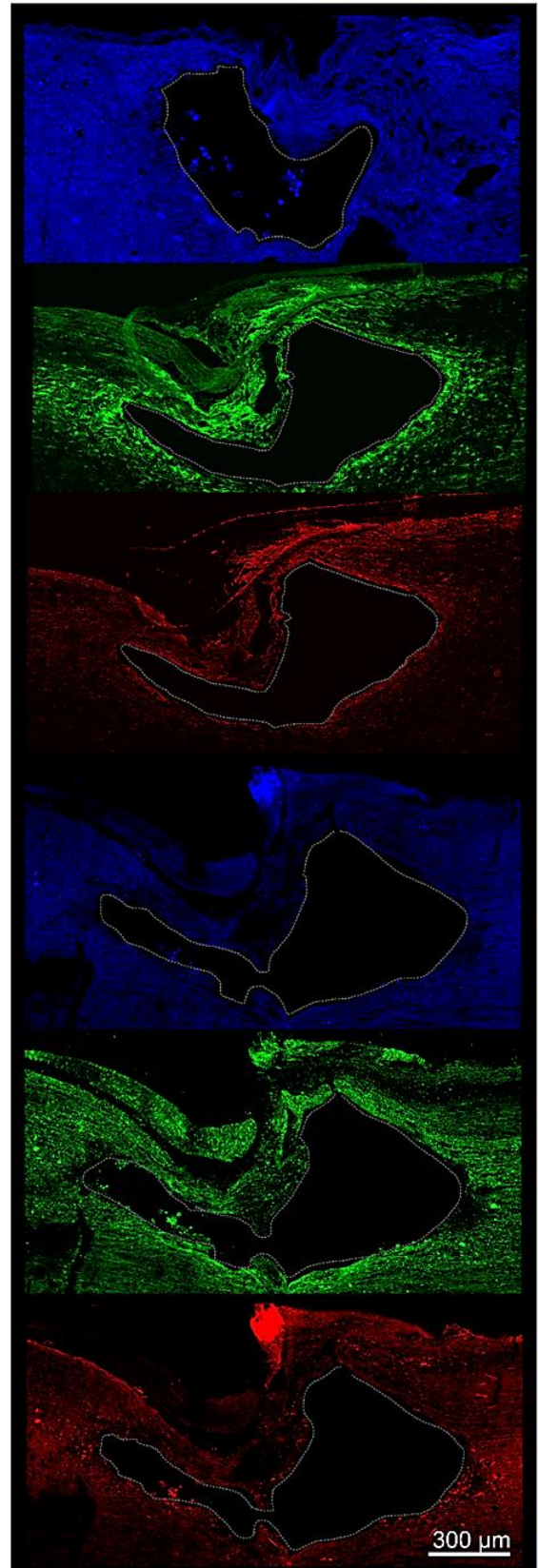
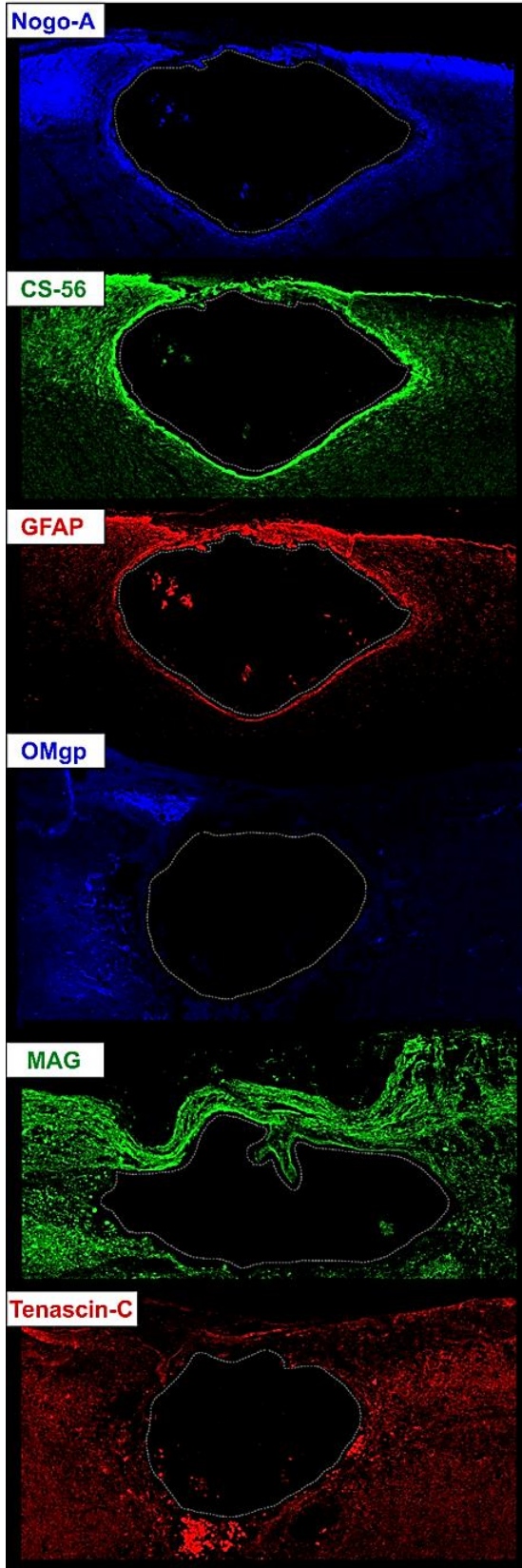
4.3 Molekulární vliv db-cAMP na složení jizvy

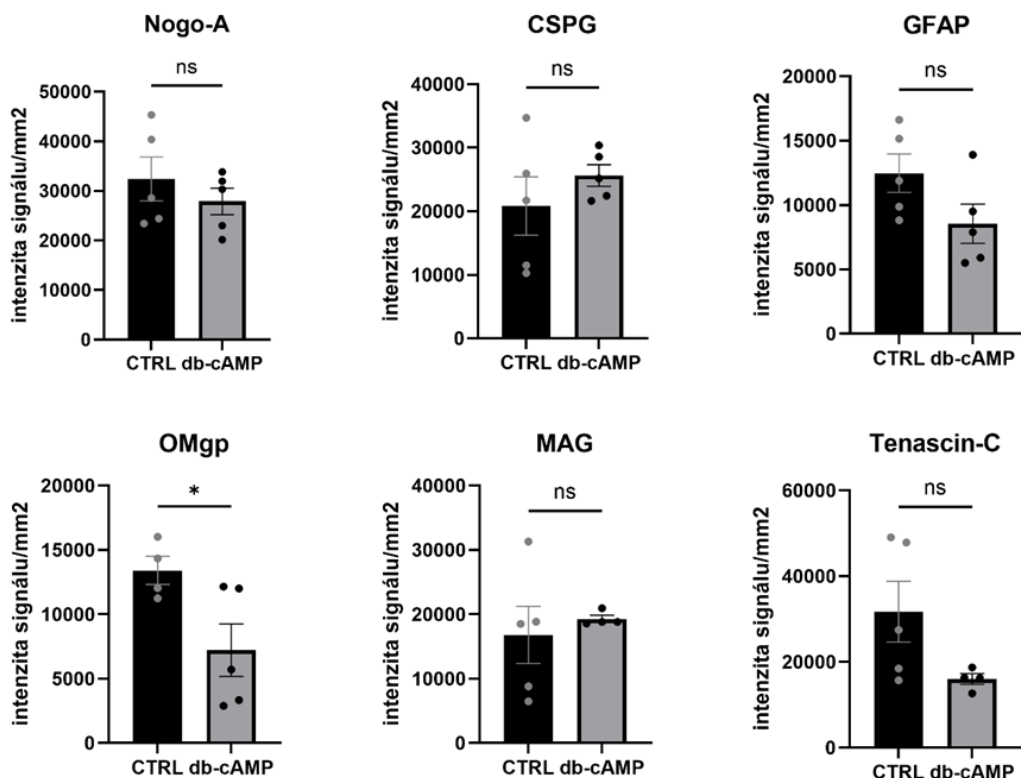
Jednou z teorií, proč byl použit právě db-cAMP byl jeho, již publikovaný, efekt na tvorbu jizvy po PM. Mikroskopické snímky z konfokálního mikroskopu vyjadřují intenzitu fluorescenčního signálu Nogo A, GSPG, GFAP, OMgp, MAG a tenascin C po 3 měsících od aplikace léčby. Z mikroskopických snímků nebylo zjištěno snížení hladin inhibičních molekul – Nogo A, GSPG, GFAP, OMgp, MAG a tenascin C – po aplikaci db-cAMP do DRG oproti kontrole (CTRL), pouze AAV vektor bez aplikace db-cAMP, viz Obr. 11 A. Kvantifikací výsledků z imunohistochemie bylo ukázáno, že došlo ke snížení OMgp v okolí jizvy po aplikaci db-cAMP do DRG, viz Obr. 11 B. Avšak rozdíl hladin inhibičních molekul Nogo A, GSPG, GFAP, MAG a tenascin C nenabyl statistického významu po 3 měsících léčby.

A

CTRL

db-cAMP



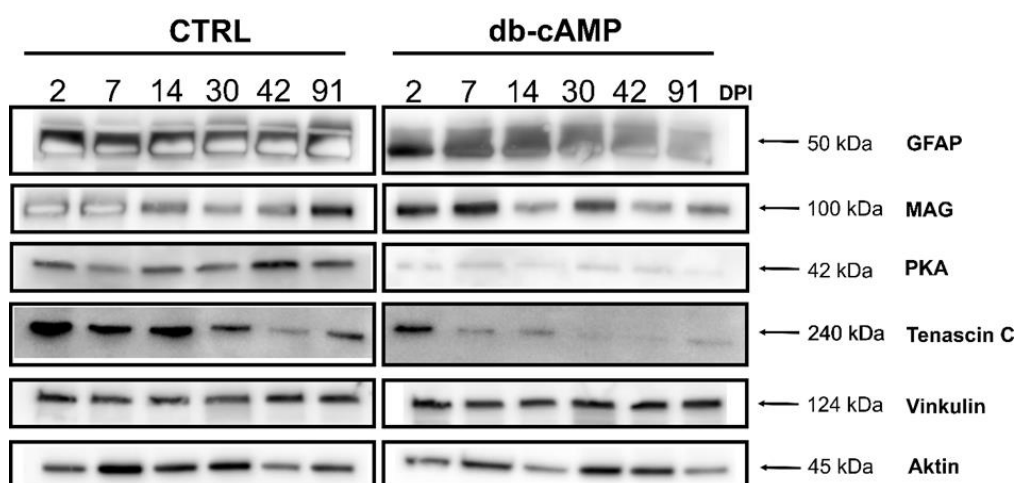
B

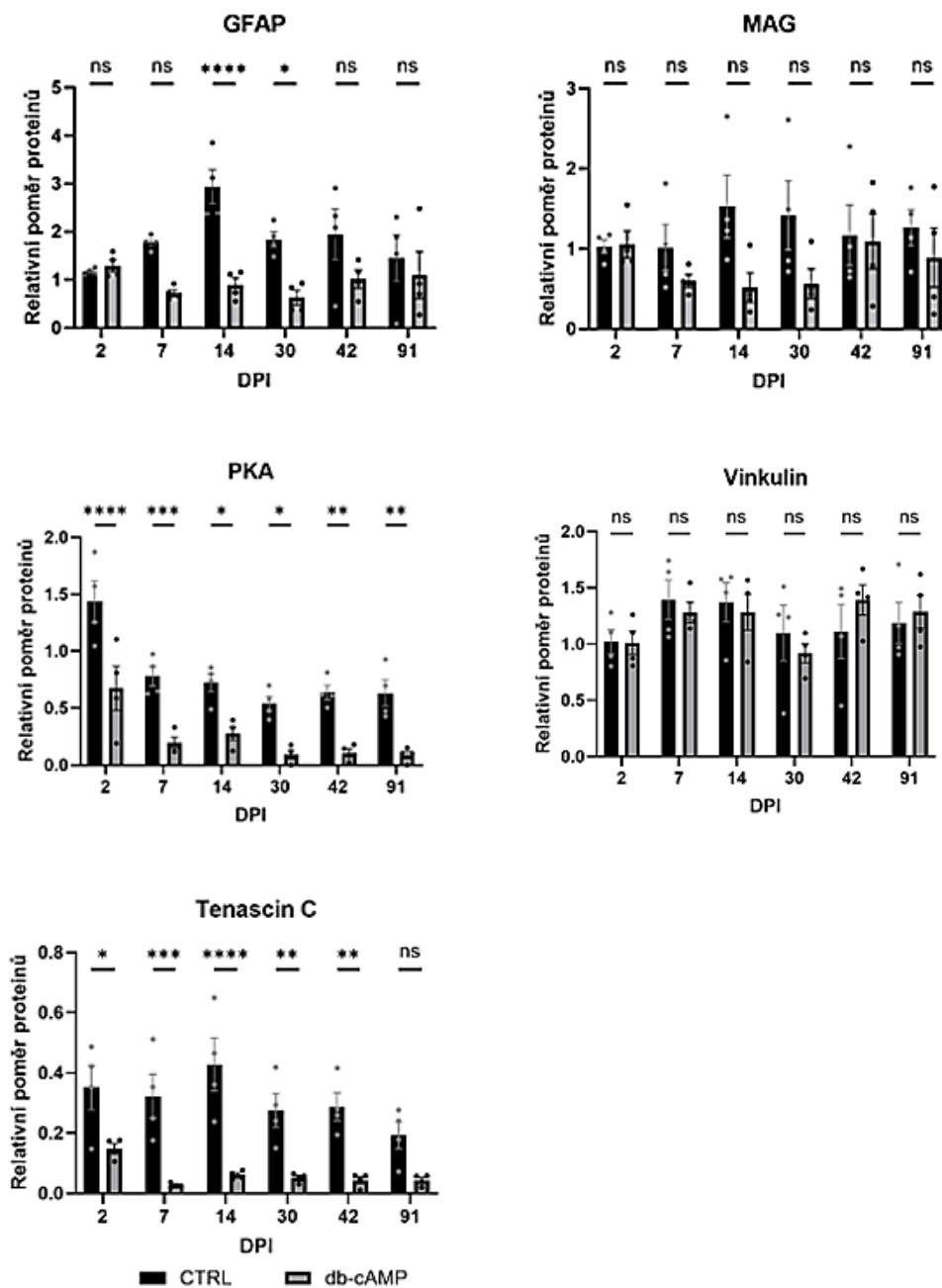
Obr. 10: Inhibiční bariéra jizvy po aplikaci db-cAMP do DRG. (A) Mikroskopický snímek inhibiční bariéry jizvy po aplikaci db-cAMP do DRG. Snímky ukazující sílu fluorescenčního signálu inhibičních molekul Nogo A, GSPG, GFAP, OMgp, MAG a tenascin C v okolí jizvy po aplikaci db-cAMP do DRG. Jako kontrola (CTRL) byl použit AAV vektor. Zvětšení 20×. (B) Kvantifikace intenzity signálu inhibičních molekul Nogo A, GSPG, GFAP, OMgp, MAG a tenascin C v okolí jizvy po aplikaci db-cAMP do DRG vztážená na mm² míšň tkáň. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM (n=4-6 zvířat na skupinu). Pro vyhodnocení výsledků z imunohistochemie byl použit nepárový t – test, ns p ≥ 0,05, * p < 0,01.

I když nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi db-cAMP léčenými zvířaty a kontrolami v množství inhibičních molekul po 3 měsících po poranění a aplikaci terapií, byla dále sledována dynamika tvorby gliové / fibrotické jizvy po PM. Pro sledování dynamiky tvorby jizvy byla použita metoda WB. Množství proteinů GFAP, MAG, PKA, tenascin C, vinkulinu a aktinu bylo hodnoceno v časovém rozmezí 2 až 91 dnů po poranění (DPI) od aplikace db-cAMP s GFP (označeno db-cAMP) do DRG. Jako kontrola (CTRL) byl aplikován pouze GFP do DRG. V první řadě bylo zjištěno, že aplikace db-cAMP do DRG má vliv na produkci GFAP. Jeho hodnoty byly v časovém rozmezí 14 až 30 DPI nižší u db-cAMP léčených zvířat v porovnání s CTRL, viz Obr. 12. GFAP je jedním z hlavní markerů astrogliózy a je produkován astrocyty po poranění nervové tkáň (Eng & Ghirnikar, 1994). Tento výsledek naznačuje, že db-cAMP má

přímý efekt na reaktivitu astrocytů. Dále bylo zjišťováno množství MAG, jako jednoho z hlavních inhibitorů regenerace axonů. V tomto případě jsme nepozorovaly signifikantní snížení, každopádně výsledky ukázaly jasný trend v tom, že je množství MAG v oblasti léze méně – a to především mezi 7 a 30 dnem po poranění u db-cAMP léčených zvířat. Po aplikaci db-cAMP do DRG bylo zaznamenáno snížené množství PKA oproti CTRL. Tento výsledek nebyl předpokládán. Největším překvapením byl ovšem efekt db-cAMP na produkci tenascinu C. Z WB analýzy je patrné, že množství tenascinu C po aplikaci db-cAMP do DRG je signifikantně nižší prakticky po celou dobu formování jizvy ve srovnání s CTRL. V posledním časovém bodě (91 dní) po poranění není vidět signifikantní rozdíl, ale trend zůstává zachován. Zároveň bylo pomocí WB potvrzeno, že formování jizvy okolo léze je velmi dynamický proces a její složení se mění i v CTRL skupině. Glykoprotein tenascin C sloužil jako perfektní příklad, protože jeho exprese nebyla konzistentní po celou dobu léčby (91 dní) po poranění. Množství tenascinu C dále podporuje fakt, že kombinovaná terapie nebyla účinná, jelikož právě tenascin C je hlavním substrátem pro aktivovaný ITG α 9. Dále množství tenascinu C podporuje přímý efekt db-cAMP na astrocyty, který byl pozorován u množství GFAP, jelikož hlavními producenty tenascinu C po PM jsou právě astrocyty (shrnuto ve Wiese et al., 2012). Hodnoty množství proteinů byly normalizovány k množství aktinu ve vzorcích míšni tkáně a jako další kontrola byl použit vinkulin, jehož hodnota se signifikantně nemění mezi skupinami v čase od 2 po 91 dní po poranění.

A



B

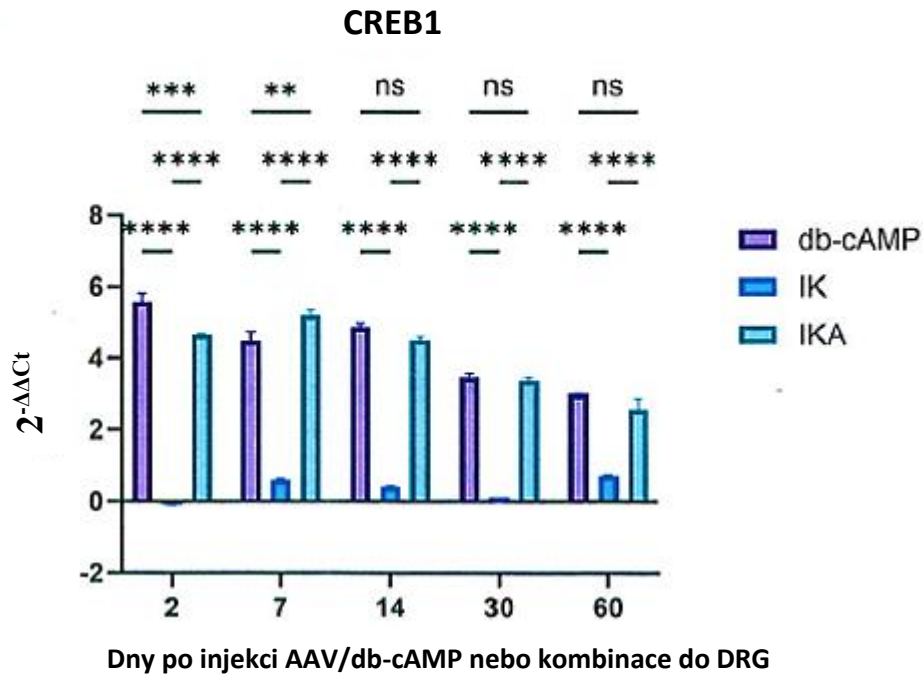
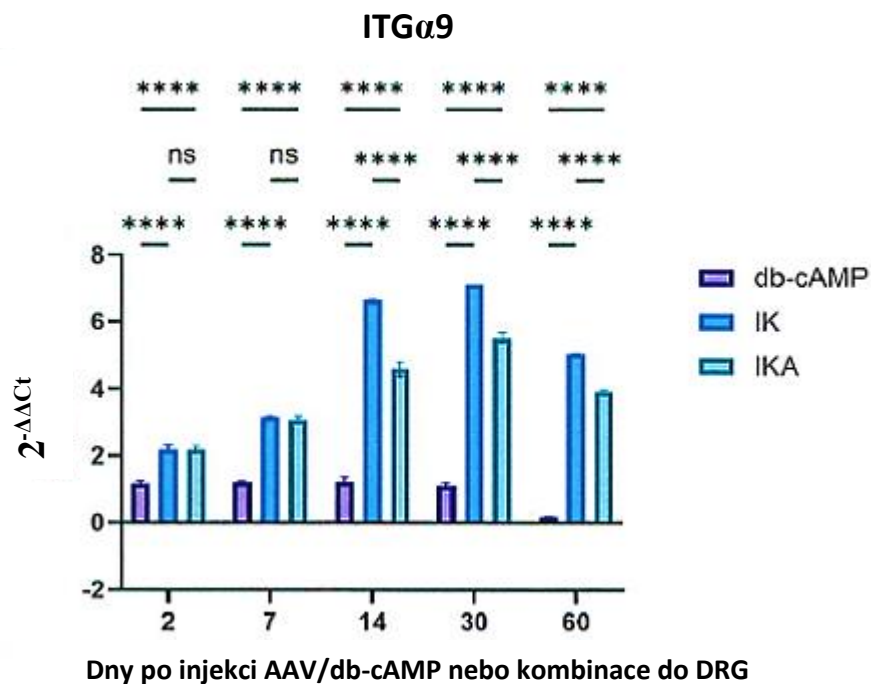
Obr. 11: Rozdíl v dynamice tvorby jizvy po aplikaci db-cAMP do DRG. (A) Detekce GFAP, MAG, tenascin C, PKA, vinkulinu a aktinu po WB. (B) Kvantifikace množství GFAP, MAG, tenascin C, PKA a vinkulinu po aplikaci db-cAMP do DRG. V kontrole (CTRL) byl aplikován GFP do DRG. Sloupcové grafy vyjadřují závislost relativního poměru zkoumaných proteinů na dnech po aplikaci CTRL / db-cAMP do DRG a zároveň po poranění (DPI). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM (n=3-5 zvířat na skupinu). Pro kvantitativní vyhodnocení výsledků z WB byl použit Tukeyho test vícenásobného porovnání, dvoucestná ANOVA, ns $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.4 Ovlivnění genové exprese AVV vektoru v rámci genové terapie

V této diplomové práci byl ukázán rozdíl na úrovni množství GFP a V5 proteinů bez a po aplikaci db-cAMP do DRG, viz kap. 4.3. Dále bylo zkoumáno, zda db-cAMP ovlivňuje expresi AAV vektorů na úrovni transkripce nebo translace. K tomu byla použita RT-qPCR. Expresi CREB1 nebo ITG α 9 v různých časových bodech po injekci AAV / db-cAMP nebo jejich kombinace do DRG byla spočítána z prahové hodnoty cyklu (Ct, z angl. *threshold cycle value*). Hodnoty z RT-qPCR byly normalizovány na GAPDH, která představuje housekeeping gen, a také na hodnotu kontrolního DRG injikovaného pouze chloridem sodným. Výsledky genové exprese z RT-qPCR jsou vyjádřeny jako závislost hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$, která byla vypočítána podle postupu uvedeném v článku Livak & Schmittgen (2001), na dnech po injekci AAV / db-cAMP nebo jejich kombinace do DRG.

Pomocí RT-qPCR bylo potvrzeno, že intracelulární hladina transkripčního faktoru CREB1 byla signifikantně zvýšena po aplikaci db-cAMP do DRG, ale i ve skupině kombinující aktivovaný ITG α 9 s db-cAMP (IKA), viz Obr. 13 A. Tímto výsledkem byla ověřena aktivace PKA kaskády pomocí db-cAMP. Naproti tomu po aplikaci AAV vektoru do DRG (IK) dosahovala hladina transkripčního faktoru CREB1 nízkých hodnot. Tento výsledek byl předpokládán, jelikož je fyziologicky se vyskytující cAMP jedním z nejdůležitějších druhých posílů v organismu. Zároveň výsledky ukazují, že db-cAMP zvyšuje expresi CREB1 dlouhodobě, a to až po dobu 60 dní po jeho injikování do DRG.

Dále byla zkoumána hladina mRNA pro ITG α 9. Z výsledků provedených RT-qPCR je patrné, že ve skupině IKA byla signifikantně nižší hladina exprimovaného ITG α 9 v porovnání s IK skupinou, viz Obr. 13 B. Výsledky naznačují, že db-cAMP kombinované s AAV vektory negativně ovlivňuje expresi injikovaného virového vektoru v DRG. Ze sloupcových grafů je dále vidět, že největší exprese AAV vektoru v DRG byla zaznamenána až po 14 dnech po jeho injekci do DRG. Dále je z grafů patrné, že exprese AAV vektoru je nejvyšší v časovém rozmezí od 14 do 30 dnů po zahájení léčby. Výsledky z RT-qPCR naznačují, že db-cAMP ovlivňuje expresi AAV vektorů již na úrovni transkripce.

A**B**

Obr. 12: Efekt db-cAMP na genovou expresi AAV vektoru v DRG. (A) Ovlivnění genové exprese CREB1 po aplikaci AAV/db-cAMP nebo jejich kombinace do DRG. (B) Vliv AAV/db-cAMP nebo jejich kombinace na úroveň genové exprese ITGα9 v DRG. Výsledky genové exprese jsou vyjádřeny jako závislost hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ na dnech po injekci AAV/db-cAMP nebo jejich kombinace do DRG. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ($n=3-5$ zvířat na skupinu). Pro vyhodnocení výsledků z RT-qPCR byl použit Tukeyho test vícenásobného porovnání, dvoucestná ANOVA ns $p \geq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5 DISKUSE

PM představuje devastující neurologické poranění, které má přímý dopad na zdravotní stav pacienta. Každým rokem utrpí PM několik milionů lidí na světě (Wyndaele & Wyndaele, 2006; James et al., 2019). V současné době není medicína schopna účinně léčit PM, protože spontánní regenerace dospělé nervové tkáně není dostatečná. Po PM se formuje gliová / fibrotická jizva, která s postupem času vytváří bariéru pro regenerující axony.

V posledních dekádách byl zaznamenán obrovský pokrok v porozumění buněčných a molekulárních mechanismů probíhajících po PM (McKeon et al., 1991; Frisén et al., 1995; Troadec et al., 2002; Pearse et al., 2004; Rhodes et al., 2006; Rowland et al., 2008; Carbajal et al., 2011; Wang et al., 2015; Cheah et al., 2016; Li et al., 2020). Díky tomu bylo navrženo pro léčbu PM několik nových potencionálních léčebných strategií a terapeutických zásahů. Nezodpovězenou otázkou však zůstává, zda pro podpoření vyššího efektu regenerace sensorických axonů *in vivo* aplikovat terapeutické přístupy samostatně, nebo v jejich kombinaci. Na základě výzkumných prací, zabývajících se přímo terapiemi sensorických deficitů po PM, byla jako nejefektivnější léčebná strategie pro regeneraci sensorických axonů po PM vyhodnocena genová terapie, exprimující ITG α 9 pomocí AAV vektorů, a aplikace db-cAMP do DRG. Pro dosažení většího efektu na rozvolnění jizvy a účinku léčby byla experimentálně zkoumána kombinace těchto dvou efektivních léčebných strategií. V předchozích výsledcích ze sensorických behaviorálních testů provedených u potkanů s PM bylo pozorováno, že kombinace genové terapie a db-cAMP vedla mnohem menší regeneraci sensorických funkcí u potkanů než aplikace samostatných léčebných terapií. Série experimentů této diplomové práce byla navržena tak, aby pomohla objasnit neúspěšný výsledek sensorických behaviorálních testů.

Po zahájení léčby PM je kritickým ukazatelem účinnosti terapie sensorických deficitů po PM počet regenerovaných axonů nad a pod míšní lézí. Množství regenerovaných axonů po PM většinou přímo úměrně souvisí s funkčním zotavením sensorických funkcí po PM. Index regenerace po PM je standardizovaný způsob pro posouzení rozsahu, v jakém poškození nervová vlákna v míše dorůstají nebo se znovu zapojují v reakci na konkrétní terapii. V podstatě se jedná o jednoduchý postup, jak kvantifikovat pokrok v obnově a zotavení po PM. Index regenerace sensorických axonů po PM prokázal neúspěšný výsledek sensorických behaviorálních testů, protože nedošlo

k regeneraci většího množství sensorických axonů po aplikaci kombinované terapie v porovnání s nekombinovanou léčbou. S ohledem na dosažené výsledky této v této práci však ale zůstává otázkou, zda neměl být zvolen lepší systém značení axonů – například značení axonů pomocí lipofilní látky aplikované *post mortem*. Jak je zmíněno ve studii Macagno et al. (1985), důležitou roli pro hodnocení regenerace sensorických deficitů může hrát i tvorba synaptických spojů mezi regenerujícími axony. Pro ověření výsledků sensorických behaviorálních testů mohla být hodnocena i tvorba synaptických spojů mezi regenerovanými axony, což se ovšem nejevilo jako nutné s ohledem na signifikantně nižší počet axonů, který překonal samotnou míšňí lézi. I když index regenerace nepřinesl pozitivní výsledky ohledně úspěšnosti kombinované terapie, tak jeho hodnota vedla ke znovu potvrzení výsledků původní studie s aktivovaným ITG α 9, využitým k léčbě PM (Štěpánková et al., 2023).

Signální molekula cAMP je v posledních dvou dekadách intenzivně zkoumána v neurovědním výzkumu pro podpoření regenerace nervové tkáně. Zvýšená signalizace cAMP by mohla být v budoucnosti využita k potlačení molekulárních mechanismů, vyvolaných PM, a k podpoře fyziologického stavu diferencovaných astrocytů pro podporu a ochranu neuronálních populací (Paco et al., 2016). Ačkoliv byl v mnoha publikacích vyzdvížen pozitivní efekt cAMP na regeneraci CNS, kvůli jeho zapojení v mnoha buněčných procesech, jsou zdůrazňovány i možné nepříznivé účinky při použití cAMP v terapii. Jako druhý posel aktivuje cAMP mnoho buněčných drah v těle, což se zdá být nežádoucí pro průběh některých terapií. Ve studii Bayerl et al. (2023) ukázali, že podání cAMP při protinádorové léčbě způsobilo dysfunkci konvenčních dendritických buněk typu 1, které hrají kritickou roli v proti rakovinové imunitě. Nežádoucím efektem podání cAMP do DRG může být dále to, že v některých případech nadměrně stimuluje neuropatickou bolest po PM. Při aplikaci cAMP do míšňí léze se proto musí dbát na podání dávky s nízkou koncentrací cAMP, která by tak nezpůsobila nadměrnou stimulaci neuronů (Song et al., 2005). Kvůli nežádoucí nadměrné stimulaci buněčných procesů pomocí cAMP, ale zároveň i kvůli přesnějšímu pochopení zapojení konkrétní signální kaskády, se zá být vhodnější použití analogu cAMP – db-cAMP – v léčbě poškozené nervové tkáně.

db-cAMP se zdá být vhodným kandidátem pro léčbu PM, protože stimuluje přežívání neuronů a axonový růst po poranění nervové tkáně (Pearse et al., 2004). Každopádně přesný mechanismus, jakým k tomu dochází není dosud objasněn. V této

práci jsme se zaměřily nikoliv však na přežívání neuronů jako takových, ale na bariéru, které se formuje v okolí jizvy. Mezi hlavní buňky, podílející se na formování jizvy, patří právě astrocyty. Výsledky v této práci ukázaly, že pomocí db-cAMP byla výrazně snížena hladina GFAP, který je produkován astrocyty po poranění CNS. Tento výsledek naznačil, že db-cAMP má přímý efekt na reaktivitu astrocytů.

Překvapivý výsledek představoval efekt db-cAMP na množství MAG v lézi. Ačkoliv ve studii Qiu et al. (2002) bylo potvrzeno snížení hladiny MAG po aplikaci 50 mM db-cAMP do DRG, nebylo v této diplomové práci dosaženo po WB signifikantního rozdílu. Negativní výsledek mohl být v rámci této diplomové práce způsoben injikováním nižší koncentrace db-cAMP (10 mM) do DRG potkanů. Pro potvrzení efektu db-cAMP na snížení hladiny MAG by se musela naplánovat nová série experimentů, ve které by byla injikována vyšší koncentrace db-cAMP do DRG potkanů. Překvapivého výsledku bylo dosaženo i u hodnoty množství PKA – po aplikaci db-cAMP do DRG bylo zaznamenáno zvýšení jejího množství oproti CTRL přesně tak, jak bylo předpokládáno. Na druhou stranu v míše byla pozorována odlišná odpověď. Již od 2 dní po poranění byla hladina PKA signifikantně nižší v porovnání s CTRL. Toto snížení mohlo být pravděpodobně způsobeno několika faktory, včetně zpětnovazebných mechanismů, které regulují aktivitu PKA za účelem udržení buněčné homeostázy nebo specifických signálních drah, které jsou v míše aktivovány v reakci na db-cAMP aplikovaného do DRG. Pro přesné vysvětlení toho mechanismu by bylo potřeba naplánovat další experimenty. Následně bylo pomocí WB naznačeno, že zvýšené množství PKA po aplikaci db-cAMP do DRG může fosforylovat GFP. V rámci již publikované studie Yang et al. (1999) bylo naznačeno, že GFP může být pomocí PKA fosforylováno. Ačkoliv byl fosforylační efekt PKA na GFP v této studii nízký, pomocí WB byl ukázán protein s molekulovou hmotností 32 kDa. Tento výsledek koreluje s předpokládanou hypotézou této diplomové práce ohledně fosforylace GFP enzymem PKA. V experimentální části diplomové práce bylo ověřeno, že analog cAMP – db-cAMP – aktivuje PKA kaskádu (jak je zmíněno v kap. 2.6.2.2) a zároveň podporuje regeneraci axonů po PM snížením množství inhibičních molekul v jizvě. Stále ale není zcela objasněn mechanismus účinku db-cAMP po PM na buněčné a molekulární úrovni.

Zacílení kombinace AAV vektoru a db-cAMP na větší rozvolnění inhibiční bariéry jizvy vedla nejenom ke snížení množství inhibičních molekul spojených s myelinem v jizvě, ale i ke snížení hladiny tenascinu C. Molekula tenascinu C je sice

produkována aktivovanými astrocyty po poranění nervové tkáně, ale zároveň představuje substrát, na který je navázán AAV vektor v rámci aplikace genové terapie. Tento efekt db-cAMP na snížení množství tenascinů C nebyl dosud publikován v žádném článku. Dále snížení hladiny tenascinů C potvrdilo domněnku, že db-cAMP přímo ovlivňuje reaktivitu astrocytů. Nutno podotknout, že po podání db-cAMP do DRG hladina tenascinů C byla signifikantně snížena jako hladina GFAP. Tímto výsledkem bylo naznačeno, že astrocyty se nechovají jako po poškození tkáně, ale spíše jako v tkáni nezraněné. Pro vysvětlení toho, co to znamená pro neurony, zda právě díky tomuto se zvyšuje jejich přežití po poranění nebo ne, by bylo nutné udělat další experimenty a zaměřit se přímo na markery neuronů, jako je například Nissl barvení nebo NeuN.

V této diplomové práci bylo dále ukázáno, že db-cAMP ovlivňuje tvorbu jizvy v časovém rozmezí 2 až 60 DPI. Zjištěný dlouhodobý efekt db-cAMP na tvorbu jizvy není v souladu s již publikovanými články, ve kterých bylo poukázáno na to, že db-cAMP podporuje expresi proteinů v krátkém časovém rozmezí po poranění (Han et al., 2004; Niu et al., 2010). Tento efekt db-cAMP nebyl předpokládán. Na základě prohledání databáze literárních rešerší bylo zjištěno, že tento výsledek o dlouhodobosti účinku db-cAMP do DRG nebyl dosud publikován. Dále by bylo potřeba zvážit, zda nedocházelo k negativní interakci mezi kombinovanými přístupy terapie PM. Ve studii Di Pasquale & Stacey (1998) bylo naznačeno, že AAV mohou interagovat s PKA a snižovat tak hladiny CREB, ale přesný mechanismus účinku nebyl doposud objasněn. Ve studii Lemons & Condic (2006) bylo naznačeno, že hladiny cAMP by mohly být ovlivňovány přítomností integrinových receptorů. Tato studie navrhuje rovnováhu mezi hladinami cAMP, integrinů a Rho GPaS k udržení pohyblivosti axonů k růstovému kuželu. Studie naznačuje, že by mohla společná kombinace AAV a db-cAMP negativně ovlivnit růst a regeneraci axonů po poranění. Otázkou však zůstává, zda by zvýšení hladiny PKA nemohlo být použito k regulaci AAV vektoru v rámci genové terapie. Pro podpoření této hypotézy by bylo potřeba naplánovat další experimenty. Interakce db-cAMP s AAV vektorem byla naznačena i v této diplomové práci, kde po imunohistochemii a WB bylo zaznamenáno snížení množství genového produktu v DRG. Pomocí výsledků z RT-qPCR bylo zjištěno, že db-cAMP ovlivňuje genovou expresi AAV vektoru v DRG již na úrovni transkripce.

Sérií experimentů provedených v této diplomové práci byl potvrzen negativní výsledek sensorických behaviorálních testů provedených na potkanech v rámci

kombinované léčby, které předcházely této práci. Kombinace léčebných terapií, zahrnující genovou terapii zprostředkovanou AAV vektory exprimující ITG α 9 v kombinaci s jeho aktivátorem K1 a db-cAMP aplikovaných do DRG potkanů, vedla k daleko nižšímu terapeutickému efektu na regeneraci sensorických axonů než v případě použití samostatných léčebných postupů.

6 ZÁVĚR

Páteční mícha představuje významný spojovací článek mezi přenosem a vedením nervových signálů z mozku do periferních nervů a naopak. PM má dalekosáhlé následky pro pacienta, projevujícími se na jeho fyzickém ale i psychickém stavu. V teoretické části diplomové práce byly shrnuty poznatky o funkci míchy v těle, sensorických drahách míchy a typech sensorických neuronů v DRG. Byl kladen důraz na samotné poranění páteční míchy a na limitující faktory regenerace sensorických axonů v dospělé CNS. V současné době neexistuje žádný účinný terapeutický přístup, který by mohl obnovit sensorické funkce u lidí po PM. Proto jsou zkoumány nové experimentální přístupy na zvířecích modelech s PM. Slibné výsledky pro léčbu poškozených sensorických axonů po PM byly zaznamenány u genové terapie a také u aplikace db-cAMP do DRG.

Hlavním cílem experimentální části diplomové práce bylo zlepšit regeneraci sensorických axonů po aplikaci genové terapie, zprostředkované injekcí dvou AAV vektorů nesoucích ITG α 9 a jeho aktivátor K1, spolu se signální molekulou db-cAMP, která podporuje regeneraci axonů, do DRG potkanů. Nejdříve bylo pomocí indexu regenerace poškozených sensorických axonů ukázáno, že kombinace AAV vektoru a db-cAMP nevedla k vyšší regenerační kapacitě sensorických axonů po PM. Pomocí metody WB a imunohistochemického barvení míšní tkáně a DRG bylo zjištěno, že db-cAMP nejenže snižuje množství inhibitorů spojených s myelinem v místě léze, ale také snižuje hladinu tenascinu C, substrátu potřebného k tomu, aby axony exprimující aktivovaný ITG α 9 překonaly inhibiční bariéru léze. Kromě toho výsledky dále ukázaly, že exprese vektorů AAV v kombinaci s db-cAMP byla signifikantně snížena ve srovnání se skupinami, kterým byl aplikován AAV vektor bez db-cAMP. Proto bylo pomocí RT-qPCR ověřeno, zda je nějakým způsobem ovlivněna genová exprese AAV vektoru dohromady s aplikací db-cAMP do DRG. Výsledky z RT-qPCR naznačily, že db-cAMP pravděpodobně negativně reguluje expresi genu neseného AAV vektorem. Výsledky této diplomové práce ukázaly, že aplikace genové terapie společně s db-cAMP do DRG nezvyšuje regenerační potenciál sensorických axonů po PM. Ačkoliv kombinace léčebných terapií sensorických deficitů po PM nebyla úspěšná, jedná se o významný pokrok nejen v oblasti experimentálního výzkumu léčby PM, ale i na poli buněčné biologie a genové terapie. Kombinace genové terapie zprostředkované AAV vektory a db-cAMP nebyla doposud experimentálně zkoumána, proto výsledky této diplomové práce přispívají cennými daty a informacemi dalšímu výzkumu zabývajícím se

experimentálními terapiemi sensorických deficitů po PM. Zároveň tato diplomová práce přináší nový pohled na db-cAMP, o jehož efektu na AAV vektory a tenascin C nebyly dosud publikovány žádné další práce. V současné době je stále potřeba najít optimální léčebnou strategii, která by vedla k vyššímu funkčnímu zotavení sensorických funkcí po PM.

7 LITERATURA

- Ahuja, C. S., Nori, S., Tetreault, L., Wilson, J., Kwon, B., Harrop, J., Choi, D., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic Spinal Cord Injury—Repair and Regeneration. *Neurosurgery*, 80(3S), S9-S22. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyw080>
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26889/>
- Altinova, H., Hammes, S., Palm, M., Achenbach, P., Gerardo-Nava, J., Deumens, R., Führmann, T., van Neerven, S. G. A., Hermans, E., Weis, J., & Brook, G. A. (2020). Dense fibroadhesive scarring and poor blood vessel-maturation hamper the integration of implanted collagen scaffolds in an experimental model of spinal cord injury. *Biomedical Materials*, 15(1). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab5e52>
- Amemori, T., Romanyuk, N., Jendelova, P., Herynek, V., Turnovcova, K., Prochazka, P., wneural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat, 4(3). <https://doi.org/10.1186/scrt219>
- Amezcuca, L., Lerner, A., Ledezma, K., Conti, D., Law, M., Weiner, L., & Langer-Gould, A. (2013). Spinal cord lesions and disability in Hispanics with multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 260(11), 2770-2776. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-7054-4>
- Anderson, M. A., O’Shea, T. M., Burda, J. E., Ao, Y., Barlatey, S. L., Bernstein, A. M., Kim, J. H., James, N. D., Rogers, A., Kato, B., Wollenberg, A. L., Kawaguchi, R., Coppola, G., Wang, C., Deming, T. J., He, Z., Courtine, G., & Sofroniew, M. V. (2018). Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature*, 561(7723), 396-400. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0467-6>
- Andressen, C., Adrian, S., Fässler, R., Arnhold, S., & Addicks, K. (2005). The contribution of $\beta 1$ integrins to neuronal migration and differentiation depends on extracellular matrix molecules. *European Journal of Cell Biology*, 84(12), 973-982. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.09.017>
- Andrews, M. R., Czvitkovich, S., Dassie, E., Vogelaar, C. F., Faissner, A., Blits, B., Gage, F. H., fFrench-Constant, C., & Fawcett, J. W. (2009). A9 Integrin Promotes Neurite Outgrowth on Tenascin-C and Enhances Sensory Axon Regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 29(17), 5546-5557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0759-09.2009>
- Batchelor, P. E., Wills, T. E., Skeers, P., Battistuzzo, C. R., Macleod, M. R., Howells, D. W., Sena, E. S., & Fehlings, M. (2013). Meta-Analysis of Pre-Clinical Studies of Early Decompression in Acute Spinal Cord Injury: A Battle of Time and Pressure. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072659>
- Baum, C., Schambach, A., Bohne, J., & Galla, M. (2006). Retrovirus Vectors: Toward the Plentivirus? *Molecular Therapy*, 13(6), 1050-1063. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.007>
- Bayerl, F., Meiser, P., Donakonda, S., Hirschberger, A., Lacher, S. B., Pedde, A. -M., Hermann, C. D., Elewaut, A., Knolle, M., Ramsauer, L., Rudolph, T. J., Grassmann, S., Öllinger, R., Kirchhammer, N., Trefny, M., Anton, M., Wohlleber, D., Höchst, B., Zaremba, A., et al. (2023). Tumor-derived prostaglandin E2 programs cDC1 dysfunction to impair intratumoral orchestration of anti-cancer T cell responses. *Immunity*, 56(6), 1341-1358.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.05.011>
- Beck, K. D., Nguyen, H. X., Galvan, M. D., Salazar, D. L., Woodruff, T. M., & Anderson, A. J. (2010). Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury:

- evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, 133(2), 433-447. <https://doi.org/10.1093/brain/awp322>
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(4):1620-4. doi: 10.1073/pnas.87.4.1620. PMID: 2154753; PMCID: PMC53527.
- Bello, L., Francolini, M., Marthyn, P., Zhang, J., Carroll, R. S., Nikas, D. C., Strasser, J. F., Villani, R., Cheresch, D. A., & Black, P. M. L. (2001). $\text{Av}\beta 3$ and $\alpha\text{v}\beta 5$ Integrin Expression in Glioma Periphery: A Final Common Step in Integrin Activation. *Neurosurgery*, 49(2), 380-390. <https://doi.org/10.1097/00006123-200108000-00022>
- Blesch, A., & Tuszynski, M. H. (2003). Cellular GDNF delivery promotes growth of motor and dorsal column sensory axons after partial and complete spinal cord transections and induces remyelination. *Journal of Comparative Neurology*, 467(3), 403-417. <https://doi.org/10.1002/cne.10934>
- Bolívar, S., & Udina, E. (2022). Preferential regeneration and collateral dynamics of motor and sensory neurons after nerve injury in mice. *Experimental Neurology*, 358. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114227>
- Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W (1997). Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA*. May 28;277(20):1597-604. PMID: 9168289.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Collins, W. F., Holford, T. R., Young, W., Baskin, D. S., Eisenberg, H. M., Flamm, E., Leo-Summers, L., Maroon, J., Marshall, L. F., Perot, P. L., Piepmeier, J., Sonntag, V. K. H., Wagner, F. C., Wilberger, J. E., & Winn, H. R. (1990). A Randomized, Controlled Trial of Methylprednisolone or Naloxone in the Treatment of Acute Spinal-Cord Injury. *New England Journal of Medicine*, 322(20), 1405-1411. <https://doi.org/10.1056/NEJM199005173222001>
- Bradbury, E. J., Moon, L. D. F., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W., & McMahon, S. B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881), 636-640. <https://doi.org/10.1038/416636a>
- Cabrera-Aldana, E. E., Ruelas, F., Aranda, C., Rincon-Heredia, R., Martínez-Cruz, A., Reyes-Sánchez, A., Guizar-Sahagún, G., & Tovar-y-Romo, L. B. (2017). Methylprednisolone Administration Following Spinal Cord Injury Reduces Aquaporin 4 Expression and Exacerbates Edema. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/4792932>
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B. S., & Filbin, M. T. (2001). Neuronal Cyclic AMP Controls the Developmental Loss in Ability of Axons to Regenerate. *The Journal of Neuroscience*, 21(13), 4731-4739. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-13-04731.2001>
- Carbajal, K. S., Miranda, J. L., Tsukamoto, M. R., & Lane, T. E. (2011). CXCR4 signaling regulates remyelination by endogenous oligodendrocyte progenitor cells in a viral model of demyelination. *Glia*, 59(12), 1813-1821. <https://doi.org/10.1002/glia.21225>
- Carter, B. J. (2004). Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective. *Molecular Therapy*, 10(6), 981-989. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.09.011>

- Cobo Cuenca, A. I., Sampietro-Crespo, A., Virseda-Chamorro, M., & Martín-Espinosa, N. (2015). Psychological Impact and Sexual Dysfunction in Men with and without Spinal Cord Injury. *The Journal of Sexual Medicine*, 12(2), 436-444. <https://doi.org/10.1111/jsm.12741>
- Colognato, H., Winkelmann, D. A., & Yurchenco, P. D. (1999). Laminin Polymerization Induces a Receptor–Cytoskeleton Network. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), 619-631. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.3.619>
- Curtis, E., Martin, J. R., Gabel, B., Sidhu, N., Rzesiewicz, T. K., Mandeville, R., Van Gorp, S., Leerink, M., Tadokoro, T., Marsala, S., Jamieson, C., Marsala, M., & Ciacci, J. D. (2018). A First-in-Human, Phase I Study of Neural Stem Cell Transplantation for Chronic Spinal Cord Injury. *Cell Stem Cell*, 22(6), 941-950.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.014>
- Čihák, R. (2016). In *Anatomie* (Třetí, upravené a doplněné vydání). Grada.
- Daroff, R., & Aminoff, M. J. (2014). In *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (2nd Edition). Academic Press.
- Day, J. M., Olin, A. I., Murdoch, A. D., Canfield, A., Sasaki, T., Timpl, R., Hardingham, T. E., & Aspberg, A. (2004). Alternative Splicing in the Aggrecan G3 Domain Influences Binding Interactions with Tenascin-C and Other Extracellular Matrix Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12511-12518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400242200>
- Devlin, T. M. (2010). In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations* (7. ed., pp. 528-530). John Wiley & Sons.
- Di Pasquale, G., & Stacey, S. N. (1998). Adeno-Associated Virus Rep78 Protein Interacts with Protein Kinase A and Its Homolog PRKX and Inhibits CREB-Dependent Transcriptional Activation. *Journal of Virology*, 72(10), 7916-7925. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.10.7916-7925.1998>
- Doane, K. J., Roisen, F. J., & Wilson, F. J. (1992). The effects of nerve growth factor and dibutyryl cyclic AMP on cytoskeletal densities in cultured sensory ganglia. *Tissue and Cell*, 24(3), 367-378. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(92\)90053-A](https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90053-A)
- Druga, R., Grim, M., & Dubový, P. (2011). *Anatomie centrálního nervového systému*. Galén.
- Dylevský, I. (2016). In *Základy funkční anatomie člověka I.* (2. upravené vydání, pp. 33-34). Vysoká škola tělesné výchovy a sportu Palestra, spol. s r.o.
- Eddleston, M., & Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes – implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54(1), 15-36. <https://doi.org/10.1016 / 0306-4522>
- Eng, L. F., & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology*, 4(3), 229-237. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x>
- Faltýnková Zdeňka. Vše okolo tetraplegie. Praha: Česká asociace paraplegiků – CZEPA, 2012, s. 13. ISBN 978-80-260-5098-8.
- Fan, W. -li, Liu, P., Wang, G., Pu, J. -gang, Xue, X., & Zhao, J. -hua. (2018). Transplantation of hypoxic preconditioned neural stem cells benefits functional recovery via enhancing neurotrophic secretion after spinal cord injury in rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(6), 4339-4351. <https://doi.org/10.1002/jcb.26397>
- Fassett, D. R., Harrop, J. S., & Vaccaro, A. R. (2008). Evidence on magnetic resonance imaging of Brown–Séguard spinal cord injury suffered indirectly from a gunshot wound. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 8(3), 286-287. <https://doi.org/10.3171/SPI/2008/8/3/286>
- Fawcett, J. W. (2017). An integrin approach to axon regeneration. *Eye*, 31(2), 206-208. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.293>

- Fiala, P., & Valenta, J. (2020). In *Přehled anatomie centrálního nervového systému*. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum.
- Forbes, L. H., & Andrews, M. R. (2019). Grafted Human iPSC-Derived Neural Progenitor Cells Express Integrins and Extend Long-Distance Axons Within the Developing Corticospinal Tract. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00026>
- Friedmann, T. (2009). Approaches to Gene Therapy of Complex Multigenic Diseases: Cancer as a Model and Implications for Cardiovascular Disease and Diabetes. *Annals of Medicine*, 24(5), 411-417. <https://doi.org/10.3109/07853899209147847>
- Frisén, J., Johansson, C. B., Török, C., Risling, M., & Lendahl, U. (1995). Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *The Journal of cell biology*, 131(2), 453-464. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.453>
- Ganog, W. (c2005). In *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Galén.
- Ge, L., Arul, K., & Mesfin, A. (2019). Spinal Cord Injury From Spinal Tumors: Prevalence, Management, and Outcomes. *World Neurosurgery*, 122, e1551-e1556. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.11.099>
- Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J., & Zur Hausen, H. (1984). Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology*, 134(1), 64-71. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90272-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90272-1)
- Ghasemlou, N., Bouhy, D., Yang, J., López-Vales, R., Haber, M., Thuraisingam, T., He, G., Radzioch, D., Ding, A., & David, S. (2010). Beneficial effects of secretory leukocyte protease inhibitor after spinal cord injury. *Brain*, 133(1), 126-138. <https://doi.org/10.1093/brain/awp304>
- Ghosh, M., Xu, Y., & Pearse, D. D. (2016). Cyclic AMP is a key regulator of M1 to M2a phenotypic conversion of microglia in the presence of Th2 cytokines. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0463-9>
- Giulian, D., Woodward, J., Young, D. G., Krebs, J. F., & Lachman, L. B. (1988). Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *The Journal of Neuroscience*, 8(7), 2485-2490. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-07-02485.1988>
- Gonzenbach, R. R., & Schwab, M. E. (2008). Disinhibition of neurite growth to repair the injured adult CNS: Focusing on Nogo. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(1), 161-176. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7170-3>
- Grim, M., & Druga et al., R. (c2014). In *Základy anatomie (2., přeprac. vyd)*. Galén.
- Gupta, D., Tator, C. H., & Shoichet, M. S. (2006). Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord. *Biomaterials*, 27(11), 2370-2379. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.015>
- Hackett, A. R., Yahn, S. L., Lyapichev, K., Dajnoki, A., Lee, D. -H., Rodriguez, M., Cammer, N., Pak, J., Mehta, S. T., Bodamer, O., Lemmon, V. P., & Lee, J. K. (2018). Injury type-dependent differentiation of NG2 glia into heterogeneous astrocytes. *Experimental Neurology*, 308, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.07.001>
- Hall, S., Myers, M. A., Sadek, A. -R., Baxter, M., Griffith, C., Dare, C., Shenouda, E., & Nader-Sepahi, A. (2019). Spinal fractures incurred by a fall from standing height. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 177, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2019.01.005>
- Han, G. H., Kim, S. J., Ko, W. -K., Lee, D., Han, I. -B., Sheen, S. H., Hong, J. B., & Sohn, S. (2021). Transplantation of tauroursodeoxycholic acid-inducing M2-phenotype macrophages

- promotes an anti-neuroinflammatory effect and functional recovery after spinal cord injury in rats. *Cell Proliferation*, 54(6). <https://doi.org/10.1111/cpr.13050>
- Han, P., Shukla, S., Subramanian, P., & Hoffman, P. (2004). Cyclic AMP elevates tubulin expression without increasing intrinsic axon growth capacity. *Experimental Neurology*, 189(2), 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.010>
- Hara, M., Kobayakawa, K., Ohkawa, Y., Kumamaru, H., Yokota, K., Saito, T., Kijima, K., Yoshizaki, S., Harimaya, K., Nakashima, Y., & Okada, S. (2017). Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin–N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 23(7), 818-828. <https://doi.org/10.1038/nm.4354>
- Harvey, P. A., Lee, D. H. S., Qian, F., Weinreb, P. H., & Frank, E. (2009). Blockade of Nogo Receptor Ligands Promotes Functional Regeneration of Sensory Axons after Dorsal Root Crush. *The Journal of Neuroscience*, 29(19), 6285-6295. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5885-08.2009>
- Hasturk, A., Atalay, B., Calisaneller, T., Ozdemir, O., Oruckaptan, H., & Altinors, N. (2009). Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage. *Turkish Neurosurgery*, 19(4), 353-359.
- Hausmann, O. N. (2003). Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, 41(7), 369-378. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101483>
- Hayashi, Y., Shumsky, J. S., Connors, T., Otsuka, T., Fischer, I., Tessler, A., & Murray, M. (2005). Immunosuppression with Either Cyclosporine A or FK506 Supports Survival of Transplanted Fibroblasts and Promotes Growth of Host Axons into the Transplant after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 22(11), 1267-1281. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.1267>
- Hermens, W. T. J. M. C., Brake, O. T., Dijkhuizen, P. A., Sonnemans, M. A. F., Grimm, D., Kleinschmidt, J. A., & Verhaagen, J. (1999). Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus by Iodixanol Gradient Ultracentrifugation Allows Rapid and Reproducible Preparation of Vector Stocks for Gene Transfer in the Nervous System. *Human Gene Therapy*, 10(11), 1885-1891. <https://doi.org/10.1089/10430349950017563>
- Hines, D. J., Hines, R. M., Mulligan, S. J., & Macvicar, B. A. (2009). Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia*, 57(15), 1610-1618. <https://doi.org/10.1002/glia.20874>
- Hirt, J., Khanteymoori, A., Hohenhaus, M., Kopp, M. A., Howells, D. W., Schwab, J. M., & Watzlawick, R. (2023). Inhibition of the Nogo-pathway in experimental spinal cord injury: a meta-analysis of 76 experimental treatments. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49260-5>
- Humphries, M. J., McEwan, P. A., Barton, S. J., Buckley, P. A., Bella, J., Paul Mould, A., Strasser, J. F., Villani, R., Cheresch, D. A., & Black, P. M. L. (2003). Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), 313-320. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)02313-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)02313-6)
- Hynes, R. O. (2002). Integrins. *Cell*, 110(6), 673-687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
- Chamberlain, K., Riyad, J. M., & Weber, T. (2016). Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Human Gene Therapy Methods*, 27(1), 1-12. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.140>

- Chan, C. W. L., Eng, J. J., Tator, C. H., & Krassioukov, A. (2016). Epidemiology of sport-related spinal cord injuries: A systematic review. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 39(3), 255-264. <https://doi.org/10.1080/10790268.2016.1138601>
- Chang, D. -J., Cho, H. -Y., Hwang, S., Lee, N., Choi, C., Lee, H., Hong, K. S., Oh, S. -H., Kim, H. S., Shin, D. A., Yoon, Y. W., & Song, J. (2021). Therapeutic Effect of BDNF-Overexpressing Human Neural Stem Cells (F3.BDNF) in a Contusion Model of Spinal Cord Injury in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22136970>
- Cheah, M., Andrews, M. R., Chew, D. J., Moloney, E. B., Verhaagen, J., Fassler, R., & Fawcett, J. W. (2016). Expression of an Activated Integrin Promotes Long-Distance Sensory Axon Regeneration in the Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, 36(27), 7283-7297. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0901-16.2016>
- Cheng, J., Chen, Z., Liu, C., Zhong, M., Wang, S., Sun, Y., Wen, H., & Shu, T. (2021). Bone mesenchymal stem cell-derived exosome-loaded injectable hydrogel for minimally invasive treatment of spinal cord injury. *Nanomedicine*, 16(18), 1567-1579. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0025>
- Jaja, B. N. R., Jiang, F., Badhiwala, J. H., Schär, R., Kurpad, S., Grossman, R. G., Harrop, J. S., Guest, J. D., Toups, E. G., Shaffrey, C. I., Aarabi, B., Boakye, M., Fehlings, M. G., & Wilson, J. R. (2019). Association of Pneumonia, Wound Infection, and Sepsis with Clinical Outcomes after Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 36(21), 3044-3050. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6245>
- James, S. L., Theadom, A., Ellenbogen, R. G., Bannick, M. S., Montjoy-Venning, W., Lucchesi, L. R., Abbasi, N., Abdulkader, R., Abraha, H. N., Adsuar, J. C., Afarideh, M., Agrawal, S., Ahmadi, A., Ahmed, M. B., Aichour, A. N., Aichour, I., Aichour, M. T. E., Akinyemi, R. O., Akseer, N., et al. (2019). *The Lancet Neurology*, 18(1). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30415-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30415-0)
- Jessell, T. M., & Siegelbaum, S. A. (2021). In *Principles of Neural Science (Sixth Edition)*. McGraw-Hill Education.
- Jones, I., Novikova, L. N., Wiberg, M., Carlsson, L., & Novikov, L. N. (2021). Human Embryonic Stem Cell-derived Neural Crest Cells Promote Sprouting and Motor Recovery Following Spinal Cord Injury in Adult Rats. *Cell Transplantation*, 30. <https://doi.org/10.1177/0963689720988245>
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2005). In *Basic histology (11th ed, pp. 160-163)*. McGraw-Hill.
- Kajana, S., & Goshgarian, H. G. (2008). Spinal activation of the cAMP-PKA pathway induces respiratory motor recovery following high cervical spinal cord injury. *Brain Research*, 1232, 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.012>
- Kaňovský, P., & Bartáková a kol., A. (2022). In *Obecná neurologie a vyšetřovací metody v neurologii (2. doplněné vydání, pp. 89-90)*. Univerzita Palackého.
- Khalil, A. S., Hellenbrand, D., Reichl, K., Umhoefer, J., Filipp, M., Choe, J., Hanna, A., & Murphy, W. L. (2022). A Localized Materials-Based Strategy to Non-Virally Deliver Chondroitinase ABC mRNA Improves Hindlimb Function in a Rat Spinal Cord Injury Model. *Advanced Healthcare Materials*, 11(19). <https://doi.org/10.1002/adhm.202200206>
- Kobashi, S., Terashima, T., Katagi, M., Nakae, Y., Okano, J., Suzuki, Y., Urushitani, M., & Kojima, H. (2020). Transplantation of M2-Deviated Microglia Promotes Recovery of Motor Function after Spinal Cord Injury in Mice. *Molecular Therapy*, 28(1), 254-265. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.004>

- Kohoutová a kolektiv, M. (2013). In *Lékařská biologie a genetika* (3., nezměněné vydání, pp. 101-108). Karolinum.
- Konrádová, V., Uhlík, J., & Vajner, L. (2000). In *Funkční histologie* (2. vyd, p. 79). H&H.
- Koolman, J., & Klaus-Heinrich, R. (2012). In *Barevný atlas biochemie* (4th ed). Grada.
- Kříž, J. et al. (2019). In *PORANĚNÍ MÍCHY Příčiny, důsledky, organizace péče: příčiny, důsledky, organizace péče*. Galén.
- Kumar, H., Choi, H., Jo, M. -J., Joshi, H. P., Muttigi, M., Bonanomi, D., Kim, S. B., Ban, E., Kim, A., Lee, S. -H., Kim, K. -T., Sohn, S., Zeng, X., & Han, I. (2018). Neutrophil elastase inhibition effectively rescued angiotensin-1 decrease and inhibits glial scar after spinal cord injury. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0576-3>
- Kurt, G., Ergün, E., Cemil, B., Börcek, A. Ö., Börcek, P., Gülbahar, Ö., & Çeviker, N. (2009). Neuroprotective effects of infliximab in experimental spinal cord injury. *Surgical Neurology*, 71(3), 332-336. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2008.01.038>
- Landhuis, E. (2021). The Definition of Gene Therapy Has Changed. *Nature*, 1-5. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02736-8>
- Lau, B. Y. B., Fogerson, S. M., Walsh, R. B., & Morgan, J. R. (2013). Cyclic AMP promotes axon regeneration, lesion repair and neuronal survival in lampreys after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 250, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.004>
- Lein, P. J., Higgins, D., Turner, D. C., Flier, L. A., & Terranova, V. P. (1991). The NC1 domain of type IV collagen promotes axonal growth in sympathetic neurons through interaction with the alpha 1 beta 1 integrin. *The Journal of cell biology*, 113(2), 417-428. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.2.417>
- Lemons, M., & Condic, M. (2006). Combined integrin activation and intracellular cAMP cause Rho GTPase dependent growth cone collapse on laminin-1. *Experimental Neurology*, 202(2), 324-335. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.06.008>
- Li, Y., He, X., Kawaguchi, R., Zhang, Y., Wang, Q., Monavarfeshani, A., Yang, Z., Chen, B., Shi, Z., Meng, H., Zhou, S., Zhu, J., Jacobi, A., Swarup, V., Popovich, P. G., Geschwind, D. H., & He, Z. (2020). Microglia-organized scar-free spinal cord repair in neonatal mice. *Nature*, 587(7835), 613-618. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2795-6>
- Liu, F. -T., Xu, S. -M., Xiang, Z. -H., Li, X. -N., Li, J., Yuan, H. -B., & Sun, X. -J. (2014). Molecular Hydrogen Suppresses Reactive Astrogliosis Related to Oxidative Injury during Spinal Cord Injury in Rats, 20(8), 778-786. <https://doi.org/10.1111/cns.12258>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). In *Histologie* (Překlad 3. vydání, pp. 183-184). Grada.
- Macagno, E. R., Muller, K. J., & DeRiemer, S. A. (1985). Regeneration of axons and synaptic connections by touch sensory neurons in the leech central nervous system. *The Journal of Neuroscience*, 5(9), 2510-2521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.05-09-02510.1985>
- Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G. J., Iwaki, Y., & Colosi, P. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Therapy*, 5(7), 938-945. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300680>

- McCarthy, H. O., Wang, Y., Mangipudi, S. S., & Hatefi, A. (2010). Advances with the use of bio-inspired vectors towards creation of artificial viruses. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(4), 497-512. <https://doi.org/10.1517/17425240903579989>
- McDonald, J. W., & Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *The Lancet*, 359(9304), 417-425. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07603-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07603-1)
- McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S., & Silver, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 11(11), 3398-3411. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-11-03398.1991>
- McKerracher, L., David, S., Jackson, D. L., Kottis, V., Dunn, R. J., & Braun, P. E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*, 13(4), 805-811. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90247-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90247-X)
- Mescher, A. L. (2018). In *Junqueirovy základy histologie* (pp. 1-16, 188). Galén.
- Milich, L. M., Choi, J. S., Ryan, C., Cerqueira, S. R., Benavides, S., Yahn, S. L., Tsoulfas, P., & Lee, J. K. (2021). Single-cell analysis of the cellular heterogeneity and interactions in the injured mouse spinal cord. *Journal of Experimental Medicine*, 218(8). <https://doi.org/10.1084/jem.20210040>
- Milone, M. C., & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), 1529-1541. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0106-0>
- Moser, M., Nieswandt, B., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H., & Calderwood, D. A. (2008). Talin Binding to Integrin β Tails: A Final Common Step in Integrin Activation. *Nature Medicine*, 14(3), 103-106. <https://doi.org/10.1038/nm1722>
- Mothe, A. J., Tam, R. Y., Zahir, T., Tator, C. H., & Shoichet, M. S. (2013). Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials*, 34(15), 3775-3783. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.002>
- Naik, M. U., Mousa, S. A., Parkos, C. A., & Naik, U. P. (2003). Signaling through JAM-1 and $\alpha\beta3$ is required for the angiogenic action of bFGF: dissociation of the JAM-1 and $\alpha\beta3$ complex. *Blood*, 102(6), 2108-2114. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1114>
- New, P. W., & Marshall, R. (2014). International Spinal Cord Injury Data Sets for non-traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord*, 52(2), 123-132. <https://doi.org/10.1038/sc.2012.160>
- Nguyen, H. X., O'Barr, T. J., & Anderson, A. J. (2007). Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF- α . *Journal of Neurochemistry*, 102(3), 900-912. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04643.x>
- Niidome, T., & Huang, L. (2002). Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors. *Gene Therapy*, 9(24), 1647-1652. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301923>
- Nikulina, E., Tidwell, J. L., Dai, H. N., Bregman, B. S., & Filbin, M. T. (2004). The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(23), 8786-8790. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402595101>
- Nishiyama, A., Dahlin, K. J., Prince, J. T., Johnstone, S. R., & Stallcup, W. B. (1991). The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *The Journal of cell biology*, 114(2), 359-371. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.2.359>

- Niu, L., Zhou, J., Huang, Y., Chen, Y., & Li, C. (2010). Db-Cyclic adenosine monophosphate promotes axon regeneration and motor function recovery in cerebral ischemia-reperfusion rats. *Neurology India*, 58(2). <https://doi.org/10.4103/0028-3886.63786>
- Paco, S., Hummel, M., Plá, V., Sumoy, L., & Aguado, F. (2016). Cyclic AMP signaling restricts activation and promotes maturation and antioxidant defenses in astrocytes. *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2623-4>
- Pang, Q. -M., Chen, S. -Y., Xu, Q. -J., Fu, S. -P., Yang, Y. -C., Zou, W. -H., Zhang, M., Liu, J., Wan, W. -H., Peng, J. -C., & Zhang, T. (2021). Neuroinflammation and Scarring After Spinal Cord Injury: Therapeutic Roles of MSCs on Inflammation and Glial Scar. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.751021>
- Parr, A. M., Kulbatski, I., Zahir, T., Wang, X., Yue, C., Keating, A., & Tator, C. H. (2008). Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience*, 155(3), 760-770. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.042>
- Pearse, D. D., Pereira, F. C., Marcillo, A. E., Bates, M. L., Berrocal, Y. A., Filbin, M. T., & Bunge, M. B. (2004). cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 10(6), 610-616. <https://doi.org/10.1038/nm1056>
- Pineau, I., & Lacroix, S. (2007). Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: Multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *The Journal of Comparative Neurology*, 500(2), 267-285. <https://doi.org/10.1002/cne.21149>
- Preston, E., Webster, J., & Small, D. (2001). Characteristics of Sustained Blood-Brain Barrier Opening and Tissue Injury in a Model for Focal Trauma in the Rat. *Journal of Neurotrauma*, 18(1), 83-92. <https://doi.org/10.1089/089771501750055794>
- Qiao, L., Tang, Q., An, Z., & Qi, J. (2023). Minocycline relieves neuropathic pain in rats with spinal cord injury via activation of autophagy and suppression of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Journal of Pharmacological Sciences*, 153(1), 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2023.06.002>
- Qiu, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P. N., Bregman, B. S., & Filbin, M. T. (2002). Spinal Axon Regeneration Induced by Elevation of Cyclic AMP. *Neuron*, 34(6), 895-903. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00730-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00730-4)
- Racek a kolektiv, J. (2021). In *Klinická biochemie (Třetí, přepracované a rozšířené vydání)*, pp. 267-268. Galén.
- Rhodes, K. E., Raivich, G., & Fawcett, J. W. (2006). The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience*, 140(1), 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.055>
- Rowland, J. W., Hawryluk, G. W. J., Kwon, B., & Fehlings, M. G. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical Focus*, 25(5). <https://doi.org/10.3171/FOC.2008.25.11.E2>
- Salewski, R. P., Mitchell, R. A., Li, L., Shen, C., Milekovskaia, M., Nagy, A., & Fehlings, M. G. (2015). Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Mediate Functional Recovery Following Thoracic Spinal Cord Injury Through Remyelination of Axons. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(7), 743-754. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0236>
- Sasaki, M., Black, J. A., Lankford, K. L., Tokuno, H. A., Waxman, S. G., & Kocsis, J. D. (2006). Molecular Reconstruction of Nodes of Ranvier after Remyelination by Transplanted Olfactory

- Ensheathing Cells in the Demyelinated Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 26(6), 1803-1812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3611-05.2006>
- Shen, M., Zhou, C., Tian, Y., Shang, T., Qingyun liang, Ming, M., Ding, F., & Ji, Y. (2023). Effects of Semaphorin3A on the growth of sensory and motor neurons. *Experimental Cell Research*, 424(2). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113506>
- Shewan, D., Dwivedy, A., Anderson, R., & Holt, C. E. (2002). Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. *Nature Neuroscience*, 5(10), 955-962. <https://doi.org/10.1038/nn919>
- Schanne, F. A. X., Kane, A. B., Young, E. E., & Farber, J. L. (1979). Calcium Dependence of Toxic Cell Death: A Final Common Pathway. *Science*, 206(4419), 700-702. <https://doi.org/10.1126/science.386513>
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., & Muller, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature Immunology*, 3(2), 143-150. <https://doi.org/10.1038/ni749>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. -Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmid, R. S., & Anton, E. S. (2003). Role of Integrins in the Development of the Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*, 13(3), 219-224. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.3.219>
- Schultheiss, T. E., Stephens, L. C., & Peters, L. J. (1986). Survival in radiation myelopathy. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 12(10), 1765-1769. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(86\)90317-2](https://doi.org/10.1016/0360-3016(86)90317-2)
- Siegel, S. G., Patton, B., & English, A. W. (2000). Ciliary Neurotrophic Factor Is Required for Motoneuron Sprouting. *Experimental Neurology*, 166(2), 205-212. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7528>
- Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., Hainzl, A., Schatz, S., Qi, Y., Schlecht, A., Weiss, J. M., Wlaschek, M., Sunderkötter, C., & Scharffetter-Kochanek, K. (2011). An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 985-997. <https://doi.org/10.1172/JCI44490>
- Slotkin, J. R., Pritchard, C. D., Luque, B., Ye, J., Layer, R. T., Lawrence, M. S., O'Shea, T. M., Roy, R. R., Zhong, H., Vollenweider, I., Edgerton, V. R., Courtine, G., Woodard, E. J., & Langer, R. (2017). Biodegradable scaffolds promote tissue remodeling and functional improvement in non-human primates with acute spinal cord injury. *Biomaterials*, 123, 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.024>
- Smith, J. A., Siegel, J. H., & Siddiqi, S. Q. (2005). Spine and Spinal Cord Injury in Motor Vehicle Crashes: A Function of Change in Velocity and Energy Dissipation on Impact with Respect to the Direction of Crash. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 59(1), 117-131. <https://doi.org/10.1097/01.TA.0000171534.75347.52>
- Snow, D. M., Lemmon, V., Carrino, D. A., Caplan, A. I., & Silver, J. (1990). Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology*, 109(1), 111-130. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(05\)80013-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(05)80013-5)
- Song, X. -song, Cao, J. -li, Xu, Y. -bing, He, J. -hua, Zhang, L. -cai, & Zeng, Y. -ming. (2005). Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(7), 789-798. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00123.x>

- Spencer, T., & Filbin, M. T. (2004). A role for cAMP in regeneration of the adult mammalian CNS. *Journal of Anatomy*, 204(1), 49-55. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2004.00259.x>
- Štěpánková, K., Smejkalová, B., Machová Urdziková, L., Haveliková, K., de Winter, F., Suchánková, Š., Verhaagen, J., Herynek, V., Kwok, J., Fawcett, J., & Jendelová, P. (2023). Alpha 9 integrin expression enables reconstruction of the spinal cord sensory pathway. *BioRxiv*, 1-36. <https://doi.org/10.1101/2023.03.24.534172>
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H., & Calderwood, D. A. (2003). Talin Binding to Integrin β Tails: A Final Common Step in Integrin Activation. *Science*, 302(5642), 103-106. <https://doi.org/10.1126/science.1086652>
- Tan, C. L., Andrews, M. R., Kwok, J. C. F., Heintz, T. G. P., Gumy, L. F., Fässler, R., & Fawcett, J. W. (2012). Kindlin-1 Enhances Axon Growth on Inhibitory Chondroitin Sulfate Proteoglycans and Promotes Sensory Axon Regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 32(21), 7325-7335. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5472-11.2012>
- Tang, D., & Goldberg, D. J. (2000). Bundling of Microtubules in the Growth Cone Induced by Laminin. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 15(3), 303-313. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0820>
- Tate, M. C., García, A. J., Keselowsky, B. G., Schumm, M. A., Archer, D. R., & LaPlaca, M. C. (2004). Specific β 1 integrins mediate adhesion, migration, and differentiation of neural progenitors derived from the embryonic striatum. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 27(1), 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.05.001>
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4(5), 346-358. <https://doi.org/10.1038/nrg1066>
- Tran, A. P., Warren, P. M., & Silver, J. (2018). The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiological Reviews*, 98(2), 881-917. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2017>
- Troade, J. -D., Marien, M., Mourlevat, S., Debeir, T., Ruberg, M., Colpaert, F., & Michel, P. P. (2002). Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (ERK 1/2) Signaling Pathway by Cyclic AMP Potentiates the Neuroprotective Effect of the Neurotransmitter Noradrenaline on Dopaminergic Neurons. *Molecular Pharmacology*, 62(5), 1043-1052. <https://doi.org/10.1124/mol.62.5.1043>
- Tysnes BB, Larsen LF, Ness GO, Mahesparan R, Edvardsen K, Garcia-Cabrera I, Bjerkvig R. (1996) Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. *Int J Cancer*. 67(6), 777-784. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960917)67:6<777::AID-IJC5>3.0.CO;2-O
- Urbiniati, F., Campo Fernandez, B., Masiuk, K. E., Poletti, V., Hollis, R. P., Koziol, C., Kaufman, M. L., Brown, D., Mavilio, F., & Kohn, D. B. (2018). Gene Therapy for Sickle Cell Disease: A Lentiviral Vector Comparison Study. *Human Gene Therapy*, 29(10), 1153-1166. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.061>
- Wang, J. -wei, Yang, J. -feng, Ma, Y., Hua, Z., Guo, Y., Gu, X. -lin, & Zhang, Y. -feng. (2015). Nogo-A expression dynamically varies after spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, 10(2). <https://doi.org/10.4103/1673-5374.152375>
- Wang, K. C., Koprivica, V., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R. L., & He, Z. (2002). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, 417(6892), 941-944. <https://doi.org/10.1038/nature00867>
- Wang, L., Gu, S., Gan, J., Tian, Y., Zhang, F., Zhao, H., & Lei, D. (2021). Neural Stem Cells Overexpressing Nerve Growth Factor Improve Functional Recovery in Rats Following Spinal

- Cord Injury via Modulating Microenvironment and Enhancing Endogenous Neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.773375>
- Wang, L., Wei, F. -xin, Cen, J. -sheng, Ping, S. -ning, Li, Z. -qing, Chen, N. -ning, Cui, S. -bin, Wan, Y., & Liu, S. -yu. (2014b). Early administration of tumor necrosis factor-alpha antagonist promotes survival of transplanted neural stem cells and axon myelination after spinal cord injury in rats. *Brain Research*, 1575, 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.038>
- Wang, Y., Wang, H., Tao, Y., Zhang, S., Wang, J., & Feng, X. (2014a). Necroptosis inhibitor necrostatin-1 promotes cell protection and physiological function in traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 266, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.007>
- Wiese, S., Karus, M., & Faissner, A. (2012). Astrocytes as a Source for Extracellular Matrix Molecules and Cytokines. *Frontiers in Pharmacology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00120>
- Wirth, T., Parker, N., & Ylä-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, 525(2), 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
- Wu, J. -C., Huang, W. -C., Chen, Y. -C., Tu, T. -H., Tsai, Y. -A., Huang, S. -F., Huang, H. -C., & Cheng, H. (2011). Acidic fibroblast growth factor for repair of human spinal cord injury: a clinical trial. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 15(3), 216-227. <https://doi.org/10.3171/2011.4.SPINE10404>
- Wyndaele, M., & Wyndaele, J. -J. (2006). Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord*, 44(9), 523-529. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101893>
- Xia, T., Huang, B., Ni, S., Gao, L., Wang, J., Wang, J., Chen, A., Zhu, S., Wang, B., Li, G., Zhu, S., & Li, X. (2017). The combination of db-cAMP and ChABC with poly(propylene carbonate) microfibers promote axonal regenerative sprouting and functional recovery after spinal cord hemisection injury, 86, 354-362. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.045>
- Xu, X., Chen, A., Guenard, V., Kleitman, N., & Bunge, M. B. (1997). Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *Journal of Neurocytology*, 26(1), 1-16. <https://doi.org/10.1023/A:1018557923309>
- Yamanaka, K., Eldeiry, M., Aftab, M., Ryan, T. J., Meng, X., Weyant, M. J., Fullerton, D. A., & Reece, T. B. (2019). Synergetic Induction of NGF With Diazoxide and Erythropoietin Attenuates Spinal Cord Ischemic Injury. *Journal of Surgical Research*, 233, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.07.021>
- Yang, F., Liu, Y., Bixby, S. D., Friedman, J. D., & Shokat, K. M. (1999). Highly Efficient Green Fluorescent Protein-Based Kinase Substrates. *Analytical Biochemistry*, 266(2), 167-173. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2885>
- Yu, Y. -M., Cristofanilli, M., Valiveti, A., Ma, L., Yoo, M., Morellini, F., & Schachner, M. (2011). The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C promotes locomotor recovery after spinal cord injury in adult zebrafish. *Neuroscience*, 183, 238-250. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.043>
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *The Journal of Neuroscience*, 32(18), 6391-6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zhou, G., Wang, Z., Han, S., Chen, X., Li, Z., Hu, X., Li, Y., & Gao, J. (2022). Multifaceted Roles of cAMP Signaling in the Repair Process of Spinal Cord Injury and Related

Combination Treatments. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.808510>

Zhu, Y., Soderblom, C., Trojanowsky, M., Lee, D. -H., & Lee, J. K. (2015). Fibronectin Matrix Assembly after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 32(15), 1158-1167.
<https://doi.org/10.1089/neu.2014.3703>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAV	Adeno-asociovaný vir
BCA	Stanovení bílkovin pomocí kyseliny bicinchoninové (z angl. <i>bicinchoninic acid protein assay</i>)
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	Cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát
cDNA	Komplementární DNA (z angl. <i>complementary DNA</i>)
CNS	Centrální nervová soustava
CRE	cAMP-regulační element
CREB	Protein vážící se na cAMP-regulační element (z angl. <i>cAMP response element-binding protein</i>)
Ct	Prahová hodnota cyklu (z angl. <i>threshold cycle value</i>)
DABCO	1,4-diazabicyklo (2,2,2) oktan
db-cAMP	Dibutyryl-cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát
DPI	Dny po zranění (z angl. <i>days post injury</i>)
DRG	Dorzální ganglia (z angl. <i>dorsal root ganglia</i>)
DTT	Dithiotreitol
ECM	Extracelulární matrix
EPAC	Z angl. <i>exchange proteins directly activated by cAMP</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (z angl. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GC	Genomová kopie (z angl. <i>genome copie</i>)
GFAP	Gliový fibrilární kyselý protein (z angl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	Zelený fluorescenční protein (z angl. <i>green fluorescent protein</i>)
GSPGs	Chondroitin sulfátové proteoglykany (z angl. <i>chondroitin sulfate proteoglycans</i>)
IL	Interleukin
ITG α 9	Integrin α 9
K1	Kindlin 1
L	Bederní obratel (z lat. <i>vertebra lumbalis</i>)
MAG	Glykoprotein asociovaný s myelinem (z angl. <i>myelin-associated glycoprotein</i>)

MAPK/ERK	Z angl. <i>mitogen-activated protein kinase / extracellular signal regulated kinase pathway</i>
OMgp	Myelinový glykoprotein oligodendrocytů (z angl. <i>oligodendrocyte myelin glycoprotein</i>)
OPCs	Oligodendrocytové progenitorové buňky (z angl. <i>oligodendrocyte progenitor cells</i>)
PBS	Fosfátový pufr (z angl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PKA	Proteinkinasa A
PM	Poranění míchy
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rho-ROCK	Z angl. <i>Rho-associated coiled-coil containing protein kinase pathway</i>
RIPA	Radioimunoprecipitační testovací pufr (z angl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RT-qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
SDS	Dodecylsulfát sodný (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
T	Hrudní obratel (z lat. <i>vertebra thoracica</i>)
TBST	Tris-pufrovaný fyziologický roztok s Tween 20 (z angl. <i>tris-buffered saline with Tween 20</i>)
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor- α
TNS	Tris-nepufrovaný fyziologický roztok (z angl. <i>tris-nonbuffered saline</i>)