

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Reakce ependymálních buněk na poškození periferního nervu

Zuzana Lunerová

Kraj: Jihomoravský

Brno 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Reakce ependymálních buněk na poškození periferního nervu

Response of ependymal cells to peripheral nerve injury

Autoři: Zuzana Lunerová

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Brno, Žižkova 55, příspěvková organizace

Kraj: Jihomoravský

Konzultant: doc. MUDr. Marek Joukal, Ph.D.

Brno, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval(a) samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

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

V dne podpis:.....

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Marku Joukalovi Ph.D. za ochotu, zasvěcení do problematiky, pomoc a cenné rady. Tato práce by nevznikla bez trpělivé pomoci asistentky Anatomického ústavu Mgr. Klaudie Hašanové, která mi pomohla pochopit problematiku, propojit souvislosti a po celou dobu mi ochotně pomáhala nejen se správnou interpretací. Dále bych chtěla poděkovat laborantovi Anatomického ústavu Lumíru Trenčanskému, jenž mě seznámil se základy práce se statistickými programy, následnou analýzou a byl velmi nápomocen při práci s veškerou technikou.

jihomoravský kraj



Tato práce byla vytvořena za finanční podpory Jihomoravského kraje.

Anotace

Tato práce se zabývá problematikou reakce ependymálních buněk na poškození periferního nervu. Ependymální buňky jsou speciální gliové buňky, které lemují komorový systém mozku a centrální kanál míchy, vytvářející epiteliální bariéru zvanou ependym. Vrstva ependymálních buněk představuje bariéru mezi mozkomíšním mokem a mozkem. V ependymálních buňkách se mohou nacházet enzymy podílející se na imunitě, které by mohly mít, v závislosti na jejich množství a intenzitě, mimojiné vliv na regeneraci po různých nervových zraněních.

Periferní nervová soustava je systém nervů, které se nacházejí mimo CNS, tedy mimo mozek a míchu. Poškození periferního nervu představuje nemalou část veškerých poranění, která mohou člověka potkat i při běžných aktivitách. Poškození nervového axonu vede k jeho separaci od buněčného těla. Bez spojení s tělem nemohou výběžky samostatně existovat a následuje odumření distálního pahýlu nervu, což nazýváme Wallerovou degeneraci. Na rozdíl od nervů CNS mají však nervy PNS schopnost postupně se regenerovat, tedy získávat znovu svůj původní tvar a funkci. Bezprostředně po poškození proto organismus spustí imunitní reakci, jejímž cílem je nejdříve se zbavit odumřelých částí nervu a poté tvorba nervu nového.

Naše práce se zabývá poškozením periferního nervu a reakcí s tím spojených, projevujících se změnou chování ependymálních buněk. Sledovali jsme přítomnost proteinů, které jsou úzce spojeny s imunitními reakcemi poškozených buněk periferního nervu. Monitorovali jsme přítomnost toll-like receptoru (TLR9) a formyl-peptidového receptoru (FPR2) v ependymálních buňkách.

Experimenty byly prováděny na třech skupinách laboratorních potkanů kmene Wistar s různou mírou poškození periferního nervu: s chirurgickým poraněním periferního nervu, s obnažením periferního nervu a intaktní. Sledovaní jedinci byli usmrceni po 1, 3, 7, 14 a 21 dnech a na fixovaných mikroskopických řezech mozkové tkáně byla pomocí nepřímé dvoustupňové imunohistochemické analýzy měřena intenzita fluorescence odpovídající zvýšené přítomnosti receptorů TLR9 a FPR2.

Pomocí nepřímé dvoustupňové imunohistochemické detekce vzorků, následná analýza výsledků a statistického vyhodnocení jsme prokázali, že v případě poranění periferního nervu se hladina TLR9 významně nemění. Na základě těchto informací můžeme usuzovat, že toll-like receptor 9 v souvislosti s poraněním periferního nervu nehraje zásadní roli. Výsledky také prokázaly, že formyl-peptidový receptor FPR2 může být zapojen do imunitní a protizánětlivé reakce při poranění periferního nervu.

Klíčová slova

Ependymální buňky, periferní nervová soustava, poškození periferního nervu, imunohistochemie, toll-like receptor TLR9, formyl-peptidový receptor FPR2

Annotation

This paper deals with the problem of ependymal cell response to peripheral nerve injury. Ependymal cells are special glial cells that line the ventricular system of the brain and the central canal of the spinal cord, forming an epithelial barrier called the ependyma. The ependymal cell layer is the barrier between the cerebrospinal fluid and the brain. The ependymal cells may contain enzymes involved in immunity, which, depending on their quantity and intensity, could also have an effect on recovery from various nerve injuries.

The peripheral nervous system is a system of nerves that are located outside the CNS, i.e. outside the brain and spinal cord. Peripheral nerve damage accounts for a significant proportion of all injuries that can be sustained during normal activities. Damage to the nerve axon leads to its separation from the cell body. Without connection to the body, the processes cannot exist independently and death of the distal nerve stump follows, which is called Wallerian degeneration. Unlike CNS nerves, however, PNS nerves have the ability to regenerate gradually, i.e., to regain their original shape and function. Immediately after damage, the body triggers an immune response to first get rid of the dead parts of the nerve and then form a new nerve. Although neurons are able to regenerate their damaged axons and thus re-establish connection with the target tissue, the return of function is not always completely successful.

Our work focuses on peripheral nerve injury and the associated responses, manifested by changes in ependymal cell behavior. We investigated the presence of proteins that are closely associated with the immune responses of damaged peripheral nerve cells. We monitored the presence of toll-like receptor (TLR9) and formyl-peptide receptor (FPR2) in ependymal cells.

Experiments were performed on three groups of laboratory Wistar rats with different degrees of peripheral nerve injury: surgical peripheral nerve injury, peripheral nerve exposure, and intact. Subjects were sacrificed after 1, 3, 7, 14 and 21 days and the fluorescence intensity corresponding to the increased presence of TLR9 and FPR2 receptors was measured on fixed microscopic sections of brain tissue by indirect two-step immunohistochemical analysis.

Using indirect two-step immunohistochemical detection of the samples, subsequent analysis of the results and statistical evaluation, we demonstrated that TLR9 levels do not change significantly in peripheral nerve injury. Based on this information, we can conclude that toll-like receptor 9 does not play a major role in the context of peripheral nerve injury. The results also demonstrated that formyl-peptide receptor FPR2 may be involved in the immune and anti-inflammatory response in peripheral nerve injury.

Keywords

Ependymal cells, peripheral nervous system, peripheral nerve injury, immunohistochemistry, toll-like receptor TLR9, formyl-peptide receptor FPR2

Obsah	8
Seznam zkratek	10
1. CÍLE PRÁCE	11
2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	12
2.1. Mozkomíšní mok a jeho tvorba	12
2.1.1. Hematolikvorová bariéra	13
2.1.2. Hematoencefalická bariéra	13
2.1.3. Choroidální plexus	14
2.1.4. Ependymální buňky (ECs)	14
2.2. Periferní nervová soustava	15
2.2.1. Somatický nervový systém (SoNS)	16
2.2.2. Autonomní nervový systém (ANS)	17
a) Sympatický nervový systém	17
b) Parasympatický nervový systém	17
2.3. Degenerace periferního nervu	18
2.3.1. Wallerova degenerace	19
2.3.2. Regenerace PNS	20
2.4. Receptory TLR a FPR	20
2.5. Imunohistochemie	21
2.5.1. Nepřímá dvoustupňová metoda	22
2.5.2. Imunofluorescenční barvení	22
3. MATERIÁL A METODIKA	23
3.1. Biologický materiál	23
3.2. Chirurgické zákroky	23
3.3. Zpracování vzorků	24
3.4. Analýza výsledků	24
3.5. Statistické vyhodnocení	25
4. VÝSLEDKY	26
4.1. Průměrná intenzita toll-like receptoru TLR9	26
4.2. Průměrná intenzita fluorescence formyl-peptidového receptoru FPR2	28
5. DISKUZE	30
6. ZÁVĚR	32
7. SEZNAM LITERATURY	33
8. SEZNAM OBRÁZKŮ	35
9. SEZNAM GRAFŮ	35

Seznam zkratek

ANS	Autonomní nervový systém
CNS	centrální nervový systém
CP	<i>plexus choroideus</i> - choroidální plexus
CSF	<i>cerebro-spinal fluid</i> - mozkomíšní mok
ECs	<i>ependymal cells</i> - ependymální buňky
ER	endoplazmatické retikulum
FPRs	formyl-peptidové receptory
HEB	hematoencefalická bariéra
NK	<i>natural killer cells</i>
PNS	periferní nervová soustava
PRR	<i>pattern recognition receptors</i> - receptory pro rozpoznávání patogenů
sCCI	<i>sterile chronic constriction injury</i>
SoNS	somatická nervová soustava
TLR9	toll-like receptor 9
TRITC	tetramethyl-rodamin-isothiokyanát

1. CÍLE PRÁCE

Primárním cílem této práce bylo zjistit, zda se poškození periferního nervu a reakce s tím spojené projeví změnou chování ependymálních buněk. Zejména jsme se zaměřili na sledování přítomnosti proteinů, které jsou úzce spojeny s imunitními reakcemi poškozených buněk periferního nervu. V této souvislosti jsme sledovali přítomnost toll-like receptoru a formyl-peptidového receptoru v ependymálních buňkách s cílem najít souvislost mezi funkcí těchto receptorů a poškozením periferního nervu a zjistit jejich možný význam při regeneraci PNS.

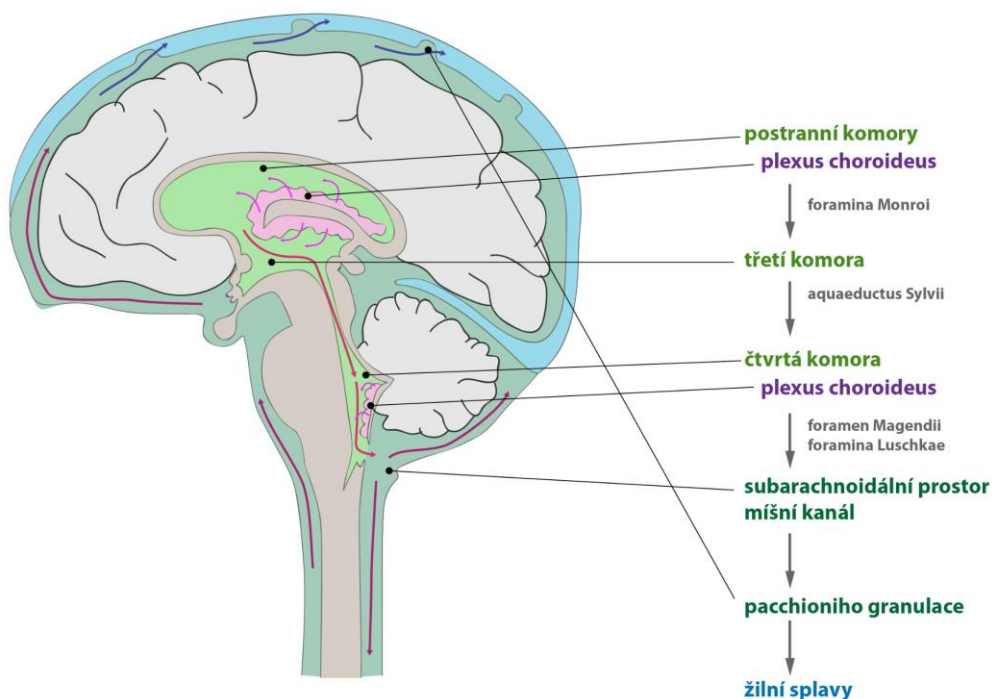
2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

2.1. Mozkomíšní mok a jeho tvorba

Mozek a mícha jsou obaleny třemi vazivovými obaly, které nazýváme mozkové pleny (meningy). Nejspodnější vrstvou je tzv. omozečnice (*pia mater*), jemná prokrvená mozková blána těsně přiléhající k mozku, tedy kopírující veškeré jeho nerovnosti a výstupky. Na ní přiléhá tzv. pavoučnice (*arachnoidea*), bezcévná, velmi tenká vrstva vaziva. Prostor mezi těmito dvěma plenami, vyplněný mozkomíšním mokem a cévami, je označován jako *subarachnoidální prostor*. Poslední mozková plena (*dura mater*), těsně přiléhající na lebku, je nazýván tvrdá plena mozková. Jedná se o prokrvenou pevnou vazivovou blánu.

Mozek je rozdělen do čtyř komor, dutin, které dohromady tvoří tzv. ventrikulární systém. Tyto komory vznikají embryologicky zbytněním centrální dutiny neurální trubice, navazují na míšní kanálek a jsou vyplněny mozkomíšním mokem. Postranní komory, III. a IV. mozková komora jsou vystlány ependymem (Ambler 2011).

Mozkomíšní mok (také likvor; cerebrospinal fluid - CSF) je tělní tekutina obklopující, vyživující a chránící organismus proti infekci mozku a míchy. Objem likvoru v těle dospělého jedince je cirká 120-180 ml. Obklopuje mozek ze všech stran a tím brání negativním následkům otřesů, změn tlaku či teploty. Tím, že je mozek v podstatě ponořen v mozkomíšním moku, se jeho reálná hmotnost (kolem 1500 g) sníží na ekvivalent přibližně 25 g. Mozek je tak chráněn před poškozením svou vlastní vahou. Zajišťuje optimální podmínky pro buňky centrálního nervového systému (CNS) a odsun produktů zbytkových látek při rozkladných procesech. Z části je produkován v okolí mozkových kapilár, z části poté v choroidálním plexu.



Obr. 1: Vnitřní prostředí mozku (Lavříková and Fontána, 2019)

2.1.1. Hematolikvorová bariéra

K oddělení mozkomíšního moku a krve slouží tzv. hematolikvorová bariéra tvořena choroidálními epiteliálními buňkami, bazální membránou a vrstvou endotelu kapilár omozečnice. Její hlavní úlohou je kontrolovat a omezovat vstup látek z krve přímo do likvoru. Mnohé proteiny krevní plazmy se tedy dostávají prostřednictvím pinocytózy nebo aktivním transportem do moku. Porucha hematolikvorové bariéry se projeví vzestupem proteinů krevní plazmy v moku. Transport se děje i opačným směrem, a tak se látky z likvoru mohou dostat zpátky do cirkulace (“11. Likvor, hematoencefalická a hematolikvorová bariéra, Funkce buněk a lidského těla,” n.d.).

2.1.2. Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra (HEB) je rozhraní, které odděluje mozek od oběhového systému a chrání centrální nervový systém od potenciálně škodlivých látek, zároveň reguluje transport vyživujících molekul a udržuje stabilní prostředí. Selektivita HEB tedy umožňuje průchod látek potřebných pro mozek. Základní funkcí HEB je ochrana tkáně CNS (především neuronů) vůči různým noxám, které by za normálních okolností mohly do tkáně CNS pronikat. Obecně

přes HEB nepronikají látky hydrofilní, ale je umožněn průnik látek lipofilních. Systém hematoenfalické bariéry je výsledkem komplexní interakce mezi nervovým parenchymem na jedné straně a krví a likvorem na straně druhé.

2.1.3. Choroidální plexus

Choroidální plexus (CP) je hustě prokrvená tkáň v mozku, jejíž hlavní funkcí je výroba mozkomíšního moku. Je tvořen záhyby omozečnice a tenkou epiteliální vrstvou endymálních buněk, které produkují CSF do komor. Ke zvětšení povrchu endymu slouží výběžky *microvilly* umístěny na apikální straně těchto buněk. Tyto buňky jsou spojeny těsnými spoji, mimo jiné *zonula occludens*. (Kaiser and Bryja, 2020). CP se nachází v části laterálních komor, kde ho tvoří přímý kontakt endymů s kolagenem. Odtud je likvor směřován do dutin na stropě III. a IV. mozkové komory, dále do subarachnoidálního prostoru. Následně je vstřebáván arachnoidálními kanálky a vyslán do oběhu CNS. Choroidální plexus je klíčovou strukturou ve zprostředkování interakcí a signálů mezi imunitním systémem a mozkem (Quan et al., 1999).

2.1.4. Endymální buňky (ECs)

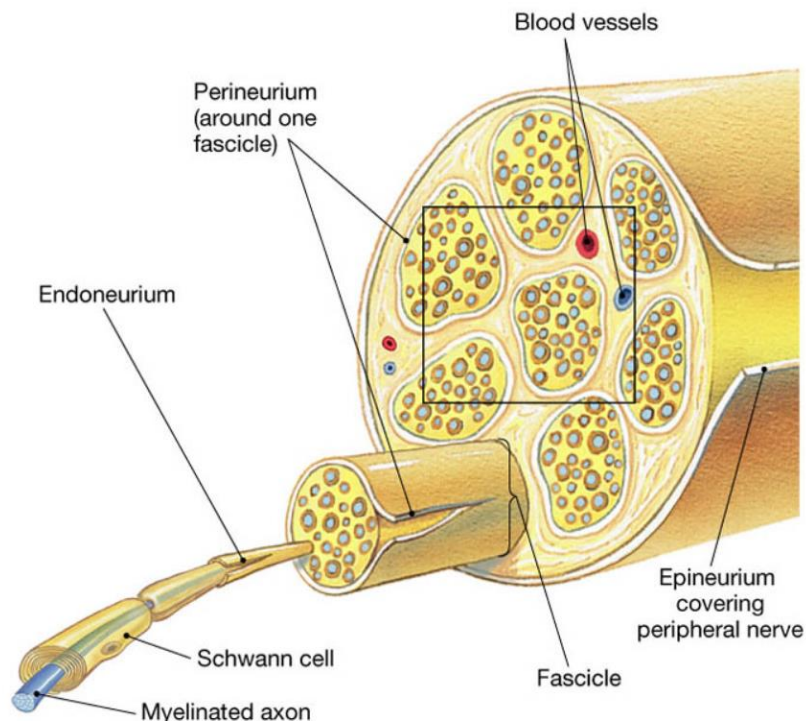
Endymální buňky (ECs) je jedna vrstva gliových buněk, které lemují komorový systém mozku a centrální kanál míchy, vytvářející epiteliální bariéru zvanou endym. Přítomnost cytoplazmatických mezivláken v ECs umožňuje, aby endym fungoval jako jakási podpůrná bariéra mezi mozkem a mozkomíšním mokem (Mokhtar et al., 2022). ECs jsou dlaždicového, kvádrového nebo sloupcového tvaru. Někdy jsou opatřeny řasinkami, které svým pohybem zlepšují pohyblivost mozkomíšního moku uvnitř dutin. Apikální strany endymu jsou omývány mozkomíšním mokem, strany bazální se dotýkají struktur nervové tkáně, jako jsou neurony, nervová vlákna, další gliové buňky, krevní cévy a další. Endymální buňky reagují na většinu zranění několika stereotypními reakcemi a neregenerují v žádném věku. (Junqueira, 2005).

2.2. Periferní nervová soustava

Periferní nervový systém (PNS) se skládá ze všech nervových struktur mimo mozek a míchu. Jeho součástí jsou míšní nervy (*nervi spinales*) a hlavové nervy (*nervi craniales*) (Kenhub). Spinální nervy tvoří celkem 31 párů nervů vycházejících z míchy zajišťující její propojení s ostatními částmi těla. Hlavovými nervy se rozumí soubor 12 periferních nervů vycházejících z mozku, které inervují struktury hlavy, krku, hrudníku a břicha. PNS umožňuje komunikaci mezi CNS a ostatními částmi těla. Tato soustava se funkčně dělí na somatický a autonomní nervový systém, přičemž autonomní NS se dále dělí na sympatický, parasympatický a enterický nervový systém (Dubový and University, 2007).

Periferní nerv se skládá z axonů, které jsou obaleny myelinovými pochvami (lipoproteiny obalujícími axony) vzniklými obtáčením Schwannových buněk kolem axonu. Nervová vlákna probíhající v nervu paralelně a pomocí vaziva tvořícího *endoneurium* se spojují v přesně ohraničené fascikly. *Perineurium* obaluje jednotlivé fascikly a *epineurium* formuje nervový kmen, který obsahuje jak fascikly, tak i zásobující cévy a vazivo. Čím menší jsou jednotlivé fascikly a čím více je v nervovém kmeni intersticiálního vaziva, tím odolnější je nerv vůči kompresi (Ehler, 2008).

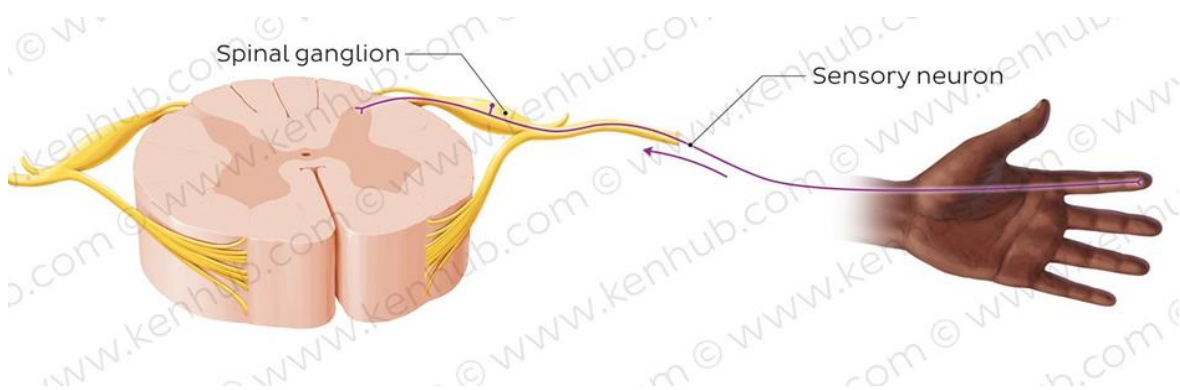
V periferním nervovém systému jsou všechny nemyelinizované axony zanořeny do cytoplasmy Schwannových buněk. Jedna Schwannova buňka tvoří obal pro mnoho nemyelinizovaných axonů. Schwannovy buňky jsou longitudinálně spojeny a vytváří tak kontinuální pochvu kolem nemyelinizovaných axonů (Václava Konrádová, Luděk Vajner, Jiří Uhlík, 2005).



Obr. 2: Schéma průřezu periferním nervem (Burnett and Zager, 2004)

2.2.1. Somatický nervový systém (SoNS)

SoNS je oddělení nervového systému složené ze všech nervových struktur mimo mozek a míchu. Tento nervový systém přenáší signály z CNS do kosterních svalů a je spojen jak s kontrolou volního pohybu těla, například s fungováním mezižebních nervů, tak s nedobrovolnými pohyby, jako je například koordinace reflexního oblouku. Kromě toho přenáší somatický nervový systém vnější podněty, jako je zrak, hmat a zvuky do centrální nervové soustavy.



Obr. 3: Senzorický nerv (Kenhub)

2.2.2. Autonomní nervový systém (ANS)

Autonomní nervový systém je spojen s činností zejména vnitřních orgánů, která není ovlivněna vůlí a vědomím jedince. Jinými slovy, ANS řídí a udržuje optimální vnitřní podmínky, tedy ‘nevědomé’ tělesné funkce, například trávení, dýchání, regulaci srdeční frekvence, regulaci průměru zornice, koordinaci hladkého svalstva atd. ANS se dále dělí na sympatický, parasympatický a enterický nervový systém.

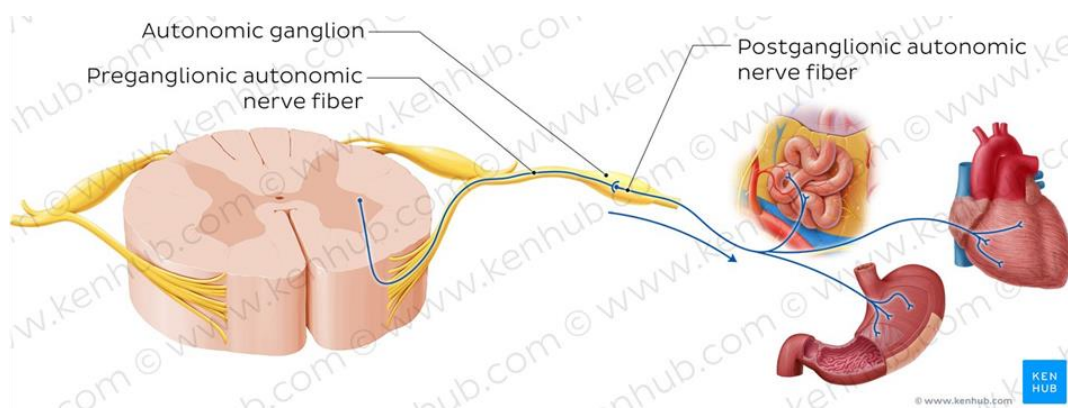
a) Sympatický nervový systém

Sympatický nervový systém připravuje tělo na fyzické či mentální aktivity. Je zodpovědný za okamžité reakce těla na hrozící nebezpečí. Během této fáze se organismus nabudí - napínají se svaly, zrychluje srdeční frekvence, stoupá krevní tlak, rozšiřují se zorničky, zvyšuje se sekrece potu, bledne kůže, zpomaluje se střevní peristaltika, rozšiřují se cévy svalů atp. K jeho zvýšené aktivaci dochází v nebezpečí, při prožívání silných emocí, při hypoglykémii či při užívání rozličných léků, nejčastěji však při vysokém stresu.

b) Parasympatický nervový systém

Parasympatický nervový systém řídí imunitní funkce, trávení, budování a opravy tkání, pod jeho vlivem se zpomaluje srdeční činnost, zmenšují zorničky, zrychluje střevní peristaltika a celkově se tlumí tělesné i psychické pochody. Zajišťuje činnost organismu v klidu a bezpečí a je odpovědný za přechod od sympatiku do klidového stavu.

pozn.: Enterický nervový systém je systém nervů, které se nacházejí ve stěnách gastrointestinálního traktu. Funguje samostatně, je však modifikován ostatními autonomními systémy (sympatickým a parasympatickým). Systém umožňuje posouvání obsahu díky koordinovaným pohybům, reguluje sekreci enzymů, kyselin a některých gastrointestinálních hormonů.

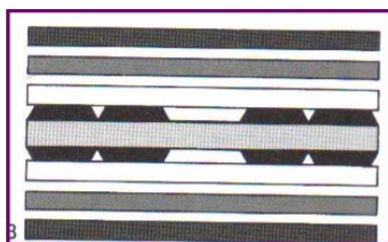


Obr. 4: Autonomní nerv (Kenhub)

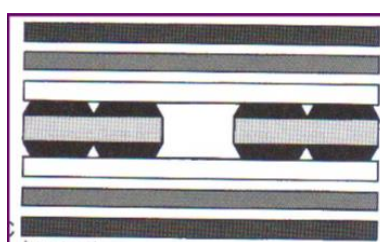
2.3. Degenerace periferního nervu

Poškození periferního nervu představuje 2-5% veškerých traumatických případů, jako jsou sportovní úrazy, zranění zapříčiněná dopravními nehodami, iatrogenní poškození a další (López-Cebral et al., 2017). V případě poškození periferního nervu dochází k obranné reakci gliových buněk a ke změnám v mikroprostředí neuronu, které nastávají v různých časových obdobích po poškození. Na rozdíl od neuronů CNS, které v případě poškození axonů vedou k atrofii či přímo zániku, neurony PNS započínají anabolické procesy, jejichž účelem je tvorba stavebních a zásobních látek. Protože jsou však tyto procesy velmi energeticky zatěžující, vyžadují během svého působení značnou energetickou podporu. Po poškození periferního nervu dochází k buněčným a molekulárním projevům zánětu nejen ve spinálních gangliích, odpovídajících poškozenému nervu, ale také v gangliích vzdálených místu poškození. (Joukal, 2016)

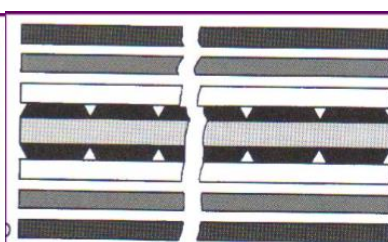
Existují tři stupně poranění nervů: neurapraxie, axonotmeze a neurotmeze. U axonotmeze i neurotmeze dochází k Wallerově degeneraci; u prvního jmenovaného je možná spontánní regenerace, u druhého však už nikoliv.



Obr. 5: neurapraxie



Obr. 6: axonotmeze



Obr. 7: neurotmeze

Poranění periferních nervů lze dělit na podkladě poškozených anatomických struktur – léze myelinové pochvy, axonu, vaziva. Při poruše myelinové pochvy dojde k demyelinizaci různě dlouhého úseku nervu (projeví se výpadkem funkce postižených vláken) a při regeneraci (remyelinizaci) se vytvářejí kratší segmenty nervu. Výsledkem je jednak trvalé zpomalení vedení v určitém segmentu nervu a jednak i desynchronizace signálu při stimulaci nervu (motorické i senzitivní odpovědi). Při otevřených poraněních nervů či těžších traumatech dojde k přerušení axonu, které je následováno Wallerovou degenerací axonu distálně od místa poranění a rovněž změnami myelinové pochvy. Periferní pahýl si zachovává elektrickou dráždivost po 5–10 dnů. Po několikadenním zdržení dochází k aktivaci těla neuronu a v další fázi (po delší časové prodlevě) k pučení jednotlivých vláken. Z každého přerušeného axonu vyrůstá řada pučících fibril. Pokud si vyhledají původní dráhu, dosáhnou cílového orgánu, vyžrávají a zvětšují svůj průměr. Rychlost pučení vláken je v průměru 1 mm za den (Ehler, 2008). Z toho vyplývá, že neurony jsou sice schopny regenerovat své poškozené axony a obnovit tak spojení s cílovou tkání, návrat funkce však není vždy 100% úspěšný. K podpoře myelinizace a posílení funkční obnovy po poranění periferních může být použito více nechirurgických přístupů, včetně farmakologické, elektrické, buněčné a laserové terapie (Modrak et al., 2020).

2.3.1. Wallerova degenerace

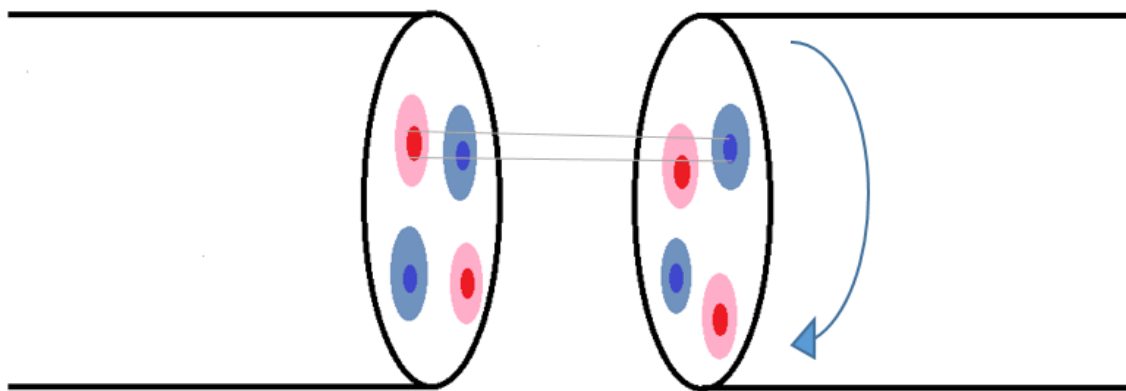
Po přerušení axonu dochází k jeho odloučení od buněčného těla a k degeneraci distálního pahýlu. Bez spojení s tělem nemohou výběžky samostatně existovat. Zaniká oddělená část axonu včetně myelinu. Bezprostředně po poškození dojde také k invazi krevních buněk (makrofágů) a profilaci Schwannových buněk. Ty z nich, které jsou nediferencované, mají schopnost zvýšení nebo obnovení syntézy neurotropických a neurotrofických faktorů a zásadně se tak podílejí na regeneraci nervu.

Wallerova degenerace je kaskáda buněčných a molekulárních reakcí, ke které dojde v nervech distálně od poškození. Jedná se o přirozenou imunitní a zánětlivou reakci buněk. Aktivují se Schwannovy buňky, které jsou v kontaktu s poškozeným axonem a zahajují regeneraci axonů. Distální segmenty porušeného axonu obsahují dezintegrované mitochondrie, které uvolňují mitochondriální proteiny a mitochondriální mtDNA. Rozvoj zánětlivé odpovědi ve Schwannových buňkách se projeví zvýšenou tvorbou a aktivací tzv. Toll-like receptorů (TLR). Receptory TLR jsou aktivovány buněčnými fragmenty produkovanými při Wallerově

degeneraci distálně od poškozeného periferního nervu. Dezintegrované mitochondrie poškozených axonů uvolňují krátké n-formylované peptidy, které fungují jako chemoatraktanty imunitních buněk a jako spouštěče zánětlivé odpovědi po traumatickém poranění. N-formylované peptidy slouží jako ligandy pro tzv. n-formyl peptidové receptory (FPR) (Korimová and Dubový, 2020).

2.3.2. Regenerace PNS

Jak již bylo řečeno, neurony jsou schopny regenerovat své poškozené axony a obnovit tak, často však v omezeném rozsahu, spojení s cílovou tkání. Cílem je obnovení spojení mezi spinálním motoneuronem nebo somatosenzorickým neuronem spinálních ganglií s odpovídající periferní tkání. S postupujícím časem od poškození se zvětšují ireverzibilní změny změny včetně změn ve vzorci spojení ve vyšších úrovních CNS, je tedy nutná rehabilitace. V případě neurotmeze je nutný neurochirurgický zákrok, jehož účelem je spojení dvou rozdělených částí nervu. Je však nutné dbát na správnou koaptaci pahýlů, protože v chybné reparace může dojít k úbytku možnosti návratu k funkci nervu.



Obr. 8: Koaptace pahýlů přerušného nervu

2.4. Receptory TLR a FPR

Pattern recognition receptors (PRR) jsou proteinové receptory schopné rychle rozpoznat molekuly typické pro mikrobiální patogeny nebo molekuly uvolňované poškozenými buňkami.

Toll-like receptory (TLR) jsou bílkovinné receptory nacházející se na povrchu cytoplazmatických membrán, které působí jako důležité regulátory imunitní a zánětlivé odpovědi při regeneračních procesech po zranění. Jedná se o skupinu receptorů, které jsou schopny rychle rozpoznat nebezpečné struktury charakteristických mikrobiálních produktů (např. lipopolysacharidů, lipoproteinů, úlomků bakteriálních bičků, bakteriální DNA) a cizorodé buněčné struktury. V současné době se TLR člení do skupin TLR1 - TLR10. Tato práce se zaměřuje na transmembránový protein TLR9, důležitý receptor exprimovaný buňkami imunitního systému, zejména pak makrofágy, dendritickými buňkami, NK buňkami (natural killer cells, podílejících se na obraně proti virům, bakteriím a parazitům) a dalšími buňkami (Jeong, 2020). TLR9 je lokalizován v kompartmentu intracelulární membrány, jako je endoplazmatické retikulum (ER), endozom a lysozom, a to z vnitřní strany membrány (Latz et al., 2004), (Kluwe et al., 2009).

Formyl peptidové receptory (FPRs) patří do skupiny 7 transmembránových chemoattractantních receptorů spřažených s G-proteinem. FPR jsou klasifikovány jako receptory pro rozpoznávání patogenů (PRR) lokalizované na imunitních buňkách, které hrají klíčovou roli ve vrozené imunitě díky své schopnosti rozpoznat oba patogenní původce spojené s poškozením. FPR2 jsou schopné rozpoznat širokou škálu endogenních nebo exogenních ligandů, od lipidů po proteiny a peptidy, včetně neformylovaných peptidů. Vzhledem k této vlastnosti mají FPR2 schopnost modulovat jak pro-, tak protizánětlivé reakce, v závislosti na povaze vázaného agonisty a na diferentních rozpoznávacích místech receptoru (Tylek et al., 2021).

2.5. Imunohistochemie

Imunohistochemie je široce používaná metoda pro detekce specifických molekul či jejich částí s využitím specifické vazby antigen-protilátka. K nejdůležitějším skupinám antigenů detekovaných v praxi patří například mikrofilamenta (aktin, myozin), intermediální filamenta, různé tkáňové receptory (Beranová and Tonar, 2002). Obecně fungují protilátky s jejich antigeny velmi rychle. Při imunohistochemické detekci molekul hrají při vytváření podmínek inkubace roli i další faktory jako je příprava tkáně, koncentrace protilátek a teplota (Ramos-Vara, 2011).

2.5.1. Nepřímá dvoustupňová metoda

Na tkáňové řezy se nejprve aplikuje neoznačená protilátka (imunoglobulin) nebo sérum, které jsou specifické proti prokazovanému antigenu a nazýváme je primární protilátkou. Ve druhé vrstvě nanášíme protilátku proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, které bylo dárce primární protilátky. Na protilátku primární se váže druhá (sekundární) protilátka, značená enzymem nebo fluorochromem a pomocí fluorescenčního mikroskopu se sleduje přítomnost hledaného antigenu, případně jeho množství úměrné intenzitě fluorescence. Imunohistochemické reakce umožňují do jisté míry provést i kvantitativní odečet, tj. posoudit míru přítomnosti pozorovaného antigenu v tkáni. Na to se v současné době využívají speciální softwares pro zpracování digitálního obrazu (Ramos-Vara, 2011), (Beranová and Tonar, 2002).

2.5.2. Imunofluorescenční barvení

Pro zobrazení zkoumaného jevu slouží fluorochromy - barviva vykazující fluorescenci. V této práci byly použity fluorochromy tetramethyl-rodamin-isothiokyanát (TRITC, červená barva) a hoechst pro značení buněčných jader (modrá barva). Analýzy označených řezů se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Biologický materiál

Experimenty byly provedeny na 33 dospělých samcích potkana kmene Wistar, vážících mezi 200 a 250 g. Zvířata byla chována ve sterilním prostředí a při teplotním režimu 22°C, potrava a voda jim byla poskytována *ad lib*. Veškeré experimenty se zvířaty byly prováděny dle protokolu schváleného Odbornou komisí pro zajištění dobrého životního standardu pokusných zvířat Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a oblastní komisí Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

3.2. Chirurgické zákroky

Tento výzkum pracuje se třemi různými skupinami zvířat; zaprvé s těmi, která prodělala chirurgické poranění nervu (sCCI), dále s těmi, u nichž došlo k umělému obnažení nervu (Sham) a nakonec s kontrolními potkany, u kterých k žádnému poškození nedošlo. Zvířata ve skupinách sCCI a Sham přežívala 1 den, 3 dny, 7 dní, 14 dní a 21 dní. Řezy byly vyhodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse NI-E vybaveném kamerou Nikon DS-Ri1 a analýzou obrazu NIS Elements (Nikon, Praha, Česká republika) (Solár et al., 2020).

V případě metody sCCI (sterile chronic constriction injury) byla kůže vertikálně proříznuta v oblasti stehna. Následně byl proveden řez svalem, obnažení sedacího nervu a byly uvázány tři ligatury tak, aby poškodily nerv, ale nezastavily epineurální průtok krve. Nakonec byla rána uzavřena. Bezprostředně poté, co je nerv zaškrcen, začne pahýl nervu degenerovat a část, která se nachází blíže k CNS, naopak regeneruje, což vede k Wallerově degeneraci. Po uplynutí požadovaného počtu dní bylo zvíře usmrceno, byla provedena fixace vzorku roztokem a následný odběr mozku. Z důvodu zamezení případné diverzity výsledků je v případě CCI metody nutné, aby zákroky prováděla pouze jedna osoba.

Sham operovaným zvířatům byl nerv pouze obnažen, nedojde k ligaturám, ale rána je rovnou uzavřena. Následný postup je u obou metod shodný.

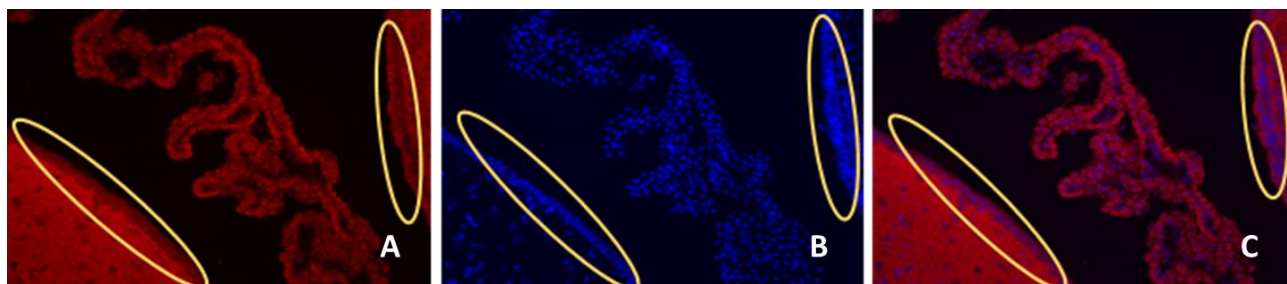
3.3. Zpracování vzorků

Zvířata skupin CCI a Sham po 1, 3, 7, 14 a 21 dnech po zákroku byla usmrcena společně s intaktními zvířaty (Naive) pomocí CO₂. Následně byla provedena transkardiální perfuze Zamboniho fixačním roztokem a roztokem PBS. Mozek byl odebrán a fixován v Zamboniho fixačním roztoku po dobu tří dnů, následně byl promytý 10% sacharózou a zalitý do směsi Tissue-Tek OCT. Po dobu pěti minut působila na řezy směs acetonu a methanolu při teplotě -20° C s následným oplachem ve směsi PBS-BSA-Tween. Dále byly připraveny kryostatové koronární řezy o tloušťce 20 µm (kryostat Leica 1800; Leica Microsystems, Wetzlar, Německo). Po inkubaci s primární protilátkou byla vazba na epitop vizualizovaná působením odpovídající sekundární protilátky značené CY5 (Kuklová and Solár, 2015).

Vzorky se inkubovaly s polyklonální primární králičí protilátkou proti TLR9 (1:500; Serotec) při pokojové teplotě na dobu 16 hodin. Následně byla aplikována kozí sekundární anti-králičí protilátka konjugovaná s CY5 (1:100; Chemicon) po dobu 90 minut. Na další vzorky se aplikovala polyklonální primární králičí protilátka proti FPR2 (1:100; Abcam) na 16 hodin a poté kozí sekundární protilátka konjugovaná s CY5 (1:100; Jackson) po dobu 90 minut. Buněčná jádra byla vizualizována barvivem Hoechst (Solár et al., 2020).

3.4. Analýza výsledků

Analýza byla provedena na snímcích řezu endymu a choroidálního plexu. Pro každou kategorii (Sham, CCI, Naive) byly v rámci daného enzymu (TLR9, FPR2) použity snímky několika různých jedinců potkanů. Pro každou skupinu různě dlouho přežívajících zvířat (1, 3, 7, 14, 21 dní) bylo měření prováděno na padesáti buňkách. Po jejich manuálním vyznačení jsme k analýze obrazu využili program NIS-Elements AR Analysis (verze 4.20.00 Nikon, Brno, Česká republika.) Buňky byly vybírány náhodně, hlavním kritériem však bylo vybírat a označovat jednotlivé endymální buňky tak, aby se nepřekrývaly, což by zkreslovalo intenzitu záření a tím i výskyt enzymů TLR9 a FPR2.



Obr. 9: Snímky řezu mozkiem pod fluorescenčním mikroskopem s vyznačeným ependymem

snímek A: fluoreskující buňky vykazující přítomnost receptoru TLR9 v červeném kanálu

snímek B: fluoreskující jádra buněk vykazující přítomnost receptoru TLR9 v modrém kanálu

snímek C: překrytí snímků A a B pro specifičtější lokalizaci jader buněk

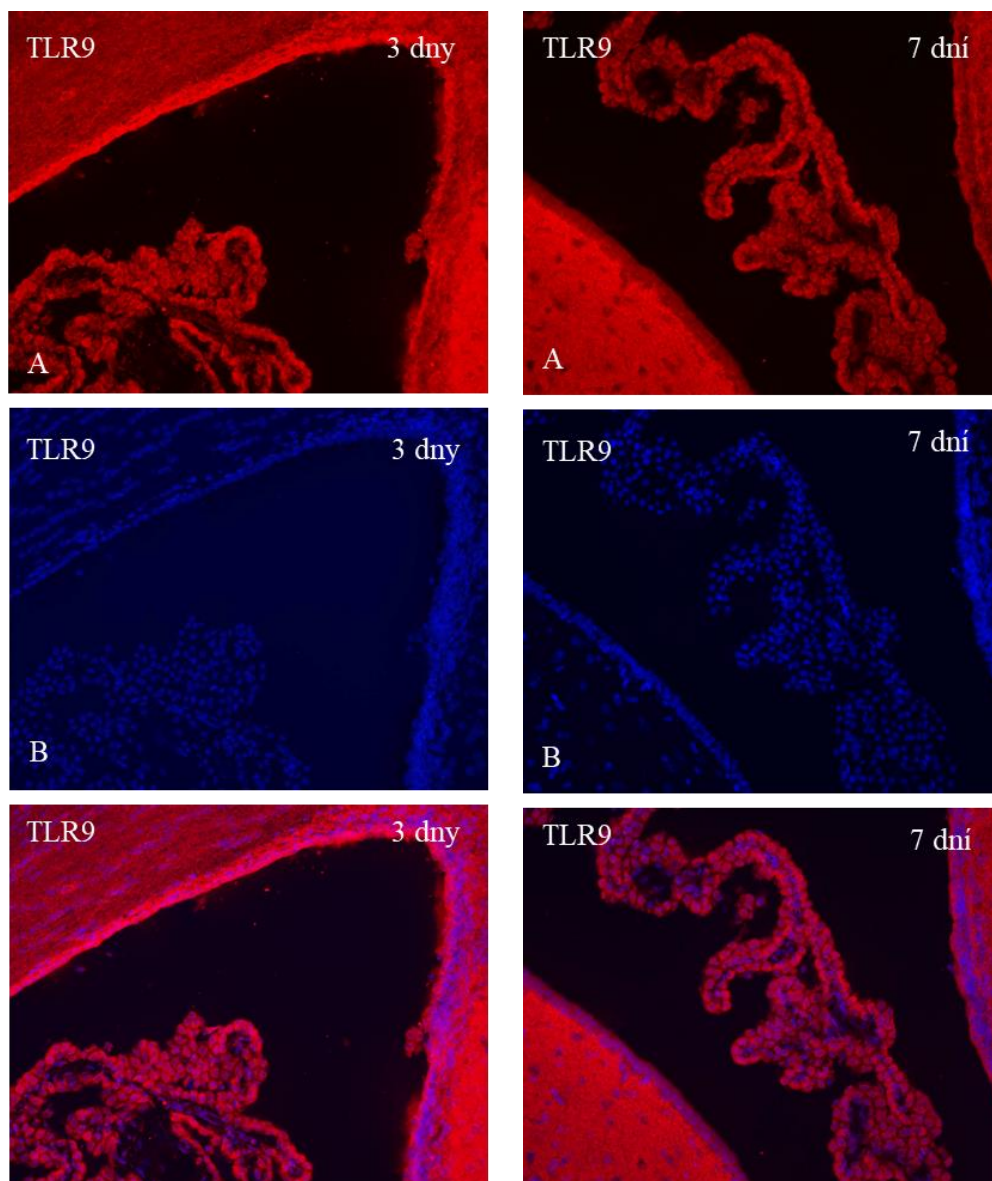
3.5. Statistické vyhodnocení

Po získání dat průměrné fluorescenční intenzity v programu NIS-Elements AR Analysis byl pro statistické vyhodnocení použit Mann-Whitneyho U-test v programu Statistica 13.5 (TIBCO Software Inc., Tulsa, USA). Tento test umožnil srovnat dvě různé skupiny a díky této informaci vygenerovat průměrnou intenzitu měřených látek. U skupin CCI a Sham jsme vyhodnocovali průměrnou relativní intenzitu imunofluorescence pozitivních oblastí v červeném spektru záření fluorescenčního mikroskopu ve srovnání s průměrnou relativní intenzitou fluorescence tkáně intaktních zvířat Naive.

4. VÝSLEDKY

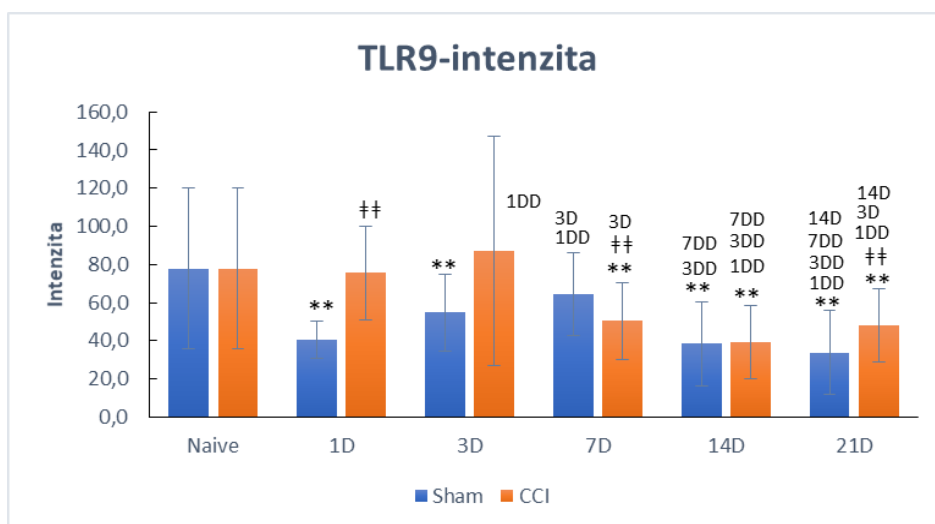
4.1. Průměrná intenzita fluorescence toll-like receptoru TLR9

Měřili jsme intenzitu fluorescence značených proteinových receptorů TLR9 na fixovaných preparátech řezů mozkovou tkání.



Obr. 10: Snímky fluoreskujících ependymálních buněk vykazujících přítomnost receptoru TLR9 u zvířat přežívajících 3 dny a 7 dní, přičemž A = barvivo TRITC fluoreskující v červené oblasti (značení proteinů) a B = barvivo Hoechst fluoreskující v modré oblasti (značení buněčných jader)

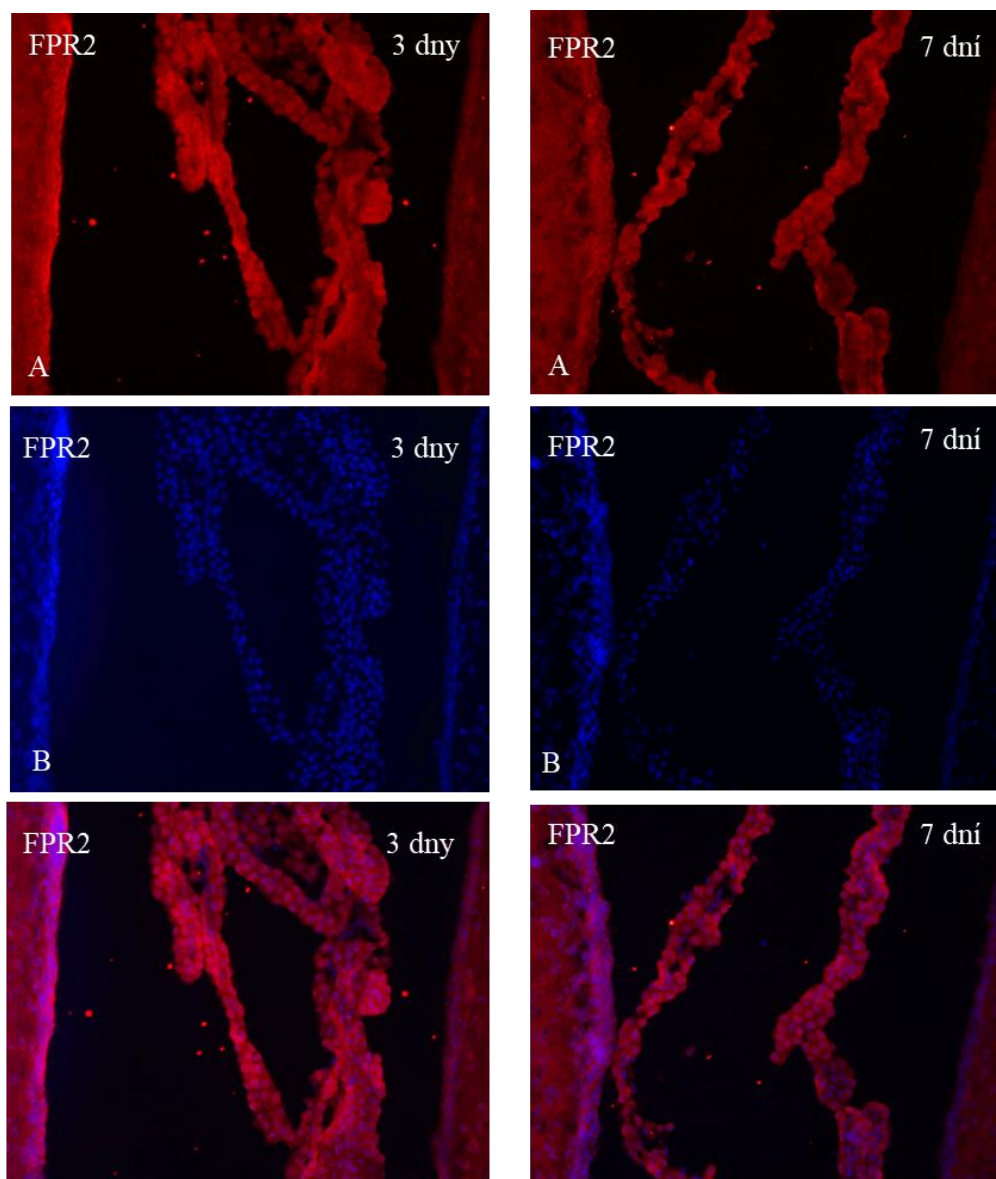
Graf 1: Průměrná intenzita fluorescence receptoru TLR9



úsečka vedoucí nahoru - směrodatná odchylka

4.2. Průměrná intenzita fluorescence formyl-peptidového receptoru FPR2

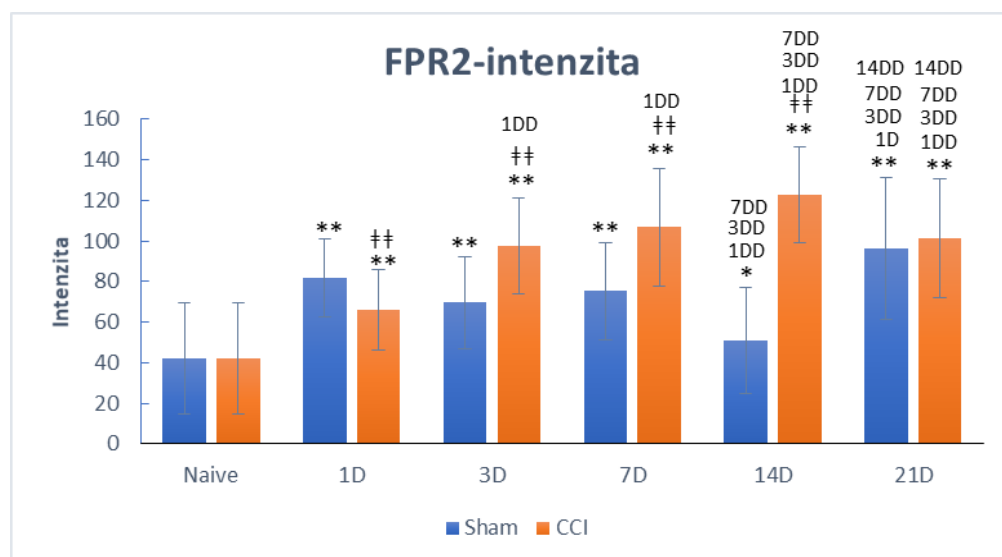
Měřili jsme intenzitu fluorescence značených proteinových receptorů FPR2 na fixovaných preparátech řezů mozkovou tkání.



Obr. 11: Snímky fluoreskujících ependymálních buněk vykazujících přítomnost receptoru TLR2 u zvířat přežívajících 3 dny a 7 dní, přičemž A = barvivo TRITC fluoreskující v červené oblasti (značení proteinů) a B = barvivo Hoechst fluoreskující v modré oblasti (značení buněčných jader)

Výsledky prokázaly, že intenzita, přímo úměrně značící přítomnost FPR2 u skupiny CCI, postupně stoupala hned od 1. dne až do dne 14, kde dosáhla nejvyšší hodnoty. Třetího a sedmého dne byla shledána znatelná odlišnost intenzity od hladiny v prvním dni. Ve všech měřených dnech byl zaznamenán signifikantní rozdíl oproti naivním zvířatům. Intenzita v kontrolní skupině Sham znatelně stoupla již první den, třetí a sedmý den se s menšími rozdíly držela v podstatě na stejné úrovni. Viditelné přiblížení zpět k naměřené hodnotě skupiny Naive nastalo až 14. den, kdy intenzita mírně klesla. 21. dne však opět narostla, což se signifikantně diferencovalo s intenzitou všech předešlých dní. Signální nitrobuněčná kaskáda v rámci FPR2 byla aktivována.

Graf 2: Průměrná intenzita fluorescence receptoru FPR2



Vysvětlivky grafu:

CCI - zvířata, u nichž bylo provedeno chirurgické poškození periferního nervu

Sham - kontrolní zvířata, u nichž bylo provedeno obnažení nervu

Naive - intaktní zvířata

* - signifikantní rozdíl oproti naivu

† - signifikantní rozdíl oproti Sham

1D - signifikantní rozdíl oproti dané periodě na hladině 5% (odlišnost od daného dne)

1DD - signifikantní rozdíl oproti dané periodě na hladině 1%

úsečka vedoucí nahoru - směrodatná odchylka

5. DISKUZE

Traumatické poranění periferního nervu představuje významný klinický problém, který je často spojen se zvýšenou pravděpodobností tělesného postižení a trvalé invalidity. Přestože periferní nervy mají do určité míry schopnost regenerovat, k regeneraci dochází velmi pomalu a k dokonalé obnově funkce dochází pouze v případech mírného traumatu. Obnova nervové funkce po traumatu závisí na řadě faktorů, jako je zejména stupeň poranění a lokace poškozeného nervu. Kritickým faktorem pro regeneraci je Wallerova degenerace, která se projevuje v úsecích axonu distálně od jeho přerušení (Modrak et al., 2020). Wallerovu degeneraci lze považovat za sterilní zánětlivý proces postihující Schwannovy buňky, který se projevuje zvýšenou produkcí cytokinů. Tyto cytokiny mohou stimulovat tvorbu proteinů neutrophinů, podílejících se na regeneraci axonů. V distálních segmentech poškození axonu dále dochází k uvolňování rozkladných produktů, které mohou spouštět intracelulární odezvu prostřednictvím zvýšeného výskytu PRR receptorů TLR9 a FPR2 (Korimová and Dubový, 2020). V posledních letech bylo zjištěno, že v neurogenezi hrají významnou roli i ependymální buňky, které tvoří podpůrnou bariéru mezi mozkovou tkání a mozkomíšním mokem (Mokhtar et al., 2022). Ependymální buňky se podílí na růstu a vývoji nervových buněk a pravděpodobně i na proliferaci axonů a podpoře systémové odezvy organismu, při diferenciaci neuronových buněk (Mokhtar et al., 2022).

V rámci této práce byla provedena série *in vivo* testů, ve kterých jsme sledovali možný vztah mezi zvýšenou přítomností PRR receptorů TLR9 a FPR2 v ependymálních buňkách a dobou, která uplynula od provedeného poškození periferního nervu. Dosud není známo, že by v ependymu docházelo k jejich zvyšování. Pomocí nepřímé dvoustupňové imunohistochemické detekce vzorků, následné analýzy výsledků a statistického vyhodnocení jsme prokázali přítomnost těchto enzymů v cytoplasmě ependymálních buněk. Zjistili jsme, že poškozením nervu se spustí proces, jehož důsledkem je aktivace těchto látek v různém rozsahu. Role receptoru TLR9 v regeneraci axonu zůstává nejasná, což je v souladu s předchozími studiemi (Korimová, Dubový, 2020). Až na téměř nepatrné zvýšení během 3. dne po zákroku hladina TLR9 během doby našeho výzkumu pomalu klesala, docházelo k postupnému snižování intenzity fluorescence. Dle toho bylo shledáno, že toll-like receptor 9 v souvislosti s poraněním periferního nervu nehraje zásadní roli. Výsledky měření formyl-peptidového receptoru FPR9 však přinesly jiné informace - již od prvního dne výzkumu hladina výrazněji stoupala a k její mírné regulaci došlo až 21. den. Tato reakce odpovídá faktu, že hladina FPR2 byla navýšena právě z důvodu poranění periferního nervu. Dokazuje to, že v případě poškození

periferního nervu se jeví FPR2 jako dominantnější receptor, který je schopen lépe vyhodnocovat a signalizovat reakce spojené s touto situací v ependymálních buňkách. Výsledky naznačují, že formyl-peptidový receptor FPR2 je zapojen do imunitní a protizánětlivé reakce při poranění periferního nervu.

Prokázali jsme, že v cytoplazmě ependymálních buněk se nachází PRR receptor FPR2, jehož množství se zvýší v případě poškození periferního nervu. Čím déle poškození trvá, tím více FPR2 je uvolňováno. Pro využití těchto procesů by se do budoucna mohla nabízet možnost ovlivnění rychlosti regenerace distálních částí axonů formou stimulace tvorby tohoto receptoru. Stále nevyjasněná pak zůstává otázka, jak se dostaly látky vyvolané imunitní reakcí, která proběhla ve velmi vzdáleném periferním nervu, do tak specifické mozkové struktury, jako je ependym.

6. ZÁVĚR

Naším záměrem bylo zjistit, zda v případě poranění periferního nervu ependymální buňky vykazují monitorovatelné změny, které by později mohly mít vliv na případnou regeneraci nervu či naopak poukázat na další komplikace spojené s poškozením. Pomocí nepřímé dvoustupňové imunohistochemické detekce vzorků, následná analýzy výsledků a statistického vyhodnocení jsme prokázali, že v případě poranění periferního nervu se hladina TLR9 v epenymu významně nemění. Na základě těchto informací můžeme usuzovat, že toll-like receptor 9 v souvislosti s poraněním periferního nervu nehraje zásadní roli. Naopak jsme zjistili, že hladina receptoru FPR2 postupně narůstá jak u skupiny operovaných zvířat, tak u kontrolních jedinců, a to téměř ve všech časových periodách. Tento receptor kopíruje fáze Wallerovy degenerace - čím delší je perioda, tím větší nárůst intenzity jsme zaznamenali. To znamená, že s narůstajícím časovým úsekem se uvolňuje stále více cytokinů, které by mohly mít vliv na následné protizánětlivé reakce. Výsledky tedy nasvědčují tomu, že formyl-peptidový receptor FPR2 může být zapojen do imunitní a protizánětlivé reakce při poranění periferního nervu.

Prokázali jsme, že receptor FPR2 je dominantní a slouží k signalizaci rozpadových produktů. Na závěr můžeme říci, že zvýšená produkce FPR2 je přirozenou obrannou reakcí organismu na typ změn, mezi které se řadí i poškození periferního nervu. Přestože je reálné klinickou bolest po prodělání poranění periferního nervu chirurgicky utišit, zvýšená přítomnost FPR2 může prokazovat to, že problém způsobený tímto poraněním stále přetrvává a je tedy třeba ho intenzivně řešit.

7. SEZNAM LITERATURY

- Beranová, M., Tonar, Z., 2002. Principy a příklady imunohistochemie.
- Burnett, M., Zager, E., 2004. Classification of peripheral nerve injury 15. Classification of Peripheral Nerve Injury [WWW Document], n.d. . Physiopedia. URL https://www.physio-pedia.com/Classification_of_Peripheral_Nerve_Injury (accessed 1.30.23).
- Dubový, P., Jančálek, R., 2019. Základy neuroanatomie a nervových drah. Masaryk University.
- Ehler, E., 2008. Traumata periferních nervů. Neurol. Praxi 9, 7–8.
- Jeong, S.W., 2020. Toll-like receptor 9, a possible blocker of non-alcoholic steatohepatitis? Clin. Mol. Hepatol. 26, 185–186. <https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0046>
- Joukal, M., 2016. Hemato-nervová a likvor-nervová bariéra ve spinálních gangliích v normě po poškození periferního nervu.
- Junqueira, L.C.U., 2005. Basic histology : text & atlas. New York : McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
- Kaiser, K., Bryja, V., 2020. Choroid Plexus: The Orchestrator of Long-Range Signalling Within the CNS. Int. J. Mol. Sci. 21, 4760. <https://doi.org/10.3390/ijms21134760>
- Kluwe, J., Mencin, A., Schwabe, R.F., 2009. Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. J. Mol. Med. 87, 125–138. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0426-z>
- Konrádová, V., Vajner, L., Uhlík, J., 2000. Funkční histologie.
- Korimová, A., Dubový, P., 2020a. N-Formylated Peptide Induces Increased Expression of Both Formyl Peptide Receptor 2 (Fpr2) and Toll-Like Receptor 9 (TLR9) in Schwannoma Cells—An In Vitro Model for Early Inflammatory Profiling of Schwann Cells. Cells 9, 2661. <https://doi.org/10.3390/cells9122661>
- Korimová, A., Dubový, P., 2020b. N-Formylated Peptide Induces Increased Expression of Both Formyl Peptide Receptor 2 (Fpr2) and Toll-Like Receptor 9 (TLR9) in Schwannoma Cells—An In Vitro Model for Early Inflammatory Profiling of Schwann Cells. Cells 9, 2661. <https://doi.org/10.3390/cells9122661>
- Kuklová, A., Solár, P., 2015. Studium změn hematomolivorové bariéry laboratorního potkana po poškození periferního nervu.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., Golenbock, D.T., 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. Nat. Immunol. 5, 190–198. <https://doi.org/10.1038/ni1028>
- Lavříková, P., Fontána, J., 2019. Likvor, hematoencefalická a hematomolivorová bariéra [WWW Document]. URL <http://fb.lt.cz/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/12-likvor-hematoencefalicka-a-hematomolivorova-bariera/> (accessed 1.25.23).
- López-Cebral, R., Silva-Correia, J., Reis, R.L., Silva, T.H., Oliveira, J.M., 2017. Peripheral Nerve Injury: Current Challenges, Conventional Treatment Approaches, and New Trends in Biomaterials-Based Regenerative Strategies. ACS Biomater. Sci. Eng. 3, 3098–3122. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00655>
- Modrak, M., Talukder, M.A.H., Gurgenshvili, K., Noble, M., Elfar, J.C., 2020. Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. J. Neurosci. Res. 98, 780–795. <https://doi.org/10.1002/jnr.24538>
- Mokhtar, D.M., Sayed, R.K.A., Zaccane, G., Albano, M., Hussein, M.T., 2022. Ependymal and Neural Stem Cells of Adult Molly Fish (*Poecilia sphenops*, Valenciennes, 1846) Brain: Histomorphometry, Immunohistochemical, and Ultrastructural Studies. Cells 11, 2659. <https://doi.org/10.3390/cells11172659>

- Ramos-Vara, J.A., 2011. Principles and Methods of Immunohistochemistry, in: Gautier, J.-C. (Ed.), Drug Safety Evaluation, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 83–96. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_5
- Solár, P., Zamani, A., Kubičková, L., Dubový, P., Joukal, M., 2020. Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids Barriers CNS* 17, 35. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00196-2>
- Tylek, K., Trojan, E., Regulska, M., Lacivita, E., Leopoldo, M., Basta-Kaim, A., 2021. Formyl peptide receptor 2, as an important target for ligands triggering the inflammatory response regulation: a link to brain pathology. *Pharmacol. Rep.* 73, 1004–1019. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00271-x>

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Vnitřní prostředí mozku (Lavříková and Fontána, 2019)

Obr. 2: Schéma průřezu periferním nervem (Burnett and Zager, 2004)

Obr. 3: Senzorický nerv (Kenhub)

Obr. 4: Autonomní nerv (Kenhub)

Obr. 5: Neurapraxie

Obr. 6: Axonotmeze

Obr. 7: Neurotmeze

Obr. 8: Koaptace pahýlů přerušného nervu

Obr. 9: Snímky řezu mozku pod fluorescenčním mikroskopem s vyznačeným ependymem

Obr. 10: Snímky fluoreskujících ependymálních buněk vykazujících přítomnost receptoru TLR9 u zvířat přežívajících 3 dny a 7 dní

Obr. 11: Snímky fluoreskujících ependymálních buněk vykazujících přítomnost receptoru TLR2 u zvířat přežívajících 3 dny a 7 dní

9. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Průměrná intenzita fluorescence receptoru TLR9

Graf 2: Průměrná intenzita fluorescence receptoru FPR2