

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Anna Kloudová

Traumatické poranění míchy a jeho léčba pomocí kurkuminu

Curcumin in the treatment of traumatic spinal cord injury

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Lucia Machová Urdzíková, Ph.D.

Praha, 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 4. 2016

Anna Kloudová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce MUDr. Lucii Machové Urdzíkové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost a také cenné rady, kterými mě po tři roky provázela laboratorní praxí. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům z Laboratoře tkáňových kultur a kmenových buněk, kteří přispěli ke zdárnému dokončení této práce, a to především Mgr. Jiřímu Růžičkovi, Ph.D. za odborné konzultace a také Mgr. Kristýně Kárové a Mgr. Janě Dubišové. Taktéž děkuji doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D. za možnost vypracovat svou práci právě na jejím oddělení. Velký dík patří také mé rodině za podporu v průběhu celého mého studia.

ABSTRAKT

Poranění míchy je velmi závažný klinický i společenský problém s dalekosáhlými důsledky, které postihují pacienta i jeho rodinu. Hledání vhodné léčby, která by dokázala zlepšit situaci těchto pacientů, je proto věnováno velké úsilí. Tato práce se zabývala možností využití přírodní látky kurkuminu v terapii míšního poranění na experimentálním modelu balónkové míšní komprese. Potkani kmene Wistar byli po indukci léze rozděleni do dvou skupin, z nichž jedné byl aplikován kurkumin a druhá sloužila jako kontrolní. Efekt kurkuminu byl sledován z funkčního hlediska pomocí sady motorických a senzorických behaviorálních testů, dále byla provedena histologická a imunohistochemická analýza a pomocí metody qPCR byla sledována exprese vybraných genů. Bylo prokázáno, že kurkumin zlepšoval základní motorické funkce léčených zvířat, a to zejména v prvních týdnech po poranění míchy. Morfometrická analýza zachované šedé a bílé hmoty nepotvrdila rozdíl mezi jednotlivými skupinami, nicméně velikost gliové jizvy byla u skupiny léčené kurkuminem v oblasti okolo středu léze významně redukována. Také aktivita transkripčního faktoru NF- κ B byla po podávání kurkuminu podstatně omezena. Analýza genové exprese prokázala snížení exprese genů pro GFAP a RANTES a naopak zvýšení exprese genu pro IRF-5 u léčené skupiny po 10 dnech od poranění míchy. Výsledky získané v této práci dokládají pozitivní efekt kurkuminu na vývoj míšního poranění a naznačují tak jeho možné využití v terapii poranění míchy.

Klíčová slova: poranění míchy, kurkumin, zánět, behaviorální testy, neurotrauma, neuroregenerace, potkan

ABSTRACT

Spinal cord injury is a very significant clinical as well as social problem with extensive consequences, affecting the patient and also his/her family. Great efforts have been devoted to searching for an effective treatment, which would improve their situation. This thesis evaluated the effects of the natural compound curcumin on spinal cord injury using an experimental balloon compression model. Male Wistar rats were randomized into two groups following the lesion induction, namely vehicle- or curcumin-treated. The behavioral recovery was evaluated using a set of locomotor and sensory tests and a histological and immunohistochemical analysis was performed. The qPCR method was used to observe the expression of some genes related to regeneration and immune response. It was demonstrated that curcumin improved locomotor recovery after the spinal cord injury, particularly in the early stages. Morphometric analysis of the gray and white matter sparing didn't confirm any differences between the two groups. Nevertheless, the glial scar formation was significantly reduced around the central part of the lesion in the curcumin treated group and also the NF- κ B activity was substantially inhibited. The gene expression analysis demonstrated downregulation of *Gfap* and *Rantes* genes and upregulation of the *Irf5* gene in the curcumin treated group 10 days after the spinal cord injury. These results demonstrated the positive effect of curcumin on spinal lesion development and this therapeutic potential might be used in the treatment of spinal cord injury.

Keywords: spinal cord injury, curcumin, inflammation, behavioral tests, neurotrauma, neuroregeneration, rat

OBSAH

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | SEZNAM ZKRATEK | 8 |
| 2 | ÚVOD | 11 |
| 3 | LITERÁRNÍ PŘEHLED | 12 |
| 3.1 | Anatomie míchy | 12 |
| 3.2 | Patofyziologie poranění míchy..... | 14 |
| 3.2.1 | Primární poranění..... | 14 |
| 3.2.2 | Sekundární poranění | 14 |
| 3.2.2.1 | <i>Záněť</i> | 15 |
| 3.2.2.2 | <i>Glutamátová excitotoxicita</i> | 17 |
| 3.2.2.3 | <i>Reaktivní sloučeniny kyslíku</i> | 17 |
| 3.2.2.4 | <i>Apoptóza a nekróza</i> | 18 |
| 3.2.2.5 | <i>Demyelinizace</i> | 18 |
| 3.2.2.6 | <i>Gliová jizva</i> | 19 |
| 3.3 | Možnosti terapie poranění míchy..... | 20 |
| 3.3.1 | Současný stav | 20 |
| 3.3.2 | Nové strategie | 20 |
| 3.3.2.1 | <i>Buněčná terapie</i> | 21 |
| 3.3.2.2 | <i>Molekulární terapie.....</i> | 22 |
| 3.3.2.3 | <i>Tkáňové inženýrství.....</i> | 23 |
| 3.4 | Kurkumin a jeho využití..... | 25 |
| 4 | CÍLE PRÁCE..... | 28 |
| 5 | MATERIÁL A METODY..... | 29 |
| 5.1 | Experimentální zvířata | 29 |
| 5.2 | Poranění míchy a aplikace kurkuminu | 29 |
| 5.3 | Behaviorální testování | 32 |
| 5.3.1 | BBB test | 32 |
| 5.3.2 | Flat Beam test..... | 32 |
| 5.3.3 | Rotarod test..... | 33 |
| 5.3.4 | Plantar test | 33 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.4 | Histologická a imunohistochemická analýza | 30 |
| 5.5 | qPCR..... | 31 |
| 5.6 | Statistická analýza..... | 33 |
| 6 | VÝSLEDKY | 34 |
| 6.1 | Histologická a imunohistochemická analýza | 34 |
| 6.1.1 | Zachování šedé a bílé hmoty | 34 |
| 6.1.2 | Gliová jizva..... | 34 |
| 6.1.3 | Axonální sprouting..... | 34 |
| 6.1.4 | Aktivita NF- κ B | 35 |
| 6.2 | Genová exprese (qRT-PCR) | 35 |
| 6.3 | Behaviorální testování | 35 |
| 6.3.1 | BBB | 35 |
| 6.3.2 | Plantar test | 36 |
| 6.3.3 | Flat Beam test..... | 36 |
| 6.3.4 | Rotarod test..... | 36 |
| 7 | DISKUZE..... | 47 |
| 8 | ZÁVĚR..... | 51 |
| 9 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 52 |
| 10 | PŘÍLOHY..... | 60 |

1 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--|---|
| 5-LOX | 5-lipooxygenáza (5-lipooxygenase) |
| ANOVA | analýza rozptylu (analysis of variance) |
| ARE | antioxidant response element |
| AT-MSC | MSC izolované z tukové tkáně (adipose tissue-derived MSC) |
| Na ⁺ /K ⁺ ATPáza | sodno-draselná pumpa (adenosin-trifosfatáza) |
| BAX | BCL-2-associated X protein |
| BBB | Basso, Beattie, Bresnahan |
| BCL-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BDNF | brain-derived neurotrophic factor |
| BM-MSC | MSC izolované z kostní dřeně (bone marrow-derived MSC) |
| C1 | 1. krční obratel |
| C4 | 4. krční obratel |
| CASP-3 | kaspáza 3 (caspase 3) |
| CCL-3 | chemokine (C-C motif) ligand 3 |
| CCL-5 | chemokine (C-C motif) ligand 5 |
| CD-163 | cluster of differentiation 163 |
| CD-86 | cluster of differentiation 86 |
| cDNA | komplementární deoxyribonukleová kyselina (complementary deoxyribonucleic acid) |
| CNS | centrální nervová soustava |
| CNTF | ciliary neurotrophic factor |
| COX-2 | cyklooxygenáza 2 (cyklooxygenase 2) |
| CSPG | chondroitin-sulfátové proteoglykany (chondroitin sulfate proteoglycans) |
| Cy3 | cyaninové barvivo 3 (cyanine dye 3) |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EMSA | electrophoretic mobility shift assay |
| ESC | embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells) |
| FGF-2 | fibroblast growth factor 2 |
| GAP-43 | growth associated protein 43 |
| GAPDH | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) |
| GDNF | glial cell line-derived neurotrophic factor |

| | |
|-------------------------------|--|
| GFAP | glial fibrillary acidic protein |
| H ₂ O ₂ | peroxid vodíku |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule 1 |
| IgG | imunoglobulin G (immunoglobulin G) |
| IKK | IκB kináza (IκB kinase) |
| IL-10 | interleukin 10 |
| IL-1β | interleukin 1β |
| IL-6 | interleukin 6 |
| iNOS | inducibilní syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase) |
| iPSC | indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells) |
| IRF-5 | interferon regulátory factor 5 |
| IκB | inhibitor κB (inhibitor of κB) |
| L2 | 2. bederní obratel |
| MIP-1α | macrophage inflammatory protein 1α |
| MP | methylprednisolon (methylprednisolone) |
| MRC-1 | mannose receptor, C type 1 |
| mRNA | mediátorová RNA (messenger RNA) |
| MSC | mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells) |
| NASCIS | Národní studie akutního míšního poranění (National Acute Spinal Cord Injury Study) |
| NF-κB | nukleární faktor κB (nuclear factor κB) |
| NGF | nerve growth factor |
| NMDA | N-methyl-D-aptát (N-methyl-D-aspartate) |
| NO | oxid dusnatý (nitric oxide) |
| NOGO-A | neurite outgrowth inhibitor A |
| NRF-2 | nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |
| NSC | neurální kmenové buňky (neural stem cells) |
| NT-3 | neurotrofin 3 (neurotrophin 3) |
| OLIG-2 | oligodendrocyte lineage transcription factor 2 |
| p21 | protein 21 |
| p53 | protein 53 |
| p65 | protein 65 |
| PBS | phosphate-buffered saline |

| | |
|----------------|---|
| PDGF | platelet derived growth factor |
| PLA-2 | fosfolipáza A2 (phospholipase A2) |
| qPCR | kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí a sledovaná v reálném čase (quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction) |
| RANTES | regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted |
| RNA | ribonukleová kyselina (ribonucleic acid) |
| ROS | reaktivní sloučeniny kyslíku (reactive oxygen species) |
| SCI | poranění míchy (spinal cord injury) |
| SEM | střední chyba průměru (standard error of mean) |
| SOD-1 | superoxid-dismutáza 1 |
| SORT-1 | sortilin 1 |
| T10 | 10. hrudní obratel |
| T8 | 8. hrudní obratel |
| TGF- β 1 | transforming growth factor β 1 |
| Th1 | T-helper cell 1 |
| Th2 | T-helper cell 2 |
| TNF- α | tumor necrosis factor α |
| UCB-MSC | MSC izolované z pupečnickové krve (umbilical cord blood-derived MSC) |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| VEGFR | vascular endothelial growth factor receptor 2 |

Poznámka: Zkratky jsou vysvětleny vždy podle svého původu, většinou v angličtině. Pouze v případě běžného užívání českého ekvivalentu je uveden český výraz. Zkratky proteinů jsou psány velkými písmeny, zkratky genů s velkým počátečním písmenem a kurzívou.

2 ÚVOD

Traumatické poranění míchy (SCI) patří mezi nejméně závažnější poranění, které má za následek trvalé poškození motorických i senzorických funkcí. To se odráží ve výrazném snížení kvality života pacienta, přičemž jeho životní a léčebné náklady prudce stoupají. V České republice je takto ročně postiženo asi 150 až 200 lidí a většinu z nich tvoří muži. Nejčastějšími příčinami jsou pády, dopravní nehody a úrazy při sportu (www.spinalcord.cz).

Pojmem SCI označujeme stav utvářený sérií procesů, které vznikají a rozvíjejí se jako důsledek mechanického působení na míchu v okamžiku poranění. Tyto patofyziologické procesy se navzájem ovlivňují a společně se podílejí na poškození nervové tkáně, které bývá obvykle nevratné. Prostředí centrální nervové soustavy (CNS) totiž není příznivé pro regeneraci nervových buněk a axonů a prozatím neexistuje žádný léčebný postup, který by tuto překážku úspěšně překonal. Proto je po celém světě vynakládáno velké úsilí na hledání nových léčebných možností, které by dokázaly zmírnit následky SCI a zlepšit tak nejen fyzický, ale i psychický stav pacientů. Mezi tyto možnosti patří například terapie pomocí kmenových buněk nebo aplikace nejrůznějších látek, jejichž cílem je podpořit regeneraci míšní tkáně.

Jednou ze zkoumaných látek je i kurkumin, přírodní barvivo získávané z rostliny *Curcuma longa*. Tato rostlina je již dlouhou dobu využívána v tradiční medicíně pro své léčivé schopnosti a současné vědecké studie prokázaly, že její aktivní substance kurkumin skutečně má protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Z tohoto důvodu je kurkumin testován jako léčivo na řadu nejrůznějších patologických stavů a traumat.

Tato práce se bude zabývat terapeutickým potenciálem kurkuminu v léčbě poranění míchy. Bude zkoumán vliv aplikace kurkuminu na probíhající patofyziologické procesy jako například zánět, formování gliové jizvy a úbytek šedé a bílé hmoty. Pozornost bude věnována i případné regeneraci nervových vláken a celkový efekt bude zhodnocen pomocí funkčních behaviorálních testů.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

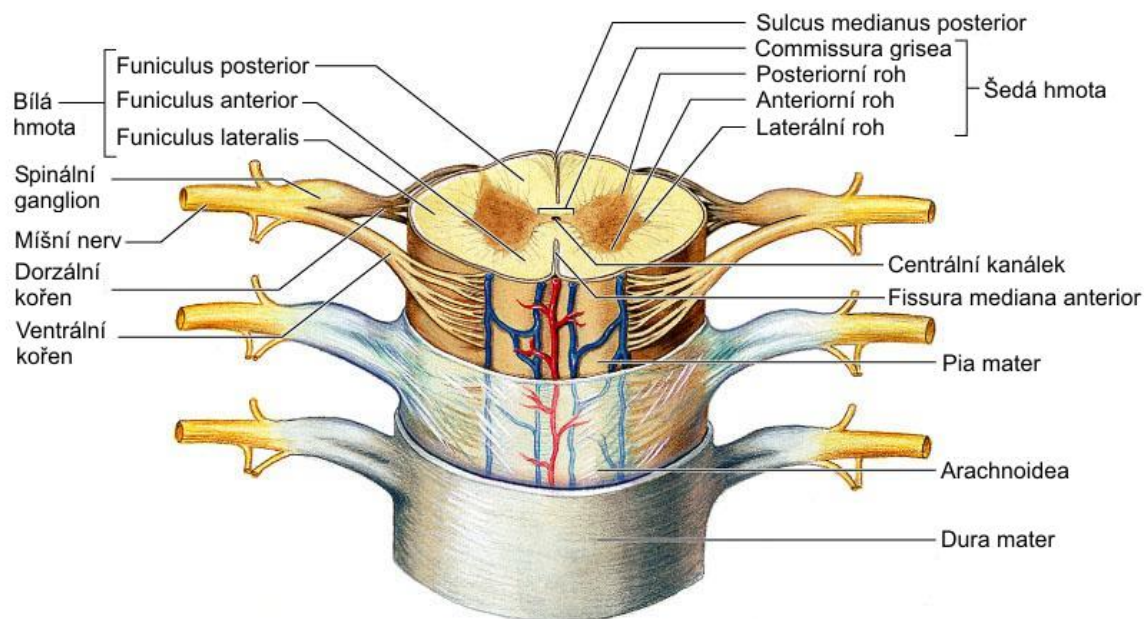
3.1 Anatomie míchy

Mícha (*medulla spinalis*) je sloupec nervové tkáně zajišťující komunikaci mezi periferními nervy a mozkem, ale také produkující jednoduché reflexní odpovědi. Je uložena v páteřním kanále. Začíná na úrovni C1 obratle jako přímé pokračování prodloužené míchy a její konec u obratle L2 se nazývá *conus medullaris*. Odtud pokračují volné svazky nervových vláken jako *cauda equina*. *Conus medullaris* je spojen s kostrčí pomocí vazivového *filum terminale*, který zajišťuje napětí a stabilizuje polohu míchy. Lidská mícha je dlouhá přibližně 40 až 45 cm a její průměr je asi 13 mm. V krční a bederní oblasti se nachází intumescence (ztluštění) jako důsledek inervace horních a dolních končetin.

Mícha je stejně jako mozek kryta vazivovými obaly (meningy). Na povrchu je nejsilnější *dura mater*, pod ní se nachází *arachnoidea* a těsně k povrchu míchy je přiložena *pia mater*. Mezi *arachnoideou* a *pia mater* je subarachnoideální prostor, který je vyplněn mozkomíšním mokem. Tento prostor přechází na úrovni *cauda equina* v lumbální cisternu.

Mícha je u člověka rozdělena na 31 míšních segmentů: 8 krčních, 12 hrudních, 5 bederních, 5 křížových a 1 kostrční. Z každého segmentu vychází skrz *foramina intervertebralia* 1 pár míšních nervů, které vznikají spojením ventrálních (motorických, eferentních) a dorzálních (senzorických, aferentních) kořenů míšních a které inervují specifickou oblast těla. Na dorzálních kořenech míšních se nachází spinální ganglia, která obsahují těla aferentních neuronů.

Samotná míšní tkáň je tvořena bílou a šedou hmotou, ale oproti mozku se zde bílá hmota nachází na povrchu. Šedá hmota má tvar písmene H, přičemž rozeznáváme anteriorní a posteriorní rohy, v hrudní části míchy ještě navíc laterální rohy. Jednotlivé oblasti šedé hmoty jsou členěny na Rexedovy zóny I až X. Uprostřed je centrální kanál vyplněný mozkomíšním mokem. Bílá hmota je díky rozložení šedé hmoty rozdělena na anteriorní, laterální a posteriorní *funiculi*. Obsahuje ascendentní a descendentní dráhy, tzv. trakty. Při vytváření zvířecích modelů SCI je třeba si uvědomit, že lokalizace těchto traktů je druhově specifická.



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Obrázek 1. Anatomie míchy (www.humananatomybody.info).

3.2 Patofyziologie poranění míchy

Poranění míchy je velice závažný stav, který je utvářen sérií navzájem se ovlivňujících patofyziologických dějů. Tyto děje ve značné míře poškozují míšní tkáň a způsobují tak zásadní změny v přenosu signálu nervovými drahami. V důsledku toho dochází k poruchám motorického a sensorického systému, jejichž rozsah se odvíjí od velikosti a také lokalizace poranění. Na základě klinického vyšetření pacienta se rozlišují následující stavy:

- Paraplegie – k lézi dochází v hrudních, bederních nebo křížových segmentech míchy. Podle výšky poranění jsou v různé míře postiženy dolní končetiny, trup, orgány břicha a pánve.
- Tetraplegie (kvadruplegie) – léze se nachází v krčních segmentech míchy. Porušena je funkce všech končetin, trupu, orgánů břicha a pánve.
- Pentaplegie – vzniká při poranění míchy nad cervikální intumescencí, tedy nad úrovní obratle C4. Kromě postižení všech končetin, trupu a orgánů břicha a pánve dochází také k poškození funkce bránice, což má za následek problémy s dýcháním. Pacienti jsou závislí na ventilační podpoře.

Dle chronologické návaznosti patofyziologických procesů rozlišujeme primární a sekundární poranění.

3.2.1 Primární poranění

Primární poranění zahrnuje procesy, které jsou přímým důsledkem mechanického působení na míchu v okamžiku zranění. Mezi tyto procesy patří porušení buněčných membrán a následná nekróza neuronů i glií, přičemž z nekrotických buněk se do okolní tkáně uvolňuje řada toxických látek. Nervová vlákna jsou přerušena, což vede k lokálnímu bloku ve vedení signálu a jejich degeneraci. Dále dochází k poškození krevních cév zásobujících míchu, hemoragii a otoku. Otékající mícha zcela vyplňuje prostor páteřního kanálu, a jakmile tlak vyvíjený na míchu přesáhne tlak v cévách, nastává ischemie (Becker et al. 2003). Na tyto procesy dále navazuje sekundární poranění.

3.2.2 Sekundární poranění

Sekundární poranění je výsledkem procesů, které spouští organismus jako odpověď na prodělané trauma. Tyto procesy mají za úkol napravit poškození tkáně a jsou tedy ve své

podstatě reparativní. Prostředí CNS je však velmi specifické, a tak tyto procesy nabývají spíše destruktivního charakteru. Nejenže často poškozují míchu ve větší míře než samotné primární poranění, ale také přímo brání regeneraci nervové tkáně. Proto je právě na ně cílena hlavní oblast výzkumu terapie SCI. Sekundární procesy můžeme řadit až do 22 kategorií (Oyinbo 2011), přičemž mezi ty nejdůležitější patří zánět, excitotoxicita, poškození reaktivními sloučeninami kyslíku, apoptóza a nekróza, demyelinizace a formování gliové jizvy.

3.2.2.1 Zánět

Zánět je jeden z nejvýznamnějších faktorů, který určuje směr dalšího vývoje sekundárního poranění míchy. V místě léze nastává regionální degenerace poškozených axonů, což je doprovázeno aktivací přiléhající rezidentní mikroglie (Popovich et al. 1997). Během několika málo hodin dochází také k infiltraci neutrofilů do místa léze, později je následuje druhá vlna makrofágů, což přispívá k plnému rozvoji zánětu (Carlson et al. 1998). Z časového hlediska dosahují neutrofilů vrcholu okolo 24 hodin po SCI a po 7 dnech je jejich množství v lézi již zanedbatelné, zatímco počet makrofágů vrcholí až 14 dní po SCI a ještě po 28 dnech od SCI je lze na daném místě detekovat (Vaughn et al. 2013).

Ačkoliv jsou fagocytické buňky důležité pro odstraňování nekrotické tkáně a myelinového debris, což je pro regeneraci tkáně nezbytné, jejich úloha v poranění CNS je značně kontroverzní. Horn se svým týmem prokázal, že aktivované makrofágy asociovaly s konci dystrofických axonů a způsobovaly jejich retrakci. Došlo tak ke zvětšení vzdálenosti, kterou by bylo při regeneraci potřeba překonat. Stejně vlastnosti pozorovali také u mikroglie (Horn et al. 2008). Při omezení infiltrace neutrofilů do místa léze pomocí inhibice P-selektinu byly u zvířat po SCI naměřeny lepší lokomoční funkce a menší krvácení oproti kontrolní skupině (Taoka et al. 1997). Na druhou stranu dle jiných studií mají fagocytické buňky na regeneraci axonů pozitivní vliv (Franzen et al. 1998; Stirling et al. 2009). Dvojitá role při rozvoji míšního poranění byla popsána u makrofágů. V současné době se rozlišují dvě populace makrofágů označované jako M1 a M2. M1 makrofágy produkují po aktivaci značné množství prozánětlivých cytokinů a reaktivních sloučenin kyslíku a uplatňují se zejména v časných fázích odpovědi na trauma, kdy podporují rozvoj zánětu. Naproti tomu M2 makrofágy vykazují produkci spíše protizánětlivých cytokinů a napomáhají tak regeneraci tkáně v pozdějších fázích vývoje poranění (Ansari 2015; Gensel et al. 2015; Vasconcelos et al. 2015). Cílem novodobých regeneračních studií je tedy spíše podporovat polarizaci

makrofágů směrem k M2 formě, než se snažit zabránit jejich vniku do místa léze (Horn et al. 2008).

Kromě výše zmíněných buněčných typů lze po SCI v místě poranění detekovat také T-lymfocyty a dendritické buňky (Vaughn et al. 2013). Působení T-lymfocytů na rozvoj poranění opět není zcela jednoznačné. Dle Gonzaleze a jeho kolegů podporují úbytek tkáně a způsobují lokomoční deficit (Gonzalez et al. 2003), zatímco podle týmu Wolfové jejich úloha závisí spíše na subtypu a aktivačním stadiu, přičemž Th2 (T-helper cell 2) buňky mají větší potenciál v ochraně neuronů před sekundární smrtí než Th1 (T-helper cell 1) buňky (Wolf et al. 2002).

Ihned po SCI v místě poranění prudce stoupají hladiny mRNA (mediátorové RNA) prozánětlivých cytokinů IL-1 β (interleukin 1 β), IL-6 (interleukin 6) a TNF- α (tumor necrosis factor α) s vrcholem během několika málo hodin, poté opět v rámci 24 až 48 hodin po zranění klesají na téměř bazální úroveň (Streit et al. 1998; Nakamura et al. 2003). U IL-1 β a TNF- α dochází k vzestupu dokonce rychleji, než do léze vniknou imunitní buňky z krve, takže tyto cytokiny jsou dle Streita a jeho kolegů z počátku produktem buněk již přítomných v míše, pravděpodobně mikroglie (Streit et al. 1998). Naproti tomu hladina mRNA protizánětlivého TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) stoupá mnohem pomaleji a vrcholu dosahuje až během čtvrtého dne po SCI (Nakamura et al. 2003).

Adachi a jeho kolegové zjistili, že po 30 minutách od SCI začíná exprese genu pro cyklooxygenázu 2 (COX-2). COX-2 je inducibilní forma enzymu, který katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandiny a tromboxany, což jsou další důležité mediátory zánětlivé odpovědi. Nejvyšší hladina mRNA pro COX-2 byla naměřena již po 3 hodinách a na svou bazální úroveň se vrátila po 1 týdnu od SCI. Zajímavé je, že buňky exprimující COX-2 byly pozorovány pouze podél *pia mater* a cév, nikoliv přímo v míšním parenchymu. Zdá se tedy, že tento enzym produkují pouze buňky endotelu; v neuronech a gliích k jeho produkci po SCI zřejmě nedochází (Adachi et al. 2005).

Při popisu zánětlivého procesu také nelze opomenout transkripční faktor NF- κ B (nukleární faktor κ B), který je jedním z hlavních regulátorů exprese genů podílejících se na zánětlivé odpovědi. Působením NF- κ B dochází ke zvýšení produkce adhezního proteinu ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), stejně jako proapoptotického BAX (BCL-2-associated X protein) a kaspázy 3. NF- κ B tedy přímo přispívá k infiltraci zánětlivých buněk do léze a apoptóze (Han et al. 2012). Jeho aktivace také vede k produkci

prozánětlivých cytokinů jako IL-1 β a TNF- α (Shakhov et al. 1990; Hiscott et al. 1993). V místě léze byl tento transkripční faktor přítomen již 30 minut po SCI, nejvyšší hladiny pak dosahoval po 24 hodinách od SCI, kdy jej bylo možné detekovat i v širším okolí od samotného epicentra (Bethea et al. 1998).

3.2.2.2 Glutamátová excitotoxicita

Následkem primárního poranění se z poškozených neuronů a glií uvolňuje do extracelulárního prostoru glutamát. Tento excitační neurotransmitter se v daném místě akumuluje a jeho množství se brzy stává pro přítomné buňky toxickým (Liu et al. 1999). Zvýšené množství glutamátu způsobuje masivní vtok vápenatých iontů do buněk, ke kterému dochází jednak přímo skrz ionotropní glutamátové receptory, ale také nepřímo díky přetrvávající depolarizaci a otevírání napěťově závislých vápníkových kanálů (Azbill et al. 1997). Bylo zjištěno, že na excitotoxickém efektu se podílejí jak NMDA (N-methyl-D-aspartát), tak non-NMDA receptory (Liu et al. 1997).

Příliš vysoká intracelulární koncentrace vápníku má za následek poškození mitochondrií a jejich funkcí. Dochází k selhání elektronového transportního systému, což vede k formaci reaktivních sloučenin kyslíku (Azbill et al. 1997). Mitochondrie ztrácí svůj membránový potenciál a její schopnost puřovat intracelulární koncentraci Ca²⁺ se snižuje až o 60 %. Do cytoplazmy se uvolňuje cytochrom c, zároveň se zvyšuje poměr BAX/BCL-2 (B-cell lymphoma 2) a aktivují se kaspázy 3 a 9 (Zhang et al. 2014). Všechny tyto mechanismy nakonec vedou k apoptóze buňky.

3.2.2.3 Reaktivní sloučeniny kyslíku

Dalším faktorem, který hraje důležitou roli v sekundárním poranění míchy, je vznik reaktivních sloučenin kyslíku (ROS). K tomu může dojít jednak výše zmíněným excitotoxickým mechanismem, dále při ischemii, která je součástí sekundárního poškození po SCI, ale přispět může také mikroglie produkující oxid dusnatý (NO).

Nebezpečí ROS tkví především v jejich vysoké reaktivitě. Tyto látky oxidují proteiny i nukleové kyseliny a jsou příčinou peroxidace lipidů (Xu et al. 2005). Produktem lipidové peroxidace polynenasycených mastných kyselin, které jsou přítomny zejména v membránách, je mimo jiné malondialdehyd, který poškozuje některé důležité metabolické enzymy (Azbill et al. 1997). Jedním z takových enzymů je dle Jamme a jeho kolegů například i

Na⁺/K⁺ ATPáza (sodnodraselná pumpa), jejíž aktivita je nepřímo uměrná míře lipidové peroxidace. Dalším důsledkem peroxidace lipidů je také narušení integrity membrány, která může vést až k lýze a smrti buňky (Jamme et al. 1995).

Produkce ROS přispívá zřejmě z velké části také k apoptóze buněk. U transgenních myší, které produkovaly zvýšené množství enzymu superoxid-dismutázy 1 (SOD-1), bylo pozorováno mnohem méně buněk podléhajících apoptóze (Xu et al. 2005). SOD-1 je enzym, který se podílí na odstraňování oxidačního stresu, stejně jako například kataláza nebo glutathion-peroxidáza. Hladiny všech těchto enzymů se po SCI přirozeně zvyšují, což jen potvrzuje vznik ROS (Vaziri et al. 2004).

3.2.2.4 Apoptóza a nekróza

Po primárním mechanickém poranění, ale také v důsledku výše uvedených sekundárních faktorů, dochází po SCI k masivní ztrátě buněk jak z důvodu apoptózy, tak nekrózy. Míra příspěvku těchto dvou rozdílných mechanismů není dosud zcela jasná. Dle Grossmanova týmu podléhají apoptóze pouze glii (Grossman et al. 2001), zatímco Liu a jeho kolegové pozorovali apoptózu u glií i neuronů (Liu et al. 1997). K nekróze dochází u obou typů buněk.

Již po 15 minutách byl Grossmanem a jeho kolegy v místě poranění pozorován patrný úbytek neuronů, což vedlo k porušení integrity šedé hmoty. Její destrukce následně pokračovala radiálním i longitudinálním směrem a docházelo také k poškození přilehlé bílé hmoty. Největší pokles neuronů byl zaznamenán mezi 4 až 8 hodinami po SCI. Ztráta oligodendrocytů byla z časového hlediska stejná jako u neuronů, zatímco u poněkud odolnějších astrocytů byla pozorována nejdříve po 4 hodinách od SCI a následně již k jejich dalšímu úbytku nedocházelo. Po 24 hodinách byla v epicentru vytvořena velká kavita obklopená tenkým okrajem z neporušené bílé hmoty (Grossman et al. 2001).

Po několika dnech se objevuje ještě sekundární apoptóza některých oligodendrocytů. Tento proces zřejmě souvisí s degenerací přerušovaných axonů, které za normálních okolností produkují trofické signály zajišťující přežití těchto glií (Liu et al. 1997).

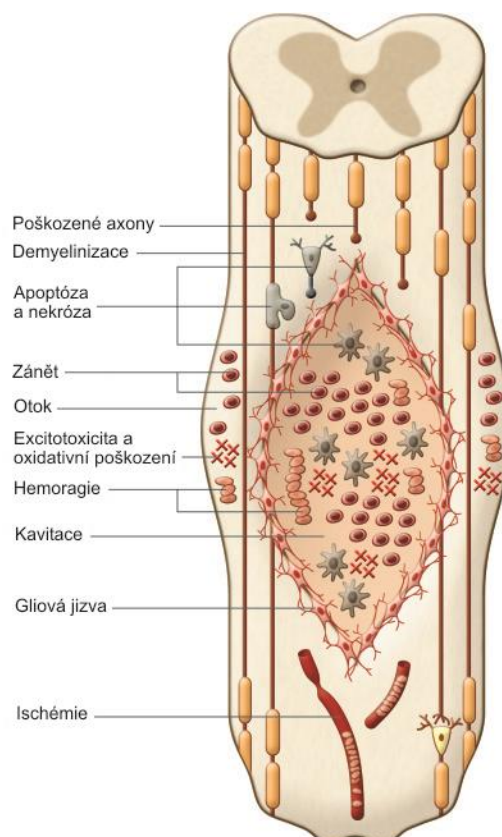
3.2.2.5 Demyelinizace

Neméně důležitou součástí sekundární fáze míšního poranění je také progresivní demyelinizace, ke které dochází jak z důvodu mechanické disrupce myelinu, tak kvůli úbytku oligodendrocytů. Největší počet demyelinizovaných axonů byl pozorován 24 hodin po

poranění, přičemž většina těchto holých axonů byla buď již mrtvá nebo ve stadiu degenerace (Totoiu et al. 2005). Asi po 14 dnech pak dochází k opětovné remyelinizaci díky produkci nových oligodendrocytů, jejichž hlavním zdrojem jsou progenitorové buňky v míše. Tato produkce pokračuje nejméně tři měsíce, ale tloušťka myelinového obalu již nikdy nedosahuje původních rozměrů (Totoiu et al. 2005; Hesp et al. 2015).

3.2.2.6 Gliová jizva

V důsledku masivního úbytku neuronů a gliových buněk po SCI, stejně tak jako po odstranění zbytků poškozené tkáně fagocytickými buňkami, dochází v míše k formování kavit, které jsou ohraničeny denzní gliovou jizvou. Tento proces je dobře viditelný již po 1 týdnu od SCI (Chung et al. 2014). Jizva je tvořena hypertrofickými astrocyty, které se sdružují do překrývajících se svazků (Wanner et al. 2013) a působí tak jako fyzická, ale také chemická bariéra pro regeneraci axonů (Klapka et al. 2005). Produkují totiž zvýšené množství chondroitin-sulfátových proteoglykanů, jako třeba *neurocanu* či *phosphacanu*, které jsou účinnými inhibitory axonálního růstu (Chung et al. 2014). Dle Wannera a jeho kolegů má ale gliová jizva na rozvoj poranění také pozitivní efekt, protože zabraňuje šíření zánětlivých buněk, a tak předchází dalšímu poškození tkáně (Wanner et al. 2013).



Obrázek 2. Patofyziologické procesy probíhající v poraněné míše (Mothe et al. 2012).

3.3 Možnosti terapie poranění míchy

3.3.1 Současný stav

V současné době neexistuje žádná spolehlivá léčba, která by nějak výrazně zlepšovala stav pacientů po SCI. Běžná praxe spočívá obvykle ve stabilizaci a dekompresi míchy, někdy v kombinaci s vysokými dávkami methylprednisolonu, následované dlouhodobou rehabilitací.

Právě dekompresi míchy, utlačované například úlomky obratlů, a podávání methylprednisolonu jsou však poněkud kontroverzní témata. Na zvířecím modelu poranění míchy s následnou kompresí bylo prokázáno, že čím větší bylo zúžení páteřního kanálu a čím déle toto zúžení trvalo, tím horší bylo poškození míšní tkáně (Dimar et al. 1999). Pacientům po SCI, u kterých byla provedena dekompresi míchy do 24 hodin po zranění, tento zásah zlepšil motorické funkce a zkrátil také pobyt v nemocnici (Dvorak et al. 2015). U některých typů dekompresních operací ale byla pozorována až o 20 % větší míra komplikací, jako například pneumonie, respirační obtíže a dekubity (Wilmot et al. 1986).

Methylprednisolon (MP) je kortikosteroid a v současnosti také jediné běžně podávané léčivo u pacientů po SCI. Dle některých výzkumů podporuje regeneraci axonů (Chen et al. 1996), snižuje expresi TNF- α a omezuje aktivitu NF- κ B, čímž působí proti rozvoji zánětu (Xu et al. 1998). Na základě slibných výsledků u zvířecích modelů byly v USA provedeny tři rozsáhlé klinické studie s názvem Národní studie akutního míšního poranění (NASCIS) – NASCIS I (Bracken et al. 1984), NASCIS II (Bracken et al. 1990) a NASCIS III (Bracken et al. 1997). Jejich výsledkem bylo potvrzení pozitivních účinků MP i u lidí a doporučení jeho podávání jako běžného léčebného postupu po SCI. Tyto studie se však zároveň staly terčem velké kritiky. Hurlbert, který provedl revizi NASCIS II a III, výrazně nedoporučuje indikaci MP pacientům s míšním poraněním. Odvolává se jednak na nesprávné metodologické a statistické postupy obou studií, ale hlavně na množství vedlejších účinků MP, jako například zvýšená míra výskytu infekcí ran, embolie, pneumonie, sepse a dokonce mnohem větší riziko úmrtí v důsledku respiračních obtíží (Hurlbert 2000). Žádné konečné stanovisko ohledně podávání MP však dosud není k dispozici.

3.3.2 Nové strategie

V souvislosti s poraněním míchy je známo, že k samovolné regeneraci axonů příliš nedochází a obnova motorických a senzorických funkcí je pozorována jen minimálně. Proto

je soustředěna velká pozornost na zkoumání různých přístupů, kterými by bylo možné vytvořit prostředí vhodné pro regeneraci nervové tkáně. Těmi nejčastějšími jsou využití kmenových i nekmenových buněk, molekulární terapie a tkáňové inženýrství.

3.3.2.1 Buněčná terapie

Aplikace různých typů buněk je využívána zejména ze dvou důvodů – aby byla nahrazena ztracená tkáň a také aby došlo ke zvýšení přežívání neuronů díky produkci trofických faktorů. V terapii SCI jsou testovány tyto buněčné typy:

- Mezenchymální kmenové buňky (MSC)

S použitím těchto buněk se můžeme setkat asi nejčastěji. Jejich zdrojem je běžně kostní dřev (BM-MSC), tuková tkáň (AT-MSC) a pupečnicková krev (UCB-MSC). Z těchto typů mají největší proliferační schopnost UCB-MSC, které exprimují nejméně senescenčních proteinů p53 a p21 a zároveň působí proti tvorbě prozánětlivých cytokinů (Jin et al. 2013). Výhodou BM-MSC (případně také AT-MSC) je zase možnost použití autologních preparátů, které u pacientů po SCI vedly ke zlepšení neurologických funkcí (Yoon et al. 2007).

- Neurální kmenové buňky (NSC)

In vitro byla pozorována diferenciací NSC v neurony, astrocyty a oligodendrocyty, po transplantaci do míchy však tvořily pouze buňky gliové linie (Shihabuddin et al. 2000). S tím nesouhlasí Hong a jeho kolegové, kteří pozorovali diferenciací NSC po transplantaci do poraněné míchy ve všechny tři typy buněk (Hong et al. 2014). NSC také podporují růst motorických i senzorických axonů a produkují trofické faktory NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) a GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (Lu et al. 2003). U zvířecího modelu SCI měly NSC pozitivní vliv na znovuzískání lokomočních funkcí (Hong et al. 2014).

- Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

Pluripotence je vlastnost, která umožňuje kmenovým buňkám diferencovat v tkáň všech tří zárodečných listů. Běžně mají tuto vlastnost pouze embryonální kmenové buňky. Takahashi a Yamanaka ale dokázali vytvořit pluripotentní buňky z myších fibroblastů a nazvali je indukované pluripotentní kmenové buňky. Potenciální nebezpečí těchto buněk ale tkví v jejich schopnosti formovat teratomy (Takahashi et al. 2006). Nori a jeho kolegové využili iPSC k transplantaci do imunodeficientních myší po SCI a zjistili, že tyto buňky

přežily a diferenciovaly v neurony, astrocyty i oligodendrocyty. Navíc také podporovaly angiogenezi a růst axonů. Myši, které byly takto léčené, vykazovaly lepší funkční zotavování než kontrolní zvířata. Důležitým zjištěním bylo také to, že nedocházelo k formování tumorů (Nori et al. 2011). Přesto je potřeba provést další studie, které by potvrdily bezpečnost použití iPSC.

- Embryonální kmenové buňky (ESC)

Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní buňky, které se získávají z embryoblastu zárodku ve stadiu blastocysty. Před použitím se obvykle diferencují na požadovaný buněčný typ, například na NSC. Takto získané NSC transplantované myším po SCI měly pozitivní efekt na lokomoční funkce a zachování nervové tkáně (Salewski et al. 2015). U ESC ovšem stejně jako u iPSC hrozí nebezpečí formování teratomů (Stachelscheid et al. 2013). Použití lidských ESC je navíc z etického hlediska značně kontroverzní téma.

- Nekmenové buňky

Kromě výše zmíněných buněčných typů se zkoumají také další, jejichž potenciál by bylo možné využít k léčbě poranění míchy. Jsou to například Schwannovy buňky (Marcol et al. 2015; Sparling et al. 2015), buňky olfaktorické glie (Rao et al. 2014) nebo M2 makrofágy (Ma et al. 2015).

3.3.2.2 Molekulární terapie

Na základě nových poznatků o molekulární podstatě patofyziologických procesů probíhajících po SCI jsou v léčbě poranění míchy testovány také nejrůznější látky, které by mohly tyto procesy ovlivňovat a napomáhat regeneraci míšní tkáně. Dle mechanismu, kterým k tomu dochází, lze tyto látky rozdělit do tří kategorií:

- Látky chránící poškozenou tkáň

Do této kategorie spadají látky, které potlačují patofyziologické procesy probíhající po SCI, jako například zánět či apoptóza. Jednou z testovaných látek je například protizánětlivý cytokin IL-10 (interleukin 10). Jeho podávání zlepšovalo motorické funkce a přežívání neuronů u zvířat po SCI, současně bylo pozorováno také menší množství apoptotických buněk (Zhou et al. 2009). V jiné studii zase IL-10 snižoval hladinu TNF- α a zmenšoval neuropatickou bolest indukovanou SCI (Lau et al. 2012). Další zkoumanou látkou je antibiotikum minocyklin. Jeho působení po SCI zahrnovalo zvýšené přežívání axonů a menší

míru kavitace (Wells et al. 2003), také snížení mikroglie a funkční zlepšení (Festoff et al. 2006). Lee a jeho kolegové však tyto efekty nedokázali potvrdit (Lee et al. 2010). Kromě výše zmíněných látek jsou pro své potenciální účinky na SCI testovány také například erythropoietin (Gorio et al. 2002) a atorvastatin (Pannu et al. 2005).

- **Látky pomáhající překonat inhibiční prostředí**

Po poranění míchy je vzniklé prostředí nevhodné pro regeneraci z důvodu přítomnosti různých inhibičních faktorů. Snaha zabránit působení těchto inhibičních faktorů je tedy logickým krokem v terapii SCI. Jedním z inhibičních faktorů axonálního růstu jsou i výše zmíněné chondroitin-sulfátové proteoglykany, produkované ve zvýšené míře hypertrofickými astrocyty (Chung et al. 2014). Podávání chondroitinázy ABC, což je enzym štěpící tyto látky, skutečně zlepšovalo regeneraci a funkční zotavování (Bradbury et al. 2002), ačkoliv dle jiné studie se její pozitivní účinky projeví až v kombinaci s buněčným transplantátem (Kim et al. 2006). Dále je v procesu testování také protilátka proti NOGO-A (neurite outgrowth inhibitor A), který je po poranění hojně přítomen v myelinovém debris (Maier et al. 2009).

- **Látky podporující regeneraci axonů**

Pro podporu regenerace axonů je možné využít neurotrofické faktory. Ty lze dodávat do místa poranění buď přímo (Bradbury et al. 1999), nebo pomocí geneticky modifikovaných buněk produkujících daný faktor ve zvýšeném množství (Liu et al. 1999). Takto byly testovány například NGF (Tuszynski et al. 1996), BDNF (Liu et al. 1999) a NT-3 (neurotrofin 3) (Bradbury et al. 1999). Všechny prokázaly pozitivní efekt na axonální růst. VEGF (vascular endothelial growth factor) a PDGF (platelet derived growth factor) zase redukovaly aktivaci makrofágů a mikroglie, omezovaly kavitaci a zlepšovaly motorické funkce (Chehrehasa et al. 2014).

3.3.2.3 Tkáňové inženýrství

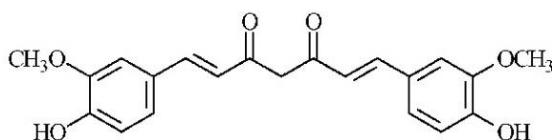
Základem tkáňového inženýrství je výběr materiálu, který je biokompatibilní a má vhodnou strukturu. Tento biomateriál poté slouží jako substrát pro adhezi buněk a funguje tak jako mechanická podpora regenerace. Někdy bývá dopředu osazen různými typy buněk či látek, které napomáhají nervové tkáni ve správném růstu.

V terapii SCI jsou testovány biomateriály přírodní i uměle připravené. Uměle se připravují například některé hydrogely, což jsou polymery silně vážící vodu jako třeba

poly(2-hydroxyethylmethakrylát) (Růžička et al. 2013). Z přírodních biomateriálů byl testován například Matrigel, tedy produkt buněk Engelbreth-Holm-Swarmova sarkomu (Williams et al. 2015), nebo také kolagenová nanovlákna (Liu et al. 2012). Pro usnadnění a orientaci růstu axonů se používají materiály s longitudinálními naváděcími kanálky (Saglam et al. 2013). Obecně všechny tyto biomateriály vykazují vlastnosti vhodné pro podporu regenerace axonů, jsou biokompatibilní a některé působí i proti tvorbě gliové jizvy. Nevýhodou při jejich testování je ale způsob provedení SCI u modelových zvířat. Nejčastěji je totiž prováděna transekce či hemisekce míchy, tedy úplné nebo částečné přerušení nervové tkáně, aby vznikl prostor, do kterého je možné biomateriál implantovat. Tento model ovšem méně odpovídá skutečným podmínkám při poranění míchy. Najdou se ovšem i studie využívající jiný typ experimentálního SCI, jako například balónkový kompresní model (Woerly et al. 2001).

3.4 Kurkumin a jeho využití

Kurkumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion] je přírodní látka lipofilního charakteru výrazně žlutooranžové barvy. Tvoří hlavní aktivní složku kurkumy (také kurkumovník dlouhý, *Curcuma longa*, anglicky turmeric), což je vytrvalá rostlina z čeledi zázvorníkovitých (*Zingiberaceae*) přirozeně se vyskytující v oblasti jihovýchodní Asie. Mletý oddenek této rostliny se používá jako koření a z důvodu své charakteristické barvy také jako potravinářské a textilní barvivo. Velmi dlouho jsou pak známy jeho léčivé schopnosti, díky kterým je již po staletí součástí tradiční čínské a indické medicíny (Shishodia et al. 2005).



Obrázek 3. Chemická struktura kurkuminu (Hong et al. 2004).

V současné době je léčebný a preventivní potenciál kurkuminu intenzivně vědecky zkoumán. Zde jsou shrnuty jeho hlavní pozitivní efekty a možnosti využití:

- Protizánětlivý efekt

Bylo prokázáno, že podávání kurkuminu účinně snižovalo aktivitu NF- κ B (Jin et al. 2014; Yu et al. 2014). Jak bylo zmíněno výše, tento transkripční faktor je jedním z nejdůležitějších mediátorů zánětlivé odpovědi, který podporuje infiltraci imunitních buněk do daného místa (Han et al. 2012) a produkci prozánětlivých cytokinů (Shakhov et al. 1990; Hiscott et al. 1993). To ostatně potvrzuje také pozorování, že zvířata s poraněním míchy, kterým byl podáván kurkumin, měla nižší hladiny prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β a IL-6 než kontrolní zvířata, kterým kurkumin podáván nebyl (Jin et al. 2014). Mechanismus, jakým kurkumin inhibuje aktivitu NF- κ B, spočívá dle Jobina a jeho kolegů ve snižování aktivity I κ B kinázy (IKK) a inhibici fosforylace I κ B (inhibitor κ B) (Jobin et al. 1999). Nefosforylovaný I κ B tak zůstává vázán na NF- κ B, čímž zabraňuje jeho translokaci do jádra.

Hong a jeho kolegové také dokázali, že kurkumin ovlivňuje metabolismus kyseliny arachidonové. Podle jejich studie kurkumin brání aktivaci fosfolipázy A2, která odštěpuje kyselinu arachidonovou z membránových fosfolipidů, také snižuje expresi cyklooxygenázy 2 a inhibuje katalytickou aktivitu 5-lipooxygenázy (Hong et al. 2004). Tím vším kurkumin

zamezuje vzniku prostaglandinů, tromboxanů a leukotrienů, což jsou důležité prozánětlivé faktory.

Dle Krausze a jeho kolegů má kurkumin také antimikrobiální a hojivé účinky. Pozorovali totiž, že přítomnost kurkuminu inhibovala růst *Staphylococcus aureus* a zlepšovala hojení u myšího modelu povrchové rány (Krausz et al. 2015).

- Antioxidační efekt

Kurkumin se také podílí na ochraně před oxidativním poškozením a jeho antioxidační aktivita je dokonce mnohem vyšší než u vitamínu E (Khopde et al. 1999). Podávání kurkuminu například zvyšuje aktivitu NRF-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Jin et al. 2014), což je významný transkripční faktor indukující expresi antioxidačních enzymů obsahujících ve své genové sekvenci ARE (antioxidant response element) (Venugopal et al. 1998).

El-Bahr také zjistil, že při působení oxidativního stresu kurkumin zvyšuje hladiny superoxid-dismutázy, katalázy a glutathion-peroxidázy, čímž podporuje zneškodňování ROS (El-Bahr 2015). To potvrzuje také Kim a jeho kolegové, kteří kurkumin podávali zvířatům s poraněním míchy a zkoumali aktivitu SOD. Navíc u těchto zvířat naměřili také nižší hladinu malondialdehydu, než je po poranění míchy běžné, což je ukazatelem menší míry peroxidace lipidů způsobené ROS (Kim et al. 2014).

Bylo také prokázáno, že kurkumin snižuje expresi iNOS, což je inducibilní forma syntázy oxidu dusnatého (Onoda et al. 2000). Tím omezuje tvorbu tohoto oxidu s radikálovou povahou. K tomu dochází pravděpodobně díky schopnosti kurkuminu snižovat aktivitu NF- κ B, který může expresi iNOS indukovat (Hatano et al. 2001).

- Antikancerogenní efekt

Pozoruhodné jsou také účinky kurkuminu na buňky nádorů. Jiang a jeho kolegové, kteří aplikovali kurkumin na buňky melanomu, pozorovali u těchto buněk zvýšenou míru apoptózy. Zároveň naměřili nižší hladinu antiapoptotického proteinu BCL-2 a zvýšenou expresi tumor-supresorového proteinu p53, z čehož usoudil na proapoptotické a antiproliferační účinky kurkuminu na nádorové buňky (Jiang et al. 2015). U buněk glioblastomu bylo dle Zanutto-Filho a jeho kolegů jeho působení obdobné – byly pozorovány mitochondriální dysfunkce, zastavení buněčného cyklu a apoptóza. Zajímavé je, že takto

kurkumin účinkoval pouze na transformované glioblastomové buňky, nikoliv na zdravé astrocyty (Zanotto-Filho et al. 2012).

Růst nádoru vyžaduje angiogenezi, aby byl zabezpečen dostatečný přísun živin pro rychle se tvořící novou tkáň. Angiogeneze je stimulována VEGF, který produkují nádorové buňky. Kurkumin produkci VEGF snižuje, navíc inhibuje aktivaci receptoru VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) a blokuje VEGFR-2 signální dráhy (Fu et al. 2015).

Do antikancerogenních vlastností kurkuminu můžeme také zařadit jeho antioxidační potenciál, který je podrobněji popsán výše.

- Kardioprotektivní účinky

Kurkumin díky svým antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem působí také kardioprotektivně. U zvířat na vysokotukové stravě potlačoval dle Zenga a jeho kolegů produkci NF- κ B a prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , a IL-6, zároveň také zvyšoval hladinu NRF-2. Z morfologického hlediska potlačoval hypertrofii kardiomyocytů a vznik srdeční fibrózy (Zeng et al. 2015). Na zvířecím modelu chronického selhání ledvin, u kterého je velké riziko kardiovaskulárních komplikací, působil kurkumin taktéž kardioprotektivně (Correa et al. 2013). Kurkumin byl také podáván pacientům po koronárním bypassu, u kterých snížil výskyt následného akutního infarktu myokardu na 13,1 % oproti 30 % u pacientů z kontrolní skupiny (Wongcharoen et al. 2012).

- Další možnosti využití

Kromě výše zmíněných možností využití kurkuminu jsou jeho účinky zkoumány také u řady nejrůznějších chorob. Jedná se například o psoriázu (Kang et al. 2016), diabetes typu I (Castro et al. 2014) a typu II (Neerati et al. 2014), roztroušenou sklerózu (Mohajeri et al. 2015), astma (Liu et al. 2015), Alzheimerovu chorobu (Lazar et al. 2013) a mnoho dalších. Nejčastěji se při tom uplatňují protizánětlivé a antioxidační vlastnosti kurkuminu, které dokáží zastavit nebo alespoň omezit patofyziologické procesy doprovázející tyto choroby.

4 CÍLE PRÁCE

1. Sledování vlivu kurkuminu na patofyziologické procesy probíhající v poraněné míše pomocí histologických a imunohistochemických metod.
2. Sledování vlivu kurkuminu na expresi vybraných genů souvisejících s imunitními a regenerativními procesy po poranění míchy.
3. Zhodnocení celkového efektu kurkuminu na vývoj míšního poranění pomocí behaviorálního testování.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Experimentální zvířata

Pro tento výzkum byli použiti samci potkanů kmene Wistar ve věku 10 týdnů, kteří byli získáni z chovného zařízení Fyziologického ústavu Akademie věd ČR v Praze. Jejich tělesná hmotnost se v době zahájení experimentu pohybovala v rozmezí 300 ± 15 g, aby byly minimalizovány rozdíly ve velikosti těla a došlo tak k vytvoření standardizované mišňní léze. Potkani byli chováni v klecích po dvou v chovech se stálou teplotou mezi 22 až 24 °C s režimem 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Přístup k potravě a vodě byl *ad libitum*. Počet jedinců v jednotlivých skupinách byl stanoven předem na základě statistické analýzy s cílem redukovat ho na minimum.

Po vytvoření SCI byli potkani náhodně rozděleni do dvou skupin. První skupině byl po dobu 28 dní aplikován kurkumin, kontrolní druhé skupině pouze vehikulum (olivový olej). 12 jedinců léčených kurkuminem a 6 kontrolních prošlo behaviorálním testováním po dobu 9 týdnů, poté byli usmrceni, perfundováni a jejich tkáň byla použita pro histologickou a imunohistochemickou analýzu. Pro detekci NF- κ B bylo použito celkem 43 jedinců, z nichž 16 bylo zároveň využito na měření exprese genů metodou qPCR po 10 a 28 dnech od provedení SCI.

Všechny experimenty byly vykonány v souladu se Směrnicí Evropského parlamentu a Rady z 22. září 2010 (2010/63/EU) o použití zvířat ve výzkumu a byly schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR v Praze.

5.2 Poranění míchy a aplikace kurkuminu

Experimentální poranění míchy bylo provedeno metodou balónkové kompresní léze. Při všech operačních zákrocích byla zvířata v hluboké anestézii vyvolané inhalováním isofluranu (Forane, Aesica Queenborough Limited, Queenborough, Kent, VB; 3,5vol%). Potkani byli umístěni do stereotaktického aparátu, místo zákroku bylo dezinfikováno a poté z něj byla odstraněna srst. V oblasti hrudní a bederní páteře byla nastřížena kůže a provedena laminektomie obratlového oblouku T10. Do epidurálního prostoru byl vsunut Fogartyho katetr (2 French) asi 1 cm kraniálním směrem, aby se jeho střed dostal na úroveň obratle T8. Balónek umístěný na konci katetru byl poté naplněn 15 μ l fyziologického roztoku na dobu 5

minut. Tím došlo ke kompresi míchy a vzniku léze. Po uplynutí této doby byl balónek vypuštěn, katetr vysunut a rána byla zašita v anatomických vrstvách (svaly, podkožní tkáň, kůže). Po celý průběh zákroku byla tělesná teplota zvířat udržována pomocí vyhřívané podložky na 37 °C. Po operaci byl všem skupinám intramuskulárně aplikován gentamicin (Gentamicin, Lek Pharmaceutical, Lublaň, Slovinsko; 5 mg/kg) kvůli prevenci pooperačních infekcí. Součástí pooperační péče bylo také manuální vyprazdňování močového měchýře kvůli retenci dvakrát denně až do obnovení funkce (tedy 2 až 3 týdny).

Kurkumin byl aplikován intraperitoneálně každý den po dobu 28 dní od SCI (Curcumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 6 mg/kg; rozpuštěný v olivovém oleji) a zároveň také intramuskulárně okolo místa léze každý týden, tedy 1., 7., 14., 21. a 28. den po SCI (Curcumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 60 mg/kg; rozpuštěný v olivovém oleji). Časování a dávky byly vybrány dle studie Ormonda *et al.* (Ormond et al. 2014).

5.3 Histologická a imunohistochemická analýza

Po ukončení behaviorálního testování (10. týden po SCI) byla zvířata transkardiálně perfundována roztokem 4% paraformaldehydu v PBS (phosphate-buffered saline). Ve stejném roztoku byla přes noc fixována jejich páteř. Poté byla z páteřního kanálu vyjmuta mícha a oříznuta tak, aby kraniální i kaudální konec byly ve vzdálenosti 1 cm od středu léze. Tato část míchy byla zalita do parafínu a příčně nařezána na řezy o tloušťce 5 µm. Řezy byly sbírány v 1mm intervalech podél kraniokaudální osy. K vyhodnocování se používal vždy střed léze a poté dalších 7 řezů kranialním a kaudálním směrem, celkem tedy 15 řezů.

Pro rozlišení šedé a bílé hmoty byly tyto řezy barveny roztokem kresylvioleti (0,25 g kresylvioleti rozpuštěno ve 100 ml destilované vody s 1 ml 10% kyseliny octové) a Luxol-fast blue (1 g Luxol-fast blue rozpuštěno ve 100 ml 96% ethanolu s 5 ml 10% kyseliny octové). Takto připravené preparáty byly nafoceny na mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Weimar, Německo). V programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) byly poté změřeny plochy zachované šedé a bílé hmoty.

Na imunohistochemickou analýzu astrogliózy a gliové jizvy byla použita primární protilátka proti GFAP (glial fibrillary acidic protein) konjugovaná s cyaninovým barvivem Cy3 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Snímky byly pořízeny na mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Weimar, Německo) a v programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) byly poté počítány protoplazmatické

astrocyty a velikost GFAP pozitivní oblasti v okolí léze. Pro imunohistochemickou analýzu axonálního růstu byla použita myší primární protilátka proti GAP-43 (growth associated protein 43) (Millipore, Billerica, MA, USA) a sekundární protilátka proti myšimu IgG (imunoglobulin G) konjugovaná s Alexa-Fluor 488 (Abcam, Bristol, UK). Snímky byly pořízeny na mikroskopu LEICACTR6500 s pomocí TissueFAXS (TissueGnostics, Vídeň, Rakousko) a vyhodnoceny v programu HistoQuest (TissueGnostics, Vídeň, Rakousko). Míra axonálního pučení byla určena jako podíl GAP-43 pozitivních vláken na celkové ploše řezu a tento podíl byl vztažen vůči kontrolním hodnotám.

Zvlášť byla provedena detekce aktivity NF- κ B specifickým barvením p65 podjednotky v kombinaci s hematoxylinem. Řezy byly z míchy připraveny stejným způsobem, jako je uvedeno výše, v časových intervalech 1, 3, 7, 10 a 28 dní po SCI. Poté byly barveny králičí primární protilátkou proti p65 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) a sekundární protilátkou proti králičímu IgG konjugovanou s peroxidázou H (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Pro vizualizaci positivity na p65 byla využita reakce přidaného diaminobenzidinu (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) s peroxidázou H za přítomnosti peroxidu vodíku. Snímky byly nafoceny mikroskopem LEICACTR6500 s pomocí programu TissueFAXS (TissueGnostics, Vídeň, Rakousko). Pro vyhodnocení počtu NF- κ B (p65) pozitivních jader na mm² byl použit program HistoQuest (TissueGnostics, Vídeň, Rakousko).

5.4 qPCR

Pro zkoumání exprese jednotlivých genů byla využita kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí a sledovaná v reálném čase (qPCR). Zkoumány byly geny *Sort1* (*Nt3*), *Fgf2*, *Olig2*, *Casp3*, *Gap43*, *Gfap*, *Vegf*, *Nfkb1*, *Cntf*, *Mipl1a* (*Ccl3*), *Rantes* (*Ccl5*), *Cd86*, *Cd163*, *Irf5* a *Mrc1* po 10 a 28 dnech od SCI. Vzorky mRNA byly izolovány z parafinových řezů za použití High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Penzberg, Německo), přičemž nejprve došlo k jejich deparafinizaci pomocí xylenu smíchaného s absolutním alkoholem a dále se postupovalo přesně podle přiloženého návodu. Množství RNA bylo kvantifikováno na spektrofotometru (NanoPhotometerTM P-Class, Mnichov, Německo) při čistotě stanovené na A280/A260, kdy použité vzorky vykazovaly hodnoty mezi 1,8 až 2,0. Izolovaná RNA byla poté reverzní transkripcí převedena na cDNA (komplementární DNA) za použití Transcriptor Universal cDNA Master (Roche, Penzberg, Německo) a termálního cykléru (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Získaný roztok cDNA byl použit na qPCR společně s FastStart Universal Probe Master

(Roche, Penzberg, Německo) a TagMan® Gene Expression Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) v konečném objemu 10 µl obsahujícím 25 ng extrahované RNA. Amplifikace probíhala na StepOnePlus™ real-time PCR cykléru (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) v tomto režimu: 2 minuty při 50 °C, 10 minut při 95 °C a následně 40 cyklů složených z 15 sekund při 95 °C a 1 minutě při 60 °C. Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech a v každé řadě byla zahrnuta negativní kontrola. Pomocí metody $\Delta\Delta C_t$ byla stanovena relativní kvantifikace genové exprese, přičemž exprese genů byla normalizována vzhledem k referenčnímu genu *Gapdh* a hodnoty kontrolních zvířat byly použity pro kalibraci. Pro lepší znázornění *up* a *down* regulace genů bylo použito měřítko \log_2 .

5.5 Behaviorální testování

Pro funkční testování byla vybrána sada čtyř behaviorálních testů. Ještě před indukci míšní léze byli potkani cvičeni, aby se adaptovali na testovací podmínky a byli schopni vykonávat testovaný úkon, čímž došlo k omezení stresu při pozdějším hodnocení. Testy byly prováděny po dobu 9 týdnů od SCI vždy ve stejné dny a časy.

5.5.1 BBB test

Pro hodnocení lokomočních funkcí byl zvolen BBB (Basso, Beattie, Bresnahan) test (Basso et al. 1995). Potkan byl umístěn do velké otevřené arény a po dobu 4 minut byly sledovány jeho pohybové schopnosti. Poté byl ohodnocen na stupnici od 0 do 21 na základě hybnosti kloubů zadních končetin, umístění tlapek, koordinace předních a zadních končetin, podpory váhy a dalších parametrů (jednotlivé kategorie jsou vyjmenovány v kapitole 10). Tento test byl prováděn vždy jednou týdně.

5.5.2 Flat beam test

Flat beam test hodnotí kromě základních motorických funkcí také schopnost koordinace předních a zadních končetin a udržování rovnováhy. Měřicí zařízení se skládá z dřevěné laťky, která je dlouhá 140 cm a široká 3,4 cm. Pro hodnocení se používá pouze střední část dlouhá 100 cm. Na konci této vzdálenosti je umístěn cílový box, který slouží jako motivační složka. Potkan byl umístěn na začátek laťky a následně byla měřena délka dráhy, kterou ušel, a doba jeho pohybu pomocí nahrávacího systému (TSE-Systems Inc., Bad Homburg, Německo). Pokud nedošlo k dosažení cílového boxu, byl pokus ukončen po 60 sekundách.

K hodnocení byla použita modifikovaná Goldsteinova škála (Goldstein et al. 1997) nabývající hodnot od 0 do 7 (jednotlivé kategorie jsou vyjmenovány v kapitole 10). Tento test byl prováděn od 3. týdne po SCI vždy dvakrát denně ve třech po sobě jdoucích dnech.

5.5.3 Rotarod test

K hodnocení motorických funkcí a udržování rovnováhy slouží rotarod test (Ugo Basile, Comerio, Itálie). Skládá se z otočného válce o průměru 7 cm s drážkami na povrchu a postranních stěn. Před SCI se na něm potkani učili chodit a to po dobu 5 minut při akceleraci od 5 do 10 otáček za minutu. Po SCI se válec otáčel konstantní rychlostí 5 otáček za minutu a potkani se na něm snažili udržet co nejdéle, maximálně však 60 sekund. Doba, po které spadli dolů, byla zaznamenávána. Tento test byl prováděn od 3. týdne po SCI vždy čtyřikrát denně v pěti po sobě jdoucích dnech.

5.5.4 Plantar test

Plantar test slouží ke zjištění, zda došlo k vyvinutí hyperalgie, tedy zvýšenému vnímání bolesti. Provádí se v zařízení (Ugo Basile, Comerio, Itálie), které se skládá z průhledného akrylového boxu, pod kterým je umístěna pohyblivá infračervená lampa. Potkan byl umístěn do tohoto boxu a po krátké adaptační periodě začalo samotné měření. Paprsek lampy byl zaměřen na chodidlo zadní končetiny vždy do stejného místa. Po aplikaci tepelného stimulu byl automaticky měřen čas, po kterém došlo k odtažení končetiny. Obě zadní končetiny byly takto změřeny pětikrát, výsledek byl poté zprůměrován. Tento test byl prováděn jednou týdně.

5.6 Statistická analýza

Pro určení, zda jsou rozdíly naměřené mezi léčenými a kontrolními zvířaty statisticky signifikantní, byl použit t-test a analýza rozptylu dvojného třídění (two-way ANOVA). V případě opakovaných měření, jako například u behaviorálních testů, byla použita analýza rozptylu dvojného třídění pro opakovaná měření (two-way ANOVA for repeated measurements). Jako *post hoc* test byl použit Student-Neuman-Keulsův test (SigmaPlot 13.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Rozdíly byly považovány za statisticky signifikantní, pokud $p < 0,05$. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM).

6 VÝSLEDKY

6.1 Histologická a imunohistochemická analýza

6.1.1 Zachování šedé a bílé hmoty

Po ukončení behaviorálního testování potkanů byla na transversálních míšních řezech měřena plocha šedé a bílé hmoty, a to v rozsahu 1,5 cm okolo středu léze. Měření probíhalo v pixelech a výsledek byl poté přepočítán na mm². U potkanů léčených kurkuminem byla ve většině lokací více zachována jak šedá, tak i bílá hmota, s výjimkou oblasti těsně obklopující epicentrum (0 ± 1 mm). Zde bylo pozorováno mírně lepší zachování míšní tkáně u kontrolních zvířat. Rozdíly v naměřených hodnotách mezi kontrolními a léčenými zvířaty však v žádné lokaci nedosáhly statistické signifikance (**grafy 1 a 2**).

6.1.2 Gliová jizva

Na imunohistochemických preparátech byla zkoumána míra vzniku gliové jizvy pomocí měření GFAP-pozitivní oblasti. Plocha jizvy byla měřena v pixelech a výsledek byl vyjádřen jako procentuální podíl celkové plochy míšního řezu. Ačkoliv celkový rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky signifikantní, u léčených potkanů byla v okolí léze zjištěna menší velikost jizvy než u kontrolních zvířat, a to zejména v rozsahu 2 mm kraniálním i kaudálním směrem. V samotném epicentru (lokace 0) a v druhém řezu kaudálním směrem dosáhl rozdíl mezi skupinami ve velikosti jizvy lokální statistické signifikance. V oblastech vzdálenějších od centra léze byly hodnoty naměřené u jednotlivých skupin velice podobné (**graf 3**).

Kromě měření velikosti gliové jizvy byl v každém řezu určen také počet protoplazmatických astrocytů, který se mezi skupinami statisticky nelišil. V úplném středu léze byl tento počet mírně vyšší u kontrolní skupiny. V některých oblastech zase počet protoplazmatických astrocytů lehce převyšoval u potkanů léčených kurkuminem a ve vzdálenosti 2 mm kaudálním směrem od epicentra byl dokonce tento výsledek lokálně signifikantní (**graf 4**).

6.1.3 Axonální pučení

Počet nově rostoucích axonálních vláken (tzv. pučení neboli sprouting) byl zjišťován pomocí barvení proteinu GAP-43 a výsledek byl vyjádřen jako procentuální poměr vůči

kontrole, která byla stanovena jako 100 %. Ačkoliv byl počet nově rostoucích vláken v průměru vyšší u zvířat léčených kurkuminem, rozdíl mezi skupinami nedosáhl statistické signifikance (**graf 5**).

6.1.4 Aktivita NF-κB

Aktivita NF-κB byla zjišťována pomocí sledování translokace faktoru p65 do buněčného jádra v různých časových úsecích (1, 3, 7, 10 a 28 dní po SCI) a výsledek byl poté vyjádřen jako hustota NF-κB (p65)-pozitivních jader na mm². Počet NF-κB-pozitivních jader se u obou skupin s postupem času zvyšoval, svého maxima dosáhl 10 dní po SCI a poté opět mírně klesal. Po celou dobu byly celkové hodnoty léčených potkanů signifikantně nižší než u kontrolních zvířat, s výjimkou 1 dne po SCI, kdy byl signifikantní rozdíl naměřen pouze lokálně v kaudální oblasti. 10 a 28 dní po SCI byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami ve všech měřených oblastech (kraniálně, ve středu léze i kaudálně) (**grafy 6, 7, 8, 9 a 10**).

6.2 Genová exprese (qPCR)

Pomocí metody qPCR byla po 10 a 28 dnech od SCI sledována exprese genů spojených s imunitní odpovědí (*Nfκb1*, *Mip1a*, *Rantes*, *Cd86*, *Cd163*, *Irf5*, *Mrc1*), vaskularizací (*Vegf*), axonálním pučením (*Gap43*), gliovou jizvou (*Gfap*), oligodendrocyty (*Olig2*), apoptózou (*Casp3*) a růstovými faktory (*Sort1*, *Fgf2*, *Cntf*). Na expresi většiny genů nemělo podávání kurkuminu významný efekt. Přesto byla 10 dní po SCI zaznamenána signifikantně zvýšená exprese genu *Irf5* oproti kontrolním hodnotám, zatímco exprese genů *Rantes* a *Gfap* byla ve stejném čase signifikantně snižena (**grafy 11, 12, 13 a 14**).

6.3 Behaviorální testování

6.3.1 BBB

Pro zkoumání efektu léčby na motorické funkce byl pozorován volný pohyb testovaných zvířat v otevřeném poli a jejich výsledky byly hodnoceny pomocí BBB skóre (Basso, 1995). Potkani, kterým byl aplikován kurkumin, dosahovali v 1. týdnu po SCI lepších výsledků než kontrolní skupina a tento rozdíl byl vysoce signifikantní. Signifikantně lepší výsledky u léčených zvířat byly pozorovány také ve 2. a 3. týdnu a poté opět v 7. týdnu po SCI. Ve 4., 5., 6., 8. a 9. týdnu po SCI nebyl rozdíl mezi skupinami signifikantní. Po celou dobu testování

však potkani léčení kurkuminem dosahovali vyššího skóre než kontrolní zvířata a celkový rozdíl mezi skupinami byl statisticky signifikantní (**graf 15**).

6.3.2 Plantar test

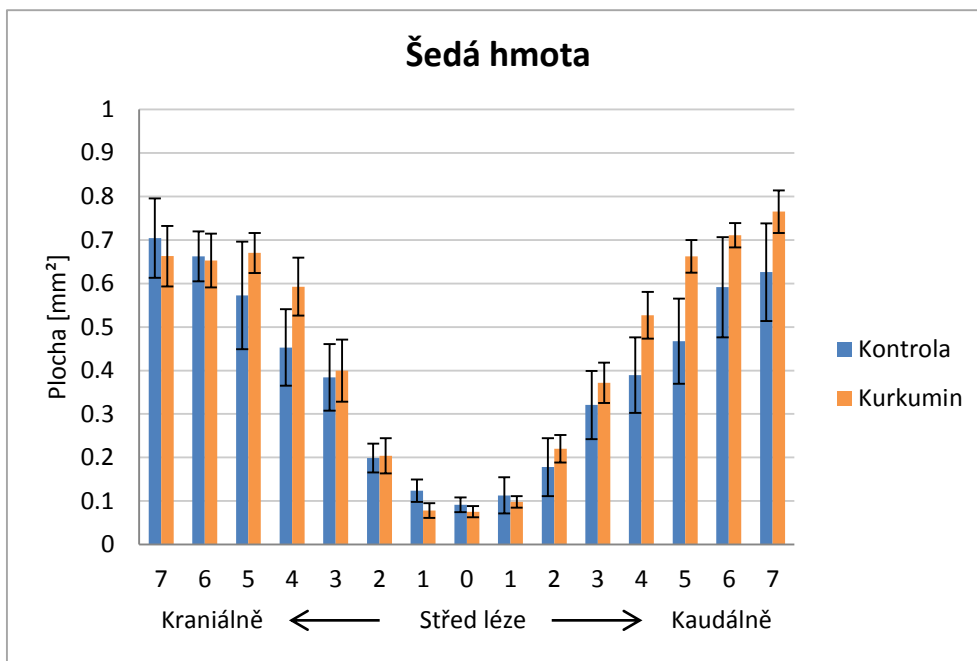
K ověření, zda léčba ovlivňuje hyperalgezií vyskytující se po SCI, byl použit plantar test měřící tepelnou nocicepci. U obou skupin, kontrolní i léčené, byly po aplikaci tepelného stimulu naměřeny nižší časy, po kterých došlo k odtažení končetiny, ve srovnání s výsledky, které byly získány před SCI. Tyto časy se však příliš nelišily mezi skupinami a ani v jednom z 9 týdnů nedosáhl jejich rozdíl statistické signifikance (**graf 16**).

6.3.3 Flat beam test

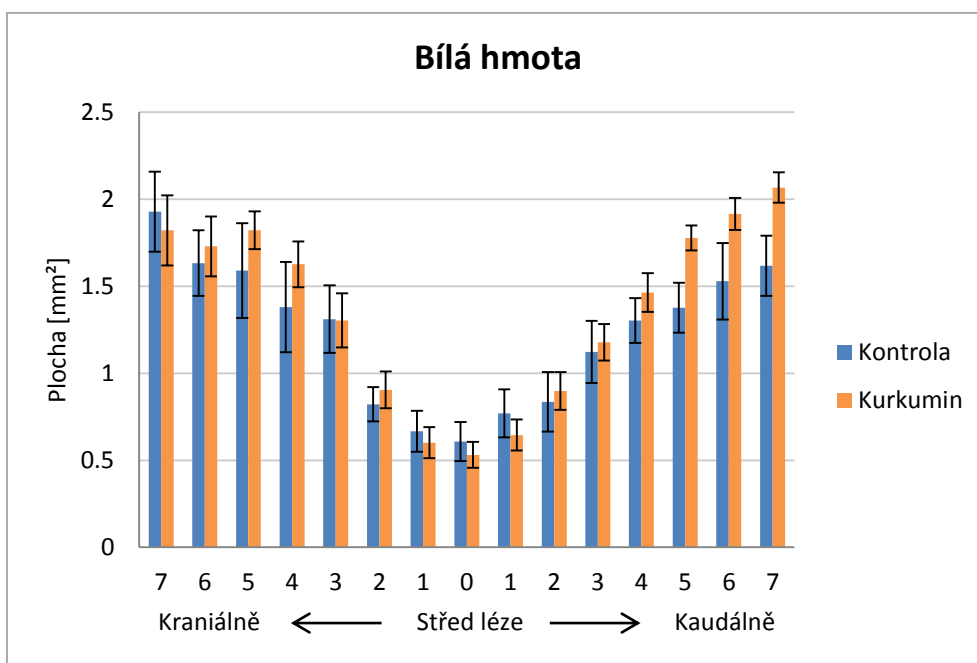
Pro měření motorických funkcí, rovnováhy a také pohybové koordinace předních a zadních končetin byl vybrán flat beam test. Z počátku byla u potkanů z obou skupin pozorována pouze omezená schopnost držet rovnováhu na tenké laťce, čemuž odpovídá velmi nízké skóre v 3. týdnu po SCI. Na druhou stranu laťky se dostali jen zřídka, případně čas nutný k přejití byl velmi vysoký. V pozdějších týdnech se u potkanů, kterým byl podáván kurkumin, skóre mírně zvyšovalo a zároveň čas potřebný k přejití laťky se snižoval. Hodnoty kontrolních potkanů zůstávaly neměnné. Tyto výsledky však v žádném týdnu nedosáhly statistické signifikance (**grafy 17 a 18**).

6.3.4 Rotarod test

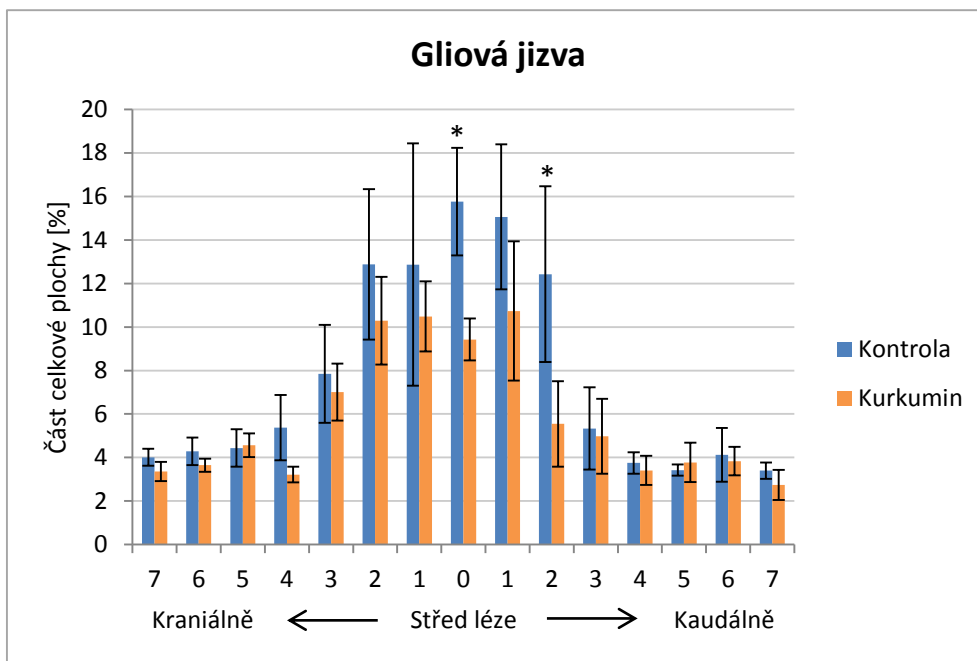
Rotarod test byl využit pro měření jak pohybových funkcí, tak schopnosti udržovat rovnováhu na otáčejícím se válci. Celkový rozdíl mezi skupinami sice nebyl signifikantní, ale ve 3. týdnu po SCI byly u potkanů léčených kurkuminem lokálně zaznamenány signifikantně lepší výsledky než u kontrolních zvířat. V následujících týdnech si léčená skupina stále udržovala mírně lepší výsledky, ale ty již statistické signifikance nedosahovaly (**graf 19**).



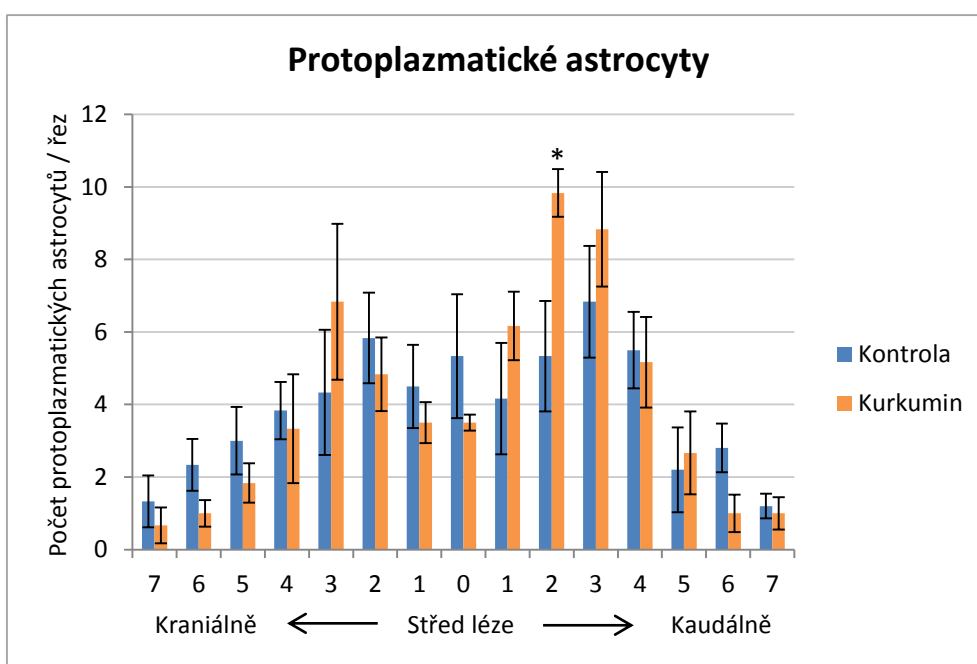
Graf 1. Plocha zachované šedé hmoty měřená v rozsahu 7 mm kraniálně až 7 mm kaudálně od středu léze u zvířat 10 týdnů po SCI. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



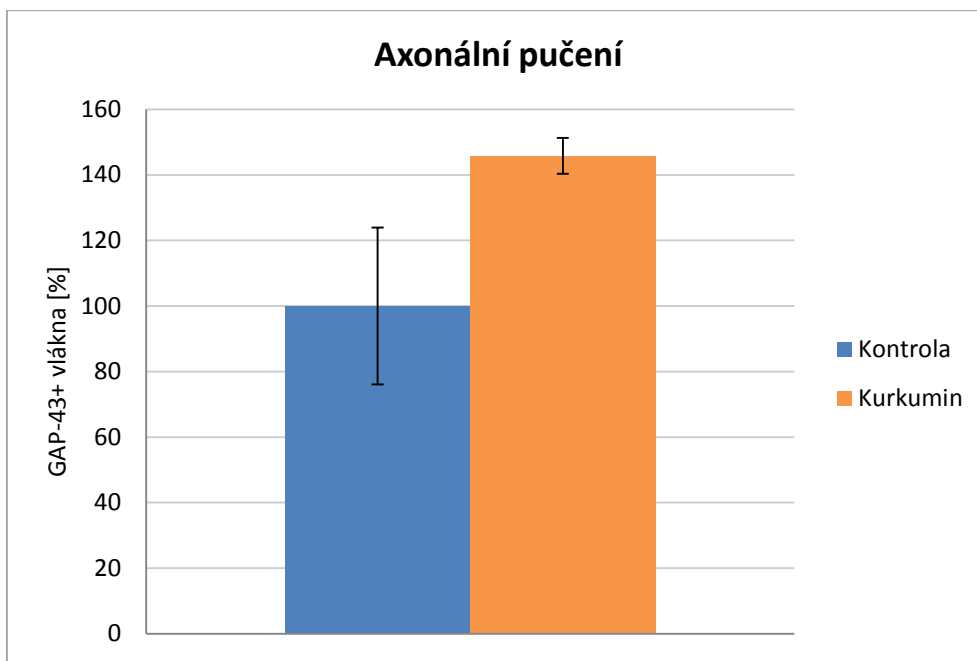
Graf 2. Plocha zachované bílé hmoty měřená v rozsahu 7 mm kraniálně až 7 mm kaudálně od středu léze u zvířat 10 týdnů po SCI. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



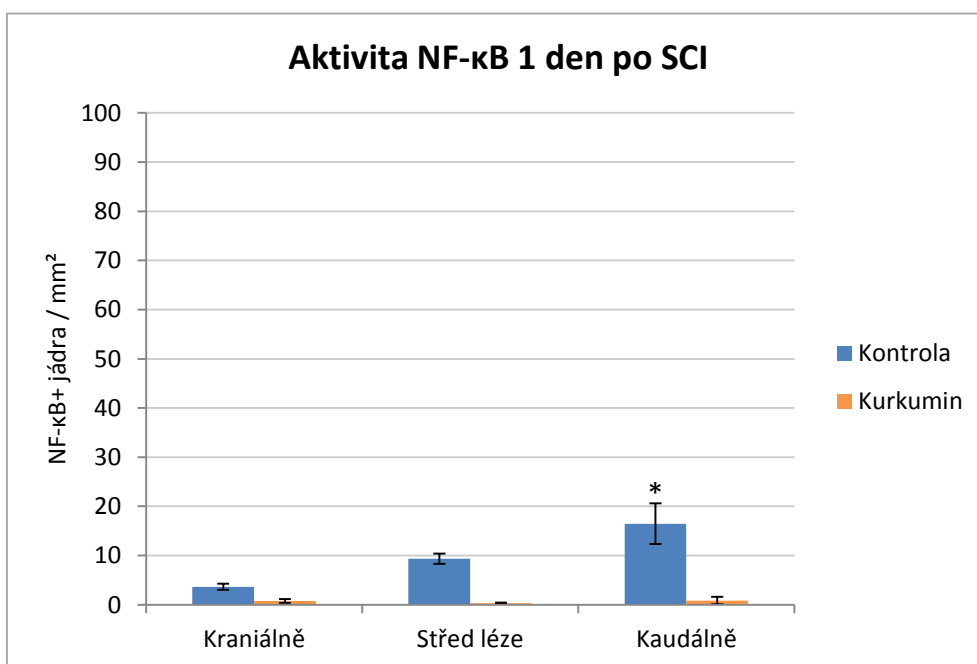
Graf 3. Velikost gliové jizvy vyjádřená jako procentuální podíl celkové plochy transversálního míšního řezu u zvířat 10 týdnů po SCI. Oblast měření zahrnovala 7 mm kraniálním až 7 mm kaudálním směrem od středu léze. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



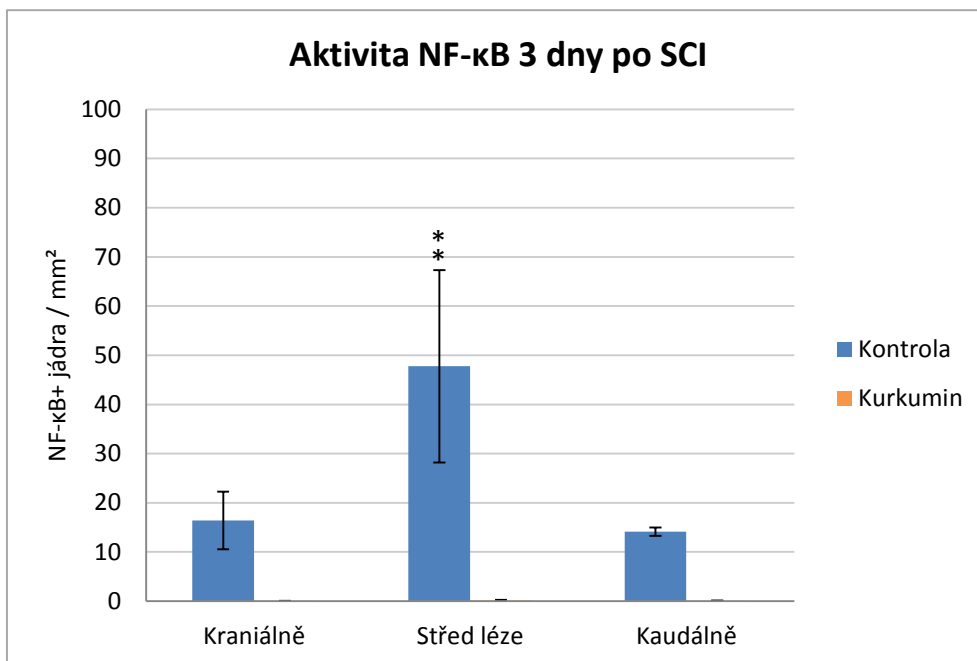
Graf 4. Množství protoplazmatických astrocytů u zvířat 10 týdnů po SCI. Oblast měření zahrnovala 7 mm kraniálním až 7 mm kaudálním směrem od středu léze. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



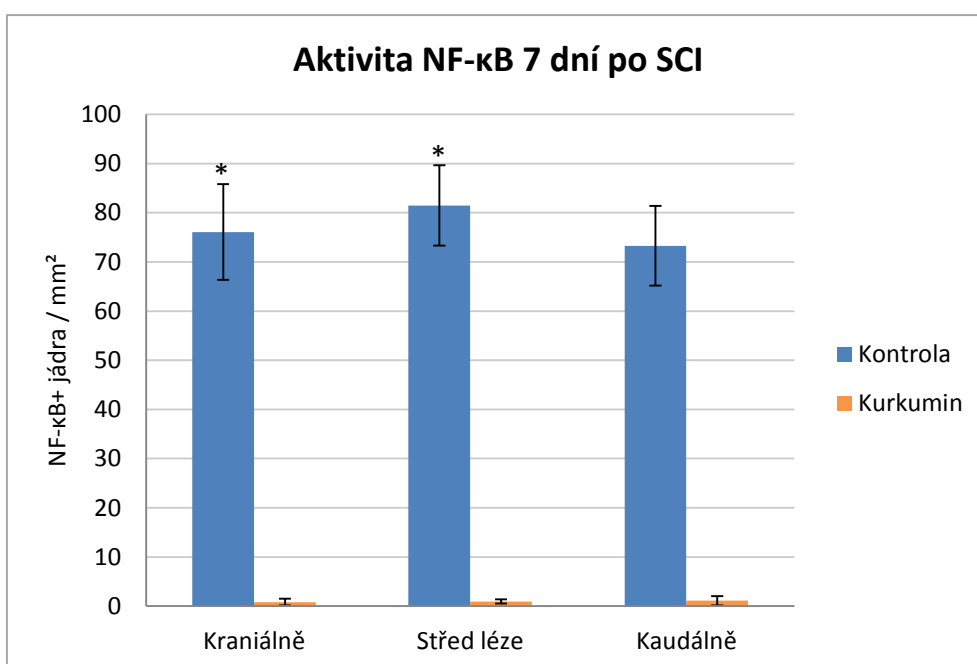
Graf 5. Axonální sprouting měřený pomocí GAP43-pozitivních vláken u zvířat 10 týdnů po SCI. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech a vztaženy ke kontrolní skupině, která je stanovena jako 100 %. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



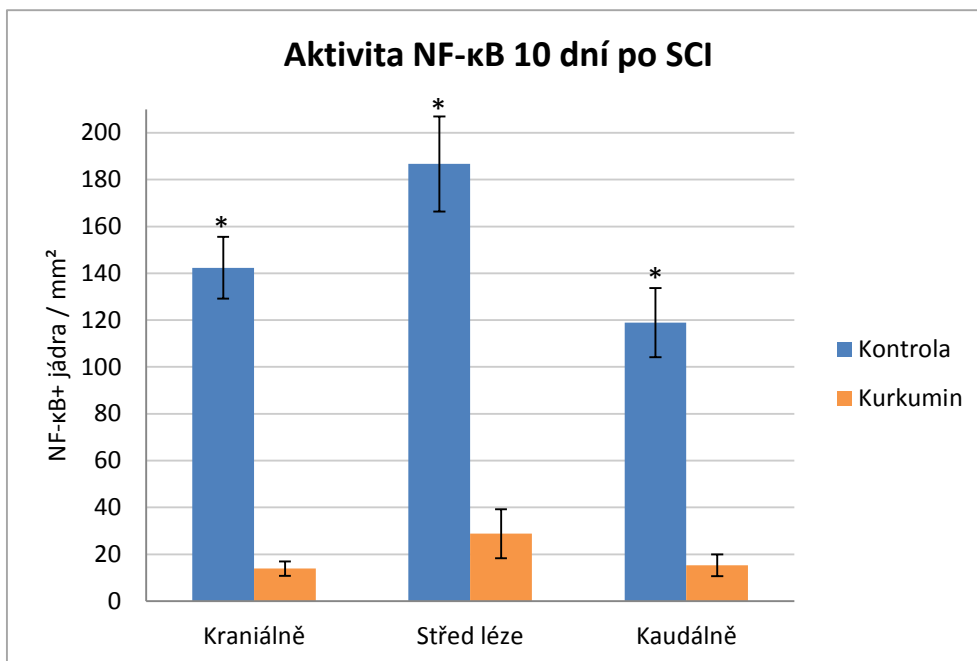
Graf 6. Aktivita NF- κ B měřená jako počet NF- κ B-pozitivních jader na mm² u zvířat 1 den po SCI. Každá oblast měření zahrnuje vždy 5 řezů vzdálených od sebe 1 mm. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



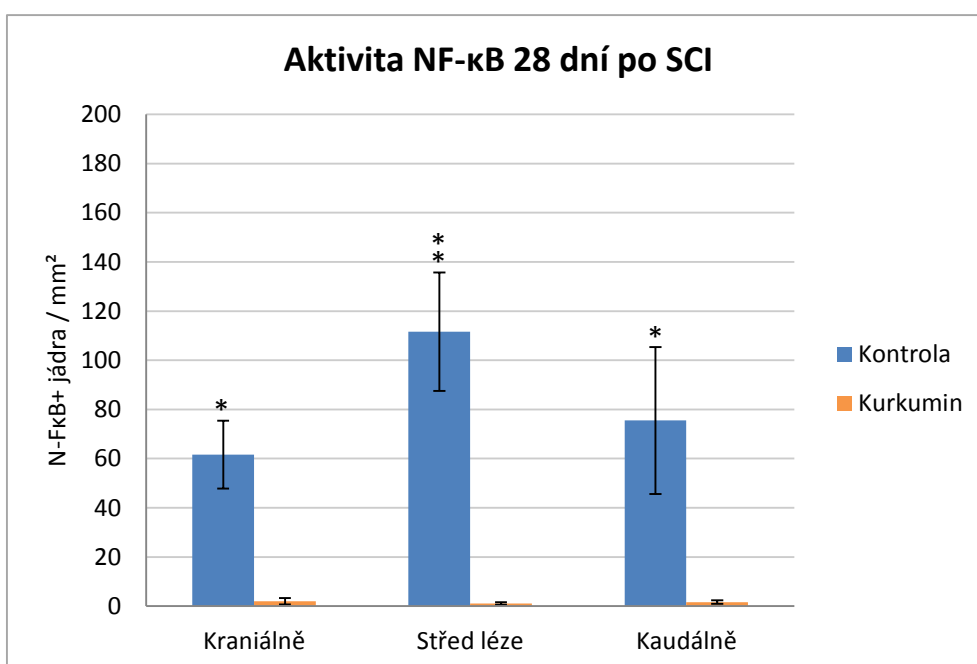
Graf 7. Aktivita NF-κB měřená jako počet NF-κB-pozitivních jader na mm² u zvířat 3 dny po SCI. Každá oblast měření zahrnuje vždy 5 řezů vzdálených od sebe 1 mm. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$), případně ** ($p < 0,01$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



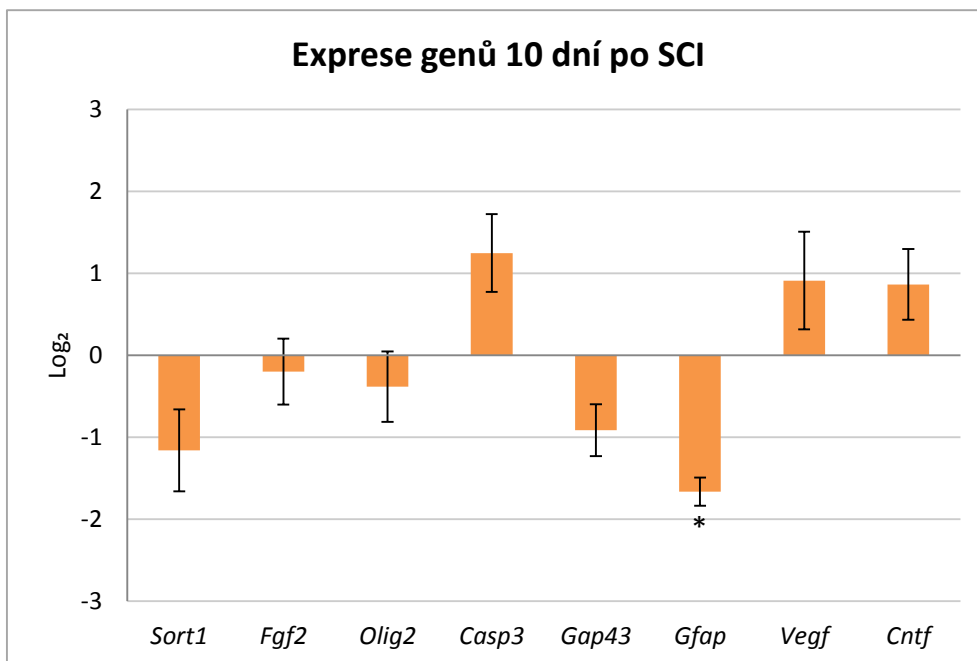
Graf 8. Aktivita NF-κB měřená jako počet NF-κB-pozitivních jader na mm² u zvířat 7 dní po SCI. Každá oblast měření zahrnuje vždy 5 řezů vzdálených od sebe 1 mm. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



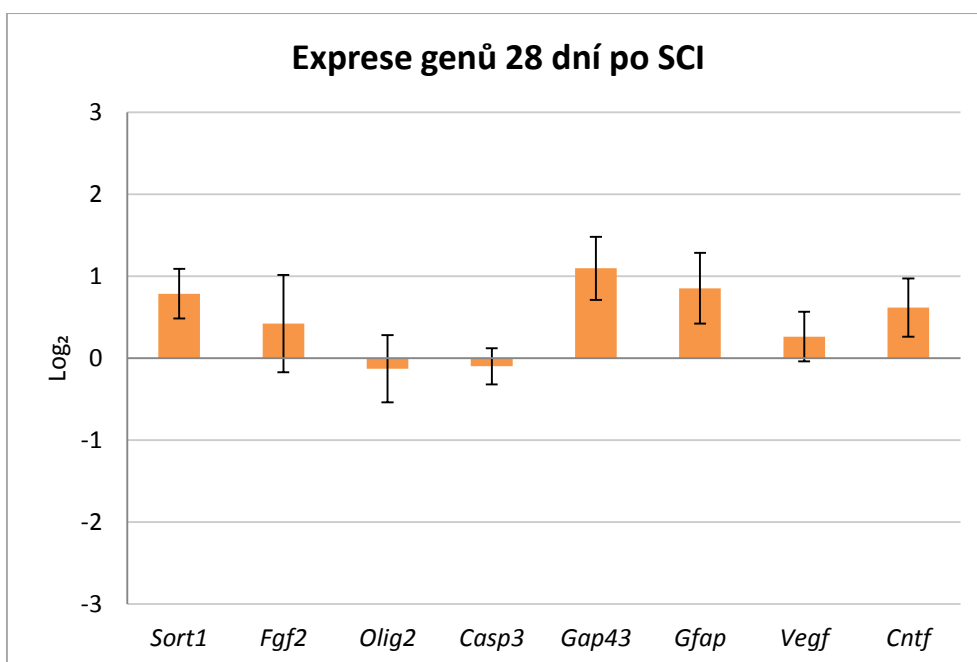
Graf 9. Aktivita NF-κB měřená jako počet NF-κB-pozitivních jader na mm² u zvířat 10 dní po SCI. Každá oblast měření zahrnuje vždy 5 řezů vzdálených od sebe 1 mm. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



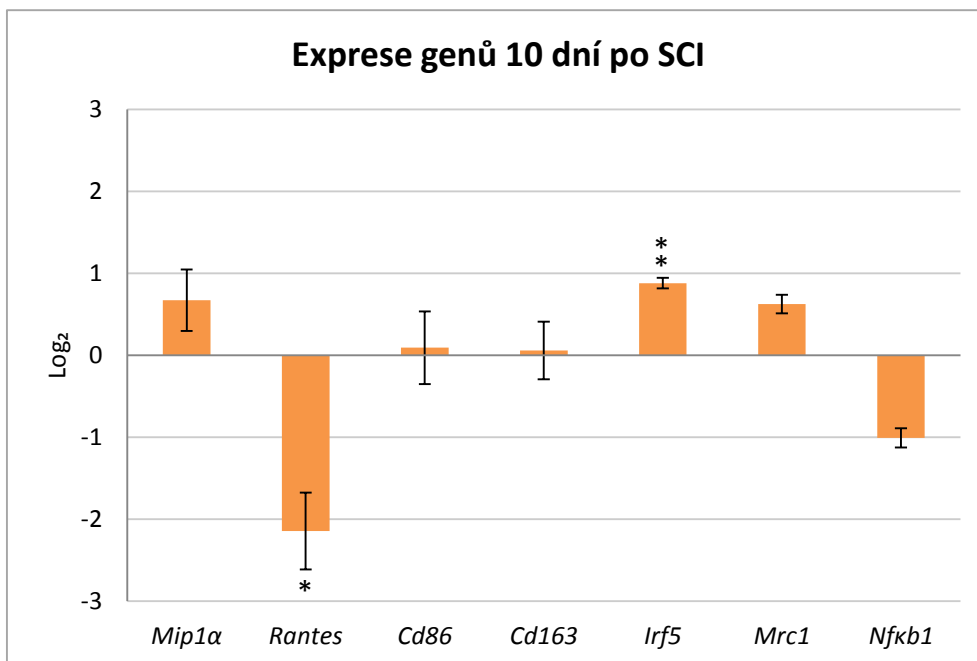
Graf 10. Aktivita NF-κB měřená jako počet NF-κB-pozitivních jader na mm² u zvířat 28 dní po SCI. Každá oblast měření zahrnuje vždy 5 řezů vzdálených od sebe 1 mm. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$), případně ** ($p < 0,01$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



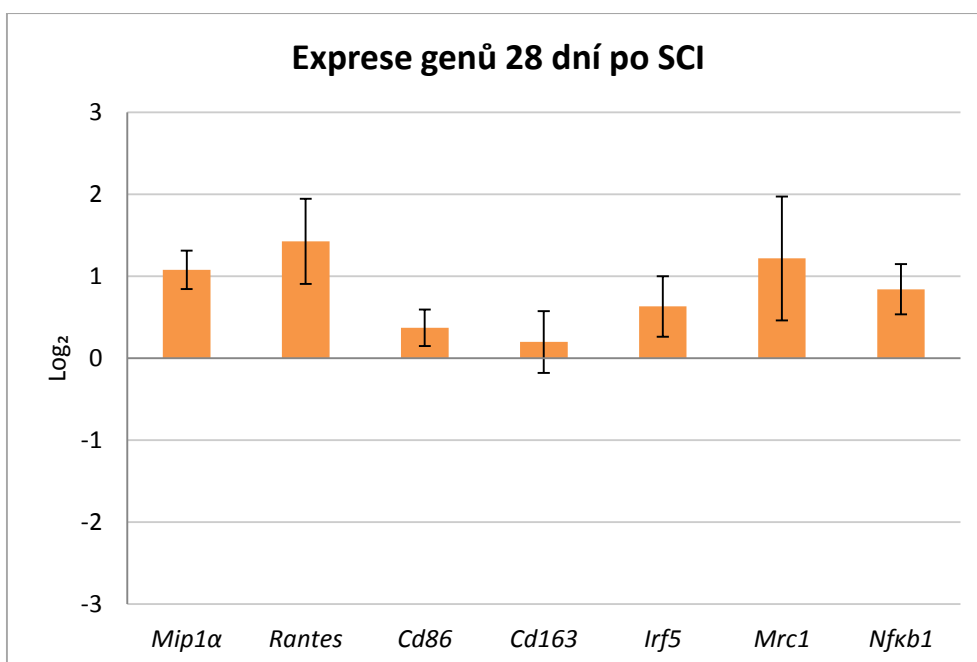
Graf 11. Expresse genů spojených s regenerativními procesy (vaskularizací, axonálním pučením, gliovou jizvou, apoptózou, oligodendrocyty a růstovými faktory) u zvířat léčených kurkuminem 10 dní po SCI. Hodnoty jsou vyjádřeny jako změny vůči kontrolní skupině (metoda $\Delta\Delta Ct$) a převedeny do logaritmičeského měřítka. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



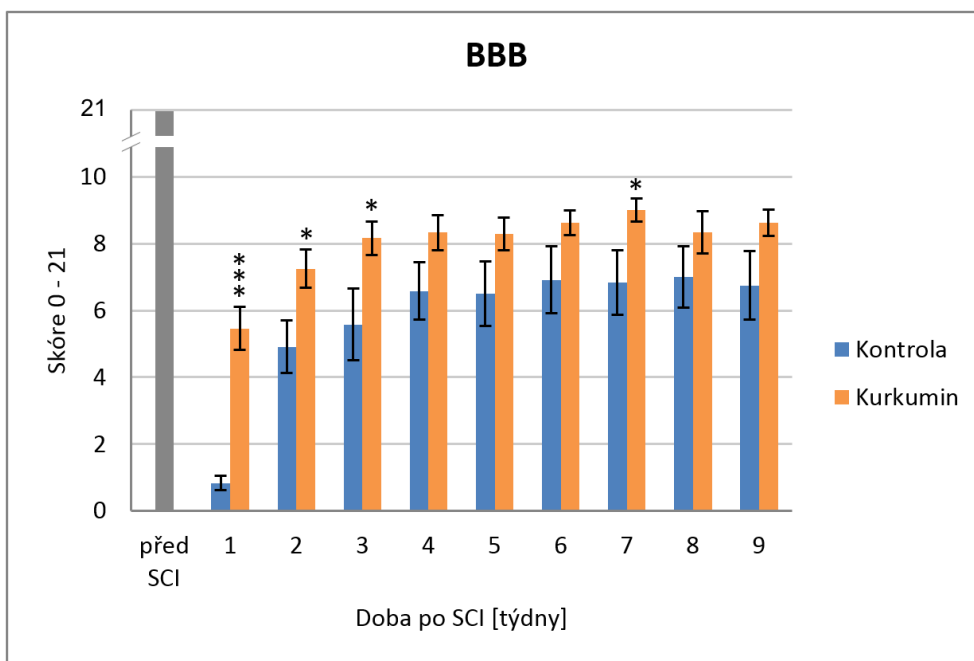
Graf 12. Expresse genů spojených s regenerativními procesy (vaskularizací, axonálním pučením, gliovou jizvou, apoptózou, oligodendrocyty a růstovými faktory) u zvířat léčených kurkuminem 28 dní po SCI. Hodnoty jsou vyjádřeny jako změny vůči kontrolní skupině (metoda $\Delta\Delta Ct$) a převedeny do logaritmičeského měřítka. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



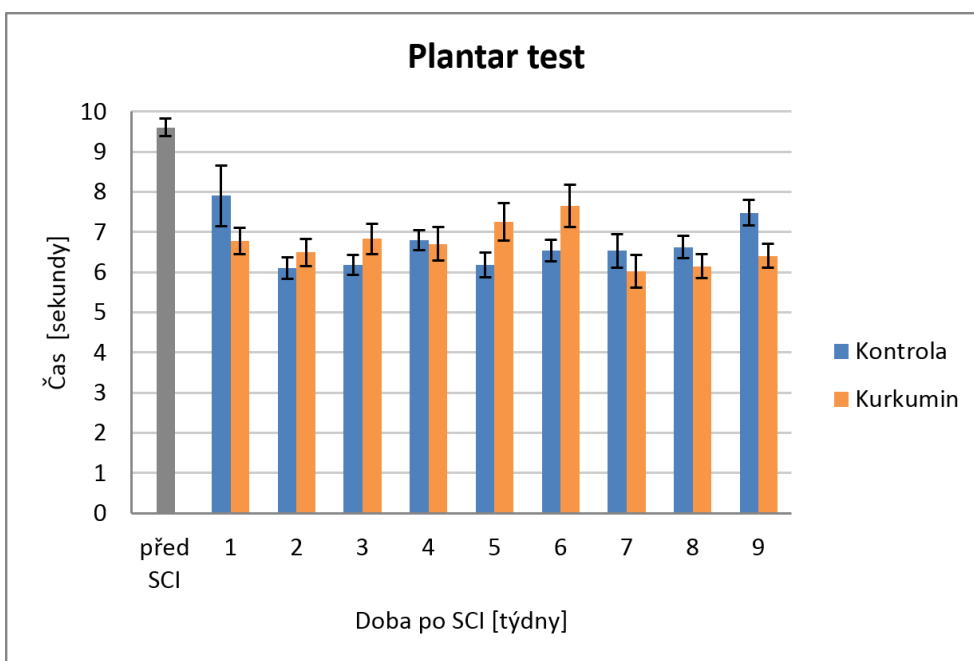
Graf 13. Expres genů spojených s imunitní odpovědí u zvířat léčených kurkuminem 10 dní po SCI. Hodnoty jsou vyjádřeny jako změny vůči kontrolní skupině (metoda $\Delta\Delta Ct$) a převedeny do logaritmického měřítka. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$), případně ** ($p < 0,01$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



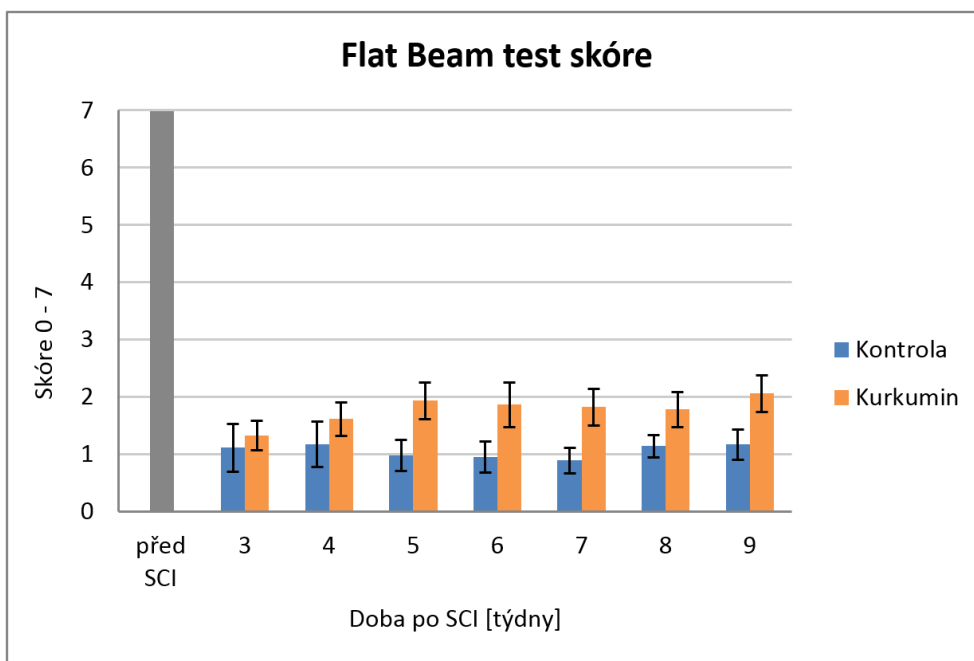
Graf 14. Expres genů spojených s imunitní odpovědí u zvířat léčených kurkuminem 28 dní po SCI. Hodnoty jsou vyjádřeny jako změny vůči kontrolní skupině (metoda $\Delta\Delta Ct$) a převedeny do logaritmického měřítka. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



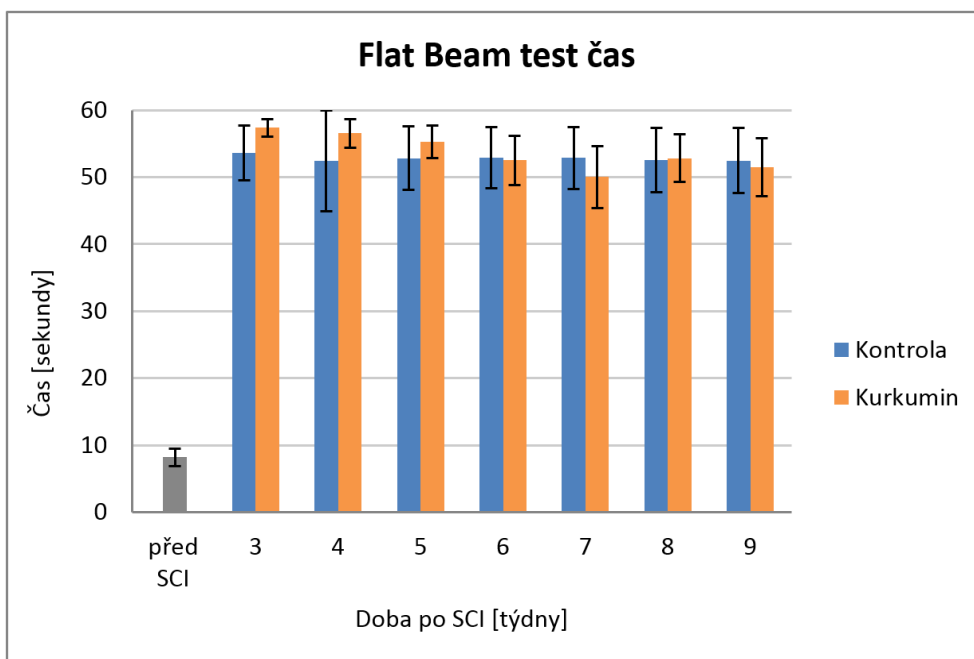
Graf 15. BBB skóre měřené po dobu 9 týdnů po SCI. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$), případně *** ($p < 0,001$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



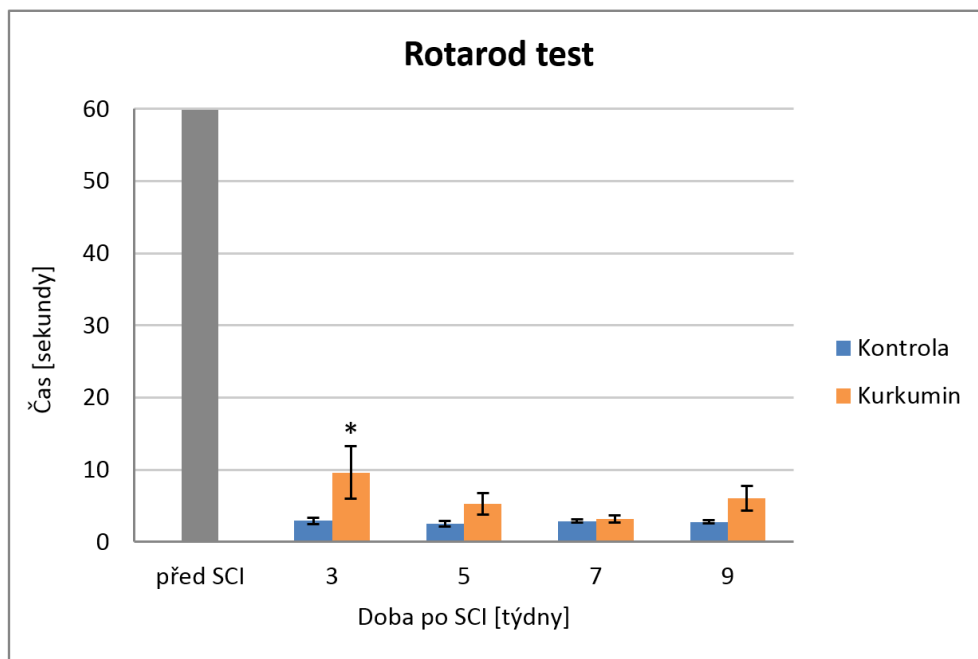
Graf 16. Plantar test měřící čas, po kterém dojde k odtažení končetiny po aplikaci tepelného stimulu. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



Graf 17. Skóre dosažené ve flat beam testu v jednotlivých týdnech. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



Graf 18. Čas potřebný k přejití laťky ve flat beam testu v jednotlivých týdnech. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.



Graf 19. Rotarod test. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrný čas, po který byli potkani schopni udržet se na otáčejícím se válci. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

7 DISKUZE

Tato práce se zabývala efektem podávání kurkuminu na traumatické poranění míchy, a to jak z funkčního hlediska, tak z hlediska tkáňové regenerace a genové exprese.

Histologická analýza zachování šedé a bílé hmoty neprokázala signifikantní rozdíl mezi kontrolní a léčenou skupinou. To by mohlo znamenat, že na částečné znovuzískání motorických funkcí, alespoň v rozsahu dosaženého BBB skóre, nemá vliv pouze čistě množství zachované nervové tkáně, ale účastní se zde i další faktory. Podobnou situaci pozoroval i Ormond a jeho tým. Jejich práce spočívala v léčbě potkanů po SCI kurkuminem, NSC nebo jejich kombinací. Ukázalo se, že potkani ze skupiny léčené kurkuminem měli nejméně zachované míšní tkáně ze všech skupin (i vůči kontrole). Jejich BBB skóre se ale v podstatě nelišilo od skupiny zvířat, kterým byly aplikovány NSC. Ve své předchozí práci přitom dokázali, že podávání kurkuminu signifikantně zlepšovalo jak BBB skóre, tak zachování bílé a šedé hmoty. Jejich závěr je takový, že neexistuje jednoduchý a přímý vztah mezi funkčními výstupy a množstvím zachované tkáně v místě zranění (Ormond et al. 2012; Ormond et al. 2014).

Velikost gliové jizvy u zvířat, kterým byl podáván kurkumin, byla v této práci prokázána jako signifikantně menší v oblasti okolo středu léze než u kontrolních zvířat. To je v souladu s tvrzením Wang a jeho kolegů, kteří aplikovali kurkumin myším s kompresním poraněním míchy. Poté u těchto myší pozorovali redukci gliové jizvy pomocí imunohistochemických metod a zároveň detekovali sníženou expresi GFAP metodou western blot (Wang et al. 2014). Ke stejnému výsledku došli i Yuan a jeho kolegové, kteří kromě GFAP sledovali také expresi chondroitin-sulfátových proteoglykanů. Ty jsou účinnými inhibitory axonálního růstu (Chung et al. 2014) a dle zmíněné práce byla jejich tvorba po SCI působením kurkuminu redukována (Yuan et al. 2015).

Míra axonálního pučení byla vyšší u zvířat léčených kurkuminem oproti kontrolním, ale tento výsledek nedosáhl statistické signifikance zřejmě z důvodu velkého rozptylu dat. Dalším sledovaným parametrem byla aktivita NF- κ B, která po SCI nejprve vzrůstala, svého vrcholu dosáhla 10 dní po SCI a poté opět klesala. Bylo prokázáno, že podávání kurkuminu významně snižovalo translokaci NF- κ B do buněčného jádra, čímž zřejmě docházelo i k potlačení jeho funkce coby transkripčního faktoru. Rozdíl mezi skupinami dosahoval statistické signifikance ve všech měřených časových úsecích, s výjimkou 1 dne po SCI, kdy k signifikantnímu

omezení translokace NF- κ B působením kurkuminu došlo pouze lokálně v kaudální oblasti. Důvodem by mohl být příliš krátký časový interval mezi aplikací kurkuminu a samotným měřením. Po 3 dnech od SCI byl již rozdíl mezi skupinami signifikantní, což odpovídá dřívějšímu měření Jina a jeho kolegů. Ti v tomto časovém úseku detekovali metodou EMSA (electrophoretic mobility shift assay) vazebnou aktivitu NF- κ B a zjistili, že vlivem kurkuminu došlo k jejímu významnému snížení. Kromě tohoto transkripčního faktoru sledovali také NRF-2, který je důležitou součástí antioxidantní ochrany. U něj pozorovali naopak zvýšení vazebné aktivity po podávání kurkuminu (Jin et al. 2014).

Metodou qPCR byla zkoumána exprese vybraných genů souvisejících s imunitní odpovědí a regenerativními procesy. Jedním z nich byl i gen pro NF- κ B. Pozoruhodné je, že pokles jeho exprese u léčené skupiny nebyl v této práci prokázán jako signifikantní, jak by tomu napovídaly výsledky imunohistochemické analýzy. Nabízí se řešení, že mechanismus působení kurkuminu nespočívá ve snižování exprese NF- κ B, ale pouze v omezování aktivace a translokace tohoto faktoru do buněčného jádra. Tomu by ostatně odpovídala i studie Jobina a jeho kolegů, podle nichž kurkumin snižuje aktivitu IKK a inhibuje tak fosforylaci I κ B, inhibitoru NF- κ B. Díky tomu nedochází k disociaci tohoto inhibitoru a jaderný lokalizační signál NF- κ B tak zůstává skrytý (Jobin et al. 1999). V práci Wang a jeho kolegů se dokonce uvádí, že kurkumin přímo zvyšuje expresi I κ B (Wang et al. 2014). Nicméně Yuan a kolektiv, kteří také zkoumali expresi NF- κ B pomocí PCR, signifikantní snížení u potkanů léčených kurkuminem našli. Zůstává otázkou, zda by tento odlišný výsledek mohl být způsoben použitím vyšší koncentrace kurkuminu (300 mg/kg) a jiným časovým plánem aplikace, než tomu bylo v této práci. Dále se kromě NF- κ B zabývali také cytokiny a zaznamenali mimo jiné významné snížení exprese TNF- α a IL-1 β po podávání kurkuminu (Yuan et al. 2015). K podobnému výsledku došli i Jin a jeho kolegové, kteří pomocí metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zaznamenali snížení koncentrace TNF- α , IL-1 β a IL-6 u potkanů po SCI léčených kurkuminem. U těchto potkanů detekovali také menší míru apoptózy než u kontrolní skupiny (Jin et al. 2014).

Dále bylo v této práci metodou qPCR naměřeno snížení exprese genu pro GFAP po 10 dnech od SCI díky působení kurkuminu. To odpovídá výsledkům imunohistochemické analýzy, kde byla v některých oblastech zaznamenána signifikantně menší velikost gliové jizvy oproti kontrolní skupině. Po 10 dnech od SCI byl také zjištěn signifikantní pokles exprese chemokinu RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), který se podílí na chemotaxi imunitních buněk do místa zranění, což podporuje hypotézu o

protizánětlivém působení kurkuminu. Na druhou stranu bylo ve stejnou dobu naměřeno signifikantní zvýšení exprese genu pro IRF-5 (interferon regulátory factor 5), což je transkripční faktor podporující zánětlivou odpověď a polarizaci M1 makrofágů (Krausgruber et al. 2011). To poněkud nesouhlasí se snahou současných regeneračních studií zvýšit činnost protizánětlivě působících M2 makrofágů (Horn et al. 2008). Je možné, že právě zvýšená produkce IRF-5 působí proti zmíněným protizánětlivým schopnostem kurkuminu a snižuje tak celkový efekt působení této přírodní látky. U ostatních sledovaných genů nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi léčenou a kontrolní skupinou.

Motorické a částečně také senzorycké funkce byly hodnoceny sérií behaviorálních testů. V BBB testu bylo prokázáno, že podávání kurkuminu pozitivně ovlivňovalo znovuzískání motorických funkcí po SCI, a to zejména v prvních několika týdnech po zranění. Již první týden po SCI projevovali potkani z léčené skupiny výrazně lepší pohybové schopnosti než potkani z kontrolní skupiny a tento rozdíl zůstal signifikantní po dobu tří týdnů. Jelikož ale u potkanů s traumatickým poraněním míchy dochází k poměrně výraznému samovolnému zotavování i bez jakéhokoliv léčebného zásahu, rozdíl mezi skupinami přestal být postupem času tak patrný a s výjimkou 7. týdne po SCI již nedosáhl statistické signifikance. Lepší BBB skóre u potkanů po SCI léčených kurkuminem pozorovali také Yuan a jeho kolegové. Ti sice podávali kurkumin pouze 7 dní po SCI, ale zato ve třech koncentracích – 30 mg/kg, 100 mg/kg a 300 mg/kg. Ve své studii pak prokázali, že výsledky v BBB testu závisely právě na dávce kurkuminu, přičemž potkani s nejvyšší koncentrací vykazovali také nejvyšší skóre (Yuan et al. 2015). Efekt kurkuminu na BBB skóre měřili také Jin a jeho kolegové, kteří pozorovali signifikantně lepší výsledky u potkanů léčených kurkuminem již 72 hodin po SCI (Jin et al. 2014).

Ve flat beam testu, rotarod testu a plantar testu nebyl v této práci prokázán významný rozdíl mezi léčenou a kontrolní skupinou. V případě flat beam testu může být příčinou to, že tento test vyžaduje velmi dobrou koordinaci jednotlivých končetin a také pokročilou schopnost udržovat rovnováhu. Odhalí tak i drobné nedostatky v souhře pohybových vzorců, které v BBB testu hodnotícím pouze základní motoriku nejsou patrné. Rotarod test zase zřejmě není vhodný pro zvířata s takovou závažností léze, jaká byla použita v této práci. Jeho provedení vyžaduje významné zapojení zadních končetin, jejichž funkce u testovaných zvířat nebyla obnovena do takové míry, aby to bylo možné. Výsledky plantar testu naznačují, že u obou testovaných skupin došlo po SCI k rozvoji hyperalgie, jelikož naměřené časy byly kratší, než před provedením SCI. Tyto časy se po celou dobu testování v podstatě neměnily a

mezi skupinami nebyl pozorován významný rozdíl. Léčba kurkuminem tedy hyperalgií sice nezlepšuje, ale na druhou stranu ani nezhoršuje.

8 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala sledováním vlivu kurkuminu na poranění míchy, a to z hlediska patofyziologických procesů, exprese vybraných genů a také funkčních výstupů.

Patofyziologické procesy probíhající po poranění míchy a jejich případná modulace vlivem kurkuminu byly sledovány pomocí histologických a imunohistochemických metod. Pozornost byla zaměřena zejména na úbytek míšní tkáně, vznik gliové jizvy a zánět. Pozitivní efekt kurkuminu na zachování šedé a bílé hmoty po poranění míchy nebyl prokázán, zato byla pozorována částečná redukce velikosti gliové jizvy okolo středu léze díky působení kurkuminu. Jako ukazatel zánětlivé odpovědi byla sledována aktivita transkripčního faktoru NF- κ B, která byla u skupiny léčené kurkuminem významně snížena.

Analýza genové exprese metodou qPCR prokázala u léčené skupiny významný pokles exprese genů pro GFAP a RANTES po 10 dnech od SCI, což je v souladu s předchozím pozorováním redukce velikosti gliové jizvy a inhibice zánětlivé odpovědi vlivem kurkuminu. Na druhou stranu byla u této skupiny ve stejném časovém úseku naměřena také zvýšená exprese genu pro IRF-5, který podporuje zánětlivou odpověď a polarizaci M1 makrofágů. Je možné, že právě tento faktor negativně ovlivňuje celkový efekt kurkuminu na poranění míchy. Exprese genu pro NF- κ B nebyla působením kurkuminu významně ovlivněna, což naznačuje, že mechanismus působení kurkuminu spočívá pouze v inhibici translokace tohoto faktoru a neomezuje jeho samotnou expresi.

Funkční výstupy testovaných zvířat byly zkoumány pomocí sady behaviorálních testů. Bylo prokázáno, že kurkumin zlepšoval základní motorické funkce léčených zvířat, a to zejména v časných stádiích po poranění míchy. Na pokročilejší motorické dovednosti, stejně jako na rozvoj hyperalgie, neměl kurkumin významný vliv.

Výsledky získané v této práci dokládají pozitivní efekt kurkuminu na poranění míchy, který se projevuje zejména redukcí velikosti gliové jizvy, potlačením zánětlivé odpovědi a zlepšením motorických funkcí. Tento efekt se uplatňuje převážně v časných stádiích vývoje poranění a se spíše mírnější intenzitou. Nabízí se tedy možnost kombinovat kurkumin s jinými léčebnými postupy, aby bylo dosaženo posílení celkového účinku. Terapeutický potenciál kurkuminu spolu s relativně snadnou dostupností z něj zároveň činí vhodný substrát pro další výzkum.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adachi, K., Y. Yimin, K. Satake, Y. Matsuyama, N. Ishiguro, M. Sawada, Y. Hirata and K. Kiuchi (2005). "Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord injury." *Neurosci Res* **51**(1): 73-80.
- Ansari, M. A. (2015). "Temporal profile of M1 and M2 responses in the hippocampus following early 24h of neurotrauma." *J Neurol Sci* **357**(1-2): 41-49.
- Azbill, R. D., X. Mu, A. J. Bruce-Keller, M. P. Mattson and J. E. Springer (1997). "Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury." *Brain Res* **765**(2): 283-290.
- Basso, D. M., M. S. Beattie and J. C. Bresnahan (1995). "A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats." *J Neurotrauma* **12**(1): 1-21.
- Becker, D., C. L. Sadowsky and J. W. McDonald (2003). "Restoring function after spinal cord injury." *Neurologist* **9**(1): 1-15.
- Bethea, J. R., M. Castro, R. W. Keane, T. T. Lee, W. D. Dietrich and R. P. Yeziarski (1998). "Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation." *J Neurosci* **18**(9): 3251-3260.
- Bracken, M. B., W. F. Collins, D. F. Freeman, M. J. Shepard, F. W. Wagner, R. M. Silten, K. G. Hellenbrand, J. Ransohoff, W. E. Hunt, P. L. Perot, Jr. and et al. (1984). "Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury." *JAMA* **251**(1): 45-52.
- Bracken, M. B., M. J. Shepard, W. F. Collins, T. R. Holford, W. Young, D. S. Baskin, H. M. Eisenberg, E. Flamm, L. Leo-Summers, J. Maroon and et al. (1990). "A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study." *N Engl J Med* **322**(20): 1405-1411.
- Bracken, M. B., M. J. Shepard, T. R. Holford, L. Leo-Summers, E. F. Aldrich, M. Fazl, M. Fehlings, D. L. Herr, P. W. Hitchon, L. F. Marshall, R. P. Nockels, V. Pascale, P. L. Perot, Jr., J. Piepmeier, V. K. Sonntag, F. Wagner, J. E. Wilberger, H. R. Winn and W. Young (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* **277**(20): 1597-1604.
- Bradbury, E. J., S. Khemani, R. Von, King, J. V. Priestley and S. B. McMahon (1999). "NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord." *Eur J Neurosci* **11**(11): 3873-3883.
- Bradbury, E. J., L. D. Moon, R. J. Popat, V. R. King, G. S. Bennett, P. N. Patel, J. W. Fawcett and S. B. McMahon (2002). "Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury." *Nature* **416**(6881): 636-640.
- Carlson, S. L., M. E. Parrish, J. E. Springer, K. Doty and L. Dossett (1998). "Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury." *Exp Neurol* **151**(1): 77-88.
- Castro, C. N., A. E. Barcala Tabarozzi, J. Winnewisser, M. L. Gimeno, M. Antunica Noguero, A. C. Liberman, D. A. Paz, R. A. Dewey and M. J. Perone (2014). "Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes." *Clin Exp Immunol* **177**(1): 149-160.
- Correa, F., M. Buelna-Chontal, S. Hernandez-Resendiz, W. R. Garcia-Nino, F. J. Roldan, V. Soto, A. Silva-Palacios, A. Amador, J. Pedraza-Chaverri, E. Tapia and C. Zazueta (2013). "Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease." *Free Radic Biol Med* **61**: 119-129.

- Dimar, J. R., 2nd, S. D. Glassman, G. H. Raque, Y. P. Zhang and C. B. Shields (1999). "The influence of spinal canal narrowing and timing of decompression on neurologic recovery after spinal cord contusion in a rat model." Spine (Phila Pa 1976) **24**(16): 1623-1633.
- Dvorak, M. F., V. K. Noonan, N. Fallah, C. G. Fisher, J. Finkelstein, B. K. Kwon, C. S. Rivers, H. Ahn, J. Paquet, E. C. Tsai, A. Townson, N. Attabib, C. S. Bailey, S. D. Christie, B. Drew, D. R. Fourny, R. Fox, R. J. Hurlbert, M. G. Johnson, A. G. Linassi, S. Parent and M. G. Fehlings (2015). "The influence of time from injury to surgery on motor recovery and length of hospital stay in acute traumatic spinal cord injury: an observational Canadian cohort study." J Neurotrauma **32**(9): 645-654.
- El-Bahr, S. M. (2015). "Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B1." Phytother Res **29**(1): 134-140.
- Festoff, B. W., S. Ameenuddin, P. M. Arnold, A. Wong, K. S. Santacruz and B. A. Citron (2006). "Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury." J Neurochem **97**(5): 1314-1326.
- Franzen, R., J. Schoenen, P. Leprince, E. Joosten, G. Moonen and D. Martin (1998). "Effects of macrophage transplantation in the injured adult rat spinal cord: a combined immunocytochemical and biochemical study." J Neurosci Res **51**(3): 316-327.
- Fu, Z., X. Chen, S. Guan, Y. Yan, H. Lin and Z. C. Hua (2015). "Curcumin inhibits angiogenesis and improves defective hematopoiesis induced by tumor-derived VEGF in tumor model through modulating VEGF-VEGFR2 signaling pathway." Oncotarget **6**(23): 19469-19482.
- Gensel, J. C. and B. Zhang (2015). "Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury." Brain Res **1619**: 1-11.
- Goldstein, B., J. W. Little and R. M. Harris (1997). "Axonal sprouting following incomplete spinal cord injury: an experimental model." J Spinal Cord Med **20**(2): 200-206.
- Gonzalez, R., J. Glaser, M. T. Liu, T. E. Lane and H. S. Keirstead (2003). "Reducing inflammation decreases secondary degeneration and functional deficit after spinal cord injury." Exp Neurol **184**(1): 456-463.
- Gorio, A., N. Gokmen, S. Erbayraktar, O. Yilmaz, L. Madaschi, C. Cichetti, A. M. Di Giulio, E. Vardar, A. Cerami and M. Brines (2002). "Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9450-9455.
- Grossman, S. D., L. J. Rosenberg and J. R. Wrathall (2001). "Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion." Exp Neurol **168**(2): 273-282.
- Han, X., M. Lu, S. Wang, D. Lv and H. Liu (2012). "Targeting IKK/NF-kappaB pathway reduces infiltration of inflammatory cells and apoptosis after spinal cord injury in rats." Neurosci Lett **511**(1): 28-32.
- Hatano, E., B. L. Bennett, A. M. Manning, T. Qian, J. J. Lemasters and D. A. Brenner (2001). "NF-kappaB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis." Gastroenterology **120**(5): 1251-1262.
- Hesp, Z. C., E. Z. Goldstein, C. J. Miranda, B. K. Kaspar and D. M. McTigue (2015). "Chronic oligodendrogenesis and remyelination after spinal cord injury in mice and rats." J Neurosci **35**(3): 1274-1290.
- Hiscott, J., J. Marois, J. Garoufalis, M. D'Addario, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, G. Bensi and et al. (1993). "Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop." Mol Cell Biol **13**(10): 6231-6240.

- Hong, J., M. Bose, J. Ju, J. H. Ryu, X. Chen, S. Sang, M. J. Lee and C. S. Yang (2004). "Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase." *Carcinogenesis* **25**(9): 1671-1679.
- Hong, J. Y., S. H. Lee, S. C. Lee, J. W. Kim, K. P. Kim, S. M. Kim, N. Tapia, K. T. Lim, J. Kim, H. S. Ahn, K. Ko, C. Y. Shin, H. T. Lee, H. R. Scholer, J. K. Hyun and D. W. Han (2014). "Therapeutic potential of induced neural stem cells for spinal cord injury." *J Biol Chem* **289**(47): 32512-32525.
- Horn, K. P., S. A. Busch, A. L. Hawthorne, N. van Rooijen and J. Silver (2008). "Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions." *J Neurosci* **28**(38): 9330-9341.
- Hurlbert, R. J. (2000). "Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care." *J Neurosurg* **93**(1 Suppl): 1-7.
- Chehrehasa, F., M. Cobcroft, Y. W. Young, A. Mackay-Sim and B. Goss (2014). "An acute growth factor treatment that preserves function after spinal cord contusion injury." *J Neurotrauma* **31**(21): 1807-1813.
- Chen, A., X. M. Xu, N. Kleitman and M. B. Bunge (1996). "Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord." *Exp Neurol* **138**(2): 261-276.
- Chung, J., M. H. Kim, Y. J. Yoon, K. H. Kim, S. R. Park and B. H. Choi (2014). "Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on glial scar formation after spinal cord injury in rats." *J Neurosurg Spine* **21**(6): 966-973.
- Jamme, I., E. Petit, D. Divoux, A. Gerbi, J. M. Maixent and A. Nouvelot (1995). "Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals." *Neuroreport* **7**(1): 333-337.
- Jiang, A. J., G. Jiang, L. T. Li and J. N. Zheng (2015). "Curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human melanoma cells." *Mol Biol Rep* **42**(1): 267-275.
- Jin, H. J., Y. K. Bae, M. Kim, S. J. Kwon, H. B. Jeon, S. J. Choi, S. W. Kim, Y. S. Yang, W. Oh and J. W. Chang (2013). "Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy." *Int J Mol Sci* **14**(9): 17986-18001.
- Jin, W., J. Wang, T. Zhu, B. Yuan, H. Ni, J. Jiang, H. Wang and W. Liang (2014). "Anti-inflammatory effects of curcumin in experimental spinal cord injury in rats." *Inflamm Res* **63**(5): 381-387.
- Jobin, C., C. A. Bradham, M. P. Russo, B. Juma, A. S. Narula, D. A. Brenner and R. B. Sartor (1999). "Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity." *J Immunol* **163**(6): 3474-3483.
- Kang, D., B. Li, L. Luo, W. Jiang, Q. Lu, M. Rong and R. Lai (2016). "Curcumin shows excellent therapeutic effect on psoriasis in mouse model." *Biochimie* **123**: 73-80.
- Khopde, M. S., K. I. Priyadarsini, P. Venkatesan and M. N. Rao (1999). "Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue." *Biophys Chem* **80**(2): 85-91.
- Kim, B. G., H. N. Dai, J. V. Lynskey, M. McAtee and B. S. Bregman (2006). "Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans potentiates transplant-mediated axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury in adult rats." *J Comp Neurol* **497**(2): 182-198.

- Kim, K. T., M. J. Kim, D. C. Cho, S. H. Park, J. H. Hwang, J. K. Sung, H. J. Cho and Y. Jeon (2014). "The neuroprotective effect of treatment with curcumin in acute spinal cord injury: laboratory investigation." *Neurol Med Chir (Tokyo)* **54**(5): 387-394.
- Klapka, N., S. Hermanns, G. Straten, C. Masanneck, S. Duis, F. P. Hamers, D. Muller, W. Zusratter and H. W. Muller (2005). "Suppression of fibrous scarring in spinal cord injury of rat promotes long-distance regeneration of corticospinal tract axons, rescue of primary motoneurons in somatosensory cortex and significant functional recovery." *Eur J Neurosci* **22**(12): 3047-3058.
- Krausgruber, T., K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann and I. A. Udalova (2011). "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." *Nat Immunol* **12**(3): 231-238.
- Krausz, A. E., B. L. Adler, V. Cabral, M. Navati, J. Doerner, R. A. Charafeddine, D. Chandra, H. Liang, L. Gunther, A. Clendaniel, S. Harper, J. M. Friedman, J. D. Nosanchuk and A. J. Friedman (2015). "Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent." *Nanomedicine* **11**(1): 195-206.
- Lau, D., S. E. Harte, T. J. Morrow, S. Wang, M. Mata and D. J. Fink (2012). "Herpes simplex virus vector-mediated expression of interleukin-10 reduces below-level central neuropathic pain after spinal cord injury." *Neurorehabil Neural Repair* **26**(7): 889-897.
- Lazar, A. N., S. Mourtas, I. Youssef, C. Parizot, A. Dauphin, B. Delatour, S. G. Antimisiaris and C. Duyckaerts (2013). "Curcumin-conjugated nanoliposomes with high affinity for Abeta deposits: possible applications to Alzheimer disease." *Nanomedicine* **9**(5): 712-721.
- Lee, J. H., S. Tigchelaar, J. Liu, A. M. Stammers, F. Streijger, W. Tetzlaff and B. K. Kwon (2010). "Lack of neuroprotective effects of simvastatin and minocycline in a model of cervical spinal cord injury." *Exp Neurol* **225**(1): 219-230.
- Liu, D., G. Y. Xu, E. Pan and D. J. McAdoo (1999). "Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury." *Neuroscience* **93**(4): 1383-1389.
- Liu, L., Y. Shang, M. Li, X. Han and J. Wang (2015). "Curcumin ameliorates asthmatic airway inflammation by activating nuclear factor-E2-related factor 2/haem oxygenase (HO)-1 signalling pathway." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **42**(5): 520-529.
- Liu, S., G. L. Ruenes and R. P. Yeziarski (1997). "NMDA and non-NMDA receptor antagonists protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord." *Brain Res* **756**(1-2): 160-167.
- Liu, T., J. D. Houle, J. Xu, B. P. Chan and S. Y. Chew (2012). "Nanofibrous collagen nerve conduits for spinal cord repair." *Tissue Eng Part A* **18**(9-10): 1057-1066.
- Liu, X. Z., X. M. Xu, R. Hu, C. Du, S. X. Zhang, J. W. McDonald, H. X. Dong, Y. J. Wu, G. S. Fan, M. F. Jacquin, C. Y. Hsu and D. W. Choi (1997). "Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury." *J Neurosci* **17**(14): 5395-5406.
- Liu, Y., D. Kim, B. T. Himes, S. Y. Chow, T. Schallert, M. Murray, A. Tessler and I. Fischer (1999). "Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function." *J Neurosci* **19**(11): 4370-4387.
- Lu, P., L. L. Jones, E. Y. Snyder and M. H. Tuszynski (2003). "Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury." *Exp Neurol* **181**(2): 115-129.
- Ma, S. F., Y. J. Chen, J. X. Zhang, L. Shen, R. Wang, J. S. Zhou, J. G. Hu and H. Z. Lu (2015). "Adoptive transfer of M2 macrophages promotes locomotor recovery in adult rats after spinal cord injury." *Brain Behav Immun* **45**: 157-170.

- Maier, I. C., R. M. Ichiyama, G. Courtine, L. Schnell, I. Lavrov, V. R. Edgerton and M. E. Schwab (2009). "Differential effects of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training in rats with incomplete spinal cord injury." Brain **132**(Pt 6): 1426-1440.
- Marcol, W., W. Slusarczyk, M. Larysz-Brysz, T. Francuz, H. Jedrzejowska-Szypulka, K. Labuzek and J. Lewin-Kowalik (2015). "Grafted Activated Schwann Cells Support Survival of Injured Rat Spinal Cord White Matter." World Neurosurg **84**(2): 511-519.
- Mohajeri, M., M. Sadeghizadeh, F. Najafi and M. Javan (2015). "Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair." Neuropharmacology **99**: 156-167.
- Mothe, A. J. and C. H. Tator (2012). "Advances in stem cell therapy for spinal cord injury." J Clin Invest **122**(11): 3824-3834.
- Nakamura, M., R. A. Houghtling, L. MacArthur, B. M. Bayer and B. S. Bregman (2003). "Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord." Exp Neurol **184**(1): 313-325.
- Neerati, P., R. Devde and A. K. Gangi (2014). "Evaluation of the effect of curcumin capsules on glyburide therapy in patients with type-2 diabetes mellitus." Phytother Res **28**(12): 1796-1800.
- Nori, S., Y. Okada, A. Yasuda, O. Tsuji, Y. Takahashi, Y. Kobayashi, K. Fujiyoshi, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Ikeda, Y. Toyama, S. Yamanaka, M. Nakamura and H. Okano (2011). "Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(40): 16825-16830.
- Onoda, M. and H. Inano (2000). "Effect of curcumin on the production of nitric oxide by cultured rat mammary gland." Nitric Oxide **4**(5): 505-515.
- Ormond, D. R., H. Peng, R. Zeman, K. Das, R. Murali and M. Jhanwar-Uniyal (2012). "Recovery from spinal cord injury using naturally occurring antiinflammatory compound curcumin: laboratory investigation." J Neurosurg Spine **16**(5): 497-503.
- Ormond, D. R., C. Shannon, J. Oppenheim, R. Zeman, K. Das, R. Murali and M. Jhanwar-Uniyal (2014). "Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury." PLoS One **9**(2): e88916.
- Oyinbo, C. A. (2011). "Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade." Acta Neurobiol Exp (Wars) **71**(2): 281-299.
- Pannu, R., E. Barbosa, A. K. Singh and I. Singh (2005). "Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats." J Neurosci Res **79**(3): 340-350.
- Popovich, P. G., P. Wei and B. T. Stokes (1997). "Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats." J Comp Neurol **377**(3): 443-464.
- Rao, Y. J., W. X. Zhu, Z. Q. Du, C. X. Jia, T. X. Du, Q. A. Zhao, X. Y. Cao and Y. J. Wang (2014). "Effectiveness of olfactory ensheathing cell transplantation for treatment of spinal cord injury." Genet Mol Res **13**(2): 4124-4129.
- Růžička, J., N. Romanyuk, A. Hejčl, M. Vetrík, M. Hrubý, G. Cocks, J. Cihlár, M. Prádný, J. Price, E. Syková and P. Jendelová (2013). "Treating spinal cord injury in rats with a combination of human fetal neural stem cells and hydrogels modified with serotonin." Acta Neurobiol Exp (Wars) **73**(1): 102-115.
- Saglam, A., A. Perets, A. C. Canver, H. L. Li, K. Kollins, G. Cohen, I. Fischer, P. Lazarovici and P. I. Lelkes (2013). "Angioneural crosstalk in scaffolds with oriented microchannels for regenerative spinal cord injury repair." J Mol Neurosci **49**(2): 334-346.

- Salewski, R. P., R. A. Mitchell, C. Shen and M. G. Fehlings (2015). "Transplantation of neural stem cells clonally derived from embryonic stem cells promotes recovery after murine spinal cord injury." Stem Cells Dev **24**(1): 36-50.
- Shakhov, A. N., M. A. Collart, P. Vassalli, S. A. Nedospasov and C. V. Jongeneel (1990). "Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages." J Exp Med **171**(1): 35-47.
- Shihabuddin, L. S., P. J. Horner, J. Ray and F. H. Gage (2000). "Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus." J Neurosci **20**(23): 8727-8735.
- Shishodia, S., G. Sethi and B. B. Aggarwal (2005). "Curcumin: getting back to the roots." Ann N Y Acad Sci **1056**: 206-217.
- Sparling, J. S., F. Bretzner, J. Biernaskie, P. Assinck, Y. Jiang, H. Arisato, W. T. Plunet, J. Borisoff, J. Liu, F. D. Miller and W. Tetzlaff (2015). "Schwann cells generated from neonatal skin-derived precursors or neonatal peripheral nerve improve functional recovery after acute transplantation into the partially injured cervical spinal cord of the rat." J Neurosci **35**(17): 6714-6730.
- Stachelscheid, H., A. Wulf-Goldenberg, K. Eckert, J. Jensen, J. Edsbacke, P. Bjorquist, M. Rivero, R. Strehl, J. Jozefczuk, A. Prigione, J. Adjaye, T. Urbaniak, P. Bussmann, K. Zeilinger and J. C. Gerlach (2013). "Teratoma formation of human embryonic stem cells in three-dimensional perfusion culture bioreactors." J Tissue Eng Regen Med **7**(9): 729-741.
- Stirling, D. P., S. Liu, P. Kubers and V. W. Yong (2009). "Depletion of Ly6G/Gr-1 leukocytes after spinal cord injury in mice alters wound healing and worsens neurological outcome." J Neurosci **29**(3): 753-764.
- Streit, W. J., S. L. Semple-Rowland, S. D. Hurley, R. C. Miller, P. G. Popovich and B. T. Stokes (1998). "Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis." Exp Neurol **152**(1): 74-87.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.
- Taoka, Y., K. Okajima, M. Uchiba, K. Murakami, S. Kushimoto, M. Johno, M. Naruo, H. Okabe and K. Takatsuki (1997). "Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat." Neuroscience **79**(4): 1177-1182.
- Totoiu, M. O. and H. S. Keirstead (2005). "Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination." J Comp Neurol **486**(4): 373-383.
- Tuszynski, M. H., K. Gabriel, F. H. Gage, S. Suhr, S. Meyer and A. Rosetti (1996). "Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury." Exp Neurol **137**(1): 157-173.
- Vasconcelos, D. P., M. Costa, I. F. Amaral, M. A. Barbosa, A. P. Aguas and J. N. Barbosa (2015). "Modulation of the inflammatory response to chitosan through M2 macrophage polarization using pro-resolution mediators." Biomaterials **37**: 116-123.
- Vaughn, C. N., J. L. Iafrate, J. B. Henley, E. K. Stevenson, I. G. Shlifer and T. B. Jones (2013). "Cellular neuroinflammation in a lateral forceps compression model of spinal cord injury." Anat Rec (Hoboken) **296**(8): 1229-1246.
- Vaziri, N. D., Y. S. Lee, C. Y. Lin, V. W. Lin and R. K. Sindhu (2004). "NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury." Brain Res **995**(1): 76-83.

- Venugopal, R. and A. K. Jaiswal (1998). "Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes." *Oncogene* **17**(24): 3145-3156.
- Wang, Y. F., J. N. Zu, J. Li, C. Chen, C. Y. Xi and J. L. Yan (2014). "Curcumin promotes the spinal cord repair via inhibition of glial scar formation and inflammation." *Neurosci Lett* **560**: 51-56.
- Wanner, I. B., M. A. Anderson, B. Song, J. Levine, A. Fernandez, Z. Gray-Thompson, Y. Ao and M. V. Sofroniew (2013). "Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury." *J Neurosci* **33**(31): 12870-12886.
- Wells, J. E., R. J. Hurlbert, M. G. Fehlings and V. W. Yong (2003). "Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice." *Brain* **126**(Pt 7): 1628-1637.
- Williams, R. R., M. Henao, D. D. Pearse and M. B. Bunge (2015). "Permissive Schwann cell graft/spinal cord interfaces for axon regeneration." *Cell Transplant* **24**(1): 115-131.
- Wilmot, C. B. and K. M. Hall (1986). "Evaluation of the acute management of tetraplegia: conservative versus surgical treatment." *Paraplegia* **24**(3): 148-153.
- Woerly, S., V. D. Doan, F. Evans-Martin, C. G. Paramore and J. D. Peduzzi (2001). "Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury." *J Neurosci Res* **66**(6): 1187-1197.
- Wolf, S. A., J. Fisher, I. Bechmann, B. Steiner, E. Kwidzinski and R. Nitsch (2002). "Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state." *J Neuroimmunol* **133**(1-2): 72-80.
- Wongcharoen, W., S. Jai-Aue, A. Phrommintikul, W. Nawarawong, S. Woragidpoonpol, T. Tepsuwan, A. Sukonthasarn, N. Apajjai and N. Chattipakorn (2012). "Effects of curcuminoids on frequency of acute myocardial infarction after coronary artery bypass grafting." *Am J Cardiol* **110**(1): 40-44.
- Xu, J., G. Fan, S. Chen, Y. Wu, X. M. Xu and C. Y. Hsu (1998). "Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats." *Brain Res Mol Brain Res* **59**(2): 135-142.
- Xu, W., L. Chi, R. Xu, Y. Ke, C. Luo, J. Cai, M. Qiu, D. Gozal and R. Liu (2005). "Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury." *Spinal Cord* **43**(4): 204-213.
- Yoon, S. H., Y. S. Shim, Y. H. Park, J. K. Chung, J. H. Nam, M. O. Kim, H. C. Park, S. R. Park, B. H. Min, E. Y. Kim, B. H. Choi, H. Park and Y. Ha (2007). "Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial." *Stem Cells* **25**(8): 2066-2073.
- Yu, D. S., Y. Cao, X. F. Mei, Y. F. Wang, Z. K. Fan, Y. S. Wang and G. Lv (2014). "Curcumin improves the integrity of blood-spinal cord barrier after compressive spinal cord injury in rats." *J Neurol Sci* **346**(1-2): 51-59.
- Yuan, J., M. Zou, X. Xiang, H. Zhu, W. Chu, W. Liu, F. Chen and J. Lin (2015). "Curcumin improves neural function after spinal cord injury by the joint inhibition of the intracellular and extracellular components of glial scar." *J Surg Res* **195**(1): 235-245.
- Zanotto-Filho, A., E. Braganhol, M. I. Edelweiss, G. A. Behr, R. Zanin, R. Schroder, A. Simoes-Pires, A. M. Battastini and J. C. Moreira (2012). "The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma." *J Nutr Biochem* **23**(6): 591-601.
- Zeng, C., P. Zhong, Y. Zhao, K. Kanchana, Y. Zhang, Z. A. Khan, S. Chakrabarti, L. Wu, J. Wang and G. Liang (2015). "Curcumin protects hearts from FFA-induced injury by

activating Nrf2 and inactivating NF-kappaB both in vitro and in vivo." J Mol Cell Cardiol **79**: 1-12.

Zhang, C., X. R. Yuan, H. Y. Li, Z. J. Zhao, Y. W. Liao, X. Y. Wang, J. Su, S. S. Sang and Q. Liu (2014). "Downregulation of dynamin-related protein 1 attenuates glutamate-induced excitotoxicity via regulating mitochondrial function in a calcium dependent manner in HT22 cells." Biochem Biophys Res Commun **443**(1): 138-143.

Zhou, Z., X. Peng, R. Insolera, D. J. Fink and M. Mata (2009). "IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury." Exp Neurol **220**(1): 183-190.

Internetové zdroje:

Spinal Cord Anatomy. In: *Human Body Info* [online]. 2015 [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <http://humananatomybody.info/spinal-cord-anatomy/>

Statistiky. In: *Česká společnost pro míšňí léze ČLS JEP* [online]. 2016 [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <http://www.spinalcord.cz/cz/statistiky/>

10 PŘÍLOHY

Příloha 1. Stupnice od 0 do 21 bodů používaná v BBB testu. Definice jednotlivých kategorií i vysvětlivky frází ponechány v originálním anglickém znění (Basso, 1995).

| Score | Definition |
|-------|--|
| 0 | No observable hindlimb (HL) movement |
| 1 | Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee |
| 2 | Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint and slight movement of one other joint |
| 3 | Extensive movement of two joints |
| 4 | Slight movement of all three joints of the HL |
| 5 | Slight movement of two joints and extensive movement of the third |
| 6 | Extensive movement of two joints and slight movement of the third |
| 7 | Extensive movement of all three joints of the HL |
| 8 | Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support |
| 9 | Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight supported dorsal stepping and no plantar stepping |
| 10 | Occasional weight supported plantar steps, no forelimb (FL)-HL coordination |
| 11 | Frequent to consistent weight supported plantar steps and no FL-HL coordination |
| 12 | Frequent to consistent weight supported plantar steps and occasional FL-HL coordination |
| 13 | Frequent to consistent weight supported plantar steps and frequent FL-HL coordination |
| 14 | Consistent weight supported plantar steps, consistent FL-HL coordination; and predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes initial contact with the surface as well as just before it is lifted off at the end of stance or frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and occasional dorsal stepping |
| 15 | Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination; and no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact |
| 16 | Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait; and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off |
| 17 | Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait; and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and lift off |

| | |
|----|--|
| 18 | Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait; and toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off |
| 19 | Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait; and toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and lift off; and tail is down part or all of the time |
| 20 | Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait; consistent toe clearance; predominant paw position is parallel at initial contact and lift off; tail consistently up; and trunk instability |
| 21 | Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, consistent trunk stability, tail consistently up |

Slight: partial joint movement through less than half the range of joint motion

Extensive: movement through more than half of the range of joint motion

Sweeping: rhythmic movement of HL in which all three joints are extended, then fully flex and extend again; animal is usually sidelying, the plantar surface of paw may or may not contact the ground; no weight support across the HL is evident

No Weight Support: no contraction of the extensor muscles of the HL during plantar placement of the paw; or no elevation of the hindquarter

Weight Support: contraction of the extensor muscles of the HL during plantar placement of the paw, or elevation of the hindquarter

Plantar Stepping: The paw is in plantar contact with weight support then the HL is advanced forward and plantar contact with weight support is reestablished

Dorsal Stepping: weight is supported through the dorsal surface of the paw at some point in the step cycle

FL-HL Coordination: for every FL step an HL step is taken and the HLs alternate

Occasional: less than or equal to half; <50%

Frequent: more than half but not always; 51-94%

Consistent: nearly always or always; 95-100%

Trunk Instability: lateral weight shifts that cause waddling from side to side or a partial collapse of the trunk

Příloha 2. Stupnice od 0 do 7 bodů používaná ve flat beam testu. Ponecháno v původním anglickém znění.

| Score | Definition |
|--------------|--|
| 0 | The rat is unable to place the affected hind paw on the horizontal surface of the beam, and its hind body falls off the beam in less than 60 s |
| 1 | The rat is unable to start traversing the beam, but keeps its body on the beam for 60 s |
| 2 | The rat traverses half of the beam dragging its hindlimbs |
| 3 | The rat traverses the whole length of the beam dragging its hindlimbs |
| 4 | The rat traverses the whole length of the beam and one of two hindlimbs is placed on the beam |
| 5 | The rat traverses the whole length of the beam and places both hindlimbs to aid less than half of its steps |
| 6 | The rat traverses the whole length of the beam and places both hindlimbs to aid more than half of its steps |
| 7 | The rat traverses the whole length of the beam with no more than 2 footslips |

Příloha 3. Použité TaqMan® Gene Expression Assays.

| Gen | Assay ID |
|----------------------|-----------------|
| <i>Gapdh</i> | Rn01775763_g1 |
| <i>Sort1 (Nt3)</i> | Rn01521847_m1 |
| <i>Fgf2</i> | Rn00570809_m1 |
| <i>Olig2</i> | Rn01767116_m1 |
| <i>Gap43</i> | Rn01474579_m1 |
| <i>Gfap</i> | Rn00566603_m1 |
| <i>Vegf</i> | Rn01511601_m1 |
| <i>Nfkb1</i> | Rn01399572_m1 |
| <i>Cntf</i> | Rn00755092_m1 |
| <i>Mip1a (Ccl3)</i> | Rn01464736_g1 |
| <i>Rantes (Ccl5)</i> | Rn00579590_m1 |
| <i>CD86</i> | Rn00571654_m1 |
| <i>CD163</i> | Rn01492519_m1 |
| <i>Irf5</i> | Rn01500522_m1 |
| <i>Mrc1</i> | Rn01487342_m1 |

Příloha 4. Ilustrační snímky k histologické a imunohistochemické analýze. Měřítka: 500 μm .

A: Znárodnění šedé a bílé hmoty. **B:** Barvení proteinu GFAP pro znárodnění gliové jizvy. **C:** Barvení proteinu GAP-43 pro znárodnění axonálního pučení. **D:** Barvení proteinu NF- κB (p65 podjednotky). Podrobnější informace ohledně barvení a použitých mikroskopů v kapitole Materiál a metody.

