

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Neuropatická bolest a imunoreaktivní dynamika: Zkoumání vlivu paklitaxelu na makrofágy mozkových komor

**Evelína Voleská
Pardubický kraj**

Česká Třebová 2023/2024

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Neuropatická bolest a imunoreaktivní dynamika: Zkoumání vlivu paclitaxelu na makrofágy mozkových komor

Neuropathic pain and immunoreactive dynamics: Investigating the influence of paclitaxel on brain ventricle macrophages

Autoři: Evelína Voleská
Škola: Gymnázium Česká Třebová
Tyršovo náměstí 970
560 02 Česká Třebová
Kraj: Pardubický kraj
Konzultant: M.Sc. Parisa EmamiAref
Alemeh Zamani, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

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

V České Třebové dne 30. 1. 2024

Evelína Voleská

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své poděkování především mé školitelce **M.Sc. Parise EmmamiAref** za odborné vedení mé práce, vlídný přístup, obětavost, investovaný čas a věnovanou podporu.

Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu **Anatomického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity** za vřelou atmosféru a vůbec za poskytnutí možnosti spolupráce. Jmenovitě děkuji **Alemeh Zamani, Ph.D.** za cenné konzultace a vynaložené úsilí, **doc. MUDr. Marku Joukalovi** za odborné poznatky, **MVDr. Lucii Kubíčkové, Ph.D.** za pomoc s experimentální částí práce, **Martě Lněničkové** za pomoc s imunohistochemickými metodami a **Lumíru Trenčanskému** za věcné připomínky.

V neposlední řadě bych také ráda poděkovala **Martinu Vašíčkovi** a **Vlastimilu Dlouhému** za pomoc s technickou stránkou práce a **PaedDr. Haně Grundové** za konzultace formální úpravy práce.

Velké poděkování patří také **Karolíně Jeřábkové** za ochotné odpovědi na mé otázky, **kamarádům**, ale především mé **rodině** za neustálou podporu.

Anotace

Neuropatická bolest je hlavním problémem postihujícím více než polovinu pacientů podstupujících chemoterapii. Přesto dodnes stále neexistuje efektivní léčba nebo řešení takového stavu. Z literatury, zabývající se tímto tématem, plyne, že různé faktory, zahrnující, mimo jiné, zánětlivé reakce, hrají nemalou roli v průběhu neuropatické bolesti. Způsob, jakým se zánět či bolest šíří mezi periferní nervovou soustavou a centrální nervovou soustavou zůstává neznámý. Choroidální plexus patří k málo prostudovaným strukturám, je ovšem známo, že se nemalým dílem podílí na průběhu inflamace. Předpokladem této práce bylo, že Kolmerovy buňky (imunitní buňky choroidálního plexu) mohou uvolňováním cytokinů ovlivňovat i počty makrofágů stěn mozkových komor. Cílem práce bylo zkoumat změny počtů takových makrofágů po aplikaci paklitaxelu. Za pomoci *in vivo* potkaního modelu neuropatické bolesti indukované paklitaxelem a imunohistochemických metod bylo zjišťováno, zda a jak se mění počty detekovaných aktivovaných (ED1+, proinflamatorních) a rezidentních (ED2+, protiinflamatorních) makrofágů ependymální vrstvy mozkových komor v průběhu neuroinflamace, která běžně propuká po léčbě chemoterapií a zdá se hrát klíčovou roli v průběhu neuropatické bolesti. Výsledky naznačují početní nárůst makrofágů po aplikaci paklitaxelu daném pozorovaném období (21 dní). Zvýšené počty poukazují na probíhající inflamaci, která přispívá k rozvoji neuropatie. Dále může docházet k ovlivnění složení mozkomíšního moku a funkcí choroidálního plexu. Ke konci sledovaného období převažují rezidentní makrofágy nad aktivovanými, k jejich převaze dochází kolem 7. dne, který v práci figuruje jako pomyslný mezník událostí. Přínosem této práce jsou nové informace přispívající k objasnění role imunoreaktivní dynamiky, konkrétně makrofágů mozkových komor.

Klíčová slova

Neuropatická bolest indukovaná paklitaxelem; neuroinflamace; makrofágy; choroidální plexus; ependym

Annotation

Neuropathic pain is a major problem affecting more than half of patients undergoing chemotherapy. Yet, there is still no effective treatment or solution for such a condition. From the literature dealing with this topic, it follows, that various factors, including, but not limited to, inflammatory reactions, play a significant role in the course of neuropathic pain. How inflammation or pain spreads between the peripheral and central nervous systems remains unknown. The choroid plexus is one of the least studied structures, but it is known that it plays a significant role in the course of inflammation. The premise of this work was that Kolmer cells (immune cells of the choroid plexus) can also influence the number of macrophages in the walls of the cerebral ventricles by releasing cytokines. The work aimed to investigate the changes in the numbers of such macrophages after the application of paclitaxel. Using an *in vivo* rat model of paclitaxel-induced neuropathic pain and immunohistochemical methods, it was determined whether and how the numbers of detected activated (ED1+, proinflammatory) and resident

(ED2+, antiinflammatory) macrophages of the ependymal layer of the cerebral ventricles change during neuroinflammation, which commonly erupts after treatment chemotherapy and appears to play a key role in the course of neuropathic pain. The results indicate a numerical increase of macrophages after applying paclitaxel for the observed period (21 days). Elevated numbers point to ongoing inflammation that contributes to the development of neuropathy. Furthermore, the composition of the cerebrospinal fluid and the functions of the choroid plexus may be affected. Towards the end of the monitored period, resident macrophages predominate over activated ones, their predominance occurs around day 7, which figures in the work as an imaginary landmark of events. The contribution of this work is new information contributing to the clarification of the role of immunoreactive dynamics, specifically macrophages of the cerebral ventricles.

Keywords

Paclitaxel-induced neuropathic pain; neuroinflammation; macrophages; choroid plexus; ependym

OBSAH

Obsah	7
Seznam použitých zkratk	10
1 Úvod	11
2 Teoretická část	13
2.1 Neuropatická bolest vyvolaná chemoterapií.....	13
2.1.1 Rakovina a její léčba	13
2.1.2 Paklitaxel a mechanismy jeho účinků	13
2.1.2.1 Paklitaxel v kontextu buněčného cyklu	14
2.1.2.2 Ovlivněné mikrotubuly	14
2.1.3 Mechanismy šíření neuropatické bolesti	15
2.1.3.1 Spinální ganglion.....	16
2.1.3.2 Reaktivní formy kyslíku	16
2.1.3.3 Mitochondrie	17
2.1.3.4 Axony a Schwannovy buňky	17
2.1.3.5 Mikroglie, astrocyty a satelitní gliové buňky	18
2.1.4 Potenciální léčba neuropatické bolesti	19
2.2 Neuroinflamace	19
2.2.1 Hematoencefalická bariéra	20
2.2.2 Hematolikvorová bariéra	20
2.2.3 Imunitní buňky v průběhu neuroinflamace	21
2.2.4 DAMPs.....	21
2.2.4.1 Mitochondriální DNA.....	21
2.2.5 Následky neuroinflamace	21
2.3 Choroidální plexus.....	22
2.3.1 Lokace	22
2.3.2 Struktura	22
2.3.3 Ependymální buňky.....	23
2.3.4 Funkce	24
2.3.4.1 Produkce mozkomíšního moku	25
2.3.4.2 Formování hematolikvorové bariéry	25
2.3.5 Kolmerovy buňky.....	25

2.3.5.1	Historie	25
2.3.5.2	Původ	26
2.3.5.3	Aktivita	26
2.4	Makrofágy mozkových komor	26
2.4.1.1	Původ	26
2.4.1.2	Funkce	26
2.4.1.3	Polarizace makrofágů	27
2.4.1.4	Rezidentní a aktivované makrofágy v průběhu inflamace	27
3	Hypotéza.....	28
4	Cíle práce	29
5	Materiál.....	30
5.1	<i>In vivo</i> model	30
5.2	Reagencie.....	31
5.3	Protilátky	31
5.4	Laboratorní vybavení.....	32
5.5	Software.....	32
6	Metody.....	33
6.1	Příprava zvířat a chirurgický zákrok.....	33
6.2	Imunohistochemie	33
6.2.1	Detekce makrofágů	34
6.2.1.1	Aktivované makrofágy	34
6.2.1.2	Rezidentní makrofágy.....	35
6.3	Fluorescenční mikroskopie.....	35
6.3.1	Vizualizace	35
6.4	Analýza dat.....	36
7	Výsledky	38
7.1	ED1	39
7.1.1	Paklitaxel.....	40
7.1.2	Vehikulum.....	40
7.2	ED2.....	41
7.2.1	Paklitaxel.....	42
7.2.2	Vehikulum.....	42
7.3	ED1/ED2	43

7.3.1	Paklitaxel	43
7.3.2	Vehikulum	44
8	Diskuze	45
9	Závěr.....	52
10	Seznam použité literatury	54
11	Seznam použitých internetových zdrojů	65
12	Seznam obrázků	66
13	Seznam tabulek.....	67
14	Přílohy	68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACC	anteriorní cingulární kortex (anterior cingular cortex)
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BBB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
B-CSFB	hematolikvorová bariéra (blood-cerebrospinal fluid barrier)
CNS	centrální nervová soustava (central nervous systém)
CP	choroidální plexus (choroid plexus)
CSF	mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid)
DAMPs patterns)	molekulární vzory spojené s poškozením (damage-associated molecular patterns)
DRG	spinální ganglion (dorsal root ganglia)
GJs	mezerové spoje (gap junctions)
IHC	imunohistochemie (immunohistochemistry)
JAMs	junkční adhezní molekuly (junctional adhesion molecules)
KCs	Kolmerovy buňky/epiplexové buňky (Kolmer cells/epiplexus cells)
mtDNA	mitochondriální DNA (mitochondrial DNA)
PAMPs patterns)	molekulární vzory asociované s patogeny (pathogen-associated molecular patterns)
PIP peripheral neuropathic)	periferní neuropatická bolest vyvolaná paklitaxelem (paclitaxel induced peripheral neuropathic)
PNS	periferní nervová soustava (peripheral nervous systém)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
TJs	těsné spoje (tight junctions)
TLR	toll-like receptory (toll-like receptors)

1 ÚVOD

Rakovina dnes představuje celosvětově rozšířený problém, toto onemocnění je charakterizováno jako nekontrolované množení buněk. V této době existuje mnoho možností a způsobů, jak rakovinu léčit (Patel 2020; Debela *et al.* 2021). Různé druhy rakoviny jako jsou rakovina prsu ovarií, či plic jsou běžně léčeny paklitaxelem, nejvíce používaným taxanem. Taxany jsou mikrotubuly stabilizující činidla, která ačkoliv jsou vysoce efektivní v blokaci progresu nádorových onemocnění, jsou příčinou vedlejších účinků chemoterapie, včetně periferní neuropatie, která je pozorována až u 60–70 % pacientů podstupujících léčbu. Neuropatie indukovaná paklitaxelem (a jinými chemoterapeutickými činidly) je hlavním důvodem dřívějšího ukončení této léčby. Mezi symptomy neuropatické bolesti se řadí bolest, necitlivost, brnění, či citlivost na chlad, mnoho pacientů také zažívá alodynii – stav, při kterém běžné podněty vyvolávají bolestivé reakce. Momentálně, ale bohužel neexistuje žádný efektivní způsob léčby těchto stavů a stále není zcela objasněno, jak přesně centrální nervový systém reaguje na léčbu paklitaxelem (Staff *et al.* 2020).

Paklitaxelem vyvolaná neuropatická bolest je často spojována s neuroinflamací (neurozánětem) v centrální a periferní nervové soustavě (Kalynovska *et al.* 2020). Neuroinflamace je vrozený obranný mechanismus jedince, sloužící k obnovení normální struktury a funkce mozku a ochraně před infekcí a poškozením (More *et al.* 2013). O ochranu centrální nervové soustavy proti škodlivým látkám v krvi se stará hematolikvorová bariéra a hematoencefalická bariéra. Existuje značné množství důkazů prokazujících, že i méně prozkoumaná hematolikvorová bariéra hraje klíčovou roli při šíření zánětlivých reakcí z periferní do centrální nervové soustavy (Solár *et al.* 2020). Hematolikvorová bariéra formovaná choroidálním plexem je tvořena jednou vrstvou polarizovaných kuboidních epiteliálních buněk s těsnými spoji, které brání toku látek mezi mozkomíšním mokem a krví. Tato bariéra je formována choroidálním plexem a nachází se na jeho apikální straně (Maslieieva, Thompson 2014).

Choroidální plexus, navzdory jeho důležitosti, patří k nejméně prozkoumaným strukturám centrální nervové soustavy. Choroidální plexus je vysoce prokrvené stroma fenestrované kapilárami, je lemovaný vrstvou ependymálních buněk spojených těsnými spoji a nachází se v mozkových komorách (Solár *et al.* 2020). Choroidální plexus tvoří strukturální a zároveň imunitní bariéru mezi krví a mozkomíšním mokem (hematolikvorová bariéra). Kromě této fyzické bariéry se na povrchu choroidálního plexu také vyskytují i rezidentní nativní imunitní buňky nazývané Kolmerovy buňky. Kolmerovy buňky a hematolikvorová bariéra společně tvoří lokální imunitní systém choroidálního plexu (Maslieieva, Thompson 2014).

Kolmerovy buňky jsou považovány za makrofágům podobné buňky monocytického původu. Konkrétně sídlí na povrchu choroidálního plexu a jsou zodpovědné například za prezenci antigenů (Wan *et al.* 2019; Maslieieva, Thompson 2014). Makrofágy hrají kritickou roli v celém procesu progresu i řešení zánětu (Fujiwara, Kobayashi 2005). Ačkoliv přesná role makrofágů během šíření neurozánětu je stále neznámá. V předchozích studiích bylo zjištěno, že se počty Kolmerových buněk na povrchu choroidálního plexu během neurozánětu zvyšují.

Tato práce hledá odpovědi na otázky, zda mohou být i makrofágy povrchu mozkových komor ovlivněny v průběhu neuropatické bolesti a jak se mění počty takových buněk po aplikaci paklitaxelu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Neuropatická bolest vyvolaná chemoterapií

Paklitaxel a další chemoterapeutická činidla evokují periferní neuropatickou bolest (PIPN), která je předním důvodem dřívějšího ukončení chemoterapie. Konkrétně paklitaxel je v praxi velmi účinným lékem, ale zároveň způsobuje PIPN jako vedlejší účinek svého působení, a to až u 60–70 % pacientů podstupujících tuto léčbu. Ačkoliv neuropatická bolest velmi zasahuje do života pacientů a ovlivňuje jeho kvalitu, momentálně neexistuje žádné dostupné řešení nebo efektivní léčba těchto projevů. Přesné reakce centrální nervové soustavy (CNS) a periferní nervové soustavy (PNS) na léčbu paklitaxelem dosud nejsou zcela objasněny (Staff *et al.* 2020).

PIPN zahrnuje symptomy jako brnění, přecitlivělost na chlad, či necitlivost (projevující se punčochovou/rukavicovou distribucí) a bolest jak spontánní, tak evokovanou. Pacienti také obvykle čelí alodynii, která se projevuje jako přecitlivělost na normální podněty, například lehký dotek je vnímán silně bolestivě. Navíc bolest může přetrvávat až v řádech měsíců či let po léčbě paklitaxelem (Duggett, Griffiths, Flatters 2017; Staff *et al.* 2020).

2.1.1 Rakovina a její léčba

Rakovina je široký pojem charakterizovaný nekontrolovatelným množением buněk (Krieghoff-Henning *et al.* 2017). Proliferací buněk bez regulace, za overexprese růstových faktorů a nedostatku tumor supresorových genů (regulujících buněčné procesy a funkce) se začínají tvořit nádory (Joyce, Rayi, Kasi 2023; Mercadante, Kasi 2023). Nádorové buňky se nekonečně množí, aniž by odumíraly tak často jako somatické buňky. Jsou totiž schopny využívat telomerázu, přidávat tak jednotky telomeru na DNA a prodlužovat svoji životnost. Včasná neléčení rakoviny může mít pro pacienta až smrtelné následky (Mercadante, Kasi 2023).

V dnešní době existuje mnoho přístupů k léčbě nádorového onemocnění, ať už hovoříme o tradiční chemoterapii, radioterapii, chirurgickém zákroku nebo novějších technikách, jako jsou: cílená terapie, léčba s užitím přírodních antioxidantů, kmenových buněk, ablační terapie a mnoho dalších. Většinou se ale jedná o dlouhý komplexní proces využívající kombinace různých metod terapie (Debela *et al.* 2021). Jednou z nejvyužívanějších léčebných technik je zmiňovaná chemoterapie. Chemoterapeutická činidla – cytostatika – můžeme klasifikovat do několika kategorií dle jejich mechanismu účinku: alkylační činidla, antimetabolity, inhibitory mitózy a mnoho dalších. Právě mezi inhibitory mitózy patří vinca alkaloidy a taxany. Do skupiny taxanů pak můžeme zařadit i paklitaxel, na který se tato práce zaměřuje (Bukowski, Kciuk, Kontek 2020; Rixe, Fojo 2007).

2.1.2 Paklitaxel a mechanismy jeho účinků

Taxany jsou chemoterapeutická, mikrotubuly stabilizující činidla, široce užívaná při léčbě běžných typů rakoviny, jako je rakovina prsu, ovarií či plic. Paklitaxel (obchodní název Taxol) je nejvíce používaný taxan (Staff *et al.* 2020). Paklitaxel je taktéž alkaloid používaný jako cytostatikum. V roce 1966 byl poprvé extrahován z kůry kmene stromu tisu západoamerického (*Taxus brevifolia*) a v dnešní době je již vyráběn synteticky (Mukhtar, Adhami, Mukhtar 2014). Paklitaxel je vysoce efektivní v blokaci nádorové progresi, nicméně jeho vedlejším účinkem je

periferní neuropatie, kterou způsobuje. Tyto projevy jsou pozorovány u více než poloviny pacientů podstupujících chemoterapii (Staff *et al.* 2020).

2.1.2.1 Paklitaxel v kontextu buněčného cyklu

Buněčný cyklus je soubor navazujících procesů, kterými buňka prochází. Mluví se o stádiích od vzniku buňky dělením, po její dělení samotné. Skládá ze čtyř fází, G1 fáze (1. přípravná fáze), S fáze (syntetická fáze), G2 fáze (2. přípravná fáze) a M fáze (mitotická/meiotická fáze). První tři zmíněné fáze můžeme souhrnně označit názvem interfáze. Jde o dobu, kdy se buňka nedělí, ale probíhá příprava k dělení buňky. Důležitá je zejména replikace DNA během S fáze (Tan, Duncan, Slawson 2017). Buňka také může dospět do tzv. G0 fáze, kdy se buňka nepřipravuje na buněčné dělení ani neprobíhá dělení samotné, buňka je ale stále udržována a metabolicky aktivní. Jedná se odpočinkovou fází buňky, způsobenou povětšinou vlivem okolí (Aono *et al.* 2019).

Paklitaxel cílí na pozdní G2 fázi, a především na M fázi. M fáze je tzv. fází mitotickou, dochází tak k mitóze (v některých případech k meióze – konkrétně při pohlavním dělení za vzniku buněk s haploidním počtem chromozomů) (Kampan *et al.* 2015; Tan, Duncan, Slawson 2017). Mitóza je proces, při kterém z jedné diploidní buňky vznikají dvě stejné dceřiné diploidní buňky. Mitózu můžeme dále rozdělit na čtyři fáze: profáze, metafáze, anafáze, telofáze. Nejzásadnější pro paklitaxel jsou metafáze a anafáze, kdy se v buňce nachází již vytvořená dělicí vřeténka z mikrotubulů, na které paklitaxel primárně cílí. Chromozomy (tvořené dvěma chromatidami) se za normálních podmínek začínají vázat k mikrotubulům a do ekvatoriální roviny dělicího vřeténka. Mikrotubuly se pak prodlužují a zkracují dle potřeby, až v anafázi díky jejich zkrácení dojde k segregaci chromatid k opačným pólům. Dalšími pochody je pak umožněno úplné rozdělení buněk, jeden celý buněčný cyklus končí cytokinezí, kdy vznikají dvě samostatné dceřiné buňky (McIntosh 2016).

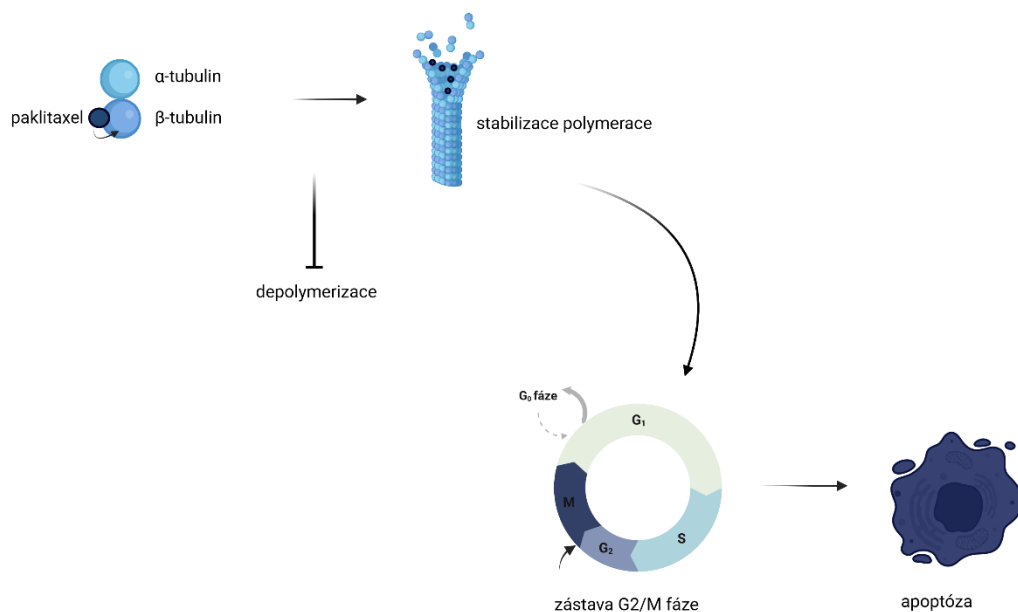
Toto dělení je klíčové pro paklitaxel, který napadá správnou funkci mikrotubulů, a tím akci v metafázi-anafázi ruší, a tím nedochází k rozdělení buněk (*Breaking malignant nuclei as a non-mitotic mechanism of taxol-paclitaxel* 2021). Rakovinné buňky jsou, díky své schopnosti dělit se častěji, v porovnání s normální buňkami více senzitivní na chemoterapeutika inhibující proces mitózy. Díky schopnosti častějšího dělení také hojně procházejí mitotickými stádii, tím jsou větší měrou vystavovány mitotickým jedům a díky tomu více zranitelné a postihnutele (Mukhtar, Adhami, Mukhtar 2014). Nicméně, buňky PNS a CNS mohou být také zasaženy a měněny paklitaxelem. Právě tato skutečnost je důvodem neurotoxicity paklitaxelu (Klein, Lehmann 2021).

2.1.2.2 Ovlivněné mikrotubuly

Mikrotubuly jsou jedním z typů vláken cytoskeletu a skládají se z bílkoviny tubulinu (α and β tubulinu). Mikrotubuly jsou zásadní v eukaryotických buněčných procesech, a to primárně při mezibuněčném transportu, buněčném dělení (mitóze a meióze), hrají také roli při interakcích s okolním prostředím a díky nim buňka rovněž vytváří dělicí vřeténka (Leung, Cassimeris 2019; Mukhtar, Adhami, Mukhtar 2014). Paklitaxel stabilizuje polymeraci mikrotubulů a inhibuje proces mitózy (*Breaking malignant nuclei as a non-mitotic mechanism of taxol-paclitaxel* 2021). Paklitaxel se primárně váže na β -tubulin a podporuje shluk mikrotubulů z tubulinových

dimerů, také předchází depolymerizaci a tím mikrotubuly stabilizuje (Leung, Cassimeris 2019; Zimmer *et al.* 2008). Výsledkem takové stability mikrotubulů je zástava G2/M fáze (metafáze-anafáze). Buňky zpravidla zanikají apoptózou, tedy programovanou buněčnou smrtí, čímž je potlačena replikace buněk (Kampan *et al.* 2015).

In vitro studie dále odkazují, že se morfologie mitotických buněk liší v případech, kdy byl paklitaxel přidán před G2/M tranzicí nebo až po tom, co buňka vkročila do stádia mitózy. V prvním případě, kdy byl paklitaxel dodán před G2/M fází byly výsledkem dělicí vřeténka multipolární. Pokud byla ale látka přidána po začátku mitózy, tvořila se vřeténka bipolární (Hornick *et al.* 2008).



Obrázek 1: Mechanismus účinků paklitaxelu
 vytvořeno autorkou dle (Chmielewski, Limoli 2022) v programu (URL1)

2.1.3 Mechanismy šíření neuropatické bolesti

K objasnění problému PIPN byly v minulosti použity různorodé přístupy. Zdá se, že paklitaxelem mohou být postihnuty různé typy buněk CNS a PNS. Z dostupných informací je známo, že výše zmiňované mikrotubuly jsou také zodpovědné za axonální transport¹ v neuronech. Paklitaxel, jak již bylo zmíněno, narušuje normální buněčný cyklus, zabraňuje depolymerizaci, a naopak podporuje shlukování mikrotubulů, čímž narušuje právě rychlý transport podél drah mikrotubulů. Důvodem PIPN budou nejspíše právě nefunkční mikrotubuly v axonech, Schwannových buňkách a spinálních gangliích (*ganglion spinale*, DRG). Ty sestávají především z buněk smyslových neuronů. PIPN může být způsobena i akumulací

¹ Axonální transport je zodpovědný za zásobování vzdálených nervových zakončení organelami, proteiny a lipidy a za jejich udržování v těchto místech (Malacrida *et al.* 2019).

paklitaxelu v DRG, na kterou jsou náchylné, což způsobuje jejich propustná hemato-nervová bariéra² (Klein, Lehmann 2021). Podle *in vivo* studií jsou také další buňky včetně mikroglíí, míšních astrocytů a satelitních gliových buněk ovlivněny léčbou paklitaxelem. Tato fakta (samozřejmě také společně s genetickými predispozicemi jedince) hrají významnou roli v průběhu PIPN a podílejí se na její progresi (Staff *et al.* 2020; Scripture, Figg, Sparreboom 2006).

PIPN úzce souvisí s neuroinflamací (viz kapitola 2.6 *Neuroinflamace*), nefunkčností iontového kanálu, overexpresí transportérů či s upregulací reaktivních forem kyslíku (ROS). Léčba paklitaxelem vyvolává zvýšení produkce ROS a související poškození DNA. Zvýšená generace a nerovnováha hladin ROS evokuje oxidativní stres u živých organismů, což způsobuje buněčné poškození. ROS poškozují antioxidantní enzymy, to vede k oxidativnímu stresu, díky kterému se PIPN může šířit dále. Generace ROS je také spojená s narušením normálních projevů a funkcí organel, iontových kanálů, biomolekul atd. Výsledkem těchto procesů v PIPN je demyelinizace, neuroinflamace a apoptóza neuronů (Hu *et al.* 2021).

2.1.3.1 Spinální ganglion

DRG jsou nervové zauzliny – shluky neuronů – které vystupují z dorzálního kořene míšních nervů (Ahimsadasan *et al.* 2023). DRG jsou situovány na rozhraní mezi PNS a CNS, mezi dorzálním kořenem míchy a terminály periferních nervů. Hrají kritickou roli při PIPN a jejím šíření z PNS do CNS. Paklitaxel se akumuluje v DRG, čímž způsobuje oxidativní stres a poškození mitochondrií. Při vzniku PIPN dochází k upregulaci transportérů paklitaxelu a tento efekt poté zapříčiňuje hromadění léku v periferních nervech. Akumulace léku v DRG poté spouští řetězovou reakci PIPN, výsledkem se stává buněčná dysfunkce, demyelinizace, nervová apoptóza a neuroinflamace (Hu *et al.* 2021). Právě neuroinflamace v DRG se jeví být klíčovým faktorem v rozvoji PIPN. Infiltrace aktivovaných imunitních buněk hraje hlavní roli ve formování neuropatické bolesti a alodynie (viz kapitola 2.6 *Neuroinflamace*) (Noh *et al.* 2020).

2.1.3.2 Reaktivní formy kyslíku

Paklitaxel navyšuje množství toxických ROS. ROS jsou zapojeny v procesu narušení normálního fungování mitochondrií, mikrotubulů, iontových kanálů či biomolekul (proteiny, lipidy, DNA...). Ovlivňují a vyvolávají také mnoho dalších reakcí, jako například zánětlivě odpovědi v podobě demyelinizace nebo apoptózy neuronů, jak již bylo avizováno dříve. Pokud dojde k narušení křehké rovnováhy mezi ROS a systémem antioxidantů, objevuje se oxidativní stres, díky kterému poté dochází k mitochondriálnímu poškození. To se následně projevuje ztrátou či poškozením buněk DRG. Bylo dokázáno, že z různých druhů ROS právě peroxid vodíku (H₂O₂) vyvolává oxidační poškození biomolekul, především ve smyslových buňkách neuronů. Na progresi PIPN mohou samozřejmě participovat i další druhy ROS, jako superoxidové anionty ($\cdot\text{O}_2^-$) nebo hydroxylové radikály ($\cdot\text{OH}$) (Hu *et al.* 2021).

² Hemato-nervová bariéra je prostředí, bariéra mezi periferními nervovými axony a krevním řečištěm (Reina *et al.* 2015).

2.1.3.3 Mitochondrie

Mitochondrie jsou organely s dvojitou membránou. Jsou také důležitým a klíčovým prvkem během reakcí, a to díky své schopnosti produkovat adenosintrifosfát (ATP). ATP vzniká důsledkem aerobního dýchání (oxidační fosforylace), a buňka ATP nadále využívá jako vlastní zdroj energie. Mitochondrie taktéž obsahují svou vlastní DNA (Rossmann *et al.* 2021).

Morfologie mitochondrií (stejně jako i dalších zmiňovaných komponentů) je ovlivňována léčbou paklitaxelem, avšak paklitaxel přímo neovlivňuje mitochondriální DNA (mtDNA) v neuronech (Staff *et al.* 2020). Poškozením mitochondrií ovšem může docházet k uvolňování takového mtDNA (viz kapitola 2.6.4.1 *mtDNA*). Paklitaxel indukuje změny otevření přechodového póru mitochondriální permeability³. To vede k bobtnání a vakuolizaci mitochondrií myelinizovaných i nemyelinizovaných sensorických nervových vláken (vlákněn sensorických nervů). Změny v průchodnosti přechodového póru mitochondriální permeability také způsobují následné uvolňování vápníku. Opět se v důsledku poškození mitochondrií začínají tvořit ROS, což znovu následně vede k oxidaativnímu stresu. Předpokládá se, že takové poškození mitochondriální funkce přispívá k rozvoji neuropatické bolesti (Klein, Lehmann 2021; Staff *et al.* 2020).

2.1.3.4 Axony a Schwannovy buňky

Výběžky nervových buněk se nazývají axony (nervové výběžky). Přenášejí informace mezi neurony nebo neurony a jinými buňkami prostřednictvím synapse⁴. Axony také šíří impulsy z PNS do CNS, proto může axonální dysfunkce ovlivnit správné fungování obou – jak PNS, tak i CNS (Debanne *et al.* 2011).

V PNS a CNS se kolem axonů nachází formovaná myelinová membrána. Myelin je tvořen z velké části především lipidy (70-80 % obsahu), zbytek se skládá z bílkovin, ačkoliv je nutné zmínit, že se složení mírně liší v závislosti na umístění (Salzer, Zalc 2016; Muzio, Cascella 2023). Tento myelinový plášť poskytuje rychlé a efektivní vedení impulzů. V PNS se hovoří o myelinové membráně tvořené Schwannovými buňkami, kde jediný axon je tvořen jedinou Schwannovou buňkou, zatímco v CNS se takový štít skládá z oligodendrocytů, které, na rozdíl od Schwannových buněk, obalují každý více rozdílných axonů (Muzio, Cascella 2023).

PIPNe je provázána poškozením malých vláken axonů sensorických neuronů. Axony jsou vlivem paklitaxelu ničeny symetricky, paklitaxel také vyvolává retrakci nervových zakončení, dochází k postupnému odumírání (tzv. dying back pattern) axonů a tím k řídnutí nervových vláken, které vedou v rukách a chodidlech (Klein, Lehmann 2021; Staff *et al.* 2020). Bylo zjištěno, že v důsledku ztráty kontaktu mezi Schwannovými buňkami a axolemmou (membránou axonových buněk) dochází k demyelinizaci axonů a degeneraci jemných intraepidermálních nociceptivních vláken (nervových vláken vedoucích bolest), což vede k zablokování elektrických signálů axonů a způsobuje nervovou dysfunkci (Staff *et al.* 2020).

³ Přechodový pór mitochondriální permeability je vnitřní mitochondriální kanál, který se otevírá pouze za určitých podmínek (např. oxidaativní stres) (Angeli *et al.* 2021).

⁴ Synapse je spojení neuronů, místo, kde dochází k jejich komunikaci (Caire, Reddy, Varacallo 2023).

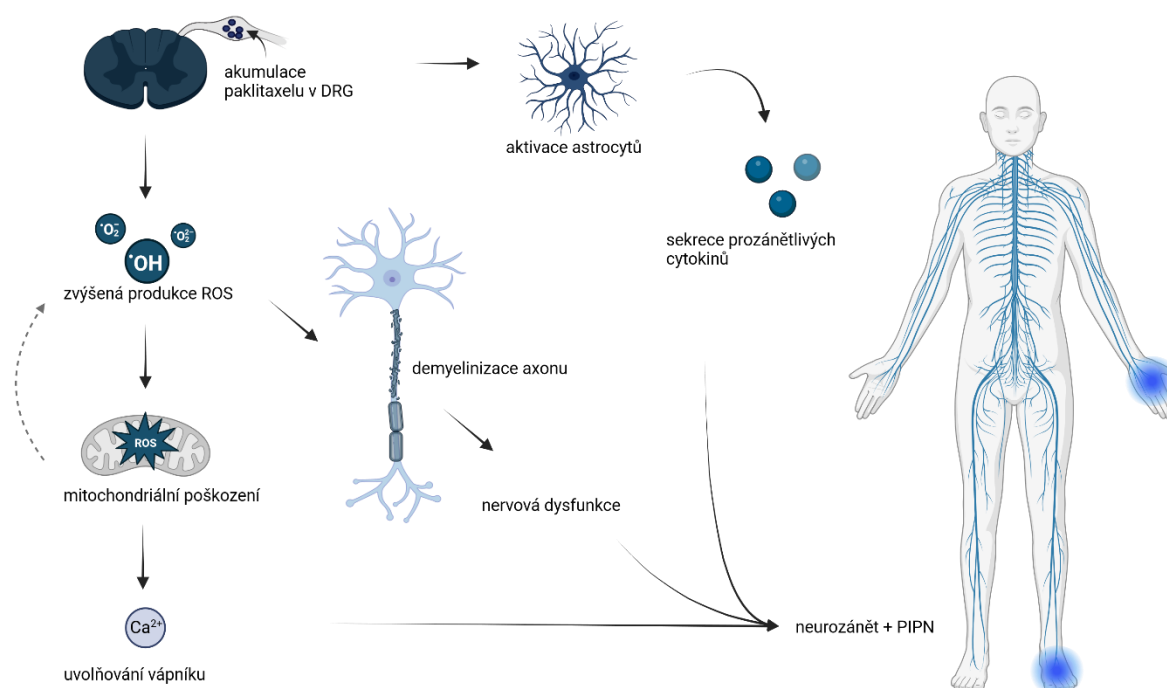
2.1.3.5 Mikroglie, astrocyty a satelitní gliové buňky

Paklitaxel indukuje aktivaci mikroglíí v dorzálním rohu míchy. Dysregulace mikroglíí, ke které dochází, je spojena se zvýšenou expresí kanabinoidního receptoru typu 2, chemokinů, ligandu 2 a interleukinu (IL-6, IL-4 a IL-10). Kanabinoidní receptory mohou sehrát roli při potlačení neuropatické bolesti, a to díky svým účinkům. V některých případech totiž tyto receptory mohou mít analgetické vlastnosti, které mohou zmírňovat projevy PIPN (Staff *et al.* 2020; Klein, Lehmann 2021).

Naopak astrocyty, které také mohou být aktivovány paklitaxelem, PIPN indukují a způsobují sekreci prozánětlivých cytokinů. Astrocyty jsou nejpočetnější skupinou nenervových buněk mozku. Podílejí se na přenosu signálů mezi buňkami a uvolňování neuroaktivních molekul, celkově napomáhají modulaci mozkové neuroaktivity. Spojení mezi jednotlivými astrocyty je zprostředkováno mezerovými spoji (GJs). Léčba paklitaxelem způsobuje upevňující se GJs, což má za následek zvýšenou konektivitu jednotlivých neuronů a ztrátu nezávislé aktivace. To vše směřující k dalším pocitům bolesti (Staff *et al.* 2020). Astrocyty jsou dále součástí anteriorního cingulárního kortexu (ACC), což je kortikální oblast mozku pravděpodobně zapojená jak do vnímání, tak do modulace bolesti. V předešlých studiích byla objevena zvýšená aktivita v ACC v průběhu neuropatické bolesti, kde byly také potvrzeny molekulární a fyziologické změny týkající se i zmiňovaných astrocytů. Pozorována byla i astroglióza, která je charakterizována abnormálním nárůstem počtů astrocytů v důsledku poškození okolních neuronů. Paklitaxelem ovlivněné astrocyty tak nejenže expresí cytokinů podporují vznik neurozánětu, taktéž zasahují do normálního fungování ACC, čímž mohou přispívat k rozvoji PIPN (Masocha 2015).

Nejen GJs spojující astrocyty, ale také ty mezi satelitními gliovými buňkami bývají často ovlivněny, což opět přispívá k rozvoji bolesti. Ačkoliv se astrocyty nachází v CNS a satelitní gliové buňky spadají naopak do PNS, jsou si oba typy buněk velmi a sdílejí mnoho funkcí i rolí v průběhu PIPN. Stejně jako u astrocytů, i u satelitních gliových buněk dochází k dysregulaci cytokinové a chemokinové signalizace, čímž i tento typ buněk participuje na neurozánětu. Satelitní gliové buňky tedy také představují významné činitele v indukci PIPN. Stejně jako u jiných spoluúčastníků na rozvoji PIPN, nejsou ovšem jejich přesné role, v rámci rozvoje bolesti a neuroinflammace zcela, objasněny (McGinnis, Ji 2023).

Informace o vlivu léčby paklitaxelem na nervové soustavy jsou velmi limitované, proto je PIPN a její bolestivé projevy subjektem, potřebujícím více pozornosti v rámci neurovědeckého výzkumu.



Obrázek 2: Zjednodušené schéma mechanismu šíření PIPN
 vytvořeno autorkou dle (Eldridge, Guo, Hamre 2020; Burgess *et al.* 2021) v programu (URL1)

2.1.4 Potenciální léčba neuropatické bolesti

Podle současných studií se nabízejí dvě hlavní metody léčby PIPN. Potenciál by mohl být ukrytý v léčbě antioxidačními léky, které mohou zbavit DRG akumulovaného paklitaxelu nebo ve zlepšení cílení terapie za současné prevence nežádoucích účinků mimo tento cíl. Také s rychlým pokrokem doby se objevují další možná řešení neuropatie v podobě nanotechnologických přístupů. Ty se zdají být velmi slibné ve zlepšení směřování účinků paklitaxelu pouze na žádoucí buňky a s jejich vývojem tak roste i nadějně zlepšení terapeutické efektivity. Momentálně jsou však možnosti léčby PIPN stále velmi omezená a vyžaduje tak vytrvalé výzkumy mechanismů účinků chemoterapeutik, léčiv i souvisejících nanosystémů (Hu *et al.* 2021).

2.2 Neuroinflamace

Inflamace (zánět) uvnitř mozku nebo míchy se nazývá neuroinflamace (neurozánět) (DiSabato, Quan, Godbout 2016). Právě neurozánět běžně provází PIPN a je s ní často asociován. Poškozené buňky PNS (Schwannovy buňky, satelitní buňky atd.) a buňky CNS (mikroglie, astrocyty atd.) významně ovlivňují PIPN a aktivně se podílejí na její indukci. Aktivací imunitního systému se také v těle spouští zánět (Miaskowski *et al.* 2019). Dochází totiž k

produkcí ROS, cytokinů a chemokinů⁵. Takovou produkci je umožněn a aktivován neurozánět (DiSabato, Quan, Godbout 2016). Neurozánět je inherentní mechanismus obrany hostitele. Jeho funkcí je chránit před infekcí a poškozením nervové soustavy, také udržovat a obnovovat normální strukturu i funkce mozku (More *et al.* 2013). Je důležité zmínit, že neurozánět může mít jak pozitivní aspekty (oprava tkáně, ochrana neuronů atd.), tak i ty negativní (poškození neuronů atd.) (DiSabato, Quan, Godbout 2016). Akutní neurozánět slouží jako efektivní obrana vůči patogenům, ovšem nerovnováhou mezi hladinami pro- a proti-zánětlivých signalizačních molekul přechází zánět v chronický, pro tělo škodlivý (Kinney *et al.* 2018).

Také hematoencefalická bariéra (BBB) a hematolivorová bariéra (B-CSFB) chrání CNS, a to konkrétně před škodlivými látkami v krvi. Ačkoliv si BBB v minulosti získala větší pozornost v rámci neurovědeckého výzkumu, v současnosti se zjišťuje, že i B-CSFB také hraje neméně důležitou roli v šíření zánětlivých reakcí. B-CSFB, která je formována choroidálním plexem (*plexus choroideus*, CP, viz kapitola 2.7 *Choroidální plexus*) je mimo jiné propustnější pro vnější patogeny. B-CSFB ovlivňuje progresi zánětlivé reakce z PNS do CNS a rovněž může přispět k šíření neurologických onemocnění a patogeneze (Solár *et al.* 2020).

2.2.1 Hematoencefalická bariéra

BBB je tvořena endoteliálními buňkami s těsnými spoji (TJs). Ty jsou složeny z proteinů především okcludinu, kladinu a junkčních adhezních molekul (JAMs). Jedná se o selektivní polopropustnou bariéru mezi mozkem a krví, která mezi nimi omezuje pohyb látek (Gawdi, Shumway, Emmady 2023; Solár *et al.* 2020). Je známo, že neurozánět zvyšuje propustnost BBB. Prostřednictvím poškozené BBB mohou mediátory také vstoupit do periferního systému mozku, což způsobuje následné zhoršení stavu jedince a probíhajícího neurozánětu (Kempuraj *et al.* 2017).

2.2.2 Hematolivorová bariéra

B-CSFB je formována CP a je umístěna na jeho apikální straně. B-CSFB vzniká kompresí jedné vrstvy polarizovaných kuboidních epiteliálních buněk, mezi kterými působí TJs. B-CSFB, jak z jejího názvu vyplývá, je v kontaktu s mozkomíšním mokem a vytváří tak fyzickou bariéru mezi krví a zmíněným likvorem za pomoci snížení toku látek. Lokální imunitní systém CP, který je důležitý při zánětlivém onemocnění a infekci, sestává společně z B-CSFB a epiplexových (Kolmerových) buněk CP (viz kapitola 2.8.2 *Kolmerovy buňky*) (Lamprey *et al.* 2022).

Poškozením BBB nebo B-CSFB je umožněno nebezpečným patogenům migrovat skrz tyto bariéry (Javed, Reddy, Lui 2023). Patogeny mají řadu různých strategií, jak proniknout do CNS. Po proniknutí patogenů přes B-CSFB je aktivována sekrece signálních molekul, kterou je zahájen nábor imunitních buněk z mozkomíšního moku (*liquor cerebrospinalis*, CSF), a poté se spouští a začíná zánětlivá reakce v CNS (Solár *et al.* 2020).

⁵ Chemokiny – nebo také chemotaktické cytokiny – jsou díky své schopnosti stimulovat migraci buněk důležité při obranných imunitních reakcích (Hughes, Nibbs 2018).

2.2.3 Imunitní buňky v průběhu neuroinflamace

Imunitní buňky (jako jsou makrofágy, mastocyty nebo dendritické buňky) spočívající v tkáních mohou rozeznávat invazi patogenů či cizích částic (často označovaných jako PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) – odvozených od mikroorganismů, nebo DAMPs (damage-associated molecular patterns) – zbytky poškozených buněk) za pomoci svých receptorů – především toll-like receptorů (TLR). Inflamace uvnitř mozku je způsobena jejich aktivací. V případě, že jsou tyto buňky vyrušeny, situace ústí v aktivaci zánětlivých signálních drah. Proces počíná aktivací imunitních buněk, které uvolňují indikátory (např. cytokiny, proteiny a enzymy). Zda tyto markery budou pro- či proti-zánětlivé, záleží na typu imunitní buňky. Ovšem obě skupiny hrají značnou roli v postupu inflamace. Během zánětlivého procesu je další část imunitních buněk rekrutována sekrecí cytokinů nebo dalších signálních molekul, což přispívá k inflamaci tkáně. V zánětlivých procesích svým počtem převyšují „naverbované“ buňky rezidentní, ty následně prochází určitými funkčními fenotypovými změnami (více o imunitních buňkách viz kapitola 2.8 *Makrofágy mozkových komor*) (Chen *et al.* 2018; Newton, Dixit 2012; Lendeckel, Venz, Wolke 2022).

2.2.4 DAMPs

DAMPs jsou svým původem odvozeny z buněk, uvolňují se poškozením tkáně, spouštějí a udržují imunitní reakci, ať už za přítomnosti patogenní infekce, či bez ní. Vypuštěné DAMPs podporují aktivaci imunitních buněk i nábor antigen-prezentujících buněk, dochází tedy i k aktivaci makrofágů, kterými se zabývá tato práce (Tang *et al.* 2012; Kato, Svensson 2015).

Aplikace paklitaxelu způsobuje poškození mitochondriím, jak bylo popisováno výše. Poškozené mitochondrie axonů nejen produkují ROS, kterými přispívají k rozvoji neuroinflamace a dalšímu poškození buněk. Také komponenty narušených mitochondrií se mohou dostávat do mimobuněčných prostor a aktivovat reakce imunitního systému. Mezi DAMPs řadíme například mtDNA, ATP, kardiolipin a další (Garg, Johri, Chakraborty 2023).

2.2.4.1 Mitochondriální DNA

MtDNA je nositelem části genetické informace mitochondrií, taktéž patří mezi DAMPs a zdá se plnit kritickou funkci v rozvoji inflamace v průběhu neuropatie vyvolání chemoterapií. Uvolněná mtDNA aktivuje inflamatorní reakce a následně sekreci prozánětlivých cytokinů, což opět vede k poškození mitochondrií a vypuštění mtDNA. Dochází tedy k jakémusi neutuchajícímu koloběhu (Garg, Johri, Chakraborty 2023).

2.2.5 Následky neuroinflamace

Poškození mozku může vést k dlouhodobým komplikacím nebo přetrvávajícím symptomům. Neurozánět může způsobit nábor imunitních buněk⁶ zvýšený přístup BBB, edém, nakonec poškození tkáně a buněčnou smrt (DiSabato, Quan, Godbout 2016). Neurozánět je považován za důležitý faktor neurodegenerace a s ní spojených tzv. neurodegenerativních onemocnění. Neurodegenerativní onemocnění jsou charakterizována jako onemocnění progresivní ztráty neuronů (ztráta funkce, struktury a následná smrt neuronů). Příkladem takové nemoci je

⁶ Imunitní buňky jsou produkovány z kostní dřeni (např. monocyty, dendritické buňky, neutrofilů a další) (Nicholson 2016).

Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba či roztroušená skleróza (Kempuraj *et al.* 2017; Lamptey *et al.* 2022).

Vědci domnívají, že chronický neurozánět může přispívat k rozvoji neuropatické bolesti a porozuměním zánětlivým mechanismům uvnitř nervové soustavy by se mohly naskytnout možnosti nových řešení bolestivých stavů, provázejících léčbu chemoterapií (Ellis, Bennett 2013). Tento předpoklad je zásadní pro předkládanou práci.

2.3 Choroidální plexus

CP je jednou z nejméně prostudovaných struktur v mozku. Poslední roky však přinesly větší povědomí o této struktuře a s ním také nové poznatky. CP je vysoce vaskularizované stroma umístěné v mozkových komorách, stará se o tvorbu B-CSFB a produkci CSF, čímž udržuje mozkovou homeostázu. CP se také podílí na mnoha procesech i průběhu různých onemocnění. Proto by měl být považován za důležitý. Neměl by být opomíjen ani přehlížen, naopak v objasnění mechanismů, na kterých se podílí, by se mohla ukrývat budoucnost potenciálních terapeutických metod (Solár *et al.* 2020).

2.3.1 Lokace

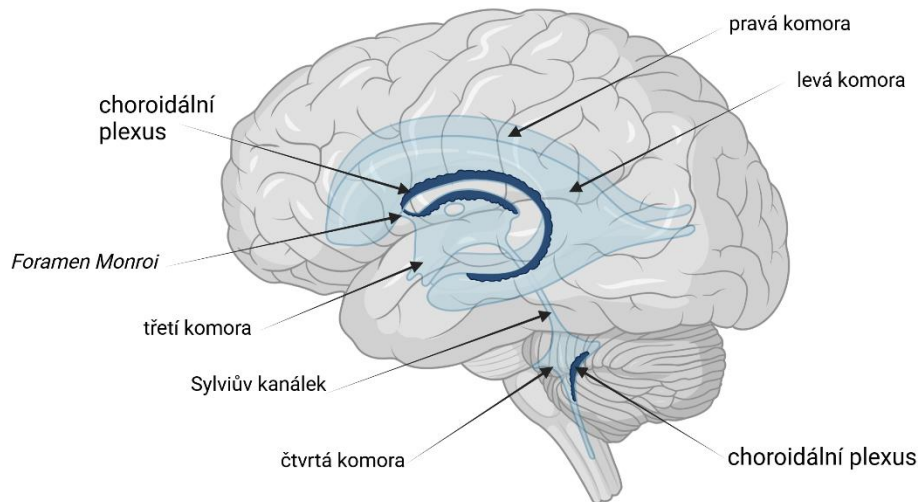
CP je umístěn ve všech čtyřech mozkových komorách (dvou laterálních, III. a IV. komoře). Každou z nich lemují, vyjma toho, že obvykle nezasahuje do čelního či týlního rohu laterálních komor a Sylviova kanálku (Baba, Nguyen 2016; Javed, Reddy, Lui 2023). Je známo, že CP laterální komory je tenký (zdroj ho konkrétně nazývá „zvlněný závoj“) ve srovnání se IV. komorou, kde je složitější s velkým množstvím laloků. CP ve III. komoře je pak znatelně menší (Solár *et al.* 2020).

2.3.2 Struktura

CP je organizovanou tkání a zároveň komplexní sítí kapilár (Javed, Reddy, Lui 2023). Tato tkáň obsahuje fenestrovane kapiláry (60nm – 80nm fenestrace), které jsou obklopeny pojivovou tkání a imunitními buňkami (Solár *et al.* 2020). CP je tvořen záhyby omozečnice (*pia mater*) a speciální výstelky – z buněk epitelu nazývaných ependym – která se nachází na ventrikulární straně stromatu CP. Ependym společně s omozečnicí formují strukturu zvanou *tela choroidea*. Cévy v bezprostřední blízkosti utváří vychlípeniny stropu mozkových komor nazývané choroidální plexy (Corbett, Haines 2018). Ependymální buňky jsou gliové buňky, které lemují mozkové komory a centrální kanál míchy. Ependymální buňky jsou spojeny GJs a obsahují mikroklky (*microvili*) a řasinky (*cilium*), což jsou vlasové výběžky, které pokrývají jejich apikální stranu a také pomáhají při absorpci a cirkulaci mozkomíšního moku (viz kapitola 2.7.3 *Ependymální buňky*) (Javed, Reddy, Lui 2023; Jiménez *et al.* 2014). Epiteliální buňky⁷ v CP jsou kuboidní spojené TJs, přičemž tato skutečnost hraje klíčovou roli při tvorbě B-CSFB. Na komorovou stranu epitelálních buněk jsou připojeny Kolmerovy buňky (epiplexové buňky,

⁷ Epiteliální buňky jsou stejného původu jako ependymální buňky a jsou považovány za modifikovaný druh těchto buněk (Kitada *et al.* 2001).

KCs). Ty budou popsány níže (viz kapitola 2.8.2 *Kolmerovy buňky*) (Solár *et al.* 2020).



Obrázek 3: Lokace choroidálního plexu
vytvořenou autorkou dle (Bitanirwe, Lizano, Woo 2022) v programu (URLI)

2.3.3 Ependymální buňky

Ependymální buňky jsou podtypem gliových buněk vystýlajících mozkové komory a centrální kanál míchy. Jsou to nenervové buňky, které se podílejí na udržování homeostázy mozku a jsou zároveň strukturální jednotkou CP, tzn. podílejí se na tvorbě B-CSFB. Jejich funkcí je nejen lemovat, mají i úlohu podpůrnou. Tvar ependymálních buněk závisí na lokaci. Převážně jsou ependymální buňky kuboidní (také sloupcovité nebo skvamózní) s řasinkami, které pomáhají s cirkulací CSF v mozkových komorách nebo centrálním kanálu míchy. Mezi buňkami se nachází GJs nebo adhezni spoje (*Zonula adherens*, AJs). TJs se zde nevyskytují, což umožňuje pohyb molekul z komor do tkáně (Aschner, Philbert 2010).

2.3.4.1 Produkce mozkomíšního moku

Sekrece CSF do mozkových komor je jednou z nejdůležitějších funkcí CP. Přesněji řečeno, produkce CSF je zajištěna choroidálními buňkami, zbytek je tvořen ependymálními buňkami (Javed, Reddy, Lui 2023; Damkier, Brown, Praetorius 2013). Podle zdrojů může CP produkovat více než 50 % celkového objemu CFS, což je kolem 500 ml denně v dospělém lidském mozku⁸ (Solár *et al.* 2020; Damkier, Brown, Praetorius 2013). CSF funguje jako tlumicí bariéra proti otřesům a poskytuje podporu míše i mozku. Kromě toho funguje jako filtrační komplex (napomáhá cirkulaci živin a vylučuje z CNS metabolický odpad) (Javed, Reddy, Lui 2023).

Nedostatečná produkce CFS může vést k inhibici vývoje a růstu mozku, zatímco vzácná nadprodukce může způsobit hydrocefalus, a to například ve stavu nazývaném papilom choroidálního plexu (Javed, Reddy, Lui 2023).

2.3.4.2 Formování hematolikvorové bariéry

Výše zmíněná B-CSFB je umístěna na apikální straně CP. Tato bariéra je tvořena kuboidními epiteliálními buňkami pevně utěsněnými TJs v kombinaci s fenestrovanými kapilárami (na rozdíl od BBB, která fenestrována není). TJs jsou rozhodující při tvorbě B-CSFB, hrají hlavní roli v regulaci toku látek mezi buňkami. B-CSFB sama o sobě vytváří fyzickou bariéru, která je důležitá při obraně mozku proti vstupu škodlivých látek i při udržování homeostázy mozku (Javed, Reddy, Lui 2023; Solár *et al.* 2020).

2.3.5 Kolmerovy buňky

KCs jsou makrofágům podobné buňky monocytického původu, které řadíme mezi rezidentní imunitní buňky CP. Rezidentní buňky CP se také podílejí na údržbě homeostázy mozku. Každá z nich je antigen-prezentující buňkou s fagocytární aktivitou. CP rekrutuje tyto buňky prostřednictvím sekrece cytokinů (Javed, Reddy, Lui 2023).

KCs vykazují řadu morfologií. Mohou mít kulovitý, polární či hvězdicovitý tvar (Wan *et al.* 2019). Můžeme u nich také pozorovat znaky dendritických buněk nebo mikroglíí, ačkoliv pro jejich specifickou charakteristiku je značíme a zařazujeme mezi nativní buňky CP. Stejně tak jako další imunitní buňky, KCs také vykazují fagocytickou aktivitu s produkcí oxidu dusnatého, akumulací železa a prezentací antigenů (Wan *et al.* 2019; Solár *et al.* 2020).

2.3.5.1 Historie

Nejprve byla v roce 1921 Dr. Hansem Kolmerem popsána volná (nezávislá) buňka přiléhající k povrchu CP (Nakamura, Koga, Moriyasu 1982). Pro zobrazování byly použity imunohistochemické metody (IHC) a elektronová mikroskopie (Solár *et al.* 2020). Později byly tyto buňky pojmenovány „Kolmerovy buňky“. V roce 1953 Ariëns-Kappers zaznamenal fagocytické funkce buněk a pojmenoval je „epiplexové buňky“ (Nakamura, Koga, Moriyasu 1982). V minulosti byly popsány dva typy těchto buněk, a to typ 1 (buňka s mnoha výběžky z buněčného těla a s vlákny) a typ 2 (buňka s méně výčnělky, podobnými panožkám) (Cui, Xu, Lehtinen 2021).

⁸ Celkový objem CSF v těle dospělého člověka je okolo 150 ml, z toho vyplývá, že se tekutina může za den vyměnit až třikrát, v některých případech čtyřikrát (Damkier, Brown, Praetorius 2013).

2.3.5.2 Původ

KCs, podobně jako makrofágy, jsou monocytického původu, což je považováno za nejpřijímanější a nejvíce používanou teorii. Cirkulující monocyty migrují z úzkostěných cév CP a dostávají se do míst pojivové tkáně. Tam se z makrofágů, které přecházejí skrz epitel CP stávají KCs (Wan *et al.* 2019).

2.3.5.3 Aktivita

KCs vykazují pohyblivost svého těla a také saltatorní (skákavý) pohyb. Tyto buňky se mohou pohybovat rychlostí až stovky mikrometrů za hodinu po povrchu CP, zatímco stromální makrofágy (vázané v prostoru mezi vrstvami epitelu a endotelu) mají vysokou motilitu a schopnost kontrolovat si své teritorium. Stále však není známo, zda stromální makrofágy a KCs pochází ze stejného typu mateřské buňky (Cui, Xu, Lehtinen 2021). Fagocytická aktivita KCs se projevuje jejich silným zbarvením esterázou a vychytáváním indikátorů (Ling, Kaur, Lu 1998).

2.4 Makrofágy mozkových komor

Makrofágy jsou buňky vrozeného imunitního systému jedince, které jsou přítomné v mnoha tkáních lidského těla. Makrofágy tvoří důležitou složku obranného systému proti invazi patogenů. Hrají také důležitou roli při udržování homeostázy i opravě poškozených tkání (Lee *et al.* 2021).

2.4.1.1 Původ

Makrofágy, jako i jiné imunitní buňky, jsou především odvozeny z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk⁹ kostní dřeně, jsou tedy považovány za buňky monocytického původu. Monocyty cirkulující v krvi se dostávají do tkáně, a tam se vyvíjejí v makrofágy. Kromě výše uvedených faktů literatura uvádí, že makrofágy nepochází jen z hematopoetických kmenových buněk, ale mohou být také prenatalně derivovány ze zárodečného žlutkového váčku, nebo dalších jiných plodových progenitorů. Důkazy také podporují teorii, která říká, že makrofágy mají schopnost vlastní lokální údržby v tkáni po celou dobu svého života, a tak nejsou produktem jen dospělých monocytů (Ogle *et al.* 2016; Hirayama, Iida, Nakase 2017).

2.4.1.2 Funkce

Makrofágy existují v mnoha orgánech a v každém z nich mají rozdílné funkce. Zde jsou popsány makrofágy mozkových komor. Makrofágy v mozku působí defenzivně na patogeny (Hirayama, Iida, Nakase 2017). Jsou důležité na počátku, v průběhu inflamace a zároveň hrají kritickou roli v jejím řešení. Během zánětu makrofágy především způsobují fagocytózu. Makrofágy pomocí chemotaktických signálů mohou migrovat k poškozenému místu, kde pohlcují patogeny. Enzymy spojené s fagocytózou v jejím průběhu usnadňují nadprodukcí ROS. Produkované ROS cílí na absorbované patogeny, které likviduje. Převaha ROS ovšem může působit toxicky a podporovat šíření neurozánětu. Makrofágy jsou známé také prezentací

⁹ Hematopoetické kmenové buňky jsou buňky, které mají schopnost vyvinout se do všech typů krevních buněk různých buněčných linií (monocyty, které se vyvíjejí v makrofágy, jsou z myeloidní linie, konkrétně z monoblastů) (Lee, Hong 2020; Wan *et al.* 2019).

antigenů, dále mají na starost produkci cytokinů a růstových faktorů, čímž je později evokovaná imunomodulace (změna reakcí imunitního systému) (Fujiwara, Kobayashi 2005; Bascones-Martinez *et al.* 2014; Lendeckel, Venz, Wolke 2022).

2.4.1.3 Polarizace makrofágů

V průběhu neuroinflamace dochází k aktivaci makrofágů, ty následně mohou podléhat polarizaci. Polarizace je proces, při kterém makrofágy získávají různé funkce vlivem okolního prostředí, uplatňuje se zde především jejich heterogenita a plasticita. Polarizací se z makrofágů tvoří makrofágy M1 (klasicky aktivované) a M2 (alternativně aktivované). Například liposacharidy či interferony napomáhají procesu polarizace makrofágů na typ M1. Ten svou rezistentní aktivitou vůči patogenům bojuje proti infekci. Díky své schopnosti uvolňovat prozánětlivé cytokiny je spojován se zvýšenou fagocytotickou aktivitou a vysokou cytotoxicitou. Nadměrné či neregulované imunitní reakce mohou ovšem vést k chronickému zánětu a následnému poškození tkáně. Makrofágy M2 polarizované díky cytokinům (především interleukinů IL-4 a IL-13) naproti tomu napomáhají v opravě tkáně a jsou tedy považovány za protizánětlivé. M2 makrofágy jsou tedy v kontextu neuroinflamace považovány za regulátory imunitní rovnováhy. M1 makrofágy se mohou měnit na M2 makrofágy a naopak (Lendeckel, Venz, Wolke 2022; Kadomoto, Izumi, Mizokami 2021).

2.4.1.4 Rezidentní a aktivované makrofágy v průběhu inflamace

Dle výše uvedené klasifikace se rezidentní makrofágy řadí mezi M2-podobné makrofágy. Obecně se mluví o rezidentních makrofázích jako o buňkách, které v průběhu inflamace napomáhají s jejím řešením obnovou tkání a odstraňováním zánětlivých pozůstatků (Davies *et al.* 2013). Makrofágy se stávají aktivovanými v důsledku vyrušení jejich receptorů patogeny. Aktivované makrofágy efektivně hubí tyto patogeny, jsou tedy fagocytoticky aktivní. Dochází také k uvolňování prozánětlivých cytokinů aktivovanými makrofágy a rekrutování dalších imunitních buněk směrem k postiženým místům. Sled událostí ústí v narušení homeostázy, což podporuje další šíření inflamace (Mosser, Edwards 2008).

3 HYPOTÉZA

Makrofágy jsou dynamické a multifunkční imunitní buňky, které se zapojují do fagocytární aktivity a imunomodulace. Jejich role je zásadní pro udržení zdraví a funkce CP a potažmo centrálního nervového systému. Souhra mezi makrofágy a dalšími imunitními složkami (potenciálně Kolmerovými buňkami) mozku je kritickým aspektem obranných mechanismů mozku a udržování tkáňové homeostázy. Tyto specializované buňky slouží jako indikátory cizích částic a aktivně se účastní různých imunitních procesů v mozku. Přesto přesná role makrofágů v šíření inflamace uvnitř mozku je stále neznámá. Stejně tak mechanismy, kterými se šíří neurozánětlivé reakce zůstávají neobjasněné.

Předešlé výzkumy Anatomického ústavu Masarykovy univerzity v Brně potvrdily, že aplikace paklitaxelu může měnit počty makrofágů na povrchu CP (EmamiAref *et al.* 2023). V této práci jsme předpokládali, že tyto makrofágy mohou produkovat cytokiny a prostřednictvím CSF aktivovat a ovlivnit i makrofágy povrchu mozkových komor.

Dále jsme předpokládali, že efekt paklitaxelu na CP může být přímý, nepřímý, či se může objevit kombinace obou. Přímý efekt se projevuje tehdy, když je lék přítomný v krevním řečišti. Jelikož je CP prokrvené stroma a je přímo spojené s krevním oběhem, může paklitaxel na CP působit svým primárním efektem a indukovat akutní zánět. Předpokládáme, že sekundární efekt paklitaxelu je způsoben uvolněnými DAMPs do krve, tedy komponenty např. poškozených axonů, jejich mitochondrií (mtDNA atd.). Projevuje se až po delší době a s postupným uvolňováním molekul i v delším časovém rozmezí. Předpokládalo se, že sekundárním efektem paklitaxelu je chronický zánět. V praxi se ovšem pravděpodobně uplatňuje kombinace obou zmíněných efektů, což však, s ohledem na pravidelnou aplikaci chemoterapeutik, vede k trvalému zánětlivému stavu a rozvoji neuropatie.

4 CÍLE PRÁCE

Práce si klade za cíl odhalit vliv paklitaxelu na makrofágy mozkových komor v kontextu neuropatické bolesti. K objasnění této problematiky byly stanoveny dva hlavní cíle:

1. detekovat početní změny aktivovaných makrofágů na povrchu ependymálních buněk mozkových komor ve stanoveném čase
2. detekovat početní změny rezidentních makrofágů na povrchu ependymálních buněk mozkových komor ve stanoveném čase

Konkrétně byly stanoveny tyto partikulární cíle:

- zhotovit *in vivo* model neuropatické bolesti indukované paklitaxelem
- detekovat makrofágy za použití imunohistochemické metody (ED1 – aktivované, ED2 – rezidentní)
- kvantifikovat rezidentní makrofágy
- kvantifikovat aktivované makrofágy
- změřit oblast jejich výskytu v pozorované tkáni v každém vzorku zvlášť
- analyzovat počet buněk na 1 mm² observované tkáně
- porovnat změny počtů aktivovaných makrofágů ve dnech 1, 7, 14, 21
- porovnat změny počtů rezidentních makrofágů ve dnech 1, 7, 14, 21
- porovnat změny počtů mezi aktivovanými a rezidentními makrofágy

5 MATERIÁL

Praktická část práce byla realizována na Anatomickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

5.1 *In vivo* model

Zvíře	Druh	Hmotnost	Pohlaví	Počet
divoký typ potkana	Wistar (<i>Rattus norvegicus domestica</i>)	200-250 g	samec	27

Tabulka 1: Laboratorní zvířata

Látka	1 dávka	Kumulativní dávka	Zdroj
Paklitaxel	2 mg/kg	8 mg/kg	Sigma-Aldrich
Vehikulum (CreCremophor EL a 95% EtOH v poměru 1 : 1)	2 mg/kg	8 mg/kg	

Tabulka 2: Seznam použitých léčiv k vytvoření *in vivo* modelu

5.2 Reagencie

Chemická látka	Zdroj
0,3% BSA	Sigma-Aldrich
Hoechst	
MOWIOL	
3% NGS	
PBS	
0,1% TWEEN 20	

Tabulka 3: Seznam použitých reagentů

5.3 Protilátky

Antigeny ED1 a ED2 sehrály dílčí roli při detekci makrofágů. ED1 a ED2, jakožto monoklonální protilátky, jsou schopny rozpoznat výhradně buňky mononukleárního fagocytárního systému. Obě protilátky se používají především k rozpoznání buněk s antigen-prezentující aktivitou. Protilátky se také váží na většinu populací Kolmerových buněk, monocytů periferní krve a prekurzory kostní dřeně (Gomes *et al.* 2004; Jäger, Radlanski, Götz 1993).

Protilátka ED1 byla v práci využita ke značení aktivovaných (ED1+, proinflamatorních) makrofágů. Protilátka ED2 byla naopak v práci použita za účelem identifikace rezidentních (ED2+, protiinflamatorních) makrofágů.

Protilátka	Původ	Ředění	Inkubace	Zdroj
ED1 (anti-CD68)	myší monoklonální protilátka	1 : 200	přes noc, pokojová teplota, tma	Serotec
ED2 (anti-CD163)	myší monoklonální protilátka	1 : 100	přes noc, pokojová teplota, tma	Serotec
G anti-M 549	kozí anti-myší monoklonální protilátka	1 : 100	90 min, pokojová teplota	Abcam

Tabulka 4: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek

5.4 Laboratorní vybavení

Zařízení	Výrobce
epifluorescenční mikroskop Nikon Eclipse NI-E Motorized Microscope System	Nikon Instruments Inc.
mikroskopová kamera Nikon DS-Ri1	
kryostat Leica 1800	Leica Microsystems

Tabulka 5: Seznam použitého laboratorního vybavení

5.5 Software

Software	Funkce
NIS-Elements	zpracování a analýza obrazu z mikroskopu, získání dat
Statistica 9.0	statistická analýza dat
GraphPad Prism 10	zpracování dat do grafů
ImageJ	zpracování obrazu z mikroskopu

Tabulka 6: Seznam použitých softwarů

6 METODY

6.1 Příprava zvířat a chirurgický zákrok

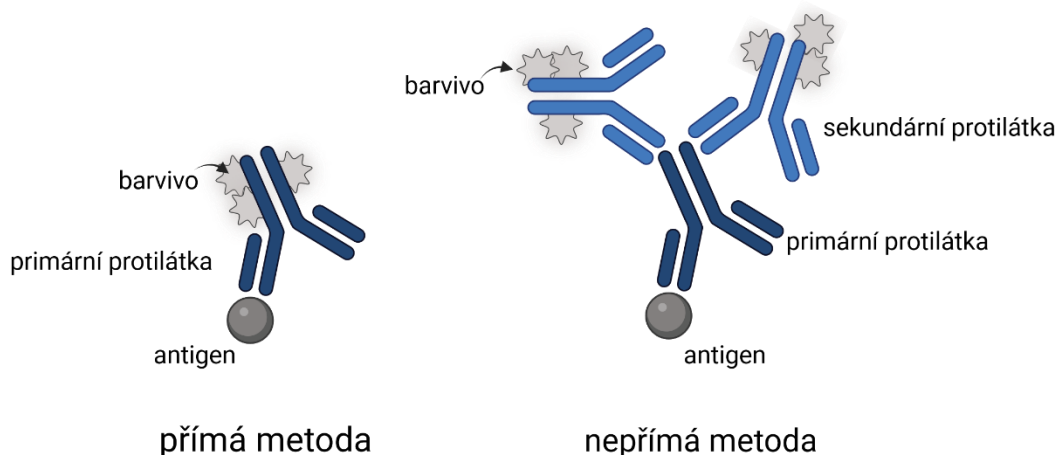
V praktické části byl použit již dříve vytvořený zvířecí model neuropatie indukované paklitaxelem dle Xiao *et al.* 2007.

Experimenty byly prováděny v SPF užitelském zařízení Masarykovy univerzity v Brně v souladu s protokoly schválenými Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat v rámci LF MU Brno. V experimentu bylo použito 27 samců kmene Wistar o hmotnosti 200–250 g, pocházejících z Chovného zařízení Masarykovy univerzity.

Experimentální zvířata byla náhodně rozdělena do dvou experimentálních skupin: zvířata léčená přímo paklitaxelem a zvířata, kterým bylo podáváno jeho vehikulum. Zvířata bez léčby byla použita jako naivní kontrola. Paklitaxel (Sigma-Aldrich; 2 mg/kg) nebo jeho vehikulum (Cremophor EL a 95% EtOH v poměru 1 : 1, Sigma) byly injikovány intraperitoneálně potkanům každý druhý den (dny 1, 3, 5 a 7; kumulativní dávka 8 mg/kg). Po době administrace byla zvířata ponechána různým dobám přežití (1, 7, 14 a 21 dní). Zvířata byla v určené dny usmrcena inhalací CO₂ a perfundována přes aortu, nejprve fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem (angl. phosphate-buffered saline, PBS, pH = 7,4), následovaným 500 ml Zamboniho fixačního prostředku. Mozek byl odstraněn a odděleně ponořen do Zamboniho fixativu při 4 ° C po dobu 72 hodin. Koronální kryostatické řezy (20 µm) mozkovými komorami byly použity pro následné nepřímé imunohistochemické barvení.

6.2 Imunohistochemie

IHC je běžná histologická technika využívaná k odhalení a vizualizaci antigenů v cílených buňkách či tkáních. IHC používá spojení mezi antigenem a protilátkou. Existují dva druhy takovýchto laboratorních metod, a to přímá a nepřímá. Přímá metoda je méně užívaná, je totiž méně senzitivní na vychytávání vazeb, a tak vyžaduje vyšší koncentrace protilátek. Používá jednoduchého procesu značení primární protilátky, která je vpravena přímo do vzorku tkáně. Oproti tomu nepřímá metoda vyžaduje jak primární, tak sekundární protilátky. Nejdříve je aplikována neznačená primární protilátka cílená na antigeny, poté sekundární (již konjugovaná), která se naváže a reaguje s primárním antigenem. Pro značení je využíváno mnoha látek, jako jsou enzymy či fluorescenční molekuly (imunofluorescence). Pro vizualizaci interakcí mezi antigenem a protilátkou se pak běžně používá světelný mikroskop, pro imunofluorescenci je ovšem potřebný fluorescenční mikroskop (Magaki *et al.* 2019; Kim, Roh, Park 2016).



Obrázek 5: Imunohistochemické metody
 vytvořeno autorkou dle (Kim, Roh, Park 2016) v programu (URL1)

6.2.1 Detekce makrofágů

Pro detekci makrofágů byla konkrétně zvolena nepřímá imunohistochemická metoda. První část imunohistochemie probíhala pro všechny vzorky stejně. Řezy mozku byly nejprve inkubovány v permeabilizačním roztoku 100% aceton : methanol v poměru 1 : 1 po dobu 10 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Permeabilizační krok zajišťuje penetraci buněčných membrán, a umožňuje tak pronikání protilátek do nitra buněk. Dále byly oplachovány PBS + 0,3 % hovězím sérovým albuminem (angl. bovine serum albumin, BSA) + 0,1% TWEEN 20 po dobu 30 minut. Poté byly opláchnuty roztokem 0,3% BSA a 0,1% TWEEN 20 v $1 \times$ PBS. Řezy mozku musely být před barvením podrobeny blokování všech nespecifických vazebných míst, aby se zabránilo vazbě protilátky na necílové struktury. Blokování probíhalo ve 3% normálním kozím séru (angl. normal goat serum, NGS) po dobu 30 minut.

6.2.1.1 Aktivované makrofágy

Část vzorků určených pro detekci aktivovaných makrofágů byla inkubována v primární protilátce ED1 (anti-CD68, firma Serotec) ředěné roztokem PBS v poměru 1 : 200 přes noc při pokojové teplotě. Další den byly vzorky promyty 3×5 minut na elektrickém magnetickém míchadle v PBS. Následně byly mozky inkubovány se sekundární protilátkou G anti-M konjugovanou fluorescenčním barvivem TRITC (firma Abcam) ředěné roztokem PBS v poměru 1 : 100 po dobu 90 minut při pokojové teplotě bez přítomnosti světla. Po inkubaci byly vzorky opět promyty 3×5 min na elektrickém magnetickém míchadle v PBS. Následovalo pětiminutové dobarvení jader v roztoku barviva Hoechst, poté byly vzorky opláchnuty redestilovanou vodou a upevněny pomocí montovacího média MOWIOL.

6.2.1.2 Rezidentní makrofágy

Zbylé vzorky (určené pro detekci rezidentních makrofágů) byly obdobnými metodami vystaveny jiné primární protilátce. Mozky nejprve byly inkubovány s primární protilátkou ED2 (anti-CD163, firma Serotec) ředěné roztokem PBS v poměru 1 : 100 přes noc při pokojové teplotě. Další den byly vzorky promyty 3×5 minut na elektrickém magnetickém míchadle v PBS a následně inkubovány se sekundární protilátkou G anti-M 549 (firma Abcam) konjugovanou s fluorescenčním barvivem TRITC v poměru ředěné roztokem PBS 1 : 100 po dobu 90 minut při pokojové teplotě bez přítomnosti světla. Opět proběhlo promytí 3×5 min na elektrickém magnetickém míchadle v PBS následované dobarvením jader (5 minut, Hoechst) a oplach redestilovanou vodou. Nakonec byly vzorky montovány do MOWIOLu.

6.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je vizualizační technika používaná pro zobrazení fluorescentních vzorků. Tato technika se běžně využívá k pozorování buněk, tkání, organických, či anorganických materiálů (Jensen 2012). Proces fluorescenční mikroskopie se zakládá na absorpci světelné energie indikátorem (excitace), která je pár nanosekund později následována emisí části světla s delší vlnovou délkou. Během procesu se totiž část energie ztrácí, takže emitovaná energie je menší než absorbovaná. Také platí, že světlo s menší energií má delší vlnovou délku než světlo s větší energií, které má naopak vlnovou délku kratší. Tento posun nebo změna vlnové délky se nazývá Stokesův posun. Větších Stokesových posunů se využívá k oddělení emitovaného světla od excitačního. Právě toto je hlavním principem fungování fluorescenční mikroskopie, výsledkem je pak jasný světelný záznam na tmavém tlumeném pozadí. K oddělení světla tímto způsobem se obvykle používají dva optické filtry. Excitační filtr definuje část světla určenou k excitaci a jeho rozsah. Emisní (bariérový) filtr určující spodní hranici vlnových délek (v některých případech i horní mez) rozděluje a propouští paprsky určitých – delších – vlnových délek. Výše uvedené filtry spolu s dichroickým zrcadlem tvoří blok – fluorescenční kostku, ve které jsou uspořádány. Dichroické zrcadlo odráží (excitační světlo) nebo propouští (emisní světlo) světlo v závislosti na vlnových délkách a je umístěno mezi excitačním a emisním filtrem pod úhlem 45° (Sanderson *et al.* 2014).

Nejpoužívanějším mikroskopem ve fluorescenční mikroskopii je epifluorescenční mikroskop (Jensen 2012). V tomto druhu mikroskopu nejprve světlo z výbojky přechází přes kolektor osvětlovače, který také může obsahovat tepelné filtry a závěrku (shutter). Potom světlo vstupuje do fluorescenční kostky, tam nejprve excitační filtr selektuje část světla a poté se vybrané světlo odrazí od dichroického zrcadla. Světlo dopadá na zkoumaný objekt, kde dochází k excitaci fluoroforů a fluorescentní vzorek tak vyzařuje světlo, které je zaostřeno objektivem a posláno skrz dichroické zrcadlo a další filtr, tentokrát emisní. Světlo, které prošlo tímto filtrem je orientováno a směřováno buď k detektoru kamery, nebo k okulárům mikroskopu (Webb, Brown 2012; Liu *et al.* 2017).

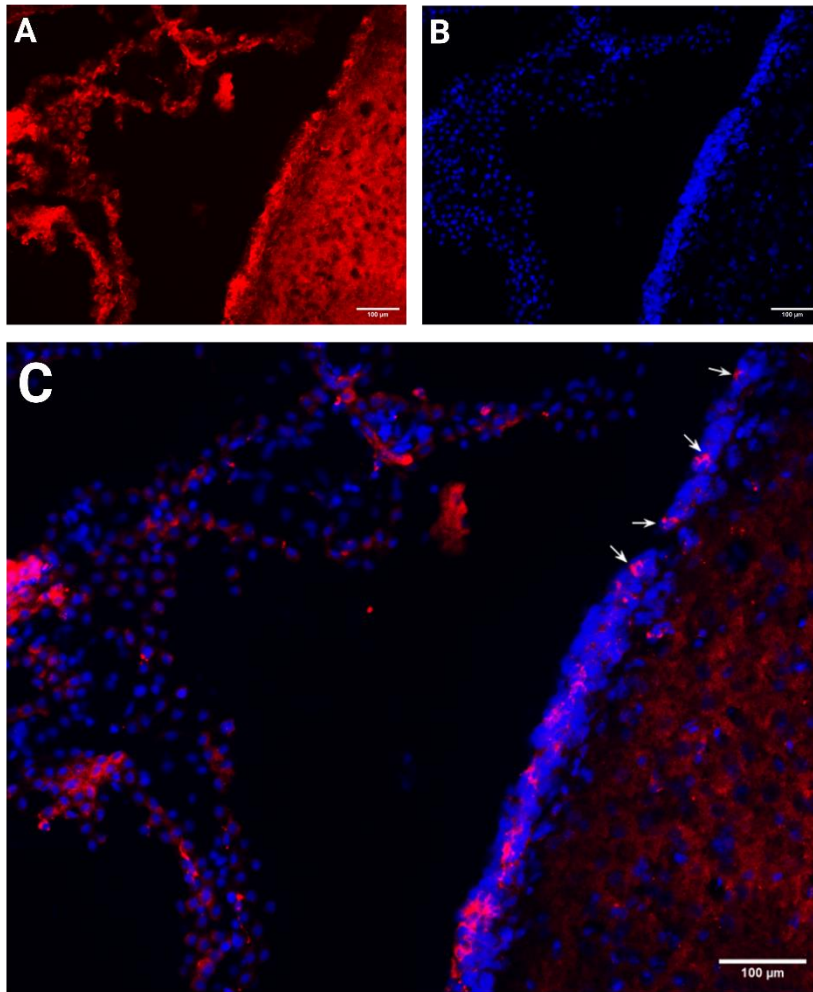
6.3.1 Vizualizace

K zabránění vysychání buněk, byla krycí sklíčka fixována na podložní sklíčka bezbarvým lakem. Po zaschnutí laku byly preparáty pozorovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu. Pro pořizování snímků byl použit epifluorescenční mikroskop (Nikon Eclipse NI-E Motorized

Microscope System) vybavený stabilizovaným napájecím zdrojem pro těleso lampy a fotoaparátem Nikon DS-Ri1 (Nikon, Praha, ČR). Snímky z každého preparátu mozkových řezů obsahujících choroidální plexus laterálních komor bylo pořízeno přibližně 10–15 snímků za použití stejných parametrů kamery, optiky a lampy, stejně jako expozičních podmínek (intenzita světla, zvětšení atd.).

6.4 Analýza dat

Mikroskopické snímky byly nejprve zpracovány v programu NIS-Elements. Pomocí tohoto programu byla měřena plocha pozorovaných ependymálních buněk povrchu mozkových komor, následně byly makrofágy rozeznány a kvantifikovány v každém vzorku zvlášť (pouze tam, kde bylo vidět i jádro). Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programech Statistica 9.0 a GraphPad Prism 10. Získaná data byla použita pro určení počtu makrofágů na 1 mm². Z dat byl stanoven aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Statistická významnost, předem stanovená na $p < 0,05^*$ (paklitaxel), $p < 0,05^+$ (vehikulum), byla prověřena pomocí neparametrického Mann-Whitney U-testu v programu Statistica 9.0.



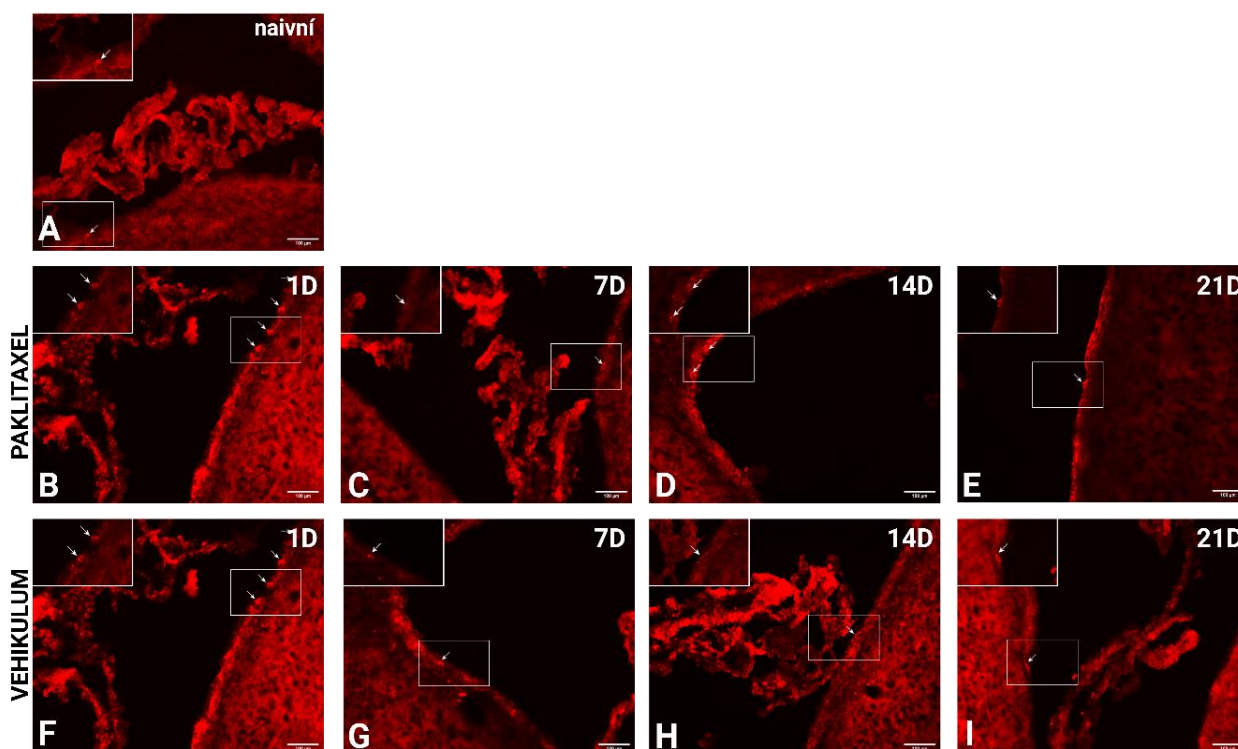
Obrázek 6: Reprezentativní mikroskopické snímky preparátů podrobených imunohistochemii ukazující postup identifikace makrofágů. Buňky (A) jsou značeny červeně sekundární protilátkou G-anti-M 549 (kojugovanou s fluorescenčním barvivem TRITC, jádra buněk (B) modře fluorescenčním barvivem Hoechst. (C) Fúze mikroskopických snímků A a B. Makrofágy stěn mozkových komor byly identifikovány v každém z pořízených mikroskopických snímků, podmínkou k jejich identifikaci byla přítomnost buněčného jádra. Tímto způsobem byly identifikované makrofágy (šipky) kvantifikovány v každém z pořízených mikroskopických snímků. Měřítka = 100µm. Pořízeno autorkou, vytvořeno v programu (URLI) autorkou.

7 VÝSLEDKY

Hlavním cílem této práce bylo sledovat, jak se v průběhu času mění počty makrofágů ependymálních buněk stěn mozkových komor. K dosažení tohoto cíle byl použit *in vivo* model neuropatické bolesti indukované paklitaxelem ke zkoumání makrofágů na povrchu buněčné výstelky mozkových komor. Makrofágy byly značeny imunohistochemickými metodami, kdy protilátka ED1 vykazuje aktivované buňky (prozánětlivé) a ED2 rozpoznává rezidentní buňky (protizánětlivé). Následně proběhla vizualizace fluorescenční mikroskopii. Na pořízených mikroskopických snímcích byly v pozorované tkáni makrofágy kvantifikovány. Tkáň byla následně změřena. Z vyhodnocených dat byly poté sestaveny grafy.

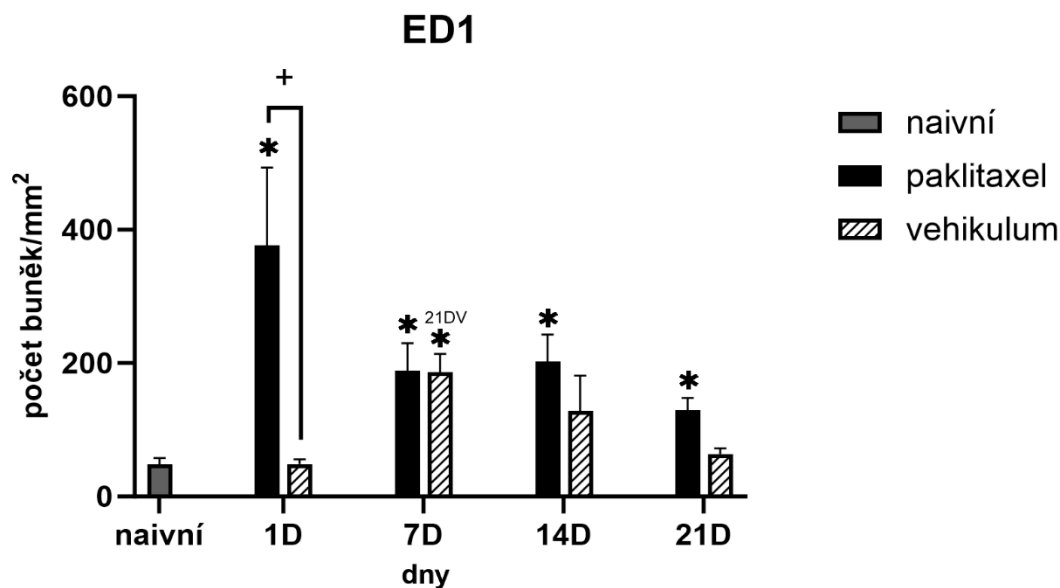
Je důležité zmínit, že v každé experimentální skupině byli zahrnuti pouze 2–3 potkani. Tyto informace jsou důležité pro pochopení velikosti vzorku a statistické významnosti výsledků, protože zjištění mohou být omezena malým počtem subjektů.

7.1 ED1



Obrázek 7: Reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu ukazující počty aktivovaných makrofágů povrchu mozkových komor. Makrofágy byly značeny primární protilátkou ED1 detekující aktivované (pro-inflamatorní makrofágy). Buňky jsou značeny **červeně** sekundární protilátkou G anti-M 549 konjugovanou fluorescenčním barvivem TRITC, taktéž identifikované makrofágy (**šipky**). Ve všech pozorovaných skupinách bylo možné nalézt aktivované makrofágy, ovšem snímky naivní kontroly vykazovaly signifikantně nižší počty makrofágů než snímky skupin ovlivněných paklitaxelem či jeho vehikulem. **(A) Naivní kontrolní skupina.** Jako kontrolní skupina byla použita zvířata bez administrace. **(B)(C)(D)(E) Skupiny zvířat, kterým byl podáván paklitaxel.** Paklitaxel byl podáván každý druhý den (celkem 4 aplikace), poté byla zvířata usmrcena v různé dny (dny 1, 7, 14, 21). **(F)(G)(H)(I) Skupiny zvířat, kterým bylo podáváno vehikulum paklitaxelu.** Vehikulum bylo zvířecím subjektům podáváno paralelně s administrací paklitaxelem předchozí skupiny. Zvířata byla taktéž ponechána stejným dobám přežití (v délce 1, 7, 14, 21 dní). Byla provedena statistická analýza se směrodatnou odchylkou předem stanovenou na $p < 0,05$. Měřítko = $100\mu\text{m}$. *Pořízeno autorkou, vytvořeno autorkou v programu (URLI).*

Obrázek 7 shrnuje počty aktivovaných makrofágů rozpoznávaných protilátkou ED1. Aktivované makrofágy bylo možné nalézt ve všech pozorovaných skupinách, ovšem snímky naivní kontroly vykazovaly signifikantně nižší počty makrofágů.



Obrázek 8: Počty aktivovaných makrofágů povrchu mozkových komor na 1 mm² tkáně. Zvířata byla léčena paklitaxelem, či jeho vehikulem a usmrcena v různé dny (dny 1, 7, 14, 21). Makrofágy byly značeny primární protilátkou ED1 rozeznávající aktivované (pro-inflamatorní) makrofágy. Aktivované makrofágy byly kvantifikovány v každém vzorku zvlášť. Následně byla změřena sledovaná oblast (vrstva ependymálních buněk mozkových komor) a určeny počty aktivovaných makrofágů na 1 mm² tkáně. Jako kontrolní skupina byla použita zvířata bez předchozí administrace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Byla ověřena statistická významnost (* = $p < 0,05$ v porovnání s naivní kontrolou, + = $p < 0,05$ v porovnání s vehikulem, ^{21DV} = $p < 0,05$ v porovnání 21. dnem skupiny vehikulum). Počty všech skupin léčených paklitaxelem se jeví statisticky významně zvýšené. Den 1. můžeme také pozorovat staticky významný rozdíl mezi skupinou paklitaxel a vehikulum. Počty skupiny vehikulum dosahují svého maxima den 7., kdy jsou v porovnání s naivní kontrolou významně zvýšené. *Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.*

7.1.1 Paklitaxel

První den po poslední injekci paklitaxelu (1D) jsme pozorovali vysoký počet aktivovaných makrofágů stěn mozkových komor ve srovnání s naivní kontrolou i vehikulem. To vypovídá o zřejmém efektu pouze paklitaxelu a zároveň indikuje akutní stav neuroinflamace. Po týdnu se tato reakce začala uklidňovat a počet makrofágů se s časem u zvířat léčených paklitaxelem snižoval. Ve srovnání s naivní kontrolou však stále zůstává zvýšený. Tento pozdější vývoj by mohl být zvýšený sekundárním efektem paklitaxelu.

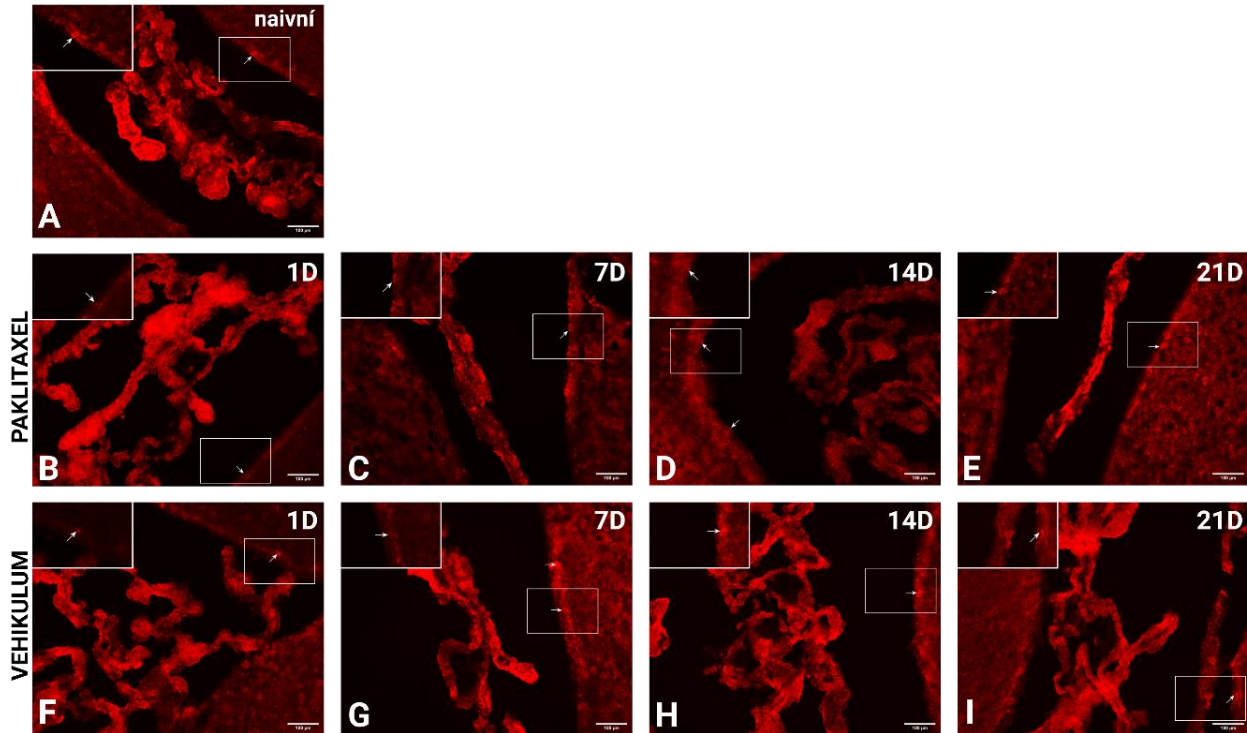
Z Grafu 1 vyplývá, že nejvyšší počty makrofágů se v těle nachází 1. den. 7. a 14. den si makrofágy udržují obdobné počty. Nejmenší výskyt makrofágů jsme pozorovali 21. den, kdy byly ovšem počty v porovnání s naivní kontrolou stále zvýšené. Z grafu je patrné, že počty makrofágů po prvotním nárůstu klesaly s přibývajícím časem.

7.1.2 Vehikulum

Ve skupině, která nebyla ošetřena paklitaxelem, nýbrž jeho vehikulem, začala imunitní odpověď slabě. Následně nabrala na své síle, zesilovala a rostla do 7. dne, kdy dosáhla svého vrcholu. Zde vidíme významný početní nárůst v porovnání se skupinou naivní. 7. den jsou tedy pravděpodobně zánětlivé reakce a související účinky způsobeny jak samotným paklitaxelem,

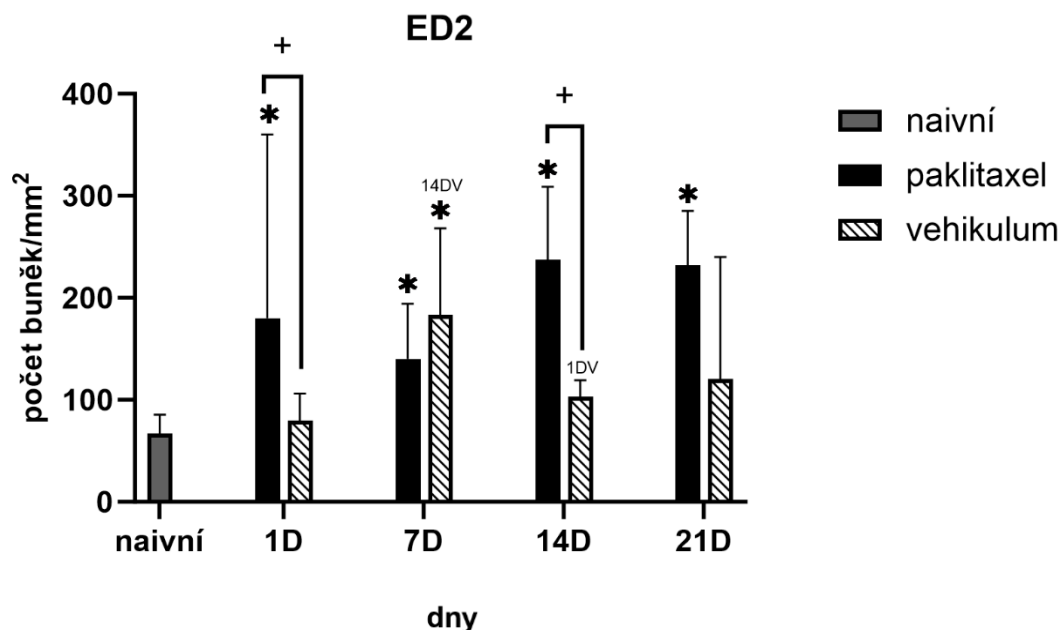
tak i nosičem účinné látky. Počty makrofágů se v této skupině začaly opět snižovat a 21. den se vrátily na svoji přibližnou původní úroveň.

7.2 ED2



Obrázek 9: Reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu ukazující počty rezidentních makrofágů povrchu mozkových komor. Makrofágy byly značeny primární protilátkou ED2 rozeznávající rezidentní (proti-inflamatorní makrofágy). Buňky jsou značeny **červeně** sekundární protilátkou G anti-M 549 konjugovanou fluorescenčním barvivem TRITC, taktéž identifikované makrofágy (**šipky**). Rezidentní makrofágy bylo možné pozorovat ve všech skupinách, ovšem snímky naivní kontroly opět vykazovaly signifikantně nižší počty makrofágů. **(A) Naivní kontrolní skupina.** Jako kontrolní skupina byla použita zvířata bez administrace. **(B)(C)(D)(E) Skupiny zvířat, kterým byl podáván paklitaxel.** Paklitaxel byl podáván každý druhý den (celkem 4 aplikace), poté byla zvířata usmrcena v různé dny (dny 1, 7, 14, 21). **(F)(G)(H)(I) Skupiny zvířat, kterým bylo podáváno vehikulum paklitaxelu.** Vehikulum bylo zvířecím subjektům podáváno paralelně s administrací paklitaxelem předchozí skupiny. Zvířata byla taktéž ponechána stejným dobám přežití (v délce 1, 7, 14, 21 dní). Byla provedena statistická analýza se směrodatnou odchylkou předem stanovenou na $p < 0,05$. Měřítka = 100 μ m. *Pořizeno autorkou, vytvořeno autorkou v programu (URL1).*

Obrázek 9 schematizuje počty rezidentních makrofágů identifikovaných protilátkou ED2. Rezidentní makrofágy, podobně jako aktivované, bylo možné pozorovat ve všech observovaných skupinách. Snímky naivní kontroly vykazovaly opět signifikantně nižší počty makrofágů.



Obrázek 10: Počty rezidentních makrofágů povrchu mozkových komor na 1 mm² tkáně. Zvířata byla léčena paklitaxelem, či jeho vehikulem a usmrcena v různé dny (dny 1, 7, 14, 21). Makrofágy byly v tomto případě značeny primární protilátkou ED2 detekující rezidentní (proti-inflamatorní) makrofágy. Rezidentní (ED2+) makrofágy byly kvantifikovány v každém vzorku zvlášť. Následně byla změřena sledovaná oblast (vrstva endymálních buněk mozkových komor) a určeny počty rezidentních makrofágů na 1 mm² tkáně. Jako kontrolní skupina byla použita zvířata bez předchozí administrace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Byla ověřena statistická významnost (* = $p < 0,05$ v porovnání s naivní kontrolou, + = $p < 0,05$ v porovnání s vehikulem, 1DV = $p < 0,05$ v porovnání s 1. dnem skupiny vehikulum, 14DV = $p < 0,05$ v porovnání se 14. dnem skupiny vehikulum). Počty všech skupin léčených paklitaxelem se jeví statisticky významně zvýšené v porovnání s naivní kontrolou. Den 1. a 14. se taktéž jeví signifikantní se skupinou vehikulum tentýž pozorovaný den. Počty skupiny vehikulum jsou signifikantní den 7. Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.

7.2.1 Paklitaxel

Data obrázku 9 naznačují, že se počty makrofágů v průběhu experimentu progresivně zvyšují. Již 1. den se počty jeví jako signifikantní, 7. den dochází k náhlému poklesu, který ovšem není statisticky významný. Počty dále rostou a ani ke konci pozorovaného období nemůžeme pozorovat pokles. Počty tedy mohou růst i za pozorovanou mez. Tuto domněnku je ale třeba ještě v budoucnu potvrdit rozšiřujícími výzkumy.

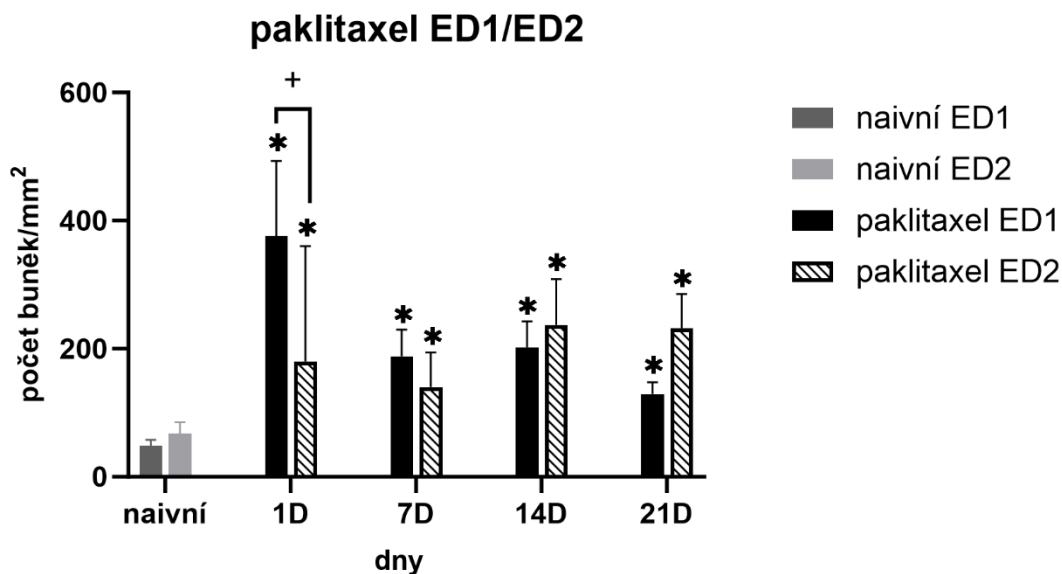
Obecně lze říci, že v tomto případě mají počty makrofágů potkanů, kterým byl podáván paklitaxel, rostoucí charakter. Zde by početní změny mohly být vyvolány kombinací primárního i sekundárního efektu léku.

7.2.2 Vehikulum

1. den je počet makrofágů ve skupině vehikulum nejnižší, současně je významně nižší než makrofágy skupiny paklitaxel. Odpověď je tedy způsobena primárně samotným paklitaxelem. Nicméně 7. den dochází k podstatnému zvýšení počtů makrofágů, zde dosahují svého nejvyššího bodu. Od 14. dne, kdy se počty zdají nižší, můžeme pozorovat klesající chování.

7.3 ED1/ED2

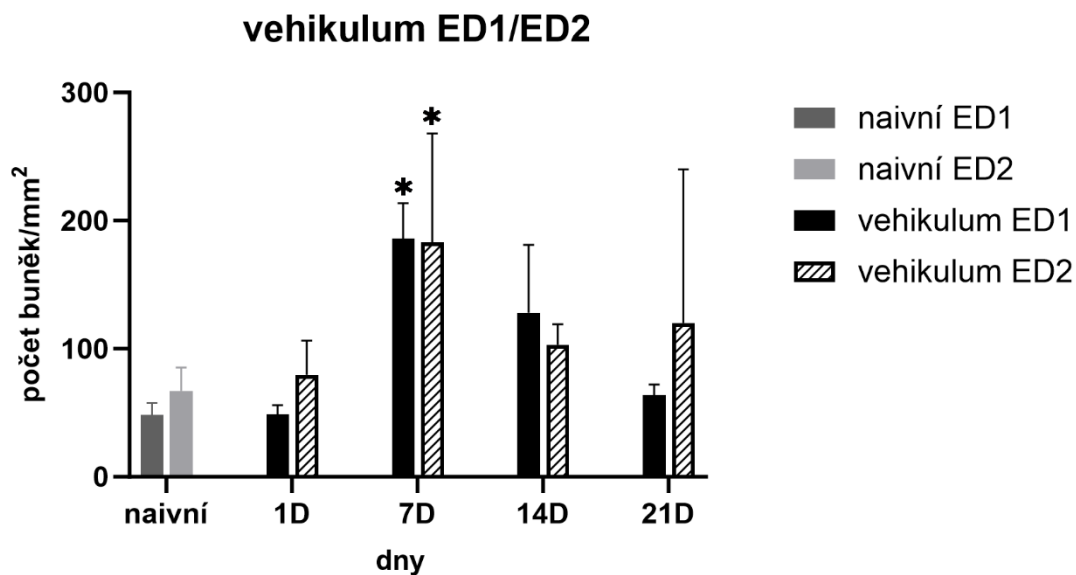
7.3.1 Paklitaxel



Obrázek 11: Porovnání počtů aktivovaných makrofágů vzhledem k rezidentním skupiny paklitaxel. Graf ukazuje stejné experimentální skupiny jako obrázky 8 a 10. jedná se ovšem pouze o skupiny paklitaxel (aktivované ED1/rezidentní ED2). Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Statisticky významné vůči naivní kontrole se jeví všechny skupiny léčené paklitaxelem jak aktivované, tak rezidentní (* = $p < 0,05$). Den 1. můžeme pozorovat signifikantní rozdíl mezi počty aktivovaných a rezidentních makrofágů (+ = $p < 0,05$). Mezi dnem 7. a 14. dochází ke změně převahy, během této doby v těle svými počty převládnu rezidentní makrofágy. Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.

Pokud porovnáme počty aktivovaných a rezidentních makrofágů, uvidíme souhru mezi pro- a proti-inflamatorní aktivací imunitního systému. Zatímco počty aktivovaných makrofágů po navýšení v 1. den v následujících dnech postupně klesají, počty rezidentních makrofágů mají rostoucí charakter. Ke konci sledovaného období, tedy 21. den, je patrné, že rezidentní makrofágy povrchu mozkových komor v těle převažují. 7. den zde hraje roli mezníku mezi převahou aktivních a rezidentních makrofágů.

7.3.2 Vehikulum



Obrázek 12: Porovnání počtů aktivovaných makrofágů vzhledem k rezidentním skupině vehikulum. Graf ukazuje stejné experimentální skupiny jako obrázky 8 a 10. jedná se ovšem pouze o skupiny vehikulum (aktivované ED1/rezidentní ED2). Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Statisticky významné vůči skupinám naivní kontroly byly počty jak aktivovaných, tak rezidentních makrofágů den 7. (* = $p < 0,05$). Z grafu je patrný velmi podobný průběh imunitní reakce obou pozorovaných skupin. Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.

Jak naznačuje i tvar grafu obrázku 11, počty makrofágů vehikulem ošetřených zvířat, mají relativně podobný charakter, pokud mluvíme o početních změnách. Počty 1. den nejeví žádné změny v porovnání s naivní kontrolou, 7. den se dotýkají svého maxima a později se vrací ke svému původního počtu, kterého dosáhnou 21. den.

8 DISKUZE

Tato část práce shrnuje výsledky a přínosy studia, a to ve světle předchozích výzkumů. Neuropatická bolest, stav, který běžně následuje léčbu rakoviny, stav, který stále nenalezl své řešení. Právě neuropatická bolest byla jedním z předmětů mého zkoumání. Neuropatická bolest se projevuje dokonce u 60–70 % pacientů podstupujících léčbu. Mezi její příznaky patří bolest, brnění a nepříjemná přecitlivělost na chlad nebo dotek (alodynie). Neuropatie se svými projevy přináší pacientům do života značné komplikace, snižuje jeho kvalitu a je bohužel stále nevléčitelná. Přesné reakce PNS a CNS na léčbu chemoterapií dosud nebyly zcela objasněny (Staff *et al.* 2020).

Rakovina, jakéhokoli typu, je známým celosvětovým problémem. Dnes existuje mnoho různých metod a možností řešení tohoto onemocnění, možná i díky tomu úmrtnost na rakovinu v průběhu let klesá. Přesto rakovina zůstává jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě (Debela *et al.* 2021; Siegel *et al.* 2023). Jednou z nejrozšířenějších a nejběžnějších léčebných technik je chemoterapie (obvykle v kombinaci s jinými metodami) (Debela *et al.* 2021). Chemoterapie cílí na nádorové buňky a inhibuje jejich rychlé množení, čímž také zastavuje šíření rakoviny. Jelikož chemoterapeutika nepůsobí toxicky pouze na rakovinné buňky, ale ovlivňují i funkce buněk PNS a CNS, přináší s sebou tato léčba vedlejší účinky, tedy i zmiňovanou neuropatickou bolest. Ta je zároveň jedním z primárních důvodů dřívějšího ukončení chemoterapie. Neléčení rakoviny však může mít vážné, mnohdy až smrtelné následky (Mercadante, Kasi 2023; Staff *et al.* 2020; Amjad, Chidharla, Kasi 2023).

Tato práce byla zaměřena speciálně na paklitaxel, vysoce účinné cytostatikum. Jedná se o běžně používaný taxan, jehož vedlejším účinkem je periferní neuropatická bolest (Staff *et al.* 2020). Je známo, že paklitaxel ovlivňuje normální funkci mikrotubulů, a to nejen u rakovinných buněk. Právě dysfunkční mikrotubuly v gangliích dorzálních kořenů, axonech a Schwannových buňkách jsou pravděpodobně příčinou neuropatické bolesti, ovšem i další typy buněk mohou být pod vlivem tohoto léku (Scripture, Figg, Sparreboom 2006; Chen *et al.* 2022). Současná teorie mluví o následném poškození mitochondrií. Bylo zjištěno, že se do mimobuněčných prostor dostávají komponenty těchto organel, tzv. DAMPs, jako jsou mtDNA. DAMPs následně aktivují imunitní systém. Dochází k produkci oxidových radikálů, sekreci cytokinů a aktivaci gliových buněk, a tím k opětovnému poškození mitochondrií (Garg, Johri, Chakraborty 2023).

V minulosti provedené výzkumy odhalily úzkou souvislost neuropatické bolesti vyvolané chemoterapií s neuroinflamací. Neuroinflamace, tedy zánět uvnitř mozku, je aktivována dříve zmíněným koloběhem postupného poškození buněk a uvolňování látek. Provedené výzkumy potvrzují, že se tak děje aktivací gliových buněk (astrocytů, mikroglíí atd.), které produkují zánětlivé mediátory (ROS, cytokiny atd.). Neuroinflamace, pokud je akutní, slouží jako obranný mechanismus jedince, jestliže ovšem nedochází k jejímu vyřešení (jako např. u opakované aplikace cytostatik, kdy pravidelně, vlivem léčby, dochází k poškození buněk PNS a CNS), může propuknout neurozánět chronický. Výzkumy upozorňují na fakt, že neuroinflamace v tomto případě může mít negativní dopady na organismus a přispívat k rozvoji

neuropatické bolesti (DiSabato, Quan, Godbout 2016; More *et al.* 2013; Gorji 2022; Miaskowski *et al.* 2019).

Souvislostmi mezi neurozánětem a neuropatickou bolestí se zabývala studie Miaskowsky *et al.* (2019). Konkrétně zkoumali poruchy neurozánětlivých mechanismů u přeživších pacientů léčby rakoviny. Navázali na dřívější zjištění, že s mitochondriální dysfunkcí je asociováno narušení signálních drah, mimo to přináší tato studie informace, že u pacientů, kteří přežili rakovinu s PIPN, byly nalezeny poruchy v pro- a proti-zánětlivých drahách spojených s neuroinflamací. Kromě toho jejich práce potvrzuje dřívější zjištění odlišné genové exprese pacientů hlásících a nehlásících neuropatickou bolest vyvolanou paklitaxelem. Celkově tato zjištění naznačují, že chronický neurozánět přispívá k přetrvávání a udržování neuropatické bolesti vyvolané chemoterapií (Miaskowski *et al.* 2019).

V několika studiích bylo odkazováno na význam choroidálního plexu nejen v průběhu, ale také v počátcích neuroinflammace. Z dostupných informací vyplývá zásadní role CP v komunikaci mezi CNS a imunitním systémem. CP by dále mohl představovat důležitý vstup pro imunitní buňky putující do CNS, kde indukující neurozánět (Engelhardt, Wolburg-Buchholz, Wolburg 2001). CP je vysoce vaskularizované stroma tvořené speciální výstelkou epitelu. Mezi hlavní funkce CP patří produkce CSF a formování B-CSFB, stará se tedy o stálost prostředí a udržení homeostázy uvnitř mozku. Samotná B-CSFB tvoří rozhraní mezi krví a mozkomíšním mokem. Poškození CP může vést k průniku patogenů z krve do nervové soustavy a taková situace dále vyústit v neurozánět (Thompson, Brissette, Watt 2022; Solár *et al.* 2020). Přestože se CP stává předmětem mnoha studií, je v dnešní době stále velmi neprobádanou strukturou. Výzkumy kladou zvláštní důraz na CP v kontextu onemocnění postihujících CNS, jako jsou onemocnění autoimunitní, infekční a traumatická, na kterých, jak bylo zjištěno, se významně podílí (Solár *et al.* 2020).

Meeker *et al.* (2012) ve své práci poukázali na skutečnost, že choroidální plexus formující B-CSFB je ve srovnání s BBB navržen k dynamičtější reaktivitě s imunitním systémem. Tato studie ukazuje, že v těchto odpovědích hlavní roli hrají nejspíše makrofágy nebo dendritické buňky a epitel. To je dáno zejména jejich schopností sekrece cytokinů, prezentace antigenů a exprese adhezních molekul. Navíc neustále dohlíží na oblast svého výskytu, což jim umožňuje receptory, uzpůsobené k detekci patogenů. Autoři však poznamenávají, že je třeba provést další výzkum v této oblasti, aby bylo možné lépe pochopit, jak choroidální plexus ovlivňuje progresi imunitních reakcí v CNS (Meeker *et al.* 2012).

Jak bylo avizováno, bylo dokázáno, že CP hraje významnou roli v průběhu neuroinflammace a tedy eventuálně i v průběhu neuropatické bolesti. Spuštěním neurozánětu dochází také k vylučování cytokinů, které aktivují lokální akumulaci imunitních buněk CP v CSF, dále rekrutují imunitní buňky do CNS přes CP (Cui, Xu, Lehtinen 2021). Mezi rezidentní imunitní buňky CP patří neprobádané Kolmerovy buňky, informace týkající se těchto makrofágům-podobných imunitních buněk jsou velmi limitované. Makrofágy během zánětu způsobují především fagocytózu a prezentují antigeny, ale také produkují růstové faktory a jak pro- tak proti-zánětlivé cytokiny (Fujiwara, Kobayashi 2005). Přesná role makrofágů v průběhu neuropatické bolesti ovšem stále nebyla objasněna. Existuje pouze velmi omezený počet

výzkumů týkajících se neuropatické bolesti v souvislosti s neuroinflamací a imunoreaktivní dynamikou (viz níže).

Studie Makker *et al.* (2017) zkoumala imunitní a neurozánětlivé změny ve vztahu k neuropatické bolesti indukované chemoterapií v DRG a sedacích nervech myšího *in vivo* modelu. Jejich výsledek naznačuje, že neurozánětlivé změny u testovaných zvířat postižených periferní neuropatií vyvolanou chemoterapií, jsou omezeny na rezidentní imunitní nebo gliové buňky. Z jejich závěru vyplývá, že léčba chemoterapií má rozdílné účinky na imunitní a nervový systém. Data naznačují, že paklitaxel může interagovat s PNS bez současné systémové imunitní aktivace a vyvolává zde patologické změny. Taktéž způsobuje fenotypové změny v CNS. Pomocí odlišných mechanismů taktéž ovlivňuje průběh neuropatické bolesti indukované chemoterapií. Výsledky citované studie podporují teorii, že důležitou roli v průběhu neuropatie hraje infiltrace imunitních buněk (především makrofágů) nebo změny hladin prozánětlivých cytokinů v PNS (Makker *et al.* 2017).

Studie Anatomického ústavu Masarykovy univerzity v Brně ukázaly, že aplikace paklitaxelu může zvýšit počty makrofágů na povrchu choroidálního plexu (počty Kolmerových buněk) (EmamiAref *et al.* 2023) V naší práci jsme předpokládali, že sekrecí cytokinů do CSF mohou tyto makrofágy aktivovat makrofágy i podél ependymální vrstvy mozkových komor a navýšit jejich počet. Dále v naší hypotéze zazněla teorie přímého a nepřímého efektu paklitaxelu. Jelikož CP obsahuje fenestrované kapiláry propojené s krevním oběhem, mohou jeho funkce být ovlivňovány přímo paklitaxelem (či jiným chemoterapeutikem, které je aplikováno intravenózně). Do krevního řečiště se ale mohou dostat i DAMPs např. komponenty poškozených mitochondrií, které by později mohly nepřímo ovlivňovat CP. V praxi se pak pravděpodobně uplatňují oba dva efekty ve vzájemné kombinaci s výsledkem v chronické neuroinflamaci.

V práci byl pomocí potkaního *in vivo* modelu neuropatie indukované paklitaxelem studován vliv léčby na stěny mozkových komor. Konkrétně bylo primárním účelem této práce analyzovat počty rezidentních (ED2+) a aktivovaných (ED1+) makrofágů v časovém rozpětí 21 dní. Zvířata bez jakékoliv léčby byla využita jako naivní kontrola. Část zvířat byla dále ošetřena pouze nosičem účinné látky, a sice k rozeznání vlivu vlastního paklitaxelu, či paklitaxelu společně s jeho vehikulem. V práci se nám provedlo prokázat, že aplikace paklitaxelu může měnit počty makrofágů na povrchu mozkových komor. Aktivované, a stejně tak rezidentní makrofágy, bylo možné pozorovat ve všech observovaných skupinách. Skupiny naivní kontroly, ukazující přirozený stav organismu, vykazovaly signifikantně nižší počty makrofágů, což potvrzuje jejich důležitou roli v průběhu neuropatické bolesti.

Počet aktivovaných (proinflatorních) makrofágů se rapidně zvýšil hned první den po léčbě paklitaxelem. To by mohlo odkazovat na přímý efekt paklitaxelu, tedy akutní stav neuroinflamace. V sedmý den, kdy se počty makrofágů ve skupinách paklitaxel a vehikulum vyrovnaly, by se mohlo jednat o situaci, kdy má i nosič účinné látky svůj podíl na indukci a rozvoji neuropatické bolesti. Počty makrofágů po prvotním navýšení klesaly s přibývajícím časem, ovšem i ke konci pozorovaného období (21. den) jsou počty makrofágů stále zvýšené, tělo i tehdy stále bojuje s neurozánětem. Zde by se mohl uplatňovat nepřímý efekt paklitaxelu.

Naproti tomu počty rezidentních (protiinflatorních) makrofágů měly rostoucí tendenci s přibývajícím časem. Již první den se počty makrofágů ve skupině zvířat léčených paklitaxelem jeví signifikantně zvýšené. Den sedmý jsme opět pozorovali dorovnání hladin skupin paklitaxel i vehikulum. Počty rezidentních makrofágů paklitaxelem léčených zvířat pokračovaly ve svém zvyšování a rostly dokonce až za pozorované období. V tomto případě by, dle tvaru grafu, početní změny mohly být způsobeny kombinací přímého a nepřímého účinku paklitaxelu.

Porovnáním počtů makrofágů v obou skupinách – rezidentní i aktivované – pozorujeme vzájemnou souhru mezi pro- a proti-inflatorními reakcemi. Z pozorování vyplývá, že se po aplikaci paklitaxelu postupně vyvíjí neurozánět. Ovšem počáteční dysbalance mezi pro a proti zánětlivými makrofágy je v průběhu času vyrovnána. Sedmý den figuruje jako jakýsi „zlomový bod“. Nejenže tento den se počty rezidentních i aktivovaných makrofágů ve skupinách vehikulem léčených zvířat vyrovnávají počtům makrofágů ve skupinách paklitaxelem léčených zvířat, ale od tohoto dne mizí i nerovnováha mezi aktivovanými a rezidentními makrofágy ve skupinách paklitaxel, kde nastává převaha rezidentních makrofágů. Postupem času se totiž projevila protektivní role makrofágů, potenciálně zásadní při zmírnění neuropatické bolesti. To se stává zjevným ke konci pozorovaného období, kdy počty rezidentních makrofágů převyšují počty aktivovaných. Po provedené analýze dat se ovšem tato převaha stále nejeví jako signifikantní. Je tedy zřejmé, že je potřeba provést další výzkumy ověřující tuto teorii, a to, pokud možno, s využitím většího vzorku laboratorních zvířat a delšího pozorovaného období.

Je samozřejmé, že tato práce má určitá omezení. Skutečnost, že pro každou pozorovanou skupinu byli použiti pouze 2–3 potkani (celkem 27 zvířat), může ovlivnit konečné výsledky. Je tedy třeba vzít tento fakt v úvahu při pohledu na získaná data. Na zvířatech dále nebyly provedeny behaviorální testy, nebylo tedy ověřováno, že se u zvířat skutečně vyvinula neuropatická bolest. Vzhledem k tomu, že preparáty byly vytvořeny přesně podle popsání modelu neuropatické bolesti vyvolané paklitaxelem, lze však vznik neuropatie oprávněně předpokládat (Xiao *et al.* 2007). Ve skupinách značených sekundární protilátkou ED2; paklitaxel 1D a vehikulum 21D můžeme pozorovat poměrně vysoké chybové úsečky, to je způsobeno malým počtem mikroskopických snímků s výskytem makrofágů. Při použití protilátky ED2 se také objevilo nechtěné barvení, preparáty obsahovaly světlé sraženiny, nicméně nešlo o zásadní problém. Během práce jsem si byla vědoma této skutečnosti a měření probíhalo pečlivě. Rizikem by mohla být lidská chyba, nicméně kvantifikace i měření probíhaly důkladně. Data byla několikrát kontrolována a v některých případech opakovaně pořízena. V této práci jsme pozorovali početní změny makrofágů po dobu tří týdnů, tedy s nejzazším pozorovaným dnem 21. V případě rezidentních makrofágů jsme se ale setkali s růstem počtů za pozorovanou hranici. Dále je potřebné uvědomit si, že se tedy v praxi uplatňuje složitější cyklus. Při léčbě paklitaxelem se totiž lék podává každé 2–3 týdny (Lück, Roché 2002). Z toho vyplývá, že tělo nemá dostatečný čas na zotavení, výsledky jasně ukazují zvýšené počty makrofágů i po tomto období. Imunitní reakce neutuchá, ačkoliv tělo vzdoruje. Není mu poskytnuta šance na rekonvalescenci, propuká chronický neurozánět, a tím dochází k rozvoji neuropatické bolesti. Budoucí detailnější výzkum s větším počtem vzorků a prodlouženými

časovými osami bude zásadní pro další porozumění chemoterapií indukované neuropatie a potenciálních terapeutických cest.

Dle mých zjištění dosud neexistuje žádná studie podobná této, problematika zůstává neprobádanou a výzkum neuropatické bolesti v kontextu imunitních buněk v okolí choroidálního plexu si v budoucnu jistě zaslouží větší pozornost. Zde tkví přínos předkládané práce. Jeho zhodnocení ovšem naráží na fakt, že v práci prezentované výsledky nelze srovnat s dosud publikovanými studiemi. Jistou možností nabízí komparace s prací Joukal *et al.* (2015) a Joukal *et al.* (2016). V těchto studiích se autoři zaměřili na změny Kolmerových buněk v choroidálním plexu po chronickém konstričním poranění pomocí imunohistochemického barvení ED1 a ED2. Jejich výsledky uvádějí, že počet Kolmerových buněk se zvýšil po poranění periferního nervu. Naše práce sice nezkoumala makrofágy (Kolmerovy buňky) povrchu CP, ale makrofágy přiléhající k ependymální vrstvě mozkových komor, ovšem i jejich počet se v naší práci po aplikaci paklitaxelu zvýšil. Autoři v publikaci dále uvádějí, že změny počtu Kolmerových buněk by mohly narušit TJs mezi buňkami epitelu CP. Početní změny Kolmerových buněk tedy poukazují na ovlivněnou bariéru mezi krví a mozkomíšním mokem (B-CSFB), která tehdy může poskytnout cestu signálním molekulám do CNS z poškozených periferních nervů, a tím umožnit i šíření zánětu z periferie. Ačkoliv se jejich výsledky nedají doslovně porovnat se získanými daty mé práce, oba výzkumy se shodují v navýšení počtu ED1+ či ED2+ makrofágů v průběhu času. Do výsledků se dále promítá zajímavé dominantnější navýšení počtů makrofágů od 7. dne, den 7. je i v mé práci pomyslným mezníkem událostí (Joukal *et al.* 2015; 2016).

Nové poznatky a hypotézy, které vychází z výsledků této práce a dalších výzkumů generují další otázky. Jestliže pracujeme s hypotézou, že zvýšený počet makrofágů CP ovlivní i počty makrofágů stěn mozkových komor, pravděpodobně tento mechanismus funguje i obráceným směrem. Můžeme tedy předpokládat, že zvýšený počet makrofágů stěn mozkových komor může prostřednictvím ovlivněného CSF přispívat k poškození CP a poskytovat průchodnější cestu neurozánětu. Jestliže pracujeme s domněnkou, že se Kolmerovy buňky mohou volně pohybovat po povrchu choroidálního plexu, mohli bychom pak vyřknout otázku, zda tyto buňky nemohou putovat napříč CSF a usídlit se i na povrchu stěn mozkových komor.

Jak Kolmerovy buňky komunikují s ostatními epiteliálními buňkami je stále málo pochopeno. Studie Maslieieva *et al.* (2014) svým zjištěním přispívá k zaplnění této znalostní mezery. Zkoumali, jak se změní motilita Kolmerových buněk po expozici exogennímu ATP. Bylo zjištěno, že ATP skutečně může zvýšit jejich motilitu v CP, aktivovat Kolmerovy buňky. Dále byl v práci popsán kanál Pannexin-1 (Panx1), který je potřebný pro tento typ aktivace, a to i když je exprimován pouze v epiteliálních buňkách, ovšem v samotných Kolmerových buňkách nikoliv. Můžeme se tedy domnívat, že komunikaci mezi epitelem a Kolmerovými buňkami bude zprostředkovávat kanál Pannexin-1 (Maslieieva, Thompson 2014).

Pokud vím, žádná ze současných studií neobsahuje informace o choroidálním plexu, jako terapeutickém cíli při léčbě neuropatie vyvolané chemoterapií. Přitom se tato struktura jeví jako slibný subjekt výzkumu potlačení neuroinflamace. Nynější výzkumy směřují, mimo jiné,

k úloze DRG, jakožto spojníku CNS a PNS, kde hledají možnosti léčby neuropatie. Léčbou samotné neuropatické bolesti se již některé výzkumné práce zabývaly.

Studie Krames (2014) shrnula do té doby známé informace o úloze dorzálních kořenových ganglií v průběhu neuropatické bolesti. Z informací vyplývá, že DRG se aktivně podílí v procesích přispívajících k šíření neuropatické bolesti, ale zároveň je poměrně snadno dosažitelný různými typy léčby (Krames 2014). Jednou z možností řešení paklitaxelem indukované neuropatické bolesti je cílově akumulovat léčivo v DRG. V současnosti se v klinických studiích používají antioxidanty. Kromě zmíněného poskytují také nanotechnologie dvě využitelné strategie. Nabízí se dodávat specifické antioxidanty do periferního systému nebo snížit nežádoucí efekt léčby zvýšením cílené akumulace léčiva pouze v požadovaných místech (Hu *et al.* 2021).

Ve vztahu k mé práci se jako jeden ze způsobů, jak předcházet nebo léčit neuropatii vyvolanou chemoterapií, nabízí prevence či inhibice maladaptivního neurozánětu. Například studie Chen *et al.* (2022) zkoumala nové látky CN016, které vykazovaly protizánětlivou aktivitu s inhibicí zásahu imunitních buněk do aktivity senzoričkových neuronů. Zároveň vykazovaly neuroprotektivní charakter. Autoři na základě vysoké účinnosti této sloučeniny navrhuji, aby se stala součástí budoucích periferní-protektivních látek a složkou farmak bojujících proti neurotoxické chemoterapeutik (Chen *et al.* 2022b).

Studie Maihöfner *et al.* (2021) zhodnotila současné znalosti vhodných terapií a možností léčby neuropatické bolesti. Jedním ze způsobů, jak nežádoucí účinky zmírnit, je způsob nefarmakologický, a to: pravidelné funkční cvičení, doporučuje se ale také chlazení končetin při podávání chemoterapeutik. Dalším způsobem, jak se vypořádat s neurotoxickou léků bojujících proti rakovině, je vydání se cestou farmakologickou. Tento více konvenční způsob zahrnuje antidepresiva, antikonvulziva, antiepileptika a příležitostně opioidy. Na základě současných znalostí a údajů je však doporučován pouze duloxetin z důvodu nedostatku klinických důkazů pro jiné z uvedených možností. Protizánětlivé léky jsou v této studii popisovány jako neúčinné, ale v případech, kdy byla neuropatie způsobena zvýšením tkáňového tlaku, mohou mít takové léky pozitivní vliv na snížení otoků končetin, a tím snížit i pocity bolesti (Maihöfner *et al.* 2021).

Mezi budoucí cíle v rámci neurovědeckého výzkumu průběhu neuropatické bolesti patří konkrétnější popsání role choroidálního plexu, pochopení regulačních mechanismů neuroinflamace a potenciálně objevení možného řešení neuropatie. Moje práce se ponořila do komplexní problematiky neuropatické bolesti vyvolané chemoterapií a regulačních neurozánětlivých mechanismů. Přináší nové informace objasňující kompenzační roli makrofágů mozkových komor a přichází s poznatky týkajícími se vztahu mezi paklitaxelem, neurozánětem a neuropatickou bolestí. Tento výzkum přispívá k rostoucímu množství důkazů, které podtrhují roli neuroinflamace v progresi neuropatické bolesti. Budoucí výzkumy zaměřené na maladaptivní neurozánětlivé reakce se jeví jako slibné v hledání řešení, jak účinně předcházet stavu neuropatické bolesti nebo jak jej léčit. Navíc další výzkumy cílené na choroidální plexus a s ním i prostor mozkových komor s imunitními buňkami se jeví jako vhodné pro nalezení terapeutického východiska. Výsledky konkrétně této práce mohou

představovat nikoliv nepodstatný krok směrem ke zlepšení kvality života a pohody pacientů žijících s neuropatickou bolestí.

9 ZÁVĚR

Rakovina – nádorové onemocnění, které každoročně postihuje nespočet lidí onemocnění, jehož léčba s sebou přináší vážné komplikace. Typy rakoviny, jako je rakovina prsu, vaječníků nebo plic, se běžně léčí paklitaxelem, mikrotubuly stabilizujícím cytostakikem. Tento typ chemoterapie s sebou přináší vedlejší účinky jako je neuropatická bolest, jdoucí ruku v ruce s neurozánětem. Choroidální plexus, struktura umístěná v mozkových komorách, tvořící hematolymphovaskulární bariéru a sama produkující mozkomíšni mok, je známým účastníkem těchto zánětlivých procesů. Spolu s touto bariérou tvoří Kolmerovy buňky (makrofágům podobné buňky na povrchu choroidálního plexu) lokální imunitní systém choroidálního plexu. Tím také ovlivňuje progresi a řešení neurozánětu. I když se choroidální plexus postupně stává stále více prozkoumanou tkání a častějším předmětem neurovědeckých výzkumů, stále je z velké části zahalen v plášti neznáma.

V práci jsme předpokládali, že makrofágy choroidálního plexu (Kolmerovy buňky) mohou sekrecí cytokinů aktivovat i makrofágy stěn mozkových komor. Cílem mého studia bylo přispět novými objevy k dosud nezodpovězeným otázkám a zkoumat imunoreaktivní dynamiku makrofágů mozkových komor po aplikaci paklitaxelu v kontextu neuropatické bolesti. Cílem práce bylo zkoumat imunitní regulační mechanismy makrofágů pomocí imunohistochemických metod a *in vivo* modelu neuropatické bolesti indukované paklitaxelem.

Zvýšené počty jak rezidentních, tak aktivovaných makrofágů naznačují probíhající neuroinflamaci. Počty aktivovaných (ED1+, protiinflamatorních) makrofágů vykazovaly první den významné navýšení, v dalších dnech měly klesající charakter. Ke konci monitorovacího období stále pozorujeme zvýšené počty makrofágů, což naznačuje probíhající boj imunitního systému proti šířícímu se zánětu. Rezidentní (ED2+, protiinflamatorní) makrofágy ve svých počtech pozvolna stoupaly s přibývajícím časem, dokonce až za pozorovanou hranici. Ke konci pozorovaného období v těle převládají rezidentní makrofágy, což upozorňuje na protektivní roli imunitního systému a aktivní angažovanost makrofágů v průběhu neuropatické bolesti a potenciálně při jejím mírnění.

Data naznačují, že den sedmý je dnem kritickým, je to den, kdy se v obou skupinách projeví zvýšené hladiny vehikula – tedy efekt nosiče účinné látky. Tento den je zároveň „bodem obratu“ mezi aktivovanými a rezidentními makrofágy, zvrát poukazuje na adaptivní chování imunitního systému během neurozánětu a neuropatie. V práci jsme prokázali, že léčba paklitaxelem může měnit počty makrofágů podél stěn mozkových komor. To potenciálně vede k šíření neurozánětu, klíčového hráče v progresi neuropatické bolesti. Změny také mohou dále ovlivňovat složení CSF a funkce choroidálního plexu. Vliv paklitaxelu na makrofágy se zdá být důsledkem jeho přímého i nepřímého efektu, nebo kombinací obou. Kromě toho náš výzkum odhalil existenci kompenzačního mechanismu, který je zprostředkován zvýšeným počtem protizánětlivých makrofágů v průběhu času. Hypotéza, že jsou makrofágy povrchu mozkových komor aktivovány díky cytokinům, produkovaným makrofágy choroidálního plexu, se zdá být správná. Makrofágy jsou po aplikaci paklitaxelu skutečně aktivovány a jejich počet se zvýšil. Ovšem tato hypotéza musí být ještě v budoucnu upřesněna podrobnějšími výzkumy regulačních mechanismů makrofágů.

Hlavním přínosem mé práce jsou nové poznatky týkající se lepšího porozumění neprobádaných makrofágů stěn mozkových komor. Zpřesňuje informace o jejich roli, funkci a regulačních mechanismech, kterými se podílejí na rozvoji neuropatické bolesti prostřednictvím neurozánětu. Budoucí výzkumy zaměřené na podobné mechanismy by mohly přinést zásadní objevy v oblasti efektivního řešení neuropatie vyvolané chemoterapií; to vše s cílem poskytnout pacientům možnost zlepšení kvality života během i po léčbě rakoviny.

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AHIMSADASAN, Nilah, REDDY, Vamsi, KHAN SUHEB, Mahammed Z. et KUMAR, Anil, 2023. *Neuroanatomy, Dorsal Root Ganglion*.
2. ALTHUBAITY, Noha, SCHUBERT, Julia, MARTINS, Daniel, YOUSAF, Tayyabah, NETTIS, Maria A., MONDELLI, Valeria, PARIANTE, Carmine, HARRISON, Neil A., BULLMORE, Edward T., DIMA, Danai, TURKHEIMER, Federico E. et VERONESE, Mattia, 2022. Choroid plexus enlargement is associated with neuroinflammation and reduction of blood brain barrier permeability in depression. *NeuroImage: Clinical*. 2022. Vol. 33, pp. 102926. DOI 10.1016/j.nicl.2021.102926.
3. AMJAD, Muhammad T., CHIDHARLA, Anusha et KASI, Anup, 2023. *Cancer Chemotherapy*.
4. ANGELI, Suzanne, FOULGER, Anna, CHAMOLI, Manish, PEIRIS, Tanuja Harshani, GERENCSEK, Akos, SHAHMIRZADI, Azar Asadi, ANDERSEN, Julie et LITHGOW, Gordon, 2021. The mitochondrial permeability transition pore activates the mitochondrial unfolded protein response and promotes aging. *eLife*. 1 septembre 2021. Vol. 10. DOI 10.7554/eLife.63453.
5. AONO, Soma, HARUNA, Yui, WATANABE, Yo-hei, MOCHIDA, Satoru et TAKEDA, Kojiro, 2019. The fission yeast Greatwall–Endosulfine pathway is required for proper quiescence/G₀ phase entry and maintenance. *Genes to Cells*. 4 février 2019. Vol. 24, n° 2, pp. 172-186. DOI 10.1111/gtc.12665.
6. ASCHNER, M. et PHILBERT, M.A., 2010. Glial Cells*. In : *Comprehensive Toxicology*. Elsevier. pp. 199-219.
7. BABA, Yahya et NGUYEN, Margaret, 2016. Choroid plexus. In : *Radiopaedia.org*. Radiopaedia.org.
8. BASCONES-MARTINEZ, A., MATTILA, R., GOMEZ-FONT, R. et MEURMAN, JH., 2014. Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2014. pp. e24-e31. DOI 10.4317/medoral.19087.
9. BITANHIRWE, Byron K. Y., LIZANO, Paulo et WOO, Tsung-Ung W., 2022. Deconstructing the functional neuroanatomy of the choroid plexus: an ontogenetic perspective for studying neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*. 26 septembre 2022. Vol. 27, n° 9, pp. 3573-3582. DOI 10.1038/s41380-022-01623-6.

10. Breaking malignant nuclei as a non-mitotic mechanism of taxol-paclitaxel, 2021. *Journal of Cancer Biology*. Vol. 2, n° 4. DOI 10.46439/cancerbiology.2.031.
11. BUKOWSKI, Karol, KCIUK, Mateusz et KONTEK, Renata, 2020. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2 mai 2020. Vol. 21, n° 9, pp. 3233. DOI 10.3390/ijms21093233.
12. BURGESS, Jamie, FERDOUSI, Maryam, GOSAL, David, BOON, Cheng, MATSUMOTO, Kohei, MARSHALL, Anne, MAK, Tony, MARSHALL, Andrew, FRANK, Bernhard, MALIK, Rayaz A. et ALAM, Uazman, 2021. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Pathomechanisms and Treatment. *Oncology and Therapy*. 16 décembre 2021. Vol. 9, n° 2, pp. 385-450. DOI 10.1007/s40487-021-00168-y.
13. CAIRE, Michael J., REDDY, Vamsi et VARACALLO, Matthew, 2023. *Physiology, Synapse*.
14. CHEN, Linlin, DENG, Huidan, CUI, Hengmin, FANG, Jing, ZUO, Zhicai, DENG, Junliang, LI, Yinglun, WANG, Xun et ZHAO, Ling, 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 23 janvier 2018. Vol. 9, n° 6, pp. 7204-7218. DOI 10.18632/oncotarget.23208.
15. CHEN, Yi-Fan, WU, Chien-Huang, CHEN, Li-Hsien, LEE, Hao-Wei, LEE, Jinq-Chyi, YEH, Teng-Kuang, CHANG, Jang-Yang, CHOU, Ming-Chen, WU, Hui-Ling, LAI, Yen-Po, SONG, Jen-Shin, YEH, Kai-Chia, CHEN, Chiung-Tong, LEE, Chia-Jui, SHIA, Kak-Shan et SHEN, Meng-Ru, 2022a. Discovery of Potential Neuroprotective Agents against Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 24 mars 2022. Vol. 65, n° 6, pp. 4767-4782. DOI 10.1021/acs.jmedchem.1c01912.
16. CHEN, Yi-Fan, WU, Chien-Huang, CHEN, Li-Hsien, LEE, Hao-Wei, LEE, Jinq-Chyi, YEH, Teng-Kuang, CHANG, Jang-Yang, CHOU, Ming-Chen, WU, Hui-Ling, LAI, Yen-Po, SONG, Jen-Shin, YEH, Kai-Chia, CHEN, Chiung-Tong, LEE, Chia-Jui, SHIA, Kak-Shan et SHEN, Meng-Ru, 2022b. Discovery of Potential Neuroprotective Agents against Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 24 mars 2022. Vol. 65, n° 6, pp. 4767-4782. DOI 10.1021/acs.jmedchem.1c01912.
17. CHMIELEWSKI, Nicole N. et LIMOLI, Charles L., 2022. Sex Differences in Taxane Toxicities. *Cancers*. 8 juillet 2022. Vol. 14, n° 14, pp. 3325. DOI 10.3390/cancers14143325.

18. CORBETT, J.J. et HAINES, D.E., 2018. The Ventricles, Choroid Plexus, and Cerebrospinal Fluid. In : *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*. Elsevier. pp. 93-106.e1.
19. CUI, Jin, XU, Huixin et LEHTINEN, Maria K., 2021. Macrophages on the margin: choroid plexus immune responses. *Trends in Neurosciences*. novembre 2021. Vol. 44, n° 11, pp. 864-875. DOI 10.1016/j.tins.2021.07.002.
20. DAMKIER, Helle H., BROWN, Peter D. et PRAETORIUS, Jeppe, 2013. Cerebrospinal Fluid Secretion by the Choroid Plexus. *Physiological Reviews*. octobre 2013. Vol. 93, n° 4, pp. 1847-1892. DOI 10.1152/physrev.00004.2013.
21. DAVIES, Luke C, JENKINS, Stephen J, ALLEN, Judith E et TAYLOR, Philip R, 2013. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*. 18 octobre 2013. Vol. 14, n° 10, pp. 986-995. DOI 10.1038/ni.2705.
22. DEBANNE, Dominique, CAMPANAC, Emilie, BIALOWAS, Andrzej, CARLIER, Edmond et ALCARAZ, Gisèle, 2011. Axon Physiology. *Physiological Reviews*. avril 2011. Vol. 91, n° 2, pp. 555-602. DOI 10.1152/physrev.00048.2009.
23. DEBELA, Dejene Tolossa, MUZAZU, Seke GY, HERARO, Kidist Digamo, NDALAMA, Maureen Tayamika, MESELE, Betelhiem Woldemedhin, HAILE, Dagimawi Chilot, KITUI, Sophia Khalayi et MANYAZEWAL, Tsegahun, 2021. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*. 12 janvier 2021. Vol. 9, pp. 205031212110343. DOI 10.1177/20503121211034366.
24. DISABATO, Damon J., QUAN, Ning et GODBOUT, Jonathan P., 2016. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*. octobre 2016. Vol. 139, pp. 136-153. DOI 10.1111/jnc.13607.
25. DUGGETT, Natalie A., GRIFFITHS, Lisa A. et FLATTERS, Sarah J.L., 2017. Paclitaxel-induced painful neuropathy is associated with changes in mitochondrial bioenergetics, glycolysis, and an energy deficit in dorsal root ganglia neurons. *Pain*. 2 août 2017. Vol. 158, n° 8, pp. 1499-1508. DOI 10.1097/j.pain.0000000000000939.
26. ELDRIDGE, Sandy, GUO, Liang et HAMRE, John, 2020. A Comparative Review of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in In Vivo and In Vitro Models. *Toxicologic Pathology*. 22 janvier 2020. Vol. 48, n° 1, pp. 190-201. DOI 10.1177/0192623319861937.
27. ELLIS, A et BENNETT, D.L.H., 2013. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia*. juillet 2013. Vol. 111, n° 1, pp. 26-37. DOI 10.1093/bja/aet128.

28. EMAMIAREF, Parisa, KUBÍČKOVÁ, Lucie, BAKHSHINEJAD, B, DUBOVÝ, Petr, JOUKAL, Marek et ZAMANI, Alemeh, 2023. Chemotherapy alters the Kolmer cell of the choroid plexus. In : . 2023.
29. ENGELHARDT, Britta, WOLBURG-BUCHHOLZ, Karen et WOLBURG, Hartwig, 2001. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microscopy Research and Technique*. 1 janvier 2001. Vol. 52, n° 1, pp. 112-129. DOI 10.1002/1097-0029(20010101)52:1<112::AID-JEMT13>3.0.CO;2-5.
30. FUJIWARA, Nagatoshi et KOBAYASHI, Kazuo, 2005. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*. 1 juin 2005. Vol. 4, n° 3, pp. 281-286. DOI 10.2174/1568010054022024.
31. GARG, Mayank, JOHRI, Saumya et CHAKRABORTY, Krishnendu, 2023. Immunomodulatory role of mitochondrial DAMPs: a missing link in pathology? *The FEBS Journal*. 4 septembre 2023. Vol. 290, n° 18, pp. 4395-4418. DOI 10.1111/febs.16563.
32. GAWDI, Rohin, SHUMWAY, Karlie R. et EMMADY, Prabhu D., 2023. *Physiology, Blood Brain Barrier*.
33. GOMES, Ligia F, LORENTE, Sandra, SIMON-GIAVAROTTI, Karin A, ARECO, Kelsy N, ARAÚJO-PERES, Clóvis et VIDELA, Luis A, 2004. Tri-iodothyronine differentially induces Kupffer cell ED1/ED2 subpopulations. *Molecular aspects of medicine*. 2004. Vol. 25, n° 1-2, pp. 183-90. DOI 10.1016/j.mam.2004.02.018.
34. GORJI, Ali, 2022. Neuroinflammation: The Pathogenic Mechanism of Neurological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 mai 2022. Vol. 23, n° 10, pp. 5744. DOI 10.3390/ijms23105744.
35. HIRAYAMA, Daisuke, IIDA, Tomoya et NAKASE, Hiroshi, 2017. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 29 décembre 2017. Vol. 19, n° 1, pp. 92. DOI 10.3390/ijms19010092.
36. HORNICK, Jessica E., BADER, Jason R., TRIBBLE, Emily K., TRIMBLE, Kayleigh, BREUNIG, J. Scott, HALPIN, Elizabeth S., VAUGHAN, Kevin T. et HINCHCLIFFE, Edward H., 2008. Live-cell analysis of mitotic spindle formation in taxol-treated cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. août 2008. Vol. 65, n° 8, pp. 595-613. DOI 10.1002/cm.20283.
37. HU, Xi, JIANG, Zhijie, TENG, Longyu, YANG, Hongyu, HONG, Dongsheng, ZHENG, Dongsheng et ZHAO, Qingwei, 2021. Platinum-Induced Peripheral

Neuropathy (PIPNe): ROS-Related Mechanism, Therapeutic Agents, and Nanosystems. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 24 novembre 2021. Vol. 8. DOI 10.3389/fmolb.2021.770808.

38. HUGHES, Catherine E et NIBBS, Robert J B, 2018. A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*. août 2018. Vol. 285, n° 16, pp. 2944-2971. DOI 10.1111/febs.14466.
39. JÄGER, A, RADLANSKI, R J et GÖTZ, W, 1993. Demonstration of cells of the mononuclear phagocyte lineage in the periodontium following experimental tooth movement in the rat. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies ED1 und ED2 on paraffin-embedded tissues. *Histochemistry*. août 1993. Vol. 100, n° 2, pp. 161-6. DOI 10.1007/BF00572903.
40. JAVED, Kinaan, REDDY, Vamsi et LUI, Forshing, 2023. *Neuroanatomy, Choroid Plexus*.
41. JENSEN, Ellen C., 2012. Types of Imaging, Part 2: An Overview of Fluorescence Microscopy. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. octobre 2012. Vol. 295, n° 10, pp. 1621-1627. DOI 10.1002/ar.22548.
42. JIMÉNEZ, Antonio J, DOMÍNGUEZ-PINOS, María-Dolores, GUERRA, María M, FERNÁNDEZ-LLEBREZ, Pedro et PÉREZ-FÍGARES, José-Manuel, 2014. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*. 19 janvier 2014. Vol. 2, n° 1, pp. e28426. DOI 10.4161/tisb.28426.
43. JOUKAL, Marek, KLUSÁKOVÁ, Ilona, SOLÁR, Peter, KUKLOVÁ, Adéla et DUBOVÝ, Petr, 2016. Cellular reactions of the choroid plexus induced by peripheral nerve injury. *Neuroscience Letters*. août 2016. Vol. 628, pp. 73-77. DOI 10.1016/j.neulet.2016.06.019.
44. JOUKAL, Marek, KUKLOVÁ, Adéla, SOLÁR, Peter, KLUSÁKOVÁ, Ilona et DUBOVÝ, Petr, 2015. Kolmer cells and their immunophenotyping in the rat choroid plexus after peripheral nerve injury. . 2015.
45. JOYCE, Catherine, RAYI, Appaji et KASI, Anup, 2023. *Tumor-Suppressor Genes*.
46. KADOMOTO, Suguru, IZUMI, Kouji et MIZOKAMI, Atsushi, 2021. Macrophage Polarity and Disease Control. *International Journal of Molecular Sciences*. 23 décembre 2021. Vol. 23, n° 1, pp. 144. DOI 10.3390/ijms23010144.

47. KALYNOVSKA, Nataliia, DIALLO, Mickael, SOTAKOVA-KASPAROVA, Dita et PALECEK, Jiri, 2020. Losartan attenuates neuroinflammation and neuropathic pain in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2 juillet 2020. Vol. 24, n° 14, pp. 7949-7958. DOI 10.1111/jcmm.15427.
48. KAMPAN, Nirmala Chandralega, MADONDO, Mutsa Tatenda, MCNALLY, Orla M., QUINN, Michael et PLEBANSKI, Magdalena, 2015. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015, pp. 1-21. DOI 10.1155/2015/413076.
49. KATO, Jungo et SVENSSON, Camilla I., 2015. Role of Extracellular Damage-Associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) as Mediators of Persistent Pain. In : . pp. 251-279.
50. KEMPURAJ, Duraisamy, THANGAVEL, Ramasamy, SELVAKUMAR, Govindhasamy P., ZAHEER, Smita, AHMED, Mohammad E., RAIKWAR, Sudhanshu P., ZAHOOR, Haris, SAEED, Daniyal, NATTERU, Prashant A., IYER, Shankar et ZAHEER, Asgar, 2017. Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 24 juillet 2017. Vol. 11. DOI 10.3389/fncel.2017.00216.
51. KIM, So-Woon, ROH, Jin et PARK, Chan-Sik, 2016. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of pathology and translational medicine*. novembre 2016. Vol. 50, n° 6, pp. 411-418. DOI 10.4132/jptm.2016.08.08.
52. KINNEY, Jefferson W., BEMILLER, Shane M., MURTISHAW, Andrew S., LEISGANG, Amanda M., SALAZAR, Arnold M. et LAMB, Bruce T., 2018. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 5 janvier 2018. Vol. 4, n° 1, pp. 575-590. DOI 10.1016/j.trci.2018.06.014.
53. KITADA, Masaaki, CHAKRABORTTY, Shushovan, MATSUMOTO, Naoya, TAKETOMI, Masanori et IDE, Chizuka, 2001. Differentiation of choroid plexus ependymal cells into astrocytes after grafting into the pre-lesioned spinal cord in mice. *Glia*. décembre 2001. Vol. 36, n° 3, pp. 364-374. DOI 10.1002/glia.1123.
54. KLEIN, Ines et LEHMANN, Helmar, 2021. Pathomechanisms of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Toxics*. 22 septembre 2021. Vol. 9, n° 10, pp. 229. DOI 10.3390/toxics9100229.
55. KRAMES, Elliot S., 2014. The Role of the Dorsal Root Ganglion in the Development of Neuropathic Pain. *Pain Medicine*. 1 octobre 2014. Vol. 15, n° 10, pp. 1669-1685. DOI 10.1111/pme.12413.

56. KRIEGHOFF-HENNING, Eva, FOLKERTS, Juliane, PENZKOFER, Andrea et WEG-REMERS, Susanne, 2017. Cancer – an overview. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*. février 2017. Vol. 40, n° 2, pp. 48-54.
57. LAMPTEY, Richard N. L., CHAULAGAIN, Bivek, TRIVEDI, Riddhi, GOTHWAL, Avinash, LAYEK, Buddhadev et SINGH, Jagdish, 2022. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 6 février 2022. Vol. 23, n° 3, pp. 1851. DOI 10.3390/ijms23031851.
58. LEE, Eunju, EO, Jun-Cheol, LEE, Changjun et YU, Je-Wook, 2021. Distinct Features of Brain-Resident Macrophages: Microglia and Non-Parenchymal Brain Macrophages. *Molecules and Cells*. 31 mai 2021. Vol. 44, n° 5, pp. 281-291. DOI 10.14348/molcells.2021.0060.
59. LEE, Ji Yoon et HONG, Seok-Ho, 2020. Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *International Journal of Stem Cells*. 30 mars 2020. Vol. 13, n° 1, pp. 1-12. DOI 10.15283/ijsc19127.
60. LENDECKEL, Uwe, VENZ, Simone et WOLKE, Carmen, 2022. Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*. 10 avril 2022. Vol. 8, n° 2, pp. 12. DOI 10.1007/s40828-022-00163-4.
61. LEUNG, Jessica C. et CASSIMERIS, Lynne, 2019. Reorganization of paclitaxel-stabilized microtubule arrays at mitotic entry: roles of depolymerizing kinesins and severing proteins. *Cancer Biology & Therapy*. 3 octobre 2019. Vol. 20, n° 10, pp. 1337-1347. DOI 10.1080/15384047.2019.1638678.
62. LING, Eng-Ang, KAUR, Charanjit et LU, Jia, 1998. Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epileptus cells. *Microscopy Research and Technique*. 1 avril 1998. Vol. 41, n° 1, pp. 43-56. DOI 10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<43::AID-JEMT5>3.0.CO;2-V.
63. LIU, E., VEGA, S., DHALIWAL, A., TREISER, M.D., SUNG, H.-J. et MOGHE, P.V., 2017. 3.19 High Resolution Fluorescence Imaging of Cell–Biomaterial Interactions ☆. In : *Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier. pp. 406-423.
64. LÜCK, Hans-Joachim et ROCHÉ, Henri, 2002. Weekly paclitaxel: an effective and well-tolerated treatment in patients with advanced breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. décembre 2002. Vol. 44, pp. 15-30. DOI 10.1016/S1040-8428(02)00105-1.
65. MAGAKI, Shino, HOJAT, Seyed A, WEI, Bowen, SO, Alexandra et YONG, William H, 2019. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in*

molecular biology (Clifton, N.J.). 2019. Vol. 1897, pp. 289-298. DOI 10.1007/978-1-4939-8935-5_25.

66. MAIHÖFNER, Christian, DIEHL, Ingo, TESCH, Hans, QUANDEL, Tamara et BARON, Ralf, 2021. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): current therapies and topical treatment option with high-concentration capsaicin. *Supportive Care in Cancer*. 23 août 2021. Vol. 29, n° 8, pp. 4223-4238. DOI 10.1007/s00520-021-06042-x.
67. MAKKER, Preet G. S., DUFFY, Samuel S., LEES, Justin G., PERERA, Chamini J., TONKIN, Ryan S., BUTOVSKY, Oleg, PARK, Susanna B., GOLDSTEIN, David et MOALEM-TAYLOR, Gila, 2017. Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *PLOS ONE*. 26 janvier 2017. Vol. 12, n° 1, pp. e0170814. DOI 10.1371/journal.pone.0170814.
68. MALACRIDA, Alessio, MEREGALLI, Cristina, RODRIGUEZ-MENENDEZ, Virginia et NICOLINI, Gabriella, 2019. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy and Changes in Cytoskeleton. *International Journal of Molecular Sciences*. 9 mai 2019. Vol. 20, n° 9, pp. 2287. DOI 10.3390/ijms20092287.
69. MASLIEIEVA, Valentyna et THOMPSON, Roger J, 2014. A critical role for pannexin-1 in activation of innate immune cells of the choroid plexus. *Channels (Austin, Tex.)*. 2014. Vol. 8, n° 2, pp. 131-41. DOI 10.4161/chan.27653.
70. MASOCHA, Willias, 2015. Astrocyte activation in the anterior cingulate cortex and altered glutamatergic gene expression during paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *PeerJ*. 22 octobre 2015. Vol. 3, pp. e1350. DOI 10.7717/peerj.1350.
71. MCGINNIS, Aidan et JI, Ru-Rong, 2023. The Similar and Distinct Roles of Satellite Glial Cells and Spinal Astrocytes in Neuropathic Pain. *Cells*. 22 mars 2023. Vol. 12, n° 6, pp. 965. DOI 10.3390/cells12060965.
72. MCINTOSH, J. Richard, 2016. Mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1 septembre 2016. Vol. 8, n° 9, pp. a023218. DOI 10.1101/cshperspect.a023218.
73. MEEKER, Rick B., WILLIAMS, Kimberly, KILLEBREW, Deirdre A. et HUDSON, Lola C., 2012. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adhesion & Migration*. 20 septembre 2012. Vol. 6, n° 5, pp. 390-396. DOI 10.4161/cam.21054.
74. MERCADANTE, Anthony A. et KASI, Anup, 2023. *Genetics, Cancer Cell Cycle Phases*.
75. MIASKOWSKI, Christine, TOPP, Kimberly, CONLEY, Yvette P., PAUL, Steven M., MELISKO, Michelle, SCHUMACHER, Mark, CHESNEY, Margaret, ABRAMS, Gary, LEVINE, Jon D. et KOBER, Kord M., 2019. Perturbations in neuroinflammatory

pathways are associated with paclitaxel-induced peripheral neuropathy in breast cancer survivors. *Journal of Neuroimmunology*. octobre 2019. Vol. 335, pp. 577019. DOI 10.1016/j.jneuroim.2019.577019.

76. MORE, Sandeep Vasant, KUMAR, Hemant, KIM, In Su, SONG, Soo-Yeol et CHOI, Dong-Kug, 2013. Cellular and Molecular Mediators of Neuroinflammation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Mediators of Inflammation*. 2013. Vol. 2013, pp. 1-12. DOI 10.1155/2013/952375.
77. MOSSER, David M. et EDWARDS, Justin P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. décembre 2008. Vol. 8, n° 12, pp. 958-969. DOI 10.1038/nri2448.
78. MUKHTAR, Eiman, ADHAMI, Vaqar Mustafa et MUKHTAR, Hasan, 2014. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1 février 2014. Vol. 13, n° 2, pp. 275-284. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-13-0791.
79. MUZIO, Maria Rosaria et CASCELLA, Marco, 2023. *Histology, Axon*.
80. NAKAMURA, S, KOGA, N et MORIYASU, N, 1982. [Epilexus cell (Kolmer cell) and its reaction against foreign bodies]. *No to shinkei = Brain and nerve*. septembre 1982. Vol. 34, n° 9, pp. 895-907.
81. NEWTON, K. et DIXIT, V. M., 2012. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1 mars 2012. Vol. 4, n° 3, pp. a006049-a006049. DOI 10.1101/cshperspect.a006049.
82. NICHOLSON, Lindsay B., 2016. The immune system. *Essays in Biochemistry*. 31 octobre 2016. Vol. 60, n° 3, pp. 275-301. DOI 10.1042/EBC20160017.
83. NOH, Myung-chul, MIKLER, Benjamin, JOY, Twinkle et SMITH, Peter A., 2020. Time Course of Inflammation in Dorsal Root Ganglia Correlates with Differential Reversibility of Mechanical Allodynia. *Neuroscience*. janvier 2020. Vol. 428, pp. 199-216. DOI 10.1016/j.neuroscience.2019.12.040.
84. OGLE, Molly E, SEGAR, Claire E, SRIDHAR, Sraeyes et BOTCHWEY, Edward A, 2016. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Experimental Biology and Medicine*. 26 mai 2016. Vol. 241, n° 10, pp. 1084-1097. DOI 10.1177/1535370216650293.
85. PATEL, Aisha, 2020. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology*. 1 septembre 2020. Vol. 6, n° 9, pp. 1488. DOI 10.1001/jamaoncol.2020.2592.

86. REINA, Miguel A., SALA-BLANCH, Xavier, ARRIAZU, Riánsares et MACHÉS, Fabiola, 2015. Microscopic Morphology and Ultrastructure of Human Peripheral Nerves. In : *Nerves and Nerve Injuries*. Elsevier. pp. 91-106.
87. RIXE, Olivier et FOJO, Tito, 2007. Is Cell Death a Critical End Point for Anticancer Therapies or Is Cytostasis Sufficient? *Clinical Cancer Research*. 15 décembre 2007. Vol. 13, n° 24, pp. 7280-7287. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-07-2141.
88. ROSSMANN, Marlies P., DUBOIS, Sonia M., AGARWAL, Suneet et ZON, Leonard I., 2021. Mitochondrial function in development and disease. *Disease Models & Mechanisms*. 1 juin 2021. Vol. 14, n° 6. DOI 10.1242/dmm.048912.
89. SALZER, J.L. et ZALC, B., 2016. Myelination. *Current Biology*. octobre 2016. Vol. 26, n° 20, pp. R971-R975. DOI 10.1016/j.cub.2016.07.074.
90. SANDERSON, Michael J., SMITH, Ian, PARKER, Ian et BOOTMAN, Martin D., 2014. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 1 octobre 2014. Vol. 2014, n° 10, pp. pdb.top071795. DOI 10.1101/pdb.top071795.
91. SCRIPTURE, Charity, FIGG, William et SPARREBOOM, Alex, 2006. Peripheral Neuropathy Induced by Paclitaxel: Recent Insights and Future Perspectives. *Current Neuropharmacology*. 1 avril 2006. Vol. 4, n° 2, pp. 165-172. DOI 10.2174/157015906776359568.
92. SIEGEL, Rebecca L., MILLER, Kimberly D., WAGLE, Nikita Sandeep et JEMAL, Ahmedin, 2023. Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 12 janvier 2023. Vol. 73, n° 1, pp. 17-48. DOI 10.3322/caac.21763.
93. SOLÁR, Peter, ZAMANI, Alemeh, KUBÍČKOVÁ, Lucie, DUBOVÝ, Petr et JOUKAL, Marek, 2020. Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids and Barriers of the CNS*. 6 décembre 2020. Vol. 17, n° 1, pp. 35. DOI 10.1186/s12987-020-00196-2.
94. STAFF, Nathan P., FEHRENBACHER, Jill C., CAILLAUD, Martial, DAMAJ, M. Imad, SEGAL, Rosalind A. et RIEGER, Sandra, 2020. Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems. *Experimental Neurology*. février 2020. Vol. 324, pp. 113121. DOI 10.1016/j.expneurol.2019.113121.
95. TAN, Ee Phie, DUNCAN, Francesca E. et SLAWSON, Chad, 2017. The sweet side of the cell cycle. *Biochemical Society Transactions*. 15 avril 2017. Vol. 45, n° 2, pp. 313-322. DOI 10.1042/BST20160145.

96. TANG, Daolin, KANG, Rui, COYNE, Carolyn B., ZEH, Herbert J. et LOTZE, Michael T., 2012. PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*. 14 septembre 2012. Vol. 249, n° 1, pp. 158-175. DOI 10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.
97. THOMPSON, Derick, BRISSETTE, Catherine A. et WATT, John A., 2022. The choroid plexus and its role in the pathogenesis of neurological infections. *Fluids and Barriers of the CNS*. 10 septembre 2022. Vol. 19, n° 1, pp. 75. DOI 10.1186/s12987-022-00372-6.
98. WAN, Yingfeng, HUA, Ya, GARTON, Hugh J. L., NOVAKOVIC, Nemanja, KEEP, Richard F. et XI, Guohua, 2019. Activation of epipterus macrophages in hydrocephalus caused by subarachnoid hemorrhage and thrombin. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 21 octobre 2019. Vol. 25, n° 10, pp. 1134-1141. DOI 10.1111/cns.13203.
99. WEBB, Donna J. et BROWN, Claire M., 2012. Epi-Fluorescence Microscopy. In : . pp. 29-59.
100. XIAO, W, BOROUJERDI, A, BENNETT, G J et LUO, Z D, 2007. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. *Neuroscience*. 19 janvier 2007. Vol. 144, n° 2, pp. 714-20. DOI 10.1016/j.neuroscience.2006.09.044.
101. ZIMMER, Shanta M., LIU, Jin, CLAYTON, Jaime L., STEPHENS, David S. et SNYDER, James P., 2008. Paclitaxel Binding to Human and Murine MD-2. *Journal of Biological Chemistry*. octobre 2008. Vol. 283, n° 41, pp. 27916-27926. DOI 10.1074/jbc.M802826200.

11 SEZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

(URL1) **BioRender**. [online]; [cit. 10. 1. 2024]

Dostupné z: <https://biorender.com/>

12 SEZNAM OBRÁZKŮ

Mechanismus paklitaxelu vytvořeno autorkou dle (Chmielewski, Limoli 2022) v (URL1).	15
Zjednodušené schéma mechanismu šíření PIPN vytvořeno autorkou dle (Eldridge, Guo, Hamre 2020; Burgess et al. 2021) v (URL1).	19
Lokace choroidálního plexu vytvořenou autorkou dle (Bitanhirwe, Lizano, Woo 2022) v (URL1).	23
Struktura choroidálního plexu vytvořeno autorkou dle (Solár et al. 2020; Jiménez et al. 2014; Althubaity et al. 2022) v (URL1).	24
Imunohistochemické metody vytvořeno autorkou dle (Kim, Roh, Park 2016) v (URL1).	34
Reprezentativní mikroskopické snímky preparátů podrobených imunohistochemii ukazující postup identifikace makrofágů. Vytvořeno v (URL1) autorkou.	37
Reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu ukazující počty aktivovaných makrofágů povrchu mozkových komor. Vytvořenou autorkou v (URL1).	39
Počty aktivovaných makrofágů povrchu mozkových komor na 1 mm² tkáně. Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.	40
Reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu ukazující počty rezidentních makrofágů povrchu mozkových komor. Vytvořenou autorkou v (URL1).	41
Počty rezidentních makrofágů povrchu mozkových komor na 1 mm² tkáně. Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.	42
Porovnání počtů aktivovaných makrofágů vzhledem k rezidentním skupiny paklitaxel. Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.	43
Porovnání počtů aktivovaných makrofágů vzhledem k rezidentním skupiny vehikulum. Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.	44

13 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Laboratorní zvířata	30
Tabulka 2: Seznam použitých léčiv k vytvoření in vivo modelu	30
Tabulka 3: Seznam použitých reagensů	31
Tabulka 4: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek	32
Tabulka 5: Seznam použitého laboratorního vybavení	32
Tabulka 6: Seznam použitých softwarů	32
Tabulka 7: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů naivní kontroly značených primární protilátkou ED1 a ED2	68
Tabulka 8: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED1, den 1.	69
Tabulka 9: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED1, den 7.	70
Tabulka 10: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED1, den 14.	71
Tabulka 11: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED1, den 21.	72
Tabulka 12: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED2, den 1.	73
Tabulka 13: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED2, den 7.	73
Tabulka 14: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED2, den 14.	74
Tabulka 15: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED2, den 21.	75

14 PŘÍLOHY

Z pořízených mikroskopických snímků byly kvantifikovány makrofágy a změřena sledovaná oblast. Z hodnot byly určeny počty makrofágů na 1 mm² tkáně a vypočítán aritmetický průměr. Z dat byly následně sestaven grafy.

Naivní kontrola	
ED1	ED2
65,70841889	89,7063731
32,95999546	55,71502434
45,84161539	42,32748692
	29,67410122
	39,74395355
	168,1899066
	44,57664888
48,17000991	67,13335637

Tabulka 7: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů naivní kontroly značených primární protilátkou ED1 a ED2

ED1	
1. den	
Paklitaxel	Vehikulum
237,5127663	41,7034352
998,7565481	55,83719215
1076,28724	
799,7184991	
218,3477625	
7,24683E-05	
356,2360909	
75,99552234	
104,9016337	
139,6302869	
59,5068784	
369,7175728	48,77031367

Tabulka 8: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED1, den 1.

ED1	
7. den	
Paklitaxel	Vehikulum
706,0734081	218,6820036
120,6512028	75,74443525
165,8711303	180,8666588
91,95664428	246,3925057
175,0499549	143,1858567
138,7763259	248,9990239
133,7396343	
123,3535386	
104,3081346	
181,0769188	
141,8203349	
229,9344802	
224,2942022	
90,74706615	
187,6894983	185,6450807

Tabulka 9: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED1, den 7.

ED1	
14. den	
Paklitaxel	Vehikulum
293,2233159	337,6838266
94,6201804	101,8727263
294,2803668	63,22135567
172,3784258	91,0655581
583,8495536	47,67853226
572,5458538	
125,7963696	
103,9479429	
201,170949	
182,9082039	
58,94891723	
147,273236	
50,67049736	
62,88817727	
161,263532	
121,5068305	
201,704522	128,3043998

Tabulka 10: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED1, den 14.

ED1	
21. den	
Paklitaxel	Vehikulum
170,5896602	83,24246031
166,2112478	81,43083753
85,81819929	48,88658361
118,4453807	45,97986542
148,2482981	40,34812361
69,47107502	82,06111255
168,7363113	
265,4322298	
74,69369981	
52,53096832	
94,89529727	
128,6429425	63,65816384

Tabulka 11: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED1, den 21.

ED2	
1. den	
Paklitaxel	Vehikulum
179,8671142	16,36906345
	62,88790043
	44,16752388
	29,98131265
	206,8461954
	228,6184587
	32,97582048
	26,43666067
	66,9994305
179,8671142	79,47581846

Tabulka 12: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED2, den 1.

ED2	
7. den	
Paklitaxel	Vehikulum
411,9294777	504,3729132
29,46251823	45,4327171
82,42419447	49,94401276
35,29668808	390,161683
46,3743383	32,68248346
122,0205629	73,95355717
254,8017388	
140,3299312	182,7578944

Tabulka 13: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED2, den 7.

ED2	
14. den	
Paklitaxel	Vehikulum
341,5829409	59,48480803
47,93681161	168,9119285
121,7213344	114,1048418
178,1614981	98,84675491
204,3646847	108,2600233
62,90837364	66,9383471
140,7715124	
142,9038928	
86,687489	
602,5929575	
1022,669167	
117,2671134	
193,0870958	
54,36021963	
236,9296493	102,7577839

Tabulka 14: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED2, den 14.

ED2	
21. den	
Paklitaxel	Vehikulum
132,5641666	120,2534462
118,8169162	
655,5434062	
394,4104156	
225,4644003	
275,9310327	
148,7597159	
329,6504782	
121,6590893	
33,80151816	
113,4672373	
231,8243979	120,2534462

Tabulka 15: Hodnoty počtů makrofágů na 1 mm² tkáně mikroskopických snímků experimentální skupiny: počty makrofágů značených primární protilátkou ED2, den 21.