

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Habilitační práce

**Účast intermediárních filament a buněk kostní dřeně
při experimentální regeneraci kosterního svalu**

MUDr. Dana Čížková, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	V
ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ	VI
ZKRATKY	VII
1. ÚVOD	1
2. SOUČASNÝ STAV SLEDOVANÉ PROBLEMATIKY	4
2.1. Regenerace kosterního svalu	4
2.1.1. Kmenové buňky kosterního svalu	5
2.1.2. Fáze a regulace regenerace kosterního svalu	6
2.2. Experimentální modely regenerace kosterního svalu	8
2.2.1. Model regenerace kosterního svalu – poranění svalu injekcí kardiotoxinu	8
2.2.2. Model regenerace kosterního svalu – heterochronní isotransplantace	9
2.3. Regenerace nervosvalových větének	10
2.4. Intermediární filamentum nestin	12
2.4.1. Intermediární filamentum nestin v kosterním svalu	15
2.5. Kostní dřev a její vztah k regeneraci kosterního svalu	16
2.6. Niche satelitových buněk v kosterním svalu	19
3. CÍLE	22
4. MATERIÁL A METODY	24
4.1. Roztoky, pufrý a fixativa	24
4.2. Laboratorní zvířata	25
4.3. Chirurgické techniky	25
4.3.1. Heterochronní isotransplantace kosterního svalu	25
4.3.2. Experimentální poranění kosterního svalu	26
4.4. Transplantace buněk kostní dřevě	26
4.5. Histologické zpracování tkání pro světelnou mikroskopii	27
4.5.1. Zhotovení parafinových řezů	27
4.5.2. Zhotovení kryořezů	27
4.5.3. Zhotovení řezů tkání zalitých do pryskyřice glykolmethakrylát (GMA)	28
4.6. Histologické zpracování tkání pro transmisní elektronovou mikroskopii	28
4.7. Histologická barvení na průkaz vápníku	28
4.7.1. Metoda podle von Kossy	28
4.7.2. Alizarinová červen (metoda Dahlova)	29
4.8. Histochemie a imunohistochemie	30
4.8.1. Histochemická detekce β galaktosidázy	30

4.8.2. Imunohistochemické detekce na parafinovaných řezech	30
4.8.3. Imunofluorescenční detekce na kryorezech	31
4.8.4. Imunohistochemické detekce na ultratenkých řezech pro transmisní elektronovou mikroskopii	31
4.8.5. Seznam použitých primárních protilátek.....	32
4.9. Analýza obsahu DNA bakteriálního genu <i>LacZ</i> pomocí metody kvantitativní PCR	32
5. VÝSLEDKY	34
5.1. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v intaktním a regenerujícím kosterním svalu zadní končetiny potkana	34
5.1.1. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v intaktním kosterním svalu zadní končetiny potkana ...	34
5.1.2. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v regenerujícím kosterním svalu zadní končetiny potkana	34
5.1.2.1. <i>Šedm dní po heterochronní isotransplantaci</i>	34
5.1.2.2. <i>Šestnáct dní po heterochronní isotransplantaci</i>	36
5.1.2.3. <i>Dvacet jedna a 29 dní po heterochronní isotransplantaci</i>	37
5.2. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách kosterního svalu zadní končetiny potkana.....	39
5.2.1. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v intaktních nervosvalových vřeténkách kosterního svalu zadní končetiny potkana.....	39
5.2.2. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v regenerujících nervosvalových vřeténkách kosterního svalu zadní končetiny potkana	42
5.3. Detekce buněk pocházejících z kostní dřene v průběhu odpovědi na poranění kosterního svalu myši.....	45
5.3.1. Histologická stavba poraněných a kontralaterálních kosterních svalů ozářených a transplantovaných myši.....	45
5.3.2. Histologická stavba poraněných kosterních svalů ozářených myši bez transplantace BKD	49
5.3.3. Histologická stavba poraněných kosterních svalů myši bez ozáření a transplantace BKD	49
5.3.4. Analýza obsahu DNA genu <i>lacZ</i> ve svalech m. tibialis ant. a v kostních dřeních transplantovaných myši.....	50
5.4. Detekce buněk pocházejících z kostní dřene v intaktním a regenerujícím kosterního svalu myši..	52
5.4.1. Histologická stavba a ultrastruktura poraněných a kontralaterálních kosterních svalů ozářených a transplantovaných myši.....	52
5.4.2. Histologická stavba kosterních svalů bez navozeného poranění ozářených a transplantovaných myši.....	59
5.4.3. Histologická stavba poraněných kosterních svalů myši bez ozáření a transplantace BKD	60
6. DISKUSE	61
6.1. Nestin, desmin a vimentin v intaktním a regenerujícím kosterním svalu zadní končetiny potkana	61
6.1.1. Nestin ve svalových buňkách a vláknech.....	62

6.1.2. Desmin a vimentin ve svalových buňkách a vláknech.....	65
6.1.3. Nestin v krevních cévách	66
6.1.4. Nestin v periferních nervech	67
6.2. Nestin, desmin a vimentin v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách.....	68
6.2.1. Nestin v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách	69
6.2.2. Desmin a vimentin v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách	71
6.3. Role transplantovaných buněk kostní dřeně při reakci na poranění kosterního svalu.....	73
6.4. Buňky pocházející z kostní dřeně jako součást niche satelitových buněk v intaktním a regenerujícím kosterním svalu myši.....	77
7. ZÁVĚRY	82
8. LITERATURA	85
9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	104

PODĚKOVÁNÍ

Nejprve bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Jaroslavu Mokrému, Ph.D., přednostovi Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy, za jeho cenné rady, stimulační diskuse, povzbuzení a pomoc při řešení výzkumných témat této práce. Poděkování patří také všem dalším kolegům z Ústavu histologie a embryologie za spolupráci, odborné rady a příjemnou pracovní atmosféru.

Z Lékařské fakulty v Hradci Králové děkuji dále prof. MUDr. Stanislavu Filipovi, D.Sc., z Kliniky onkologie a radioterapie, který mě přivedl k problematice experimentálních transplantací buněk kostní dřeně, za možnost spolupráce v rámci grantových projektů Grantové agentury České republiky, RNDr. Alešovi Bezroukovi, Ph.D., z Ústavu lékařské biofyziky za podnětnou spolupráci a technickou pomoc při vyšetřování vzorků v transmisním elektronovém mikroskopu a prof. MUDr. Stanislavu Mičudovi, Ph.D., a jeho kolegům z Ústavu farmakologie za analýzu vzorků metodou kvantitativní PCR. Také děkuji všem pracovníkům vivária za ochotu, pomoc a odborné rady při práci s laboratorními zvířaty.

Děkuji rovněž RNDr. Tomášovi Soukupovi, CSc., z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky *in memoriam*, který nás oslovil s problematikou experimentální regenerace kosterního svalu, za poskytnutí modelu heterochronní isotransplantace, přínosnou spolupráci, cenné rady a poutavé diskuse.

Prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc., a paní Jaroslavě Prokešové z Katedry radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Brně děkuji za pomoc při zavádění metody experimentální transplantace myších buněk kostní dřeně celotělově letálně ozářeným myším příjemcům a vedení katedry za možnost ozařování myši na kobaltovém zářiči.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře České republiky (projekty č. 304/08/0329 a č. 15-09161S), Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy (Výzkumný záměr č. MSM0021620820) a Univerzitě Karlově (PRVOUK č. P37/06 a Progres č. Q40/06).

V neposlední řadě děkuji svým nejbližším, manželovi, dětem a rodičům za obětavou pomoc a podporu.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji tímto, že jsem habilitační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové, 10. 12. 2019

MUDr. Dana Čížková, Ph.D.

ZKRATKY

ATP	adenosintrifosfát
BKD	buňky kostní dřevě
CD	<i>cluster of differentiation</i> ; označení povrchových molekul leukocytů
Cdk5	cyklin-dependentní kináza 5
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
devMHC	<i>developmental myosin heavy chain</i> ; vývojová forma těžkého řetězce myosinu
Flk-1	receptor pro VEGF
GMA	glykolmetakrylát
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> ; gliální fibrilární kyselý protein
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; zelený fluorescenční protein
HKB	hematopoetické kmenové buňky
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i> ; růstový faktor podobný inzulinu
IL	interleukin
miRNA	microRNA
MMSB	multipotentní mezenchymové stromální buňky
MRF	<i>myogenic regulatory factor</i> ; myogenní regulační faktor
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; mediátorová ribonukleotidová kyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> ; nukleární antigen proliferujících buněk
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; polymerázová řetězová reakce
PDGFR α , β	<i>platelet derived growth factor receptor α, β</i> ; receptor α , β pro růstový faktor z destiček
Sca-1	<i>stem cell antigen-1</i> ; antigen 1 kmenových buněk
SP buňky	<i>side population</i> buňky
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i> ; faktor nekrotizující tumory α
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> ; vaskulární endotelový růstový faktor

1. ÚVOD

Problematika kmenových buněk a regenerace tkání a orgánů představuje velmi aktuální a intenzivně se rozvíjející výzkumné téma. Nové poznatky jsou klíčové pro vývoj regenerativní medicíny, moderního a nadějněho lékařského oboru, jenž je zaměřený na reparaci poškozených tkání a orgánů, často s pomocí kmenových buněk, ve snaze nahradit poškozené a staré buňky produkcí nových elementů. Kosterní svalová tkáň tvoří zhruba 30 až 40 % tělesné hmotnosti a zastává v organismu mnoho funkcí, např. vůlí ovládaný pohyb, dýchání a posturu neboli udržování polohy těla v prostoru. Vykazuje pozoruhodnou schopnost regenerace, která je zprostředkována kmenovými buňkami kosterní svaloviny, označovanými jako satelitové buňky. Výsledky výzkumu kmenových buněk a regenerace kosterní svaloviny přispívají k vývoji buněčné terapie onemocnění kosterních svalů.

Pracoviště Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy se problematikou kmenových buněk a regenerace tkání zabývá dlouhodobě. Již desítky let zde probíhá výzkum kmenových buněk a regenerace nervové tkáně. Téma kmenových buněk a regenerace kosterního svalu nás oslovilo počátkem tohoto století při spolupráci s RNDr. Tomášem Soukupem, CSc., z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, který byl v této oblasti mezinárodně uznávaným odborníkem a poskytl nám model regenerace kosterního svalu zadní končetiny potkana nazvaný heterochronní isotransplantace. Poté se mi podařilo zavést a charakterizovat model regenerace kosterního svalu myši indukované intramuskulární injekcí kardiotoxinu. Problematiku regenerace kosterního svalu s využitím těchto modelů jsme řešili v rámci grantových projektů Grantové agentury České republiky č. 304/08/0329 „Studium faktorů mikroprostředí ovlivňujících proces reparace kosterní svaloviny“ v letech 2008 až 2010 a č. 15-09161S „Remodelace svalu na podkladě extracelulární matrix osázené funkčně charakterizovanými buňkami“ v letech 2015 až 2017 a dále v rámci projektu financovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky: Výzkumný záměr č. MSM0021620820 „Využití experimentálních a klinických modelů metabolických procesů, výživy a farmakoterapie pro rozvoj poznání, klinickou praxi a ke zlepšení kvality života“ (2005 – 2011), a projektů financovaných Univerzitou Karlovou: PRVOUK č. P37/06 „Nové postupy v diagnostice a terapii civilizačních chorob a onemocnění spojených se stárnutím populace“ (2012 – 2016) a Progres č. Q40/06 „Nové postupy ve výzkumu, diagnostice a terapii civilizačních chorob a onemocnění spojených se stárnutím populace“ (2017 – 2021). Studium intermediárního filamentu nestinu se prof.

MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D., spolu s prof. MUDr. Stanislavem Němečkem, DrSc. zabývali již od počátku 90. let minulého století, kdy byla tato složka cytoskeletu poprvé popsána prof. Lendahlem v neurálních progenitorových buňkách. Díky primární protilátce proti nestinu darované prof. Lendahlem publikovali řadu prvotních nálezů, např. expresi nestinu v novotvořených endotelových buňkách krevních cév během neovaskularizace nebo revaskularizace.

Již během svého studia na Lékařské fakultě v Hradci Králové jsem inklinovala k morfologickým oborům. V letech 1999 - 2000 jsem pracovala jako pomocná vědecká síla na Fingerlandově ústavu patologie, kde jsem spolupracovala při tvorbě Interaktivního mikroskopického atlasu (CD ROM, ISBN 80-7262-052-5). Po promoci v r. 2001 jsem začala studovat doktorský studijní program anatomie, histologie a embryologie na Lékařské fakultě v Hradci Králové na Ústavu histologie a embryologie pod vedením školitele Prof. MUDr. Jaroslava Mokrého, Ph.D. Během studia jsem si osvojila metody kultivace fetálních buněk *in vitro*, metodiku imunohistochemických detekcí i základy transmisní elektronové mikroskopie. V r. 2005 jsem obhájila dizertační práci s názvem „Fenotypizace buněk jaterní tkáně *in situ* a *in vitro*“, ve které jsem se věnovala problematice fenotypizace buněk jater potkaního a lidského fétu a dospělého jedince *in situ* se zaměřením na transportéry zodpovědné za mnohočetnou lékovou rezistenci MRP2/Mrp2 a MDR1/Mdr1 (P-glykoprotein) a intermediární filamentum nestin a fenotypizace jaterních buněk linie WRL 68 během jejich krátkodobé i dlouhodobé kultivace *in vitro* a sledování změn fenotypu těchto elementů vyvolaných vlivem rozdílných kultivačních podmínek. Od r. 2005 pracuji na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové jako odborná asistentka, věnuji se výuce a výzkumu regenerace kosterního svalu, jehož výsledky jsou obsaženy v této práci. Dobrou kvalitu mé vědecké práce dokládají získaná ocenění, kterých si velmi vážím. Za článek s názvem “Expression of nestin, desmin and vimentin in intact and regenerating muscle spindles of rat hind limb skeletal muscles.“ autorů Čížková, D., Soukup, T., Mokrý, J. publikovaný v časopisu Histochemistry and Cell Biology (2009, roč. 131, č. 2, s. 197-206) jsem získala v roce 2009 Výroční cenu České anatomické společnosti a fy. OLYMPUS C&S, spol. s r.o. za nejlepší původní vědeckou publikaci z anatomie, histologie, embryologie a buněčné biologie a za článek „Role of transplanted bone marrow cells in response to skeletal muscle injury.“ autorů Čížková, D., Vávrová, J., Mičuda, S., Filip, S., Brčáková, E., Brůčková, L., Mokrý, J. publikovaný v časopisu Folia Biologica (Praha) (2011, roč. 57, č. 6, s. 232-41) v roce 2012 Výroční cenu České společnosti histo- a cytochemické a firmy Nikon, s.r.o. za nejlepší původní vědeckou publikaci v oboru histochemie, imunohistochemie a cytochemie.

Hlavními tématy této habilitační práce věnované problematice experimentální regenerace kosterního svalu jsou exprese intermediárních filament nestinu, desminu a vimentinu v intaktním a regenerujícím kosterním svalu zadní končetiny potkana a také v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách téhož svalu, úloha transplantovaných buněk kostní dřeně dárce při reakci kosterního svalu příjemců na poranění a identifikace buněčných typů pocházejících z buněk kostní dřeně vyskytujících se v niche satelitových buněk intaktního a regenerujícího kosterního svalu.

2. SOUČASNÝ STAV SLEDOVANÉ PROBLEMATIKY

2.1. Regenerace kosterního svalu

Regenerace představuje komplexní proces, při kterém dochází k obnově tkání a orgánů v organismu. Jako fyziologickou regeneraci lze označit obvyklou obnovu tkání a orgánů, zatímco reparativní regenerace znamená nahrazení ztracených nebo odumřelých součástí tkání a orgánů novými. Při regeneraci dochází k opakování určitých fází vývoje dané tkáně nebo orgánu. Pro novotvorbu buněk tkání a orgánů v průběhu fyziologické i reparativní regenerace jsou klíčové kmenové buňky.

Kmenové buňky představují jedinečnou populaci, která se svými vlastnostmi zcela odlišuje od všech ostatních buněk v tkáni. Jsou to elementy nezralé, nediferencované, s možností vysoké proliferační aktivity a s téměř neomezenou schopností sebeobnovy. Neomezená schopnost sebeobnovy a produkce diferencovaných elementů jsou určující vlastnosti, na základě kterých lze buňku označit jako kmenovou. Souvisí s asymetrickým dělením, při kterém z mateřské kmenové buňky vznikají nejen diferencované elementy, ale i buňky s ní naprosto identické. Kmenové buňky se nacházejí téměř ve všech tkáních a orgánech po celý život, ale v různých obdobích vývoje organismu se svými vlastnostmi liší. Organismus se vyvíjí z jediné buňky – zygoty, která vzniká splynutím samčí a samičí gamety. Přestože se zygota nepovažuje za kmenovou buňku, protože při jejím dělení se netvoří buňky s ní identické, tzn. není schopna sebeobnovy, dává vznik buňkám, které již kmenové jsou. Tyto první kmenové buňky se označují jako totipotentní. Jsou prakticky identické a schopné diferencovat se v jakýkoli buněčný fenotyp. V průběhu gastrulace se tvoří buňky embryoblastu, jehož kmenové buňky se chovají jako pluripotentní, předurčené k tvorbě tkání vyvíjejících se z daného zárodečného listu. V počátcích organogeneze se z buněk zárodečných vrstev odvozují kmenové buňky tkáňově a orgánově specifické. Jsou to klíčové elementy pro tvorbu tkání a orgánů při embryonálním a fetálním vývoji. Během života vykazují různou míru proliferační aktivity a schopnosti sebeobnovy. Velmi aktivní jsou v rostoucím dětském organismu. V dospělých tkáních se chovají jako relativně klidové. Do buněčného cyklu vstupují jen tehdy, je-li potřeba doplnit počet buněk v tkáni na normální hodnotu. Jsou to tedy klíčové elementy pro udržení tkáňové homeostázy a regeneraci tkání. Nejlépe patrná je jejich činnost ve tkáních s vystupňovanou fyziologickou obměnou jako např. v epidermis, vlasových folikulech, tenkém střevě a hematopoetickém systému (Filip et al., 2006).

2.1.1. Kmenové buňky kosterního svalu

V kosterním svalu mají vlastnosti dospělých kmenových buněk satelitové buňky. Jsou to malé elementy nacházející se mezi cytoplazmatickou membránou svalového vlákna a bazální membránou. Poprvé byly popsány u žáby v roce 1961 Alexandrem Maurem, který je podle jejich charakteristického umístění rovněž pojmenoval. Mají schopnost sebeobnovy, díky které se ve zdravé tkáni udržuje jejich stálý počet a dávají vznik diferencovaným myogenním progenitorovým buňkám přispívajícím k regeneraci svalových vláken po poranění (Sacco et al., 2008; Schmidt et al., 2019). Tyto charakteristiky určují, že jsou satelitové buňky svalovými kmenovými buňkami, jak bývají v současné době již běžně označovány. Za homeostatických podmínek jsou klidové, avšak během regenerace kosterního svalu jsou aktivovány, prolifерují a diferencují se. Kosterní sval zdravé myši i člověka může plně regenerovat mnohokrát, avšak funkce satelitových buněk se snižuje v průběhu různých degenerativních onemocnění nebo stavů, při kterých dochází ke snížení schopnosti regenerace, jako je např. stárnutí. Snížená funkce satelitových buněk může být způsobena změnou složení mezibuněčné hmoty, nevyváženou mezibuněčnou interakcí s ostatními buňkami ve svalové tkáni nebo změnami systémových faktorů (Chakkalakal et al., 2012; Bentzinger et al., 2013; Sousa-Victor et al., 2014; Lukjanenko et al., 2016; Rozo et al., 2016; Schwörer et al., 2016; Evano and Tajbakhsh, 2018; Mashinchian et al., 2018; Schmidt et al., 2019). Bylo prokázáno, že satelitové buňky jsou pro regeneraci kosterního svalu po poranění nepostradatelné. Jiné buněčné populace nejsou schopné jejich funkci nahradit (Relaix a Zammit, 2012; Yin et al., 2013; Mashinchian et al., 2018; Schmidt et al., 2019).

V dospělém svalu jsou klidové satelitové buňky charakteristické expresí transkripčního faktoru Pax7, který je esenciální pro jejich funkci (Seale et al., 2000; von Maltzahn et al., 2013; Schmidt et al., 2019). Je také považován za kanonický marker těchto buněk, protože se vyskytuje u mnoha živočišných druhů včetně člověka, opice, myši, prasete, kuřete, mloka, žáby a ryby (Yin et al., 2012). Mezi další markery umožňující jejich identifikaci a izolaci se řadí integriny $\alpha 7$ a $\beta 1$, M-cadherin, receptor pro kalcitonin (CALCR, calcitonin-receptor) nebo syndecan 4 (Yin et al., 2012; Bentzinger et al., 2013; Wang et al., 2014; Schmidt et al., 2019). Je nezbytné zmínit, že přibývající poznatky o satelitových buňkách potvrzují jejich mírnou funkční heterogenitu. Mohou se lišit v rychlosti proliferace a diferenciace, klonogenní kapacitě a schopnosti sebeobnovy. Rozdílné vlastnosti mohou mít satelitové buňky lokalizované v různých svalech, ale i uvnitř jednoho svalu (Relaix a Zammit, 2012; Schmidt et al., 2019).

2.1.2. Fáze a regulace regenerace kosterního svalu

Dospělý savčí kosterní sval představuje stabilní tkáň s pouze malou obměnou jader. Menší léze způsobené každodenní běžnou zátěží vyvolají jen velmi pomalou obměnu svalových vláken. Odhadem ne více než 1 – 2 % jader svalových vláken jsou nahrazena každý týden v případě normálního dospělého kosterního svalu potkana (Schmalbruch a Lewis, 2000; Charge a Rudnicki, 2004). Nicméně po těžším poranění je savčí kosterní sval schopný rychle a intenzivně regenerovat. Bez ohledu na příčinu poranění lze proces regenerace kosterního svalu rozdělit do několika fází: zánětlivá fáze, fáze aktivace a následné diferenciaci satelitových buněk v myoblasty, které fúzí za vzniku myotub, a fáze vyzrávání, kdy dochází k tvorbě nových zralých svalových vláken (Charge a Rudnicki, 2004; Schmidt et al., 2019). Poranění svalu vyvolá nekrózu poškozených svalových vláken, která spouští prvotní zánětlivou fázi. První buňky zánětlivého infiltrátu, které se objevují v oblasti poranění, jsou neutrofilní granulocyty (Tidball et al., 2005; Yin et al., 2013; Schmidt et al., 2019). Následují je monocyty, u kterých lze rozlišit dvě odlišné populace. Časně oblast infiltrují prozánětlivé Ly6C⁺ monocyty tvořící prozánětlivé faktory jako TNF α a IL-1 β , jež podporují proliferaci myogenních buněk a zároveň inhibují jejich diferenciaci a fúzi. Později se v místě poranění objevují protizánětlivé Ly6C⁻ monocyty, které uvolňují protizánětlivé cytokiny, např. IL-10, a tím stimulují diferenciaci svalových buněk. Jakmile monocyty proniknou do tkáně, diferencují se v makrofágy. Analogicky jako u monocytů může být klasifikace makrofágů v průběhu regenerace kosterního svalu zjednodušena na úvodní vlnu prozánětlivých M1 (CD68⁺/CD163⁻) makrofágů se schopností fagocytózy, která je postupně následována druhou vlnou protizánětlivých M2 (CD68⁻/CD163⁺) makrofágů. Podobně jako prozánětlivé Ly6C⁺ monocyty vylučují M1 makrofágy IL-1 β , TNF α a také IL-6, čímž indukují proliferaci myogenních buněk, zatímco M2 makrofágy uvolňují IL-4 a IGF-1, které podporují diferenciaci svalových elementů (Arnold et al., 2007; Bentzinger et al., 2013; Saclier et al., 2013; Schmidt et al., 2019).

Během druhé fáze regenerace dochází k aktivaci a diferenciaci satelitových buněk. Po poranění svalu dosud klidové satelitové buňky vstupují do buněčného cyklu, začnou exprimovat transkripční faktor MyoD, migrují do oblasti poranění, kde buď fúzí s poraněnými svalovými vlákny nebo se z nich stávají myogenní progenitorové buňky (Schmidt et al., 2019). Migrace satelitových buněk je kontrolována signály ze svalových vláken, např. signální dráhou Ephrin a Wnt7a (Stark et al., 2011; Bentzinger et al., 2014; Schmidt et al., 2019). Myogenní progenitorové buňky proliferují, charakteristicky exprimují transkripční faktory MyoD a Myf5 a jsou obvykle označovány jako myoblasty (Schmidt et al., 2019).

MyoD, Myf5 a dále také myogenin a MRF4 představují myogenní regulační faktory, které podporují myogenní diferenciaci (Hernandez-Hernandez et al., 2017; Schmidt et al., 2019). Myoblasty se morfologicky mění v protáhlé myocyty, které fúzí za vzniku mnohojaderných myotub postupně vyzárajících ve svalová vlákna. Novotvořená svalová vlákna mají jádra umístěná centrálně a exprimují vývojovou formu MHC (devMHC). Vyzrávání svalových vláken, která jsou základními kontraktilními elementy kosterního svalu, představuje třetí, poslední, fázi regenerace (Yin et al., 2013; Schmidt et al., 2019).

Regenerace kosterního svalu je precizně regulována vnějšími signály pocházejícími z komponent mikroprostředí, tzv. niche, ve kterém se satelitové buňky nacházejí, a vnitřními signálními dráhami kontrolujícími funkci satelitových buněk. Signální dráha Wnt je jednou z klíčových uplatňujících se při svalové regeneraci, přičemž konkrétně Wnt7 aktivuje několik dalších signálních drah v satelitových buňkách a svalových vláknech, čímž se stává slibným kandidátem pro zlepšení léčby onemocnění kosterního svalu, jako jsou dystrofie (von Maltzahn et al., 2012; Lacour et al., 2017; Schmidt et al., 2019). Signální dráha Notch je významná pro udržení počtu satelitových buněk, což dokládá studie, ve které myši postrádající Notch1 a Notch2 v satelitových buňkách nejsou schopné udržet klidový stav těchto kmenových buněk. Následkem je předčasný vstup satelitových buněk do buněčného cyklu, který vede k jejich úplné ztrátě (Bjornson et al., 2012; Mourikis et al., 2012; Fujimaki et al., 2018; Evans and Tajbakhsh, 2018; Schmidt et al., 2019). Příkladem jemné rovnováhy mezi signálními dráhami a jejich přesnou aktivací během regenerace je změna dráhy Notch na Wnt, přičemž kanonická dráha Wnt antagonizuje efekt dráhy Notch, a tak umožňuje přechod k myogenní diferenciaci (Schmidt et al., 2019). Také miRNA kontrolují mnohé signální dráhy v satelitových buňkách. Např. posttranskripčně regulují udržení satelitových buněk v klidovém stavu i jejich aktivaci a diferenciaci (Mok et al., 2017; Wang et al., 2018; Schmidt et al., 2019). Cheung et al., (2012) srovnali expresi miRNA v klidových a aktivovaných satelitových buňkách a zjistili rozdíly v expresi asi 351 miRNA, čímž doložili významnost miRNA při aktivaci satelitových buněk. Některé miRNA jsou exprimovány všudypřítomně, zatímco jiné jsou specifické jen pro určité tkáně nebo orgány. miRNA exprimující se pouze ve svalových elementech jsou označovány jako myomiR, např. miR-1, miR-133 a miR-206 jsou specifické pro sval a jsou silně indukovány během diferenciaci, přičemž je jejich exprese přímo regulována myogenními regulačními faktory, jako je Myf5, MyoD a myogenin (Sweetman et al., 2008; Siracusa et al., 2018; Schmidt et al., 2019).

2.2. Experimentální modely regenerace kosterního svalu

Pro studium kmenových buněk a regenerace kosterního svalu jsou nezbytné reprodukovatelné a kontrolovatelné experimentální modely poranění svalu u experimentálních zvířat, obvykle u potkanů a myší. V současné době se nejčastěji pro modely k navození poranění svalu a jeho následnou obnovu používají mytoxické látky jako kardiotoxin a notexin, chemické látky, např. chlorid barnatý BaCl_2 , a fyzikální způsoby, mezi které patří zmrazení, ozáření, rozdrčení, denervace nebo transplantace (Hardy et al., 2016). Obecně tyto modely poranění svalu začínají nekrózou tkáně, která je následována regenerací a nakonec obnovou tkáně *ad integrum*. Nicméně jednotlivé modely poranění svalu se do určité míry liší. Hardy et al. (2016) srovnali čtyři nejpoužívanější modely: zmrazení, aplikaci notexinu, kardiotoxinu a chloridu barnatého. Jako nejvíce poškozující vyhodnotili zmrazení, přičemž až 96 % satelitových buněk bylo zničeno včetně jejich bazálních lamin a cévního zásobení. Dvacet osm dnů po poranění byl proces regenerace dokončen u všech čtyřech modelů, pouze u zmrazení došlo k rozvoji fibrózy. Počet buněk zánětlivého infiltrátu se snížil na původní hodnoty u aplikace kardiotoxinu a chloridu barnatého, zatímco u zmrazení a aplikace notexinu zůstal signifikantně zvýšený ještě jeden měsíc po poranění svalu. Co je zajímavé, počet satelitových buněk se vrátil k původním hodnotám po jednom měsíci po poranění jen u zmrazení. U ostatních tří modelů se satelitové buňky stále dělily až po dobu 3 měsíců po poranění svalu.

2.2.1. Model regenerace kosterního svalu – poranění svalu injekcí kardiotoxinu

Model regenerace kosterního svalu využívající aplikaci kardiotoxinu popsali v roce 1988 Cousteaux et al. Kardiotoxin je obsažen v jedu kobry, přičemž nejčastěji se používá kardiotoxin z kobry mosambické (*Naja mossambica mossambica*) nebo z kobry čínské (Tchajwanské, *Naja naja atra*) (Cousteaux et al., 1988; Ownby et al., 1993). Kardiotoxiny vykazují více různých biologických aktivit, např. depolarizují a kontrahují svalové elementy, zabraňují agregaci trombocytů nebo způsobují lýzu erytrocytů (Harvey, 1985; Kumar et al., 1997). Původně byly nazvány podle svého účinku na srdce *in vivo*, který vede k srdečním arytmiím (Condrea, 1974). Výhodou použití kardiotoxinu pro model regenerace kosterního svalu je jeho selektivní působení při obvykle používané koncentraci (10^{-5} M v 0,9% roztoku NaCl), kdy indukuje degeneraci svalových vláken, ale ve větší míře nepostihne krevní cévy, inervaci a především satelitové buňky, jejichž přežití je nezbytné pro regeneraci (Cousteaux et al., 1988). Kardiotoxin způsobuje lýzu plazmatickým membrán svalových vláken, která

následně podléhají nekróze, a to velmi časně, jen 30 min. po intramuskulární injekci (Ownby et al., 1993). Několik hodin poté infiltrují oblast s degenerovanými svalovými vlákny neutrofilní granulocyty. Do 24 h jsou neutrofilní granulocyty a také makrofágy velmi početné a aktivně fagocytují zbytky nekrotických svalových vláken. Během druhého dne po injekci kardiotoxinu se v místě poranění objevují jednojaderné vřetenovité buňky, myoblasty. Nové myotuby se tvoří již od následujícího dne a postupně se transformují ve svalová vlákna, přičemž dochází k tzv. marginaci jader, kdy jádra migrují ze středu k periferii (Couteaux et al., 1988). Elektronová mikroskopie potvrdila, že v tomto modelu v úvodních fázích při degeneraci svalových vláken jejich bazální laminy perzistují a slouží jako „lešení“ pro vývoj nových svalových elementů. Bazální lamina obklopující původně jedno svalové vlákno pak často obsahuje několik novotvořených myotub, které až v pozdějších fázích získávají své vlastní bazální laminy. Toto je významný rozdíl od normální myogeneze, kdy jedna bazální lamina obklopuje vždy jedno vyvíjející se svalové vlákno. Důsledkem je, že kosterní sval zregenerovaný po injekci kardiotoxinu vykazuje mírné odlišnosti od svalu intaktního, a to v organizaci svazků svalových vláken a také v uspořádání motorických plotének (Couteaux et al., 1988).

2.2.2. Model regenerace kosterního svalu – heterochronní isotransplantace

Standardní svalová transplantace představuje model degenerace a následné regenerace kosterního svalu používaný již od 80. let 20. století (Carlson a Gutmann, 1975; Carlson 1976). Kosterní sval je úplně vyjmut ze svého lůžka, přičemž dochází k přetěti jeho šlachy, krevních cév a nervů. Sval je poté do svého lůžka vrácen a přišit ke své šlaše. Po této transplantaci svalová vlákna štěpu degenerují z důvodu přechodné ztráty krevního zásobení a jsou odstraněna makrofágy během prvních 5 dnů (Carlson, 1976; Jirmanová a Soukup, 2001). Regenerace začíná po revaskularizaci a postupuje od povrchu transplantovaného svalu směrem dovnitř (Hansen-Smith et al., 1980; Jirmanová a Soukup, 2001). Přežívající satelitové buňky jsou aktivovány, dělí se, diferencují se v myoblasty, které fúzí za vzniku myotub uvnitř původních bazálních lamin. Nová svalová vlákna jsou vytvořena 7 až 9 dní po transplantaci (Carlson a Gutmann, 1975; Jirmanová a Soukup, 2001). Svalová vlákna v povrchové vrstvě transplantovaného svalu obvykle zůstávají intaktní. Pokud je žádoucí degenerace všech vláken a úplná regenerace celého svalu, transplantát lze před jeho reimplantací propláchnout v roztoku myotoxické látky, např. bupivakainu (Hall-Craggs, 1974; Carlson, 1976; Jirmanová a Soukup,

2001). Jirmanová a Soukup (1995) zavedli model tzv. heterochronní isotransplantace. Pojmenování „heterochronní“ znamená, že dárce a příjemce jsou rozdílného stáří a pojem „isotransplantace“ značí, že dárce a příjemce jsou inbrední zvířata. Po transplantaci časných postnatálních svalů 2 až 15tidenních potkanů dospělým jedincům je fagocytóza nekrotické sarkoplazmy dokončena do 2 dnů u periferně lokalizovaných svalových vláken a do 5 dnů u svalových vláken ve středu svalu. Bazální laminy svalových vláken a také satelitové buňky zůstávají nepoškozené. Do 8 dnů jsou vyvinuta nová svalová vlákna, která mají jádra většinou v centrální oblasti. Od 13. dne se zvětšuje průměr novotvořených svalových vláken a jejich jádra se přesouvají do subsarkolemální pozice. Po 8. dni se mezi svalovými vlákny začínají objevovat nemyelinizované a myelinizované axony (Jirmanová a Soukup, 1995; Jirmanová a Soukup, 2001). Model heterochronní isotransplantace je vhodný nejen ke studiu regenerace extrafuzálních svalových vláken, ale také jako model degenerace a následné regenerace nervosvalových vřetének (Jirmanová a Soukup, 1995; Soukup a Thornell, 1997; Soukup a Novotová, 2000; Jirmanová a Soukup, 2001).

2.3. Regenerace nervosvalových vřetének

Nervosvalová vřeténka jsou specializované proprioreceptory informující o protažení kosterních svalů a zprostředkující vnímání končetin a osy těla (Boyd 1980; Zelená, 1994; Banks a Barker, 2004; Barret et al., 2019). Nacházejí se mezi extrafuzálními svalovými vlákny a dosahují délky 2 – 10 mm a tloušťky 0,5 mm. Skládají se z variabilního počtu intrafuzálních svalových vláken o malém průměru orientovaných longitudinálně, která jsou spolu s inervujícími senzoryckými a motorickými axony obklopena vícevrstevným pouzdem. Pouzdro vřeténka je připojeno na jednom konci ke šlaše svalu nebo ke stranám extrafuzálních vláken (Barret et al., 2019). U savčích nervosvalových vřetének existují 2 typy intrafuzálních svalových vláken. První typ obsahuje mnoho jader v rozšířené centrální části, a proto se označuje jako „nuclear bag“ vlákno. Obvykle jsou tato vlákna ve vřeténku dvě, jedno vlákno typu „nuclear bag₁“ s nízkou aktivitou myosinové ATPázy a jedno typu „nuclear bag₂“ vykazující vysokou aktivitu myosinové ATPázy. Druhý typ představuje vlákno tenčí a kratší, jehož jádra jsou uspořádána do longitudinálně orientovaného řetězce ve středu vlákna, a proto je nazýváno „nuclear chain“ vlákno (Barret et al., 2019). Koncové části intrafuzálních svalových vláken jsou kontraktilní, zatímco centrální oblasti pravděpodobně nejsou (Barret et al., 2019). V každém nervosvalovém vřeténku jsou 2 systémy senzitivních nervových

zakončení. Jako anulospirální nebo primární se označují zakončení rychle vedoucích aferentních nervových vláken typu Ia, která obtácejí ekvatoriální segmenty všech intrafuzálních vláken. Větvičkovitá nebo sekundární zakončení jsou pouze u vláken typu „nuclear chain“ a představují zakončení aferentních nervových vláken typu II. Na polárních segmentech intrafuzálních vláken končí motorickými ploténkami eferentní motorická vlákna γ motoneuronů míchy. Vícevrstevné pouzdro vřeténka se skládá z vnějšího pouzdra tvořeného lamelovitě uspořádanými oploštěnými buňkami, které jsou pokračováním perineuria nervu vřeténka, a z vnitřních kapsulárních buněk, což jsou fibroblasty obklopující jednotlivá intrafuzální vlákna. Pouzdro vřeténka se ve střední části rozšiřuje, čímž se vytváří kolem intrafuzálních vláken a nervových vláken periaxiální prostor, který je vyplněn vysoce viskózním gelem tvořeným především kyselinou hyaluronovou. Mezi buňkami vnějšího pouzdra jsou spojení typu *tight junction*, která tvoří bariéru pro difúzi látek do periaxiálního prostoru podobně jako perineurium v periferním nervu (Banks a Barker, 2004).

Intrafuzální svalová vlákna nervosvalových vřetének mají stejně jako extrafuzální vlákna při použití vhodného modelu schopnost regenerovat (Milburn, 1976; Rogers a Carlson, 1981; Rogers, 1982; Diwan a Milburn, 1986; Jirmanová a Soukup, 1995). Je nezbytné zmínit, že nervosvalová vřeténka jsou schopná regenerovat pouze tehdy, když není poškozeno jejich pouzdro. Při rozdrčení svalu jsou původní pouzdra vřetének zničena a v regenerovaném svalu nejsou poté žádná vřeténka nacházena (Zelená a Sobotková, 1971). Po svalové heterochronní isotransplantaci intrafuzální vlákna a jejich inervace podlehnou nekróze zároveň s extrafuzálními, avšak jejich pouzdro perzistuje. V zachovalém pouzdru a uvnitř původních bazálních lamin tvořících lešení intrafuzální svalová vlákna regenerují z intrafuzálních satelitových buněk, jež byly aktivovány během degenerace. Aktivované intrafuzální satelitové buňky se dělí a vznikající myoblasty vyplňují perzistující bazální laminy, fúzují za vzniku myotub, které poté vyzárají v intrafuzální svalová vlákna (Jirmanová a Soukup, 1995, 2001). Podobně jako u extrafuzálních svalových vláken regenerace intrafuzálních začíná na periférii transplantovaného svalu a postupuje dovnitř, společně s revaskularizací (Jirmanová a Soukup, 1995, 2001). Regenerovaná nervosvalová vřeténka se od intaktních liší v několika vlastnostech. Dosahují jen přibližně poloviční délky a jejich periaxiální prostor je redukován. Jirmanová a Soukup (1995) popsali přítomnost kapilár uvnitř regenerovaných vřetének, zatímco v normálních receptorech se kapiláry v periaxiálním prostoru nevyskytují. Intrafuzální vlákna regenerovaných vřetének mají často podobný průměr a obsahují jednotlivá, periferně nebo centrálně lokalizovaná malá jádra. Velká a kulatá jádra charakteristická pro vlákna typu

„nuclear bag“ nejsou obvykle přítomná (Jirmanová a Soukup, 1995). Intrafuzální vlákna štěpů totiž nejsou schopná diferencovat se ve specifické typy s charakteristickými morfológickými, histochemickými a imunocytochemickými znaky. Důvodem je chybějící inervace senzorigkými axony, protože intrafuzální vlákna regenerovaných vřetének jsou inervována pouze motorickými axony podobně jako vlákna extrafuzální (Jirmanová a Soukup, 1995, 2001, Soukup 1976, 1988; Soukup et al., 1990; Soukup a Thornell 1997; Soukup a Novotová 2000). Regenerovaná nervosvalová vřeténka ve štěpech po svalové transplantaci, při níž nebyla poškozena inervace (tzv. „nerve-intact grafting“), obsahují intrafuzální vlákna inervovaná senzorigkými i motorickými axony vykazující shodné charakteristiky jako intrafuzální vlákna v intaktních receptorech (Walro et al., 1989, 1991). V podstatě shodná situace je u modelu regenerace kosterního svalu navozené injekcí mytoxické látky, např. bupivakainu, kdy inervace zůstává taktéž intaktní (Milburn, 1976). Po heterochronní isotransplantaci až 93 % vláken v regenerovaných nervosvalových vřeténkách odpovídá podle svých histochemických a imunocytochemických charakteristik extrafuzálním vláknům typu 2B nebo 2A (Soukup a Thornell 1997). Intrafuzální satelitové buňky, bez ohledu na to, zda pocházejí z vláken typu „nuclear bag“ nebo „nuclear chain“, jsou tedy schopné diferencovat se ve vlákna s extrafuzálním fenotypem (Soukup a Novotová 2000). Intrafuzální satelitové buňky podobně jako extrafuzální exprimují transkripční faktor Pax7, ale vyskytují se ve vyšší frekvenci než extrafuzální (Kirkpatrick et al., 2008). Je to pravděpodobně dáno tím, že jsou relativně méně vyzrálé, o čemž svědčí také vyšší četnost intrafuzálních satelitových buněk exprimujících transkripční faktor Pax3, který se u extrafuzálních detekuje jen během vývoje a postnatálně pouze u jedné vzácné podskupiny (Kirkpatrick et al., 2008, 2010). Regulace regenerace intrafuzálních vláken v nervosvalových vřeténkách je tedy pravděpodobně do určité míry odlišná od regulace regenerace extrafuzálních vláken, ale bohužel jí není v poslední době věnována velká pozornost. Nervosvalová vřeténka jsou v současnosti nejvíce studována z pohledu patofyziologického a neurologického (Kröger, 2018). Zajímavé aktuální výsledky se týkají možností jejich senzorigké reinervace (Asano et al., 2019).

2.4. Intermediární filamentum nestin

Intermediární filamenta tvoří spolu s mikrotubuly a mikrofilamenty hlavní složky cytoskeletu buňky. Poslední dvě jmenované cytoskeletární součásti se vyskytují téměř ve všech buňkách, zatímco exprese intermediárních filament je mnohem dynamičtější. Dosud

bylo charakterizováno více než 50 typů intermediárních filament, jež se rozdělují do 6 tříd podle homologie sekvencí a struktury genu. Cytokeratiny vyskytující se především v epitelových buňkách tvoří třídu I a II; desmin, vimentin, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) a peripherin se řadí do třídy III; třída IV zahrnuje neurofilamenta, α -internexin, syncoilin, synemin a paranemin a třída V obsahuje nukleární laminy. Nestin reprezentuje třídu VI a patří ke stejné vývojové větvi jako neurofilamenta a α -internexin (Goldman et al., 1999; Helfand et al., 2004). Podle aktuálních poznatků dochází v této zavedené klasifikaci postupně k určitým změnám. Syncoilin je přeřazen do třídy III a nestin je považován za intermediární filamentum třídy IV. Třída VI zahrnuje phakinin a filensin, proteiny vyskytující se v oční čočce (Hermann a Aebi, 2016; Cheng a Eriksson, 2017). Průběžné změny v klasifikaci intermediární filament bohužel zapříčiňují její nejednotnost v současné literatuře. Intermediární filamenta obvykle tvoří cytoplazmatickou síť obklopující jádro, odkud dosahují až k periférii buňky, kde jsou často zakotvena do plazmatické membrány v místech mezibuněčných spojů, např. typu desmozomu. Intermediární filamenta jsou velmi pevná v tahu a tím umožňují buňkám vydržet mechanický stres, k němuž dochází při jejich natažení. Jsou taktéž nejodolnější ze všech tří typů cytoskeletárních součástí, přičemž prakticky jako jediné cytoskeletární struktury přežívají působení koncentrovaných roztoků solí a silných neiontových detergentů (Alberts et al., 2015; Mescher a Junqueira, 2018). V současné době se již opustil názor, že jsou intermediární filamenta statickou součástí buněčného cytoskeletu. Mnoho studií využívajících různé typy živých buněk prokazuje, že intermediární filamenta a jejich prekurzory jsou značně dynamické a vykazují širokou škálu pohybových aktivit souvisejících s jejich subcelulární organizací (Goldman et al., 1999; Helfand et al., 2004; Hermann a Aebi, 2016; Cheng a Eriksson, 2017).

Protein nestin představuje svými vlastnostmi unikátní intermediární filamentum. Poprvé byl popsán roku 1985 v neuroepitelových kmenových buňkách, přičemž jeho název vznikl jako akronym od NEuroepithelial STem cell proteIN (Hockfield and McKay, 1985; Lendahl et al., 1990). Nestin se obecně považuje za marker kmenových nebo progenitorových buněk izolovaných např. z mozku, kostní dřeně, kůže nebo střeva, nicméně se neexprimuje ve všech kmenových nebo progenitorových buňkách a detekuje se také v dalších nezralých elementech např. nervové nebo svalové tkáni. Za fyziologických podmínek je nestin přítomný v některých typech buněk jen v časově omezeném období během vývoje. Při embryogenezi se tento protein exprimuje v migrujících a proliferujících buňkách. Později během buněčné diferenciace je nahrazen jiným tkáňově nebo orgánově specifickým intermediárním filamentem. V dospělých tkáních a orgánech ho lze identifikovat v situacích, kdy dochází k opakování vývojových fází,

jako je např. fyziologická obměna některých typů buněk, tkáňová regenerace a hojení, revaskularizace, produkce nediferencovaných elementů v nádorech vznikajících z buněk, které exprimovaly nestin během svého vývoje. Nestin není sám schopen tvořit filamenta pravděpodobně kvůli velmi krátkému N-konci, který je k tomu nezbytný. Přítomnost jiného intermediárního filamenta, zvláště ze třídy III a IV, je tedy nutná ke vzniku heterodimerů nebo smíšených polymerů (Marvin et al., 1998; Eliasson et al., 1999; Steinert et al., 1999; Wiese et al., 2004). Funkce nestinu nebyla dosud přesně určena a je stále intenzivně studována (Michalchuk a Ziman, 2005; Lindqvist et al., 2016; Bernal a Arranz, 2018). Spolu s dalšími strukturálními proteiny hraje pravděpodobně komplexní roli při morfologických změnách provázejících buněčné dělení a migraci, kdy se strukturální složky potřebují rozložit a znovu sestavit přesně prostorově i časově regulovaným způsobem. Funkce nestinu při remodelaci buňky se řídí jeho fosforylací, přičemž nízké hladiny fosforylace jsou spjaty se sestavováním intermediárních filament (Ku et al., 1996; Sahlgren et al., 2001, 2003). Dále nestin může hrát roli při propojení tří složek cytoskeletu – mikrotubulů, mikrofilament a intermediárních filament (Herrmann and Aebi, 2016) a jeho exprese souvisí se zvýšeným cytoplazmatickým transportem během buněčného dělení, kdy se složky cytoskeletu a dalších buněčných organel musí asymetricky rozdělit do dceřiných buněk (Frederiksen and McKay, 1988; Chou et al., 2003). Funkci nestinu lze studovat na myších modelech s cíleně inaktivovaným („knock out“) genem pro nestin. Deficit nestinu vedl u modelu vytvořeného Park et al. (2010) k embryonální letalitě po embryonálním dni 8,5 způsobené masivní apoptózou buněk neurální trubice a experimenty *in vitro* potvrdily klíčovou roli nestinu v přežívání a sebeobnově neurálních kmenových buněk. Překvapivě autoři nenašli žádné zjevné abnormality v tkáních a orgánech, kde se nestin také vyskytuje, ani změny v integritě cytoskeletu neurálních kmenových buněk (Park et al., 2010; Bernal a Arranz, 2018). U jiného modelu zavedeného Mohseni et al., (2011) jsou *Nestin*^{-/-} myši viabilní a vykazují normální vývoj centrálního nervového systému, ale zhoršenou motorickou koordinaci, jež je způsobena abnormalitami v rozptýlení klastrů receptorů pro acetylcholin v motorických ploténkách (Bernal a Arranz, 2018). Nicméně tyto práce se nezabývaly funkcí nestinu v dalších tkáních a orgánech, kde se tento protein také vyskytuje. Během embryonálního a fetálního vývoje byla jeho přítomnost potvrzena v nervovém systému kromě výše zmíněných neurálních kmenových buněk v buňkách neurální lišty, v radiálních gliích a ve Schwannových buňkách (Hockfield and McKay, 1985; Frederiksen a McKay, 1988; Friedman et al. 1990). Dále se nestin nachází v presomitickém mezodermu (Zimmerman et al., 1994), mesonefrickém mezenchymu (Fröjdman et al. 1997), vyvíjejících se kardiomyocytech (Kachinski et al., 1995), endotelu vyvíjejících se krevních cév

(Mokrý a Němeček, 1998a; Mokrý et al., 2004), ve vyzářajících zubech (Terling et al., 1995), buňkách čočky během vývoje oka (Mokrý a Němeček, 1998b; Yang et al., 2000) a diferencujících se podocytech ledviny (Bertelli et al., 2007) atd. V dospělých tkáních se nestin exprimuje např. v satelitových buňkách ganglií míšních dorzálních kořenů (Hockfield and McKay, 1985), ve Schwannových buňkách (Hockfield and McKay, 1985; Friedman et al. 1990), v několika definovaných buněčných typech v mozku (Wiese et al., 2004), v sítnici (Mayer et al., 2003), v progenitorových buňkách vlasových folikulů (Li et al., 2003), v odontoblastech (Terling et al., 1995), v podocytech ledviny (Bertelli et al., 2007). Nestin se exprimuje také v buňkách mnoha maligních nádorů především neurogenního původu, např. v meduloblastomech, gliomech nebo glioblastomech, ale i v buňkách nádorů mezenchymového původu jako jsou rhabdomyosarkomy nebo osteosarkomy, nebo překvapivě i v buňkách nádorů epitelového původu např. v karcinomech ovarií nebo prsu (Neradil a Veselská, 2015). U některých typů nádorů jeho zvýšená exprese koreluje se stupněm nádoru, indikuje invazivní fenotyp transformovaných buněk, a tudíž horší prognózu pacienta (Kolář et al., 2007; Neradil a Veselska, 2015). V současné době se intenzivně studuje role nestinu jakožto markeru nádorových kmenových buněk (Neradil a Veselská, 2015).

2.4.1. Intermediární filamentum nestin v kosterním svalu

Poprvé byl nestin detekován v elementech svalové tkáně HockfielDEM a McKayem (1985) a Sejersenem a Lendahlem (1993), a to v mnohojaderných myotubách potkaních svalů v 13. a 15. dni embryonálního vývoje a ve 2. týdnu postnatálně. Výskytem nestinu během vývoje se zabývali Kachinski et al. (1994). Tento protein identifikovali již v raných vývojových stádiích, a to v buňkách myotomů myších somitů a také v kultivovaných embryonálních, fetálních a neonatálních myších myoblastech. V myoblastech nestin kopolymerizuje s vimentinem, intermediárním filamentem typickým pro mezenchymovou tkáň (Franke et al., 1978), přičemž během následné diferenciaci vimentin postupně úplně vymizí (Fürst et al., 1989; Barbet et al., 1991; Sejersen a Lendahl, 1993). Ve vyzářajících myotubách nestin tvoří filamenta spolu s desminem, hlavním intermediárním filamentem dospělých kosterních svalových vláken (Sejersen a Lendahl, 1993). Ve zralých svalových vláknech je nestin přítomný v omezeném množství jen v sarkoplazmě motorických plotének a myotendinózních spojení (Carlsson et al., 1999; Vaittinen et al., 1999). Nestin se analogicky vyskytuje v myoblastech

a myotubách během regenerace dospělého kosterního svalu, kde spoluvytváří filamenta s vimentinem a později s desminem (Vaittinen et al., 2001).

Pallari et al. (2011) doložili participaci nestinu na regulaci diferenciaci myogenních progenitorových buněk, myoblastů, přičemž jeho „downregulace“ v těchto buňkách zvyšovala míru jejich diferenciaci přes ovlivnění cyklin-dependentní kinázy 5 (Cdk5). Studie využívající myši s inaktivovaným genem pro nestin potvrdily důležitou roli nestinu při vývoji a udržování morfologicky i funkčně normálních motorických plotének, a to opět přes regulaci Cdk5 (Mohseni et al., 2011; Lindquist et al., 2017). Linqvist et al. (2017) využili tento model *Nestin*^{-/-} myši ke studiu funkcí nestinu v průběhu regenerace kosterního svalu. Zajímavé výsledky vzešly již z charakterizace kosterních svalů těchto myši. *Nestin*^{-/-} myši vykazovaly signifikantně snížené množství svalové hmoty oproti kontrolním geneticky nemodifikovaným myším, přičemž jednotlivé svaly, např. *m. extensor digitorum longus* a *m. tibialis anterior*, byly významně lehčí oproti svalům kontrolních myši. Při histologické analýze bylo zjištěno, že počet svalových vláken s centrálně uloženými jádry, jež se považují za standardní marker regenerujících svalů, byl vyšší u *Nestin*^{-/-} myši oproti kontrolním. Z tohoto nálezu vyplývá, že u těchto myši postrádajících funkční gen pro nestin dochází ke spontánní regeneraci kosterních svalů. Po navození poranění kosterního svalu *Nestin*^{-/-} myši jeho naříznutím regenerace proběhla, ale se signifikantním zpožděním. Satelitové buňky začaly proliferovat později, což je pravděpodobně spjato s deregulací Cdk5 (Linqvist et al. 2017).

Nestin byl také identifikován v buňkách a vláknech kosterní svaloviny u některých patologických stavů. Sjöberg et al., (1994) popsali imunopozitivitu nestinu v bazofilních svalových vláknech o malém průměru s jádry uloženými centrálně ve svalech pacientů s Duchenneovou/Beckerovou svalovou dystrofií a s myositidou, kde průkaz tohoto proteinu doložil proces regenerace postižených svalů. Fröhlich et al. (2016) zavedli prasečí model Duchenneovy svalové dystrofie a u 3měsíčních zvířat zaznamenali zvýšenou hladinu nestinu oproti zdravým kontrolním prasatům. Jak bylo zmíněno výše, nestin se exprimuje také v buňkách rbdomyosarkomů (Kobayashi et al., 1998).

2.5. Kostní dřev a její vztah k regeneraci kosterního svalu

Kostní dřev představuje jedinečnou heterogenní buněčnou populaci zahrnující mnoho typů buněk v různých stádiích vývoje včetně hematopoetických kmenových buněk (HKB) a jejich potomstva, multipotentních mezenchymových stromálních buněk (MMSB; také

označovaných jako mezenchymové kmenové buňky nebo stromální kmenové buňky kostní dřeně) a endotelových progenitorů. Od HKB jsou odvozené společné lymfoidní progenitory diferencující se v B a T lymfocyty a společné myeloidní progenitory, z nichž vznikají granulocyty, monocyty, erytrocyty a megakaryocyty rozpadající se v trombocyty. Tyto buňky cirkulují v krvi, ale lymfocyty, granulocyty a monocyty jsou schopné migrovat do vazivové tkáně, kde plní důležité funkce imunitního systému, např. B lymfocyty se diferencují v plazmatické buňky produkující protilátky a monocyty se mění v makrofágy schopné fagocytózy, sekrece cytokinů a prezentace antigenů dalším imunitním buňkám. Zajímavé je, že žírné buňky, osteoklasty a dendritické buňky také pocházejí z HKB. Zmíněné buňky imunitního systému odvozené od HKB jsou důležitými buněčnými komponentami niche satelitových buněk kosterního svalu. Za klidových podmínek se zde nejčastěji vyskytují žírné buňky a makrofágy, ale po poranění svalu jsou v časných fázích nejpočetnější granulocyty, především neutrofilů (Chazaud et al., 2003; Dumont a Frenette, 2010; Bentzinger et al., 2013). HKB a buňky od nich odvozené přispívají k regeneraci kosterního svalu. Poprvé tento zajímavý fenomén popsali Ferrari et al. (1998) na myším modelu regenerace kosterního svalu navozené injekcí kardiotoxinu. Po subletálním celotělovém ozáření příjemců jim byly intravenózně transplantovány *lacZ*⁺ BKD a po 5 týdnech indukováno poranění kosterního svalu. β -gal⁺ jádra pocházející z transplantovaných *lacZ*⁺ BKD identifikovali v novotvořených nezralých vláknech s centrálně uloženými jádry, ve více zralých svalových vláknech s jádry v subsarkolemální pozici a v jednojaderných buňkách infiltrujících oblast poranění. Tyto výsledky byly inspirací pro mnoho vědeckých týmů, které se tomuto fenoménu začaly intenzivně věnovat. Gussoni et al. (1999) intravenózně transplantovali neseparované BKD letálně ozářeným *mdx* myším, které představují model Duchenneovy svalové dystrofie, a zaznamenali inkorporaci jader pocházejících od dárce do svalu a překvapivě také částečné obnovení exprese dystrofinu v postižených svalech. Obnovení nebo zvýšení exprese dystrofinu po transplantaci BKD nebo HKB u *mdx* myši nebo u psího modelu Duchenneovy svalové dystrofie se však nepodařilo v pozdějších studiích potvrdit (Ferrari et al., 2001; Kuhr et al., 2007). Po transplantaci dokonce jediné HKB bylo její potomstvo detekováno ve svalových vláknech po regeneraci (Camargo et al., 2003; Corbel et al., 2003). Camargo et al. (2003) prokázali, že cirkulující myeloidní buňky odvozené od CD45⁺ HKB přispívají do svalu tak, že během regenerace fúzí s novotvořenými svalovými vlákny. Doyonnas et al. (2004) potvrdili, že tato schopnost se týká výlučně c-kit⁺ nezralých myelomonocytárních prekurzorů, které transplantovali intramuskulární injekcí. Zralé potomstvo myelomonocytárních prekurzorů představující CD11b⁺ makrofágy tuto schopnost nevykazovalo, přestože tyto buňky přirozeně fúzí. Abedi et al., (2005, 2007) popsali vztahy

mezi dávkou ozáření, dávkou a typem transplantovaných buněk a načasováním indukce regenerace kosterního svalu. Všechny tyto faktory ovlivňují výsledky experimentů zaměřených na studium účasti BKD na svalové regeneraci, čímž je vysvětlena mírná nejednotnost závěrů publikovaných prací věnujících se této problematice. Také jednotlivé kosterní svaly se ve schopnosti inkorporovat buňky odvozené od BKD liší (Brazelton et al., 2003). Podíl buněk pocházejících z HKB na regeneraci kosterního svalu se zvyšuje při poranění svalu, nicméně je zaznamenán i při fyziologické odpovědi na stres. Palermo et al. (2005) použili k identifikaci BKD metodu tzv. parabioticky spojených párů geneticky značených a neznačených myší, díky které doložili, že transplantace BKD spojená s ozářením, injekcí BKD do cirkulace a imunologickou reakcí není nezbytná pro schopnost buněk odvozených od BKD přispět k regeneraci svalových vláken, kterou indukovali intenzivním fyzickým cvičením. Přestože Sacco et al. (2005) prokázali při *in vitro* experimentech, že IGF-1 zvyšuje až čtyřikrát schopnost myelomonocytárních prekurzorů fúzovat se svalovými myotubami, množství novotvořených svalových vláken, u kterých byl prokázán podíl buněk odvozených od HKB při jejich vzniku *in vivo*, je stále velmi nízké, pohybuje se v řádek desetin procenta, a pravděpodobně ani špičkovým týmům se nedaří ho zvýšit. Dokladem je minimální množství prací publikovaných v posledních letech týkajících se účasti HKB na regeneraci kosterního svalu.

Multipotentní mezenchymové stromální buňky (MMSB) jsou multipotentní dospělé kmenové buňky původně izolované z kostní dřene (Friedenstein et al., 1966; Tavassoli a Friedenstein, 1983; Caplan, 1991), ale mohou být získány také z dalších tkání jako je tuková tkáň nebo pupečník (Bianco a Gehron Robey, 2000; Ankrum et al., 2014). Jsou schopné diferencovat se *in vitro* v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty, což se považuje za minimální kritérium pro jejich definici (Dominici et al., 2006), ale také v další buňky mezenchymového původu, např. fibroblasty (Bianco a Gehron Robey, 2000; Ankrum et al., 2014). Wakitani et al., (1995) indukovali *in vitro* pomocí 5-azacytidinu diferenciaci potkaních mezenchymových kmenových buněk odvozených z BKD v mnohojaderné myotuby exprimující myosin charakteristický pro kosterní sval. MMSB jsou intenzivně studovány *in vitro*, ale jejich vlastnosti charakteristické pro kmenové buňky musejí být v živých organismech *in vivo* ještě potvrzeny. Dezawa et al., (2005) zavedli metodu indukce myogenních buněk z adherovaných MMSB *in vitro*, které se po transplantaci diferencovaly ve svalová vlákna v degenerovaných svalech nebo ve svalech *mdx* myší. Nicméně podle současných znalostí nebyla schopnost MMSB se za normálních podmínek v dospělém organismu přímo diferencovat v myoblasty dosud zdokumentována (Galli et al., 2014).

Endotelové progenitory představují skupinu různých buněčných typů, které přispívají k tvorbě endotelových buněk *in vitro* a k postnatální neovaskularizaci *in vivo*, poprvé izolované z dospělé periferní krve (Asahara et al., 1997). HKB a jejich potomstvo, MMSB i vaskulární buňky z kostní dřeně mohou být zdrojem endotelových progenitorů (Chao a Hirschi, 2010).

V kostní dřeni se také nacházejí buňky související s cévním systémem, např. pericyty nebo mesangioblasty, jejichž potenciál podílet se na regeneraci kosterní svaloviny se intenzivně studuje (Yin et al., 2013; Mangialardi et al., 2016; Rotini et al., 2018; Gautam et al., 2019).

2.6. Niche satelitových buněk v kosterním svalu

Termín niche (z francouzštiny výklenek, okénko) znamená specializované lokální mikroprostředí tvořené buněčnými a nebuněčnými složkami, ve kterém se nacházejí kmenové buňky. Hraje klíčovou roli při udržování kmenových buněk v nediferencovaném stavu, jejich sebeobnově a produkci diferencovaného potomstva, tj. při určujících vlastnostech kmenových buněk. Složení niche se dynamicky mění během různých procesů jako jsou vývoj, regenerace, stárnutí, tumorigeneze a další patologické okolnosti a je ovlivňováno exogenními faktory (Ohlstein et al., 2004). V různých tkáních a orgánech mají niche odlišné složení a vlastnosti. Niche je charakterizováno např. v kostní dřeni (Wilson a Trumpp, 2006; Beerman et al., 2017), v mozku (Ma et al., 2009) v játrech (Zhang et al., 2008; Chen et al., 2017), ve střevě, srdci, bílé tukové tkáni a kůži (Yin et al., 2013).

Dospělé kmenové buňky kosterního svalu, satelitové buňky, se nacházejí na povrchu svalových vláken, mezi plazmatickou membránou a bazální laminou (Mauro, 1961). Svalová vlákna jsou obklopena řídkým kolagenním vazivem zvaným endomysium, které je tvořené fibroblasty, fibrocyty, buňkami imunitního systému schopnými vystoupit z krevního řečiště do tkáně, kolagenními vlákny a složkami základní amorfní hmoty a obsahuje krevní a lymfatické cévy a periferní nervy. Buněčné komponenty unikátního niche satelitových buněk zahrnují myogenní elementy v různých vývojových fázích, buňky imunitního systému, vazivové tkáně a vaskulárního systému. Mezi extracelulární komponenty, kterým je v současné literatuře věnována největší pozornost patří fibronectin, laminin a kolagen (Bentzinger et al., 2013; Yin et al., 2013; Mashinchian et al., 2018). Složení a vlastnosti niche satelitových buněk se liší v různých obdobích života a při různých procesech a souvisí s funkčním stavem satelitových buněk. Po narození, kdy kosterní svaly intenzivně rostou, lze definovat niche perinatální. Satelitové buňky v tomto období prolifерují a tvoří až 30 %

sublaminárních jader. Syntetizují velké množství kolagenu IV, čímž se odlišují od satelitových buněk aktivovaných v úvodních fázích regenerace, které tento protein do svého niche neukládají. Fibronektin tvoří jak perinatálně, tak ve fázi aktivace, ale velmi málo v klidové fázi. Z buněčných komponent jsou v perinatálním niche přítomny např. PW1+ intersticiální buňky exprimující Sca-1, fibroblasty a buňky tvořící krevní cévy, tj. endotelové buňky a jejich progenitory, buňky hladké svaloviny a pericyty (Yin et al., 2013; Mashinchian et al., 2018). V dospělosti se satelitové buňky nacházejí v klidovém stavu, který je charakteristický jejich nízkou metabolickou aktivitou a mitotickou inaktivitou. Jejich počet je stabilní, přičemž představují zhruba 5 – 10 % sublaminárních jader (Relaix a Zammit, 2012). Klidové niche zahrnuje komponenty bazální laminy, která satelitové buňky bezprostředně obklopuje, např. laminin a kolagen IV. Plazmatická membrána svalových vláken představuje další klíčovou složku niche, s níž satelitové buňky komunikují prostřednictvím M-cadherinu. Součástí niche udržují satelitové buňky dospělého kosterního svalu v klidovém stavu, přičemž se významně uplatňují kromě intaktních svalových vláken také buňky tvořící krevní cévy (Yin et al., 2013; Mashinchian et al., 2018). V průběhu regenerace kosterní svaloviny se složení a vlastnosti regeneračního niche satelitových buněk velmi dynamicky mění, přičemž všechny komponenty se společně podílejí na regulaci aktivace, proliferace, sebeobnovy, diferenciaci a znovunabytí klidového stavu satelitových buněk, což je v současné době extenzivně studováno. Podle fáze regenerace lze rozlišit několik odlišných niche. Zánětlivé niche, kde hrají klíčovou roli buňky imunitního systému, vzniká velmi časně po poranění svalu. Pro mitogenní niche je charakteristická proliferace satelitových buněk a z nich vznikajících myoblastů, ale i dalších podpůrných buněk, např. fibroblastů nebo fibroadipogenních progenitorů. Je také zvýšená produkce proteinů extracelulární hmoty, především fibronektinu a kolagenu IV. Během existence diferenciačního niche dochází fúzi myoblastů k tvorbě nových mnohojaderných svalových vláken a satelitové buňky, které jsou určeny pro udržení poolu těchto kmenových buněk, přecházejí zpět do klidového stavu. Analogicky k mechanismu, který podporuje přechod satelitových buněk do klidového stavu během postnatálního vývoje, aktivace receptoru Tie2 na satelitových buňkách angiotensinem 1 produkovaným pericyty navodí ukončení jejich buněčného cyklu (Yin et al., 2013; Mashinchian et al., 2018). Stárnutí a degenerativní onemocnění kosterních svalů představují vysoce komplexní procesy, které vedou k multifaktoriálním defektům v niche satelitových buněk. Naopak mírná, avšak konstantní fyzická aktivita má velmi pozitivní vliv. Důležitým mechanismem je ovlivnění vaskulatury, protože při cvičení dochází k uvolnění oxidu dusnatého a proangiogenních faktorů jako je

VEGF, který přímo reguluje funkci satelitových buněk. Bylo také prokázáno, že fyzická aktivita koreluje se sníženou úrovní proinflamatorních markerů, stabilizuje ve svalu redoxní systém a indukuje remodelaci extracelulární matrix ve smyslu zachování elasticity svalu, která kriticky ovlivňuje funkci satelitových buněk (Mashinchian et al., 2018).

3. CÍLE

Tato práce zaměřená na studium experimentální regenerace kosterního svalu sleduje několik cílů. První souhrnný cíl spočívá v zavedení několika nových metod. Jedná se o metody v rámci práce s laboratorními zvířaty, a to metodu indukce regenerace kosterního svalu myši poraněním intramuskulární injekcí kardiotoxinu a metodu odběru myších buněk kostní dřene od dárců, přípravu suspenze těchto buněk a její intravenózní transplantaci celotělově letálně ozářeným příjemcům. Dále jde o metodu imunohistochemickou v rámci transmisní elektronové mikroskope, a to imunohistochemickou detekci antigenů na ultratenkých tkáňových řezech a s tím související metodu zalévání tkání do akrylátové pryskyřice LR White. Nezbytná je také optimalizace již zavedených metod histologického zpracování tkání a imunohistochemických pro konkrétní potřeby prováděných studií.

Cíle vlastní experimentální práce sestávaly z několika dílčích:

- imunohistochemicky detekovat unikátní intermediární filamentum nestin a s ním kopolymerující intermediární filamenta desmin a vimentin v intaktním a regenerujícím kosterním svalu zadní končetiny potkana a získané výsledky vyhodnotit komplexně, tzn. popsat expresi nestinu, desminu a vimentinu nejen ve svalových buňkách a vláknech, ale také v dalších komponentách svalové tkáně jako jsou krevní cévy, periferní nervy a endomysium, s cílem posoudit, zda lze nestin považovat za marker regenerace kosterního svalu
- imunohistochemicky detekovat intermediární filamenta nestin, desmin a vimentin v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách kosterního svalu zadní končetiny potkana a získané výsledky vyhodnotit opět z komplexního pohledu, tzn. popsat expresi nestinu, desminu a vimentinu nejen v intrafuzálních svalových buňkách a vláknech, ale také v dalších součástech těchto receptorů jako jsou pouzdra a inervace, s cílem posoudit, zda nestin představuje také marker regenerace nervosvalových vřetének
- intravenózně transplantovat myši *lacZ*⁺ neseparované BKD celotělově letálně ozářeným imunokompetentním myším 7 hodin po poranění kosterního svalu *m. tibialis ant.* příjemců injekcí kardiotoxinu s cílem zhodnotit úlohu transplantovaných BKD při reakci kosterního svalu příjemců na poranění

- intravenózně transplantovat myši GFP⁺ neseparované BKD celotělově letálně ozářeným imunokompetentním myším 4 týdny před poraněním kosterního svalu *m. tibialis ant.* příjemců injekcí kardiotoxinu s cílem pomocí přímé fluorescence GFP a imunohistochemické detekce proteinu GFP na odparafinovaných řezech a na ultratenkých řezech pro transmisní elektronovou mikroskopii identifikovat buněčné typy pocházející z BKD vyskytující se v niche satelitových buněk intaktního a regenerujícího kosterního svalu

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Roztoky, pufry a fixativa

PBS pufr (fyziologický roztok pufrovaný fosfáty), pH 7,4

8 g NaCl, 7,164 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄ a 0,2 g KCl je rozpuštěno v 1000 ml destilované nebo deionizované vody.

0,1 M PB pufr (fosfátový pufr, Sørensenův), pH 7,4

Rozpuštěním 71,64 g Na₂HPO₄·12 H₂O v 1 000 ml destilované nebo deionizované vody připravíme 0,2 M roztok. Rozpuštěním 31,21 g NaH₂PO₄·2 H₂O v 1 000 ml destilované nebo deionizované vody připravíme 0,2 M roztok. Smícháním 36 ml 0,2 M Na₂HPO₄ a 14 ml 0,2 M NaH₂PO₄ a doplněním do 100 ml destilované nebo deionizované vody získáme 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4.

10% formalín

100 ml 36% - 38% formaldehydu se doplní do 1 000 ml pramenitou vodou a naleje do lahve na vrstvu plavené křídly.

4% paraformaldehyd v PBS pufru

4 g paraformaldehydu jsou rozpuštěny ve 100 ml PBS pufru zahřátého na 60 °C. Roztok se projasní přidáním několika kapek 1 M NaOH a přefiltruje.

4% paraformaldehyd v 0,1 M PB pufru

4 g paraformaldehydu je rozpuštěno v 50 ml destilované nebo deionizované vody zahřáté na 60 °C. Roztok se projasní přidáním několika kapek 1M NaOH a přefiltruje. Po vychladnutí 4% paraformaldehydu přidáme stejné množství, tj. 50 ml, 0,2 M PB pufru.

3% paraformaldehyd a 0,05% glutaraldehyd v 0,1 M PB (Sørensenově) pufru

3 g paraformaldehydu je rozpuštěno v 50 ml destilované nebo deionizované vody zahřáté na 60 °C. Roztok se projasní přidáním několika kapek 1M NaOH a přefiltruje. Po vychladnutí 3% paraformaldehydu přidáme 200 µl 25% glutaraldehydu. Ke vzniklému roztoku přidáme stejné množství, tj. 50 ml, 0,2 M PB pufru.

4.2. Laboratorní zvířata

K experimentům prováděným v rámci studia intermediárního filamenta nestinu jsme použili samice laboratorního potkana kmene Lewis dodávané autorizovanou laboratoří pro inbrední chov vivária Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (AV ČR), kde byly pokusy také uskutečněny po schválení Etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR.

K transplantačním experimentům jsme použili jako dárce myši kmene B6;129S-Gt(ROSA)26Sor a jako příjemce myši kmene B6;129SF2/J (F2 hybridy) zakoupené od firmy Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Později jako dárci sloužily myši kmene C57Bl6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131-Osb zakoupené od firmy Riken Laboratories (Saitama, Japonsko) a jako kompatibilní příjemci myši kmene C57Bl/6 zakoupené od vivária Masarykova Univerzity (Brno, Česká republika). Transplantační experimenty byly provedeny ve viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy po schválení tamní Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat.

Potkani i myši byli během experimentů chováni v místnostech s kontrolovanou teplotou, vlhkostí a 12tíhodinovým cyklem světla a tmy v klecích po 2 až 6 zvířatech s volným přístupem k potravě i tekutinám. Potkani byli utraceni předávkováním anestetiky a myši inhalací CO₂ a následným vykrvácením.

4.3. Chirurgické techniky

4.3.1. Heterochronní isotransplantace kosterního svalu

Při heterochronní isotransplantaci jsme transplantovali buď *m. extensor digitorum longus* nebo *m. soleus* 15tídených potkanů do *m. extensor digitorum longus* 2 až 3měsíčních inbredních jedinců. Zvířatům byla navozena celková anestézie pomocí intraperitoneální injekce

Nembutalu (sodium pentobarbital 40 mg/kg i.p.; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) a operace byla provedena za aseptických podmínek. Vyjmutý sval byl proplachován 15 až 20 min. v 0,5% roztoku Marcainu (AstraZeneca, Velká Británie). Poté byla proximální šlacha transplantovaného svalu podvázána hedvábným vláknem spojeným s jemnou atraumatickou jehlou a zatáhnutá distoproximálně přes odhalený *m. extensor digitorum longus* příjemce. Ligovaný konec transplantovaného svalu, který se objevil na povrchu *m. extensor digitorum longus* příjemce, byl přišit ke svalové tkáni na proximálním konci svalu příjemce a distální šlacha transplantátu byla připevněna ke svalové tkáni na distálním konci svalu příjemce. Po transplantaci byla přetáta šlacha *m. tibialis ant.* příjemce přišita do místa svého úponu a kůže příjemce také zašita.

4.3.2. Experimentální poranění kosterního svalu

Experimentální poranění kosterního svalu bylo provedeno u myší příjemců v rámci transplantací buněk kostní dřeně. Poranění bylo indukováno injekcí 75 μ l roztoku kardiotoxinu (z kobry *Naja mossambica mossambica*; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; ředění 0,06 μ g/ μ l v 0,9% roztoku NaCl) do pravého *m. tibialis ant.* v celkové anestézii navozené intraperitoneální injekcí ketaminu (100 mg/kg; Narkamon 5%, Spofa, Praha, Česká republika) a xylazinu (10 mg/kg; Rometar 2%; Spofa, Praha, Česká republika). Krátký řez kůže nad *m. tibialis ant.* umožnil přesnou aplikaci roztoku kardiotoxinu podél longitudinální osy svalu od kotníku ke kolenu pomocí jehly (Sterican® 0,40 x 20 mm, B/Braun, Melsungen, Německo) a 1 mililitrové stříkačky (Omnifix®-F, B/Braun, Melsungen, Německo). Po intramuskulární injekci byl řez kůže sešit sterilním vláknem Premilene nebo Dafilon® (B/Braun, Tuttlingen, Německo). Všechny chirurgické postupy byly provedeny za aseptických podmínek.

4.4. Transplantace buněk kostní dřeně

Kostní dřeň byla odebrána od 8 až 10títýdenních myší dárců kmene B6;129S-Gt(ROSA)26Sor (ROSA 26) nebo kmene C57Bl6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131-Osb. Jednobuněčná suspence byla připravena z kostní dřeně femurů v PBS pufru obsahujícím 2 % fetálního telecího séra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Myši příjemci, 8 až 10títýdenní myši kmene B6;129SF2/J (F2 hybridy) nebo C57Bl/6 byli vystaveni γ záření o dávce 9 Gy z ^{60}Co zářiče (Chisotron, Chirana, Česká republika). Po 3 hodinách

po celotělovém ozáření byla příjemcům intravenózně do ocasní žíly transplantována suspenze neseparovaných čerstvě izolovaných buněk kostní dřeně o dávce 5×10^6 buněk/myš.

4.5. Histologické zpracování tkání pro světelnou mikroskopii

4.5.1. Zhotovení parafinových řezů

Fixace tkání byla provedena nejprve perfúzí 10% neutrálním formalínem u potkanů nebo 4% paraformaldehydem v 0,1M PB pufru (před histochemickou detekcí β galaktosidázy) nebo 4% paraformaldehydem v PBS pufru u myši. Po odběru regenerujících a kontralaterálních intaktních kosterních svalů následovalo dofixování imerzí v 10% formalínu 72 h nebo v 4% paraformaldehydu v PBS pufru 48 h při pokojové teplotě. Tkáň byla poté dehydratována vzestupnou alkoholovou řadou, převedena do xylenu a zalita do parafínu. Z parafinových bločků byly nakrájeny sériové řezy o tloušťce 5 – 7 μm . Řezy se k podložnímu sklu lepily pomocí kamencové želatiny. Každý 10. sériový řez byl po odparafinování a zavodnění rutinně obarvený hematoxylinem a eozinem. Na ostatních řezech byly provedeny imunohistochemické detekce. Obarvené řezy byly opět dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou a montovány do DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.5.2. Zhotovení kryořezů

Myší svaly, které byly určeny pro zhotovení kryořezů, byly fixovány perfúzí a poté imerzí v 4% paraformaldehydu v PBS pufru 24 h při 4°C. Po oplachu následovalo vložení tkáně do 10% sacharózy v PBS pufru na 4 h a potom do 30% sacharózy v PBS pufru přes noc při 4 °C. Svaly prosycené sacharózou byly zality do zalévacího media OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Radnor, PA, USA) a rychle zmrazeny ponořením do isopentanu vychlazeného kapalným dusíkem. Ze zmražených bločků byly na kryostatu (Leica Biosystems, Nussloch, Německo) krájeny kryořezy o tloušťce 10 μm , které se nanášely na podložní skla StarFrost® (Waldemar Knittel, Braunschweig, Německo) nebo SuperFrost® Plus (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Německo).

4.5.3. Zhotovení řezů tkání zalitých do pryskyřice glykolmetakrylát (GMA)

Do pryskyřice glykolmethakrylát byly zalévány myší svaly fixované perfúzí a imerzí 4% paraformaldehydem v 0,1M PB pufru po histochemické detekci β galaktosidázy (viz níže). Tkáně byly odvodněny absolutním acetonem a zality do pryskyřice glykolmethakrylát, která polymerizovala přes noc při 4 °C. Řezy silné 1 – 2 μ m se krájely na ultramikrotomu Ultrotome Nova (LKB, Broma, Švédsko) a přischlé na podložním skle se dobarvily jádrovou červení.

4.6. Histologické zpracování tkání pro transmisní elektronovou mikroskopii

K fixaci svalů, které byly určeny k vyšetření jejich ultrastruktury v transmisním elektronovém mikroskopu, byl použit 3% paraformaldehyd a 0,05% glutaraldehyd v 0,1 M fosfátovém Sørensenově pufru (pH 7,2 – 7,4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nejprve byla provedena perfúze fixativem a po excizi pravého poraněného a levého intaktního m. tibialis ant. a jejich přikrojení na malé tkáňové bločky následovala imerze ve stejném fixačním roztoku po dobu 4 h při pokojové teplotě. Po oplachu v 0,1 M fosfátovém Sørensenově pufru byly tkáňové bločky odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (30%, 50%, 70%, 90%, 96%) při 4 °C a zality do pryskyřice LR White (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Polymerizace pryskyřice proběhla během 1 dne při 50 °C. Polosilné řezy o tloušťce 1 až 2 μ m byly obarveny hematoxylinem a eozinem a sloužily pro výběr oblasti řezu vhodné pro vyšetření ultrastruktury v transmisním elektronovém mikroskopu. Ultratenké řezy o tloušťce 50 až 60 nm byly krájeny na ultramikrotomu Ultrotome Nova (LKB, Broma, Švédsko) a shromážděny na niklové síťky s formvarovou blankou naprášené uhlíkem (Agar Scientific, Essex, Velká Británie).

4.7. Histologická barvení na průkaz vápníku

4.7.1. Metoda podle von Kossy

Roztoky

3% dusičnan stříbrný (AgNO_3)

5% thiosíran sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

Postup

Parafínové řezy se rutinně odparafinují, převedou do vody a poté se provede reakce na denním světle 3% roztokem dusičnanu stříbrného po dobu 30 minut. Po vyprání řezů v destilované nebo deionizované vodě následuje ustálení reakce 5% roztokem thiosíranu sodného po dobu 1 min. Po pečlivém oplachu v destilované nebo deionizované vodě se jádra dobarví jádrovou červení. Poté se řezy rutinně odvodní a zamontují do DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Výsledek

Výsledná depozita vápenatých solí jsou zbarvena černě, jádra buněk červeně.

4.7.2. Alizarinová červeň (metoda Dahlova)

Roztoky

a) Alizarinová červeň (pH 6,3 – 6,5)

0,5 g alizarinu

45 ml destilované vody

5 ml ředěného amoniaku (28% amoniak ředěný 1:100), přidávat za stálého míchání

b) Okyselený alkohol

na 100 ml 96% alkoholu přidáme 0,01 ml HCl

Postup

Parafínové řezy se rutinně odparafinují a převedou do vody. Následuje barvení roztokem alizarinové červeně po dobu 2 až 5 minut. Poté se řezy promyjí v destilované vodě (5 až 10 sekund) a opláchnou okyseleným alkoholem po dobu 15 sekund. Obarvené řezy se rutinně odvodní a zamontují do DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Výsledek

Výsledná depozita vápenatých solí jsou zbarvena oranžově červeně.

4.8. Histochemie a imunohistochemie

4.8.1. Histochemická detekce β galaktosidázy

Histochemická detekce β galaktosidázy v *lacZ*⁺ buňkách (myši ROSA26) byla provedena metodou pre-embedding, tzn. po fixaci před zalitím do parafínu nebo pryskyřice glykolmethakrylát. Po perfúzi 4% paraformaldehydem v 0,1M PB pufru (pH 7,4) byly odebrané myší svaly přikrojeny na menší bločky a dofixovány imerzí ve stejném fixačním roztoku 1h při 4°C. Po oplachu byly bločky inkubovány v roztoku X-gal (pH 7,6; substrát pro enzym β galaktosidázu) 24 h při 37°C. Poté byly tkáně dehydratovány a zality do parafínu nebo do pryskyřice glykolmethakrylát.

4.8.2. Imunohistochemické detekce na parafinovaných řezech

Imunohistochemické detekce na parafinových řezech byly provedeny nepřímou třístupňovou metodou (metodou *labelled streptavidin-biotin*; LSAB). Parafinové řezy byly odparafinovány a hydratovány sestupnou alkoholovou řadou. Odmaskování antigenů (*antigen retrieval*) bylo provedeno buď v mikrovlnné troubě (při výkonu 700 W; Siemens, Berlín, Německo) po zahřátí v citrátovém pufru (pH 6,0) po dobu 3krát 5 min. (Shi et al., 1991) nebo pomocí mikrovlnného procesoru (HistoStation, Milestone, Sorisole, Itálie). Po vychladnutí řezů a oplachu v PBS pufru byly převedeny na 3krát 10 min. do roztoku 5% H₂O₂ ve vodě pro utlumení aktivity „endogenní peroxidázy“. Po oplachu v PBS pufru se na řezy nakapalo 5% normální oslí sérum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) v PBS pufru pro potlačení nespecifické vazby protilátek. Po 20 min bylo sérum odsáto a řezy se inkubovaly s primární protilátkou ředěnou v PBS pufru nebo v roztoku DAKO Diluent (DAKO, Santa Clara, CA, USA) obvykle přes noc ve vlhké komůrce při teplotě 2 až 8 °C. Po pečlivém oplachu v PBS pufru se řezy inkubovaly s oslí sekundární biotinylovanou protilátkou (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) po dobu 45 min. při pokojové teplotě. Po pečlivém oplachu v PBS pufru následovala inkubace řezů v roztoku streptavidinu značeném křenovou peroxidázou (DAKO, Santa Clara, CA, USA) po dobu 45 min při pokojové teplotě. Vlastní místo vazby peroxidázy bylo detekováno tetrahydrochloridem diaminobenzidinu (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 20 mg rozpuštěného v několika kapkách dimethylformamidu, doplněno 20 ml PBS a 5 μ l 30% H₂O₂). Výsledná sraženina hnědé barvy je nerozpustná ve vodě a umožňuje vizualizaci místa vazby protilátek na antigen na úrovni světelné mikroskopie. Takto zpracované řezy byly dobarveny

Mayerovým nebo Gillovým hematoxylinem nebo jádrovou červení, dehydratovány a zamontovány do DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). K vyloučení falešné positivity byly kontrolní řezy tkáně inkubovány ve stejných mediích s vyloučením primární protilátky.

4.8.3. Imunofluorescenční detekce na kryořezech

Imunofluorescenční detekce na kryořezech byly provedeny nepřímou dvoustupňovou metodou. Po rozmražení kryořezů (30 min. při pokojové teplotě) byly antigeny odmaskovány stejným způsobem jako při imunohistochemických detekcích na parafinových řezech. Poté po 20minutovém působení 5% normálního oslího séra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) v PBS pufru pro potlačení nespecifické vazby protilátek se řezy inkubovaly s primární protilátkou ředěnou v PBS pufru nebo v roztoku DAKO Diluent (DAKO, Santa Clara, CA, USA) obvykle 1h ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po pečlivém oplachu v PBS pufru následovala inkubace řezů s oslí sekundární protilátkou konjugovanou s fluorochromem Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) po dobu 45 min. při pokojové teplotě. Řezy byly dobarveny DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a zamontovány pomocí DAKO Fluorescence Mounting Medium (DAKO, Santa Clara, CA, USA). Také u imunofluorescenčních detekcí na kryořezech byla falešná pozitivita vyloučena díky kontrolním řezům inkubovaným ve stejných roztocích s vyloučením primární protilátky.

Řezy obarvené histologickými barvenými a po histochemických, imunohistochemických a imunofluorescenčních detekcích antigenů byly vyšetřeny a nasnímány ve světelném mikroskopu BX51 vybaveném epifluorescencí a kamerou DP71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japonsko).

4.8.4. Imunohistochemické detekce na ultratenkých řezech pro transmisní elektronovou mikroskopii

Imunohistochemické detekce na ultratenkých řezech byly provedeny nepřímou dvoustupňovou metodou. Nespecifická vazba protilátek byla potlačena inkubací řezů v 5% normálním kozím séru (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Následovala inkubace s primární protilátkou, která byla 10x koncentrovanější než při

imunohistochemických detekcích na parafinových řezech, po dobu 3,5 h při pokojové teplotě. Po pečlivém oplachu byla na řezy nakapána kozí sekundární protilátka konjugovaná s 18 nm částicemi koloidního zlata (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), která působila po dobu 2 h při pokojové teplotě. Po pečlivém oplachu byly řezy kontrastovány acetátem uranylu a citrátem olova.

Ultratenké řezy byly vyšetřeny a nasnímány v transmisních elektronových mikroskopech Tesla BS500 (při 90 kV, Tesla, Brno, Česká republika) vybaveném digitální kamerou Megaview G2 a iTEM softwarem (oboje Olympus Corporation, Tokyo, Japonsko) a JEOL JEM-1400Plus (při 120kV; JEOL, Tokyo, Japonsko) vybaveném integrovanou 8Mpix CCD kamerou a příslušným softwarem (JEOL, Tokyo, Japonsko).

4.8.5. Seznam použitých primárních protilátek

- myší monoklonální protilátka proti nestinu, klon Rat-401 (DSHB, Iowa, USA)
- myší monoklonální protilátka proti desminu, klon D33 (BioGenex, San Ramon, CA, USA; GeneTex, Irvine, CA, USA)
- myší monoklonální protilátka proti vimentinu, klon V9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; DakoCytomation, Glostrup, Dánsko)
- králičí monoklonální protilátka proti desminu, klon Y66 (Abcam, Cambridge, Velká Británie)
- králičí monoklonální protilátka proti GFP, klon D5.1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

4.9. Analýza obsahu DNA genu *lacZ* pomocí kvantitativní PCR

Celkem 18 příjemců po transplantaci buněk kostní dřeně od *lacZ*⁺ myších dárců (kmene B6;129S-Gt(ROSA)26Sor) bylo určeno pro analýzu obsahu DNA genu *lacZ* pomocí metody kvantitativní PCR. Sedm dní (N = 6), 14 dní (N = 6) a 33 dní (N = 6) po transplantaci byly příjemci utraceni inhalací CO₂ a následným vykrvácením. Jejich pravé poraněné a levé intaktní svaly m. tibialis ant. byly po vyjmutí zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při -80 °C. Od 3 transplantovaných příjemců z každé skupiny (celkem od 9 myší) byla také odebrána propláchnutím dřevných dutin femurů a tibií PBS pufrem kostní dřev, která byla zmrazena v kapalném dusíku a uchovávána při -80 °C.

DNA byla ze vzorků kosterních svalů a kostních dřev izolována pomocí kitu DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Kvantitativní PCR byla provedena v triplicátech s 20 ng DNA pomocí TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) a předem navržených genových esejí pro bakteriální gen *lacZ* (ecoLacZ_Q1; GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR), and myší referenční („housekeeping“) gen *polr2a* (mPolr2a_G1; GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, ČR). Cyklické podmínky (pro oba produkty *lacZ* and *polr2a*) byly 10 min. při 95 °C, následovalo 40 cyklů při 95 °C po dobu 15 s a při 60 °C po dobu 1 min. Relativní poměr exprese byl poté vypočítán z hodnot $\Delta C_{t_{target}}$ a $\Delta C_{t_{housekeeping}}$, jak bylo popsáno v práci Fuksa et al. 2010.

V rámci statistické analýzy výsledků metody kvantitativní PCR jsou všechny hodnoty v grafech vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm střední chyba aritmetického průměru. K porovnání experimentálních dat byl použit nepárový, dvouvýběrový *t*-test. Pro naše testování jsme zvolili hladinu významnosti $\alpha = 0,05$. Byl použit statistický software Graphpad Prism 5.0 software (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5. VÝSLEDKY

5.1. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v intaktním a regenerujícím kosterním svalu zadní končetiny potkana

5.1.1. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v intaktním kosterním svalu zadní končetiny potkana

Nestin jsme v intaktních kosterních svalech příjemců detekovali ve svalových vláknech pouze ojedinelé. Nejintenzivnější imunoreaktivita nestinu se vždy nacházela ve fokálním vyklenutí sarkoplazmy. Pod tímto vyklenutím subsarkolemálně byl signál nestinu také velmi výrazný a zeslaboval se směrem k opačné straně vlákna (obr. 1). Tento jev naznačoval oblast motorické ploténky. Nestin jsme dále zaznamenali ve Schwannových buňkách periferních nervů intaktních svalů příjemců. Endotelové i ostatní buňky krevních cév byly v intaktních svalech příjemců nestin negativní.

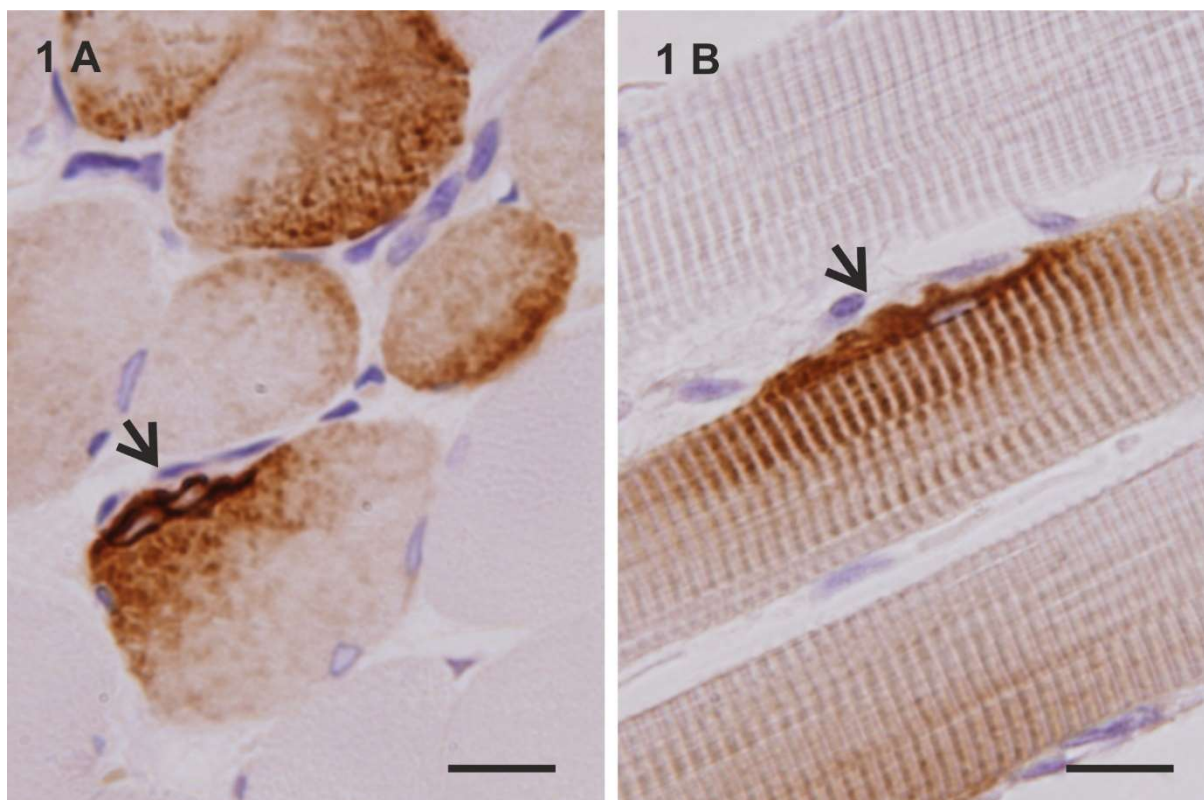
Desmin jsme imunohistochemicky prokázali ve všech svalových vláknech intaktních kosterních svalů příjemců. Jednotlivá svalová vlákna se intenzitou signálu tohoto intermediárního filamenta mírně lišila. Desmin jsme dále detekovali v buňkách hladké svaloviny stěny krevních cév, především arteriol.

Vimentin nebyl ve svalových vláknech intaktních kosterních svalů příjemců detekován. V krevních cévách byl vimentin identifikován v endotelových buňkách a v buňkách hladké svaloviny. Imunopozitivitu tohoto proteinu jsme pozorovali také v buňkách endomysia.

5.1.2. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v regenerujícím kosterním svalu zadní končetiny potkana

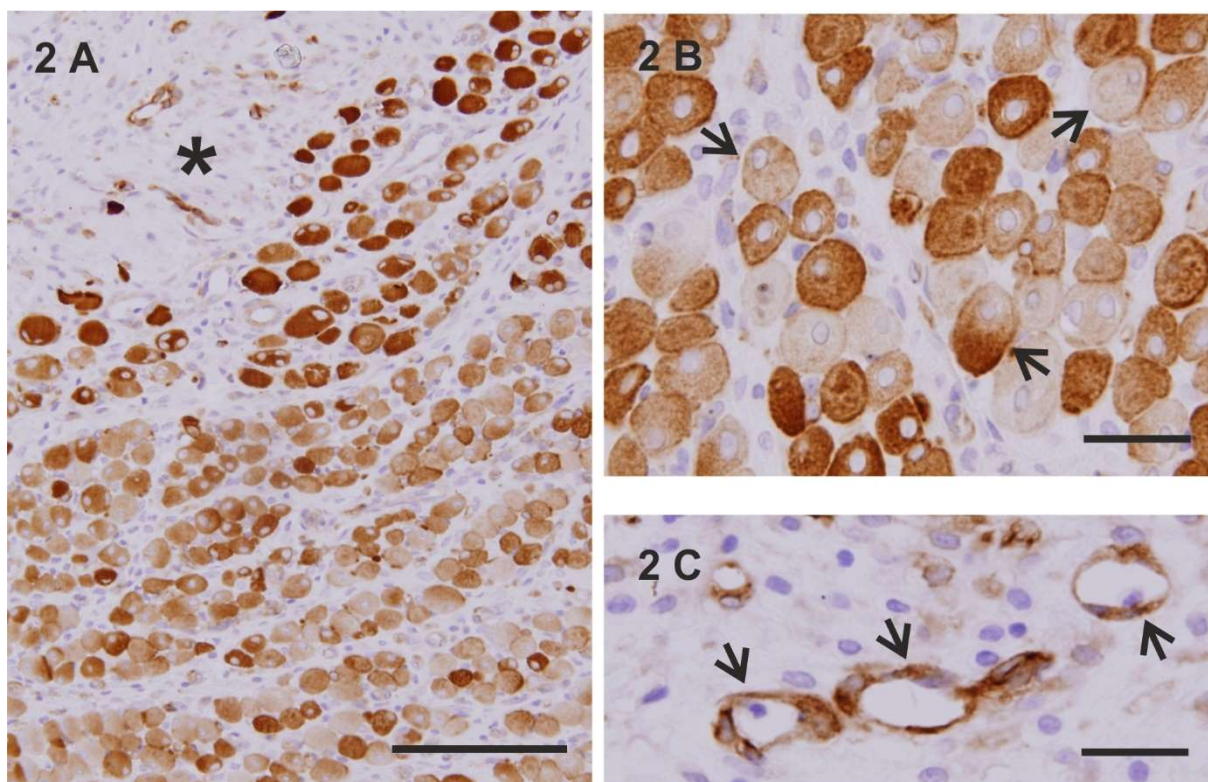
5.1.2.1. *Sedm dní po heterochronní isotransplantaci*

Sedm dní po transplantaci se v oblasti štěpu nacházely novotvořené myotuby a svalová vlákna s centrálně uloženými jádry. Endomysium obsahovalo jen malé množství krevních kapilár. Téměř všechny novotvořené myotuby a svalová vlákna vykazovala pozitivitu nestinu,



Obr. 1. **Detekce nestinu ve zralých svalových vláknech příjemců.** Maximální intenzita imunoreaktivity nestinu se nachází ve fokálním vyklenutí sarkoplazmy, přičemž signál byl nejvýraznější subsarkolemálně pod vyklenutím a zeslaboval se směrem k opačné straně svalového vlákna. Tento jev značí přítomnost motorické ploténky (šipky). A příčný řez, B podélný řez. Měřítka obou obrázků je 25 μm .

avšak s rozdílnou intenzitou a lokalizací. Některá byla homogenně pozitivní, u jiných se nejsilnější signál vyskytoval jen v jedné polovině nebo v určité oblasti na periferii a jeho intenzita klesala směrem k opačné straně svalového vlákna (obr. 2 A, B). V oblasti transplantátu jsme nestin detekovali také v endotelových buňkách vrůstajících krevních cév (obr. 2 C). V bezprostřední blízkosti štěpu byl v tkáni příjemce nestin prokázán v některých svalových vláknech (ojediněle měla jádra uložena centrálně), v endotelových buňkách krevních cév a v periferních nervech. Vyzrávající myotuby a svalová vlákna vykazovala pozitivitu desminu a slaběji také vimentinu. Silnou imunoreaktivitu vimentinu a rovněž desminu jsme pozorovali ve stěně krevních cév. Vimentin pozitivní byly dle očekávání fibroblasty endomysia.

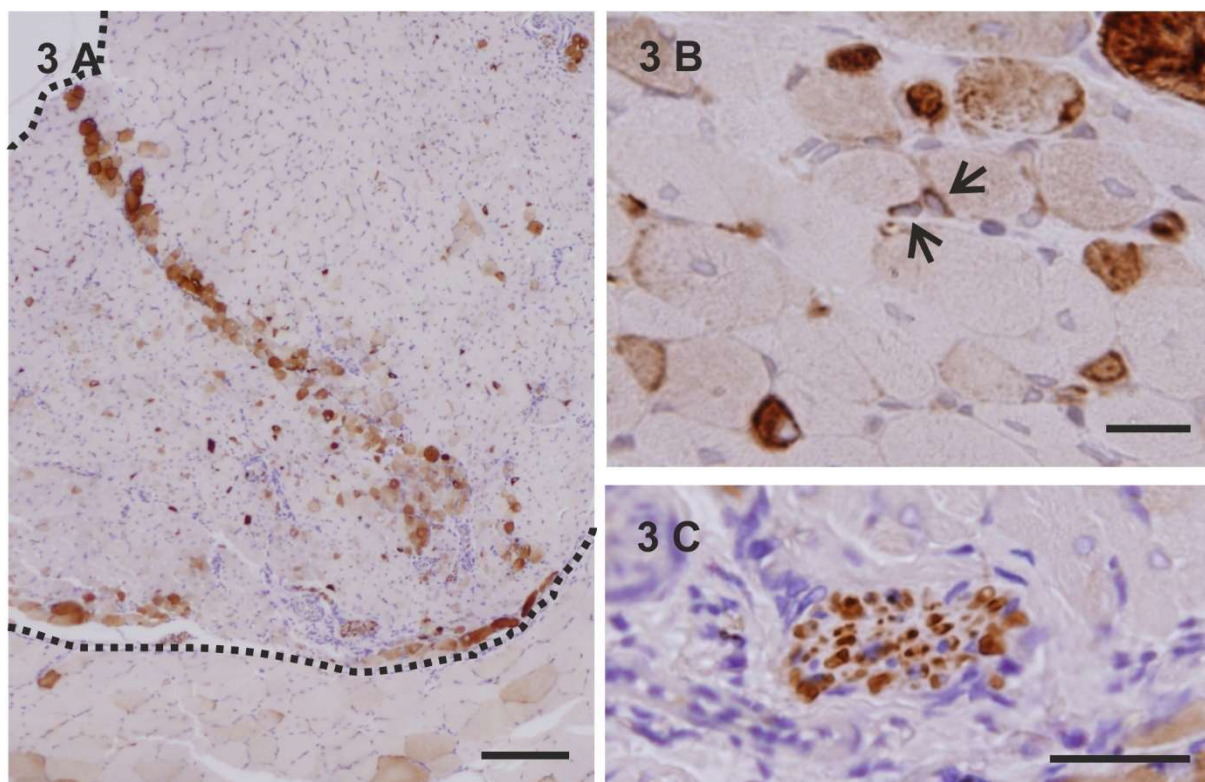


Obr. 2. **Detekce nestinu v regenerujícím kosterním svalu 7 dní po heterochronní isograftaci.** Nestin se vyskytuje ve štěpu v téměř všech novotvořených myotubách a svalových vláknech, která mají kulatá a zhruba centrálně uložená jádra. Hvězdička značí šlachu štěpu, ve které jsou vrostlé krevní cévy s nestin⁺ vyžrávajícími endotelovými buňkami (A). Novotvořené myotuby a svalová vlákna štěpu se liší imunoreaktivitou nestinu; některá jsou homogenně pozitivní, zatímco jiná mají nejsilnější signál v jedné oblasti na periferii a ve zbývajících oblastech se jeho intenzita snižuje (šipky; B). Nestin je také detekován v nezralých endotelových buňkách krevních cév ve štěpu (šipky; C). Měřítka obrázku A je 200 μm a obrázků B a C 100 μm .

5.1.2.2. Šestnáct dní po heterochronní isograftaci

Štěpy vyšetřované 16 dní po transplantaci obsahovaly nezralá svalová vlákna protkaná vrůstajícími krevními cévami a regenerujícími periferními nervy. Novotvořená svalová vlákna měla menší průměr než tytéž svalové elementy ve tkáni příjemce a ojediněle měla centrálně uložená vlákna. Ve štěpu už většina svalových vláken nevykazovala imunopozitivitu nestinu, avšak toto intermediární filamentum bylo silně detekováno v elementech o malém průměru nacházejících se na periferii nestin negativních svalových vláken (obr. 3 A, B). Nestin jsme prokázali v regenerujících nervech (obr. 3 C) a v endotelových buňkách několika vrůstajících krevních cév. Ve svalech příjemců jsme nestin detekovali v oblastech motorických plotének

a na longitudinálních řezech také v místech myotendinózních spojení. Všechny svalové elementy včetně buněk hladké svaloviny ve stěnách krevních cév ve tkáni štěpu i příjemce vykazovaly imunopozitivitu desminu. Vimentin byl detekován ve stěnách krevních cév a v buňkách endomysia.

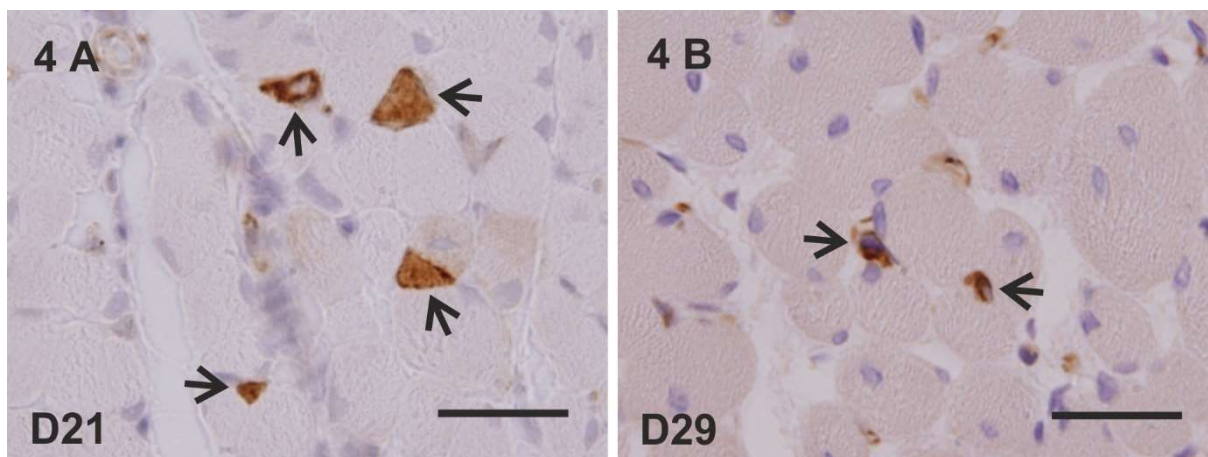


Obr. 3. **Detekce nestinu v regenerujícím kosterním svalu 16 dní po heterochronní isotransplantaci.** Ve štěpu (vyznačen tečkovanou čarou) jen malý počet novotvořených svalových vláken vykazuje pozitivitu nestinu. Tato nestin⁺ svalová vlákna svým nahloučením vytvářejí pruh napříč štěpem (A). Malé buňky nacházející se na periferii nestin negativních svalových vláken štěpu jsou silně nestin pozitivní. Větší elementy představují vznikající myotuby, zatímco malé buňky zjevně odpovídají myoblastům (šipky, B). Ve štěpu je nestin detekován také v regenerujících nervech jako malá ložiska signálu vyskytující se uvnitř nervu. Měřítko obrázku A je 200 μm , obrázku B 25 μm a obrázku C 50 μm .

5.1.2.3. *Dvacet jedna a 29 dní po heterochronní isotransplantaci*

Dvacet jedna a 29 dní po heterochronní isotransplantaci štěpy sestávaly z vyzářavajících svalových vláken s jádry přesouvajícími se k periferii, jejichž průměry však dosud nedosáhly průměrů zralých svalových vláken příjemce. Transplantáty byly již bohatě vaskularizované a inervované. Ve štěpech vyšetřovaných 21 dní po transplantaci jsme nestin detekovali jen

zřídka ve vyvíjejících se svalových vláknech a v malých elementech na periferii nestin negativních vyzávajících svalových vláken (obr. 4 A). V transplantátech svalů odebraných 29 dní po transplantaci novotvořená svalová vlákna nevykazovala žádnou imunopozitivitu nestinu, tento protein byl prokázán jen v malých periferně uložených svalových elementech (obr. 4 C). Ve tkáni příjemců jsme signál nestinu zaznamenali jen v oblastech motorických plotének a myotendinózních spojení. Endotelové buňky krevních cév byly nestin pozitivní jen ve štěpech a jejich bezprostředním okolí. Naproti tomu bylo toto intermediární filamentum jednoznačně detekováno v periferních nervech jak transplantátů, tak intaktních tkání příjemců. Imunoreaktivitu desminu jsme pozorovali v dospělých i vyzávajících svalových vláknech a ve stěnách krevních cév. Vimentin jsme prokázali ve stěnách krevních cév a v buňkách endomysia.

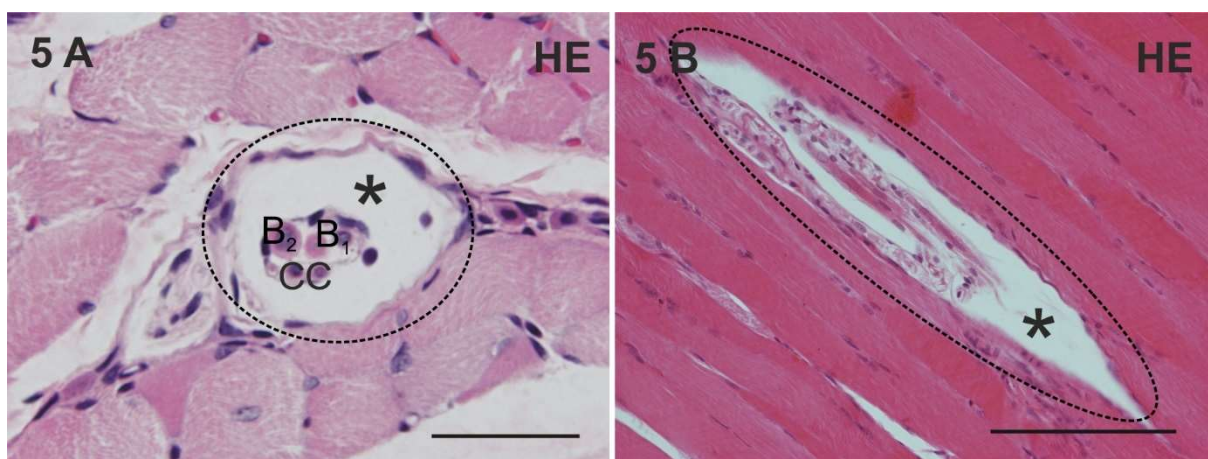


Obr. 4. Detekce nestinu v regenerujících kosterních svalech 21 a 29 dní po heterochronní isotransplantaci. Ve štěpu vyšetřovaném 21 dní po transplantaci je nestin detekován jen zřídka ve vyzávajících svalových vláknech a v malých buňkách (šipky) na periferii nestin negativních vláken (A). Ve štěpech hodnocených 29 dní po transplantaci novotvořená svalová vlákna nevykazují žádnou imunoreaktivitu nestinu. Tento protein se vyskytuje jen velmi vzácně v malých periferně uložených buňkách (šipky, B). Měřítka obrázků A i B je 50 μm .

5.2. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách kosterního svalu zadní končetiny potkana

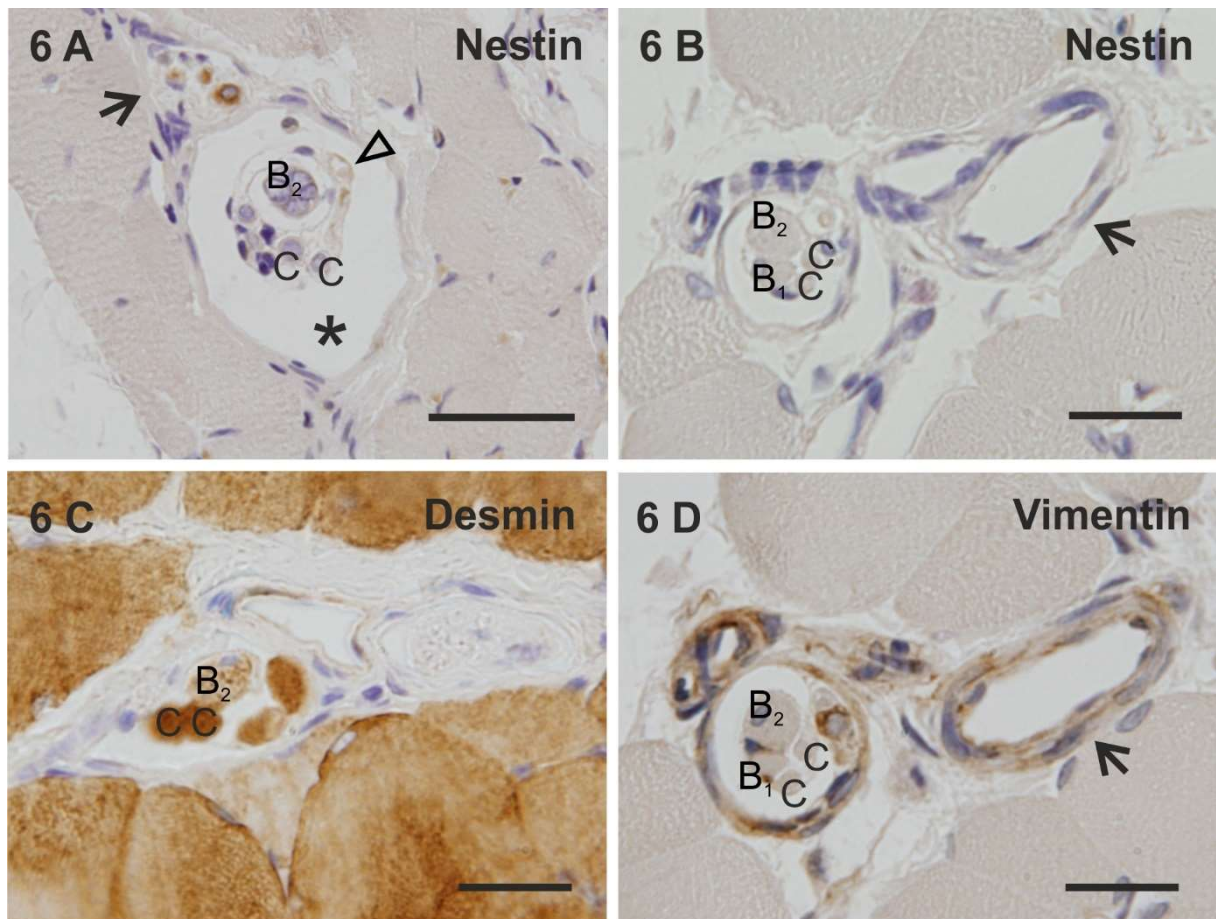
5.2.1. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v intaktních nervosvalových vřeténkách kosterního svalu zadní končetiny potkana

Analyzovali jsme 20 intaktních nervosvalových vřetének jednoznačně určených na základě sériových řezů obarvených hematoxylinem a eozinem a imunohistochemických detekcí včetně detekce proteinu S-100, který jakožto marker Schwannových buněk umožnil rozlišit nervosvalová vřeténka od shluku extrafuzálních svalových vláken obalených endomysiem. V kosterních svalech příjemců byla v intaktních vřeténkách obvykle čtyři intrafuzální svalová vlákna: jedno „nuclear bag₁“, jedno „nuclear bag₂“ a dvě „nuclear chain“ (obr. 5).



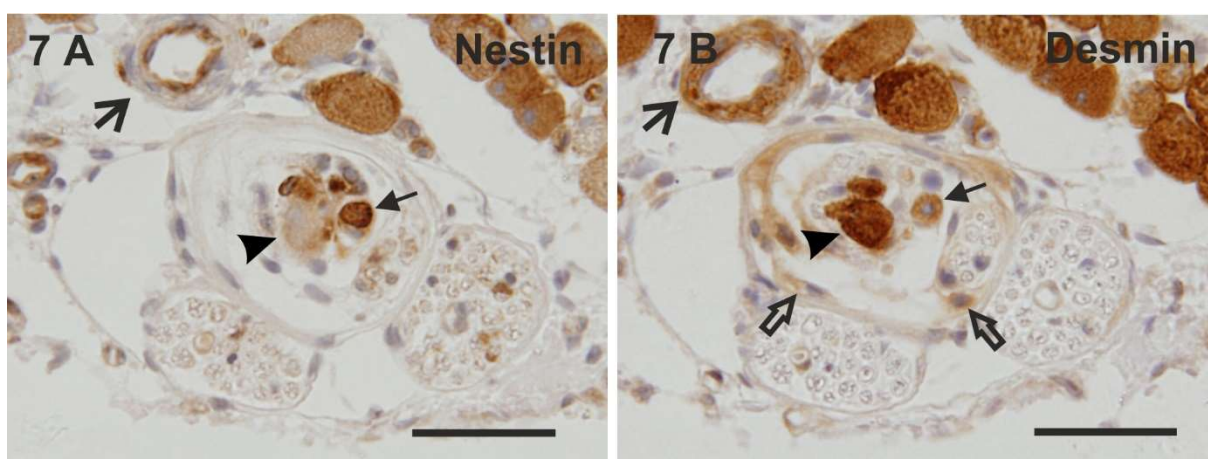
Obr. 5. Intaktní nervosvalová vřeténka v *m. extensor digitorum longus* příjemců. V intaktních vřeténkách v kosterních svalech zadní končetiny potkana jsou obvykle čtyři intrafuzální svalová vlákna: jedno „nuclear bag₁“ (B_1), jedno „nuclear bag₂“ (B_2) a dvě „nuclear chain“ (C). Vřeténko je obaleno pouzdrem. Mezi intrafuzálními svalovými vlákny a pouzdrem se nachází periaxiální prostor (hvězdička). A příčný řez, B podélný řez. Řezy obarveny hematoxylinem a eozinem. Měřítka obrázku A je 50 μm , obrázku B je 200 μm .

Nestin jsme detekovali v intaktních nervosvalových vřeténkách příjemců jen zřídka obvykle v centrální ekvatoriální zóně jako drobné slabší imunopozitivity značící přítomnost Schwannových buněk (obr. 6 A). V polárních zónách, které postrádají senzitivní inervaci, jsme imunoreaktivitu nestinu nezaznamenali (obr. 6 B).



Obr. 6. Detekce nestinu (A, B), desminu (C) a vimentinu (D) v intaktních nervosvalových vřeténkách v *m. extensor digitorum longus* příjemců. Nestin vykazuje slabou imunoreaktivitu ve Schwannových buňkách tvořících obaly senzitivních axonů („prázdná“ šipka) v ekvatoriální zóně vřeténka a ve Schwannových buňkách periferních nervů (šipka) v blízkosti vřeténka (A). Dobře rozpoznatelný je na obrázku A periaxiální prostor (hvězdička) a nahromaděná jádra v největším intrafuzálním svalovém vláknu typu „nuclear bag₂“ (B_2). V polární zóně vřeténka, kde nejsou zakončení senzitivních nervových vláken, nestin není detekován (B). Krevní céva nacházející se v sousedství vřeténka je také nestin negativní (šipka). Nervosvalové vřeténko na obrázku B má typické složení intrafuzálních svalových vláken: jedno velké vlákno typu „nuclear bag₂“ (B_2), jedno středně velké vlákno typu „nuclear bag₁“ (B_1) a dvě malá vlákna typu „nuclear chain“ (C). Periaxiální prostor je redukovaný, což je charakteristické pro polární zónu. Desmin je detekován s rozlišnou intenzitou ve všech intrafuzálních svalových vlákních vřeténka (C). Imunoreaktivita desminu je silnější ve vlákních typu „nuclear chain“ (C) než ve větších vlákních typů „nuclear bag“. Okolní extrafuzální svalová vlákna vykazují srovnatelnou imunopozitivitu desminu. Signál vimentinu se vyskytuje v buňkách zevního pouzdra a jako drobné imunopozitivity také v buňkách vnitřního pouzdra (D). V blízké krevní cévě se vimentin detekuje v endotelových buňkách a v buňkách hladké svaloviny její stěny (šipka). Tento protein se také vyskytuje ve fibroblastech endomysia. Měřítko obrázku A je 50 μm a obrázků B, C a D je 25 μm .

V jednom svalu odebraném 7 dní po transplantaci jsme identifikovali nervosvalové vřetenko, které se nacházelo na hranici mezi svalem příjemce a transplantátem. Tato oblast byla charakteristická přítomností nestinu v mnoha svalových vláknech příjemce, zatímco ve všech ostatních svalových vláknech příjemce se tento protein nevyskytoval, s výjimkou oblastí motorických plotének. Intrafuzální svalová vlákna tohoto receptora byla také nestin pozitivní, což svědčilo o probíhající regeneraci a představovalo zajímavý nález. Jednotlivá intrafuzální vlákna tohoto vřetenka se lišila intenzitou imunoreaktivity nestinu, přičemž některá vykazovala silný signál, jiná jen slabý (obr. 7 A).



Obr. 7. Detekce nestinu (A) a desminu (B) v nervosvalovém vřetenku vyskytující se v poraněné tkáni příjemce v těsné blízkosti štěpu – 7 dní po transplantaci. Nestin detekujeme s rozličnou intenzitou ve všech intrafuzálních svalových vláknech tohoto receptora i ve všech extrafuzálních vláknech svalu příjemce nacházejících se v blízkosti štěpu (vpravo nahoře) a také v endotelových buňkách krevní cévy (šipka; A). Imunopozitivita nestinu je viditelná ve Schwannových buňkách periferních nervů provázejících vřetenko. Desmin je detekován v rozličnou intenzitou ve všech intrafuzální i extrafuzálních svalových vláknech a také v buňkách hladké svaloviny krevní cévy (šipka, B). Zajímavá je opačná imunoreaktivita nestinu a desminu ve velkém a středně velkém intrafuzálním svalovém vláknu (šipky), která naznačuje časově rozdílný průběh jejich regenerace. Obrázky A a B jsou sériové řezy. Měřítka obou obrázků je 25 μ m.

V intaktních nervosvalových vřetenkách svalů příjemců byla všechna intrafuzální svalová vlákna desmin pozitivní. Silná nebo středně silná imunopozitivita desminu byla obvykle pozorována ve vláknech o malé průměru, která jsou charakteristická řetězem neboli jednou řadou jader ve střední části vlákna, a proto označována jako „nuclear chain“ vlákna. Slabší imunoreaktivitu desminu jsme zaznamenali ve vláknech o větším průměru, která odpovídají „nuclear bag“ vláknům s typickým nahromaděním jader ve střední části vlákna (obr. 6 C). V nervosvalovém vřetenku nacházejícím se na hranici mezi svalem příjemce

a transplantátem vykazujícím imunoreaktivitu nestinu v intrafuzálních vláknech byl desmin překvapivě identifikován také v některých buňkách zevního pouzdra (obr. 7 B).

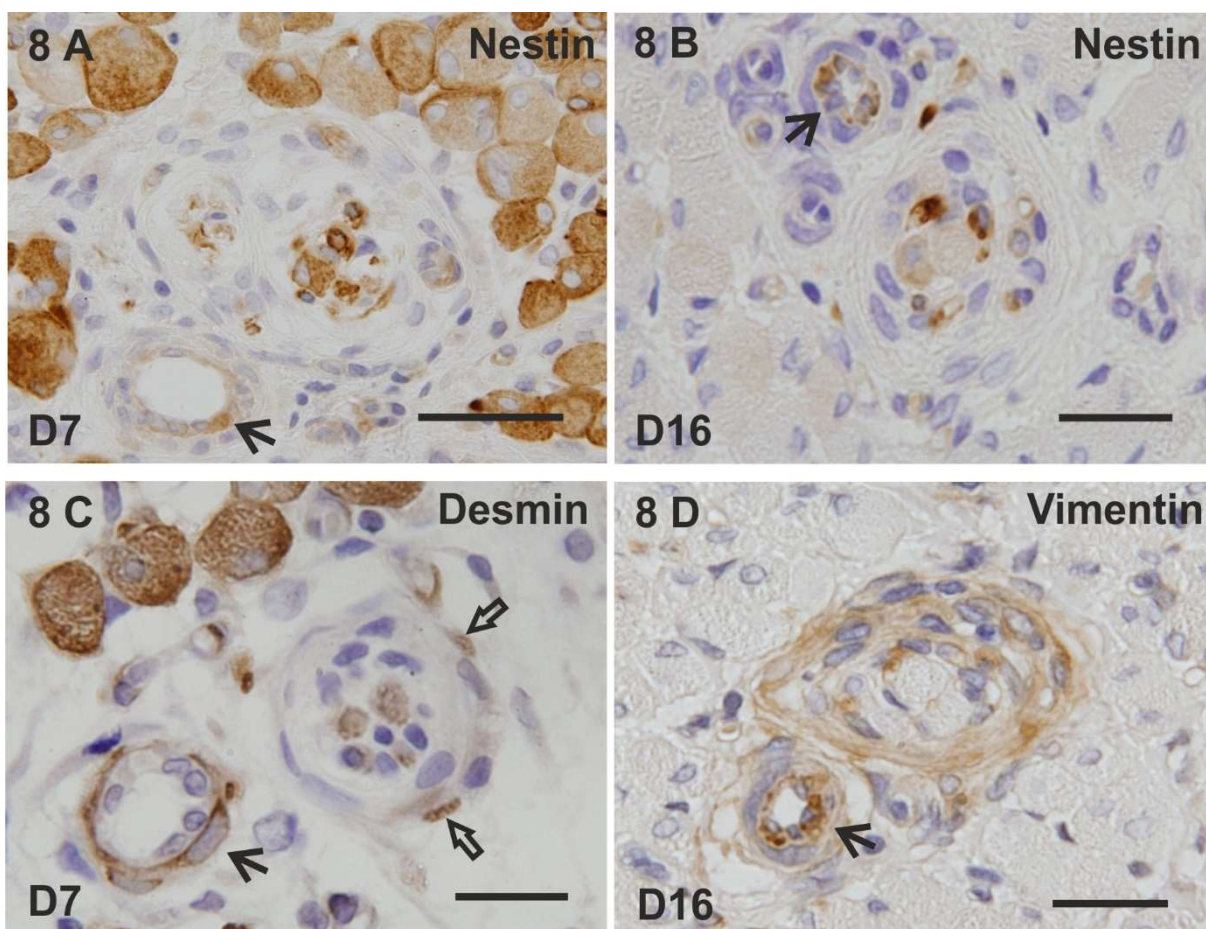
Imunoreaktivitu vimentinu jsme zaznamenali v nervosvalových vřeténcích příjemců v buňkách zevního pouzdra a jako drobné slabší fokální pozitivitu odhalující buňky vnitřního pouzdra (obr. 6 D).

5.2.2. Detekce nestinu, desminu a vimentinu v regenerujících nervosvalových vřeténcích kosterního svalu zadní končetiny potkana

Nervosvalová vřeténka byla ve tkáni štěpu ($n = 3$) rozpoznatelná, ale svojí morfologií se od intaktních receptorů ve tkáni příjemce lišila. Pouzdro regenerovaných nervosvalových vřetének bylo tenčí a jejich periaxiální prostor byl významně redukován. Regenerující intrafuzální svalová vlákna měla obvykle podobný průměr a postrádala typické uspořádání jader buď v podobě řetězce ve středu vlákna v případě „nuclear chain“ vláken nebo nahromadění v centrální oblasti vlákna u „nuclear bag“ vláken. Místo toho byla jejich jádra malá a lokalizovaná periferně nebo centrálně, čímž připomínala extrafuzální svalová vlákna o malém průměru. Nervosvalová vřeténka v oblasti štěpu také často obsahovala kapiláry mezi vrstvami zevního pouzdra nebo ve vnitřním prostoru, čímž se lišila od intaktních receptorů, uvnitř nichž se kapiláry nevyskytují. V regenerujících nervosvalových vřeténcích štěpů vyšetřovaných 7 dní po transplantaci se svalové elementy nacházely podle své lokalizace v transplantátu buď ve stadiu myoblastů, diferencujících se myotub nebo svalových vláken s centrálně uloženými jádry. V myoblastech a myotubách jsme detekovali nestin, zatímco desmin jsme zaznamenali ve svalových elementech ve všech vývojových stádiích (obr. 8 A, C). Podobně jako v intaktních nervosvalových vřeténcích se intenzita imunoreaktivity desminu mezi jednotlivými svalovými elementy mírně lišila. Vimentin byl prokázán v buňkách zevního pouzdra a jako drobné imunopozitivity uvnitř vřeténka svědčící pro přítomnost buněk vnitřního pouzdra. Slabší imunoreaktivitu vimentinu jsme pozorovali také v myoblastech a myotubách regenerujících nervosvalových vřetének svalů odebraných 7 dní po transplantaci.

V regenerujících nervosvalových vřeténcích svalů odebraných 16 dní po transplantaci ($n = 4$) se svalové elementy nacházely ve stadiu nezralých svalových vláken stále vykazujících imunopozitivitu nestinu avšak s různou intenzitou (obr. 8 B). Desmin byl detekován ve svalových vláknech a vimentin v buňkách zevního i vnitřního pouzdra všech nervosvalových vřetének (obr. 8 D).

Regenerovaná nervosvalová vřeténka ve tkáni štěpů vyšetřovaných 21 dní (n = 3) a 29 dní (n = 2) po transplantaci nevykazovala žádnou nebo jen fokální slabou imunopozitivitu nestinu podobně jako receptory v intaktních tkáních příjemců. Výsledky detekce desminu a vimentinu v regenerovaných nervosvalových vřeténkách také odpovídaly výsledkům získaným detekcí těchto intermediárních filament v intaktních receptorech. Desmin pozitivní byly všechny intrafuzální svalové elementy a vimentin pozitivní byly buňky zevního a vnitřního pouzdra.



Obr. 8. Detekce nestinu (A, B), desminu (C) a vimentinu (D) v regenerujících nervosvalových vřeténkách vyšetřovaných 7 dní (A, C) a 16 dní (B, D) po transplantaci. Nestin detekujeme ve vyvíjejících se buňkách nervosvalových vřetének ve stádiu myoblastů nebo myotub a také v okolních regenerujících extrafuzálních svalových vlákněch štěpu a v endotelových buňkách krevních cév vrůstajících do štěpu v průběhu revaskularizace (šipka, A). Vyrávající intrafuzální svalová vlákna vřeténka stále vykazují imunopozitivitu nestinu, avšak s různou intenzitou (B). Vlákna o malém průměru jsou silně pozitivní, zatímco vlákna o velkém průměru jsou slabě pozitivní. Signál nestinu je také viditelný v novotvořených endotelových buňkách krevní cév (šipka), avšak sousedící extrafuzální svalová vlákna štěpu imunoreaktivitu nestinu už nevykazují. Desmin je imunohistochemicky prokázán ve všech regenerujících intrafuzálních svalových elementech, stejně jako ve všech

vyzrávajících extrafuzálních myotubách a svalových vláknech štěpu a v buňkách hladké svaloviny krevní cévy (šipka, C). Vimentin je detekován pouze v buňkách zevního pouzdra a jako drobné imunopozitivity také v buňkách vnitřního pouzdra vřeténka (D). Intrafuzální svalová vlákna již imunoreaktivitu vimentinu nevykazují podobně jako vlákna extrafuzální. Signál vimentinu je viditelný v endotelových buňkách a buňkách hladké svaloviny krevné cévy (šipka). Měřítko obrázku A je 50 μm , obrázků B, C a D je 25 μm .

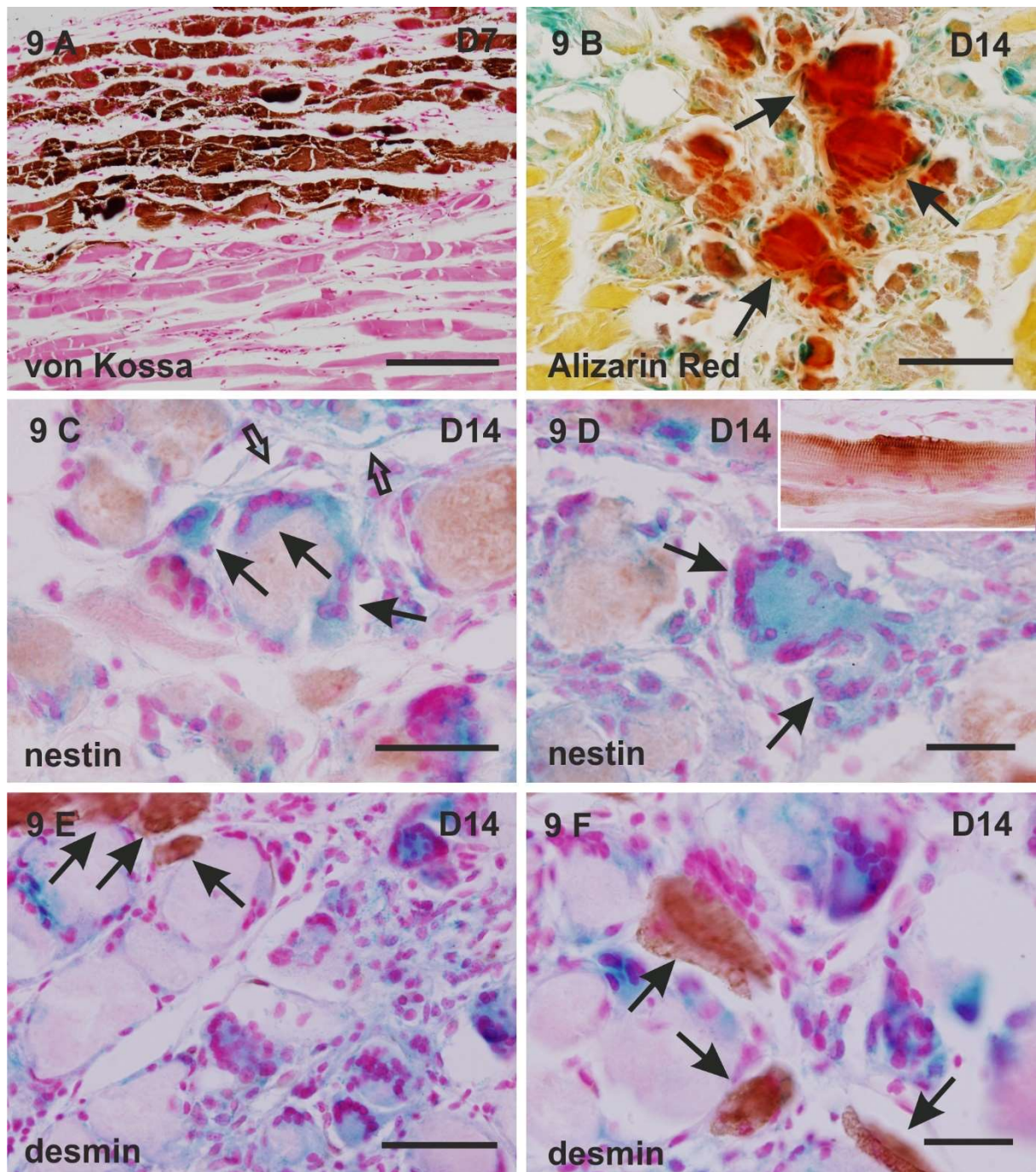
5.3. Detekce buněk pocházejících z kostní dřeně v průběhu odpovědi na poranění kosterního svalu myši

V této studii byly myši příjemci celotělově letálně ozáření 4 h po poranění kosterního svalu *m. tibialis ant.* kardiotoxinen a 3 h po ozáření jim byly intravenózně transplantovány neseparované BKD čerstvě izolované z dárců exprimujících *lacZ* myši ROSA26.

5.3.1. Histologická stavba poraněných a kontralaterálních kosterních svalů ozářených a transplantovaných myší

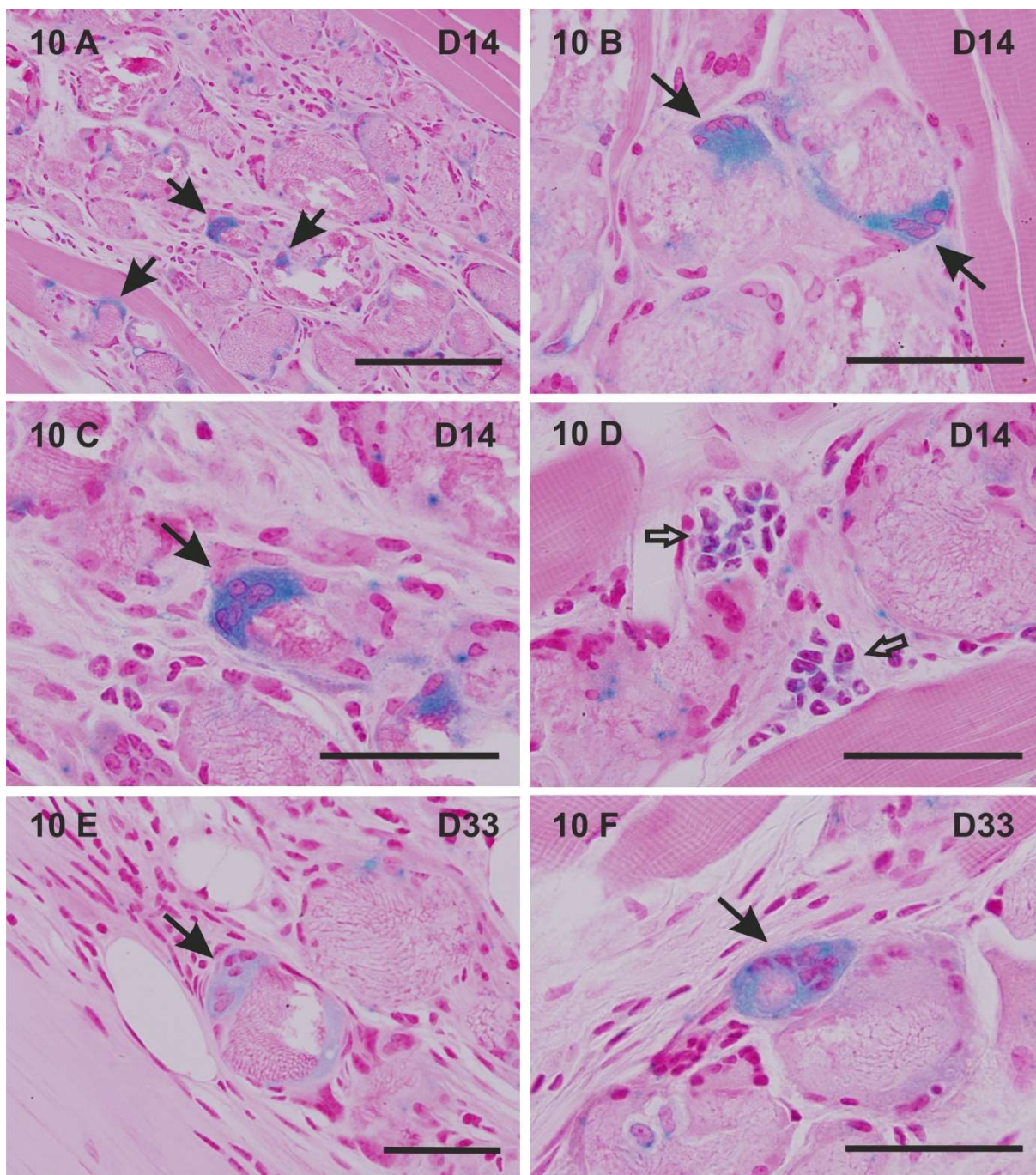
Sedm dní po poranění svalu, celotělovém ozáření a transplantaci BKD byla svalová vlákna v místě poranění nekrotická. Oblasti s degenerovanými svalovými vlákny byly infiltrované buňkami imunitního systému, především neutrofilů, ale zánětlivé infiltráty nebyly početné. Impregnace podle von Kossy a barvení alizarinovou červení odhalily kalcifikace v nekrotických svalových vláknech (obr. 9 A). Neidentifikovali jsme žádné X-gal⁺ buňky v místech poranění ani ve zbývajících intaktních oblastech *m. tibialis ant.* Desmin jsme detekovali pouze v neporaněných svalových vláknech a imunoreaktivita nestinu byla zaznamenána jen v oblastech motorických plotének a myotendinózních spojení intaktních svalových vláken.

Nekrotická kalcifikovaná sarkoplazma degenerovaných svalových vláken přetrvala a byla pozorována v poraněných svalech odebraných od transplantovaných myší 14 dní po injekci toxinu (obr. 9 B). V blízkosti degenerovaných svalových vláken v oblastech poranění jsme identifikovali velké mnohoaderné X-gal⁺ buňky. Většina z nich byla v těsném kontaktu s nekrotickými svalovými vlákny a co je zajímavé, některé je dokonce obklopovaly. Tyto X-gal⁺ buňky měly nepravidelný tvar a jejich oválná nebo nepravidelná jádra nebyla nijak uspořádaná nebo vzácněji byla nahromaděná ve tvaru půlměsíce na periferii buňky (obr. 9 C, D, E, F, obr. 10 A, B, C). Podle své morfologie tyto velké mnohoaderné X-gal⁺ buňky připomínaly obrovské buňky cizích těles, které vznikají fúzí aktivovaných makrofágů a značí probíhající chronický zánět. Ojedinele byly ve stejné oblasti jako tyto X-gal⁺ buňky přítomny také velké mnohoaderné avšak X-gal⁻ buňky. X-gal pozitivita byla dále zaznamenána v některých buňkách endomysia, vazivové tkáně poraněných svalů. Buňky vřetenovitého tvaru s protáhlým nebo oválným jádrem a tenkými výběžky pravděpodobně představovaly X-gal⁺



Obr. 9. Histochemická detekce β galaktosidázy (v X-gal⁺ buňkách odvozených od BKD dárce), **průkaz kalcifikace (A, B) a imunohistochemické detekce nestinu (C, D) a desminu (E, F) v poraněných kosterních svalech transplantovaných myši.** Nekrotická sarkoplazma degenerovaných svalových vláken v poraněných svalech je v obou časových intervalech, 7 (D7) i 28 dní (D28) po injekci kardiotoxinu, kalcifikovaná, jak je prokázáno impregnací podle von Kossy (A, soli kalcia jsou tmavě hnědé až černé) a barvením alizarinovou červení (B, kalcium se barví červeně, při tomto barvení se modrá barva X-gal⁺ buněk změní v zelenou). Nestin není v X-gal⁺ (modrých) velkých mnohjaderných buňkách detekován (C, D, šipky). „Prázdné“ šipky v obrázku C ukazují X-gal⁺ fibroblasty endomysia. Výřez vpravo nahoře v obrázku D zachycuje detekci nestinu v oblasti motorické ploténky intaktního svalového vlákna na tomtéž řezu sloužící jako pozitivní kontrola této detekce. X-gal⁺ velké mnohjaderné buňky nejsou desmin pozitivní, zatímco přeživší svalová vlákna vykazují silnou

imunoreaktivitu tohoto proteinu (E, F, šipky). Řezy na obrázcích A, C, D, E, F jsou dobarveny jádrovou červení. Měřítka obrázku A je 400 μm , obrázku B je 200 μm , obrázku C je 100 μm a obrázků D, E a F je 50 μm .



Obr. 10. Histologická stavba poraněného svalu a histochemická detekce β galaktosidázy (v X-gal⁺ buňkách odvozených od BKD dárce) 14 dní (D14; A, B, C, D) a 33 dní (D33; E, F) po injekci kardiotoxinu. X-gal⁺ velké mnohojaderné buňky jsou přítomné v oblastech poranění 14 i 33 dní po injekci kardiotoxinu (šipky). Vyskytují se v blízkosti nekrotických svalových vláken, nicméně nemají morfologii typickou pro myotuby. Připomínají obrovské buňky cizích těles vznikající fúzí makrofágů. V endomysiu se nacházejí X-gal⁺ buňky zánětlivého

infiltrátu („prázdné“ šipky, D). Na obrázcích jsou GMA řezy o tloušťce 1 – 2 μm , dobarvené jádrovou červení. Měřítko obrázku A je 200 μm , obrázku B je 100 μm , obrázků C a D je 50 μm a obrázků E a F je 100 μm .

fibroblasty, nicméně jejich nález byl sporadický (obr. 9 C). Naopak X-gal⁺ buňky zánětlivého infiltrátu byly velmi početné. V okolí degenerovaných svalových vláken byly stále přítomné skupiny X-gal⁺ neutrofilů a začalo se objevovat mnoho X-gal⁺ makrofágů (obr. 10 D). V poraněném svalu 14 dní po injekci toxinu nestin nebyl detekován v žádném typu X-gal⁺ buněk včetně velkých mnohojaderných buněk nepravidelného tvaru (obr. 9 C, D). V místech poranění na rozdíl od nekrotických svalových vláken svalová vlákna s normální morfologií vykazovala imunoreaktivitu desminu (obr. 9 E, F).

Třicet tři dní po injekci toxinu byla místa poranění tvořena nekrotickými kalcifikovaným svalovým vláknem obklopenými X-gal⁺ velkými mnohojadernými buňkami nepravidelného tvaru (obr. 10 E, F) a endomysiem obsahujícím vzácné X-gal⁺ fibroblasty a makrofágy. Ve srovnání s histologickou stavbou poraněného svalu vyšetřovaného 14 dní po injekci toxinu počet X-gal⁺ velkých mnohojaderných buněk a buněk zánětlivého infiltrátu mírně klesl, zatímco množství vazivové tkáně včetně fibroblastů mírně stoupl. Imunohistochemický průkaz nestinu potvrdil, že X-gal⁺ velké mnohojaderné buňky nepravidelného tvaru toto intermediární filamentum neobsahují. Detekce desminu umožnila odhalit viabilní svalová vlákna nacházející se v místě poranění mezi nekrotickými svalovými vlákny.

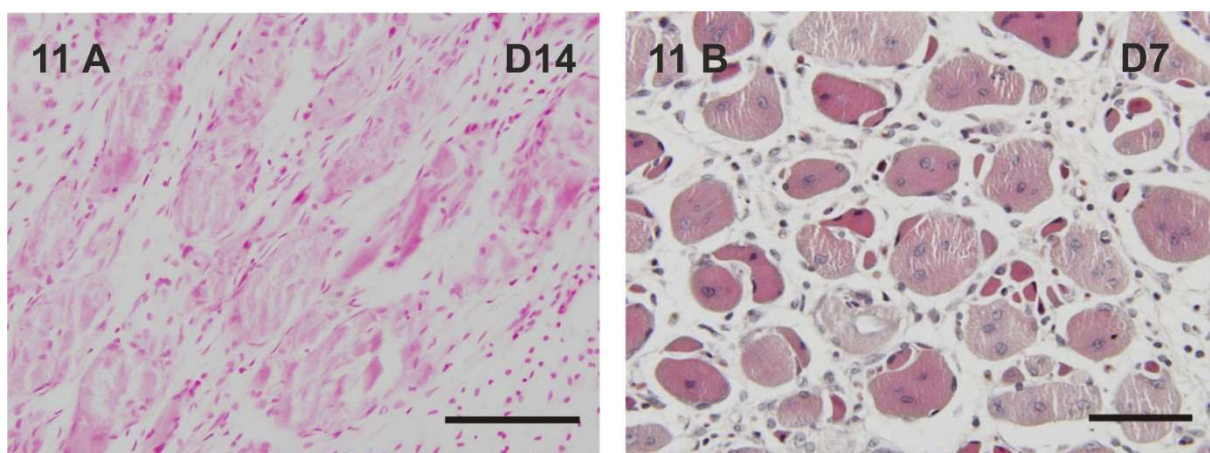
U všech myší této skupiny byla histologická stavba levých intaktních svalů *m. tibialis ant.* vyhodnocena jako normální a nebyly zaznamenány žádné X-gal⁺ buňky.

5.3.2. Histologická stavba poraněných kosterních svalů ozářených myší bez transplantace BKD

U skupiny kontrolních myší, které byly celotělově letálně ozářené 4 h po injekci kardiotoxinu, byly poraněné svaly m. tibialis ant. vyšetřeny 7 a 14 dní po navození poranění. Delší interval přežití jsme z etických důvodů nestudovali, zabránili jsme tak myším trpět příznaky letálního ozáření končícího smrtí. Sedm i 14 dní po injekci toxinu byla v místech poranění degenerovaná svalová vlákna nekrotická a v endomysiu se objevil zánětlivý infiltrát. Nezaznamenali jsme žádné X-gal⁺ buňky nebo známky regenerace (obr. 11 A).

5.3.3. Histologická stavba poraněných kosterních svalů myší bez ozáření a transplantace BKD

U myší kontrolní skupiny, které nebyly ani celotělově letálně ozářeny, ani jim nebyly transplantovány BKD, poraněné svaly m. tibialis ant. plně zregenerovaly. Sedm dní po injekci toxinu byly v místech poranění vytvořeny nové myoblasty, myotubuly a svalová vlákna s jádry uloženými centrálně (obr. 11 B). Po dalších sedmi dnech se jádra novotvořených svalových vláken posouvala k periferii a 33 dní po injekci toxinu byla místa poranění špatně rozlišitelná, protože regenerace svalu byla úplná. V těchto kontrolních svalech jsme neidentifikovali žádné X-gal⁺ buňky.



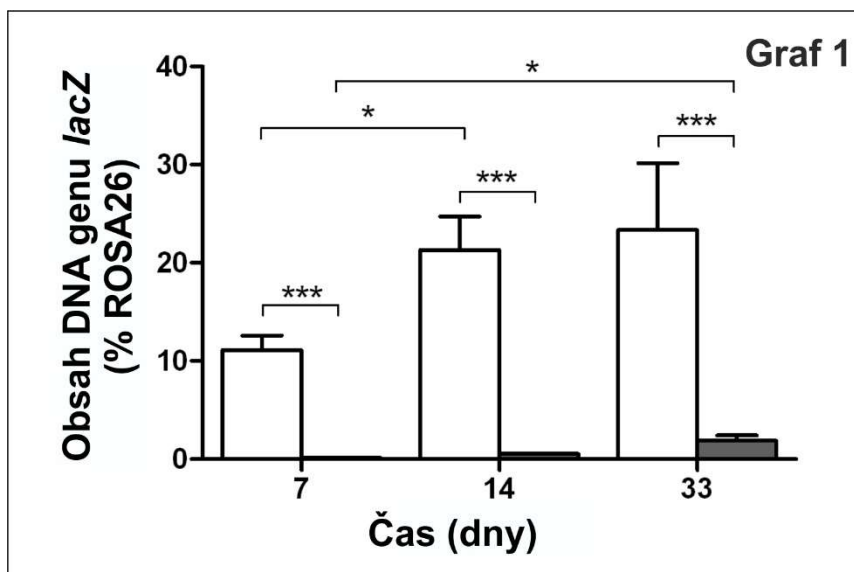
Obr. 11. **Histologická stavba poraněných svalů a histochemická detekce β galaktosidázy (v X-gal⁺ buňkách odvozených od BKD dárce) u myší kontrolních skupin.** U myší kontrolní skupiny, které byly celotělově letálně ozářené 4 h po poranění svalu, ale nebyla u nich provedena transplantace BKD, nepozorujeme v poraněných svalech žádné X-gal⁺ buňky ani známky regenerace (A). U druhé kontrolní skupiny, ve které bylo myším navozeno

poranění svalu bez následného ozáření a transplantace BKD, jsou 7 dní po injekci kardiotoxinu v oblasti poranění svalů vytvořeny nové myoblasty, myotuby a svalová vlákna s centrálně uloženými jádry (B). Řez na obrázku A je dobarven jádrovou červení, řez na obrázku B je obarven hematoxylinem a eozinem. Měřítka obrázku A je 200 μm a obrázku B je 50 μm .

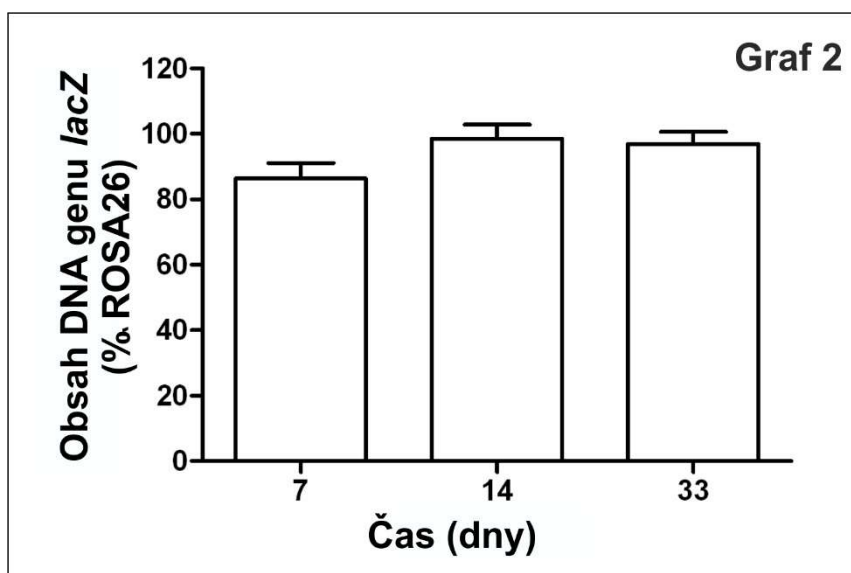
5.3.4. Analýza obsahu DNA genu *lacZ* ve svalech *m. tibialis ant.* a v kostních dřeních transplantovaných myší

Analýza obsahu DNA bakteriálního genu *lacZ* pomocí metody kvantitativní PCR potvrdila, že jádra buněk odvozených od dárce byla přítomna v poraněných svalech příjemců ve všech časových intervalech, tj. 7, 14 a 33 dní po transplantaci BKD (graf 1). Pozorovali jsme progresivní zvýšení obsahu DNA buněk dárce v poraněných svalech v průběhu času. Nejvyšší průměrná hodnota dosáhla 23 % obsahu DNA genu *lacZ* dárce, myši ROSA26, a to v poraněných svalech studovaných 33 dní po transplantaci. Statisticky významný nárůst byl u poraněných svalů mezi 7. a 14. dnem po transplantaci ($P < 0,05$). Zajímavým nálezem bylo zvýšení obsahu DNA genu *lacZ* v průběhu času v intaktních kontralaterálních svalech příjemců, přičemž statisticky významný byl mezi 7. a 33. dnem a mezi 14. a 33. dnem po transplantaci ($P < 0,05$). Celkově byl obsah DNA genu *lacZ* mnohokrát vyšší v poraněných svalech než v intaktních kontralaterálních svalech příjemců. Statisticky významný rozdíl byl prokázán mezi poraněnými a intaktními svaly ve všech časových intervalech, tj. 7, 14 a 33 dní po transplantaci ($P < 0,001$).

Obsah DNA bakteriálního genu *lacZ* jsme pomocí metody kvantitativní PCR analyzovali také v kostní dřeni tří transplantovaných myší z každé skupiny (graf 2). Výsledky potvrdily, že buňky odvozené od BKD dárce po transplantaci osídlily příjemce a nahradily endogenní BKD zničené letálním celotělovým ozářením. Statistickou analýzu těchto výsledků jsme neprovedli kvůli malému počtu myší v každé skupině. Nicméně je naprosto zřejmé, že hodnoty obsahu DNA buněk dárce v kostních dřeních příjemců se blížily 100 % obsahu DNA genu *lacZ* v kostních dřeních dárců, myší ROSA26. Výsledky tudíž prokázaly efektivnost transplantací BKD provedených v našich experimentech.



Graf 1. Analýza obsahu DNA genu *lacZ* metodou kvantitativní PCR v poraněných svalech (bílé sloupce) a v intaktních kontralaterálních svalech (šedé sloupce) transplantovaných myší 7, 14 a 33 dní po injekci kardiotoxinu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± střední chyba aritmetického průměru. Všechny hodnoty v grafu jsou statisticky významně odlišné ($P < 0,001$) od hodnot obsahu DNA genu *lacZ* v intaktních svalech dárců, myší ROSA26, který představuje 100 %. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$



Graf 2. Analýza obsahu DNA genu *lacZ* metodou kvantitativní PCR v kostních dřenech transplantovaných myší 7, 14 a 33 dní po injekci kardiotoxinu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± střední chyba aritmetického průměru. Obsah DNA genu *lacZ* v kostních dřenech dárců, myší ROSA26, představuje 100 %. Statistická analýza nebyla provedena z důvodů malého počtu myší v každé skupině ($N = 3$).

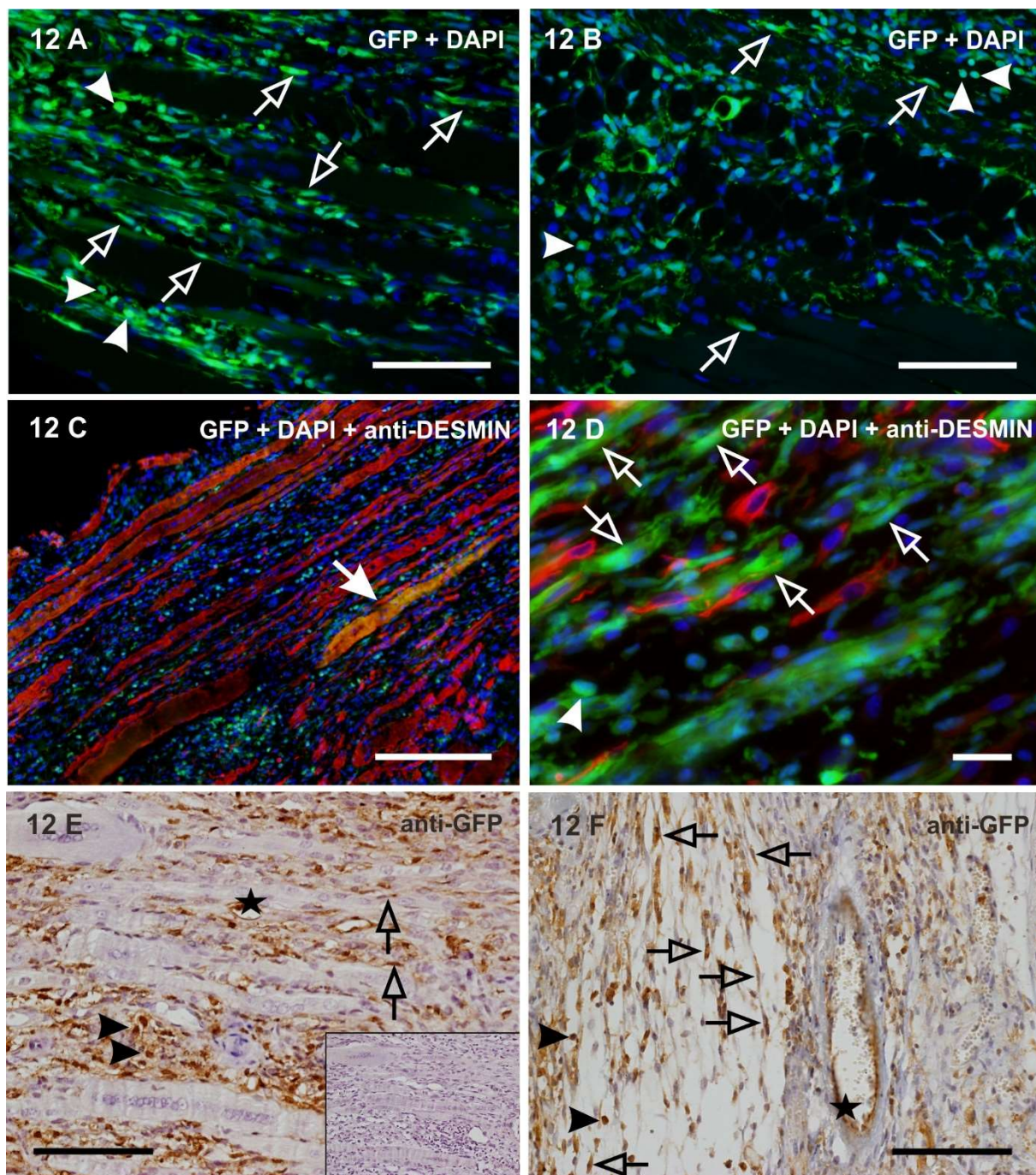
5.4. Detekce buněk pocházejících z kostní dřeně v intaktním a regenerujícím kosterního svalu myši

V této studii jsme intravenózně transplantovali myši GFP⁺ neseparované čerstvě izolované BKD celotělově letálně ozářeným imunokompetentním myším 4 týdny před poraněním kosterního svalu *m. tibialis ant.* příjemců injekcí kardiotoxinu.

5.4.1. Histologická stavba a ultrastruktura poraněných a kontralaterálních kosterních svalů ozářených a transplantovaných myši

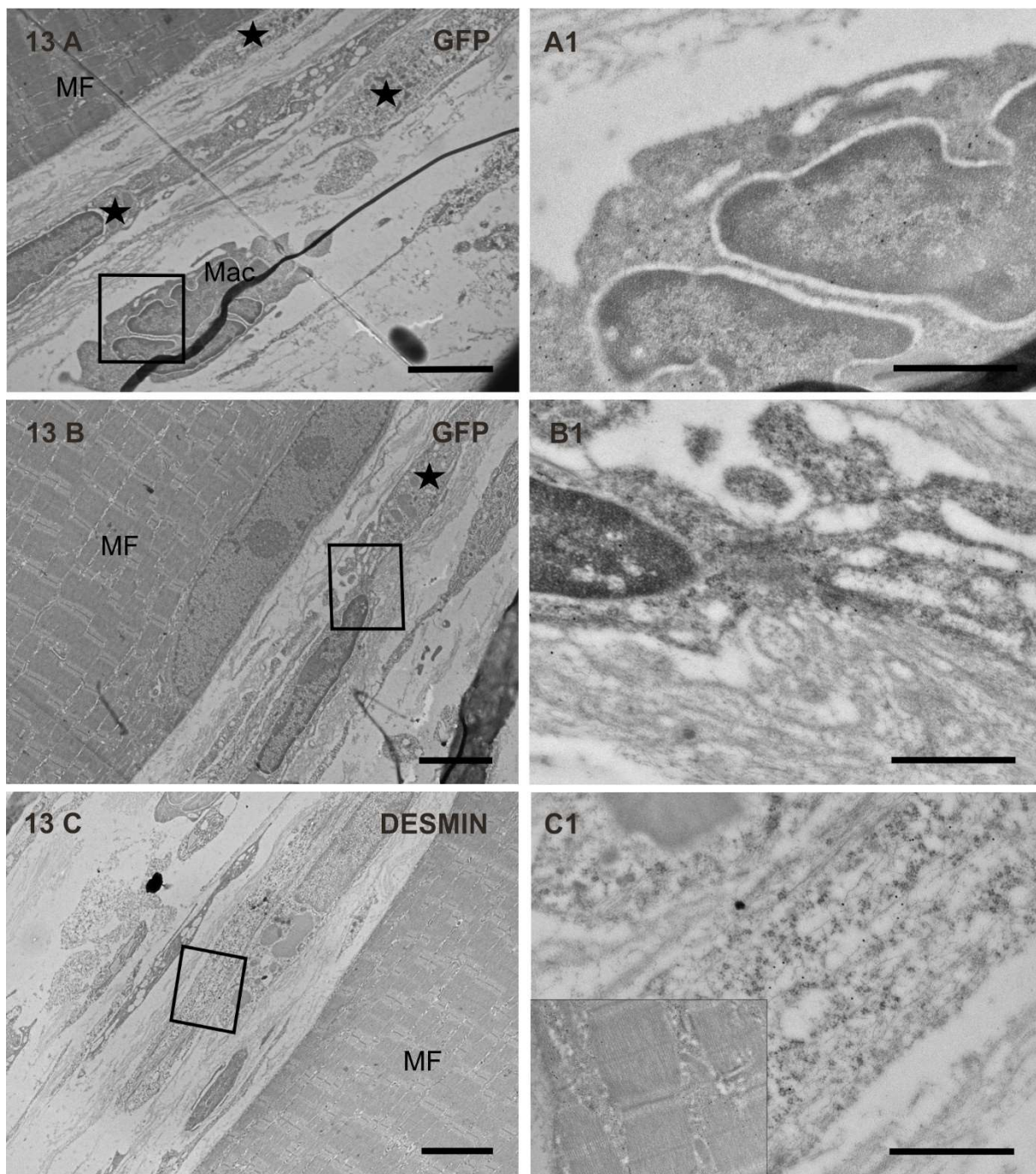
Sedm dní po intramuskulární injekci toxinu celotělově letálně ozářeným a transplantovaným myším byly v oblasti regenerace svalu přítomné novotvořené myoblasty, myotuby a nezralá svalová vlákna s jádry centrálně uloženými společně s četnými buňkami zánětlivého infiltrátu. Pozitivitu GFP jsme pozorovali v hojných buňkách imunitního systému, především v neutrofilech a makrofázích (obr. 12 A, B, D hrot šipky), což jsme potvrdili imunohistochemickou detekcí proteinu GFP na odparafinovaných (obr. 12 E, F hrot šipky) a také ultratenkých řezech (obr. 13 A, A1). Mnoho buněk nacházejících se ve vazivové tkáni endomysia vykazovalo fluorescenci GFP (obr. 12 1 A, B, D „prázdné“ šipky). Přestože měly vřetenovitý tvar, svalový marker desmin u nich nebyl detekován, a tudíž nenáležely k myogenní linii a nepředstavovaly myoblasty (obr. 12 D „prázdné“ šipky). Tyto GFP⁺ buňky endomysia jsme identifikovali na odparafinovaných řezech (obr. 12 E, F „prázdné“ šipky) a také na ultratenkých řezech. Jejich protáhlé tělo s jedním jádrem bylo uloženo paralelně s neporaněnými svalovými vlákny a obsahovalo jen málo organel (obr. 13 B, B1). Detekce desminu na kryorezech (obr. 12 C, D) a na ultratenkých řezech (obr. 13 C, C1) odhalila přítomnost vřetenovitých myoblastů v oblasti regenerace. Co je však důležité, pozitivita GFP a desminu se u vřetenovitých buněk nikdy nepřekrývala. Znamená to tedy, že v našich experimentech myoblasty nebyly odvozeny z transplantovaných BKD. Desmin byl imunohistochemicky prokázán také v myotubách a vyzářujících svalových vláknech, přičemž velmi vzácně jeho pozitivita kolokalizovala se slabým signálem GFP. Při malých zvětšeních jsme zaznamenali GFP⁺ struktury připomínající svalová vlákna (obr. 12 C šipka). Nicméně při větších zvětšeních bylo zřejmé, že se jedná o degenerovaná svalová vlákna vyplněná GFP⁺ makrofágy fagocytujícími nekrotickou sarkoplazmu. Překvapivým nálezem byly četné GFP⁺ fibroblasty šlachy poraněného svalu označované jako tendinocyty. Pozitivita GFP byla zřídka

zaznamenána ve stěně krevních cév, především v endotelových buňkách (obr. 12 E, F hvězdička), ale velmi vzácně také v některých jiných typech buněk vyskytujících se v hlubších vrstvách.



Obr. 12. Identifikace GFP⁺ buněk odvozených od BKD dárců v poraněných svalech příjemců pomocí fluorescence GFP (zeleně; A, B, C, D) a metodou imunohistochemické detekce GFP (hnědě; E a F). V regenerujících svalech 7 dní po poranění je pozitivita GFP pozorována v početných buňkách imunitního systému, především v makrofázích (A, B, D, E, F hrot šipky), v některých buňkách vřetenovitého tvaru

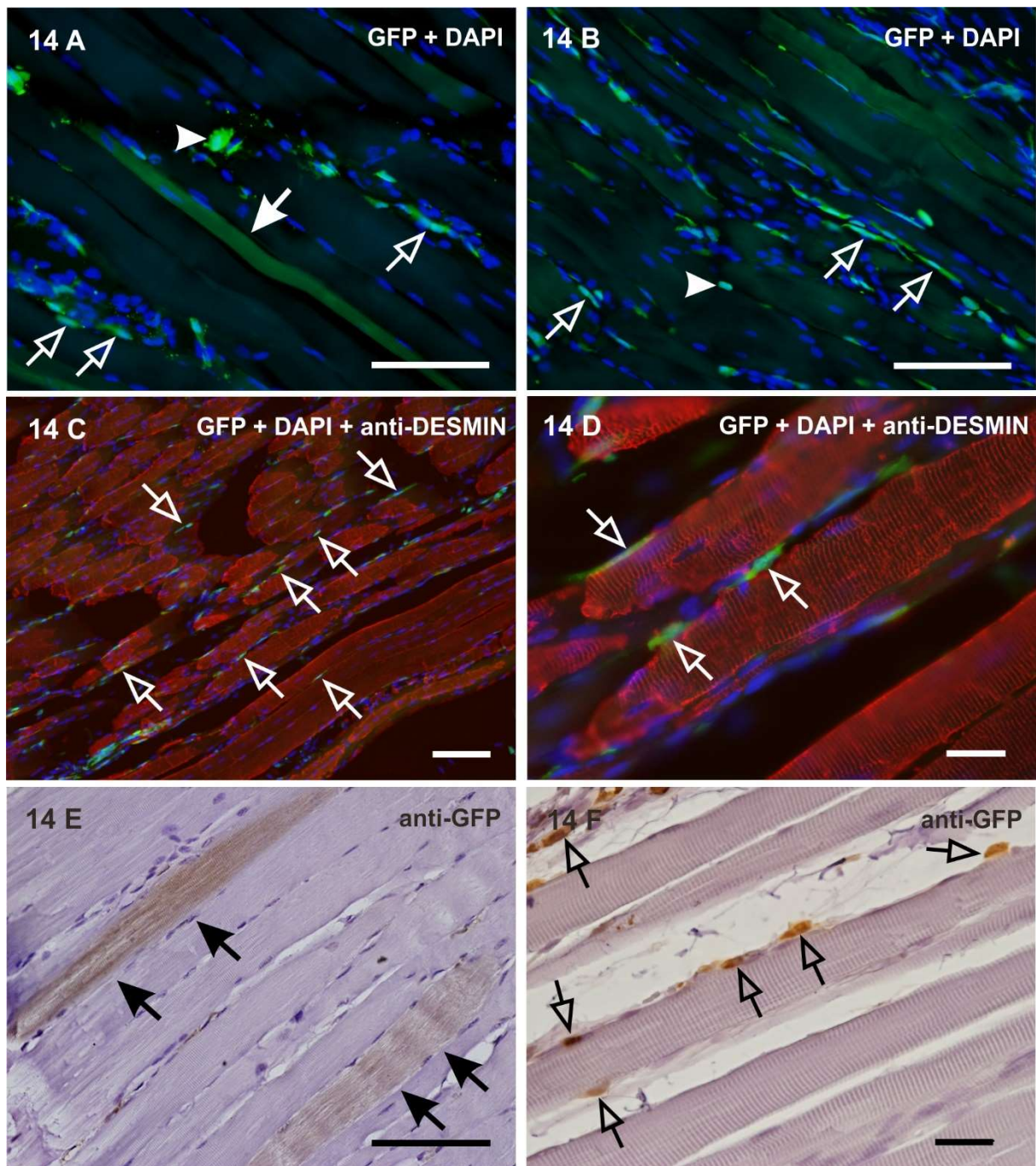
vyskytujících se v endomysiu (A, B, D, E, F „prázdné šipky“) a vzácně v endotelových buňkách krevních cév (E, F hvězdičky). Šipka v obrázku C ukazuje na degenerované desmin⁺ svalové vlákno naplněné GFP⁺ makrofágy fagocytujícími nekrotickou sarkoplazmu. Výřez v obrázku E zachycuje negativní kontrolu k imunohistochemické detekci GFP, kdy byla vynechána inkubace s primární protilátkou. Řezy na obrázcích A, B, C a D jsou dobarveny DAPI, na obrázcích E a F hematoxylinem. Měřítko obrázků A, B, E, a F je 200 μm , obrázku C je 400 μm a obrázku D je 50 μm .



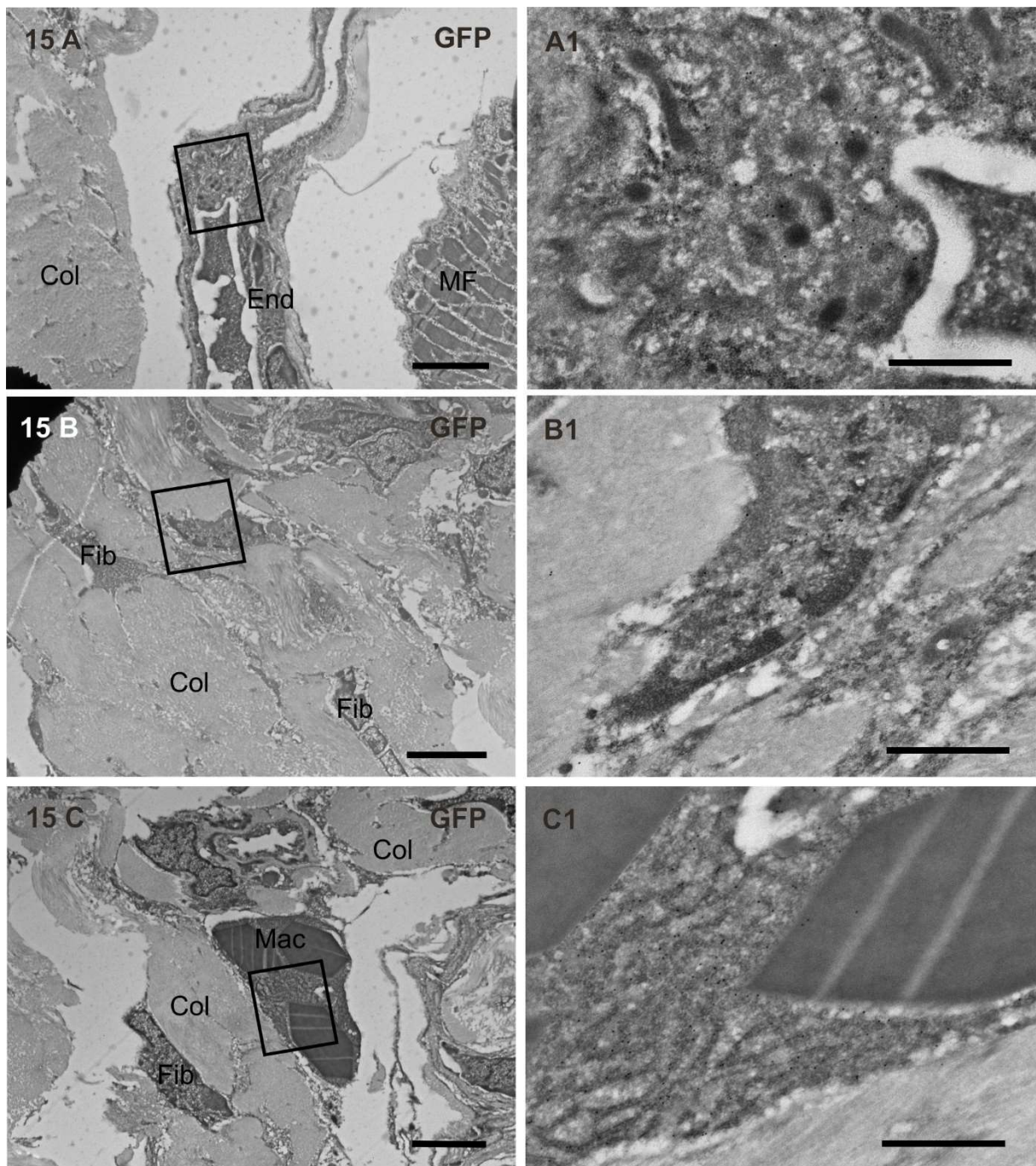
Obr. 13. Identifikace GFP⁺ buněk odvozených od BKD dárců v poraněných svaích příjemců metodou imunohistochemické detekce GFP v transmisní elektronové mikroskopii (A, B) – 7 dní po injekci

kardiotoxinu. Obdélníkové oblasti v obrázcích A, B a C jsou zvětšeny v obrázcích A1, B1 a C1, kde jsou viditelné 18 nm partikule zlata konjugované se sekundární protilátkou. Obrázek A zachycuje GFP⁺ makrofág (Mac). Protáhlé buňky v blízkosti svalového vlákna (MF) označené hvězdičkou také vykazují imunopozitivitu GFP. Podobné GFP⁺ protáhlé buňky vyskytující se hned vedle svalového vlákna v endomysiu jsou nasnímány na obrázku B. Obrázek C ukazuje imunohistochemickou detekci desminu. Protáhlé buňky v sousedství svalového vlákna jsou desmin pozitivní. Ve výřezu v obrázku C1 je viditelná imunopozitivita desminu v intaktním svalovém vláknu. Měřítka obrázků A, B a C je 3 μm a obrázků A1, B1 a C1 je 1 μm .

Dvacet osm dní po injekci toxinu byly poraněné svaly celotělově letálně ozářených a transplantovaných myší plně zregenerované. Oblast poranění jsme odhadovali podle menších průměrů regenerovaných svalových vláken, nicméně jejich jádra se již nacházela na periferii podobně jako u intaktních svalových vláken. Počet GFP⁺ buněk imunitního systému výrazně klesl ve srovnání s jejich množstvím v regenerujících svalech vyšetřovaných 7 dní po injekci toxinu (obr. 14 A, B, hroty šipek, obr. 15 C, C1). Vřetenovité buňky endomysia představovaly populaci, která vykazovala pozitivitu GFP nejčastěji (obr. 14 A, B, C, D, F „prázdné“ šipky). Na kryorezech i na odparafinovaných řezech se nám podařilo nalézt GFP⁺ svalová vlákna, jejichž četnost výskytu po transplantaci BKD byla popsána jako velmi nízká (obr. 14 A, E šipky). Pozitivitu GFP jsme zaznamenali v několika tendinocytech ve šlaše (obr. 15 B, B1) a vzácně v endotelových buňkách krevních cév (obr. 15 A, A1) podobně jako u regenerujících svalů hodnocených 7 dní po navození poranění.

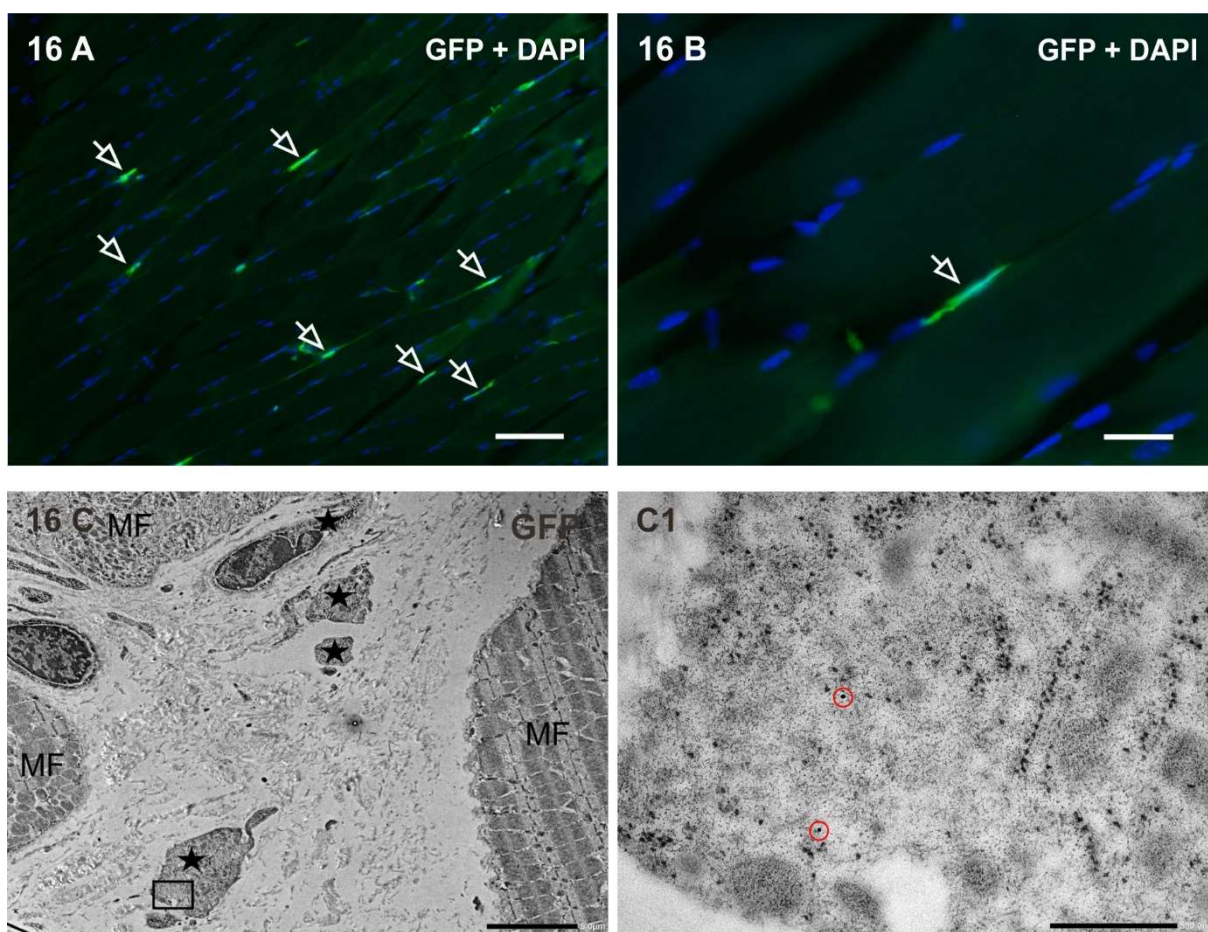


Obr. 14. Identifikace GFP⁺ buněk odvozených od BKD dárců v poraněných svaích příjemců pomocí fluorescence GFP (zeleně; A, B, C, D) a metodou imunohistochemické detekce GFP (hnědě; E a F). V regenerovaných svaích 28 dní po poranění jsou GFP⁺ buňky imunitního systému (A a B hrot šipky) a GFP⁺ vřetenovité buňky endomysia (A, B, C, D a F „prázdné šipky“) méně početné než v poraněných svaích 7 dní po injekci kardiotoxinu, zatímco vzácné GFP⁺ endotelové buňky (Obr. 15 A) jsou stále detekované. Na obrázcích A a E jsou zachycena GFP⁺ svalová vlákna (šipky) dokládající zajímavý fenomén participace BKD na regeneraci kosterního svalu. Řezy na obrázcích A, B, C a D jsou dobarveny DAPI, na obrázcích E a F hematoxylinem. Měřítka obrázků A, B a E je 200 μm , obrázků C je 400 μm a obrázků D a F je 50 μm .

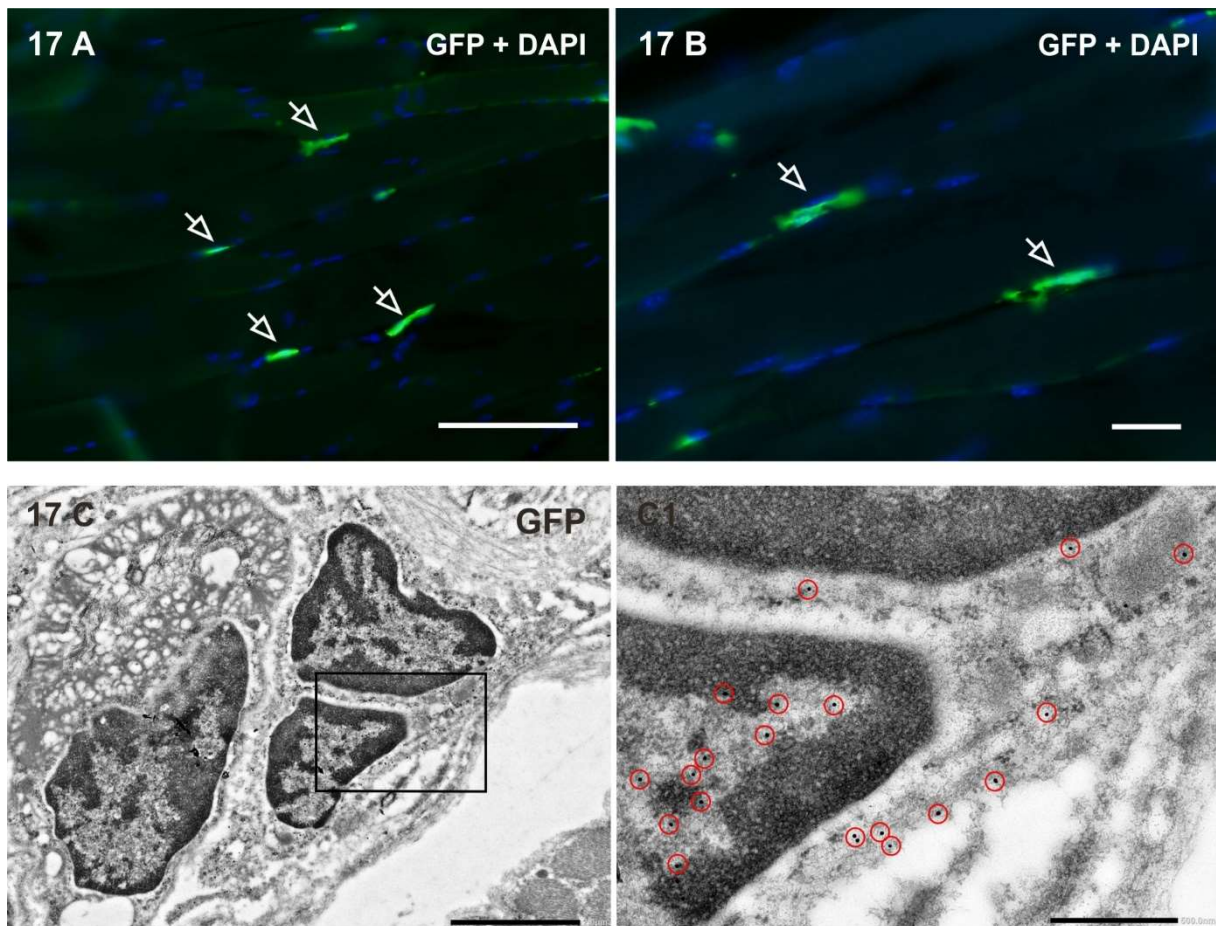


Obr. 15. Identifikace GFP⁺ buněk odvozených od BKD dárců v poraněných svaích příjemců metodou imunohistochemické detekce GFP v transmisní elektronové mikroskopii (A, B, C) – 28 dní po injekci *kardiotoxinu*. Obdélníkové oblasti v obrázcích A, B a C jsou zvětšeny v obrázcích A1, B1 a C1, kde jsou viditelné 18 nm partikule zlata konjugované se sekundární protilátkou. Obrázek A ukazuje GFP⁺ endotelovou buňku krevní cévy (End) vyskytující se mezi svalovým vláknem (MF) a svazkem kolagenních vláken (Col). Šlacha svalu obsahuje fibroblasty, tzv. tendinocyty (B; Fib), z nichž některé vykazují imunopozitivitu GFP. Obrázek C zachycuje GFP⁺ makrofág nacházející se v oblasti šlachy svalu. Měřítko obrázků A, B a C je 3 μ m a obrázků A1, B1 a C1 je 1 μ m.

V kontralaterálních kosterních svalech celotělově letálně ozářených a transplantovaných myší jsme pozitivitu GFP pozorovali v nečetných buňkách imunitního systému, hlavně v makrofázích a v občasných vřetenovitých buňkách endomysia v obou studovaných časových intervalech, tj. 7 i 28 dní po navození poranění svalu (obr. 16, 17). Ve vzorcích získaných z našich experimentů jsme GFP nedetekovali ve svalových vláknech ani v krevních cévách.



Obr. 16. Identifikace GFP⁺ buněk odvozených od BKD dárců v kontralaterálních (neporaněných) svalech příjemců pomocí fluorescence GFP (zeleně, A, B) a metodou imunohistochemické detekce GFP v transmisní elektronové mikroskopii (C) – 7 dní po injekci kardiotoxinu. V kontralaterálních svalech transplantovaných myší je pozitivita GFP pozorována vzácně v buňkách imunitního systému a také ve vřetenovitých buňkách endomysia (A a B „prázdné šipky“). Obdélníková oblast v obrázku C je zvětšena v obrázku C1, kde jsou viditelné 18 nm partikule zlata konjugované se sekundární protilátkou (zvýrazněny červeným kroužkem). Na obrázku C buňky vyskytující se v endomysiu mezi svalovými vlákny (MF) označené hvězdičkou vykazují imunopozitivitu GFP. Řezy na obrázcích A a B jsouobarveny DAPI. Měřítko obrázku A je 200 μ m, obrázku B je 50 μ m, obrázku C je 5 μ m a obrázku C1 je 500 nm.

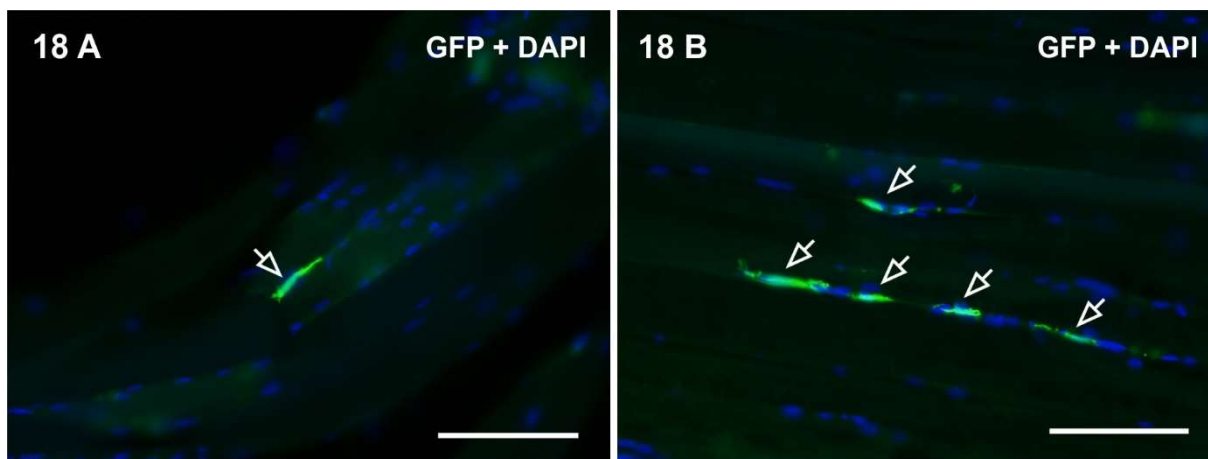


Obr. 17. Identifikace GFP⁺ buněk odvozených od BKD dárců v kontralaterálních (neporaněných) svalech příjemců pomocí fluorescence GFP (zeleně, A, B) a metodou imunohistochemické detekce GFP v transmisní elektronové mikroskopii (C) – 28 dní po injekci kardiotoxinu. Stejně jako v kontralaterálních svalech transplantovaných myší vyšetřených 7 dní po injekci kardiotoxinu jsou v kontralaterálních svalech hodnocených 28 dní po navození poranění jako GFP⁺ identifikovány nečetné buňky imunitního systému a vřetenovité buňky endomysia (A a B „prázdné šipky“). Obdélníková oblast v obrázku C je zvětšena v obrázku C1, kde jsou viditelné 18 nm partikule zlata konjugované se sekundární protilátkou (zvýrazněny červeným kroužkem). Na obrázku C je zachycena buňka v endomysiu vykazující imunopozitivitu GFP. Řezy na obrázcích A a B jsou dobarveny DAPI. Měřítka obrázku A je 200 μm , obrázku B je 50 μm , obrázku C je 2 μm a obrázku C1 je 500 nm.

5.4.2. Histologická stavba kosterních svalů bez navozeného poranění ozářených a transplantovaných myší

Intaktní kosterní svaly myší této kontrolní skupiny byly vyjmuty ve stejných časových intervalech jako poraněné kosterní svaly, tj. 5 a 8 týdnů po celotělovém letálním ozáření a transplantaci BKD (obr. 18). GFP protein jsme v intaktních svalech detekovali v obou

časových intervalech jen v nečetných vřetenovitých buňkách endomysia a zřídka v buňkách imunitního systému, hlavně v makrofázích. V našich vzorcích jsme nezaznamenali pozitivitu GFP ve svalových vláknech ani v krevních cévách.



Obr. 18. Identifikace GFP⁺ buněk odvozených od BKD dárců v intaktních svalech příjemců kontrolní skupiny, u které nebylo navozeno poranění svalu, pomocí fluorescence GFP (zeleně) – 5 týdnů (A) a 8 týdnů (B) *po transplantaci*. V intaktních svalech příjemců této kontrolní skupiny je GFP identifikován vzácně ve vřetenovitých buňkách nacházejících se v endomysiu (A a B „prázdné šipky“) a v buňkách imunitního systému. Řezy na obrázcích A a B jsou dobarveny DAPI. Měřítko obou obrázků je 50 μ m.

5.4.3. Histologická stavba poraněných kosterních svalů myší bez ozáření a transplantace BKD

Histologická stavba poraněných svalů myší kontrolní skupiny, které nebyly celotělově ozářeny ani transplantovány, odpovídala stavbě poraněných svalů shodné kontrolní skupiny popsané v rámci předchozí studie v kapitole 5.3.3. V poraněných svalech této kontrolní skupiny jsme v obou časových intervalech, tj. 7 a 28 dní po injekci toxinu, nezaznamenali žádnou pozitivitu GFP.

6. DISKUSE

6.1. Nestin, desmin a vimentin v intaktním a regenerujícím kosterním svalu zadní končetiny potkana

V této studii jsme použili model regenerace kosterního svalu heterochronní isotransplantací zavedenou Jirmanovou a Soukupem (1995), při které je proces regenerace iniciován po úplné nekróze štěpu způsobené přechodnou ztrátou jeho krevního zásobení. Podobně jako při jiných příčinách ischemické nekrózy svalová vlákna degenerují, přičemž jejich bazální laminy obvykle přetrvávají a slouží jako jakési lešení pro regeneraci. Satelitové buňky, které zůstávají intaktní a viabilní, jsou aktivovány během degenerace svalových vláken. Nekrotická sarkoplazma degenerovaných svalových vláken je odstraněna makrofágy, které se také podílejí na aktivaci satelitových buněk sekrecí růstových faktorů (Lescaudron et al., 1999). Po revaskularizaci štěpu proces regenerace rekapituluje vývojové fáze. Satelitové buňky proliferují, diferencují se v myoblasty, které fúzí za vzniku myotub postupně vyžívají ve svalová vlákna. Štěp je reinervován z okolního svalu během druhého týdne po transplantaci (Soukup a Novotová, 2000). Regenerace postupuje podle určitého gradientu, začíná na periférii transplantovaného svalu a pokračuje dovnitř společně s průběhem revaskularizace. Tento gradient je příčinou vzniku zón, které se liší vyžívostí regenerujících svalových elementů. Proto můžeme pozorovat novotvořené myoblasty i vyžívá svalová vlákna ve stejném časovém intervalu po transplantaci. Transplantované svaly jsou dobře rozlišitelné díky jejich zachovalému epimyziu a menšímu průměru regenerovaných svalových vláken. Přesné ohraničení oblasti regenerace považujeme za velkou výhodu tohoto modelu.

Naše výsledky jsou v souladu s výše citovanými studiemi popisujícími heterochronní isotransplantaci (Jirmanová a Soukup, 1995; Soukup a Novotová, 2000). Sedm dní po transplantaci byl štěp bohatě vaskularizován a sestával se z novotvořených myotub nebo svalových vláken s centrálně uloženými jádry, ale postrádal inervaci. Šestnáct dní po transplantaci byly regenerované nervy již přítomné a u mnoha novotvořených svalových vláken se jejich jádra přesouvala k periférii. Vyžívající svalová vlákna ve štěpech vyšetřovaných 21 a 29 dní po transplantaci se lišila od dospělých intaktních jen svým menším průměrem.

Intermediární filamentum nestin bylo poprvé identifikováno Hockfieldem a McKayem (1985), kteří vytvořili primární monoklonální myši protilátku proti nestinu, klon Rat-401, která se díky své spolehlivosti dosud používá. Imunopozitivitu nestinu zaznamenali v neurální trubici v 11. dni embryonálního vývoje potkana, zatímco v pozdějších vývojových fázích pouze v radiálních gliích. Zajímavým nálezem byla imunoreaktivita nestinu ve Schwannových buňkách periferních nervů a také v buňkách myotomů v 11. dni embryonálního vývoje a v myoblastech a myotubách vyvíjejících se svalů. Podle Lendahla et al., (1990) stopy mRNA nestinu ve vyvíjejícím se kosterním svalu představovaly jedinou expresi pozorovanou vně vyzárajícího centrálního nervového systému. Později díky zlepšujícím se detekčním metodám byla exprese nestinu popsána v mnoha dalších embryonálních a fetálních tkáních, např. v presomitickém mezodermu (Zimmerman et al., 1994), mesonefrickém mezenchymu (Fröjdman et al. 1997), vyvíjejících se kardiomyocytech (Kachinski et al., 1995), endotelu vyvíjejících se krevních cév (Mokrý a Němeček, 1998a; Mokrý et al., 2004), ve vyzárajících zubech (Terling et al., 1995), buňkách čočky během vývoje oka (Mokrý a Němeček, 1998b; Yang et al., 2000) a diferencujících se podocytech ledviny (Bertelli et al., 2007) atd. Jednou z nejcharakterističtějších vlastností nestinu je jeho reexprese v situacích, kdy dochází k reprodukci vývojových fází. Proto lze nestin identifikovat v různých dospělých tkáních za fyziologických i patologických podmínek (Wiese et al., 2004; Michalchuk a Ziman, 2005; Lindqvist et al., 2016; Bernal a Arranz, 2018).

6.1.1. Nestin ve svalových buňkách a vláknech

Satelitové buňky jsou myogenními prekurzory *in vivo*. Mají schopnost tvořit jak nová svalová vlákna, tak i nové satelitové buňky. Splňují tedy základní definici kmenových buněk, protože produkují diferencované potomstvo a udržují svoje množství sebeobnovou (Zammit et al., 2006; Sacco et al., 2008; Yin et al., 2013; Bentzinger et al., 2013; von Maltzahn et al., 2013; Mashinchian et al., 2018; Schmidt et al., 2019). Satelitové buňky lze jednoznačně identifikovat v transmisním elektronovém mikroskopu podle jejich umístění mezi plazmatickou membránou svalového vlákna a bazální laminou (Mauro et al., 1961). Přestože vykazují další morfologické znaky, např. zvýšený poměr velikosti jádra k množství cytoplazmy, redukované množství organel, jádro, ve kterém je kondenzovaný interfázický chromatin, jejich identifikace ve světelné mikroskopii na řezech obarvených hematoxylinem

a eozinem je relativně problematická (Yin et al., 2013). Nicméně dosud nestin nebyl v satelitových buňkách prokázán na úrovni světelné ani elektronové mikroskopie.

Nestin jsme detekovali v diferencujících se myotubách a v nezralých svalových vláknech 7 dní po transplantaci. V průběhu regenerace se jeho výskyt snižoval, přičemž 16 a 21 dní po transplantaci jsme tento protein prokázali jen zřídka v novotvořených svalových vláknech. Naše výsledky tedy ilustrují „downregulaci“ nestinu během diferenciací svalových elementů, jež byla popsána jako charakteristický znak tohoto intermediárního filamenta při normálním vývoji (Sejersen a Lendahl, 1993; Carlsson et al., 1999; Pallari et al. 2011) a při regeneraci (Vaittinen et al., 2001; Aarimaa et al., 2004; Čížková et al., 2009a; Lindqvist et al., 2017). Expresi nestinu během regenerace kosterního svalu po experimentálním navození poranění poprvé popsali Vaittinen et al. (2001). Výskyt nestinu v myogenních prekurzorech zaznamenali již 6 hodin po indukci poranění intramuskulární injekcí notexinu i protětim svalu. Maximální expresi tohoto proteinu zjistili 3. až 5. den po poranění, kdy myoblasty fúzovaly ve štíhlé mnohojaderné myotuby. Od 7. dne se exprese nestinu postupně snižovala. Po 28. dni se vrátila k hodnotám srovnatelným s kontrolními intaktními svaly a imunohistochemicky byla prokázána jen v oblastech motorických plotének a myotendinózních spojení. Imunoreaktivitu nestinu v intaktních svalových vláknech jsme v oblastech motorických plotének také zaznamenali. Naše výsledky jsou tudíž v souladu se studií Vaittinen et al. (2001) i dalších (Carlsson et al., 1999; Vaittinen et al., 1999; Kang et al., 2007).

Silnou imunoreaktivitu nestinu jsme pozorovali v malých buňkách situovaných na periférii vyzářajících nestin negativních svalových vláken ve štěpech vyšetřovaných 16, 21 a 29 dní po transplantaci. Podle velikosti a umístění představovaly tyto buňky myoblasty vytvořené po pozdější aktivaci satelitových buněk nacházejících se na povrchu novotvořených primárních myotub nebo svalových vláken. Tyto myoblasty posléze fúzí s primárními strukturami (Soukup et al., 1993; Zelená a Soukup, 1993; Soukup a Thornell, 1997).

Imunopozitivita nestinu v novotvořených myotubách ve štěpech vyšetřených 7 dní po transplantaci nebyla uniformní. Některé myotuby byly homogenně pozitivní, zatímco jiné měly nejsilnější signál v jednom místě na periférii a jeho intenzita se snižovala směrem k opačné straně vlákna. Fenomén této „lateralizace“ pozorovaný v diferencujících se myotubách a svalových vláknech pravděpodobně představuje mechanismus, jakým se nestin eliminuje z vyzářajících svalových vláken. Během vývoje kosterního svalu je nestin „downregulován“ a v dospělých svalových vláknech se vyskytuje jen v oblastech motorických

plotének a myotendinózních spojeních (Carlsson et al., 1999; Vaittinen et al., 1999; Nazarian et al., 2005; Kang et al., 2007; Čížková et al., 2009a; Mohseni et al., 2011). Ve zralých svalových vláknech příjemců jsme také zaznamenali oblasti odpovídající motorickým ploténkám, které vykazovaly silný signál nestinu ve fokálním vyklenutí sarkoplazmy. Imunoelektronová mikroskopie odhalila, že se nestin nachází mezi postjuncčními záhyby a subneurálním jádrem a mezi tímto jádrem a myofibrilami pod ním (Carlsson et al., 1999). Intenzita a distribuce výskytu nestinu v oblastech motorických plotének je zjevně regulována inervací (Vaittinen et al., 1999; Kang et al., 2007). Po denervaci se v nestin pozitivních segmentech svalových vláken v blízkosti motorických plotének začne zvyšovat exprese nestinu a normální distribuce tohoto proteinu je obnovena po reinervaci (Vaittinen et al., 1999). Zajímavé je, že v dospělém svalu se mRNA nestinu syntetizuje selektivně v subsynaptických jádrech svalových vláken (Kang et al., 2007). Mohseni et al., (2011) prokázali, že nestin je nezbytný pro normální stavbu a funkci motorických plotének, neboť myši s funkčně inaktivovaným genem pro nestin jsou sice viabilní a vykazují normální vývoj centrálního nervového systému, ale zhoršenou motorickou koordinaci, jež je způsobena abnormalitami v rozptýlení klastrů receptorů pro acetylcholin v motorických plotenkách (Bernal a Arranz, 2018). Domníváme se tedy, že fenomén „lateralizace“ nestinu ve vyvíjejících se svalových elementech naznačuje změnu distribuce tohoto proteinu v průběhu diferenciaci – z celé sarkoplazmy v myoblastech do oblastí motorických plotének v dospělých svalových vláknech. Tuto naši domněnku částečně potvrdili Yang et al. (2011), kteří zaznamenali podobný fenomén ve vyvíjejících se svalových vláknech kosterního svalu končetiny myši v 18. dni embryonálního vývoje a ve své studii potvrdili, že nestin je potřebný při vývoji motorických plotének ke správnému rozptýlení klastrů receptorů pro acetylcholin, které je indukované acetylcholinem a závislé na kináze Cdk5. Nestin jsme také detekovali v myotendinózních spojeních na koncích svalových vláken, kde byla jeho exprese rovněž popsána (Carlsson et al., 1999; Vaittinen et al., 1999). Ve vyzárajících svalových vláknech štěpů i v oblastech myotendinózních spojeních a motorických plotének, zvláště pod subneurálními jádry, dospělého svalu vykazoval nestin příčné pruhování, což bylo v souladu s prací Carlsson et al. (1999), kteří zdokumentovali lokalizaci nestinu na úrovni Z proužků myofibril.

V kosterních svalech příjemců jsme nestin detekovali v mnoha svalových vláknech v bezprostředním okolí štěpů vyšetřovaných 7 dní po transplantaci, přičemž některá z nich měla jádra uložená centrálně. V blízkosti štěpů hodnocených 16, 21 a 29 dní po transplantaci svalová vlákna příjemců imunopozitivitu nestinu nevykazovala. V souladu s Vaittinen et al. (2001)

předpokládáme, že při transplantaci došlo k mechanickému poranění svalových vláken příjemců v sousedství štěpů nebo jejich inervace a tím ke stimulaci jejich regenerace. Dalším vysvětlením výskytu nestinu ve svalových vláknech příjemců je možnost difúze růstových faktorů, které spouští regeneraci, do okolí štěpů, kde indukují změny specifické pro regeneraci včetně modifikace distribuce intermediárních filament.

6.1.2. Desmin a vimentin ve svalových buňkách a vláknech

Vyzávající myotuby a svalová vlákna štěpů vyšetřovaných 7 dní po transplantaci vykazovaly imunopozitivitu desminu a slaběji také vimentinu, zatímco svalové elementy ve štěpech odebraných 16, 21 a 29 dní po transplantaci byly jen desmin pozitivní. Tyto nálezy jsou ve shodě se studiemi demonstrujícími „downregulaci“ vimentinu a „upregulaci“ desminu během vývoje kosterního svalu (Gard a Lazarides, 1980; Sejersen a Lendahl, 1993) a při regeneraci (Bornemann a Schmalbruch, 1992; Vaittinen et al., 2001).

Desmin představuje hlavní intermediární filamentum vyskytující se v buňkách a vláknech kosterní svaloviny, v kardiomyocytech i v hladkých svalových buňkách, a proto je využíván jako marker myogenních elementů. V příčně pruhovaných svalovinách, ve vláknech kosterního svalu a v kardiomyocytech, obklopuje a propojuje myofibrily a připojuje periferní myofibrily k sarkolemě (Carlsson a Thornell, 2001). V hladkých svalových buňkách se vyskytuje mezi denzními tělísky (Meshner a Junqueira, 2018). Desmin je první protein specifický pro sval, který se objevuje při vývoji, a to během diferenciací myotomů (Bignami a Dahl, 1984). Posléze se exprimuje v časných myoblastech, které také obsahují vimentin. Další myogenní specifické proteiny jako je aktin, myosin, titin a myomesin se objevují až v postmitotických myoblastech (Fürst et al., 1989). Přesto překvapivě jeho absence u myší s funkčně inaktivovaným („knockout“) genem pro desmin neovlivňuje myogenezi ani myofibrilogenezi (Carlsson a Thornell, 2001). Nicméně postnatálně vede jeho nepřítomnost k multisystémovým poruchám v kosterní, srdeční i hladké svalovině. V kosterních svalových vláknech vznikají strukturální abnormality jako poruchy v uspořádání myofibril nebo fokální degenerativní změny (Li et al. 1997). Po injekci kardiotoxinu je indukovaná regenerace kosterního svalu opožděná oproti kontrolním geneticky nemodifikovaným myším a v oblasti poranění dochází k akumulaci adipocytů a perzistenci svalových vláken o malém průměru, která exprimují vývojové izoformy myosinu (Agbulut et al., 2001). Poruchy týkající se

intermediárního filamenta desminu se vyskytují i u člověka a označují se jako desminopatie (Carlsson a Thornell, 2001; Hnia et al., 2015).

Vimentin je intermediární filamentum charakteristické pro buňky mezenchymového původu, které poprvé identifikovali Franke et al. (1978). Exprimuje se již v oblastech budoucích myotomů v somitech, ve kterých dosud nejsou žádné myogenní specifické proteiny. V myoblastech je přítomný společně s desminem, ale postupně mizí z myotub (Barbet et al., 1991; Fürst et al., 1989; Güttsches et al., 2015). Vaittinen et al. (2001) detekovali vimentin spolu s nestinem v myogenních prekurzorech již 6 hodin a v myoblastech 12 hodin po indukci poranění intramuskulární injekcí notexinu i protětím svalu. Podobně jako nestin, vimentin se maximálně expimoval 3. až 5. den po poranění a poté se jeho exprese postupně snižovala. V dospělých svalových vláknech se vimentin nevyskytuje (Fürst et al., 1989; Barbet et al., 1991; Sejersen and Lendahl, 1993), ale je detekován ve fibroblastech vazivové tkáně tvořící obaly endomysium, perimysium a epimysium a ve stěně krevních cév, jmenovitě v endotelových buňkách a ve vaskulární hladkých svalových buňkách (Franke et al., 1978; Gabbiani et al., 1981). Vimentin se také exprimuje ve Schwannových buňkách periferních nervů (Autilio-Gambetti et al., 1982; Chiu et al., 1988). Funkce vimentinu během vývoje a regenerace kosterního svalu nejsou dosud objasněny. Přestože myši s funkčně inaktivovaným genem pro vimentin vykazují normální myogenezi a vývoj a rozmnožují se bez zjevného patologického fenotypu, vimentin se pravděpodobně podílí na organizaci mnoha klíčových proteinů souvisejících s buněčnou adhezí, migrací a signalizací (Colucci-Guyon et al., 1994; Ivaska et al., 2007; Battaglia et al., 2018).

6.1.3. Nestin v krevních cévách

Revaskularizace štěpu představuje klíčový krok v průběhu regenerace kosterního svalu. Nestin jsme detekovali v endotelových buňkách kapilár nebo menších krevních cév vrůstajících do štěpů a v blízkosti štěpů vyšetřovaných 7 dní po transplantaci, zatímco 16, 21 a 29 dní po transplantaci nestin pozitivní endotelové buňky byly nacházeny jen zřídka. Imunoreaktivita nestinu byla tedy omezena na nezralé endotelové buňky cév tvořených během procesu revaskularizace. V endotelových buňkách cév ve štěpech v pokročilejších stádiích byl nestin jednoznačně „downregulován“ nebo úplně vymizel jako v intaktním dospělém kosterním sval. Expresa nestinu v endotelových buňkách byla poprvé zaznamenána v krevních cévách zásobujících centrální nervový systém (Tohyama et al., 1992; Frisen et al., 1995), nádory

(Tohyama et al., 1992; Dahlstrand et al., 1992; Kim et al., 2002; Sugawara et al. 2002) a vyvíjející se končetinový pupen myši (Wroblewski et al., 1997). Mokrý a Němeček (1998a, 1998b, 1999) popsali expresi nestinu v endotelových buňkách novotvořených krevních cév v mnoha potkaních intraembryonálních tkáních a orgánech, v extraembryonálních tkáních jako je placenta a také při neovaskularizaci potkaního dospělého mozku po neurální transplantaci. Později Mokrý et al. (2004) potvrdili, že nestin lze považovat za marker nezralých endotelových buněk krevních cév tvořených při neovaskularizaci nebo revaskularizaci dospělých lidských tkání a orgánů. Přítomnost tohoto proteinu imunohistochemicky prokázali v cévním řečišti mnoha lidských fetálních tkání a orgánů, corpus luteum dospělého lidského ovaria, jež představuje dočasnou endokrinní žlázu vznikající spolu se svým cévním zásobením v odpovědi na fyziologickou hormonální stimulaci, a mnoha nádorů pacientů, např. glioblastomu a melanomu (Mokrý et al. 2004). V oblasti infarktu myokardu, kde dochází na hranici nekrotické a nepostižené tkáně k regeneraci, zaznamenali v endotelových buňkách cév vrůstajících do nekrotické tkáně současnou expresi nestinu a proliferačního markeru PCNA dokládající nezralý fenotyp těchto buněk (Mokrý et al., 2004, 2008). V kosterním svalu byla exprese nestinu v nezralých endotelových buňkách popsána během vývoje (Sejersen a Lendahl, 1993; Wroblewski et al., 1997; Carlsson et al., 1999) a v rhabdomyosarkomech (Kobayashi et al., 1998). Naše nálezy tudíž demonstrují, že se nestin vyskytuje v diferencujících se endotelových buňkách krevních cév také během regenerace potkaního kosterního svalu. Přestože je v poslední době publikována řada prací využívajících nestin jako spolehlivý marker endotelových buněk novotvořených krevních cév v různých tkáních a orgánech v různých situacích indukujících neovaskularizaci nebo revaskularizaci, Dusart et al. (2018) došli překvapivě k závěru, že se nestin exprimuje ve všech dospělých lidských endotelových buňkách krevních cév nezávisle na jejich proliferaci. Nicméně, nelze si nepovšimnout, že autoři tohoto článku pro imunohistochemickou analýzu lidských tkáních nepoužili žádnou ze zavedených monoklonálních protilátek proti nestinu od věrohodného dodavatele, ale polyklonální protilátku od lokálního výrobce.

6.1.4. Nestin v periferních nervech

Po transplantaci periferní nervy ve štěpech degenerují, zatímco Schwannovy buňky přežijí dočasnou ischemii, proliferují a podporují růst axonů při reinervaci (Soukup a Novotová, 2000). Při detekci proteinu S-100, markeru Schwannových buněk, jsme ve štěpech

vyšetřovaných 7 dní po transplantaci nepozorovali žádnou imunoreaktivitu, ale ve štěpech odebraných 16, 21 a 29 dní po transplantaci byly nervy jasně identifikovatelné. Naše nálezy tedy podporují výsledky z elektronové mikroskopie Soukupa a Novotové (2000), kteří demonstrovali reinervaci štěpů během druhého týdne po heterochronní isotransplantaci. V periferních nervech ve štěpech i ve tkáních příjemců jsme pozorovali imunoreaktivitu nestinu ve formě početných malých pozitivit uvnitř nervů, zjevně odpovídajících Schwannovým buňkám obklopujícím jednotlivé axony. Friedman et al. (1990) popsal přítomnost nestinu ve Schwannových buňkách vyvíjejících se i dospělých periferních nervů potkana. Kromě toho byla exprese nestinu zdokumentována také v buňkách schwannomů (Sarlomo-Rikala et al., 2002; Shimada et al., 2007). Imunopozitivita nestinu tudíž odhaluje přítomnost Schwannových buněk v nervech. Signál nestinu byl silnější a jeho malá ložiska byla početnější v nervech nacházejících se ve štěpech ve srovnání s nervy v intaktních tkáních příjemců. Můžeme spekulovat, zda je nestin „upregulován“ v prolifерujících Schwannových buňkách nebo zda se může vyskytovat v rostoucích axonech, ve kterých se cytoskelet dynamicky reorganizuje a nestin by mohl v tomto procesu hrát roli. Kromě toho se nestin exprimuje v časných fázích vývoje neuronů a mohl by se reexprimovat během remodelace těchto buněk. Touto problematikou se zabýval Alibardi (2015), který detekoval na úrovni ultrastruktury buněk nestin v rostoucích axonech regenerujícího ocasu ještěrky. Další studie jsou nezbytné k objasnění, zda je nestin přítomný pouze ve Schwannových buňkách nebo i v rostoucích axonech také u hlodavců nebo člověka.

6.2. Nestin, desmin a vimentin v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténcích

V této studii jsme detekovali nestin ve Schwannových buňkách motorických i senzorických nervů v intaktních i regenerujících nervosvalových vřeténcích a v novotvořených svalových elementech v regenerujících vřeténcích. Zralá intrafuzální svalová vlákna intaktních i regenerovaných vřetének nestin postrádala. Imunoreaktivitu desminu jsme pozorovali ve svalových elementech ve všech vývojových stádiích, včetně dospělých intrafuzálních svalových vláken, v intaktních i regenerovaných vřeténcích. Vimentin jsme prokázali v buňkách zevního a vnitřního pouzdra v intaktních i regenerujících vřeténcích a dále také v novotvořených myoblastech a myotubách regenerujících vřetének.

Savčí nervosvalová vřeténka obsahují specializovaná intrafuzální svalová vlákna, která jsou označována jako „nuclear bag“ nebo „nuclear chain“ podle uspořádání jader v ekvatoriální oblasti. V kosterních svalech zadní končetiny potkana jsou v intaktních vřeténkách obvykle čtyři intrafuzální svalová vlákna: jedno „nuclear bag₁“, jedno „nuclear bag₂“ a dvě „nuclear chain“ (Soukup, 1976, 1988; Zelená, 1994, Soukup et al., 1995). Senzorická myelinizovaná nervová vlákna patřící do skupiny Ia a II inervují nervosvalová vřeténka tak, že obkružují střední části všech intrafuzálních vláken. Polární regiony intrafuzálních vláken se kontrahují na podnět z malých gama motoneuronů (Boyd, 1980; Zelená, 1994; Banks a Barker, 2004). Vlastnosti mnohvrstevného pouzdra, které obklopuje nervosvalové vřeténko, nejsou ještě zcela popsány. Buňky v nejzevnější vrstvě vykazují perineuriální fenotyp a buňky tvořící vnitřní vrstvy zevního pouzdra jsou endoneuriální fibroblasty (Zelená et al., 1994; Triantafyllou, 2007).

V modelu heterochronní isotransplanace intrafuzální svalová vlákna degenerují během 2 dnů po transplantaci. Satelitové buňky, Schwannovy buňky, buňky vnitřního a zevního pouzdra a bazální laminy přetrvávají dočasnou ischemii a působení bupivakainu (Jirmanová a Soukup, 2001). Čtvrtý den po transplantaci, kdy se objevuje revaskularizace, jsou bazální laminy regenerujících vláken vyplněny řadami nebo svazky myoblastů vznikajících dělením aktivovaných satelitových buněk. Pátý až sedmý den po transplantaci jsou již vytvořeny myotuby nebo svalová vlákna, ale zároveň mohou být pozorovány také přidružené myoblasty. Regenerovaná intrafuzální svalová vlákna rostou v obvodu a nakonec všechna dosáhnou podobného průměru (Jirmanová a Soukup, 1995, 2001). Počet přetrvávajících pouzder a tudíž počet regenerujících nervosvalových vřetének se liší v závislosti na věku dárce. Bylo prokázáno, že štěpy svalů z 10ti a 15tidenních potkanů obsahují v průměru jen 5 až 8 regenerovaných vřetének kvůli malé odolnosti pouzder nezralých receptorů vůči ischemii (Jirmanová a Soukup, 1995). Tato okolnost vysvětluje malý počet vřetének analyzovaných na sériových řezech v naší studii, ve které byly transplantovány svaly 15tidenních potkanů.

6.2.1. Nestin v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách

Drobné imunopozitivity nestinu v intaktních nervosvalových vřeténkách naznačovaly výskyt Schwannových buněk, které obalují motorické i senzorické axony uvnitř vřetének i v jejich blízkém okolí. Obaly tvořené Schwannovými buňkami jsou velmi tenké, a přestože regenerující vřeténka často obsahují Büngnerovy pruhy tvořené mnohočetnými Schwannovými

buňkami nacházející se v místech degenerovaných sensorických axonů (Jirmanová a Soukup, 2001), imunoreaktivita nestinu nebyla zřetelná ve všech nervosvalových větévkách.

V dospělých extrafuzálních svalových vláknech se nestin exprimuje v oblastech motorických plotének a myotendinózních spojeních (Carlsson et al., 1999; Vaitinen et al., 1999; Čížková et al., 2009a). Můžeme spekulovat, zda se nestin neexprimuje také v oblasti motorických plotének intrafuzálních svalových vláken nervosvalových větének. Bohužel intrafuzální svalová vlákna jsou poměrně tenká a motorické ploténky fusimotorických zakončení v polárním regionu věténka jsou drobná a málo početná (Zelená, 1994; Banks a Barker, 2004). Také v regenerovaných nervosvalových větévkách reinervovaných velkými alfa motoneurony jsou nervosvalová spojení zřidkavá a nejsou nahromaděná do dobře organizovaných motorických plotének jako u motorické inervace extrafuzálních svalových vláken (Soukup a Novotová, 2000). S použitím světelné mikroskopie a peroxidázové imunohistochemie jsme bohužel nebyli schopni přesně určit, zda se nestin vyskytuje v motorických ploténkách intrafuzálních svalových vláken. Metoda imunoelektronové mikroskopie by mohla objasnit tuto zajímavou otázku.

Detekce nestinu v intrafuzálních vláknech nervosvalového věténka nacházejícího se hned vedle štěpu vyšetřovaného 7 dní po transplantaci představovala pozoruhodný nález. V blízkosti tohoto receptoru mnoho extrafuzálních svalových vláken příjemců vykazovalo také imunopozitivitu nestinu. Některá z nich měla dokonce jádra umístěná centrálně, což značí proces regenerace. Za příčinu objevení se nestinu v intrafuzálních svalových vláknech tohoto receptoru považujeme stejné okolnosti, které mohly vést k imunopozitivitě nestinu v extrafuzálních svalových vláknech tkáně příjemce bezprostředně sousedící se štěpem, a to mechanické poranění při transplantaci nebo difúzi růstových faktorů, přičemž obojí iniciuje regeneraci. Rozdíly v intenzitě imunoreaktivity nestinu v jednotlivých intrafuzálních svalových vláknech lze vysvětlit rozdílnou mírou přežití a regenerace. Vyzrálější svalová vlákna vykazují slabší imunopozitivitu nestinu, zatímco méně vyvinutá silnější, podobně jako u regenerujících extrafuzálních svalových vláken.

V regenerujících nervosvalových větévkách jsme nestin detekovali ve Schwannových buňkách, tak jako v intaktních receptorech. Ve štěpech vyšetřovaných 7 dní po transplantaci nervosvalová věténka obsahovala novotvořené myoblasty a myotuby vykazující imunopozitivitu nestinu. Ve vyzrávajících intrafuzálních svalových vláknech v receptorech štěpů odebraných 16 dní po transplantaci jsme nestin také prokázali, ale s rozdílnou intenzitou

signálu. Vřeténka štěpů hodnocených 21 a 29 dní po transplantaci nevykazovala žádnou nebo jen fokální slabou imunopozitivitu nestinu podobně jako receptory v intaktních tkáních příjemců. Intenzita imunohistochemického signálu nestinu se tudíž během diferenciaci novotvořených svalových elementů v regenerujících vřeténkách snižuje a zralá intrafuzální svalová vlákna signál zcela postrádají (Čížková et al., 2009b). Tyto nálezy jsou v souladu se studii prokazujícími „downregulaci“ nestinu v průběhu diferenciaci extrafuzálních svalových vláken (Sejersen a Lendahl, 1993; Carlsson et al., 1999; Vaittinen et al. 2001; Aarimaa et al., 2004; Čížková et al., 2009a; Lindqvist et al., 2017). Ve vyvíjejících se nervosvalových vřeténkách se jednotlivá intrafuzální svalová vlákna netvoří současně. Vlákna „nuclear bag“ se vyvíjejí první a jsou následována vlákny „nuclear chain“ (Zelená, 1994). Podobný jev jsme pozorovali také během regenerace nervosvalových vřetének. Intrafuzální svalová vlákna o velkém průměru pravděpodobně vznikající ze satelitových buněk původních „nuclear bag“ vláken vykazovala slabou imunoreaktivitu nestinu. Byla tudíž více vyvinutá než vlákna o malém průměru odpovídající původním „nuclear chain“ vláknům se silným signálem nestinu.

6.2.2. Desmin a vimentin v intaktních a regenerujících nervosvalových vřeténkách

Desmin byl detekován ve všech intrafuzálních svalových vláknech intaktních nervosvalových vřetének i v myoblastech, myotubách a vyzrávajících svalových vláknech regenerujících receptorů. Tyto nálezy potvrdily naše očekávání, protože jak bylo zmíněno výše, desmin je přítomný ve všech typech svalových elementů a nenacházíme důvod pro to, aby intrafuzální svalové buňky a vlákna byla výjimkou. Během vývoje i regenerace kosterního svalu je „upregulace“ desminu trvalá na rozdíl od přechodné „upregulace“ nestinu (Sejersen a Lendahl, 1993; Vaittinen et al., 2001; Aarimaa et al., 2004; Čížková et al., 2009a; Lindqvist et al., 2017). Intrafuzální svalové elementy vykazující silnou imunoreaktivitu desminu by proto měly být více vyzrálé než elementy se slabou imunoreaktivitou. Nicméně důvod, proč se intenzita signálu desminu liší mezi jednotlivými dospělými intrafuzálními vlákny intaktních vřetének, zůstává neobjasněn.

Detekce desminu v některých buňkách pouzdra regenerovaných nervosvalových vřetének a receptoru nacházejícího se v bezprostřední blízkosti štěpu vyšetřovaného 7 dní po transplantaci představovala ojedinělý a překvapující nález. Podle současných znalostí je pouzdro tvořené lamelovitě uspořádanými oploštěnými buňkami, které jsou pokračováním

perineuria nervu vřeténka, a vnitřními kapsulárními buňkami, což jsou fibroblasty obklopující jednotlivá intrafuzální vlákna (Banks a Barker, 2004; Triantafyllou, 2007). Dosud však není známo, že by buňky perineuria exprimovaly desmin a otázka exprese desminu ve fibroblastech není jednoznačně dořešená. Nervosvalové vřeténko vyskytující se v těsném sousedství štěpu je unikátní svojí polohou v oblasti, kde byla tkáň vysoce pravděpodobně přímo poraněna při intramuskulární transplantaci. Po poranění se jizva hojila, což mohlo být doprovázeno vznikem myofibroblastů. Nicméně exprese desminu v myofibroblastech není dosud jednoznačně potvrzena. Dále můžeme imunopozitivitu desminu v zevním pouzdru vysvětlit tak, že denervace nebo de-eferentace a rovněž i regenerace navozená intramuskulární transplantací vede ke vzniku mnoha malých myotub nebo svalových vláken mezi vrstvami zevního pouzdra, zřejmě pocházejících z migrujících myoblastů po aktivaci satelitových buněk. Tento jev byl zaznamenán na úrovni světelné i elektronové mikroskopie (Jirmanová a Soukup, 1995, 2001; Novotová a Soukup, 1995; Soukup a Thornell, 1997; Soukup a Novotová, 2000).

Vimentin byl detekován v buňkách zevního pouzdra a ve vnitřních kapsulárních buňkách intaktních i regenerujících nervosvalových vřetének. Buňky tvořící vnitřní kapsulární vrstvu jsou fibroblasty, tedy buňky obsahující vimentin jako hlavní komponentu intermediárních filament. Buňky nejzevnější vrstvy pouzdra vykazují perineuriální fenotyp. Exprese vimentinu v buňkách perineuria nebyla dosud v literatuře důkladně popsána, nicméně Peltonen et al. (1987) pozorovali expresi vimentinu v těchto buňkách kultivovaných *in vitro* a Hirose et al. (1998) zdokumentovali imunopozitivitu vimentinu a imunonegativitu desminu v buňkách perineuriálního maligního nádoru obalů periferních nervů. Vimentin byl detekován také v buňkách arachnoidey (Kida et al., 1988; Yamashima et al., 1989), jež jsou analogické k buňkám perineuria. Můžeme tudíž předpokládat, že se vimentin vyskytuje v mnoha, ne-li ve všech buňkách tvořících vnitřní a zevní pouzdro nervosvalových vřetének.

Slabá imunopozitivita vimentinu pozorovaná ve svalových buňkách regenerujících vřetének ve štěpech vyšetřovaných 7 dní po transplantaci odpovídá nálezům v extrafuzálních svalových buňkách. Během myogeneze a regenerace kosterního svalu se vimentin exprimuje v extrafuzálních myoblastech a vyvíjejících se myotubách spolu s nestinem, zatímco ve vyžívajících a dospělých svalových vláknech se tento protein nevyskytuje (Sejersen a Lendahl, 1993; Vaitinen et al., 2001).

6.3. Role transplantovaných buněk kostní dřeně při reakci na poranění kosterního svalu

V této studii byly myši příjemci celotělově letálně ozářeni 4 h po poranění kosterního svalu *m. tibialis ant.* kardiotoxinen a 3 h po ozáření jim byly intravenózně transplantovány BKD čerstvě izolované z dárců exprimujících *lacZ* myši ROSA26. Cílem těchto experimentů bylo studovat roli transplantovaných BKD při reakci kosterních svalů příjemců na poranění.

Injekce kardiotoxinu do kosterního svalu způsobí degeneraci svalových vláken, ale nepostihne satelitové buňky, krevní cévy ani inervaci svalu (Couteaux et al., 1988). Nekróza svalových vláken navozená toxinem se objeví velmi rychle, již 30 min. po injekci (Ownby et al., 1993). Nekróza spouští lokální akutní imunitní reakci a buňky imunitního systému okamžitě infiltrují oblast poranění. Nekrotická degenerovaná svalová vlákna jsou odstraněna makrofágy, které se také účastní aktivace satelitových buněk sekrecí růstových faktorů (Lescaudron et al., 1999). Aktivované satelitové buňky proliferují, diferencují se v myoblasty, které během třetího dne po poranění svalu fúzíjí, čímž se tvoří myotuby postupně vyzářavající ve svalová vlákna (Couteaux et al., 1988). V našich experimentech byly myši příjemci celotělově letálně ozářeni velmi časně, 4 h po injekci kardiotoxinu, aby došlo k inhibici rychlé spontánní regenerace poraněných svalů a tak byla imitována situace lidských pacientů s významně redukovanou schopností regenerace kosterního svalu. Předpokládáme, že ozáření postihlo aktivované a proliferující satelitové buňky a způsobilo jejich smrt. Absence známek regenerace v poraněných kosterních svalech kontrolních myší, které byly celotělově letálně ozářené 4 h po injekci kardiotoxinu a nálezu úplné regenerace poraněných svalů kontrolních myší, u kterých byl jen poraněn sval, potvrzují naše předpoklady. Celotělové letální ozáření také suprimuje hematopoézu. V našich experimentech byla transplantace BKD úspěšná a bylo dosaženo vysokého stupně mikrochimerismu, což dokládá analýza obsahu DNA dárcovských buněk v kostních dřeních myších příjemců stanovaná metodou kvantitativní PCR.

Pozitivita histochemické detekce pomocí substrátu X-gal znamenající původ v buňkách dárce byla identifikována v poraněných kosterních svalech příjemců ve velkých mnohояaderných buňkách nepravidelného tvaru vyskytujících se v těsné blízkosti nekrotických degenerovaných svalových vláken, v infiltrujících neutrofilech a makrofázích a vzácněji ve fibroblastech endomysia, a to v časových intervalech 14 a 33 dní po poranění svalu. Tyto výsledky histochemické detekce byly v souladu s výsledky analýzy obsahu DNA genu *lacZ* získanými metodou kvantitativní PCR. Sedm dní po injekci toxinu nebyly v poraněných

svalech zaznamenány žádné X-gal⁺ buňky, avšak střední hodnota obsahu DNA genu *lacZ* v těchto poraněných svalech daného časového intervalu dosáhla 11,1 % obsahu DNA genu *lacZ* v intaktních shodných svalech dárce, myši ROSA26. Podobná diskrepance se objevila mezi výsledky histochemické detekce X-gal⁺ buněk a analýzy obsahu DNA buněk dárce pomocí kvantitativní PCR v intaktních kontralaterálních svalech příjemců. Analýza obsahu DNA genu *lacZ* provedená pomocí kvantitativní PCR poskytuje velmi přesnou informaci o výskytu buněk odvozených od dárce exprimujících *lacZ*, ale neumožňuje určit fenotyp těchto buněk. Naopak histochemie je vhodná pro studium morfologie X-gal⁺ buněk a jejich distribuce ve tkáních. Nevýhodou této metody je, že X-gal pozitivita je detekována pouze v buňkách, které obsahují aktivní formu enzymu β -galaktosidázy kódovaného genem *lacZ*. Buňky pocházející od dárce, které nesyntetizují aktivní formu enzymu β -galaktosidázy, se mohou v tkáních příjemců nalézat, ale nejsou detekovány histochemicky pomocí substrátu X-gal. Tato skutečnost podle našeho názoru vysvětluje diskrepanci mezi výsledky získanými kvantitativní PCR a histochemickou detekcí. Nicméně souběžné provedení těchto dvou metod považujeme za výhodné, protože se navzájem doplňují.

Čtrnáct a 33 dní po injekci toxinu, celotělovém ozáření a transplantaci BKD byly v oblasti poranění identifikovány X-gal⁺ velké mnohjaderné buňky nepravidelného tvaru. V těchto buňkách nebyl detekován desmin, spolehlivý svalový marker (Bignami a Dahl, 1984; Fürst et al., 1989; Sejersen a Lendahl, 1993; Li et al. 1997; Carlsson a Thornell, 2001), ani nestin, jenž byl zaznamenán ve vyvíjejících se myoblastech, myotubách a nezralých svalových vláknech (Sejersen a Lendahl, 1993; Carlsson et al., 1999; Vaittinen et al. 2001; Aarimaa et al., 2004; Čížková et al., 2009a, 2009b; Lindqvist et al., 2017). Nenáleží tedy k myogenní linii, přestože vykazují některé znaky novotvořených svalových vláken, jako jsou mnohočetná jádra a umístění v těsné blízkosti nekrotické sarkoplazmy degenerovaných svalových vláken. Podle stavby tyto X-gal⁺ velké mnohjaderné buňky připomínaly obrovské buňky cizích těles, které vznikají fúzí aktivovaných makrofágů. Jeden nebo dva dny po nástupu akutního zánětu cirkulující monocyty migrují do místa poranění a po vstupu do vazivové tkáně se transformují v makrofágy s vysokou schopností fagocytózy. Po aktivaci např. mrtvými buňkami nebo mikroorganismy makrofágy vylučují různé biologicky aktivní látky, což je charakteristické pro chronický zánět. Pokud je příčinou relativně inertní cizí těleso, vzniká tzv. granulom z cizích těles. Akumulace makrofágů a jejich fúze v obrovské buňky cizích těles jsou charakteristické pro tento typ chronického zánětu (Anderson, 2000; Brooks et al., 2019).

Zhao et al., (2009) vyhodnotili poranění svalu kardiotoxinem jako vhodný zvířecí model pro dystrofickou kalcifikaci. Popsali výskyt velkých mnohojaderných buněk připomínajících osteoklasty, které resorbovaly kalcifikovaná nekrotická degenerovaná svalová vlákna. V našich experimentech byla v poraněných svalech *m. tibialis ant.* transplantovaných myší kalcifikace nekrotické sarkoplazmy degenerovaných svalových vláken potvrzena barvením alizarinovou červení a impregnací podle von Kossy. Proto by X-gal⁺ velké mnohojaderné buňky nacházející se v blízkosti kalcifikovaných nekrotických svalových vláken mohly představovat buňky typu osteoklastů. Podobně jako obrovské buňky cizích těles jsou osteoklasty schopné fagocytózy a vznikají fúzí aktivovaných makrofágů. Uvědomujeme si, že osteoklasty mají aktivní endogenní savčí β -galaktosidázu, a proto by mohly vykazovat falešnou X-gal pozitivitu (Coates et al., 2001; Kopp et al., 2007). Nicméně máme jednoznačný důkaz, že v našich experimentech byly X-gal⁺ velké mnohojaderné buňky odvozeny od transplantovaných BKD. Za prvé analýza obsahu DNA genu *lacZ* metodou kvantitativní PCR potvrdila, že jádra pocházející od buněk dárce byla přítomna v poraněných svalech *m. tibialis ant.* příjemců v množství odpovídajícím počtu X-gal⁺ velkých mnohojaderných buněk. Za druhé u kontrolních myší letálně celotělově ozářených po injekci kardiotoxinu, ale netransplantovaných, nebyly v oblastech poranění identifikovány žádné X-gal⁺ buňky. Tudíž X-gal⁺ buňky, které se objevily v místech injekce kardiotoxinu u transplantovaných příjemců, pocházely z buněk dárce. Ať už X-gal⁺ velké mnohojaderné buňky pozorované v našich experimentech připomínají více obrovské buňky cizích těles nebo osteoklasty, hlavní otázkou je, proč neresorbovaly nekrotická svalová vlákna. Podle našeho názoru mohla být perzistence nekrotických svalových vláken způsobena nedostatečným množstvím buněk schopných fagocytózy vzhledem k rozsahu nekrózy nebo změnou vlastností nekrotické tkáně navozenou ozářením, která spočívala ve zvýšené rezistenci nekrotické tkáně vůči resorpci.

Po intramuskulární injekci kardiotoxinu je oblast poranění velmi rychle infiltrována makrofágy a dalšími buňkami zánětlivého infiltrátu a nekrotická degenerovaná svalová vlákna jsou odstraněna během dvou nebo tří dnů (Couteaux et al., 1988). V našich experimentech 7 dní po poranění svalu nebyly zánětlivé infiltráty početné a nekrotická svalová vlákna byla stále přítomná. Lze důvodně předpokládat, že transplantované BKD mají nejprve rekonstituovat hematopoézu postiženou letálním celotělovým ozářením, a proto proliferují a diferencují se ve všechny hematopoetické buňky včetně diferencovaných krevních elementů, což je pro ozářený organismus život zachraňující proces. Po obnově hematopoézy může potomstvo transplantovaných BKD participovat na regeneraci poraněného kosterního svalu. Domníváme

se, že z těchto důvodů je v našich experimentech tvorba zánětlivého infiltrátu v oblastech poranění u ozářených a transplantovaných myší zpožděna ve srovnání s kontrolními myšmi, u kterých bylo pouze navozeno poranění svalu injekcí kardiotoxinu.

Kostní dřevina obsahuje také multipotentní mezenchymové stromální buňky (MMSB; také označované jako mezenchymové kmenové buňky). Bylo popsáno, že jsou schopné participovat na regeneraci kosterního svalu (Dezawa et al., 2005; de la Garza-Rodea et al., 2011). Během vývoje jsou zdrojem mnoha buněk pojivových tkání, včetně fibroblastů. Proto naše sporadické nálezy X-gal⁺ fibroblastů v oblastech poranění svalů u transplantovaných myší nebyly překvapující. Aktivované a proliferující fibroblasty endomysia jsou také postiženy celotělovým ozářením. Podle našich výsledků se MMSB odvozené z BKD a jejich potomstvo podílejí na procesu obnovy endomysia.

Bylo popsáno několik mechanismů, jakými transplantované BKD potencionálně participují na regeneraci kosterního svalu indukované jeho poraněním. Buňky odvozené z BKD se mohou dostat cirkulací do místa poranění svalu, kde z nich vznikají satelitové buňky, které uskuteční regeneraci svalu (LaBarge a Blau, 2002; Luth et al., 2008). Jiným mechanismem je fúze buněk zánětlivého infiltrátu, především makrofágů a neutrofilů, s vyvíjejícími se myotubami v průběhu regenerace svalu (Camargo et al., 2003; Doyonnas et al., 2004). Existuje také odlišný názor, že regenerace kosterního svalu je zcela zprostředkována kmenovými buňkami sídlícími ve svalové tkáni, poněvadž destrukce rezidentních svalových kmenových buněk vysokými dávkami lokálního ozáření má za následek dlouhodobý deficit v růstu a regeneraci svalu (Wakeford et al., 1991; Pagel a Partridge, 1999; Heslop et al., 2000). Naše výsledky souhlasí se závěry studií potvrzující tento poslední názor. V našich experimentech transplantace BKD nezabránila degeneraci svalů, ve kterých byly satelitové buňky eradikovány letálním celotělovým ozářením. Vznik ojedinělých X-gal⁻ zralých svalových vláken v oblastech poranění svalu u transplantovaných myší byl způsoben aktivací, proliferací a diferenciací rezidentních satelitových buněk, které přežily ozáření. Nicméně nevylučujeme první dva možné mechanismy podílu BKD na regeneraci kosterního svalu. V naší studii byly satelitové buňky poškozeny ozářením, a tudíž mohly chybět přirozené signály nezbytné k indukci aktivace a proliferace satelitových buněk a k tvorbě nových svalových vláken, na čemž by se mohly podílet transplantované BKD. Selhání prvního stádia regenerace, kdy makrofágy resorbují nekrotická svalová vlákna, dokládá nezastupitelnou úlohu makrofágů v počátečních fázích regenerace kosterního svalu (Čížková et al., 2011).

6.4. Buňky pocházející z kostní dřeně jako součást niche satelitových buněk v intaktním a regenerujícím kosterním svalu myši

V této studii jsme intravenózně transplantovali myši GFP⁺ neseparované BKD celotělově letálně ozářeným imunokompetentním myším 4 týdny před poraněním kosterního svalu příjemců injekcí kardiotoxinu. Cílem těchto experimentů bylo pomocí přímé fluorescence GFP a imunohistochemické detekce proteinu GFP na odparafinovaných řezech a na ultratenkých řezech pro transmisní elektronovou mikroskopii identifikovat buněčné typy pocházející z BKD vyskytující se v intaktním a regenerujícím kosterním svalu.

Výsledky získané na základě vyhodnocení přirozené fluorescence GFP byly vždy potvrzeny imunohistochemickou detekcí proteinu GFP. V případě kosterního svalu je to nezbytné, protože určitý typ svalového vlákna vykazuje autofluorescenci, která může být chybně považována za pozitivitu GFP (Jackson et al., 2004; Brazelton a Blau, 2005; Swenson et al., 2007). Jedná se o skupinu oxidativních svalových vláken typu IIa, u nichž je příčinou autofluorescence pravděpodobně flavin společně s NADH dehydrogenázou (Jackson et al., 2004).

Pozitivita GFP znamenající původ v kostní dřeni byla identifikována během regenerace kosterního svalu v obou časových intervalech, 7 i 28 dní po poranění svalu, ve všech buněčných typech představujících důležité komponenty niche satelitových buněk, jmenovitě v buňkách imunitního systému, buňkách vazivové tkáně endomysia, buňkách vaskulárního systému a elementech myogenní linie. V kontralaterálním a kontrolním neporaněném svalu byla pozitivita GFP určena v méně početných buňkách imunitního systému a endomysia.

GFP⁺ buňky imunitního systému, hlavně makrofágy, se hojně vyskytovaly v regenerujících svalech 7 dní po poranění a 28 dní po injekci kardiotoxinu byly stále detekovány. V kontralaterálních a kontrolních neporaněných svalech byly sporadicky pozorovány GFP⁺ makrofágy a žírné buňky. Buňky imunitního systému odvozené od hematopoetických kmenových buněk jsou nepostradatelné pro prvotní fázi regenerace kosterního svalu (Lescaudron et al., 1999). Rezidentní leukocyty aktivované poraněním produkují např. TNF- α (tumor necrosis factor- α) a interleukin-6, které spolu s dalšími faktory podporují aktivaci a proliferaci satelitových buněk a indukují atrakci cirkulujících granulocytů, hlavně neutrofilů. Neutrofilové uvolňují prozánětlivé signály nezbytné k rekrutování monocytů, jež se stávají velmi početnými a diferencují se v makrofágy. Nejprve prozánětlivé makrofágy M1 fagocytují nekrotickou sarkoplazmu degenerovaných svalových vláken a podporují

proliferaci myoblastů vznikajících z aktivovaných dělicích se satelitových buněk a následně protizánětlivé makrofágy M2 regulují myogenní diferenciaci a stimulují tvorbu myotub (Bentzinger et al., 2013; Yin et al., 2013; Mashinchian et al., 2018). Všechny typy výše zmíněných buněk imunitního systému se tedy velmi přesně zapojují do regulace regenerace kosterního svalu a jakákoli změna v jejich náležitém poměru může vést k selhání regenerace (Arnold et al., 2007; Segawa et al., 2008; Liu et al., 2017b). Tento fakt byl také doložen v naší předchozí studii, kdy byly příjemci celotělově letálně ozářeni 4 h po poranění svalu za účelem eradikace dělicích se satelitových buněk a suprese hematopoézy a následně transplantovány BKD dárce. Sedm dní po injekci kardiotoxinu nebyly v oblasti degenerace nalezeny žádné buňky imunitního systému odvozené od BKD dárce, což vedlo k perzistenci a dokonce kalcifikaci nekrotické sarkoplazmy poraněných svalových vláken. Dva a 4 týdny po injekci kardiotoxinu, kdy jsou během obvyklé regenerace již vytvořena nová svalová vlákna, jsme našli v těsné blízkosti přetrvávajících nekrotických svalových vláken mnoho od BKD dárce odvozených velkých mnohjaderných buněk připomínajících obrovské buňky cizích těles, které vznikají fúzí aktivovaných makrofágů (Čížková et al., 2011).

V této studii byl signál GFP zjištěn v mnoha desmin⁺ buňkách vřetenovitého tvaru vyskytujících se v endomysiu poraněných svalů vyšetřovaných v obou časových intervalech, 7 a 28 dní po injekci kardiotoxinu. V kontralaterálních a kontrolních neporaněných svalech byly tyto buňky také zaznamenány, ale v mnohem menším množství, jak jsme předpokládali. V intersticiální tkáni endomysia se nacházejí různé buněčné typy, jejichž původ a funkce při regeneraci kosterního svalu nebyly dosud plně objasněny (Bentzinger et al., 2013; Yin et al., 2013; Mashinchian et al., 2018).

Fibroblasty jsou hlavní fixní buňky řídkého kolagenního vaziva, které obklopuje jednotlivá svalová vlákna v podobě endomysia. Jejich klíčovou funkcí je syntéza složek extracelulární matrix, především kolagenu a fibronektinu, a také komponent bazální laminy. Jsou schopné aktivně remodelovat mezibuněčnou hmotu sekrecí metaloproteináz (Bentzinger et al., 2013). Po poranění svalu velmi rychle proliferují, přičemž jich je nejvíce zhruba 5. den po indukci regenerace, kdy také vrcholí počet dělicích se satelitových buněk. V této fázi podporují expanzi satelitových buněk, jak bylo zdokumentováno ve studii, při které částečná ablace fibroblastů v průběhu regenerace vedla k sníženému počtu satelitových buněk a jejich předčasné diferenciaci a k tvorbě nových svalových vláken o menším průměru (Murphy et al., 2011). Fibroblasty mohou vznikat z rezidentních mezenchymových kmenových buněk, avšak

co je pozoruhodné, ve stromatu nádorů také z BKD dárce (Dikerze et al., 2004; Barcellos-de-Souza et al., 2013; Kurashige et al., 2018).

Fibroadiopogenní progenitory jsou fibrogenní mezenchymové stromální buňky, které sídlí v kosterním svalu. Exprimují povrchové markery CD34, Sca-1 a PDGFR α , ale nevykazují pozitivitu hematopoetických markerů CD45 a CD31 a markeru satelitových buněk integrinu α 7. Jsou schopné diferencovat se ve fibroblasty, adipocyty a pravděpodobně také v buňky kosti a chrupavky. Jejich diferenciaci v myogenní prekurzory nebo svalová vlákna *in vitro* ani *in vivo* nebyla dosud prokázána, tudíž zřejmě nemají myogenní potenciál. V klidových podmínkách se nacházejí v blízkosti krevních cév. V průběhu regenerace jsou aktivovány a prolifерují v intersticiu, přičemž nejvyššího počtu dosahují mezi 3. a 4. dnem a k původnímu množství se vrací 7. až 9. den po poranění. Spolu s fibroblasty syntetizují proteiny extracelulární matrix. Také podporují myogenní diferenciaci, např. sekrecí interleukinu-6, a naopak vznikající myotuby inhibují jejich diferenciaci v adipocyty (Joe et al., 2010; Heredia et al., 2013; Bentzinger et al., 2013; Fiore et al., 2016). Co je velmi zajímavé, fibroadiopogenní progenitory pravděpodobně odstraňují nekrotické zbytky tkáně z regenerujících svalů efektivněji než makrofágy (Heredia et al., 2013; Bentzinger et al., 2013). Jejich původ nebyl dosud jednoznačně určen.

Mitchell et al. (2010) popsali rezidentní kmenové buňky v intersticiu kosterního svalu, které exprimují stresový mediátor PW1 a povrchové markery CD34 a Sca-1. Na rozdíl od fibroadiopogenní progenitorů mají myogenní potenciál *in vitro* a neexprimují PDGFR α . Také postrádají marker satelitových buněk Pax7 (Mitchell et al., 2010; Pannérec et al., 2013; Yin et al., 2013). Tyto PW1⁺ intersticiální buňky produkují follistatin a IGF1, čímž podporují proliferaci a diferenciaci satelitových buněk (Formicola et al., 2014; Mashinchian et al., 2018). Experimenty sledující Pax3⁺ buňky naznačují, že PW1⁺ intersticiální buňky nevznikají z embryonálních Pax3⁺ myogenních progenitorových buněk, a tudíž jsou odvozeny od jiné buněčné linie než satelitové buňky (Mitchell et al., 2010; Yin et al., 2013).

Telocyty představují další intersticiální buněčný typ zatím neurčeného původu vyskytující se v kosterním svalu. Jsou charakterizovány podle vzhledu v transmisním elektronovém mikroskopu jako buňky s malým tělem a velmi dlouhými tenkými moniliformními (majícími tvar šňůry korálků) výběžky, které se dichotomicky větví a tvoří trojrozměrnou síť (Popescu et al., 2011; Suciú et al., 2012; Yin et al., 2013). Nacházejí se v těsné blízkosti satelitových buněk, svalových vláken, nervových zakončení a krevních cév.

Na rozdíl od fibroblastů exprimují c-kit a dále také PDGFR β a VEGF, ale nikoli Pax7. Jejich předpokládanými funkcemi je přenos mezibuněčných signálů uvolňováním nebo absorpcí mikrovezikul, tzv. exosomů, obohacených o proteiny a RNA a podpora vaskulogeneze sekrecí VEGF (Popescu et al., 2011; Suciú et al., 2012; Yin et al., 2013).

Výčet typů buněk nacházejících se v endomysiu *in vivo* nebo izolovaných z kosterního svalu a kultivovaných *in vitro* je ještě mnohem širší. Lze zmínit např. ze svalu odvozené kmenové buňky („muscle-derived stem cells“). Jsou to buňky izolované z kosterního svalu, které při kultivaci *in vitro* jen pomalu adherují a dlouhodobě proliferují. Exprimují Flk-1, Sca-1 a desmin a zároveň jsou CD45, M-Cadherin a CD34 negativní. Jsou multipotentní, mohou se diferencovat v buňky myogenní, adipogenní, osteogenní, chondrogenní a hematopoetické linie. Po transplantaci přispívají k regenerujícím svalovým vláknům, inkorporují se do niche satelitových buněk a jsou také schopné diferencovat se v endotelové a neurální buňky (Yin et al., 2013; Lorant et al., 2018). Buňky Twist2⁺/Pax7⁻ se nacházejí v intersticiu kosterního svalu. Po indukci jejich diferenciaci *in vitro* ztrácejí transkripční faktor Twist2, začnou exprimovat Pax7 a jsou schopné fúzovat mezi sebou i se satelitovými buňkami. Při experimentech *in vivo* se podílejí na regeneraci kosterního svalu fúzí s existujícími svalovými vlákny i tvorbou nových, přičemž v obou případech se jedná především o svalová vlákna typu IIb/x (Liu et al., 2017a; Schmidt et al., 2019).

Dreyfus et al. (2004) identifikovali v intersticiu intaktních kosterních svalů buňky odvozené od kostní dřene dárce exprimující CD34 nebo Sca-1. Přestože imunofenotypizace těchto buněk je nedostatečná vzhledem k současným znalostem, v souladu s našimi výsledky tato studie dokládá přítomnost buněk odvozených od BKD ve svalovém intersticiu (Čížková et al., 2018). Intersticiální buňky endomysia tedy považujeme za velmi zajímavou buněčnou komponentu niche satelitových buněk a bude důležité studovat jejich konkrétní funkce a původ. Jaký buněčný typ představují GFP⁺ desmin⁻ buňky endomysia pozorované v intaktních i regenerujících svalech v našich experimentech zůstává k objasnění a stává se cílem našich nadcházejících studií.

Pozitivita GFP byla zřídka zaznamenána v endotelových buňkách krevních cév v poraněných svalech 7 i 28 dní po injekci kardiotoxinu. Tyto nálezy prokazují přítomnost endotelových progenitorů v kostní dřeni dárce. Buňky krevních cév jsou důležitou součástí niche satelitových buněk, přičemž v intaktních i regenerujících svalech se kapiláry vyskytují v jejich velmi těsné blízkosti (Christov et al., 2007). Po poranění svalu se jejich počet zpočátku

zvyšuje, ačkoli nebyly přímo poškozeny (Ochoa et al., 2007). Endotelové buňky vylučují celou řadu mitogenních a anti-apoptotických faktorů, jako je VEGF, které ovlivňují svalové elementy, a naopak diferencující se svalové elementy také produkují VEGF a tudíž mají proangiogenní efekt. Myogenezе a angiogeneze jsou tedy úzce koregulovány (Bentzinger et al., 2013; Latroche et al., 2017).

GFP spolu s desminem jsme detekovali velmi vzácně 7 dní po injekci kardiotoxinu v myotubách poraněných svalů a 28 dní po poranění ve svalových vláknech. Schopnost hematopoetických kmenových buněk podílet se na regeneraci kosterního svalu byla již dobře popsána (Ferrari et al., 1998; Palermo et al., 2005; LaBarge a Blau, 2002; Brazelton et al., 2003; Camargo et al., 2003; Corbel et al., 2003; Doyonnas et al., 2004; Sacco et al., 2005; Abedi et al., 2005, 2007; de la Garza-Rode et al., 2011) a naše výsledky potvrzují výskyt tohoto výjimečného fenoménu. Důležité je, že jsme nenašli žádné GFP⁺ desmin⁺ myoblasty a signál GFP se objevil pouze v myotubách a svalových vláknech, což podporuje názor, že HKB nejsou schopné generovat myogenní progenitory a že dochází fúzí k inkorporaci myeloidních buněk do novotvořených myotub (Camargo et al., 2003; Corbel et al., 2003). Myogenní elementy v různých stádiích vývoje jsou důležitými součástmi niche satelitových buněk během reparativní myogeneze, kdy vylučují růstové faktory, poskytují regulační signály a účastní se mezibuněčných interakcí. Signální dráhy Notch a Wnt7 patří z tohoto pohledu mezi nejvýznamnější, a proto jsou stále intenzivně studovány (Brack et al., 2008; Bentzinger et al., 2013; Yin et al., 2013; Schmidt et al., 2019).

7. ZÁVĚRY

Úspěšně se mi podařilo zavést všechny nové metody nezbytné pro řešení cílů vlastní experimentální práce. Stanovila jsem optimální postup a osvojila si chirurgické techniky indukce regenerace kosterního svalu myši poraněním intramuskulární injekcí kardiotoxinu. Zvládla jsem metodu odběru myších buněk kostní dřene od dárců, přípravu suspenze těchto buněk a její intravenózní transplantaci celotělově letálně ozářeným příjemcům. V laboratoři transmisní elektronové mikroskopie se nám podařilo nejprve zavést vhodný postup zalévání tkání do akrylátové pryskyřice LR White a následně imunohistochemickou metodu detekce antigenů na ultratenkých tkáňových řezech. Dle potřeby jsem také optimalizovala již zavedené metody histologického zpracování tkání a imunohistochemické detekce.

Při regeneraci kosterního svalu zadní končetiny potkana indukované heterochronní isotransplantací se nestin exprimoval nejsilněji v novotvořených myoblastech a myotubách a jeho signál se zeslaboval během diferenciací svalových vláken, kdy jsme zdokumentovali fenomén tzv. „lateralizace“ nestinu do určité oblasti na periferii svalového elementu, jenž by mohl naznačovat mechanismus, jakým je nestin eliminován z vyvíjejícího se svalového vlákna. V dospělých intaktních svalových vláknech se nestin exprimoval pouze v oblastech motorických plotének a myotendinózních spojení. Nestin byl detekován v novotvořených krevních cévách v časnějších fázích než v regenerujících nervech, což dokládá, že revaskularizace předcházela reinervaci. Vimentin byl detekován jen slabě v novotvořených myoblastech a myotubách. Zralá svalová vlákna tento protein neexprimovala, zatímco desmin se vyskytoval ve všech vývojových stádiích včetně zralých svalových vláken. Podle výsledků této studie nestin představuje ideální marker regenerace kosterního svalu, přičemž jeho exprese provází důležité procesy vývoje, revaskularizace a reinervace novotvořených svalových vláken.

V intaktních i regenerujících nervosvalových vřeténkách kosterního svalu zadní končetiny potkana byl nestin detekován ve Schwannových buňkách inervujících nervových vláken a pouze v regenerujících receptorech ve vyvíjejících se intrafuzálních svalových elementech. Zralá intrafuzální svalová vlákna intaktních i regenerovaných vřetének nestin

postrádala. Desmin se exprimoval ve všech vyvíjejících se i dospělých intrafuzálních svalových elementech intaktních i regenerovaných receptorů. Vimentin byl detekován v buňkách zevního a vnitřního pouzdra v intaktních i regenerujících vřeténcích a také v novotvořených myoblastech a myotubách regenerujících vřetének. Získané nálezy demonstrují, že přestože intrafuzální svalová vlákna vykazují mnoho strukturních i funkčních rozdílů od extrafuzálních, v expresi intermediárních filament v intaktních i regenerujících svalech se neliší. Tato studie poskytuje komplexní pohled na expresi nestinu, desminu a vimentinu ve všech komponentách intaktních a regenerujících nervosvalových vřetének, přičemž z ní vzešly prvotní, v literatuře dosud nepopsané výsledky.

V poraněných kosterních svalech zadní končetiny myši byla pozitivita X-galu znamenající původ v intravenózně transplantovaných *lacZ*⁺ BKD identifikovaná v časových intervalech 14 a 33 dní po injekci kardiotoxinu v infiltrujiících neutrofilech a makrofázích, vzácněji v buňkách endomysia a v mnoha velkých mnohojaderných buňkách nepravidelného tvaru, které se vyskytovaly v těsné blízkosti perzistujících nekrotických svalových vláken, neexprimovaly desmin ani nestin a připomínaly obrovské buňky cizích těles vznikající fúzí aktivovaných makrofágů. Tyto výsledky dokládají schopnost intravenózně transplantovaných dospělých BKD osídlit poraněné kosterní svaly a generovat buňky infiltrujiící endomysium a účastníci se úklidové reakce. Při inhibici endogenní myogeneze buňky odvozené od transplantovaných BKD nejsou schopny podílet se na tvorbě nových svalových vláken kvůli perzistujícím nekrotickým degenerovaným svalovým vláknům a místo toho se snaží resorbovat nekrotické struktury. Výsledky tedy potvrzují klíčovou úlohu makrofágů odvozených z BKD při regeneraci kosterního svalu.

V intaktních i poraněných kosterních svalech *m. tibialis ant.* myši byla pozitivita GFP značící původ v intravenózně transplantovaných BKD potvrzena v buňkách imunitního systému, hlavně v makrofázích, a ve vřetenovitých buňkách v endomysiu. Pouze v poraněných svalech byly vzácně detekovány GFP⁺ endotelové buňky krevních cév a GFP⁺ novotvořené myotuby a svalová vlákna. Imunohistochemická detekce proteinu GFP v transmisní elektronové mikroskopii umožňující vyšetřit ultrastrukturu buněk odvozených od BKD v intaktním a regenerujícím kosterním svalu nebyla v dosud publikovaných pracích použita a přináší prvotní nálezy. Tato studie potvrzuje schopnost buněk odvozených z kostní dřene

přispět k buněčné komponentě niche satelitových buněk v intaktním i regenerujícím kosterním svalu. GFP⁺ buňky pocházely nejen z hematopoetických kmenových buněk, ale zjevně také z dalších kmenových nebo progenitorových buněk kostní dřeně, jako jsou multipotentní mezenchymové stromální buňky nebo endotelové progenitory. GFP⁺ desmin⁻ buňky vřetenovitého tvaru nacházející se v endomysiu představují velmi zajímavý nález, přičemž lze konstatovat, že intersticiální buňky tvoří velmi pozoruhodnou a dosud ne zcela charakterizovanou komponentu niche satelitových buněk intaktního i regenerujícího kosterního svalu. Otázka, jaký typ intersticiální GFP⁺ desmin⁻ buňky představují a z jakého typu BKD pocházejí, zůstává k vysvětlení a stává se atraktivní výzvou.

8. LITERATURA

- AARIMAA, V., KAARIAINEN, M., VAITTINEN, S., TANNER, J., JARVINEN, T., BEST, T., KALIMO H. Restoration of myofiber continuity after transection injury in the rat soleus. *Neuromuscul. Disord.* 2004, roč. 14, s. 421-428.
- ABEDI, M., GREER, D.A., FOSTER, B.M., COLVIN, G.A., HARPEL, J.A., DEMERS, D.A., PIMENTEL, J., DOONER, M.S., QUESENBERRY, P.J. Critical variables in the conversion of marrow cells to skeletal muscle. *Blood.* 2005, roč. 106, s. 1488-1494.
- ABEDI, M., FOSTER, B.M., WOOD, K.D., COLVIN, G.A., MCLEAN, S.D., JOHNSON, K.W., GREER, D.A. Haematopoietic stem cells participate in muscle regeneration. *Br. J. Haematol.* 2007, roč. 138, s. 792-801.
- AGBULUT, O., LI, Z., PÉRIÉ, S., LUDOSKY, M.A., PAULIN, D., CARTAUD, J., BUTLER-BROWNE, G. Lack of desmin results in abortive muscle regeneration and modifications in synaptic structure. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 2001, roč. 49, č. 2, s. 51-66.
- ALBERTS, B., HUNT, T., JOHNSON, A. et al. *Molecular biology of the cell* [online]. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015. ISBN 978-0-8153-4432-2.
- ALIBARDI, L. Ultrastructural immunolocalization of nestin in the regenerating tail of lizards shows its presence during cytoskeletal modifications in the epidermis, muscles and nerves. *Tissue Cell.* 2015, roč. 47, č. 2, s. 178-185.
- ANDERSON J.M. Multinucleated giant cells. *Curr. Opin. Hematol.* 2000, roč. 7, č. 1, s. 40-47.
- ANKRUM, J.A., ONG, J.F., KARP, J.M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat. Biotechnol.* 2014, roč. 32, s. 252-260.
- ARNOLD, L., HENRY, A., PORON, F., BABA-AMER, Y., VAN ROOIJEN, N., PLONQUET, A., GHERARDI, R.K., CHAZAUD, B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 2007, roč. 204, s. 1057-1069.
- ASANO, K., NAKANO, T., TOKUTAKE, K., ISHII, H., NISHIZUKA, T., IWATSUKI, K., ONISHI, T., KURIMOTO, S., YAMAMOTO, M., TATEBE, M., HIRATA, H. Muscle spindle reinnervation using transplanted embryonic dorsal root ganglion cells after peripheral nerve transection in rats. *Cell Prolif.* 2019, roč. 52, č. 5, e12660. doi: 10.1111/cpr.12660.
- ASAHARA, T., MUROHARA, T., SULLIVAN, A., SILVER, M., VAN DER ZEE, R., LI, T., WITZENBICHLER, B., SCHATTEMAN, G., ISNER, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997, roč. 275, s. 964-967.
- AUTILIO-GAMBETTI, L., SIPPLE, J., SUDILOVSKY, O., GAMBETTI, P. Intermediate filaments of Schwann cells. *J. Neurochem.* 1982, roč. 38, s. 774-780.

BANKS, R.W., BARKER, D. The muscle spindle. In: ENGEL, AG. a FRANZINI-ARMSTRONG, C. *Myology: basic and clinical*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, c2004, s. 489-509. ISBN 0-07-137180-X.

BARBET, J.P., THORNELL, L.E., BUTLER-BROWNE, G.S. Immunocytochemical characterisation of two generations of fibers during the development of the human quadriceps muscle. *Mech. Dev.* 1991, roč. 35, s. 3-11.

BARCELLOS-DE-SOUZA, P., GORI, V., BAMBI, F., CHIARUGI, P. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013, roč. 1836, s. 321-335.

BARRETT, K.E., BARMAN, S.M., BROOKS, H.L., YUAN, J.X. *Ganong's review of medical physiology*. Twenty-sixth edition. New York: McGraw Hill Education, [2019]. A Lange medical book. ISBN 978-1-260-12240-4.

BATTAGLIA, R.A., DELIC, S., HERRMANN, H., SNIDER, N.T. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Res.* 2018, roč. 7, pii: F1000 Faculty Rev-1796. doi: 10.12688/f1000research.15967.1.

BEERMAN, I., LUIS, T.C., SINGBRANT, S., LO CELSO, C., MÉNDEZ-FERRER, S. The evolving view of the hematopoietic stem cell niche. *Exp. Hematol.* 2017, roč. 50, s. 22-26.

BENTZINGER, C.F., WANG, Y.X., DUMONT, N.A., RUDNICKI, M.A. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* 2013, roč. 14, s. 1062-72.

BENTZINGER, C.F., VON MALTZAHN, J., DUMONT, N.A., STARK, D.A., WANG, Y.X., NHAN, K., FRENETTE, J., CORNELISON, D.D., RUDNICKI, M.A. Wnt7a stimulates myogenic stem cell motility and engraftment resulting in improved muscle strength. *J. Cell Biol.* 2014, roč. 205, č. 1, s. 97-111.

BERNAL, A., ARRANZ, L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2018, roč. 75, č. 12, s. 2177-2195.

BERTELLI, E., REGOLI, M., FONZI, L., OCCHINI, R., MANNUCCI, S., ERMINI, L., TOTI, P. Nestin expression in adult and developing human kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 2007, roč. 55, s. 411-421.

BIANCO, P., GEHRON ROBEY, P. Marrow stromal stem cells. *J. Clin. Invest.* 2000, roč. 105, s. 1663-1668.

BIGNAMI, A., DAHL, D. Early appearance of desmin, the muscle-type intermediate filament protein, in the rat embryo. *J. Histochem. Cytochem.* 1984, roč. 32, s. 473-476.

BJORNSON, C.R., CHEUNG, T.H., LIU, L., TRIPATHI, P.V., STEEPER, K.M., RANDO, T.A. Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells.* 2012, roč. 30, č. 2, s. 232-42.

BORNEMANN, A., SCHMALBRUCH, H. Desmin and vimentin in regenerating muscles. *Muscle Nerve.* 1992, roč. 15, s. 14-20.

BOYD, I.A. The isolated mammalian muscle spindle. *Trends Neurosci.* 1980, roč. 3, s. 258-265.

BRAZELTON, T.R., NYSTROM, M., BLAU, H.M. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Dev. Biol.* 2003, roč. 262, s. 64-74.

BRAZELTON, T.R., BLAU, H.M. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem Cells.* 2005, roč. 23, č. 9, s. 1251-65.

BRACK, A.S., CONBOY, I.M., CONBOY, M.J., SHEN, J., RANDO, T.A. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell.* 2008, roč. 2, s. 50-59.

BROOKS, P.J., GLOGAUER, M., MCCULLOCH, C.A. An overview of the derivation and function of multinucleated giant cells and their role in pathologic processes. *Am. J. Pathol.* 2019, roč. 189, č. 6, s. 1145-1158.

CAMARGO, F.D., GREEN, R., CAPETANAKI, Y., JACKSON, K.A., GOODELL, M.A. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* 2003, roč. 9, s. 1520-1527.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991, roč. 9, s. 641-650.

CARLSON, B.M., GUTMANN, E. Regeneration in free grafts of normal and denervated muscles in the rat: morphology and histochemistry. *Anat Rec.* 1975, roč. 183, č. 1, s. 47-62.

CARLSON, B.M. A quantitative study of muscle fiber survival and regeneration in normal, predenervated, and Marcaine-treated free muscle grafts in the rat. *Exp Neurol.* 1976, roč. 52, č. 3, s. 421-432.

CARLSSON, L., LI, Z., PAULIN, D.L., THORNELL, E. Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice. *Exp. Cell. Res.* 1999, roč. 251, s. 213-223.

CARLSSON, L., THORNELL, L.E. Desmin-related myopathies in mice and man. *Acta Physiol. Scand.* 2001, roč. 171, č. 3, s. 341-348.

COATES, P.J., LORIMORE, S.A., RIGAT, B.A., LANE, D.P., WRIGHT, E.G. Induction of endogenous beta-galactosidase by ionizing radiation complicates the analysis of p53-LacZ transgenic mice. *Oncogene.* 2001, roč. 20, s. 7096-7097.

COLUCCI-GUYON, E., PORTIER, M.M., DUNIA, I., PAULIN, D., POURNIN, S., BABINET, C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell.* 1994, roč. 79, č. 4, s. 679-694.

CONDREA, E. Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytotoxins. *Experientia.* 1974, roč. 30, s. 121-129.

CORBEL, S.Y., LEE, A., YI, L., DUENAS, J., BRAZELTON, T.R., BLAU, H.M., ROSSI F.M. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat. Med.* 2003 roč. 9, s. 1528-1532.

COUTEAUX, R., MIRA, J.C., D'ALBIS, A. Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. *Biol. Cell.* 1988, roč. 62, s. 171-182.

ČÍŽKOVÁ, D., SOUKUP, T., MOKRÝ, J. Nestin expression reflects formation, revascularization and reinnervation of new myofibers in regenerating rat hind limb skeletal muscles. *Cells Tissues Organs.* 2009a, roč. 189, č. 5, s. 338-347.

ČÍŽKOVÁ, D., SOUKUP, T., MOKRÝ, J. Expression of nestin, desmin and vimentin in intact and regenerating muscle spindles of rat hind limb skeletal muscles. *Histochem. Cell Biol.* 2009b, roč. 131, č. 2, s. 197-206.

ČÍŽKOVÁ, D., VÁVROVÁ, J., MIČUDA, S., FILIP, S., BRČÁKOVÁ, E., BRŮČKOVÁ, L., MOKRÝ, J. Role of transplanted bone marrow cells in response to skeletal muscle injury. *Folia Biol. (Praha).* 2011, roč. 57, č. 6, s. 232-241.

ČÍŽKOVÁ, D., KOMÁRKOVÁ, Z., BEZROUK, A., MACHÁČKOVÁ, L., VÁVROVÁ, J., FILIP, S., MOKRÝ, J. Bone marrow-derived cells participate in composition of the satellite cell niche in intact and regenerating mouse skeletal muscle. *Folia Biol (Praha).* 2018, roč. 64, č. 5-6, s. 155-166.

DAHLSTRAND, J., COLLINS, V.P., LENDAHL, U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 1992, roč. 52, č. 19, s. 5334-5341.

DE LA GARZA-RODEA, A.S., VAN DER VELDE, I., BOERSMA, H., GONÇALVES, M.A., VAN BEKKUM, D.W., DE VRIES, A.A., KNAÄN-SHANZER, S. Long-term contribution of human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice. *Cell Transplant.* 2011, roč. 20, s. 217-231.

DEZAWA, M., ISHIKAWA, H., ITOKAZU, Y., YOSHIHARA, T., HOSHINO, M., TAKEDA, S., IDE, C., NABESHIMA, Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science.* 2005, roč. 309, s. 314-317.

DIREKZE, N.C., HODIVALA-DILKE, K., JEFFERY, R., HUNT, T., POULSOM, R., OUKRIF, D., ALISON, M.R., WRIGHT, N.A. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* 2004, roč. 64, č. 23, s. 8492-8495.

DIWAN, F.H., MILBURN, A. The effects of temporary ischaemia on rat muscle spindles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986, roč. 92, s. 223-254.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, DJ., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006, roč. 8, s. 315-317.

DOYONNAS, R., LABARGE, M.A., SACCO, A., CHARLTON, C., BLAU, H.M. Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, roč. 101, č. 37, s. 13507-13512.

DREYFUS, P.A., CHRETIEN, F., CHAZAUD, B., KIROVA, Y., CARAMELLE, P., GARCIA, L., BUTLER-BROWNE, G., GHERARDI, R.K. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am. J. Pathol.* 2004, roč. 164, s. 773-779.

DUMONT, N., FRENETTE, J. Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: a mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am. J. Pathol.* 2010, roč. 176, č. 5, s. 2228-2235.

DUSART, P., FAGERBERG, L., PERISIC, L., CIVELEK, M., STRUCK, E., HEDIN, U., UHLÉN, M., TRÉGOUËT, D.A., RENNÉ, T., ODEBERG, J., BUTLER, L.M. A systems-approach reveals human nestin is an endothelial-enriched, angiogenesis-independent intermediate filament protein. *Sci Rep.* 2018, roč. 8, č. 1, 14668. doi: 10.1038/s41598-018-32859-4.

ELIASSON, C., SAHLGREN, C., BERTHOLD, C.H., STAKEBERG, J., CELIS, J.E., BETSHOLTZ, C., ERICSSON, J.E., PEKNY, M. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 1999, roč. 274, s. 23996-4006.

EVANO, B., TAJBAKHSH, S. Skeletal muscle stem cells in comfort and stress. *NPJ Regen. Med.* 2018, roč. 3, 24. doi: 10.1038/s41536-018-0062-3.

FERRARI, G., CUSELLA-DE ANGELIS, G., COLETTA, M., PAOLUCCI, E., STORNAIUOLO, A., COSSU, G., MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998, roč. 279, s. 1528-1530.

FERRARI, G., STORNAIUOLO, A., MAVILIO, F. Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature*. 2001, roč. 411, č. 6841, s. 1014-1015.

FILIP, S., MOKRÝ, J., HRUŠKA, I. *Kmenové buňky: biologie, medicína, filozofie*. Praha: Galén, 2006. Makropulos. ISBN 80-7262-401-6.

FIORE, D., JUDSON, R.N., LOW, M., LEE, S., ZHANG, E., HOPKINS, C., XU, P., LENZI, A., ROSSI, F.M., LEMOS, D.R. Pharmacological blockage of fibro/adipogenic progenitor expansion and suppression of regenerative fibrogenesis is associated with impaired skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Res.* 2016, roč. 17, s. 161-169.

FORMICOLA, L., MARAZZI, G., SASSOON, D.A. The extraocular muscle stem cell niche is resistant to ageing and disease. *Front. Aging Neurosci.* 2014, roč. 6, 328. doi: 10.3389/fnagi.2014.00328.

FRANKE, W.W., SCHMID, E., OSBORN, M., WEBER, K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978, roč. 75, s. 5034-5038.

- FREDERIKSEN, K., MCKAY, R.D. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J. Neurosci.* 1988, roč. 8, s. 1144-1151.
- FRIEDENSTEIN, A.J., PIATETZKY-SHAPIRO, I.I., PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1966, roč. 16, s. 381-390.
- FRIEDMAN, B., ZAREMBA, S., HOCKFIELD, S. Monoclonal antibody rat 401 recognizes Schwann cells in mature and developing peripheral nerve. *J. Comp. Neurol.* 1990, roč. 295, s. 43-51.
- FRISÉN, J., JOHANSSON, C.B., TÖRÖK, C., RISLING, M., LENDAHL, U. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J. Cell Biol.* 1995, roč. 131, č. 2, s. 453-464.
- FRÖHLICH, T., KEMTER, E., FLENKENTHALER, F., KLYMIUK, N., OTTE, K.A., BLUTKE, A., KRAUSE, S., WALTER, M.C., WANKE, R., WOLF, E., ARNOLD, G.J. Progressive muscle proteome changes in a clinically relevant pig model of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep.* 2016, roč. 6, 33362. doi: 10.1038/srep33362.
- FRÖJDMAN, K., PELLINIEMI, L.J., LENDAHL, U., VIRTANEN, I., ERIKSSON, J.E. The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation.* 1997, roč. 61, s. 243-249.
- FUJIMAKI, S., SEKO, D., KITAJIMA, Y., YOSHIOKA, K., TSUCHIYA, Y., MASUDA, S., ONO, Y. Notch1 and Notch2 coordinately regulate stem cell function in the quiescent and activated states of muscle satellite cells. *Stem Cells.* 2018, roč. 36, č. 2, s. 278-285.
- FUKSA, L., BRČÁKOVÁ, E., KOLOUCHOVÁ, G., HIRŠOVÁ, P., HROCH, M., CERMANOVÁ, J., ŠTAUD, F., MIČUDA, S. Dexamethasone reduces methotrexate biliary elimination and potentiates its hepatotoxicity in rats. *Toxicology.* 2010, roč. 267, s. 165-171.
- FÜRST, D.O., OSBORN, M., WEBER, K. Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J. Cell. Biol.* 1989, roč. 109, s. 517-527.
- GABBIANI, G., SCHMID, E., WINTER, S., CHAPONNIER, C., DE CKHASTONAY, C., VANDEKERCKHOVE, J., WEBER, K., FRANKE, W.W. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981, roč. 78, s. 298-302.
- GALLI, D., VITALE, M., VACCAREZZA, M. Bone marrow-derived mesenchymal cell differentiation toward myogenic lineages: facts and perspectives. *Biomed. Res. Int.* 2014, roč. 2014, 762695. doi: 10.1155/2014/762695.
- GARD, D.L., LAZARIDES, E. The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell.* 1980, roč. 19, s. 263-275.
- GAUTAM, J., YAO, Y. Pericytes in Skeletal Muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; roč. 1122, s. 59-72.

GOLDMAN, R. D., CHOU, Y. H., PRAHLAD, V., YOON, M. Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB J.* 1999, roč. 13, Suppl. 2, s. S261-S265.

GUSSONI, E., SONEOKA, Y., STRICKLAND, C.D., BUZNEY, E.A., KHAN, M.K., FLINT, A.F., KUNKEL, L.M., MULLIGAN, R.C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999, 401, roč. 6751, s. 390-394.

GÜTTSCHE, A.K., BALAKRISHNAN-RENUKA, A., KLEY, R.A., TEGENTHOFF, M., BRAND-SABERI, B., VORGERD, M. ATOH8: a novel marker in human muscle fiber regeneration. *Histochem. Cell Biol.* 2015, roč. 143, č. 5, s. 443-452.

HALL-CRAGGS, E.C. Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcain). *Exp Neurol.* 1974, roč. 43, č. 2, s. 349-58.

HANSEN-SMITH, F.M., CARLSON, B.M., IRWIN, K.L. Revascularization of the freely grafted extensor digitorum longus muscle in the rat. *Am J Anat.* 1980, roč. 158, č. 1, s. 65-82.

HARDY, D., BESNARD, A., LATIL, M., JOUVION, G., BRIAND, D., THÉPENIER, C., PASCAL, Q., GUGUIN, A., GAYRAUD-MOREL, B., CAVAILLON, J.M., TAJBAKHS, S., ROCHETEAU, P., CHRÉTIEN, F. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One.* 2016, roč. 11, č. 1, e0147198. doi: 10.1371/journal.pone.0147198.

HARVEY, A.L. Cardiotoxins from cobra venoms: possible mechanisms of action. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1985, roč. 4, s. 41-69.

HELFAND, B. T., CHANG, L., GOLDMAN, R. D. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J. Cell Sci.*, 2004, roč. 117, s. 133-141.

HEREDIA, J.E., MUKUNDAN, L., CHEN, F.M., MUELLER, A.A., DEO, R.C., LOCKSLEY, R.M., RANDO, T.A., CHAWLA, A. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell.* 2013, roč. 153, s. 376-388.

HERRMANN, H., AEBI, U. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016, roč. 8, č. 11, s. a018242. doi: 10.1101/cshperspect.a018242.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J.M., GARCÍA-GONZÁLEZ, E.G., BRUN, C.E., RUDNICKI, M.A. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017, roč. 72, s. 10-18.

HESLOP, L., MORGAN, J.E., PARTRIDGE, T.A. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J. Cell Sci.* 2000, roč. 113, s. 2299-2308.

HIROSE, T., SCHEITHAUER, B.W., SANO, T. Perineurial malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST): a clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of seven cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998, roč. 22, s. 1368-1378.

HNIA, K., RAMSPACHER, C., VERMOT, J., LAPORTE, J. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. *Cell Tissue Res.* 2015, roč. 360, č. 3, s. 591-608.

HOCKFIELD, S., MCKAY, R.D. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 1985, roč. 5, s. 3310-3328.

CHAKKALAKAL, J.V., JONES, K.M., BASSON, M.A., BRACK, A.S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature.* 2012, roč. 490, č. 7420, s. 355-360.

CHAO, H., HIRSCHI, K.K. Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvasc. Res.* 2010, roč. 79, s. 169-173.

CHARGÉ, S.B., RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004, roč. 84, č. 1, s. 209-238.

CHAZAUD, B., SONNET, C., LAFUSTE, P., BASSEZ, G., RIMANIOL, A.C., PORON, F., AUTHIER, F.J., DREYFUS, P.A., GHERARDI, R.K. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell. Biol.* 2003, roč. 163, s. 1133-1143.

CHEN, J., CHEN, L., ZERN, M.A., THEISE, N.D., DIEHL, A.M., LIU, P., DUAN, Y. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver Int.* 2017, roč. 37, č. 9, s. 1260-1271.

CHENG, F., ERIKSSON, J.E. Intermediate Filaments and the Regulation of Cell Motility during Regeneration and Wound Healing. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017, roč. 9, č. 9, s. a022046. doi: 10.1101/cshperspect.a022046.

CHEUNG, T.H., QUACH, N.L., CHARVILLE, G.W., LIU, L., PARK, L., EDALATI, A., YOO, B., HOANG, P., RANDO, T.A. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature.* 2012 roč. 482, s. 524-528.

CHIU, F.C., SACCHI, R.S., CLAUDIO, L., KOBAYASHI, S., SUZUKI, K. Coexpression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in the central and peripheral nervous systems of the twitcher mutant. *Glia.* 1988, roč. 1, č. 2, s. 105-112.

CHOU, Y.H., KHUON, S., HERRMANN, H., GOLDMAN R.D. Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 2003, roč. 14, s. 1468-1478.

CHRISTOV, C., CHRÉTIEN, F., ABOU-KHALIL, R., BASSEZ, G., VALLET, G., AUTHIER, F.J., BASSAGLIA, Y., SHININ, V., TAJBAKSH, S., CHAZAUD, B., GHERARDI, R.K. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell.* 2007, roč. 18, s. 1397-1409.

IVASKA, J., PALLARI, H.M., NEVO, J., ERIKSSON, J.E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell. Res.* 2007, roč. 13, s. 2050-2062.

JACKSON, K.A., SNYDER, D.S., GOODELL, M.A. Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells.* 2004, roč. 22, č. 2, s. 180-187.

JIRMANOVÁ, I., SOUKUP, T. Critical period in muscle spindle regeneration in grafts of developing rat muscles. *Anat. Embryol.* 1995, roč. 192, s. 283-291.

JIRMANOVÁ, I., SOUKUP, T. Early changes in extrafusal and intrafusal muscle fibers following heterochronous isotransplantation. *Acta Neuropathol.* 2001, roč. 102, s. 473-484.

JOE, A.W., YI, L., NATARAJAN, A., LE GRAND, F., SO, L., WANG, J., RUDNICKI, M.A., ROSSI, F.M. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2010, roč. 12, s. 153-163.

KACHINSKY, A.M., DOMINOV, J.A., MILLER, J.B. Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin. *Dev. Biol.* 1994, roč. 165, s. 216-228.

KACHINSKY, A.M., DOMINOV, J.A., MILLER, J.B. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J. Histochem. Cytochem.* 1995, roč. 43, s. 843-847.

KANG, H., TIAN, L., SON, Y.J., ZUO, Y., PROCACCINO, D., LOVE, F., HAYWORTH, C., TRACHTENBERG, J., MIKESH, M., SUTTON, L., PONOMAREVA, O., MIGNONE, J., ENIKOLOPOV, G., RIMER, M., THOMPSON, W. Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J. Neurosci.* 2007, roč. 30, s. 5948-5957.

KIDA, S., YAMASHIMA, T., KUBOTA, T., ITO, H., YAMAMOTO, S. A light and electron microscopic and immunohistochemical study of human arachnoid villi. *J. Neurosurg.* 1988, roč. 69, s. 429-435.

KIM, H.S., KANG, H.S., MESSAM, C.A., MIN, K.W., PARK, C.S. Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2002, roč. 10, č. 2, s. 121-127.

KIRKPATRICK, L.J., ALLOUH, M.Z., NIGHTINGALE, C.N., DEVON, H.G., YABLONKA-REUVENI, Z., ROSSER, B.W. Pax7 shows higher satellite cell frequencies and concentrations within intrafusal fibers of muscle spindles. *J. Histochem. Cytochem.* 2008, roč. 56, č. 9, s. 831-840.

KIRKPATRICK, L.J., YABLONKA-REUVENI, Z., ROSSER, B.W. Retention of Pax3 expression in satellite cells of muscle spindles. *J. Histochem. Cytochem.* 2010, roč. 58, č. 4, s. 317-327.

KOBAYASHI, M., SJOBERG, G., SODERHALL, S., LENDAHL, U., SANDSTEDT, B., SEJERSEN, T. Pediatric rhabdomyosarcomas express the intermediate filament nestin. *Pediatr. Res.* 1998, roč. 43, s. 386-392.

KOLÁŘ, Z., EHRMANN, J. JR., TURASHVILI, G., BOUCHAL, J., MOKRÝ, J. A novel myoepithelial/progenitor cell marker in the breast? *Virchows Arch.* 2007, roč. 450, č. 5, s. 607-609.

KOPP, H.G., HOOPER, A.T., SHMELKOV, S.V., RAFII, S. Beta-galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. *Histol. Histopathol.* 2007, roč. 22, s. 971-976.

KRÖGER, S. Proprioception 2.0: novel functions for muscle spindles. *Curr. Opin. Neurol.* 2018, roč. 31. č. 5, s. 592-598.

KU, N.O., LIAO, J., CHOU, C.F., OMARY, M.B. Implications of intermediate filament protein phosphorylation. *Cancer Metastasis Rev.* 1996, roč. 15, s. 429-444.

KUHR, C.S., LUPU, M., STORB, R. Hematopoietic cell transplantation directly into dystrophic muscle fails to reconstitute satellite cells and myofibers. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007, roč. 13, č. 8, s. 886-8.

KUMAR, T.K., JAYARAMAN, G., LEE, C.S., ARUNKUMAR, A.I., SIVARAMAN, T., SAMUEL, D., YU, C. Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997, roč. 15, č. 3, s. 431-463.

KURASHIGE, M., KOHARA, M., OHSHIMA, K., TAHARA, S., HORI, Y., NOJIMA, S., WADA, N., IKEDA, J.I., MIYAMURA, K., ITO, M., MORII, E. Origin of cancer-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages in humans after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Commun. Biol.* 2018, roč. 1, s. 131. doi: 10.1038/s42003-018-0137-0.

LABARGE, M.A., BLAU, H.M. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell.* 2002, roč. 111, s. 589-601.

LACOUR, F., VEZIN, E., BENTZINGER, C.F., SINCENNES, M.C., GIORDANI, L., FERRY, A., MITCHELL, R., PATEL, K., RUDNICKI, M.A., CHABOISSIER, M.C., CHASSOT, A.A., LE GRAND, F. R-spondin1 controls muscle cell fusion through dual regulation of antagonistic Wnt signaling pathways. *Cell Rep.* 2017, roč. 18, č. 10, s. 2320-2330.

LATROCHE, C., WEISS-GAYET, M., MULLER, L., GITIAUX, C., LEBLANC, P., LIOT, S., BEN-LARBI, S., ABOU-KHALIL, R., VERGER, N., BARDOT, P., MAGNAN, M., CHRÉTIEN, F., MOUNIER, R., GERMAIN, S., CHAZAUD, B. Coupling between myogenesis and angiogenesis during skeletal muscle regeneration is stimulated by restorative macrophages. *Stem Cell Reports.* 2017, roč. 12, s. 2018-2033.

LEND AHL, U., ZIMMERMAN, L.B., MCKAY, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990, roč. 23, s. 585-595.

LESCAUDRON, L., PELTÉKIAN, E., FONTAINE-PÉRUS, J., PAULIN, D., ZAMPIERI, M., GARCIA, L., PARRISH, E. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul. Disord.* 1999, roč. 2, s. 72-80.

LI, L., MIGNONE, J., YANG, M., MATIC, M., PENMAN, S., ENIKOLOPOV, G., HOFFMAN, R.M. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003, roč. 100, č. 17, s. 9958-9961.

LI, Z., MERICKSKAY, M., AGBULUT, O., BUTLER-BROWNE, G., CARLSSON, L., THORNELL, L.E., BABINET, C., PAULIN, D. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 1997, roč. 139, s. 129-144.

LINDQVIST, J., WISTBACKA, N., ERIKSSON, J.E. Studying nestin and its interrelationship with Cdk5. *Methods Enzymol.* 2016, roč. 568 s. 509-35.

LINDQVIST, J., TORVALDSON, E., GULLMETS, J., KARVONEN, H., NAGY, A., TAIMEN, P., ERIKSSON, J.E. Nestin contributes to skeletal muscle homeostasis and regeneration. *J. Cell Sci.* 2017, roč. 130, č. 17, s. 2833-2842.

LIU, N., GARRY, G.A., LI, S., BEZPROZVANNAYA, S., SANCHEZ-ORTIZ, E., CHEN, B., SHELTON, J.M., JAICHANDER, P., BASSEL-DUBY, R., OLSON, E.N. A Twist2-dependent progenitor cell contributes to adult skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 2017a, roč. 19, č. 3, s. 202-213.

LIU, X., LIU, Y., ZHAO, L., ZENG, Z., XIAO, W., CHEN, P. Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: The roles of regulatory factors for muscle regeneration. *Cell Biol. Int.* 2017b, roč. 41, s. 228-238.

LORANT, J., SAURY, C., SCHLEDER, C., ROBRIQUET, F., LIEUBEAU, B., NÉGRONI, E., LEROUX, I., CHABRAND, L., VIAU, S., BABARIT, C., LEDEVIN, M., DUBREIL, L., HAMEL, A., MAGOT, A., THORIN, C., GUEVEL, L., DELORME, B., PÉREON, Y., BUTLER-BROWNE, G., MOULY, V., ROUGER, K. Skeletal Muscle Regenerative Potential of Human MuStem Cells following Transplantation into Injured Mice Muscle. *Mol. Ther.* 2018, roč. 26, č. 2, s. 618-633.

LUKJANENKO, L., JUNG, M.J., HEGDE, N., PERRUISSEAU-CARRIER, C., MIGLIAVACCA, E., ROZO, M., KARAZ, S., JACOT, G., SCHMIDT, M., LI, L., METAIRON, S., RAYMOND, F., LEE, U., SIZZANO, F., WILSON, D.H., DUMONT, N.A., PALINI, A., FÄSSLER, R., STEINER, P., DESCOMBES, P., RUDNICKI, M.A., FAN, C.M., VON MALTZAHN, J., FEIGE, J.N., BENTZINGER, C.F. Loss of fibronectin from the aged stem cell niche affects the regenerative capacity of skeletal muscle in mice. *Nat Med.* 2016, roč. 22, č. 8, s.897-905.

LUTH, E.S., JUN, S.J., WESSEN, M.K., LIADAKI, K., GUSSONI, E., KUNKEL, L.M. Bone marrow side population cells are enriched for progenitors capable of myogenic differentiation. *J. Cell Sci.* 2008, roč. 121, s. 1426-1434.

MA, D.K., BONAGUIDI, M.A., MING, G.L., SONG, H. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res.* 2009, roč. 19, č. 6, s. 672-682.

MANGIALARDI, G., CORDARO, A., MADEDDU, P. The bone marrow pericyte: an orchestrator of vascular niche. *Regen Med.* 2016, roč. 11, č. 8, s. 883-895.

MARVIN, M.J., DAHLSTRAND, J. LENDAHL, U., MCKAY, R.D. A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J. Cell Sci.* 1998, roč. 111, s. 1951-1961.

MASHINCHIAN, O., PISCONTI, A., LE MOAL E., BENTZINGER, C.F. The muscle stem cell niche in health and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2018, roč. 126, s. 23-65.

- MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961, roč. 9, s. 493-495.
- MAYER, E.J., HUGHES, E.H., CARTER, D.A., DICK, A.D. Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. *Br. J. Ophthalmol.* 2003, roč. 87, č. 9, s. 1154-1158.
- MESCHER, A.L. a JUNQUEIRA, L.C.U. *Junqueirovy základy histologie*. Čtrnácté vydání, první české. Praha: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-324-1.
- MICHALCZYK, K., ZIMAN, M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol. Histopathol.* 2005, roč. 20, s. 665-671.
- MILBURN, A. The effect of the local anaesthetic bupivacaine on the muscle spindle of rat. *J. Neurocytol.* 1976, roč. 5, s. 425-446.
- MITCHELL, K.J., PANNÉREC, A., CADOT, B., PARLAKIAN, A., BESSON, V., GOMES, E.R., MARAZZI, G., SASSOON, D.A. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* 2010, roč. 12, s. 257-266.
- MOHSENI, P., SUNG, H.K., MURPHY, A.J., LALIBERTE, C.L., PALLARI, H.M., HENKELMAN, M., GEORGIU, J., XIE, G., QUAGGIN, S.E., THORNER, P.S., ERIKSSON, J.E., NAGY, A. Nestin is not essential for development of the CNS but required for dispersion of acetylcholine receptor clusters at the area of neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 2011, roč. 31, č. 32, s. 11547-52.
- MOK, G.F., LOZANO-VELASCO, E., MÜNSTERBERG, A. microRNAs in skeletal muscle development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017, roč. 72, s. 67-76.
- MOKRÝ, J., NĚMEČEK S. Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells. *Folia Biol. (Praha)*. 1998a, roč. 44, č. 5, s. 155-161.
- MOKRÝ, J., NĚMEČEK, S. Immunohistochemical detection of intermediate filament nestin. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 1998b, roč. 41, č. 2, s. 73-80.
- MOKRÝ, J., NĚMEČEK, S. Cerebral angiogenesis shows nestin expression in endothelial cells. *Gen. Physiol. Biophys.* 1999, roč. 18, s. 25-29.
- MOKRÝ, J., ČÍŽKOVÁ, D., FILIP, S., EHRMANN, J., OSTERREICHER, J., KOLÁŘ, Z., ENGLISH D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev.* 2004, roč. 13, s. 658-664.
- MOKRÝ, J., PUDIL, R., EHRMANN, J., ČÍŽKOVÁ, D., OSTERREICHER, J., FILIP, S., KOLÁŘ, Z. Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted patients. *Virchows Arch.* 2008, roč. 453, č. 1, s. 33-41.
- MOURIKIS, P., SAMBASIVAN, R., CASTEL, D., ROCHETEAU, P., BIZZARRO, V., TAJBAKSH, S. A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells.* 2012, roč. 30, č. 2, s. 243-52.

MURPHY, M.M., LAWSON, J.A., MATHEW, S.J., HUTCHESON, D.A., KARDON, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*. 2011, roč. 138, s. 3625-3637.

NAZARIAN, J., BOURI, K., HOFFMAN, E.P. Intracellular expression profiling by laser capture microdissection: three novel components of the neuromuscular junction. *Physiol. Genomics*. 2005, roč. 21, s. 70-80.

NERADIL, J., VESELSKÁ, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci*. 2015, roč. 106, č. 7, s. 803-811.

NOVOTOVÁ, M., SOUKUP, T. Neomyogenesis in neonatally de-efferented and postnatally denervated rat muscle spindles. *Acta Neuropathol*. 1995, roč. 89, č. 1, s. 85-95.

OHLSTEIN, B., KAI, T., DECOTTO, E., SPRADLING, A. The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol*. 2004, roč. 16, č. 6, s. 693-699.

OCHOA, O., SUN, D., REYES-REYNA, S.M., WAITE, L.L., MICHALEK, J.E., MCMANUS, L.M., SHIREMAN, P.K. Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2^{-/-} mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2007, roč. 293, s. 651-661.

OWNBY, C.L., FLETCHER, J.E., COLBERG, T.R. Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle in vivo. *Toxicon*. 1993, roč. 31, s. 697-709.

PAGEL, C.N., PARTRIDGE, T.A. Covert persistence of mdx mouse myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. *J. Neurol. Sci*. 1999, roč. 164, s. 103-116.

PALLARI, H.M., LINDQVIST, J., TORVALDSON, E., FERRARIS, S.E., HE, T., SAHLGREN, C., ERIKSSON, J.E. Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Mol Biol Cell*. 2011, roč. 22, č. 9, s. 1539-1549.

PALERMO, A.T., LABARGE, M.A., DOYONNAS, R., POMERANTZ, J., BLAU, H.M. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev. Biol*. 2005, roč. 279, s. 336-344.

PANNÉREC, A., FORMICOLA, L., BESSON, V., MARAZZI, G., SASSOON, D.A. Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials. *Development*. 2013, roč. 140, s. 2879-2891.

PARK, D., XIANG, A.P., MAO, F.F., ZHANG, L., DI, C.G., LIU, X.M., SHAO, Y., MA, B.F., LEE, J.H., HA, K.S., WALTON, N., LAHN, B.T. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells*. 2010, roč. 28, č. 12, s. 2162-2171.

PELTONEN, J., JAAKKOLA, S., VIRTANEN, I., PELLINIEMI, L. Perineurial cells in culture. An immunocytochemical and electron microscopic study. *Lab. Invest*. 1987, roč. 57, s. 480-488.

POPESCU, L.M., MANOLE, E., SERBOIU, C.S., MANOLE, C.G., SUCIU, L.C., GHERGHICEANU, M., POPESCU, B.O. Identification of telocytes in skeletal muscle

interstitium: implication for muscle regeneration. *J. Cell. Mol. Med.* 2011, roč. 15, s. 1379-1392.

RELAIX, F., ZAMMIT, P.S. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development.* 2012, roč. 139, č. 16, s. 2845-2856.

ROGERS, S.L. Muscle spindle formation and differentiation in regenerating rat muscle grafts. *Dev. Biol.* 1982, roč. 94, s. 265-283.

ROGERS, S.L., CARLSON, B.M. A quantitative assessment of muscle spindle formation in reinnervated and non-reinnervated grafts of the rat extensor digitorum longus muscle. *Neuroscience.* 1981, roč. 6, s. 87-94.

ROTINI, A., MARTÍNEZ-SARRÀ, E., DUELEN, R., COSTAMAGNA, D., DI FILIPPO, E.S., GIACOMAZZI, G., GROSEMANS, H., FULLE, S., SAMPAOLESI, M. Aging affects the in vivo regenerative potential of human mesoangioblasts. *Aging Cell.* 2018, roč. 17, č. 2, e12714. doi:10.1111/acel.12714.

ROZO, M., LI, L., FAN, C.M. Targeting β 1-integrin signaling enhances regeneration in aged and dystrophic muscle in mice. *Nat. Med.* 2016, roč. 22, č. 8, s. 889-96.

SACCO, A., DOYONNAS, R., LABARGE, M.A., HAMMER, M.M., KRAFT, P., BLAU, H.M. IGF-I increases bone marrow contribution to adult skeletal muscle and enhances the fusion of myelomonocytic precursors. *J. Cell Biol.* 2005, roč. 171, s. 483-492.

SACCO, A., DOYONNAS, R., KRAFT, P., VITOROVIC, S., BLAU, H.M. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature.* 2008, roč. 456, č. 7221, s. 502-506.

SACLIER, M., YACOB-YOUSSEF, H., MACKAY, A.L., ARNOLD, L., ARDJOUNE, H., MAGNAN, M., SAILHAN, F., CHELLY, J., PAVLATH, G.K., MOUNIER, R., KJAE, M., CHAZAUD, B. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells.* 2013, roč. 31, č. 2, s. 384-396.

SAHLGREN, C.M., MIKHAILOV, A., HELLMAN, J., CHOU, Y.H., LENDAHL, U., GOLDMAN, R.D., ERIKSSON, J.E. Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* 2001, roč. 276, s. 16456-16463.

SAHLGREN, C.M., MIKHAILOV, A., VAITTINEN, S., PALLARI, H.M., KALIMO, H., PANT, H.C., ERIKSSON, J.E. Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. *Mol. Cell. Biol.* 2003, roč. 23, s. 5090-5106.

SARLOMO-RIKALA, M., TSUJIMURA, T., LENDAHL, U., MIETTINEN, M. Patterns of nestin and other intermediate filament expression distinguish between gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *APMIS.* 2002, roč. 110, č. 6, s. 499-507.

SEALE, P., SABOURIN, L.A., GIRGIS-GABARDO, A., MANSOURI, A., GRUSS, P., RUDNICKI, M.A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 2000, roč. 102, č. 6, s. 777-786.

SEGAWA, M., FUKADA, S., YAMAMOTO, Y., YAHAGI, H., KANEMATSU, M., SATO, M., ITO, T., UEZUMI, A., HAYASHI, S., MIYAGOE-SUZUKI, Y., TAKEDA, S., TSUJIKAWA, K., YAMAMOTO, H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp. Cell. Res.* 2008, roč. 314, s. 3232-3244.

SEJERSEN, T., LENDAHL U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J. Cell Sci.* 1993, roč. 106, s. 1291-1300.

SHI, S.R., KEY, M.E., KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1991, roč. 39, s. 741-748.

SHIMADA, S., TSUZUKI, T., KURODA, M., NAGASAKA, T., HARA, K., TAKAHASHI, E., HAYAKAWA, S., ONO, K., MAEDA, N., MORI, N., ILLEI P.B. Nestin expression as a new marker in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Pathol. Int.* 2007, roč. 57, s. 60-67.

SIRACUSA, J., KOULMANN, N., BANZET, S. Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018, roč. 9, č. 1, s. 20-27.

SJÖBERG, G., EDSTRÖM, L., LENDAHL, U., SEJERSEN, T. Myofibers from Duchenne/Becker muscular dystrophy and myositis express the intermediate filament nestin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1994, roč. 53, č. 4, s. 416-423.

SCHMALBRUCH, H., LEWIS, D.M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 2000, roč. 23, č. 4, s. 617-626.

SCHMIDT, M., SCHÜLER, S.C., HÜTTNER, S.S., VON EYSS, B., VON MALTZAHN, J. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019 roč. 76, č. 13, s. 2559-2570.

SCHWÖRER, S., BECKER, F., FELLER, C., BAIG, A.H., KÖBER, U., HENZE, H., KRAUS, J.M., XIN, B., LECHER, A., LIPKA, D.B., VARGHESE, C.S., SCHMIDT, M., ROHS, R., AEBERSOLD, R., MEDINA, K.L., KESTLER, H.A., NERI, F., VON MALTZAHN, J., TÜMPPEL, S., RUDOLPH, K.L. Epigenetic stress responses induce muscle stem-cell ageing by Hoxa9 developmental signals. *Nature.* 2016, roč. 540, č. 7633, s. 428-432.

SOUKUP, T. Intrafusal fibre types in rat limb muscle spindles. Morphological and histochemical characteristics. *Histochemistry.* 1976, roč. 47, s. 43-57.

SOUKUP, T. Regeneration of muscle spindles in grafted extensor digitorum longus of the rat. In: HNÍK, P., SOUKUP, T., VEJSADA, R., ZELENÁ, J. (eds.) *Mechanoreceptors - Development, Structure and Function.* New York: Plenum Press, 1988, s. 111-116. ISBN 0306428326.

SOUKUP, T., NOVOTOVÁ, M. Ultrastructure and innervation of regenerated intrafusal muscle fibres in heterochronous isografts of the fast rat muscle. *Acta Neuropathol.* 2000, roč. 100, s. 435-444.

SOUKUP, T., PEDROSA, F., THORNELL, L.E. Rat intrafusal fibres regenerated after autotransplantation of the EDL muscle do not express their typical myosin heavy chain isoenzymes in the absence of sensory innervation. In: MARÉCHAL, G., CARRARO, U. (eds) *Muscle and Motility*. Andover Hampshire, U.K.: Intercept Ltd., 1990, s. 105-110 . ISBN 0946707340.

SOUKUP, T., PEDROSA-DOMELLÖF, F., THORNELL, L.E. Differentiation of supernumerary fibres in neonatally deafferented rat muscle spindles. *Differentiation*. 1993, roč. 53, s. 35-43.

SOUKUP, T., PEDROSA-DOMELLÖF, F., THORNELL, L.E. Expression of myosin heavy chain isoforms and myogenesis of intrafusal fibres in the rat muscle spindles. *Microsc. Res. Tech.* 1995, roč. 30, s. 390-407.

SOUKUP, T., THORNELL, L.E. Expression of myosin heavy chain isoforms in regenerated muscle spindle fibres after muscle grafting in young and adult rats - plasticity of intrafusal satellite cells. *Differentiation*. 1997, roč. 62, s. 179-186.

SOUSA-VICTOR, P., GUTARRA, S., GARCÍA-PRAT, L., RODRIGUEZ-UBREVA, J., ORTET, L., RUIZ-BONILLA, V., JARDÍ, M., BALLESTAR, E., GONZÁLEZ, S., SERRANO, A.L., PERDIGUERO, E., MUÑOZ-CÁNOVES, P. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*. 2014, roč. 506, č. 7488, s. 316-321.

STARK, D.A., KARVAS, R.M., SIEGEL, A.L., CORNELISON, D.D. Eph/ephrin interactions modulate muscle satellite cell motility and patterning. *Development*. 2011, roč. 138, č. 24, s. 5279-5289.

STEINERT, P.M., CHOU, Y.H., PRAHLAD, V., PARRY, D.A., MAREKOV, L.N., WU, K.C., JANG, S.I. GOLDMAN, R.D. A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J. Biol. Chem.* 1999, roč. 274, s. 9881-9890.

SUCIU, L.C., POPESCU, B.O., KOSTIN, S., POPESCU, L.M. Platelet-derived growth factor receptor- β -positive telocytes in skeletal muscle interstitium. *J. Cell. Mol. Med.* 2012, roč.16, s. 701-707.

SUGAWARA, K., KURIHARA, H., NEGISHI, M., SAITO, N., NAKAZATO, Y., SASAKI, T., TAKEUCHI, T. Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab. Invest.* 2002, roč. 82, s. 345-351.

SWEETMAN, D., GOLJANEK, K., RATHJEN, T., OUSTANINA, S., BRAUN, T., DALMAY, T., MÜNSTERBERG, A. Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Dev. Biol.* 2008, roč. 321, č. 2, s. 491-499.

SWENSON, E.S., PRICE, J.G., BRAZELTON, T., KRAUSE, D.S. Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker. *Stem Cells*. 2007, roč. 25, č. 10, s. 2593-2600.

- TAVASSOLI, M., FRIEDENSTEIN, A. Hemopoietic stromal microenvironment. *Am. J. Hematol.* 1983, roč. 15, s. 195-203.
- TERLING, C., RASS, A., MITSIADIS, T.A., FRIED, K., LENDAHL, U., WROBLEWSKI, J. Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int. J. Dev. Biol.* 1995, roč. 39, s. 947-956.
- TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005, roč. 288, č. 2, s. R345-53.
- TOHYAMA, T., LEE, V.M., RORKE, L.B., MARVIN, M., MCKAY, R.D., TROJANOWSKI J.Q. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab. Invest.* 1992, roč. 66, č. 3, s. 303-313.
- TRIANAFYLLOU, A. Immunohistochemical characterization of capsular cells in neuromuscular spindles of the neck. *J. Oral. Pathol. Med.* 2007, roč. 36, s. 501-504.
- VAITTINEN, S., LUKKA, R., SAHLGREN, C., RANTANEN, J., HURME, T., LENDAHL, U., ERIKSSON, J.E., KALIMO, H. Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 1999, roč. 154, s. 591-600.
- VAITTINEN, S., LUKKA, R., SAHLGREN, C., HURME, T., RANTANEN, J., LENDAHL, U., ERIKSSON, J.E., KALIMO, H. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2001, roč. 60, s. 588-597.
- VON MALTZAHN, J., RENAUD, J.M., PARISE, G., RUDNICKI, M.A. Wnt7a treatment ameliorates muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012, roč. 109, č. 50, s. 20614-20619.
- VON MALTZAHN, J., JONES, A.E, PARKS, R.J., RUDNICKI, M.A. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013, roč. 110, č. 41, s. 16474-16479.
- WAKEFORD, S., WATT, D.J., PARTRIDGE, T.A. X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD. *Muscle Nerve.* 1991, roč. 14, s. 42-50.
- WAKITANI, S., SAITO, T., CAPLAN, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995, roč. 18, č. 12, s. 1417-1426.
- WALRO, J.M., KUCERA, J., CUI, F., STAFFELD, C.G. Innervation of regenerated spindles in muscle grafts of the rat. *Histochemistry.* 1989, roč. 92, č. 1, s. 1-13.
- WALRO, J.M., KUCERA, J., NARVY, R. Non-neural and neural expression of myosin heavy chains by regenerated intrafusal fibers of rats. *Neurosci Lett.* 1991, roč. 122, č. 2, s. 213-217.

WANG, J., YANG, L.Z., ZHANG, J.S., GONG, J.X., WANG, Y.H., ZHANG, C.L., CHEN, H., FANG, X.T. Effects of microRNAs on skeletal muscle development. *Gene*. 2018, roč. 668, s. 107-113.

WANG, Y.X., DUMONT, N.A., RUDNICKI, M.A. Muscle stem cells at a glance. *J. Cell Sci*. 2014, roč. 127, s. 4543-4548.

WIESE, C., ROLLETSCHKE, A., KANIA, G., BLYSZCZUK, P., TARASOV, K.V., TARASOVA, Y., WERSTO, R.P., BOHELER, K.R. WOBUS, A.M. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell. Mol. Life Sci*. 2004, roč. 61, č. 19-20, s. 2510-2522.

WILSON, A., TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol*. 2006, roč. 6, č. 2, s. 93-106.

WROBLEWSKI, J., ENGSTROM, M., EDWALL-ARVIDSSON, C., SJOBERG, G., SEJERSEN, T., LENDAHL, U. Distribution of nestin in the developing mouse limb bud in vivo and in micro-mass cultures of cells isolated from limb buds. *Differentiation*. 1997, roč. 61, s. 151-159.

YAMASHIMA, T., TACHIBANA, O., NITTA, H., YAMAGUCHI, N., YAMASHITA, J. Ultrastructural immunogold labelling of vimentin filaments on postembedding ultrathin sections of arachnoid villi and meningiomas. *Histol. Histopathol*. 1989, roč. 4, s. 47-53.

YANG, J., BIAN, W., GAO, X., CHEN, L., JING N. Nestin expression during mouse eye and lens development. *Mech. Dev*. 2000, roč. 94, s. 287-291.

YANG, J., DOMINGUEZ, B., DE WINTER, F., GOULD, T.W., ERIKSSON, J.E., LEE, K.F. Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nat Neurosci*. 2011, roč. 14, č. 3, s. 324-330.

YIN, H., PRICE, F., RUDNICKI, M.A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev*. 2013, roč. 93, s. 23-67.

ZAMMIT, P.S., PARTRIDGE, T.A., YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem. Cytochem*. 2006, roč. 54, s. 1177-1191.

ZELENÁ, J., SOBOTKOVÁ, M. Absence of muscle spindles in regenerated muscles of the rat. *Physiol. Bohemoslov*. 1971, roč. 20, č. 5, s. 433-439.

ZELENÁ, J. *Nerves and mechanoreceptors*. London: Chapman and Hall, 1994. ISBN 978-0-412-43430-3.

ZELENÁ, J., SOUKUP, T. Increase in the number of intrafusal muscle fibres in rat muscles after neonatal motor denervation. *Neuroscience*. 1993, roč. 52, s. 207-218.

ZHANG, L., THEISE, N., CHUA, M., REID, L.M. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology*. 2008, roč. 48, č. 5, s. 1598-1607.

ZHAO, Y., URGANUS, A.L., SPEVAK, L., SHRESTHA, S., DOTY, S.B., BOSKEY, A.L., PACHMAN, L.M. Characterization of dystrophic calcification induced in mice by cardiotoxin. *Calcif. Tissue Int.* 2009, roč. 85, s. 267-275.

ZIMMERMAN, L., PARR, B., LENDAHL, U., CUNNINGHAM, M., MCKAY, R., GAVIN, B., MANN, J., VASSILEVA, G., MCMAHON, A. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cell or muscle precursors. *Neuron.* 1994, roč. 12, s. 11-24.

9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Prvoautorské publikace v odborných časopisech s IF

ČÍŽKOVÁ, D., KOMÁRKOVÁ, Z., BEZROUK, A., MACHÁČKOVÁ, L., VÁVROVÁ, J., FILIP, S., MOKRÝ, J. Bone marrow-derived cells participate in composition of the satellite cell niche in intact and regenerating mouse skeletal muscle. *Folia Biol (Praha)*. 2018, roč. 64, č. 5-6, s. 155-166. (IF 1,073)

ČÍŽKOVÁ, D., VÁVROVÁ, J., MIČUDA, S., FILIP, S., BRČÁKOVÁ, E., BRŮČKOVÁ, L., MOKRÝ, J. Role of transplanted bone marrow cells in response to skeletal muscle injury. *Folia Biol. (Praha)*. 2011, roč. 57, č. 6, s. 232-41. (IF 0,729)

ČÍŽKOVÁ, D., SOUKUP, T., MOKRÝ, J. Expression of nestin, desmin and vimentin in intact and regenerating muscle spindles of rat hind limb skeletal muscles. *Histochem. Cell Biol.* 2009, roč. 131, č. 2, s. 197-206. (IF 2,893)

ČÍŽKOVÁ, D., SOUKUP, T., MOKRÝ, J. Nestin expression reflects formation, revascularization and reinnervation of new myofibers in regenerating rat hind limb skeletal muscles. *Cells Tissues Organs*. 2009, roč. 189, č. 5, s. 338-347. (IF 1,776)

ČÍŽKOVÁ, D., MOKRÝ, J., MIČUDA, S., ÖSTERREICHER, J., MARTÍNKOVÁ, J. Expression of MRP2 and MDR1 transporters and other hepatic markers in rat and human liver and in WRL 68 cell line. *Physiol. Res.* 2005, roč. 54, č. 4, s. 419-428 (IF 1,140)

ČÍŽKOVÁ, D., MOKRÝ, J., MIČUDA, S., ÖSTERREICHER, J., MARTÍNKOVÁ, J. Expression of MRP2 and MDR1 and other hepatic markers in hepatocytes in situ and WRL 68 cells in vitro. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005, roč. 96, č. 3, s. 249-250. (IF 1,302)

Spoluautorské publikace v odborných časopisech s IF

ČECHÁKOVÁ, L., ONDŘEJ, M., PAVLÍK, V., JOŠT, P., ČÍŽKOVÁ, D., BEZROUK, A., PEJCHAL, J., AMARAVADI, R.K., WINKLER, J.D., TICHÝ, A. A potent autophagy inhibitor (Lys05) enhances the impact of ionizing radiation on human lung cancer cells H1299. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, roč. 20, č. 23, pii: E5881. doi: 10.3390/ijms20235881.

FILIP, S., MOKRÝ, J., VÁVROVÁ, J., ČÍŽKOVÁ, D., ŠINKOROVÁ, Z., MIČUDA, S., BLÁHA, M., ENGLISH, D. Splenectomy influences homing of transplanted stem cells in bone marrow-ablated mice. *Stem Cells Dev.* 2012, roč. 21, č. 5, s. 702-709. (IF 4,791)

FILIP, S., MOKRÝ, J., ČÍŽKOVÁ, D., VÁVROVÁ, J., MIČUDA, S., BLÁHA, M. Colonization of recipient tissues with transplanted murine bone marrow cells. *Transfus. Apher. Sci.* 2012, roč. 46, č. 1, s. 109-111. (IF 1,587)

FILIP, S., MOKRÝ, J., VÁVROVÁ, J., ČÍŽKOVÁ, D., ŠINKOROVÁ, Z., TOŠNEROVÁ, V., BLÁHA, M. Homing of lin(-)/CD117(+) hematopoietic stem cells. *Transfus. Apher. Sci.* 2009, roč. 41, č. 3, s. 183-190. (IF 0,938)

FILIPOVÁ, A., DIAZ GARCIA, D., BEZROUK, A., ČÍŽKOVÁ, D., DVOŘÁK, J., FILIP, S., STURGE, J., ŠINKOROVÁ, Z. The toxic effect of cytostatics on primary cilia frequency and multiciliation. *J. Cell. Mol. Med.* 2019, roč. 23, č. 8, s. 5728-5736.

FILIPOVÁ, A., DIAZ-GARCIA, D., BEZROUK, A., ČÍŽKOVÁ, D., HAVELEK, R., VÁVROVÁ, J., DAYANITHI, G., ŘEZÁČOVÁ, M. Ionizing radiation increases primary cilia incidence and induces multiciliation in C2C12 myoblasts. *Cell Biol Int.* 2015, roč. 39, č. 8, s. 943-953. (IF 1,933)

MIČUDA, S., MUNDLOVÁ, L., MOKRÝ, J., ÖSTERREICHER, J., CERMANOVÁ, J., ČÍŽKOVÁ, D., MARTÍNKOVÁ, J. The effect of Mdr1 induction on the pharmacokinetics of rhodamine 123 in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005, roč. 96, č. 3, s. 257-258. (IF 1,302)

MOKRÝ, J., PUDIL, R., EHRMANN, J., ČÍŽKOVÁ, D., ÖSTERREICHER, J., FILIP, S., KOLÁŘ, Z. Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted patients. *Virchows Arch.* 2008, roč. 453, č. 1, s. 33-41. (IF 2,029)

MOKRÝ, J., KARBANOVÁ, J., FILIP, S., ČÍŽKOVÁ, D., PAZOUR, J., ENGLISH, D. Phenotypic and morphological characterization of in vitro oligodendroglial cells. *Stem Cells Dev.* 2008, roč. 17, č. 2, s. 333-341. (IF 3,224)

MOKRÝ, J., ČÍŽKOVÁ, D., FILIP, S., EHRMANN, J., ÖSTERREICHER, J., KOLÁŘ, Z., ENGLISH, D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev.* 2004, roč. 13, č. 6, s. 658-664. (IF 3,116)

SCHONDORF, I., BERAN, J., ČÍŽKOVÁ, D., LESNÁ, V., BANZHOF, A., ZENT, O. Tick-borne encephalitis (TBE) vaccination: Applying the most suitable vaccination schedule. *Vaccine.* 2007, roč. 25, č. 8, s. 1470-1475. (IF 3,338)

Spoluautorské publikace v odborných recenzovaných časopisech (indexovaných v medicínských databázích Web of Science, PubMed nebo SCOPUS)

HREBÍKOVÁ, H., ČÍŽKOVÁ, D., CHVÁTALOVÁ, J., PISAL, R., ADAMČIK, R., BEZNOŠKA, P., DÍAZ-GARCIA, D., MOKRÝ, J. Cell stratification, spheroid formation and bioscaffolds used to grow cells in three dimensional cultures. *Acta Medica (Hradec Králové).* 2015, roč. 58, č. 3, s. 79-85.

MOKRÝ, J., EHRMANN, J., KARBANOVÁ, J., ČÍŽKOVÁ, D., SOUKUP, T., SUCHÁNEK, J., FILIP, S., KOLÁŘ, Z. Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2008, vol. 51, č. 3, s. 173-179.

MOKRÝ, J., KARBANOVÁ, J., ČÍŽKOVÁ, D., PAZOUR, J., FILIP, S., ÖSTERREICHER, J. Differentiation of neural stem cells into cells of oligodendroglial lineage. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2007, roč. 50, č. 1, s. 35-41.

MOKRÝ, J., ČÍŽKOVÁ, D., OSTERREICHER, J. Subependymal zone: immunohistochemically distinct compartment in the adult mammalian forebrain. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2004, roč. 47, č. 4, s. 235-242.