

Anna Głowacka

Stymulacja neuronalnej nadprodukcji BDNF w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura; ocena zmian molekularnych i morfologicznych w okresie najlepszej poprawy funkcjonalnej

Praca doktorska
wykonana w Grupie Neurobiologii Naprawczej
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Małgorzata Skup

Promotor pomocniczy:

Dr Olga Gajewska-Woźniak

Warszawa, 2023

Badania zrealizowane w niniejszej pracy były wykonane i współfinansowane w ramach następujących projektów badawczych:

NCN grant OPUS 2018/31/B/NZ4/02789

NCN grant PRELUDIUM 2020/37/N/NZ4/04136

NCN grant OPUS 2013/09/B/NZ4/03306

oraz funduszy przeznaczonych na realizację zadań statutowych Instytutu Nenckiego



Część wyników, włączonych do pracy doktorskiej, opublikowano w następującym artykule:

Głowacka A., Ji, B.; Szczepankiewicz, A.A., Skup, M., Gajewska-Woźniak, O. (2022) BDNF Spinal Overexpression after Spinal Cord Injury Partially Protects Soleus Neuromuscular Junction from Disintegration, Increasing VACHT and AChE Transcripts in Soleus but Not Tibialis Anterior Motoneurons. *Biomedicines* 10, 2851. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112851>

PODZIĘKOWANIA

Z głębokim szacunkiem i wdzięcznością pragnę wyrazić najszczerze podziękowania Pani Promotor,

Pani Profesor Małgorzacie Skup, za pełną zaangażowania i profesjonalizmu opiekę nad moją pracą doktorską. Wysoka kompetencja, wiedza i wysiłek włożony w mój rozwój naukowy, a przy tym okazywana wyrozumiałość i życzliwość pozostaną ze mną jako wzór do naśladowania i inspiracja.

Składam również serdeczne podziękowania

Pani Profesor Julicie Czarkowskiej-Bauch za nieocenione wsparcie merytoryczne w analizie danych behawioralnych i gotowość do dzielenia się wiedzą i doświadczeniem.

Pragnę serdecznie podziękować mojej Promotor Pomocniczej,

dr Oldze Gajewskiej-Woźniak za wsparcie i konstruktywne opinie na każdym etapie pracy.

Chciałabym również podziękować:

dr Andrzejowi Szczepankiewiczowi za pomoc w doświadczeniach z wykorzystaniem techniki mikroskopii elektronowej;

dr Matyldzie Macias za wsparcie w przeprowadzeniu eksperymentu na hodowlach komórkowych;

Natalii Nowak, Arturowi Wolnemu oraz Małgorzacie Całce-Kresa, pracownikom Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych, za merytoryczną pomoc przy obrazowaniu mikroskopowym;

a także wszystkim Koleżankom i Kolegom z Grupy Neurobiologii Naprawczej, w szczególności Benjunowi, Rafałowi, Ewelinie, Kamilowi, Sylwii i Idze, za wsparcie, zaangażowanie i tworzenie pozytywnej atmosfery pracy.

Spis treści

Wykaz użytych skrótów.....	10
STRESZCZENIE.....	11
ABSTRACT	13
1. WPROWADZENIE	15
1.1 Kontrola lokomocji u zwierząt i generowanie ruchu na poziomie rdzenia kręgowego.....	15
1.2 Realizacja funkcji motorycznych przez aparat mięśniowy	15
1.3 Uszkodzenia rdzenia kręgowego.....	17
1.3.1 Epidemiologia.....	17
1.3.2 Całkowite przecięcie rdzenia kręgowego w dolnym odcinku piersiowym u dorosłego szczura: model do badań potencjału odizolowanej sieci neuronowej.....	18
1.3.3 Charakterystyka zmian po urazach – rdzeń kręgowy	19
1.3.4 Charakterystyka zmian po urazach – synapsy obwodowe i mięśnie	20
1.4 BDNF – aktywność i występowanie w rdzeniu kręgowym	22
1.5 BDNF – aktywność i występowanie w złączach nerwowo-mięśniowych i mięśniach	24
1.6 Wykorzystanie BDNF w terapii uszkodzonego rdzenia kręgowego	25
1.7 Wirusy AAV jako nośniki genów w terapii genowej.....	26
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY.....	27
3. MATERIAŁY I METODY	28
3.1 Podstawowe odczynniki, roztwory, zestawy odczynników, materiały i aparatura	28
3.2 Metody <i>in vitro</i>	32
3.2.1 Hodowla komórkowa	32
3.2.2 Zbieranie pożywki wzrostowej i przygotowywanie lizatów komórek do doświadczenia WB.....	33
3.3 Zwierzęta doświadczalne	33
3.3.1 Grupy doświadczalne	34
3.3.2 Procedura osuwania zwierząt.....	35
3.4 Zabiegi chirurgiczne.....	35
3.4.1 Domięśniowe iniekcje barwników	35
3.4.2 Całkowite przecięcie rdzenia kręgowego	37
3.4.3 Iniekcje dordzeniowe PBS, AAV-eGFP i AAV-BDNF	37
3.4.4 Opieka pooperacyjna nad zwierzętami	39
3.5 Badania behawioralne	39

3.5.1	Procedura badania sprawności ruchowej zwierząt na ruchomym bieżniku z użyciem zmodyfikowanej skali BBB.....	39
3.5.2	Badanie progu czucia bólu testem von Freya	41
3.6	Pozyskiwanie materiału badawczego.....	42
3.6.1	Pozyskiwanie materiału tkankowego do doświadczeń immunohistochemicznych i mikroskopii elektronowej	42
3.6.2	Pozyskiwanie materiału tkankowego do doświadczeń biochemicznych	42
3.7	Metody pracy z kwasami nukleinowymi.....	43
3.7.1	Izolowanie całkowitego RNA.....	43
3.7.2	Pomiar stężenia i ocena jakości RNA i cDNA	44
3.7.3	Otrzymywanie cDNA do badania ekspresji genów: synteza komplementarnego DNA na matrycy całkowitego RNA w reakcji odwrotnej transkrypcji.....	44
3.7.4	Badanie ekspresji genów; reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)	45
3.7.5	Badanie ekspresji genów – fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH).....	47
3.8	Metody pracy z białkami.....	48
3.8.1	Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	48
3.8.2	Transfer białek na błony PVDF	49
3.8.3	Immunochemiczna detekcja białek na membranach	51
3.8.4	Immunofluorescencyjne identyfikowanie białek (IF) w tkance.....	52
3.9	Mikroskopia elektronowa.....	54
3.9.1	Przygotowanie preparatów do obrazowania metodą mikroskopii elektronowej	54
3.10	Akwizycja i analiza obrazów mikroskopowych – mikroskopia konfokalna	55
3.10.1	Dekonwolucja obrazów	56
3.10.2	Trójwymiarowa (3D) rekonstrukcja obrazów IF z mikroskopu konfokalnego	56
3.10.3	Analiza intensywności znakowania białek i ilości transkryptów w 2D	57
3.11	Akwizycja i analiza obrazów – mikroskopia elektronowa.....	58
3.11.1	Parametry optyczne rejestracji obrazu i sprzęt mikroskopowy.....	58
3.11.2	Ocena rozmiaru i gęstości rozmieszczenia pęcherzyków synaptycznych w złączy nerwowo-mięśniowym.....	58
3.11.3	Ocena szerokości szczeliny synaptycznej oraz liczby stref aktywnych.....	58
3.12	Analiza statystyczna wyników	59
4.	WYNIKI.....	60
4.1	Wydzielanie i aktywność biologiczna rekombinowanego BDNF	60
4.2	Ocena lokomocji szczurów po spinalizacji i dordzeniowej iniekcji AAV-BDNF	61
4.3	Ocena progów bólowych w kończynach tylnych.....	63

4.4	Ocena zakresu transdukcji wektorem AAV-BDNF i występowania rekombinowanego BDNF	64
4.5	Analiza wpływu iniekcji AAV-BDNF na ekspresję BDNF oraz receptorów TrkB i p75 w rdzeniu kręgowym i mięśniach TA i Sol	67
4.7	Analiza ekspresji BDNF oraz receptorów TrkB i p75 w motoneuronach za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i>	72
4.8	Ocena zmian w złączach nerwowo-mięśniowych TA i Sol po SCT i rdzeniowej nadekspresji BDNF.....	75
4.9	Analiza ekspresji BDNF oraz receptorów TrkB i p75 w złączach nerwowo-mięśniowych TA i Sol za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> połączonej z IF.....	76
4.10	Wpływ SCT oraz nadekspresji BDNF na stan złącza nerwowo-mięśniowego	79
4.10.1	Ocena stopnia demielinizacji i ekspresji markerów mieliny.....	79
4.10.2	Ocena integralności złącza – znakowanie struktur pre- i postsynaptycznych.....	81
4.10.3	Ocena ultrastruktury złącza.....	83
4.11	Wpływ iniekcji AAV-BDNF na ekspresję markerów neuroprzeżywalności motoneuronów w mięśniach	85
5.	DYSKUSJA	87
5.1	Poprawa zdolności lokomotorycznych w odpowiedzi na BDNF	87
5.2	Wpływ BDNF na przeżywalność bólową.....	88
5.3	Różnice w ekspresji BDNF/TrkB/p75 między obwodami TA i Sol u zwierząt kontrolnych	88
5.4	Różnice w ekspresji BDNF/TrkB/p75 między obwodami TA i Sol u zwierząt spinalizowanych	90
5.5	Różnice w ekspresji BDNF/TrkB/p75 między obwodami TA i Sol u zwierząt z grupy AAV-BDNF	90
5.6	Brak negatywnej regulacji receptora TrkB w warunkach nadekspresji BDNF	92
5.7	Wzrost ekspresji p75 w rdzeniu kręgowym i złączu nerwowo-mięśniowym w warunkach nadekspresji BDNF	92
5.8	Wpływ BDNF na neuroprzeżywalność w złączu nerwowo-mięśniowym.....	93
5.9	Zagadnienie korelacji pomiędzy zachowaniem osłonki mielinoj a poziomem ekspresji markerów mieliny	94
5.10	Przyczyny mniejszej reprezentacji wyznakowanych motoneuronów oraz złączy nerwowo-mięśniowych po spinalizacji	95
5.11	Uzyskane wyniki widziane w aspekcie odległości od miejsca iniekcji.....	96
5.12	Ograniczenia metodologiczne pracy i proponowany kierunek badań.....	96
6.	WNIOSKI KOŃCOWE.....	98
7.	BIBLIOGRAFIA.....	99
8.	SPIS PUBLIKACJI WŁASNYCH	110

Wykaz użytych skrótów

AAV (ang. adeno-associated virus) - wirusy zależne od adenowirusów
Ab (ang. antibody) – przeciwciało
ACh (ang. acetylcholine) – acetylocholina
BDNF (ang. brain derived neurotrophic factor) – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego
bGH (ang. bovine growth hormone) – bydlęcy hormon wzrostu
BTX (ang. bungarotoxin) - bungarotoksyna
cDNA (ang. copy DNA, complementary DNA) - sekwencja syntetycznego DNA uzyskana w wyniku enzymatycznej transkrypcji ze specyficznego mRNA z użyciem odwrotnej transkryptazy, kodująca gen bez intronów
cds (ang. complete coding sequence) – bezintronowe mRNA przepisane na sekwencję DNA
ChAT (ang. choline acetyltransferase) – acetylotransferaza cholinowa (EC 3.1.1)
cMYC - metka cMYC, czynnik transkrypcyjny
CPG (ang. central pattern generator) – ośrodkowy generator wzorca lokomocji
DEPC (ang. diethylpyrocarbonate) – dietylopirowęglan
DMSO (ang. dimethyl sulfoxide) – dimetylosulfotlenek
DNA (ang. deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP (ang. deoxyribonucleotide) - mieszanina deoksynukleotydów
eGFP (ang. enhanced green fluorescent protein) –białko wzmocnionej zielonej fluorescencji
FISH (ang. fluorescence *in situ* hybridization) – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
GAPDH (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (białko podstawowego metabolizmu komórkowego), tu: gen referencyjny w qPCR
HRP (ang. horse redish peroxide) – peroksydaza chrzanowa
hSyn (ang. human synapsin) - gen synapsyny człowieka, tu: neuronospecyficzny promotor
IgG - immunoglobulina G
kb (ang. kilobase) – tysiąc par zasad (kpz), jednostka miary wielkości kwasów nukleinowych
KO (ang. knock-out) – zwierzęta z wyłączoną ekspresją określonego genu
L (ang. lumbar) – odcinek lędźwiowy rdzenia kręgowego
MAPK (ang. mitogen-activated protein kinase) - kinaza białkowa aktywowana mitogenami
mc. – masa ciała
MN (ang. motor neuron) - motoneuron
NGS (ang. normal goat serum) – koźła surowica przedimmunizacyjna
NMJ (ang. neuromuscular junction) – złącze nerwowo-mięśniowe
p75 – receptor neurotrofin o małym powinowactwie (m.cz. 75kDa)
qRT-PCR (ang. quantitative PCR, real-time PCR) – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy służąca pomiarowi poziomu ekspresji genów, PCR w czasie rzeczywistym
rBDNF (ang. recombinant brain derived neurotrophic factor) – rekombinowany czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego
SCT (ang. spinal cord transection) - przecięcie rdzenia kręgowego
T (ang. thoracic) – odcinek piersiowy rdzenia kręgowego
TEM (ang. transmission electron microscopy) – transmisyjna mikroskopia elektronowa
tSC (ang. terminal Schwann cells) – przyłączone komórki Schwanna
TU (ang. transduction units) – bezwzględna liczba transdukujących cząsteczek wektorów wirusowych
VACHT (ang. vesicular acetylcholine transporter) – pęcherzykowy transporter acetylocholiny
w/v – wagowo/objętościowy
w/w – wagowo/wagowy
WPRE (ang. Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element) – element wzmacniający ekspresję genów pochodzenia wirusowego, wykorzystywany w inżynierii genetycznej do stabilizacji mRNA transgenu
mBBB (ang. modified Basso, Beattie and Bresnahan scale) - zmodyfikowana skala Basso, Beattie i Bresnahan, używana do oceny zdolności lokomotorycznych szczurów po uszkodzeniu rdzenia.

STRESZCZENIE

Uszkodzenie rdzenia kręgowego prowadzi do przerwania i degeneracji dróg nerwowych, które mają swoje źródło w ośrodkach nadrženiowych. W rezultacie pacjent doświadcza częściowej lub całkowitej utraty zdolności ruchowej, której stopień zależy od lokalizacji i stopnia uszkodzenia rdzenia. Takie urazy często wiążą się z trwałą niepełnosprawnością, gdyż obecne metody leczenia są ograniczone w swojej skuteczności. Pomimo intensywnych badań i rozwoju w dziedzinie neurobiologii regeneracyjnej, znalezienie terapii, która odwraca lub łagodzi skutki uszkodzenia rdzenia kręgowego wciąż pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Jedną z obiecujących strategii jest wzbogacanie sieci neuronowej poniżej miejsca uszkodzenia w neurotrofiny – niskocząsteczkowe białka promujące przeżycie neuronów i procesy plastyczności synaptycznej.

W niniejszej dysertacji dorosłym szczurom po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego (SCT) na poziomie dolnych segmentów piersiowych podano dordzeniowo wektor AAV niosący gen czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (AAV-BDNF). Zwierzęta z nadekspresją BDNF wykazały szybką i znaczącą poprawę sprawności ruchowej; w trzecim tygodniu po uszkodzeniu odzyskały zdolność do naprzemiennego ruchu kończyn, podporu masy ciała i stawiania stóp na podszwie w trakcie treningu na ruchomym bieżniku, a ocena w skali mBBB (zmodyfikowanej skali Basso, Beattie i Bresnahan) była zbliżona do wyników u szczurów bez uszkodzenia. Te wyniki, uzyskane w grupie 14 zwierząt stały się mocnym potwierdzeniem potencjału terapeutycznego wektora AAV-BDNF zaobserwowanego wcześniej w eksperymencie chronicznym przeprowadzonym w naszym Zespole. W doświadczeniu trwającym 6 tygodni okres najlepszej poprawy funkcjonalnej przypadał na trzeci tydzień po SCT i iniekcji AAV-BDNF, zaś w późniejszych czasach pooperacyjnych pojawiały się efekty uboczne w postaci drgawek i ruchów klonicznych, najprawdopodobniej związane z nadmierną stymulacją sieci.

W niniejszej pracy postanowiono odpowiedzieć na pytanie o molekularne podłoże terapeutycznego działania BDNF. W tym celu scharakteryzowano zmiany neurochemiczne i strukturalne w rdzeniu kręgowym i złączy nerwowo-mięśniowym w okresie największej poprawy funkcjonalnej. Ze względu na przesłanki wskazujące na różną wrażliwość na SCT obwodów neuronalnych dwóch przeciwstawnie działających mięśni stawu skokowego: zginacza (Tibialis anterior, TA) i prostownika (Soleus, Sol), zbadano motoneurony i złącza nerwowo-mięśniowe tych dwóch mięśni. Połączenie analizy komórkowej i subkomórkowej dystrybucji mRNA, ocenianej na podstawie fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oraz analizy rozmieszczenia białek wykrywanych za pomocą immunofluorescencji na skrawkach tkanki umożliwiło kompleksową odpowiedź na pytania o wpływ uszkodzenia i nadekspresji BDNF na odpowiedzi komórkowe w rdzeniu kręgowym i mięśniach. W celu zbadania zmian w ultrastrukturze złącza nerwowo-mięśniowego posłużono się transmisyjną mikroskopią elektronową.

Wykazano, że w trzecim tygodniu po podaniu wektora nadekspresja BDNF w rdzeniu kręgowym koncentrowała się w neuronach segmentów lędźwiowych L1-L2, bliskich miejsca iniekcji, natomiast w rejonie motoneuronów tylnych kończyn, zlokalizowanych w segmentach L3-L6, białko transgeniczne obserwowano tylko we włóknach transdukowanych komórek. Na podstawie tak scharakteryzowanego rozmieszczenia rekombinowanego BDNF wysunięto wniosek, że lokalnie wprowadzony wektor prowadzi do działania transgenicznego białka na neurony zlokalizowane w przestrzeni całego odcinka lędźwiowego. Dowiedziono, że terapia wywarła szereg pozytywnych skutków: pozwoliła utrzymać obniżoną po SCT receptywność motoneuronów na BDNF wpływając na ekspresję receptora o wysokim powinowactwie TrkB, spowodowała zwiększoną aktywność transkrypcyjną podłączonych jąder komórkowych miocytów i przyczyniła się do normalizacji markerów przewodnictwa neuronalnego w mięśniu. Ponadto stwierdzono, że iniekcja AAV-BDNF doprowadziła do zachowania integralności strukturalnej złączy nerwowo-mięśniowych, przy czym jednostka nerwowo-mięśniowa Soleusa odpowiadała lepiej na terapię. Uzyskane wyniki przyczyniają się do zrozumienia mechanizmu działania neurotrofiny BDNF oraz wskazują na potencjalnie użyteczny kierunek badań: terapię celowaną przeznaczoną do wybranych typów jednostek motorycznych.

ABSTRACT

Spinal cord injury leads to the disruption and degeneration of neural pathways originating in supraspinal centers. Consequently, patients experience partial or complete loss of motor function, the extent of which depends on the location and severity of spinal damage. Such injuries often result in permanent disability due to limited effectiveness of current treatment methods. Despite intensive research and development in regenerative neurobiology, finding a therapy that reverses or mitigates the effects of spinal cord injury remains one of the greatest challenges in contemporary medicine. One promising strategy involves enriching the neuronal network below the injury site with neurotrophins – low molecular weight proteins that promote neuron survival and synaptic plasticity processes.

In this dissertation, adult rats subjected to complete spinal cord transection (SCT) at the lower thoracic segments were administered an intraspinal AAV vector carrying the brain-derived neurotrophic factor gene (AAV-BDNF). Animals overexpressing BDNF demonstrated rapid and significant improvement in motor function; by the third week post-injury, they regained the ability for alternating limb movements, weight-bearing, and plantar stepping during treadmill training, and their mBBB scale assessment (modified Basso, Beattie, and Bresnahan scale) approximated the results in uninjured rats. These results, obtained in a group of 14 animals, strongly confirmed the therapeutic potential of the AAV-BDNF vector previously observed in a chronic experiment conducted by our Team. In the 6-week experiment, the best functional improvement occurred in the third week post-SCT and AAV-BDNF injection, but side effects in the form of clonic movements emerged in later postoperative periods, likely related to overstimulation of the network.

This study aimed to elucidate the molecular basis of BDNF's therapeutic action. To this end, neurochemical and structural changes in the spinal cord and neuromuscular junction were characterized during the period of greatest functional improvement. Given indications of different SCT sensitivities in the neuronal circuits of two antagonistic muscles of the ankle joint: the flexor (Tibialis anterior, TA) and extensor (Soleus, Sol), motoneurons and neuromuscular junctions of these two muscles were examined. Combining cellular and subcellular mRNA distribution analysis, assessed via fluorescent in situ hybridization, and protein distribution analysis using immunofluorescence in tissue sections, provided a comprehensive response to questions about the impact of injury and BDNF overexpression on cellular responses in the spinal cord and muscles. Transmission electron microscopy was employed to examine changes in the ultrastructure of the neuromuscular junction.

It was demonstrated that, in the third week post-vector administration, BDNF overexpression in the spinal cord concentrated in neurons of the L1-L2 lumbar segments, close to the injection site, while in the area of the hind limb motoneurons, located in the L3-L6 segments, the transgenic protein was observed only in fibers of transduced cells. Based on this characterized distribution of recombinant BDNF, it was concluded that locally introduced vector leads to the transgenic protein's action on neurons located throughout the entire lumbar segment. The therapy was proven to have several

positive effects: it maintained reduced SCT post-injury receptivity of motoneurons to BDNF, caused increased transcriptional activity of subsynaptic myocyte nuclei, and contributed to the normalization of neuronal signaling markers in the muscle. Moreover, AAV-BDNF injection preserved the structural integrity of neuromuscular junctions, with the Soleus motor unit responding more favorably to therapy. These results contribute to understanding the mechanism of action of the neurotrophin BDNF and point to a potentially useful research direction: targeted therapy for selected types of motor units.

1. WPROWADZENIE

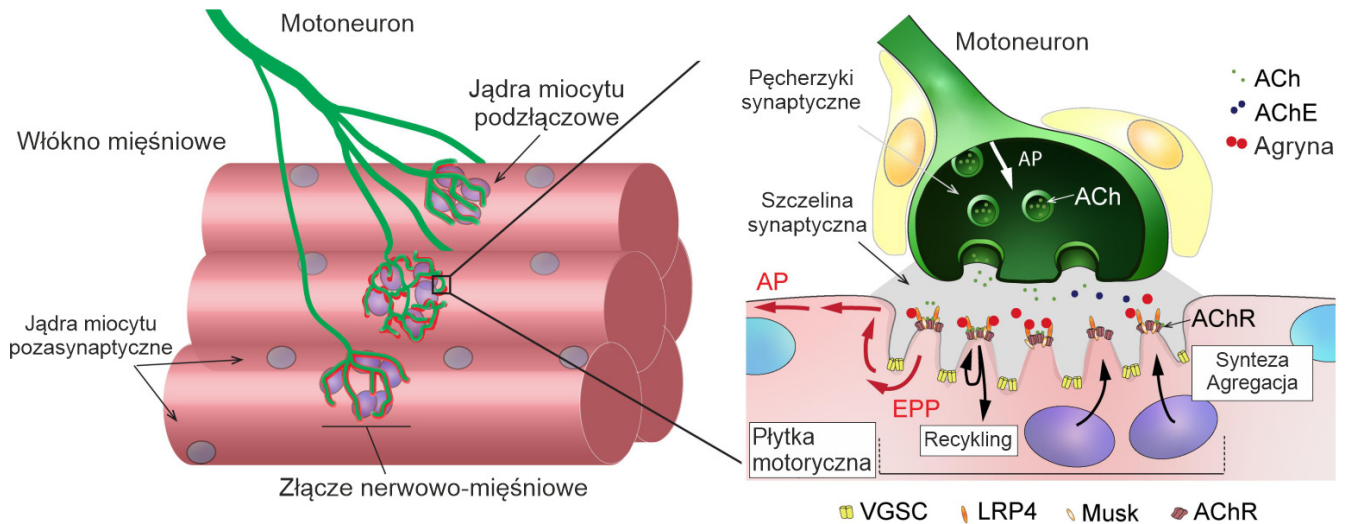
1.1 Kontrola lokomocji u zwierząt i generowanie ruchu na poziomie rdzenia kręgowego

Zachowanie ruchowe zwierząt kręgowych, nawet w przypadku najprostszych zadań, wymaga zintegrowanej pracy wielu sieci neuronowych w tym projekcji z ośrodków nadrdzeniowych w aspekcie planowania i egzekwowania ruchu. Na poziomie rdzenia kręgowego w kontrolę lokomocji zaangażowane są neurony zorganizowane w ośrodkowe generatory wzorca lokomocji (ang. central pattern generator; CPG), zlokalizowane na różnych poziomach rdzenia. CPG to lokalna grupa interneuronów, zorganizowanych w systemy kontrolujące aktywność i poziom pobudzenia motoneuronu (MN). Ich aktywacja jest inicjowana przez projekcje zstępujące z pnia mózgu, ale wykazują one także własną aktywność, zależną od wejść obwodowych (Kandel i in., 2021). Eksperymenty przeprowadzone przez Barbeau i Rossignola w latach 1989 - 2000 oraz Pearsona w latach 1997- 2000 roku na kotach udowodniły, że znacząca część kontroli nad lokomocją zachodzi na poziomie rdzenia kręgowego, co zostało potwierdzone w badaniach na kotach, którym całkowicie przecięto rdzeń kręgowy. Regularny trening ruchowy pozwolił kotom odzyskać zdolność do utrzymania podporu ciała i wykonywania ruchów lokomocyjnych (Barbeau & Rossignol, 1987; Stein i in., 2000). Modulowany przez CPG motoneuron, jego akson oraz grupa włókien mięśniowych, które są przez niego unerwione nazywany jednostką motoryczną. Pojęcie to wprowadził w 1925 roku Charles Sherrington.

1.2 Realizacja funkcji motorycznych przez aparat mięśniowy

Proces skurczu mięśnia polega na sumowaniu działań poszczególnych jednostek ruchowych pod wpływem impulsów nerwowych z ośrodków nerwowych. Jest to kluczowy mechanizm generowania ruchu w mięśniach (Celichowski i in., 1996; Kandel i in., 2021). W stanie spoczynku, sarkolemma utrzymuje stan polaryzacji, głównie dzięki gradientowi stężeń jonów potasu wewnątrz komórki oraz jonów sodu na zewnątrz włókna. Aktywacja włókna mięśniowego poprzez wyrzut acetylocholiny z aksonu oraz związanie jej z receptorem nikotynowym w części postsynaptycznej złącza wiąże się z otwarciem kanałów jonowych w sarkolemmie, co umożliwia przepływ jonów sodu i potasu zgodnie z ich gradientem stężeń i skurcz mięśnia (Ryc. 1P). Złącza nerwowo-mięśniowe to wyspecjalizowane synapsy chemiczne, a ich formowanie oraz utrzymanie wymaga złożonej współpracy między nerwami, włóknami mięśniowymi oraz terminalnymi komórkami Schwanna (tSC). Terminalne

niemielinizujące komórki Schwanna stanowią znaczącą, lecz stosunkowo słabo zbadaną składową złącza nerwowo-mięśniowego (NMJ). Reagują na aktywność synaptyczną, modulując transmisję w celu zapewnienia odpowiedniej siły sygnału w NMJ (Jahromi i in., 1992), a także mają kluczowe znaczenie w procesach regeneracji po uszkodzeniu nerwu, co zostało opisane w kolejnych rozdziałach.



Rycina 1P. Uproszczony schemat budowy i funkcjonowania złączy nerwowo-mięśniowych.

Po lewej: Schemat przedstawiający akson motoneuronu, który rozgałęzia się i tworzy złącze nerwowo-mięśniowe, unerwiając włókna mięśnia szkieletowego. Pod złączem nerwowo-mięśniowym widoczne są jądra podzłączowe. Po prawej: Powiększony widok złącza, ukazujący komórki Schwanna osłaniające mięsień i akson, fałdy postsynaptyczne oraz akumulację białek synaptycznych na postsynaptycznej błonie mięśniowej, a także wydzielanie pęcherzyków synaptycznych w odpowiedzi na potencjał czynnościowy. ACh, acetylocholina; AChE, acetylocholinesteraza; AChR, nikotynowy receptor acetylocholino; AP, potencjał czynnościowy; EPP, potencjał płytki końcowej; LRP4, białko pokrewne receptorowi LDL; VGSC, kanał sodowy zależny od napięcia. Źródło: (Castets i in., 2020), zmodyfikowane.

Każde włókno mięśniowe jest kontrolowane przez aktywność motoneuronu, która wpływa na unikalny zbiór genów, swoistych dla określonego typu włókna mięśniowego (Chin i in., 1998). Ze względu na funkcje, wyróżniamy kilka typów jednostek motorycznych: wolne i odporne na zmęczenie (S, ang. slow), szybkie i odporne na zmęczenie (FR, ang. fast fatigue-resistant) oraz szybkie o dużej męczliwości (FF, ang. fast fatigable), które cechuje różny metabolizm. Metabolizm włókien S jest oksydacyjny, włókien FR oksydacyjno-glikolityczny, a włókien FF tylko glikolityczny.

Włókna wolne i odporne na zmęczenie (S) używają tlenu do produkcji energii w mitochondriach. Dzięki temu mogą pracować przez długie okresy, nie wykazując oznak zmęczenia. Są bogate w mioglobinę oraz dobrze unaczynione, co ułatwia dostarczanie tlenu i składników odżywczych. Mają również więcej mitochondriów niż inne typy włókien.

Z kolei włókna szybkie i odporne na zmęczenie (FR) wykazują mieszany typ metabolizmu: oksydacyjno-glikolityczny. Pozwala on na generowanie energii zarówno w warunkach obecności tlenu, jak i jego braku, co sprawia, że są bardziej wszechstronne w porównaniu do włókien wolnych. Choć są szybsze od włókien wolnych, nadal wykazują stosunkowo dobrą odporność na zmęczenie.

Włókna szybkie o dużej męczliwości (FF) charakteryzują się wyłącznie glikolitycznym metabolizmem, co oznacza, że wytwarzają energię bez udziału tlenu. Są to włókna, które potrafią generować bardzo szybkie i silne skurcze, ale męczą się szybko. Te włókna są typowe dla aktywności wymagających krótkich, intensywnych wysiłków, szybko wytwarzają energię, ale również szybko wykorzystują swoje rezerwy energetyczne (Kandel i in., 2021).

Typ włókna można zidentyfikować za pomocą testów enzymatycznych (Lowry i in., 1978) i histochemicznej wizualizacji ATPazy (Brooke & Kaiser, 1970). Obecnie włókna mięśniowe są klasyfikowane głównie według występowania izoform łańcucha ciężkiego miozyny (MHC), które wyrażają (Schiaffino, 2018). Identyfikacja różnych włókien mięśni szkieletowych ewoluowała. W latach 1960–1967 badacze rozróżnili szybkie (białe) i wolne (czerwone) włókna mięśniowe; w latach 1967–1975 zidentyfikowano włókna MHC typu 1, 2A i 2B; a w latach 1986–1991 włókna mięśniowe typu 1, 2A, 2X i 2B (Murgia i in., 2021; Schiaffino, 2010, 2018).

1.3 Uszkodzenia rdzenia kręgowego

Ciężkie upośledzenia funkcji czuciowych i ruchowych oraz autonomicznych po urazie rdzenia kręgowego często powodują pełne uzależnienie osoby od pomocy zewnętrznej. Problem ten dotyka wielu ludzi a leczenie, które mogłoby doprowadzić do przywrócenia funkcji i wydłużenia życia osób po urazie wciąż pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Badania naukowe koncentrują się na dwóch głównych kierunkach: łagodzeniu negatywnych skutków uszkodzenia (takich jak rozwój reakcji zapalnej, neurotoksyczność i degeneracja komórek) oraz stymulacji uszkodzonych dróg nerwowych do regeneracji lub adaptacji.

1.3.1 Epidemiologia

Na podstawie danych z 2013 roku, opublikowanych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO), każdego roku na świecie odnotowuje się między 250 000 a 500 000 przypadków urazów rdzenia kręgowego. Wśród najczęstszych przyczyn wymienione są wypadki drogowe, upadki i akty przemocy. Prawie 90% przypadków ma charakter urazowy, choć udział urazów

pochodzenia innego niż mechaniczne wydaje się rosnać (Center, 2013). Uraz rdzenia kręgowego pociąga za sobą znaczne koszty indywidualne i społeczne. Osoby z urazem rdzenia kręgowego cechuje dwu- do pięciokrotnie wyższe ryzyko przedwczesnej śmierci w porównaniu z osobami bez tego urazu, przy czym gorsze wskaźniki przeżywalności odnotowuje się w krajach o niskich i średnich dochodach.

1.3.2 Całkowite przecięcie rdzenia kręgowego w dolnym odcinku piersiowym u dorosłego szczura: model do badań potencjału odizolowanej sieci neuronowej

Chociaż ruchy człowieka i szczura różnią się znacznie, to mechanizmy kontrolujące lokomocję w obu przypadkach wykazują istotne podobieństwa, umożliwiając ich porównywanie. Lokomocja czworonożna opiera się na rytmiczności i koordynacji ruchów przednich i tylnych kończyn, które są regulowane przez rdzeniowe generatory wzorca lokomocji, w tym przez neurony "sprzęgające" segmenty szyjne i lędźwiowe. Te zasadnicze mechanizmy koordynacji ruchów kończyn górnych i dolnych są zachowane również u ludzi. Na przykład, jednostronna elektrostymulacja mięśnia łydki podczas chodu wywołuje odruchową odpowiedź w mięśniach nóg i rąk, co nie występuje podczas stymulacji w pozycji siedzącej lub stojącej (Bastiaanse i in., 2000). Taka specyficzna dla danej aktywności reakcja umożliwia człowiekowi wykorzystanie kończyn górnych do precyzyjnych działań lub do utrzymania równowagi podczas chodu. Można stwierdzić, że podstawowe mechanizmy aktów ruchowych u ludzi pozostały niezmienione, choć rozwinęły się dodatkowe funkcje.

W eksperymentach na zwierzętach stosuje się różne metody uszkodzenia rdzenia, w tym kontuzję, kompresję, a także mikrochirurgiczne techniki polegające na częściowym lub całkowitym przecięciu rdzenia, najczęściej na poziomie dolnego odcinka piersiowego Th10-Th11. Uszkodzenia kontuzyjne odzwierciedlają najczęściej występujące typy urazów rdzenia kręgowego, z częściowym porażeniem kończyn dolnych. Uszkodzenie górnego odcinka szyjnego rdzenia jest także częste u ludzi, ale prowadzi do upośledzenia funkcji oddechowych, co w doświadczeniach chronicznych na zwierzętach, bez prowadzenia sztucznego oddychania prowadziłyby do śmierci zwierzęcia.

W niniejszych badaniach wykorzystano model całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego u szczura w dolnych segmentach piersiowych (T11-T12), który jest szeroko stosowany i dobrze opisany (Celichowski i in., 2006; Edgerton i in., 2001; Sławińska i in., 2000; Sławińska i in., 2014). Ten model umożliwia analizę zmian zachodzących w sieciach rdzenia kręgowego izolowanych od wpływów nadrdzeniowych, ale nadal podlegających wpływom proprioceptywnym i bodźcom z receptorów skórnych, w stopniu wystarczającym do

wywołania aktywności mięśnia (Alaimo i in., 1984; Li & Bennett, 2003). Wybrane podejście ułatwia interpretację uzyskanych danych – obserwowane zmiany molekularne i fizjologiczne można przypisać zmianom w sieciach rdzeniowych, które zostały odseparowane od wpływów pochodzących z wyższych ośrodków nerwowych.

1.3.3 Charakterystyka zmian po urazach – rdzeń kręgowy

Następstwem funkcjonalnym całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego (SCT) jest między innymi utrata zdolności lokomotorycznych z powodu zniesienia kontroli pochodzącej z ośrodków nadrdzeniowych i upośledzonej funkcji zachowanej sieci (Kim i in., 2002; Seif i in., 2007).

W pierwszej fazie pourazowej dochodzi do zniszczenia neuronów w polu urazu, przzerwania włókien nerwowych i uszkodzenia neuronów w pobliżu miejsca uszkodzenia oraz rozprzestrzeniającej się fali zmian spowodowanych spadkiem aktywności neuronów (Eidelberg i in., 1989; Liu i in., 1997; Tator, 1995). Bariera krew-rdzeń zostaje przzerwana. Wskutek tych zmian dochodzi do wystąpienia reakcji zapalnej, następują zmiany w stężeniach jonów w środowisku, zaburzenia energetyki komórkowej oraz uwalnianie wolnych rodników (Juurink & Paterson, 1998; Kuzhandaivel i in., 2011; Kwo i in., 1989; Tator & Fehlings, 1991). Zmiany obejmują też komórki glejowe; następuje degeneracja, rozplem i aktywacja komórek glejowych – stopień występowania tych trzech odpowiedzi zależy od odległości, w której są położone te komórki i ich prekursorzy od miejsca urazu. Obumieranie oligodendrocytów prowadzi do demielinizacji aksonów (Bresnahan i in., 1976; Totoiu & Keirstead, 2005), co obniża funkcjonalność zachowanych obwodów nerwowych poprzez wpływ na amplitudę i prędkość przewodnictwa elektrycznego (Blight, 1983; James i in., 2011; Nashmi & Fehlings, 2001).

W rejonach bardziej odległych od miejsca uszkodzenia, w ciągu dwóch pierwszych tygodni po urazie, zmiany w cechach morfologicznych MN obejmują przede wszystkim ich drzewo dendrytyczne. Liczba i stopień rozgałęzienia dendrytów MN ulegają zmniejszeniu, co zmienia znacząco wielkość pola recepcyjnego tych komórek i powoduje zmiany w ich pobudliwości (Gazula i in., 2004; Kitzman, 2006). Dopiero w późnym okresie, po kilku miesiącach zaobserwowano nieznaczne (4-8%) zmniejszenie obwodu perikarionów MN (Kitzman, 2005). Zniszczenie dróg, które tworzą połączenia z MN, eliminuje wiele zakończeń synaptycznych na dendrytach i ciałach MN. W wyniku dysfunkcji interneuronów, ocenianej na podstawie wyników badań elektrofizjologicznych, histologicznych i molekularnych, dochodzi do znacznego zmniejszenia pobudzających i hamujących sygnałów synaptycznych docierających

do MN (Grycz i in., 2019; Skup i in., 2012; Ziemińska i in., 2014). O osłabieniu funkcji MN we wczesnym okresie po urazie, świadczą również zmiany w aktywności transkrypcyjnej MN (Ji i in., 2022).

Wyniki naszej grupy wykazały, że całkowite przecięcie rdzenia kręgowego u szczurów skutkuje zmniejszeniem liczebności obwodowych proprioceptywnych wejść glutaminergicznych i interneuronalnych wejść cholinergicznych na perikariony MN w dolnych odcinkach lędźwiowych. Tym procesom towarzyszyły zmiany w gęstości sieci perineuronalnych w pobliżu tych MN (Grycz i in., 2019; Grycz i in., 2022; Skup i in., 2012). Kolejne badania ujawniły, że czasowy przebieg zmian w liczbie wejść na motoneurony zginacza (przedni piszczelowy; TA) i prostownika (mięsień płaszczkowaty; Sol) stawu skokowego był różny, co wskazuje na różną podatność tych obwodów na uraz rdzenia kręgowego (Gajewska-Woźniak, 2017; Skup i in., 2012; Więckowska i in., 2018).

Wszystkie te zmiany świadczą o skomplikowanej i wielopłaszczyznowej odpowiedzi rdzenia kręgowego na uraz, począwszy od bezpośredniego uszkodzenia tkanki, poprzez zmiany w unerwieniu i receptywności motoneuronów, aż do długofalowych zmian w ekspresji białek związanych z neuroprzebiegiem.

1.3.4 Charakterystyka zmian po urazach – synapsy obwodowe i mięśnie

Zmiany zachodzące w rdzeniu kręgowym po urazie prowadzą do silnego zaburzenia współdziałania między motoneuronami a unerwianymi przez nie włóknami w mięśniach (Burns i in., 2007; Ollivier-Lanvin i in., 2009; White & Holmes, 2018). Złącza nerwowo-mięśniowe, pozbawione odpowiedniej stymulacji, zaczynają ulegać dezintegracji. Stosując radykalny wariant uszkodzenia rdzenia kręgowego, które polegało na wycięciu fragmentu rdzenia i przecięciu korzonków grzbietowych, a więc w warunkach, w których usunięto również wejścia obwodowe do rdzenia, zaobserwowano masowy rozpad złączy nerwowo-mięśniowych. Dotykał on szczególnie NMJ w mięśniach TA dwa tygodnie po urazie (Burns i in., 2007). W innym zginaczu operującym w obrębie tego samego stawu, mięśniach prostownika długim palców (EDL), opisano również utratę receptora nikotynowego acetylocholin (nAChR) w NMJ (Burns i in., 2007). Zarówno u pacjentów w fazie podostrej jak i chronicznej po uszkodzeniu badania elektrofizjologiczne przeprowadzone na mięśniach TA udowodniły istotne zmniejszenie liczby jednostek motorycznych w porównaniu do wartości kontrolnych (Xiong i in., 2008). Jedną z przyczyn opisanego rozpadu złączy może być wzrost aktywności mięśniowych zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych, które mogą powodować degradację składników strefy błony podstawnej. W modelu aksotomii, po dwóch dniach od

uszkodzenia Festoff i współpracownicy zaobserwowali wzrost poziomu białka aktywatora plazminogenu (PA) utrzymujący się przez co najmniej 7 dni (Festoff i in., 1986).

W ostrej fazie po denerwacji szczególną aktywność w złączu nerwowo-mięśniowym wykazują terminalne komórki Schwanna. Począwszy od trzeciego dnia po uszkodzeniu nerwu, tSC wypuszczają wypustki cytoplazmatyczne, które służą jako swojego rodzaju „mosty” dla wzrostu aksonu (Kang i in., 2014; Love & Thompson, 1998). tSC nabywają także, niezbędną do pomyślnej regeneracji nerwu, aktywność fagocytarną. Usuwają szczątki osłonki mielinowej, przyciągają również makrofagi do miejsca urazu aby wspomóc ten proces (Duregotti i in., 2015). Po denerwacji za pomocą α -latroksyny, tSC były aktywowane przez trzy cząsteczki sygnałne pochodzenia mitochondrialnego: nadtlenek wodoru, cytochrom c i DNA mitochondrialne, poprzez ścieżkę MAPK. Inaktywacja nadtlenku wodoru opóźniła regenerację NMJ po denerwacji (Duregotti i in., 2015). Mitochondria występują obficie w złączu nerwowo-mięśniowym, a po urazie lub uszkodzeniu mięśni wywołanym toksyną, uwalniają one DNA mitochondrialne (mtDNA) oraz cytochrom c przyczyniając się do systemowych lub lokalnych odpowiedzi zapalnych (Duregotti i in., 2015; Zhang i in., 2010; Zornetta i in., 2012).

Wspomniane badania koncentrują się na reakcji komórek Schwanna na uszkodzenia nerwu, brakuje danych na temat zachowania tSC w sytuacji uszkodzenia rdzenia kręgowego. W tym przypadku akson pozostaje nienaruszony, a jedynie motoneuron doświadcza pewnego stopnia atrofii. W świetle opisanych badań, istnieje uzasadnione przypuszczenie, że terminalne komórki Schwanna mogą odgrywać znaczącą rolę również w tym modelu.

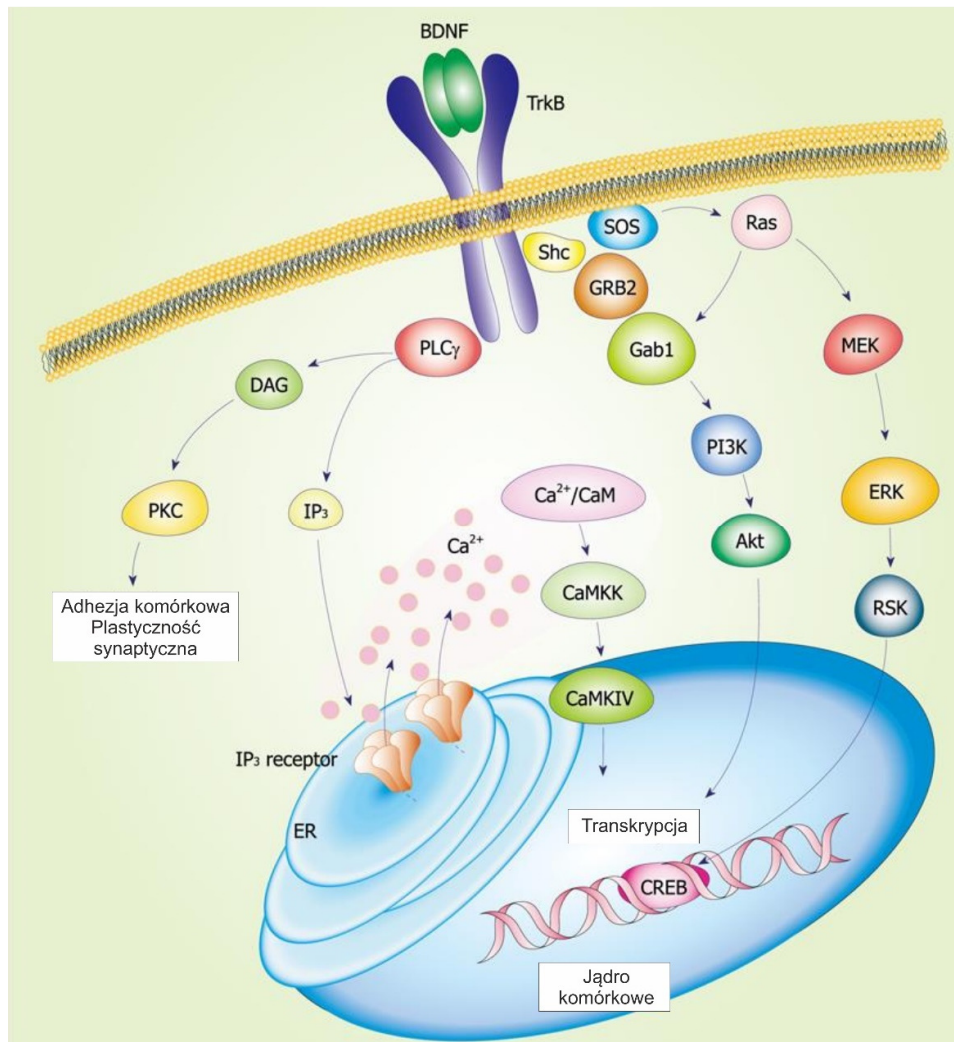
Zmiany w ultrastrukturze włókien mięśniowych po urazie rdzenia kręgowego zostały opisane u ludzi w badaniu z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej w przewlekle porażonym mięśniu uda, mięśniu obszernym bocznym (vastus lateralis) (Kern i in., 2008). Opisano także ultrastrukturalne i molekularne zmiany w miofibrylach wynikające z chronicznego braku aktywności mięśni (Salanova i in., 2014). Wspomniane doświadczenia ujawniły zmiany w mięśniach, które pojawiają się w przewlekłej fazie urazu rdzenia kręgowego. Mianowicie, (1) sarkomery były średnio o 20 nanometrów węższe w przewlekle porażonym mięśniu, (2) profile włókien w normalnym mięśniu były oddzielone minimalną ilością tkanki śródmiąższowej, z wysoko uporządkowaną organizacją wewnętrzną, podczas gdy u osób z urazem rdzenia przestrzeń śródmiąższowa między włóknami była powiększona, (3) średnica włókien była bardziej zmienna niż w normalnym mięśniu, niektóre włókna cechowała niezwykle duża lub bardzo mała średnica, (4) mitochondria straciły swoje specyficzne umiejscowienie obok linii Z i koncentrowały się głównie w skupiskach tuż pod

sarkolemmą. W ostrej fazie urazu badanie ultrastrukturalne ujawniło proliferację siateczki sarkoplazmatycznej, narastające nagromadzenie lipidów, włóknienie śródmiąższowe i zmiany mikrokrążenia (Scelsi i in., 1982). Późniejsze badania wykazały transformację mięśni z wolnych, odpornych na zmęczenie, do szybkich, męczliwych mięśni u ludzi (Gerrits i in., 1999) i szczurów (Talmadge i in., 2002) w przewlekłym okresie po urazie.

1.4 BDNF – aktywność i występowanie w rdzeniu kręgowym

Czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF), będący drugim po czynniku wzrostu nerwów (NGF) odkrytym członkiem rodziny neurotrofin, został po raz pierwszy wyizolowany przez Barde i współpracowników z mózgu świni w 1982 roku (Barde i in., 1982). BDNF charakteryzuje się szerokim występowaniem w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie wywiera zarówno neurotroficzne, jak i bezpośrednie elektrofizjologiczne efekty w centralnych strukturach motorycznych, w tym w korze ruchowej, mózdzku, jądrach podstawnych i rdzeniu kręgowym (Gómez-Pinilla i in., 2002; Hu i in., 2005; Kobayashi i in., 1997; Macias i in., 2002; Pajenda i in., 2014; Skup i in., 2014). W ośrodkowych strukturach motorycznych BDNF zajmuje kluczowe miejsce i jego deficyt prowadzi do poważnych zaburzeń ruchowych. Utrzymuje morfologię i funkcję neuronów, zapobiega zanikowi, moduluje regenerację aksonalną i plastyczność, działając poprzez receptor TrkB (Alonso i in., 2004; Koyama i in., 2004; McAllister i in., 1995; Oppenheim i in., 1992). BDNF ulegający ekspresji w neuronach ruchowych ma działanie proprzeżyciowe i proregeneracyjne (Macias i in., 2007; Nakajima i in., 2007; Pajenda i in., 2014; Uchida i in., 2012), podlega również transportowi wstecznemu, co jest istotne w komunikacji między mięśniami a motoneuronami (Mitsumoto & Tsuzaka, 1999). BDNF w organizmach dojrzałych pełni rolę modulatora przewodnictwa nerwowego, zarówno hamulcowego, jak i pobudzającego, (Crozier i in., 2008; Lu i in., 2009), poprzez zmiany w ekspresji podjednostek kanałów jonowych i fosforylację receptorów (Rose i in., 2004; Slack i in., 2004). Innym mechanizmem bezpośredniej regulacji neuroprzewodnictwa przez BDNF jest zmiana stanu fosforylacji synapsyny, białka biorącego udział w transporcie pęcherzyków synaptycznych. (Boulanger & Poo, 1999; Poo, 2001). Zmiany w synapsie indukowane neurotrofiną BDNF zachodzą tak szybko, że to działanie jest przyrównywane do klasycznych neuroprzekazników.

Istotne z punktu widzenia terapeutycznego jest to, że aktywność ruchowa wpływa na ekspresję, syntezę oraz wydzielanie neurotrofiny BDNF. Ekspresja receptora BDNF o wysokim powinowactwie TrkB również wzrasta po ćwiczeniu (Macias i in., 2007; Skup i in., 2002).



Rycina 2P. Kaskady sygnału aktywowane po związaniu się BDNF z receptorem o dużym powinowactwie TrkB.

Ścieżka MAPK/ERK: Gdy reszty tyrozynowe Tyr490 i Tyr515 receptora TrkB zostają aktywowane, białko adaptacyjne Shc wiąże się do nich i rekrutuje Grb2 (białko wiążące receptor czynnika wzrostu 2) oraz kinazę Ras MAPK/ERK. Następnie kinaza ta fosforyluje czynnik transkrypcyjny CREB (białko wiążące element odpowiedzi na cAMP). Fosforylowany CREB przenika do jądra komórkowego i wiąże się z promotorami różnych genów, regulując w ten sposób transkrypcję, promując przeżycie, różnicowanie i proliferację komórek.

Ścieżka PI3K/Akt: Kompleks Ras z resztą Tyr515 receptora TrkB aktywuje również ścieżkę kinazy PI3, która uruchamia dwie kaskady: ścieżkę PI3K/Akt i ścieżkę MEK/MAPK. Ścieżka PI3K/Akt również reguluje grupę białek niezbędnych dla różnicowania, wzrostu i przeżycia komórek.

Ścieżka PLCγ: Fosforylacja reszty Tyr816 receptora TrkB aktywuje ścieżkę PLCγ (fosfolipaza Cγ), wytwarzając DAG (diacyloglicerol) i IP3 (inozytol-1,4,5-trifosforan). Ścieżka PLCγ/IP3 stymuluje uwalnianie Ca²⁺ z ER i aktywuje CaMKII (kinaza białkowa zależna od wapnia/kalmoduliny II), która indukuje fosforylację CREB, podczas gdy DAG aktywuje PKC (kinaza białkowa C). Aktywacja CaMKII i PKC odgrywa rolę w promowaniu wzrostu neurytów, plastyczności synaptycznej i przeżycia neuronów. Źródło: (Numakawa i in., 2010), zmodyfikowane.

Początkowo BDNF jest syntetyzowany jako glikozylowany prekursor, proBDNF, a następnie przetwarzany do dojrzałej formy BDNF wewnątrz- (Mowla i in., 2001) lub zewnątrzkomórkowo (Lee i in., 2001). Zarówno proBDNF, jak i dojrzała forma BDNF są aktywne biologicznie, ale mają odmienne funkcje (Park & Poo, 2013). BDNF oddziałuje poprzez receptor kinazy tyrozynowej o dużym powinowactwie, TrkB, a główne szlaki sygnalizacyjne związane z aktywacją tego receptora obejmują kaskady kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK), szlak kinazy fosfatydyloinozytolu 3 (PI3K) oraz szlak fosfolipazy C- γ (PLC γ), przedstawione na Rycinie 2P.

ProBDNF wykazuje wysokie powinowactwo do receptora p75 i pośredniczy w działaniach przeciwstawnych; podczas gdy BDNF/TrkB zwiększa pobudliwość neuronów i siłę synaps, proBDNF/p75 działa zmniejszając pobudliwość oraz indukuje plastyczność neuronów (Sasi i in., 2017), aktywując szlak kinazy JNK (Anastasia i in., 2013; Kowiański i in., 2018; Reichardt, 2006), ale też wywołując apoptozę neuronów (Teng i in., 2005) oraz inicjując kaskadę NF- κ B regulującą rozwój i nawigację stożków wzrostu oraz przeżycie komórek. W procesie rozwoju organizmu, sygnalizacja przez receptor p75NTR indukuje ważny proces naturalnej śmierci komórkowej (Kraemer i in., 2014). Receptory TrkB i p75 występują na ciałach neuronów oraz dendrytach (Bronfman & Fainzilber, 2004) w tym receptor TrkB został opisany na błonach pre- i postsynaptycznych oraz wewnątrzkomórkowo (Gomes i in., 2006).

1.5 BDNF – aktywność i występowanie w złączach nerwowo-mięśniowych i mięśniach

BDNF ulega ekspresji w mięśniach szkieletowych zarówno w trakcie rozwoju, kiedy wpływa na ograniczenie eliminacji synaps w rozwoju postnatalnym (Je i in., 2013), jak i u dorosłych osobników, u których sygnalizacja BDNF/TrkB jest niezbędna dla zachowania stabilności złącza nerwowo-mięśniowego (NMJ) i prawidłowego neuroprzebieżnictwa (Ahuja i in., 2022; Delezie i in., 2019; Hurtado i in., 2017; Mantilla i in., 2014; Santafé i in., 2014).

Po związaniu z receptorem TrkB, BDNF aktywuje ścieżkę kinazy białkowej C i wpływa na uwalnianie ACh ułatwiając fuzję pęcherzyków synaptycznych poprzez fosforylację białek Munc-18-1 i SNAP-25 (Hurtado i in., 2017; Obis i in., 2015; Simó i in., 2018). Z drugiej strony, aktywacja receptora TrkB jest kontrolowana przez presynaptyczne receptory muskarynowe acetylocholino (mAChR) (Garcia, Tomàs, Santafé, i in., 2010; Lohof i in., 1993), co wskazuje na ścisłe powiązanie sygnalizacji cholinergiczej i BDNF w złączu nerwowo-mięśniowym.

Po związaniu z receptorem p75 proBDNF moduluje w złączu dostępność neuroprzebieżników i wpływa na organizację złącza nerwowo-mięśniowego w dojrzałym

układzie nerwowym (Garcia, Tomàs, Santafe, i in., 2010; Pérez i in., 2019). Stwierdzono, że brak receptora p75 skutkuje znacznym zmniejszeniem liczby pęcherzyków synaptycznych i stref aktywnych, a także zmniejszonym stopniem pofałdowania błony postsynaptycznej (Pérez i in., 2019).

BDNF jest wydzielany w mięśniu w sposób zależny od aktywności. Ten efekt obserwowano po treningu ruchowym i elektrostymulacji (Gajewska-Woźniak i in., 2013; Gómez-Pinilla i in., 2002; Hurtado i in., 2017; Just-Borràs i in., 2021; Macias i in., 2009; Matthews i in., 2009). Podwyższoną ekspresję BDNF w mięśniu opisano również przy uszkodzeniu tkanki. W szczurzym modelu cukrzycy ekspresja BDNF korelowała z wysokim poziomem kreatyny w osoczu. Autorzy wnioskuje, że to uszkodzenia mięśniowe obserwowane u tych zwierząt były głównym czynnikiem indukującym ekspresję (Copray i in., 2000). Wysoka ekspresja BDNF przyczynia się do regeneracji mięśni szkieletowych poprzez aktywację komórek miogennych, tzw. komórek satelitarnych mięśnia (Clow & Jasmin, 2010; Lian i in., 1998; Liu i in., 2015).

1.6 Wykorzystanie BDNF w terapii uszkodzonego rdzenia kręgowego

Odkrycia dotyczące roli BDNF w modulacji plastyczności synaptycznej i wpływu na białka związane z neuroprzekaznictwem skłoniły naukowców do prób wykorzystania tego czynnika jako środka wspomagającego w terapii uszkodzeń rdzenia kręgowego. Zarówno stymulowanie uwalniania BDNF, jak i zastosowanie egzogennej BDNF, przyczyniało się do poprawy funkcji lokomotorycznych po urazie (Gómez-Pinilla i in., 2001; Gómez-Pinilla i in., 2002; Sharma, 2007; Ye & Houle, 1997; Zhou i in., 2008). W jednym z nowszych badań udowodniono również pozytywny wpływ podania dooponowego BDNF u szczurów po hemisekcji na poziomie szyjnym C2, na aktywność elektromiograficzną mięśni przepony (Sieck i in., 2021).

Nasza grupa oraz grupa Lorne Mendella wykazały, że po przecięciu rdzenia kręgowego, szczury którym podano dordzeniowo AAV-BDNF wykonywały naprzemienne ruchy lokomotoryczne z podparciem ciężaru ciała i umieszczaniem stopy na powierzchni podszwowej, czego nie potrafiły szczury którym podano bufor PBS (Ziemlińska i in., 2014). Te pozytywne efekty zwiększonej ekspresji BDNF stały się widoczne w drugim tygodniu po SCT i utrzymywały się przynajmniej przez 7 tygodni. Okres najlepszej poprawy funkcjonalnej przypadał na trzeci tydzień po uszkodzeniu i podaniu wektora. W późniejszych czasach po uszkodzeniu pojawiały się objawy nadmiernej stymulacji sieci, w postaci drgawek i spastyczności. Zrodziło to pytania o mechanizmy poprawy oraz przyczynę obserwowanej nadpobudliwości, skłaniające do dalszych badań.

1.7 Wirusy AAV jako nośniki genów w terapii genowej

AAV (ang. Adeno-Associated Virus, wirus zależny od adenowirusów) to bezpieczny wektor wirusowy wykorzystywany w terapiach genowych. Cząsteczki AAV są modyfikowane, tak aby zastąpić i uzupełnić geny wirusa genami terapeutycznymi. Jedną z ich głównych zalet jest niska immunogenność. To sprawia, że są one bezpieczniejsze i lepiej tolerowane w porównaniu z innymi wektorami wirusowymi. Dodatkowo, wektory AAV charakteryzują się defektywnością replikacji, co oznacza, że nie mogą się replikować bez pomocy innego wirusa. Dzięki temu ryzyko niekontrolowanego rozprzestrzeniania się jest minimalne. Jedną z najbardziej znaczących cech wektorów AAV jest również ich zdolność do infekowania wielu typów komórek różnych gatunków zwierząt, co czyni je uniwersalnymi narzędziami do różnorodnych zastosowań w badaniach i terapii. Możliwość infekowania zarówno komórek proliferujących, jak i nieproliferujących, oraz możliwość zastosowania promotora który pozwala na ekspresję tylko w wybranym typie komórek, rozszerza zakres ich użyteczności. Stabilna ekspresja przenoszonych genów, utrzymująca się przez długi czas, nawet lata, stanowi zaletę, która umożliwia długotrwałe efekty terapeutyczne po jednorazowej aplikacji. Fakt, że ekspresja genów może utrzymywać się przez lata, jest szczególnie ważny w kontekście leczenia przewlekłych chorób. Wysokie miano uzyskiwanych preparatów wirusowych (dochodzące do 10^{12} cząstek na mililitr) i ich stabilność, są kolejnymi atutami. Wektory AAV posiadają jedno istotne ograniczenie: stosunkowo małą pojemność DNA (4-4,5kpz), co należy uwzględnić w początkowej fazie projektowania.

AAV jest jednym z najczęściej używanych nośników genów w doświadczalnej i klinicznej terapii genowej. Znany przykładem jest lek Zolgensma, jednorazowa terapia genowa stosowana w rdzeniowym zaniku mięśni, która wykorzystuje wektory AAV do dostarczenia funkcjonalnych ludzkich genów SMN1 pacjentom poprzez pojedynczą infuzję dożylną.

Wirus zależny od adenowirusów (AAV) jest wysoce skuteczny w transferze genu BDNF, co sprawia że jego aplikacja powoduje znaczący wzrost poziomu BDNF w tkance (Boyce i in., 2012; Ji i in., 2022; Nakajima i in., 2007; Uchida i in., 2012; Ziemińska i in., 2014).

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Rdzeniowa nadekspresja BDNF u dorosłych szczurów, poddanych całkowitemu przecięciu rdzenia kręgowego na poziomie dolnym piersiowym i iniekcji wektora w tym samym zabiegu, prowadzi do wczesnej poprawy ich zdolności lokomotorycznych. Ten efekt behawioralny sugeruje, że zwiększenie zasobności rdzenia w BDNF nie tylko pobudza aktywność i zmiany plastyczne w sieci neuronalnej w rdzeniu, ale też wspomaga utrzymanie funkcjonalności synaps nerwowo-mięśniowych, niezbadanych dotąd w tym modelu.

Na podstawie nielicznych danych literaturowych wiadomo, że szczury transgenizowane BDNF osiągają maksimum poprawy w trzecim tygodniu po operacji i że długotrwała nadekspresja BDNF prowadzi do nadmiernego pobudzenia sieci i pogorszenia lokomocji (Ziemlińska i in., 2014). Takie przebieg zmian był przesłanką do podjęcia badań nad komórkowymi i molekularnymi mechanizmami działania terapeutycznego BDNF w okresie największej poprawy funkcji. W badaniach (Grycz i in., 2019; Skup i in., 2012) odkryto, że obwody rdzeniowego unerwienia mięśni zginaczy i prostowników kończyn tylnych u szczura, które są odpowiedzialne za ruch w stawie skokowym, charakteryzuje różna wrażliwość w przypadku urazu rdzenia kręgowego. W świetle tych danych przyjęto założenia, że nadekspresja BDNF w rdzeniu kręgowym:

1. doprowadzi w pierwszych dwóch tygodniach od urazu do zmiany receptywności motoneuronów
2. zwiększy aktywność neuroprzebieżnikową motoneuronów
3. wpłynie protekcyjnie na stan złączy nerwowo-mięśniowych

Założono również, że receptywność MN zginaczy i prostowników na BDNF może być różna, a jeśli tak, zróżnicowanie efektu działania BDNF może być inne w każdym z unerwianych przez nie mięśni.

Główne cele niniejszej pracy to:

- (1) potwierdzenie terapeutycznego działania AAV-BDNF w zakresie poprawy lokomotorycznej po całkowitym przecięciu rdzenia;**
- (2) zbadanie zakresu transgenizacji i zdolności sieci przetrwałych poniżej miejsca uszkodzenia do odpowiedzi na BDNF w czasie 2 tygodni po uszkodzeniu, z uwzględnieniem motoneuronów mięśni różnych funkcjonalnie: zginacza (TA) i prostownika (Sol) stawu skokowego;**
- (3) zbadanie zmian w strukturze i ultrastrukturze złączy nerwowo-mięśniowych TA i Sol**
- (4) próba wglądu w mechanizm działania rekombinowanego BDNF i dyskusja jego użyteczności w zastosowaniu klinicznym.**

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Podstawowe odczynniki, roztwory, zestawy odczynników, materiały i aparatura

Tabela 1M. Substancje chemiczne

Odczynnik	Producent
Kwasy: HCl	POCH, Gliwice, Polska
Zasady: NaOH	POCH, Gliwice, Polska
Sole nieorganiczne: NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ , NaHCO ₃ , NaCl, KCl, MgCl ₂ ,	POCH, Gliwice, Polska
Rozpuszczalniki organiczne: etanol, heptan	POCH, Gliwice, Polska
Sacharoza	POCH, Gliwice, Polska
Glicerol	Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy
30% H ₂ O ₂	Fluka, Steinheim, Niemcy
DAB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Akrylamid, bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thimerosal (Thiomersal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-base	SERVA, Heidelberg, Niemcy
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Etanol	Hempur, Piekary Śląskie, Polska
Mowiol 4-88	Fluka, Steinheim, Niemcy
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	SERVA, Heidelberg, Niemcy
Tween 20	MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA USA
Dietylopirowęglan (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabela 2M. Roztwory

Roztwór	Skład
PB – 0,2M bufor fosforanowy, pH 7,4	(A) 0,2M NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O (B) 0,2M Na ₂ HPO ₄
PBS – roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym	10mM PB pH 7,4 150mM NaCl
PBST – roztwór soli fizjologicznej w PB z dodatkiem detergentu Triton X-100	PBS pH 7,4 0,2% Triton X-100
Bufor do perfuzji	0,2M PB pH 7,4 140mM NaCl 4,8mM KCl 6mM NaHCO ₃
4% roztwór PFA do perfuzji naczyniowej i do utrwalania (postfix) wypreparowanych tkanek	8% Paraformaldehyd w dH ₂ O 0,2M PB pH 7,4 połączone 1:1 (v/v)
30% roztwór sacharozy	Sacharoza in substantia 0,1M PB pH 7,4
5% roztwór koziej surowicy do blokowania nieswoistych epitopów w tkance	100% NGS 0,01M PBST pH 7,4
1% roztwór koziej surowicy do rozcieńczania przeciwciał pierwszorzędowych	100% NGS 0,01M PBST pH 7,4
5% roztwór osłej surowicy do blokowania nieswoistych epitopów w tkance	100% NDS 0,01M PBST pH 7,4
1% roztwór osłej surowicy do rozcieńczania przeciwciał pierwszorzędowych	100% NDS 0,01M PBST pH 7,4
0,3% roztwór H ₂ O ₂ do blokowania endogennych peroksydaz	30% H ₂ O ₂ 0,01M PBS pH 7,4
0,05% roztwór 3,3'-diaminabenzyny (DAB) 0,01% roztwór H ₂ O ₂ do wywoływania reakcji immunohistochemicznej na obecność antygenów tkankowych	DAB w dH ₂ O 30% H ₂ O ₂ w 0,01M PBS pH 7,4
Roztwór barwnika Hoechst do wykrywania kwasów nukleinowych	200μM bisbenzimid H 33258 w dH ₂ O

Roztwór Mowiolu do zatapiania skrawków tkankowych na szkiełku mikroskopowym	Mowiol 4-88 (alkohol poliwinylowy) 99,5% Glicerol 98% 1,4-diazabicylo-2,2,2-octan (DABCO) 0,2M Tris pH 8,5
Roztwór Antifreeze do przechowywania skrawków tkankowych w temp. -20°C	50 g sucrose 100 ml glycerol 42 ml 0.2M PB 125 ml H2O

Tabela 3M. Gotowe zestawy odczynników

Odczynnik	Numer katalogowy	Zastosowanie	Producent
ZR RNA MiniPrep™	R1055	izolowanie całkowitego RNA	Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	04896866001	synteza komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy całkowitego RNA	Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA
LightCycler® 480 Probe Master	04887301001	Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (qPCR)	Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA
Universal Probe Library Rat GAPD Gene Assay	05046220001	gen referencyjny w ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy (qPCR)	Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA
RNAScope Multiplex Fluorescent Kit	323100	hybrydyzacja <i>in situ</i>	ACD Bio, USA
Opal 6-Plex Manual Detection Kit (fluorochromy)	NEL811001KT	hybrydyzacja <i>in situ</i> połączona z wykrywaniem immunofluorescencyjnym białek	Akoya Biosciences, USA
Protein Ladder Biotinylated + Anti-Biotin HRP Linked Ab Kit	7727	Identyfikowanie m.cz. białek rozdzielonych elektroforetycznie, po ich transferze na błonę metodą WB (1:1000)	Cell Signaling, USA
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	12316992	Detekcja białek w doświadczeniu WB	GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Wielka Brytania

Tabela 4M. Materiały

Materiał	Zastosowanie	Producent
Bibuła chromatograficzna Whatman 17 CHR	transfer białek metodą WB	Whatman International Ltd., Maidstone, Wielka Brytania
Bibuła filtracyjna No. 42	filtrowanie roztworów	Carl Roth, Karlsruhe, Niemcy
Błona PVDF (difluorek poliwinylidenu) – 0,2 µm	transfer białek metodą WB	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Jung Tissue-freezing Medium	klej do mrożenia tkanek	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Niemcy
Klisy fotograficzne - Fuji Medical X-Ray Film	detekcja białek w błonie PVDF w metodzie WB	FujiFilm Europe GmbH, Düsseldorf, Niemcy
Płytki 96-dołkowe	reakcja real-time PCR	Roche Applied Science, Penzberg, Niemcy
Szkiełka mikroskopowe podstawowe i nakrywkowe	Do umieszczania i przykrywania preparatów tkankowych w celu obserwacji mikroskopowych	Menzel-Glaser, Niemcy

Tabela 5M. Aparatura badawcza i drobny sprzęt

Nazwa	Producent
Aparat do elektroforezy pionowej Mini-Protean III	BioRad, Hercules, CA, USA
Spektrofotometr BioPhotometer Typ 6131	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Homogenizator ULTRA -TURRAX T8	IKA-Werke GmbH i Co. KG, Staufen, Niemcy
Homogenizator Polytron PT 1200E	Kinematica AG, Luzern, Szwajcaria
Lampa światłowodowa KL 1500 LCD	Carl Zeiss MicroImaging LLC, Thornwood, NJ, USA
Termocykler LightCycler® 96	Roche Applied Science, Penzberg, Niemcy
Piec do hybrydyzacji HybEz Oven	ACD Bio, USA.
Pompa perfuzyjna	IKA Werke GmbH i Co. KG, Staufen, Niemcy
Mikrotasak McIlwaina do tkanek	Ted Pella, Inc., Redding, USA
Termocykler GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Transiluminator UV Ingenious	Syngene, Cambridge, Wielka Brytania

Wirówka 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
pehametr 430	Corning Incorporated, New York, NY, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc, New York, NY, USA
Waga analityczna AB204-S	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, OH, USA
Bieżnia	Panlab S.L. Barcelona, Hiszpania
Kamera video NV-GS400	Panasonic Corporation, Kadoma, Osaka, Japan
Autoklaw 2100	Prestige Medical Ltd, Blackburn, Wielka Brytania
Wytrząsarka Heidolph Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Niemcy
Kriostat Leica CM1850	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Niemcy
Narzędzia chirurgiczne	WPI Inc., USA
Mikroskop chirurgiczny Nikon SMZ 1000	Nikon Corporation, Tokio, Japonia Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA
Mikroskop fluorescencyjny Nikon Eclipse 80i Kamera cyfrowa CCD Evolution VF	Nikon Corporation, Tokio, Japonia Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA
Mikroskop konfokalny Zeiss LSM780	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy
Mikroskop konfokalny Zeiss LSM800 Airyscan	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy
Mikroskop konfokalny Leica Sp8	Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy
Transmisyjny mikroskop elektronowy JEM 1200EX	JEOL, Tokio, Japonia
Ultramikrotom EM UC7	Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy
Pompa strzykawkowa WPI SP101i	WPI Inc., Sarasota, FL, USA
Zestaw do badania progu czucia bólu wg. Sammesa i von Freya	BiosebLab, Vitrolles, Francja

3.2 Metody *in vitro*

3.2.1 Hodowla komórkowa

Pierwotną hodowlę neuronów hipokampa założoną w celu sprawdzenia syntezy i wydzielania rekombinowanego BDNF (rBDNF) *in vitro* uzyskano od dr Matyldy Macias z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej PAN w Warszawie. Pierwotne komórki nerwowe wykorzystane do tej hodowli pochodziły z hipokampa 18-dniowych (E18) płodów szczurów linii Wistar.

3.2.2 Zbieranie pożywki wzrostowej i przygotowywanie lizatów komórek do doświadczenia WB

Pożywki wzrostowe zbierane z hodowli komórek pierwotnych hipokampa gotowano przez 5min w temp. 98°C w pięciokrotnie stężonym roztworze obciążającym do próbek z SDS i rozdzielano elektroforetycznie w celu identyfikacji rozdzielonych białek.

Lizaty komórkowe przygotowywano w następujący sposób:

1. Po zebraniu pożywki wzrostowej z hodowli prowadzonej w sześćojamkowych płytkach hodowlanych, powierzchnię komórek delikatnie przemywano PBS.
2. Do jamki wkraplano roztwór do homogenizacji w objętości 25 µl/jamkę płytki 24-jamkowej i 100 µl/jamkę płytki 6-jamkowej. Osad komórek, o żelowej konsystencji, zbierano okrężnymi ruchami i przenoszono pipetą do probówek o pojemności 2 ml. Probówki z osadami komórkowymi schładzano w lodzie.
3. W celu rozbicia kwasów nukleinowych zawiesinę poddawano sonikacji przez 15 sek. (amplituda 40%).
4. Zawiesinę wirowano (30 min, 11 600 x g, 4°C) i zbierano nadsącz, który następnie zamrażano w temp. -20°C. Pomiar stężenia białka całkowitego w nadsączu wykonywano testem BCA (Pierce), zgodnie z instrukcją producenta.

3.3 Zwierzęta doświadczalne

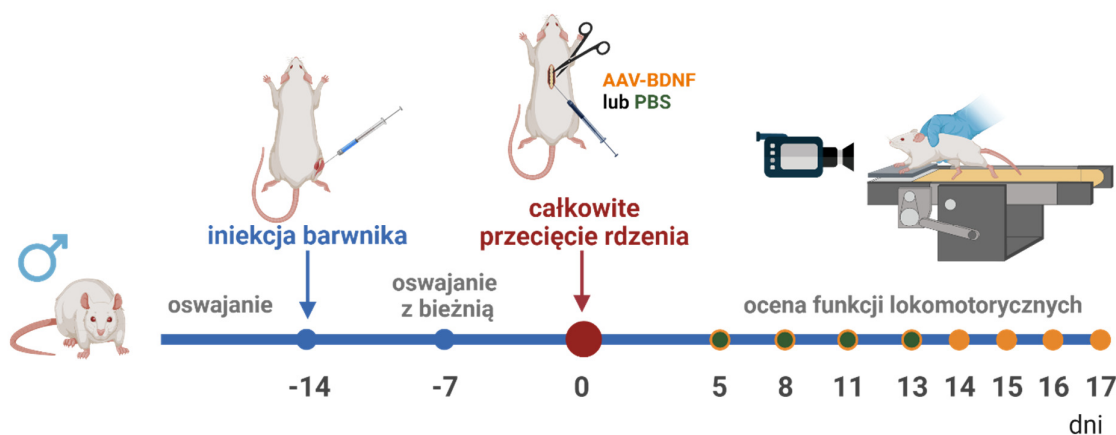
Badania przeprowadzono na 50 dorosłych samcach szczurów szczepu Wistar, o początkowej masie ciała 250-330g. Zwierzęta pochodziły z hodowli w Centrum Medycyny Doświadczalnej Akademii Medycznej w Białymstoku oraz z hodowli zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Szczury były hodowane w standardowych klatkach, w pomieszczeniach o stałej temperaturze i wilgotności, z zachowaniem naturalnego cyklu dobowego (12h w świetle, 12h w ciemności). Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i suchej karmy. Do terminu operacji, w każdej klatce przebywały po dwa osobniki; po operacji przebywały w klatkach pojedynczo. Procedury postępowania ze zwierzętami w eksperymencie były zgodnie z wytycznymi Dyrektyw z dnia 24 listopada 1986 (86/609/EWG), z dnia 22 września 2010 (2010/63/UE) oraz polskiej Ustawy o Ochronie Zwierząt (2017) dotyczącej ochrony zwierząt używanych do celów naukowych. Procedury zostały zatwierdzone przez Pierwszą Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie (511/2013 z dnia 14 listopada 2013, 523/2018 z dnia 20 marca 2018, 950/2019 z dnia 21 stycznia 2020).

3.3.1 Grupy doświadczalne

Aby zrealizować cele badawcze związane z identyfikacją *in situ* białek i transkryptów w skrawkach rdzenia kręgowego i mięśni oraz z oceną ekspresji genów w próbkach z tych narządów zwierzęta podzielono na siedem grup, które przedstawiono w Tabeli 6M. Szczury poddano procedurom zilustrowanym na Ryc. 1M na osi czasu.

Tabela 6M. Grupy doświadczalne

Cel doświadczenia	kontrole naiwne (KN)	całkowite przecięcie rdzenia kręgowego (SCT)		
		z iniekcją PBS (SCT-PBS)	z iniekcją wektora AAV-EGFP (SCT-EGFP)	z iniekcją wektora AAV-BDNF (SCT-BDNF)
Badania morfologii komórek i synaps, lokalizacji i poziomu komórkowego i subkomórkowego białek (histo – i immunohistochemicznie, mikroskopia konfokalna i elektronowa)	10	7	4	7
Badania ekspresji genów i komórkowej współlokalizacji mRNA/białko (RT-PCR, RNA scope)	9	7	-	6



Rycina 1M. Schemat procedur, którym poddawano zwierzęta.

Dwa tygodnie przed operacją całkowitego przecięcia rdzenia zwierzętom podawano domięśniowo barwniki (ang. tracers) fluorescencyjne w celu wyznakowania pul unerwiających je motoneuronów. Lokomocja była oceniana od piątego dnia po operacji co trzy dni, a od 13 dnia, w grupie AAV-BDNF była oceniana codziennie, w celu określenia momentu najlepszej poprawy. Przed operacją oraz w 5., 10. i 15. dniu po operacji testowano progi bólowe w kończynach tylnych u zwierząt z grup SCT-PBS i SCT-BDNF (nie uwzględniono na rycinie).

3.3.2 Procedura osławiania zwierząt

Zanim przystąpiono do doświadczeń, zwierzęta osławiano (ang. handling) z eksperymentatorem i otoczeniem przez 5 dni. W związku z tym, że jednym z celów eksperymentu była ocena sprawności ruchowej zwierząt, przed przystąpieniem do doświadczeń szczury przyzwyczajano również do bieżnika (3-5 dni), na którym następnie oceniano ich lokomocję. Jako wzmocnienie motywacyjne stosowano chrupki kukurydziane.

3.4 Zabiegi chirurgiczne

3.4.1 Domięśniowe iniekcje barwników

Dwa tygodnie przed przeprowadzeniem operacji przecięcia rdzenia kręgowego, grupy szczurów przeznaczone do badań histochemicznych i oceny morfologii komórek otrzymywały domięśniowe iniekcje barwników fluorescencyjnych, które umożliwiły zidentyfikowanie wybranych grup motoneuronów (MN) (Tab. 7M).

Tabela 7M. Barwniki fluorescencyjne użyte do wyznakowania motoneuronów

Mięsień	Nazwa znacznika	Nr kat.	Stężenie	Producent
Tibialis anterior	Podjednostka B toksyny cholery sprzężona z fluorochromem Alexa Fluor 488	C34775	0,01% w buforze PBS	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Soleus	Fast Blue	74749-42-1	2% roztwór wodny	GenoSynth GmbH, Berlin Niemcy

Zwierzęta umieszczano w pudełku z narkozą wziewną (izofluran w mieszaninie z tlenem, Tab. 8M), a po ich uśpieniu, w aparacie stereotaktycznym dozującym narkozę wziewną. Szczury otrzymywały podskórną iniekcję środka usmierzającego ból (premedykacja Butomidorem, Tab. 8M). Po ogoleniu, zdezynfekowaniu i przecięciu skóry pokrywającej wybrane mięśnie kończyny tylnej, nacinano mięsień dwugłowy uda (Biceps femoris), odsłaniając leżące głębiej mięśnie: mięsień piszczelowy przedni (Tibialis anterior, TA; zginacz stawu skokowego), i mięsień płaszczkowaty (Soleus; Sol; prostownik tego stawu). Do TA wstrzykiwano 0,1% roztwór w PBS toksyny cholery sprzężonej z barwnikiem Alexa Fluor 488 (Tab. 7M) w objętości 20 μ l. Do Sol wstrzykiwano 1% roztwór wodny Fast Blue (Tab. 7M) w objętości 5 μ l. Iniekcje przeprowadzano za pomocą mikrostrzykawki Hamilton z zamocowaną igłą o rozmiarze 22G. Po wprowadzeniu barwnika, igłę pozostawiano w mięśniu przez co najmniej 3 minuty, aby uniknąć wycieku barwnika, po czym powoli ją

usuwano. Miejsce iniekcji płukano ciepłym roztworem NaCl 0,9%, a mięsień dwugłowy uda i skórę zszywano warstwami.

Tabela 8M. Użyte leki

Nazwa handlowa	Producent	Dawka	Substancja aktywna/ zastosowanie/podanie
Vetbutal	Biowet Puławy Polska	80 mg/kg mc.	pentobarbital sodu 50 mg/ml /usypianie terminalne /dootrzewnowo
Heparyna	WZF, Polfa S. A., Polska	0,1 ml	heparyna /substancja przeciwskrzeplinowa / dosercowo
AErrane	Baxter Polska Sp. z o.o.	3-4% obj., indukcja znieczulenia 1,5-3,5% obj. znieczulenie podtrzymujące	izofluran /znieczulenie podczas operacji /wziewnie
Butomidor	Richter Pharma AG, Wels, Austria	3,3 mg/kg mc.	winian butorfanolu 10 mg/ml / indukcja neuroleptoanalgezji oraz indukcja znieczulenia ogólnego / dootrzewnowo
Xylocaine® 2%	AstraZeneca AB, Szwecja	0,4 ml	chlorowodorek lidokainy / lek miejscowo znieczulający / naoponowo
Tolfedine® 4%	Vetoquino, Lure Cedex, Francja	3 mg/kg mc.	kwas tolfenamowy / niesterydowy lek przeciwzapalny, przeciwbólowy, przeciwgorączkowy / podskórnice
Baytril 2,5%	Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen Niemcy	5 mg/kg mc.	enrofloksacyna / antybiotyk / podskórnice
Sul-Tridin 24%	ScanVet Sp. z o.o., Gniezno, Polska	30 mg/kg mc.	sulfadiazyna / antybiotyk / podskórnice
Vetaflunix	VET-AGRO Sp. z o. o., Lublin, Polska	2,5 mg/kg mc.	Fluniksyna w postaci fluniksyny z megluminą / lek przeciwzapalny, przeciwbólowy/ podskórnice

3.4.2 Całkowite przecięcie rdzenia kręgowego

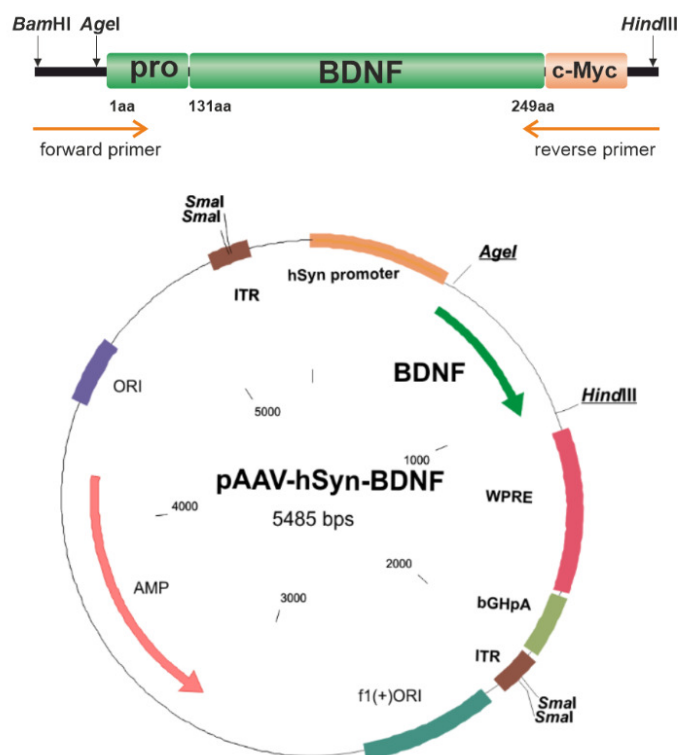
Zwierzęta umieszczano w pudełku z narkozą wziewną (izofluran w mieszaninie z tlenem, Tab. 8M), a następnie w aparacie stereotaktycznym dozującym narkozę wziewną. Po osadzeniu w aparacie szczury otrzymywały podskórną iniekcję środka usmierzającego ból (premedykacja Butomidorem, Tab. 8M). Po głębokim uśpieniu zwierzęcia golono sierść na grzbiecie i dezynfekowano skórę 70% etanolem. Nacinano skórę, odsłaniano mięśnie grzbietu i odpreparowywano je od wyrostków kolczystych kręgow. Na podstawie kształtu kręgów określano odcinek kręgosłupa. Następnie wykonywano laminektomię na poziomie T9/T10 w celu odsłonięcia segmentów Th10/Th11 rdzenia kręgowego oraz drugą laminektomię, na poziomie T11/T12, w celu odsłonięcia segmentów L1/L2 rdzenia kręgowego. Do znieczulenia miejscowego stosowano Xylocaine 2% (kropla naoponowo, Tab. 8M). Następnie przecinano rdzeń kręgowy nożyczkami chirurgicznymi a szczelinę powiększano pod kontrolą mikroskopu do około 1mm, przez wysysanie tkanki za pomocą ssaka o średnicy 22G, aby zapewnić całkowite przerwanie ciągłości rdzenia.

3.4.3 Iniekcje dordzeniowe PBS, AAV-eGFP i AAV-BDNF

Bezpośrednio po całkowitym przecięciu rdzenia zawieszinę cząsteczek wektorów wirusowych AAV-eGFP, AAV-BDNF lub roztwór PBS wprowadzano za pomocą szklanej kapilary (\varnothing 40–60 μm) do miąższu rdzenia na poziomie L1 (Tab. 9M, Ryc. 2M). Przed iniekcją przecinano opony twardą i pajęczynówkę oraz delikatnie nakłuwano oponę mięką. Iniekcje wykonywano kolejno do obu połówek lewej i prawej rdzenia. Kapilarę wkłuwano pod kontrolą mikroskopu (Nikon SMZ 1000) w celu śledzenia jej położenia w trakcie manipulacji, utrudnionych przez ruchy oddechowe zwierzęcia. Po trzech do pięciu minut od umieszczenia kapilary w miąższu rdzenia uruchamiano pompę, która dozowała preparat z prędkością 0,1 μl na minutę [pompa strzykawkowa sp 101i, WPI]. Każda iniekcja polegała na podaniu 1 μl zawiesiny zawierającej 3×10^8 cząsteczek wektorów lub 1 μl buforu PBS. W celu ograniczenia wypływu płynów wzdłuż kapilary, jej usuwanie rozpoczynano po 5 minutach od zakończenia podawania preparatu. Po upewnieniu się, że nie ma krwawienia z miejsc uszkodzenia i iniekcji, zszywano mięśnie oraz powłoki podskórne jedwabnymi nićmi chirurgicznymi. Skórę zespalano metalowymi klipsami, a miejsce zespolenia przemywano wodą utlenioną. W końcowej fazie operacji podawano zwierzętom podskórną antybiotyk w stężeniu 5 mg/kg mc. (Baytril 2,5%, Tab. 8M) oraz niesterydowy lek przeciwzapalny, przeciwbólowy i przeciwgorączkowy (Tolfedine® 4%, Tab. 8M), w stężeniu 3 mg/kg mc. Przed wybudzeniem zwierzętom podawano podskórną 5 ml soli fizjologicznej.

Tabela 9M. Wektory wirusowe

Wektor wirusowy	Charakterystyka	Źródło
AAV1/2 hSyn-BDNF	AAV serotyp hybrydowy 1/2, zawierający plazmid pAAV[hSyn-BDNF], 3×10^8 TU/ μ l	Vector Builder, USA
AAV1/2 hSyn-GFP	AAV serotyp hybrydowy 1/2, zawierający plazmid pAAV[GFP], 3×10^8 TU/ μ l	dr Ewelina Ziemińska i dr Sebastian Kügler, Viral Vector Laboratory, University Medical Center Göttingen Niemcy



Rycina 2M. Schemat plazmidu użytego do przygotowania wektora AAV1/2 hSyn-BDNF

Plazmid zaprojektowano tak, aby ograniczyć ekspresję rekombinowanego BDNF do neuronów. Sekwencja kodująca DNA została zintegrowana z promotorem genu synapsyny-1 człowieka (hSyn), aktywowanym wyłącznie w neuronach. Wektor zawierał dodatkowe elementy na 3'-końcu: (1) sekwencję WPRE (ang. Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Response Element), która po transkrypcji tworzy trzeciorzędową strukturę, zwiększającą efektywność translacji genu docelowego oraz (2) miejsce poliadenylacji bydłęcego hormonu wzrostu (bGHpA, ang. bovine growth hormone polyadenylation site). Fragmenty ITR (ang. Inverted Terminal Repeats) są jedynymi zachowanymi częściami oryginalnego genomu wirusa AAV, niezbędnymi do właściwego zapakowania kasyety zawierającej transgen, promotor i sekwencje regulatorowe do kapsydu wektora. Pozostałe elementy (miejsce startu replikacji ORI i gen oporności na ampicylinę AMP), służą do selektywnej replikacji w komórkach bakteryjnych. Sekwencja kodująca BDNF szczura, o identyfikatorze Gene ID: 24225, pochodzi z klonu MGC:105254, numer dostępu GenBank: BC087634.1, uzyskanego w ramach projektu Mammalian Gene Collection (MGC, Narodowy Instytut Zdrowia, Bethesda, Maryland, USA).

3.4.4 Opieka pooperacyjna nad zwierzętami

Po operacji zwierzęta umieszczano w osobnych klatkach, aby zapobiec otwarciu rany pooperacyjnej przez inne zwierzę. Przez kilka dni szczurom podawano podskórnym Baytril i Tolfedine (Tab. 8M). Szczury codziennie pielęgnowano i w miarę potrzeby opróżniano im pęcherze moczowe, do momentu odzyskania automatyzmu pęcherzowego (około 5 dni).

3.5 Badania behawioralne

3.5.1 Procedura badania sprawności ruchowej zwierząt na ruchomym bieżniku z użyciem zmodyfikowanej skali BBB

W celu monitorowania poprawy lokomocji w czasie po podaniu PBS, AAV-BDNF lub AAV-EGF, sprawność ruchową zwierząt oceniano na bieżniku ruchomym (Ryc. 1M) w 5, 8, 11 i 13 dniu po operacji. Po każdym nagrywaniu na bieżniku szczury obserwowano przez 1 min. w czasie lokomocji swobodnej w otwartym polu i zapisywano spostrzeżenia. W grupie SCT-BDNF jeśli jakość lokomocji wykazywała postępującą poprawę, kontynuowano badanie 14go dnia i w kolejnych dniach (15, 16 i 17), aby zidentyfikować dzień ustabilizowania się sprawności lub największej poprawy funkcjonalnej.

Zebrany materiał filmowy poddano analizie z wykorzystaniem zmodyfikowanej skali Basso, Beattie and Bresnahan (*mBBB*), opracowanej do oceny lokomocji zwierząt z całkowicie przeciętym rdzeniem kręgowym na poziomie dolnych segmentów piersiowych (Antri i wsp. 2002 i 2003, Tab. 10M). W tej skali 0 punktów oznacza brak ruchu kończyn tylnych, a 22 punkty przypisuje się lokomocji prawidłowej.

Przed przystąpieniem do badania sprawności ruchowej, przednią część tułowia i przednie kończyny szczura opierano na nieruchomej platformie położonej 1,5 cm nad powierzchnią bieżnika. Tylnie kończyny spoczywały na bieżniku. Następnie uruchamiano bieżnik, który poruszał się z prędkością 5 cm/s. Eksperymentator zabezpieczał prawidłową pozycję ciała zwierzęcia na bieżniku poprzez przytrzymywanie przedniej części tułowia wraz z kończynami na platformie. Kamera rejestrująca zachowanie zwierząt umieszczona była na statywie, w osi optycznej prostopadłej do boku zwierzęcia. Filmowano prawy i lewy profil ciała szczura – po 1,5 - 2 min z każdej strony, podczas następujących po sobie sesji. Do filmowania i robienia zdjęć użyto kamery video Panasonic NV-GS400 (25 klatek/s) (Tab. 5M). Filmy z zarejestrowanym zachowaniem ruchowym zwierząt analizowało niezależnie troje eksperymentatorów.

Tabela 10M. Zmodyfikowana skala ocen (mBBB)

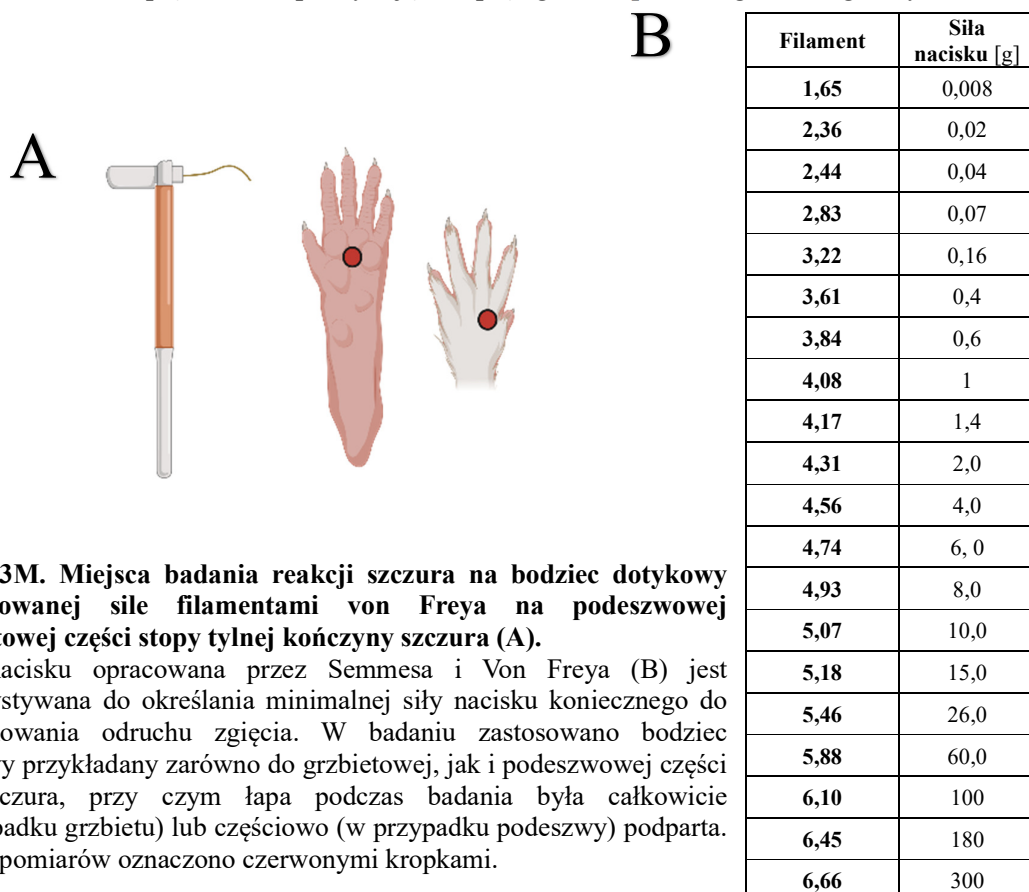
Ocena	Składowa ruchu				
Poziom Punkty	Ruch w stawach kończyn tylnych	Alternacje P - L	Amplituda	Podtrzymanie ciężaru ciała	Stawianie stóp na podszwie
Poziom 1					
0	brak	-	-	-	-
1	słabe drżenie kończyn	-	-	-	-
Poziom 2 (ruchy rytmiczne, stawianie stopy na stronie grzbietowej)					
2	obecny	brak	mała	-	-
3	obecny	brak	duża	-	-
4	obecny	sporadyczne	mała	-	-
5	obecny	sporadyczne	duża	-	-
6	obecny	częste	mała	-	-
7	obecny	częste	duża	-	-
8	obecny	stałe	mała	-	-
9	obecny	stałe	duża	-	-
Poziom 3 (ruchy naprzemienne o dużej amplitudzie, stawianie stopy na stronie grzbietowej, sporadyczne podtrzymywanie ciężaru ciała)					
10	obecny	obecne	duża	sporadyczne	-
Poziom 4 (stawianie stopy na stronie podszwowej)					
11	obecny	sporadyczne	duża	brak	sporadyczne
12	obecny	częste	duża	brak	sporadyczne
13	obecny	częste	duża	sporadyczne	sporadyczne
14	obecny	stałe	duża	brak	sporadyczne
15	obecny	stałe	duża	sporadyczne	sporadyczne
16	obecny	częste	duża	częste	częste
17	obecny	częste	duża	częste	stałe
18	obecny	częste	duża	stałe	częste
19	obecny	częste	duża	stałe	stałe
20	obecny	stałe	duża	stałe	sporadyczne
21	obecny	stałe	duża	stałe	częste
22	obecny	stałe	duża	stałe	stałe

P-L - prawa/lewa; - nieobserwowane; **stałe** - obserwowane w >95% analizowanych cykli chodu; **częste** - obserwowane w 51-95% analizowanych cykli chodu; **sporadyczne** - obserwowane <51% analizowanych cykli chodu; **podtrzymywanie ciężaru ciała*** - skurcz mięśni prostowników kończyn tylnych stawianych na podszwowej części stopy lub uniesienie tylnej części ciała w trakcie lokomocji.

Ocenie poddano cztery zasadnicze parametry chodu: naprzemiennosc ruchów obu kończyn (alternacja), zakres/amplituda ruchów, zdolność do podtrzymywania ciężaru ciała oraz zdolność do stawiania kończyn na podszewkowej części stóp. W opisie wyniku przedstawiono ocenę przeprowadzoną na podstawie analizy minuty ruchu każdego zwierzęcia, 2 tygodnie po operacji przecięcia rdzenia.

3.5.2 Badanie progu czucia bólu testem von Freya

Do zmierzenia progu reakcji na ból posłużono się metodą badania odruchu cofnięcia kończyny wywołanego bodźcem dotykowym. Skalibrowane filamenty von Frey'a pozwalały na określenie minimalnej siły, która indukuje cofnięcie łapy jako odpowiedź na ból. Procedura ta polegała na delikatnym przykładaniu końcówki filamentu do badanego obszaru stopy i zwiększaniu siły nacisku do momentu zgięcia się filamentu. Jeśli nie następowało wycofanie kończyny, sięgano po kolejny filament, aż do uzyskania odruchu i określenia progu wrażliwości. Próg wrażliwości na ból mierzono dla strony grzbietowej jak i podszewkowej stopy (Ryc. 3M). Progi bazowe dla każdego osobnika ustalano pod koniec fazy przyzwyczajania zwierząt do obecności eksperymentatora. W trakcie eksperymentu, pomiary progów przeprowadzano co pięć dni, rozpoczynając od piątego dnia po zabiegu chirurgicznym.



Rycina 3M. Miejsca badania reakcji szczura na bodziec dotykowy o stopniowanej sile filamentami von Freya na podszewkowej i grzbietowej części stopy tylnej kończyny szczura (A).

Skala nacisku opracowana przez Semmesa i Von Freya (B) jest wykorzystywana do określania minimalnej siły nacisku koniecznego do sprowokowania odruchu zgięcia. W badaniu zastosowano bodziec dotykowy przykładany zarówno do grzbietowej, jak i podszewkowej części łapy szczura, przy czym łapa podczas badania była całkowicie (w przypadku grzbietu) lub częściowo (w przypadku podszewki) podparta. Miejsca pomiarów oznaczono czerwonymi kropkami.

3.6 Pozyskiwanie materiału badawczego

Analizy zmian strukturalnych i molekularnych spowodowanych uszkodzeniem rdzenia kręgowego oraz podawaniem AAV-BDNF lub AAV-EGFP przeprowadzano po upływie 2 tygodni od operacji. W przypadku pooperacyjnych grup kontrolnych (SCT-PBS, SCT-EGFP) czas ten był stały i wynosił 14 dni po operacji. W przypadku grupy SCT-BDNF terminacja eksperymentu następowała w dniu osiągnięcia przez zwierzę największej poprawy funkcjonalnej i zawierała się w dniach 13-17 po operacji. Zwierzęta usypiano poprzez dootrzewnowe podanie śmiertelnej dawki pentobarbitalu sodu (80mg/kg masy ciała).

3.6.1 Pozyskiwanie materiału tkankowego do doświadczeń immunohistochemicznych i mikroskopii elektronowej

Po wprowadzeniu zwierzęcia w stan głębokiej narkozy przecinano powłoki brzuszne i klatkę piersiową, po czym podawano dosercowo 0,5 ml roztworu heparyny z ksylokainą (4:1) aby zapobiec powstawaniu skrzeplin, które zatykając naczynia upośledzają przepływ płynów perfuzyjnych i utrwalenie tkanek. Po kaniulacji serca, przez aortę wprowadzano 300 ml 0,01M roztworu PBS (2.5-3 min.) za pomocą pompy do perfuzji (Tab. 5M) po czym, w celu utrwalenia tkanki, zwierzę perfundowano 4% roztworem paraformaldehydu (PFA) w 0,1M buforze fosforanowym (20 min.) w objętości 250 ml płynu perfuzyjnego. Wypreparowany rdzeń kręgowy dotrwalało przez godzinę w 4% roztworze PFA. Następnie, w celu krioprotekcji tkanki, rdzeń umieszczano kolejno w roztworach sacharozy o wzrastających stężeniach (10%, 20%, 30%) a po wysyceniu tkanki sacharozą przechowywano preparat w 30% roztworze sacharozy w 4°C. Rdzeń cięto na kriostacie, na skrawki poprzeczne o grubości 25µm. Swobodnie pływające skrawki, zawieszono w płynie zabezpieczającym przed zamrażaniem Antifreeze (Tab. 2M) przechowywano w temperaturze -20°C. Wypreparowane mięśnie Tibialis anterior i Soleus poddawano dotrwaleniu przez godzinę w 4 % PFA a następnie przenoszono do roztworu PBS i przechowywano w 4°C.

3.6.2 Pozyskiwanie materiału tkankowego do doświadczeń biochemicznych

Po wprowadzeniu zwierzęcia w stan głębokiej narkozy przecinano powłoki brzuszne i klatkę piersiową. Po kaniulacji serca, przez aortę pompowano 150ml roztworu do perfuzji, stosując szybki przepływ płynu (2.5-3 min.), a następnie pompowano 300 ml przez 20 min., stosując wolny przepływ. Preparatyka rdzenia kręgowego i mięśni odbywała się w chłodni. Materiał krojono za pomocą mikrotasaka do tkanek McIlwaina na skrawki grubości około 1mm i przechowywano w probówkach w temperaturze -70 stopni do czasu dalszych oznaczeń.

3.7 Metody pracy z kwasami nukleinowymi

3.7.1 Izolowanie całkowitego RNA

Próbki rdzenia kręgowego homogenizowano w 25 objętościach (4% homogenat) w buforze do lizy (z zestawu do izolowania RNA), przy użyciu homogenizatora mechanicznego ULTRA-TURRAX T8 (Tabela 5M). Homogenizację przeprowadzano w temperaturze pokojowej, w cyklu 3 x 30 sek. homogenizacji, rozdzielone 5-7 sek. przerwami. W kolejnych etapach postępowano zgodnie z protokołem producenta (Tabela 11M). Do wyizolowania całkowitego RNA z tkanki rdzenia kręgowego użyto zestawu ZR RNA MiniPrep™ (Tabela 3M). Zestaw wykorzystuje powinowactwo izolowanych kwasów nukleinowych do zmodyfikowanego złoża krzemionkowego, którym są wypełnione kolumnienki na które nanosi się preparat. Izolowanie obejmuje etapy: dezintegracji/rozpuszczania tkanki, wiązania kwasów nukleinowych do złoża, degradacji genomowego DNA, oczyszczania RNA z soli chaotropowych i rozpuszczalników organicznych oraz wypłukiwania RNA ze złoża.

Tabela 11M. Protokół izolowania całkowitego RNA z próbek rdzenia kręgowego

1) Homogenizowanie tkanki w 25 objętościach wagowych - 1,5 min., temperatura pokojowa
2) Wirowanie 11 600 x g, 2 min, przeniesienie nadsączu do probówek Eppendorffa
3) Naniesienie nadsączu na kolumnę Zymo-Spin IIC. Wirowanie przy 8 000 x g, 30 sek. Zachowanie przesączu
4) Dodanie do przesączu 0,8 objętości etanolu (95-100%); wymieszanie
5) Naniesienie mieszaniny na kolumnę Zymo-Spin IIC z probówek Eppendorffa. Wirowanie 11 600 x g, 2 min. Odrzucenie przesączu
6) Naniesienie 400 µl RNA Wash Buffer na kolumnę Zymo-Spin IIC z probówek Eppendorffa. Wirowanie 11 600xg, 1 min. Odrzucenie przesączu
7) Trawienie genomowego DNA – naniesienie roztworu DNazy pozbawionej RNaz w stężeniu 10 U/100 µl, 18 min., 30°C Wirowanie 11 600 x g, 1 min. Odrzucenie przesączu
8) Naniesienie 400 µl RNA Prep Buffer na kolumnę Zymo-Spin IIC. Wirowanie 11 600 x g, 2 min. Odrzucenie przesączu
9) Naniesienie 800 µl RNA Wash Buffer na kolumnę Zymo-Spin IIC. Wirowanie 11 600 x g, 1min. Odrzucenie przesączu
10) Naniesienie 400 µl RNA Wash Buffer na kolumnę Zymo-Spin IIC. Wirowanie 11 600 x g, 1 min. Wyrzucenie przesączu
11) Dodatkowe wirowanie 11 600 x g, 4 min. Wyrzucenie przesączu
12) Wypłukanie RNA z kolumny - dodanie 30-100 µl wody DEPC. Odczekanie 1 min. Wirowanie przy 10 000 x g, 30 sek. Zamrożenie preparatu RNA w -80°C

W przypadku mięśni, ze względu na większą włóknistość tkanki i trudniejszą sedymentację, wirowanie na kolumnie Zymo-Spin IIC (punkt 5 protokołu) wydłużono do 30 minut.

3.7.2 Pomiar stężenia i ocena jakości RNA i cDNA

Do pomiaru stężeń kwasów nukleinowych użyto spektrofotometru BioSpectrometer 035739 firmy Eppendorf (Tab. 5M). Minimalna objętość próbki wynosiła 1 μ l. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy trzech długościach fali: 260 nm (w celu określenia stężenia kwasów nukleinowych), 280 nm (w celu wykrycia zanieczyszczeń białkowych) oraz 320 nm (w celu identyfikacji zanieczyszczeń izotiocyanianem guanidyny, który jest używany do izolowania kwasów nukleinowych). Uzyskane wyniki pomiarów przyjmowano za wiarygodne, jeśli absorbancja próbek przy A260 nm zawierała się w przedziale od 0,1 do 0,6. Czystość preparatu była uznawana za zadowalającą, gdy stosunek A260/A280 wynosił \sim 2,0 dla RNA, \sim 1,8 dla cDNA, a stosunek A260/A320 nie przekraczał 3,0.

3.7.3 Otrzymywanie cDNA do badania ekspresji genów: synteza komplementarnego DNA na matrycy całkowitego RNA w reakcji odwrotnej transkrypcji

Matrycą do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) było całkowite RNA, wyizolowane z próbek rdzenia kręgowego. Analizowano próbki, uzyskane z odcinka piersiowego obejmującego obszar lezji (T11-12), i z odcinków lędźwiowych L1-L2 i L3-L6. Jako starterów użyto do reakcji mieszaniny oligonukleotydów, zawierających wszystkie możliwe sekwencje heksamerowe (ang. random hexamers), które pozwalają na uzyskanie zrównoważonej reprezentacji mRNA poprzez wzrost liczby krótkich transkryptów cDNA. Krótkie transkrypty cDNA pozwalają wzbogacić pulę transkryptów o takie RNA, które łatwo przybierają struktury drugorzędowe i są trudne do przepisania z zastosowaniem oligonukleotydów tyminowych (oligo dT). Krótkie transkrypty cDNA zwiększają również prawdopodobieństwo skopiowania pełnej sekwencji kodującej gen (cgs). Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano odczynniki z zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Tabela 2M), postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Jako kontrole negatywne posłużyły:

- (1) równoległe prowadzone reakcje RT-PCR z pominięciem enzymu odwrotnej transkryptazy;
- (2) kontrole odczynnikowe (z pominięciem matrycowego RNA).

Procedurę przeprowadzano w następujący sposób:

1. Do cienkościennej probówki Eppendorfa o pojemności 0,2 mL pipetowano odczynniki w następującej kolejności:

Matryca RNA + startery	Objętość (μl)	Stężenie końcowe
dH ₂ O, jałowa	do 13	-
Matrycowe RNA (1 μg)	~	0,05 μg/μl
Random hexamers (600 pmol/μl)	2	60 μM

2. Inkubowano mieszaninę matrycowego RNA przez 10 minut w temp. 65°C
3. Dodawano do mieszaniny kolejno:

Składnik	Objętość (μl)	Stężenie końcowe
5X Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Buffer	4	1X
Protector™ – inhibitor RNaz (40 U/μl)	0,5	20 U
dNTP (10mM każdy)	2	1 mM (każdy)
Transcriptor – odwrotna transkryptaza (20 U/μl)	0,5	10 U

4. Zwirowywano zawartość probówki (5 sek.) i przeprowadzano reakcję RT-PCR w termocyklerze zgodnie z poniższymi parametrami temperatury i czasu:

Etap	Temp.	Czas trwania	Liczba cykli
Przyłączanie heksamerów	25°C	10 minut	1
RT-PCR	50°C	60 minut	1
Inaktywacja odwrotnej transkryptazy	85°C	5 minut	1

5. Reakcję zatrzymywano przez umieszczenie próbek w lodzie. Uzyskane preparaty cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.7.4 Badanie ekspresji genów; reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Ekspresję wybranych genów zbadano techniką real-time PCR (PCR z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym). Do analizy wykorzystano termocykler LightCycler® 96 firmy Roche (Tab. 5M), system znakowanych fluorescencyjnie sond hydrolizujących typu TaqMan (Tab. 3M) oraz dedykowany zestaw odczynników LightCycler® 480 Probe Master (Tab. 3M), zawierający bufor reakcyjny oraz wodę (PCR grade). Przeprowadzono reakcje real-time PCR typu duplex, w których analizowano jednocześnie przyrost genu badanego

i referencyjnego, kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego - GAPDH (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Do zaprojektowania starterów i sond specyficznych dla badanego genu skorzystano z aplikacji Universal Probe Library Assay Design Center firmy Roche Applied Science (www.rocheappliedscience.com). W celu zwiększenia specyficzności i zmniejszenia ryzyka wykrycia genomowego DNA, wybierano sondy tzw. *intron spanning*, tzn. obejmujące miejsce łączenia się egzonów badanego genu. Wykorzystano system sond hydrolizujących, które na swym końcu 5' posiadają barwnik fluorescencyjny, pełniący rolę reportera (donor energii), a na końcu 3' barwnik pełniący rolę wyciszacza (akceptor energii). Rolę donora fluorescencji w sondach wykrywających badane transkrypty pełni barwnik FAM (wzbudzenie - 465 nm; emisja - 510 nm), zaś w sondzie wykrywającej gen referencyjny barwnik Yellow 555 (wzbudzenie - 533 nm; emisja - 580 nm). Zasada działania opiera się na zjawisku FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) - przeniesieniu energii z donora na akceptor. Po wzbudzeniu fluorescencji barwnika FAM lub Yellow555, energia wzbudzenia jest pochłaniana przez wyciszacz na końcu 3' każdej z sond dopóty, dopóki oba barwniki są w bliskim kontakcie, czyli w nienaruszonej sondzie. Na etapie przyłączania starterów do cDNA, sondy również łączą się z matrycą (tuż przed starterami). W momencie, gdy polimeraza DNA wydłuży syntetyzowaną nić do miejsca przyłączenia sond, sonda zostaje zhydrolizowana przez polimerazę, która ma aktywność 5' nukleazową, co odłącza FAM od wyciszacza. Pozwala to zarejestrować poziom fluorescencji. Pomiar dokonywany jest zatem pod koniec fazy wydłużania ampliconu, a poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości produktu powstałego w reakcji real-time PCR. Kontrolami negatywnymi były próby NTC (no template control, bez próbki DNA) i NRT (no reagent control, samo DNA zawieszone w wodzie). Reakcję real-time PCR przeprowadzano w 10 µl objętości roztworu, zgodnie z protokołem polecanym przez producenta. Najpierw przygotowywano mieszaninę reakcyjną:

Odczynnik*	Objętość / próbkę (µl)	Stężenie końcowe
2x LightCycler® 480 Probes Master (buforowany roztwór termostabilnej polimerazy DNA i mieszanina deoksynukleotydów)	5	–
Sonda Universal Probe Library (UPL#) dla badanego genu (10 µM)	0,3	0,3 µM
Zestaw starterów dla badanego genu (20 µM)	0,3	0,6 µM
Sonda UPL genu referencyjnego (10 µM)	0,15	0,15 µM
Zestaw starterów genu referencyjnego (20 µM)	0,15	0,3 µM
Woda jałowa	Do 10	

* Wykaz odczynników znajduje się w Tab. 3M.

Do 96-dółkowej płytki (Tab. 4M) pipetowano mieszaninę reakcyjną, a następnie matrycowe cDNA badanych prób. Reakcję PCR przeprowadzano w aparacie LightCycler®480 przy następujących ustawieniach:

Etap	Temp.	Czas	Pomiar fluorescencji	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	–	1
Denaturacja	95°C	10 s	–	45
Przyłączenie sond i starterów	60°C	30 s	–	
Wydłużanie amplikonu i hydroliza sond	72°C	1 s	FAM, Yellow 555	
Schładzanie	40°C	∞	–	1

Tabela 12M. Użyte sondy fluorescencyjne typu TaqMan i startery do qPCR

Gen	Białko	Numer dostępowy	Nr sondy UPL	starter lewy (5'-3')	starter prawy (5'-3')
Gapdh	GAPDH	NM_017008.4	*	ctgcaccaccaactgcttag	tgatggcatggactgtgg
Ache	AChE	NM_172009.1	25	cctggatccctcactgaact	tgcataagtcgctgagcaaa
Bdnf	BDNF	NM_012513.4	67	gcagtcaagtgcctttggag	cggcatccaggtaattttg
Ntrk2	TrkB	NM_012731.3 NM_001163168.3	80	cgccaccttgacttgctg	agtgtcggggctggattt
Ntrk2	TrkB ^{FL}	NM_012731.3	106	tgggaaatggaaccagaa	tgggtttcctatgcaggac
Slc18a3	VACHT	NM_031663.2	64	cactctctggctttgagca	actggtgcgtagagcaggtt
Chrm2	M2	AB017655.1	64	ccacctcagactgtcaacaatta	catggagaaaacacctatgatgag
Chrm4	M4	NM_031547.1	56	cctggtgactgttgggta	tgcaactgcctgtgacct
Ngfr	p75	NM_012610.2	106	ggctactgtagaggtgcca	gagagaaactgcacagcgaca
Ntf3	NT3	NM_031073.3	73	agtgagagcctgtgggtgac	taacctggtgtccccgaat
Mpz	MBP	NM_017027.2	94	cttgatagcctctgccaac	tgtggattgagcccgagga
S100b	S100b	NM_013191.1	65	gaaggagctcatcaacaacga	tccatcacttgtccaccac

- Sonda syntetyzowana w serwisie syntezy oligonukleotydów IBB PAN olig.pl; sekwencja: tttgcatcgtg

3.7.5 Badanie ekspresji genów – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* RNAscope® (ACDBio, CA, USA) użyta w tej pracy jest nowoczesną techniką hybrydyzacji opartą na amplifikacji sygnału za pomocą tyramidu (TSA, Tyramide Signal Amplification), która umożliwia wykrycie nawet pojedynczej cząsteczki RNA, widocznej pod mikroskopem jako sygnał punktowy. Dwie niezależne sondy

(tzw. podwójne sondy Z) hybrydują z sekwencją docelową w układzie tandemowym, co umożliwia amplifikację sygnału. Zważywszy, że jest mało prawdopodobne, aby dwie niezależne sondy hybrydowały nieswoicie tuż obok siebie, przyjmuje się, że amplifikacja sygnału specyficznego dla docelowej sekwencji przebiega selektywnie. Dodatkową zaletą metody jest skuteczna hybrydyzacja nawet częściowo zdegradowanego RNA, którą zapewnia stosunkowo krótka sekwencja docelowa (40-50 zasad dolnej części podwójnej sondy Z). Wang i współpracownicy (Wang i in., 2012) potwierdzili możliwość użycia tej metody do wykrywania pojedynczych transkryptów.

Tabela 13M. Użyte sondy fluorescencyjne do hybrydyzacji metodą RNAScope

Sonda	Nr kat.	Transkrypt
Rn-Ngfr	406351	Niskocząsteczkowy receptor p75 czynnika wzrostu nerwów (Ngfr), mRNA
Rn-Ntrk2-C2	317531-C2	Wysokocząsteczkowy receptor TrkB formy pełnej neurotrofiny BDNF i NT4 o aktywności kinazy tyrozynowej typu drugiego (Ntrk2) wariant transkrypcyjny 1
Rn-BDNF	sonda syntetyzowana na zamówienie przez firmę ACDBio	Czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (bdnf), mRNA BC087634.1
Polr2A C1 - kontrola pozytywna PPIB C2 - kontrola pozytywna UBC C3 - kontrola pozytywna	320891	Polimeraza RNA typu II podjednostka RPB1 cyklofilina B ubikwityna C
DapB (C1, C2, C3) – kontrole negatywne	320871	bakteryjna reduktaza dihydropikolinianu (Bacillus subtilis)

3.8 Metody pracy z białkami

3.8.1 Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Przygotowane próby, zawierające zdenaturowane, opłaszczone przez SDS białka, rozdzielano elektroforetycznie metodą Laemmliego na żelu poliakrylamidowym z SDS (SDS-PAGE) w aparacie Mini-Protean III (Tab. 5M). Przygotowywano żele o grubości 1,5 mm. Żel składał się z 5% żelu zagęszczającego (wys. warstwy tego żelu 1 cm; pH 6,8), w którym dochodziło do zateżnienia białek oraz 9% żelu rozdzielającego (wys. warstwy ok. 5 cm, pH 8,8), (Tab. 14M). Dalsze postępowanie obejmowało następujące etapy:

Płytki, zawierające spolimeryzowane żele mocowano do statywu elektrody i umieszczano w pojemniku zawierającym schłodzony bufor do elektroforezy (Tab. 14M). Do każdego z dołków żelu pipetowano próbkę zawierającą 15-30µg całkowitego białka. W tym samym żelu rozdzielano standardy wielkości białek.

Elektroforezę przeprowadzano w temp. 4°C, przy stałym napięciu 160 V i początkowym natężeniu prądu o sile 40 mA. Rozdzielanie białek prowadzono do czasu, w którym barwnik (błękit bromofenolowy), znakujący czoło rozdzielanych białek, osiągał granicę żelu.

3.8.2 Transfer białek na błony PVDF

1. Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego usuwano żel zagęszczający, a żel rozdzielający inkubowano przez 30-60 min w schłodzonym do 4°C buforze do transferu (Tab. 14M). Następnie wykonano kolejne kroki:
2. Błony PVDF zwilżano metanolem, a następnie stabilizowano w buforze do transferu (minimum 30 min) w celu zwiększenia ich hydrofilności.
3. W kasecie aparatu do transferu układano pod warstwą buforu kolejno: gąbkę, bibułę Whatmann, błonę PVDF, żel, następnie ponownie warstwę bibuły i gąbkę.
4. Transfer prowadzono przez 1,5 godziny, przy napięciu 100 V i natężeniu prądu 400 mA, w aparacie zawierającym zamrożony blok chłodniczy, utrzymując ciągle mieszanie buforu.
5. W celu oceny wydajności transferu podbarwiano białka pozostałe w żelu w roztworze błękitu Coomassie (Tab. 14M).

Tabela 14M. Odczynniki do rozdziału elektroforetycznego i analizy białek metodą Western Blot

Roztwór	Skład
Roztwór do homogenizowania próbek tkankowych	200 mM Tris-HCl, pH 8,0 137 mM NaCl 10% glicerol 1% NP 40 1x Inhibitory: Complete™ i PhosStop 0,1 mM PMSF
Odczynnik Bradforda A (oznaczanie stężenia białek)	100 ml 95% etanolu 200 ml 88% kwasu ortofosforowego 350 mg Serva Blue G

Roztwór	Skład
Roztwór roboczy Bradforda B (oznaczanie stężenia białek)	425 ml dH ₂ O 15 ml 95% etanolu 30 ml 88% kwasu ortofosforowego 30 ml Odczynnika Bradforda A
5 x tzw. bufor „obciążający” do próbek	62 mM Tris-HCl, pH 6,8 10% (w/v) SDS 5% (w/v) β-Merkaptoetanol 50% (v/v) glicerol 0,13% (w/v) błękit bromofenolowy
Roztwór A (składnik żeli do elektroforezy białek)	30% akrylamid 0,8% bis-akrylamid
Roztwór B (składnik żelu rozdzielającego do elektroforezy białek)	75 ml 2M Tris-HCl, pH 8,8 4 ml 10% SDS 21 ml dH ₂ O
Roztwór C (składnik żelu zagęszczającego do elektroforezy białek)	50 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8 4 ml 10% SDS 46 ml dH ₂ O
Żel rozdzielający 10% (denaturująca elektroforeza białek)	3 ml roztworu A 7,5 ml roztworu B 4,5 ml dH ₂ O 50 μl 10% APS 5 μL TEMED
Żel zagęszczający 5% (denaturująca elektroforeza białek)	0,67 ml roztworu A 1 ml roztworu C 2,3 ml dH ₂ O 30 μl 10% APS 5 μl TEMED
Roztwór buforowy Tris-glicyna z SDS (denaturująca elektroforeza białek)	25 mM Tris 192 mM glicyna 0,1% SDS
Roztwór buforowy Tris-glicyna (transfer białek z żelu na błony)	25 mM Tris pH 8,3 192 mM glicyna

Roztwór	Skład
Roztwór Coomassie Blue (barwienie białek w żelu)	0,1% Coomassie Blue 45% metanol 10% kwas octowy
Odbarwiacz do żeli	10% metanol 10% kwas octowy
TBS-T (bufor do reakcji na błonach PVDF)	25 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 0,01% Tween 20 w TBS

3.8.3 Immunochemiczna detekcja białek na membranach

Po przeprowadzeniu transferu białek na błonę PVDF, posługując się widocznymi prążkami wzorców masy cząsteczkowej, błonę cięto na 3 fragmenty, w których znajdowały się białka o masach cząsteczkowych zawartych w przedziałach: 230-80 kDa, 80-50 kDa i mniejsze niż 50 kDa. Pozwoliło to na niezależne identyfikowanie białek o różnych masach cząsteczkowych. Następnie stabilizowano błony przez 5 - 10 minut w buforze TBS-T (pH 7,4). Immunodetekcję białek prowadzono w następujący sposób:

1. Blokowano niespecyficzne miejsca wiązań inkubując błonę w 5% roztworze BSA w TBS-T przez 60 minut w temperaturze pokojowej (RT).
2. Wykrywano wybrane białka inkubując błonę w roztworach przeciwciał pierwszorzędowych (Tab. 15M), zawieszonych w 5% BSA w TBS-T, przez noc w 4°C.
3. Następnego dnia błonę płukano 1 x 10 min i 2 x 5 min buforem TBS-T i inkubowano przez 60 minut (RT) z roztworem przeciwciała drugorzędowego, skoniugowanego z peroksydazą chrzanową (Tab. 16M) w TBS-T.
4. Po ostatnim cyklu płukania (1 x 10 min, 2 x 5 min buforem TBS-T) do detekcji znakowania immunochemicznego używano roztworu ECL (Tab. 3M). Sygnał chemiluminescencyjny rejestrowano na kliszy rentgenowskiej. Klisze eksponowano kilkakrotnie celem optymalizacji sygnału i wywoływano.

Tabela 15M. Wykaz przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystanych w metodzie WB

Antygen	Gospodarz przeciwciała	Nr kat.	Rozcieńczenie	Producent
Metka C-Myc	królik	2272s	1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
TrkB, forma ufosforylowana (pTyr705)	królik	11328	1:400	Signalway Antibody, College Park, MD, USA
Phospho-S6 (Ser235/236)	królik	4858	1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
β -tubulina	mysz	3873	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Tabela 16M. Wykaz przeciwciał drugorzędowych (2o Ab) wykorzystanych w metodzie WB

Przeciwciało / metoda detekcji	Nr kat.	Rozcieńczenie	Producent
Kozie przeciwciało sprzężone z HRP, rozpoznające królicze IgG / WB	P0448	1:10 000	DAKO, Santa Clara, CA, USA
Kozie przeciwciało sprzężone z HRP, rozpoznające mysie IgG / WB	P0447	1:10 000	DAKO, Santa Clara, CA, USA

3.8.4 Immunofluorescencyjne identyfikowanie białek (IF) w tkance

Do analiz IF wykorzystano poprzeczne skrawki rdzenia kręgowego oraz pojedyncze włókna mięśniowe z mięśni stawu skokowego TA i Sol szczurów z grup KN, AAV-EGFP oraz AAV-BDNF. Białka wykrywano za pomocą reakcji pośredniej. Polega ona na wykorzystaniu dwóch przeciwciał: pierwszorzędowego (1° Ab), specyficznego wobec poszukiwanego antygeny oraz drugorzędowego (2° Ab) skoniugowanego z fluorochromem, rozpoznającego przeciwciało pierwszorzędowe. Podczas reakcji IF przeprowadzano kontrolę specyficzności reakcji, pomijając w inkubacji pierwszorzędowe przeciwciała. Sprawdzano w ten sposób, czy przeciwciała drugorzędowe przyłączają się niespecyficznym do tkanki. Poniżej przedstawiono zastosowany protokół reakcji IF (Tab.17M).

Tabela 17M. Protokół znakowania immunofluorescencyjnego wzbogaconego o znakowanie jąder komórkowych

Etapy reakcji IF	Roztwory i stężenia/ czas procedury / temperatura
DZIEŃ 1	
Płukanie	0,01 M PBST/ 5 x 3 min/ RT
Blokowanie miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał	5% NGS/ 30-60 min/ RT
Inkubacja z 1° Ab	1% NGS / przez noc/ +4°C

DZIEŃ 2	
Płukanie	0,01 M PBST/ 5 x 3 min/ RT
Inkubacja z 2° Ab	0,01 M PBST/ 60 min/ RT
Płukanie	0,01 M PBST/ 5 x 3 min/ RT
Barwienie jąder komórkowych	Hoechst (1:1000) w 0,01 M PBST/ 5 min/ RT
Płukanie	0,01 M PBS/ 5 x 3 min/ RT
Suszenie	~4-6 minut/ RT
Zaklejanie preparatów	Mowiol

Zestawienie przeciwciał i odczynników użytych do reakcji przedstawiono w tabelach 18-21M.

Tabela 18M Wykaz wykorzystanych przeciwciał pierwszorzędowych (1° Ab)

Antygen	Gospodarz przeciwciała	Nr kat.	Rozcieńczenie	Producent
Transporter pęcherzykowy acetylocholinyl VAcHT	koza	ABN100	1:500	Millipore, Burlington, MA, USA
Marker komórek Schwanna S-100	królik	Z0311	1:500	DAKO, Santa Clara, CA, USA
Neurofilament (NF)	mysz	M0762	1:200	DAKO, Santa Clara, CA, USA
Białko osłonki mielinowej Periaxyna	królik	-	1:3000	Peter Brophy, Centre for Neuroscience Research, University of Edinburgh, UK
Metka C-Myc	mysz	9B11	1:500	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF)	królik	ANT-010	1:200	Alomone Labs, Jerusalem, Izrael

Tabela 19M. Wykaz wykorzystanych przeciwciał drugorzędowych (2° Ab)

Przeciwciało	Nr kat.	Rozcieńczenie	Producent
Kozie przeciwciało sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor 647, rozpoznające królicze IgG	A21246	1:500	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ośle przeciwciało sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor 488, rozpoznające kozie IgG	A-11055	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ośle przeciwciało sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor 568, rozpoznające królicze IgG	A-10042	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Ośle przeciwciało sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor 488, rozpoznające mysie IgG	A21202	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
---	--------	-------	-------------------------------

Tabela 20M. Wykaz odczynników do wykrywania nikotynowego receptora acetylocholin

Odczynnik	Nr kat.	Rozcieńczenie	Producent
Bungarotoksyna sprzężona z Alexą Fluor 555	B35451	1:1000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabela 21M. Wykaz wykorzystanych surowic

Nazwa	Producent
Albumina z surowicy bydłej (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Surowica kozia (NGS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Surowica ośła (NDS)	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania

3.9 Mikroskopia elektronowa

3.9.1 Przygotowanie preparatów do obrazowania metodą mikroskopii elektronowej

Pojedyncze włókna mięśniowe izolowano pod szkłem powiększającym (powiększenie 10x). Włókna inkubowano w roztworze bungarotoksyny sprzężonej z AF555 (liganda nikotynowego receptora acetylocholin nACh) w buforze PBS (1:1000) przez 15 minut, w celu wyznakowania receptorów nikotynowych identyfikujących część postsynaptyczną złączy nerwowo-mięśniowych (NMJ). Następnie włókna trzykrotnie płukano w buforze PBS. NMJ lokalizowano pod mikroskopem Nikon Eclipse przy użyciu obiektywów 10× (0,30 N.A. DICL/N1) i 20× (0,50 N.A. DIC M/N2). Fragmenty włókien mięśniowych zawierające NMJ precyzyjnie wycinano skalpelem z użyciem szkła powiększającego, aby uzyskać odcinki o długości około 1 mm. Tak przygotowane próbki poddawano następującym procedurom (we współpracy z dr. Andrzejem Szczepankiewiczem, wykaz odczynników w Tab. 22M):

1. dotrwalanie w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego (klasa EM) w buforze kakodylan sodu-HCl (CB) o stężeniu 0,1 M przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej;
2. trzykrotne płukanie próbek w CB (3 × 10 minut);
3. dotrwalenie w 1% roztworze czterotlenku osmu przez 1 godzinę w CB w temperaturze pokojowej;
4. płukanie próbek w wodzie (3 × 10 minut);
5. odwodnienie przez inkubowanie w roztworach etanolu o rosnących stężeniach (50%, 70%, 90%, 96% i 2 × 100%; po 10 minut w każdym roztworze). W czasie odwadniania w 70% roztworze etanolu próbki poddano barwieniu 1% dwuwodzianem octanu uranylu (40 minut).

6. Prześwietlanie w mieszaninie 1:1 etanolu i tlenku propylenu (1×10 minut) oraz w 100% tlenku propylenu (2×15 minut);

7. zatapianie w medium epoksydowym Epon (Serva).

Polimeryzacja przebiegała w temperaturze 60°C i trwała dwa dni. Ultracienkie skrawki o grubości 60 nm uzyskano przy użyciu ultramikrotomu Leica Ultracut R i zebrano na siatki TEM o wymiarach $1 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA). Jeśli na danym skrawku nie znaleziono złącza nerwowo-mięśniowego, cięcie kontynuowano. Skrawki poddawano następnie barwieniu w roztworach octanu uranylu (2hydrat) i cytrynianu ołowiu według metody Reynoldsa (Reynolds, 1963).

Tabela 22M. Wykaz odczynników do mikroskopii elektronowej

Odczynnik	Nr kat.	Producent
Aceton	BA2480111	Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska
Czterotlenek osmu, roztwór 4% w H ₂ O	R1024	Agar Scientific, Essex, Wielka Brytania
Epoxy Embedding Medium	45359	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glutaraldehyd, roztwór 25% w H ₂ O, EM Grade	16220	Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA
Kakodylan sodu trójwodny	30118	BDH Chemicals, Londyn, Wielka Brytania
Octan uranylu dwuwodny	77870	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Niemcy
Paraformaldehyd	19200	Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA
Azotan ołowiu	10145	BDH Chemicals, Londyn, Wielka Brytania
Cytrynian ołowiu	11534	Estman Kodak, Rochester, NY, USA

3.10 Akwizycja i analiza obrazów mikroskopowych – mikroskopia konfokalna

Analizę komórkowej lokalizacji wykrytych immunofluorescencyjnie białek (VACHT, S100, CMyc, Periaksyna, nAChR, NF, p75, BDNF, TrkB) przeprowadzono na komputerowo zebranych obrazach uzyskanych za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss 780, Zeiss Airyscan LSM800 oraz Leica SP8 (Tabela 5M). Użyto obiektywów Plan Apochromat 40x/1.3

Oil DIC, Plan Achromat 63x/1.4 Oil DIC. Zebrano stosy obrazów cyfrowych z rozdzielczością 2700×2700 pikseli, o rozmiarach woksela $0,069 \mu\text{m} \times 0,069 \mu\text{m} \times 0,21 \mu\text{m}$ (w osiach XYZ). Do wzbudzenia fluorescencji wykorzystano laser argonowy i laser UV. Zastosowano stałe parametry ekspozycji i ustawienia kamery dla każdego z kanałów, w których rejestrowano znakowanie. Obrazy z mikroskopu konfokalnego składały się średnio ze stosu 80 skanów, próbkowanych co $0,21 \mu\text{m}$, co odpowiada fragmentowi komórki o wymiarze ok. $17 \mu\text{m}$ w osi Z.

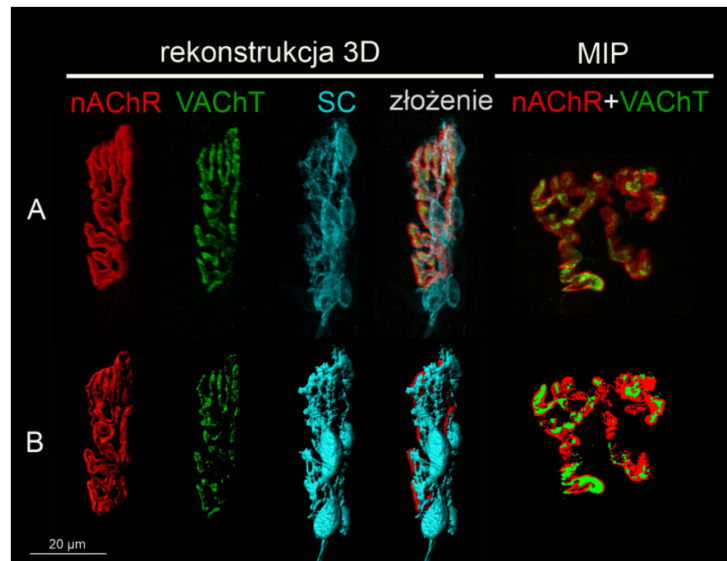
3.10.1 Dekonwolucja obrazów

Wszystkie obrazy, zarejestrowane w systemie mikroskopu konfokalnego poddano procesowi dekonwolucji przy użyciu oprogramowania Huygens Professional (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Holandia). Jest to proces matematyczny w którym analizowane są informacje o rozkładzie punktów źródłowych światła i o charakterystyce optycznej systemu obrazowania. W przypadku zbierania obrazów przy użyciu mikroskopu konfokalnego, otrzymuje się wiele skrawków optycznych (Z-stack); dekonwolucja pozwala na poprawę rozdzielczości przestrzennej i usunięcie niepożądanych zniekształceń obrazu. Na podstawie losowego zestawu zakodowanych obrazów, określano parametry algorytmu dekonwolucji w celu uzyskania maksymalnej jakości zdjęć dla każdego obrazowanego białka i transkryptu. Poziom tła i stosunek wartości sygnału do szumu zostały wybrane niezależnie dla każdego kanału; liczba iteracji dla algorytmu dekonwolucji wynosiła 40.

3.10.2 Trójwymiarowa (3D) rekonstrukcja obrazów IF z mikroskopu konfokalnego

Obrazy uzyskane po dekonwolucji kodowano losowo. Z-stosy cyfrowych obrazów umożliwiły rekonstrukcję obiektów w 3D (rozmiar woksela x/y/z $0,065 \times 0,065 \times 0,21 \mu\text{m}^3$). Analizę NMJ przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Imaris 7.6.1 (Bitplane, South Windsor, CT, USA). Mierzono powierzchnię i objętość części pre- i postsynaptycznej NMJ (zilustrowane na Ryc. 4M), a dane importowano do programu Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) w celu przeprowadzenia analizy statystycznej.

Wszystkie obrazy były również oceniane jakościowo - zaobserwowana na preparatach zmieniona morfologia NMJ lub przejawy retrakcji nerwu były opisywane.



Rycina 4M. Schemat rekonstrukcji obrazów w celu analizy złączy nerwowo-mięśniowych. Wszystkie NMJ poddano rekonstrukcji 3D. NMJ uchwycone w projekcji en-face zostały dodatkowo przeanalizowane w 2D w projekcji o maksymalnej intensywności (MIP). (A) Reprezentatywny obraz spod mikroskopu konfokalnego NMJ mięśnia Soleus szczura kontrolnego: znakowanie nikotynowego receptora acetylocholin (nAChR), pęcherzykowego transportera acetylocholin (VAcHT), komórek Schwanna (SC) oraz złożenie kanałów. Ostatni obraz przedstawia inne złącze kontrolne mięśnia Soleus, uchwycone w projekcji en-face z widocznym znakowaniem nAChR i VAcHT. (B) Trójwymiarowe maski stworzone na podstawie sygnału fluorescencyjnego przy użyciu oprogramowania Imaris w celu pomiaru objętości i powierzchni struktur. Ostatni obraz przedstawia maski 2D wygenerowane w celu pomiaru nakładania się części pre- i postsynaptycznych NMJ w oprogramowaniu ImageJ.

3.10.3 Analiza intensywności znakowania białek i ilości transkryptów w 2D

Dodatkową analizę NMJ, widocznych w preparatach w położeniu en-face, przeprowadzono za pomocą oprogramowania ImageJ. Procent obszaru zajmowanego przez nakładające się markery pre- i postsynaptyczne w maksymalnej projekcji intensywności (MIP) zbadano, posługując się protokołem Jonesa i wsp. (Jones i in., 2016). W przypadku analizy poziomu transkryptów w wyznakowanych motoneuronach analizowano obrazy spod mikroskopu fluorescencyjnego i zliczano punktowy sygnał mRNA w komórce z użyciem oprogramowania ImageJ z uwzględnieniem podziału na sygnał w jądrze komórkowym i w cytoplazmie. Analizę poziomu transkryptów w złączach nerwowo-mięśniowych przeprowadzano następująco: (1) do analizy wybierano tylko te jądra, które widoczne były w osi Z w całości; (2) obcinano zdjęcie w osi Z zostawiając tylko obszar występowania jądra; (3) zliczano punktowy sygnał mRNA (zgodnie z zaleceniami producenta zliczano punkty nie biorąc pod uwagę ich różnej intensywności) z zastosowaniem oprogramowania ImageJ.

3.11 Akwizycja i analiza obrazów – mikroskopia elektronowa

3.11.1 Parametry optyczne rejestracji obrazu i sprzęt mikroskopowy

Mikrografie elektronowe wykonano za pomocą aparatu Morada i mikroskopu elektronowego transmisyjnego JEM 1400 o napięciu 80 kV (JEOL Co., Tokyo, Japonia) w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie (we współpracy z dr. Andrzejem Szczepankiewiczem).

3.11.2 Ocena rozmiaru i gęstości rozmieszczenia pęcherzyków synaptycznych w złączy nerwowo-mięśniowym

Rozmiary i gęstość rozmieszczenia pęcherzyków synaptycznych (SVs) zmierzono posługując się protokołem opisanym przez Kim i wsp., używając funkcji liczenia komórek oprogramowania ImageJ (Kim i in., 2017). Liczba przeanalizowanych SVs w NMJ wyniosła:

- w preparatach z mięśnia TA: Kontrola: 400, SCT-PBS: 320, SCT-BDNF: 320;
- w preparatach z mięśnia Sol: Kontrola: 320, SCT-PBS: 190, SCT-BDNF: 360.

Do pomiarów średnicy zewnętrznej wybierano tylko pęcherzyki z wyraźnie odgraniczoną błoną. W celu obliczenia gęstości występowania pęcherzyków analizowano obszar zakończenia synaptycznego o powierzchni 0,6–1 μm^2 . Gęstość mierzono w polu o wielkości co najmniej 500 nm^2 pozostałym po wykluczeniu obszaru zajmowanego przez mitochondria aksonalne.

3.11.3 Ocena szerokości szczeliny synaptycznej oraz liczby stref aktywnych

Do pomiarów szerokości szczeliny synaptycznej oraz liczenia stref aktywnych (AZ) brano pod uwagę tylko synapsy z dobrze zachowanymi błonami pre- i postsynaptycznymi. Przeanalizowano tylko te obrazy, w których błona presynaptyczna była dobrze widoczna na odcinku o długości co najmniej 1 μm . AZ identyfikowano jako miejsca o dużej gęstości elektronowej występujące na wysokości fałd postsynaptycznych, zgodnie z opisami w literaturze (Nishimune, 2012; Südhof, 2012). AZ liczono ręcznie, używając oprogramowania ImageJ. Szerokość szczeliny synaptycznej była mierzona jako wewnętrzny wymiar między błoną presynaptyczną a grzbietami fałdów złączowych. Do dalszej analizy brano średnią wartość z pięciu pomiarów, wykonanych w kilku miejscach danego obrazu. Łącznie przeanalizowano od 8 do 24 obrazów na grupę.

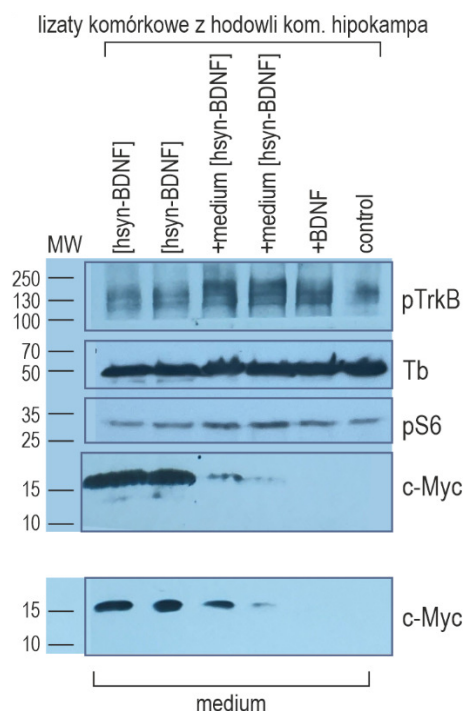
3.12 Analiza statystyczna wyników

Średnia i odchylenie standardowe (SD) zostały obliczone dla każdego zestawu danych. Test Grubbsa na obserwacje odstające przeprowadzono dla wszystkich danych, a wyniki odstające (outliers) odrzucono (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>, dostęp z dnia 20 czerwca 2022). Do weryfikacji normalności rozkładów uzyskanych danych użyto testu Shapiro-Wilka, a do weryfikacji homogeniczności wariancji w grupach testu Levene'a. Przy nierównych wielkościach grup zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z testem Tukeya HSD (Spjotvoll & Stoline). Ponieważ w niektórych wynikach eksperymentalnych naruszone zostały założenia o normalności rozkładu lub homogeniczności wariancji, do porównania niezależnych prób (różnice między grupami) używano wtedy nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya, a do porównania próbek zależnych wewnątrz grup (mięsień TA vs. MNs Sol oraz próbki mięśnia TA vs. Sol) użyto testu t i testu Wilcoxon. Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie STATISTICA 13.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Za istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami przyjęto $p \leq 0,05$.

4. WYNIKI

4.1 Wydzielanie i aktywność biologiczna rekombinowanego BDNF

Zanim przystąpiono do badań *in vivo* przeprowadzono doświadczenie *in vitro* aby potwierdzić efektywność działania wektora wirusowego AAV-hSyn-BDNF. Zbadano aktywność biologiczną wydzielonej frakcji białka fuzyjnego BDNF-cMYC, produkowanego przez neurony transdukowane wektorami wirusowymi AAV-hSyn-BDNF (Ryc. 1W).



Rycina 1W. Transdukcja pierwotnych neuronów hipokampa *in vitro* wektorem wirusowym AAV1/2 niosącym gen BDNF pod kontrolą neuro-specyficznego promotora hSyn prowadzi do zwiększonej syntezy rekombinowanego białka, które wykazuje zdolność do aktywowania receptora błonowego TrkB (pTrkB) i rybosomalnego białka S6 (pS6).

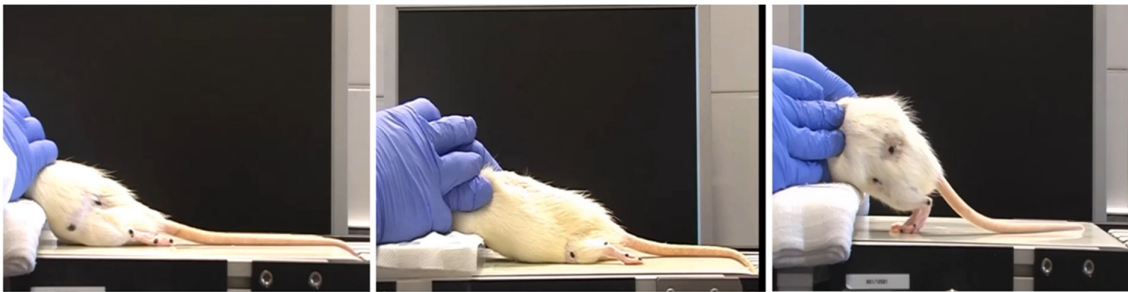
Rycina przedstawia wyniki dwóch doświadczeń WB, przeprowadzonych na komórkach w 6 dni po ich transdukcji (DIV 12). Górny blot dokumentuje rozdzielanie elektroforetyczne lizatów komórkowych, natomiast dolny przedstawia wyniki analizy nadsączy z hodowli tych komórek. Od lewej strony: ścieżki 1 i 2 odpowiadają neuronom poddanych transdukcji AAV1/2[hSyn-BDNF], ścieżki 3 i 4 – neuronom nietransdukowanym, z hodowli kontrolnej, traktowanym medium z neuronów transdukowanych, ścieżka 5 - neuronom kontrolnym inkubowanym z oczyszczonym białkiem BDNF pochodzenia ludzkiego (pożywka hrBDNF, 50 ng/ml), stanowiącym kontrolę pozytywną. Ostatnia ścieżka pochodzi z neuronów kontrolnych niczym nie traktowanych.

W analizie WB wykazano, że rekombinowane białko było wydzielane do medium hodowlanego (dolny panel). Analiza biofunkcjonalności BDNF-cMYC polegała na wykorzystaniu medium hodowlanego, pobranego z transdukowanych komórek

w dwunastym dniu hodowli (12 DIV, 6 dni od transfekcji), do stymulowania naiwnych komórek kontrolnych. Obecny w medium BDNF-cMYC indukował fosforylację receptora BDNF o dużym powinowactwie TrkB w komórkach kontrolnych, co skutkowało fosforylacją reszty Tyr w pozycji 816 oraz fosforylacją rybosomalnego białka S6 w pozycji Ser235/236 w szlaku sygnałowym mTOR aktywowanym przez BDNF-TrkB.

4.2 Ocena lokomocji szczurów po spinalizacji i dordzeniowej iniekcji AAV-BDNF

Zdolności lokomotoryczne szczurów po całkowitym uszkodzeniu rdzenia kręgowego (SCT-PBS) oraz po przecięciu i terapii BDNF (SCT-BDNF) oceniano na ruchomej bieżni, przy prędkości 0,05 m/s (Rycina 2W), korzystając ze zmodyfikowanej skali BBB (mBBB; Tabela 11 M), która obejmuje cztery poziomy i 22 punkty (Antri i in., 2003; Antri i in., 2002).



Rycina 2W. Lokomocja szczurów po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego i iniekcji PBS (Bi3, 13 DPO, panel lewy), AAV-EGFP (Zb4, 13 DPO, panel środkowy) lub AAV-BDNF (Zd5, 13 DPO, panel prawy) na ruchomej bieżni.

Szczury po SCT, którym podano PBS lub kontrolny wektor wirusowy, ciągną stopy leżące na części grzbietowej, podczas gdy szczury po SCT i iniekcji AAV-BDNF są zdolne do wykonywania naprzemiennych ruchów kończyn z podparem masy ciała (Głowacka i in., 2022).

Nie stosowano stymulacji uciskowej ogona, która u zwierząt poddanych spinalizacji jest warunkiem wywołania ruchów kończyn. Ocenę lokomocji na bieżni przeprowadziło troje doświadczonych obserwatorów, niezależnie oceniających zachowania motoryczne każdego zwierzęcia według wspólnego protokołu. Wyniki budzące wątpliwości były weryfikowane i ostatecznie uzgadniane przez wszystkich obserwatorów.

Wszystkie zwierzęta z grupy SCT z iniekcją PBS (SCT-PBS), testowane 13. dnia po operacji, były niezdolne do podtrzymania ciężaru ciała, a ich wiotkie kończyny tylne spoczywały bezwładnie stroną grzbietową na powierzchni bieżnika (Ryc. 2W). Szczury sporadycznie wykonywały spontaniczne ruchy kończyn tylnych, lecz nie obserwowano ruchów naprzemiennych. W tym samym okresie, szczury z grupy SCT z iniekcją AAV-BDNF

(SCT-BDNF) wykazywały ruchy podobne do kroczenia, z alternacją, stawianiem stopy na podszwie oraz podtrzymaniem masy ciała. Analiza lokomocji na bieżni przeprowadzona została dla obu grup przy użyciu skali mBBB według której poziom 1 i punktacja 0 odpowiadają braku ruchów, podczas gdy poziom 4 i punktacja 22 są równoważne lokomocji zwierzęcia kontrolnego.

Zdolności motoryczne dwunastu na czternaście szczurów SCT-PBS, oceniane na bieżni w 13. dniu po zabiegu, zostały sklasyfikowane na poziomie 1, a pozostałe dwa szczury na poziomie 2 (Tab. 1W). W grupie SCT-BDNF w tym samym czasie, dwanaście na trzynaście szczurów osiągnęło poziom 4. Pozostały szczur SCT-BDNF został sklasyfikowany na poziomie 2 z wynikiem 4.5, co jest wynikiem wyższym niż we wszystkich szczurach SCT-PBS (Tabela 1W). Średnie wyniki w 13. dniu wynosiły 0,36 +/- 0,74 w grupie SCT-PBS w porównaniu do 12,19 +/- 3,31 w grupie SCT-BDNF (test U Manna-Whitneya, p=0,006) co wykazuje, że wprowadzenie dordzeniowe AAV-BDNF znacząco poprawiło lokomocję szczurów po uszkodzeniu rdzenia.

Tabela 1W. Ocena lokomocji na ruchomym bieżniku szczurów z grupy SCT-PBS oraz SCT-BDNF

13 DPO						dzień najlepszej poprawy lokomocji		
SCT-PBS			SCT-BDNF			SCT-BDNF		
Zwierzę	wynik w skali mBBB		Zwierzę	wynik w skali mBBB		DPO	wynik w skali mBBB	
	poziom	punkty		poziom	punkty		poziom	punkty
Zc4	1	0	Zd1	2	4,5	16	4	15,5
Zc5	1	0	Zd2	4	11,0	14	4	16,5
Zc6	1	1	Zd3	4	11,0	16	4	11,5
Zc7	1	0	Zd4	4	11,0	16	4	11,0
Zc8	1	0	Zd5	4	11,5	15	4	15,5
Zc9	1	0	Zd7	4	13,0	13	4	13,0
Zc10	2	2	Bj1	4	16,0	14	4	17,0
Bi1	1	0	Bj2	4	16,0	13	4	16,0
Bi2	1	0	Bj3	4	13,0	13	4	13,0
Bi3	1	0	Bj4	4	11,5	14	4	15,5
Bi4	2	2	Bj5	4	11,0	15	4	11,5
Bi5	1	0	Bj6	4	18,0	13	4	18,0
Bi6	1	0	Bj7	4	11,0	16	4	16,0
Bi7	1	0						
Średnia		0,36			12,19**			14,62***
SD		0,74			3,31			2,32

Do oceny użyto zmodyfikowanej skali BBB (mBBB wg Antri i wsp., 2002). Istotność różnic pomiędzy grupami SCT-PBS i SCT-BDNF w teście U Manna-Whitneya: ** p<0,01 ; *** p<0,005.

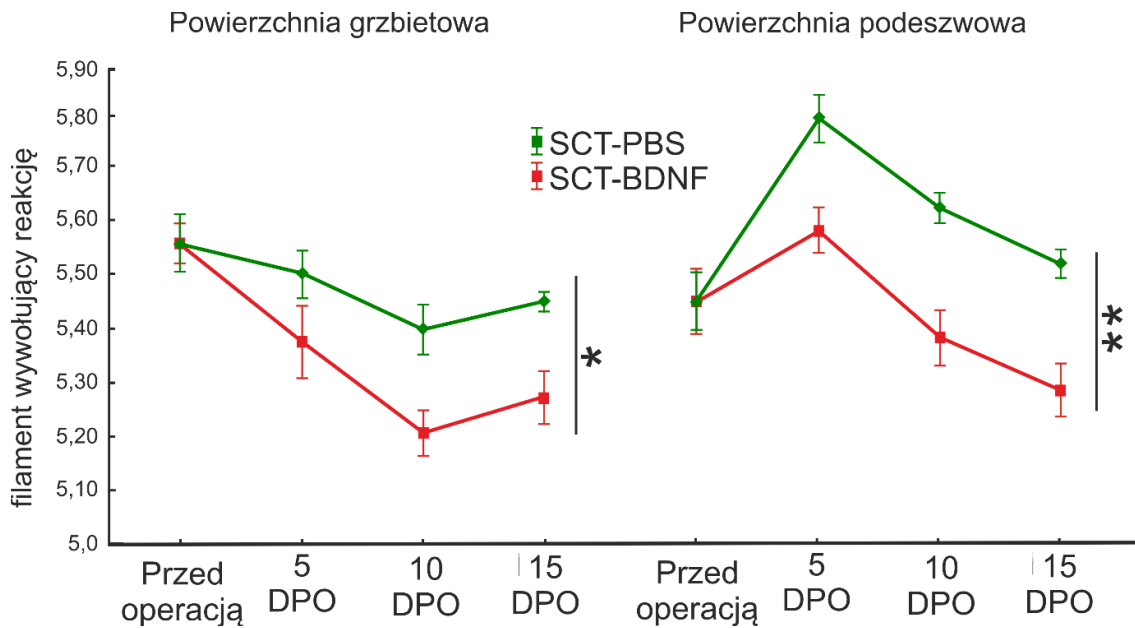
Różnice w punktacji pomiędzy szczurami SCT-BDNF w 13. dniu testowania sugerowały, że niektóre zwierzęta osiągnęły już potencjalnie najwyższy poziom swoich zdolności motorycznych (np. Zd7, BJ2, BJ3, BJ6; Tab. 1W), podczas gdy inne nie. Aby zweryfikować możliwość dalszej poprawy, obserwację wszystkich szczurów SCT-BDNF przedłużono o kolejne dwa dni. Obserwacja ujawniła, że u większości badanych osobników SCT-BDNF poprawa wydajności osiągnęła szczyt między 13. a 16. dniem po terapii BDNF. W dniu najwyższej poprawy wszystkie szczury zostały sklasyfikowane na poziomie 4 ze średnim wynikiem 14,62 +/- 2,32 (Tabela 1W). W porównaniu z wydajnością w 13. dniu, dalsza poprawa była również znacząca (test Wilcoxon, $P = 0,008$). Te wyniki potwierdzają korzystny wpływ terapii AAV-BDNF na zdolności motoryczne szczurów po uszkodzeniu rdzenia, z okresem najlepszej poprawy przypadającym na trzeci tydzień po uszkodzeniu i podaniu wektora (Ziemlińska i in., 2014).

W otwartym polu, szczury SCT-PBS poruszały się za pomocą kończyn przednich, ciągnąc ciało leżące na podłożu symetrycznie lub asymetrycznie. Stopy tylnych kończyn spoczywały na stronie grzbietowej; kończyny wykazywały sporadyczne ruchy, bez rytmiczności właściwej przednim kończynom. Iniekcja AAV-BDNF spowodowała, że spinalizowane szczury wykazywały ruchy tylnych kończyn, ze stopami stawianymi na powierzchni podszwowej oraz okazjonalnymi alternacjami. Zgodnie z obserwacjami, pięć z trzynastu szczurów z grupy SCT-BDNF było w stanie utrzymać ciało symetrycznie do osi ruchu przez większą część czasu przebywania w otwartym polu.

4.3 Ocena progów bólowych w kończynach tylnych

Mając na uwadze, że BDNF pełni funkcję modulatora w przekazywaniu sygnałów bólowych (Merighi i in., 2008; Pezet i in., 2002; Vanelderen i in., 2010), określono u badanych zwierząt wartość progową siły mechanicznego bodźca punktowego o charakterze nocyceptywnym, która inicjuje odruchowe cofnięcie kończyny (zob. Metody 3.5.3). Początkowy pomiar siły nacisku filamentem von Freya, który powodował reakcję cofania łapy przez zwierzę, przeprowadzono przed interwencjami chirurgicznymi, podczas przyzwyczajania zwierząt do badacza. Wyniki uzyskane z tego pomiaru były bardzo spójne u wszystkich zwierząt (Rycina 3W). Późniejsze odczyty wartości siły nacisku realizowano w piątym, dziesiątym i piętnastym dniu po zabiegu chirurgicznym. Analiza przeprowadzona w pierwszym tygodniu po operacji wykazała trend wzrostowy progu bólowego na stronie podszwowej stóp u zwierząt obu grup. W dalszej fazie pooperacyjnej, następowało

zmniejszenie wartości progów reakcji względem wartości przedoperacyjnych. W wynikach uzyskanych w teście z części grzbietowej łap już od 5 dnia po zabiegu obserwowano podwyższoną wrażliwość na bodźce. Stwierdzono, że nadprodukcja BDNF istotnie pogłębia podwyższoną wrażliwość na bodźce mechaniczne oznaczoną u szczurów SCT-PBS.

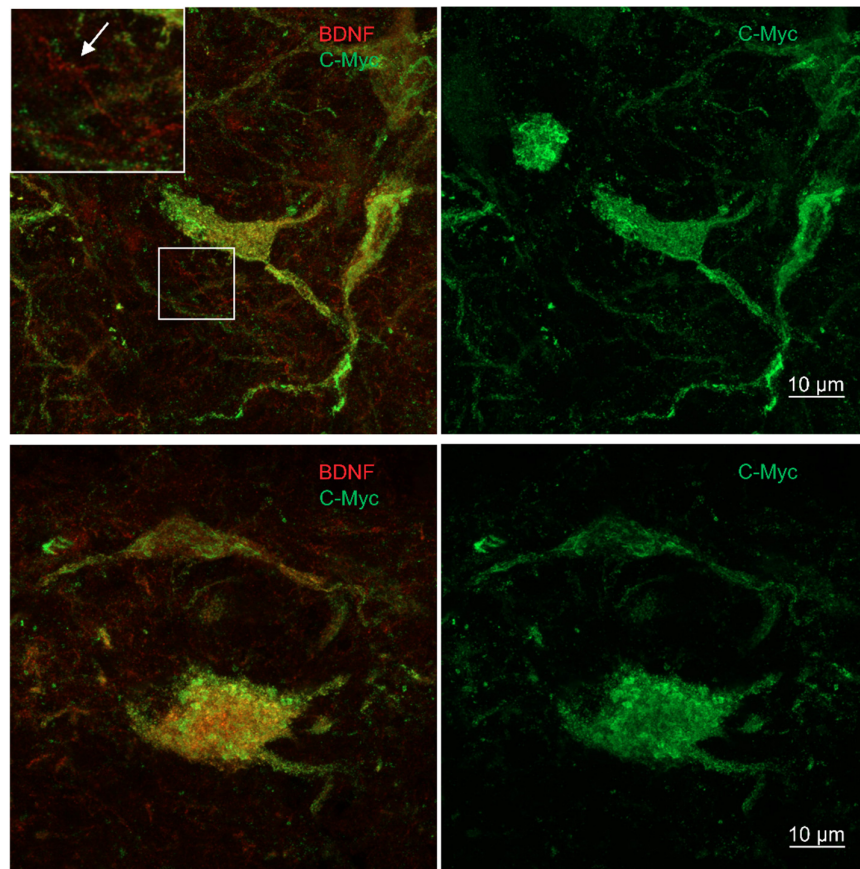


Rycina 3W. Średnie wartości progów reakcji (+/- SEM), zmierzone przy użyciu mikrofilamentów von Freya na poduszkowej i grzbietowej części stopy szczura. Badania te przeprowadzono oddzielnie dla lewej i prawej łapy, a przedstawione wyniki są średnimi z danych z obu łap. (Powierzchnia grzbietowa: grupa SCT-PBS vs. grupa SCT-BDNF, $p = 0,017$; Powierzchnia poduszkowa: grupa SCT-PBS vs. grupa SCT-BDNF, $p = 0,0011$) Do oceny różnic między grupami eksperymentalnymi użyto analizy wariancji dla powtarzanych pomiarów (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

4.4 Ocena zakresu transdukcji wektorem AAV-BDNF i występowania rekombinowanego BDNF

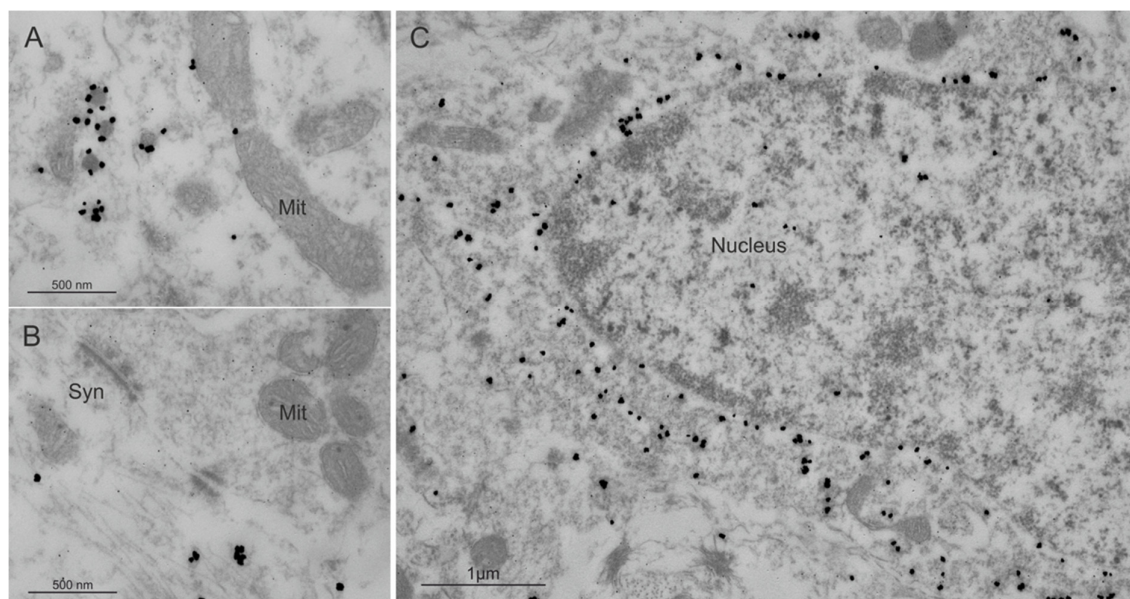
W celu oceny zakresu występowania tych neuronów, które podjęły syntezę rekombinowanego BDNF (rBDNF) w ciągu 2 tygodni od wszczepienia AAV-BDNF, przeprowadzono znakowania immunofluorescencyjne metki c-Myc dołączonej do rBDNF. Porównano je ze znakowaniem całej puli BDNF w preparatach rdzenia kręgowego. Dwa tygodnie po podaniu wektora, reakcja IF wykazała obecność białka cMyc w neuronach rdzenia kręgowego każdego ze szczurów z grupy AAV-BDNF (reprezentatywne obrazy przedstawiono na Ryc. 4W i 6W).

Efektywność transdukcji była najwyższa w segmentach lędźwiowych L1-L2, w pobliżu miejsca iniekcji, w licznych komórkach o fenotypie neuronów oraz we włóknach (Ryc. 4W). Endogenny BDNF [struktury subkomórkowe BDNF(+) cMyc (-)] występował w neuronach z ekspresją rBDNF ale również w sieci drobnych włókien o morfologii wskazującej na pochodzenie glejowe (ramka na Ryc. 4W). Ta obserwacja może odzwierciedlać syntezę BDNF w astrocytach i/lub w mikrogleju aktywowanych w następstwie naruszenia opony twardej i lokalnego uszkodzenia miąższu rdzenia igłą iniekcyjną (Giralt i in., 2010; Saha i in., 2006). Nadprodukcja BDNF w tym rejonie może służyć wzmocnieniu sygnału troficznego w grupie położonych tu interneuronów i motoneuronów mięśni uda, odpowiedzialnych za prostowanie i zginanie stawu kolanowego w trakcie lokomocji.



Rycina 4W. Występowanie endogennego i rekombinowanego białka BDNF w rdzeniu kręgowym szczura w miejscu iniekcji AAV-BDNF (segment L1).

Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu konfokalnego prezentują projekcje maksymalnej intensywności uzyskane z 15 przekrojów optycznych skrawków z odcinka lędźwiowego L1 rdzenia kręgowego. Białko **BDNF** jest widoczne w cytoplazmie neuronów i w ich wypustkach, a także w delikatnej siatce włókienek, prawdopodobnie pochodzenia glejowego (lewy górny panel; ramka ilustruje wzmocniony sygnał w komórce glejowej). Rekombinowane białko z metką c-Myc (**c-Myc** IF) jest wykrywalne w ciałach neuronów i w wypustkach neuronów ale nie w siateczce włókien uwidocznionych na lewym panelu. Wynik wskazuje, że synteza rBDNF zachodzi specyficznie w neuronach.

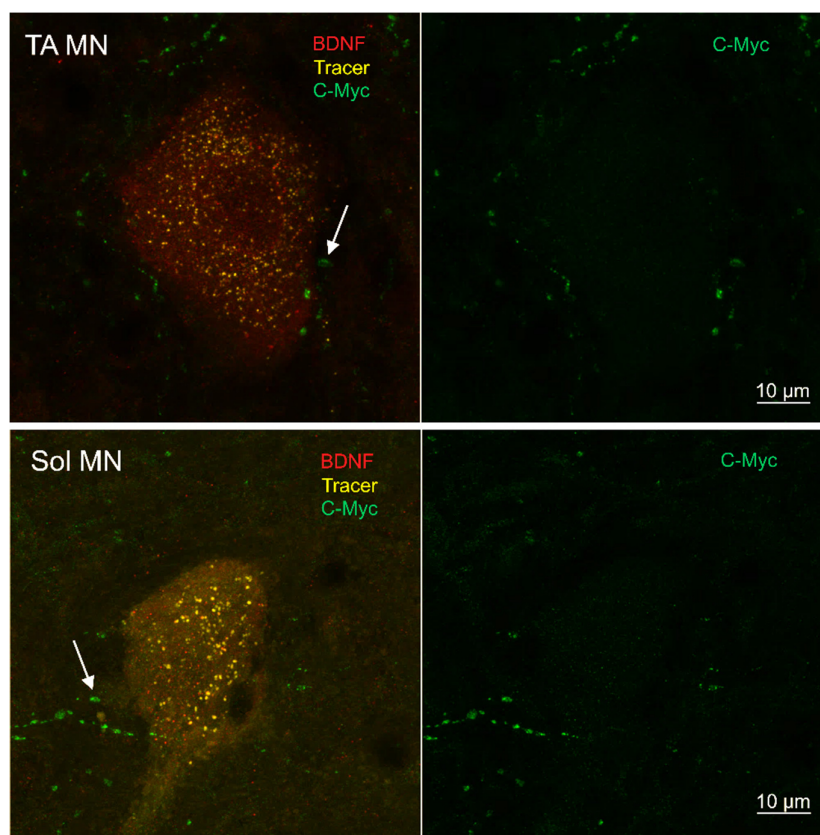


Rycina 5W. Występowanie rekombinowanego białka BDNF w strukturach subkomórkowych w rdzeniu kręgowym szczura w miejscu iniekcji AAV-BDNF (segment L1).

Reprezentatywne zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego obrazują rozmieszczenie sygnału immunogold Cmyc(+) – metki dołączonej do białka rBDNF. Rekombinowane białko jest wykrywalne w elektronogęstych pęcherzykach sekrecyjnych (A), w pobliżu synapsy (B) oraz w skupieniach dookoła jądra komórkowego (C).

Analiza ultrastrukturalna umiejscowienia sygnału rBDNF w komórce w rejonie L1 wykazała mnogość sygnału cMyc(+) w elektronogęstych pęcherzykach, prawdopodobnie sekrecyjnych (Dieni i in., 2012; Harward i in., 2016), przy włóknach cytoszkieletu aksonu w pobliżu synaps oraz dookoła jąder komórkowych (Ryc. 5W).

Inaczej niż w miejscu iniekcji AAV-BDNF w górnym segmencie lędźwiowym, w dolnych segmentach lędźwiowych L3-6 znakowanie immunofluorescencyjne metki c-Myc wykazało obecność rBDNF tylko we włóknach sieci nerwowej (Ryc. 6W). Włókna c-Myc (+) wykryto w pobliżu motoneuronów Sol i TA unerwiających mięśnie tylnych kończyn, odpowiedzialnych za pracę stawu skokowego. Te dwie obserwacje sugerują, że zarówno procesy indukowane przez rBDNF w sieciach neuronów górnych odcinków lędźwiowych i te, indukowane przez rBDNF wydzielany z ich zakończeń w dolnych odcinkach lędźwiowych mogą mieć udział w poprawie czynnościowej, która wystąpiła u zwierząt z iniekcją AAV-BDNF w tym wczesnym okresie po uszkodzeniu. Z kolei 5-6 tygodni po uszkodzeniu ekspresja rBDNF w tym samym modelu została potwierdzona również w wielu motoneuronach lędźwiowych (Ziemlińska i in., 2014).



Rycina 6W. Występowanie endogennego i rBDNF w rdzeniu kręgowym w segmentach L3 – L4 w neuropilu i motoneuronach mięśni piszczelowego przedniego (Tibialis anterior, TA) i płaszczkowatego (Soleus, Sol).

Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu konfokalnego prezentują projekcje maksymalnej intensywności z 11-16 przekrojów optycznych. MN mięśnia TA został wyznakowany podjednostką B toksyny cholery sprzężoną z AF488, MN mięśnia Sol wyznakowano barwnikiem Fast Blue (Tab. 7M). Endogenny BDNF obserwowano głównie w ciałach motoneuronów. Rekombinowane białko BDNF z metką c-Myc (*c-Myc*) jest wykrywalne we włóknach otaczających motoneurony mięśni TA i Sol (strzałki). Włókna nerwowe to dominująca składowa jego lokalizacji w dolnych segmentach lędźwiowych.

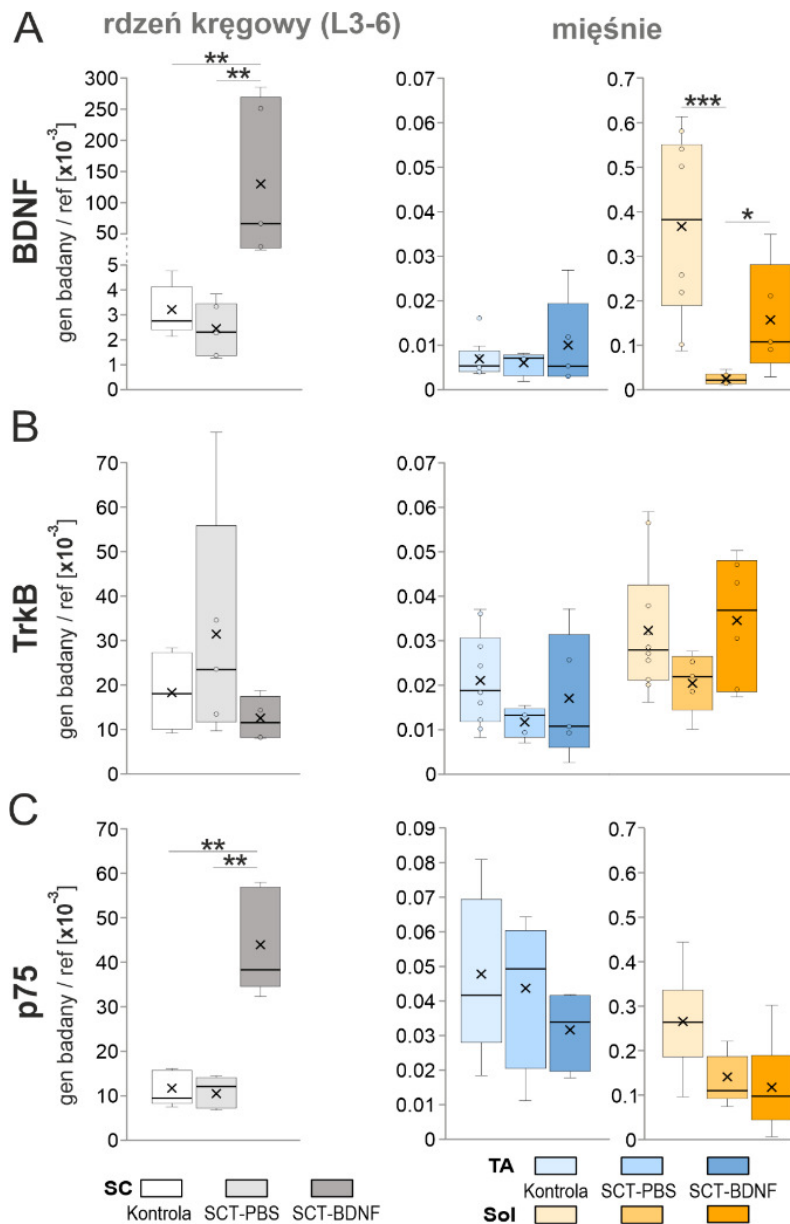
4.5 Analiza wpływu iniekcji AAV-BDNF na ekspresję BDNF oraz receptorów TrkB i p75 w rdzeniu kręgowym i mięśniach TA i Sol

Uzyskane wyniki dowiodły skuteczności transgenizacji. Należało zbadać, jak zmienia się w opisanych warunkach potencjał do syntezy BDNF w całej populacji komórek dolnych odcinków lędźwiowych rdzenia kręgowego, istotny dla zachodzenia zmian plastycznych i aktywności MN tego odcinka, i czy potencjalne zmiany ośrodkowe mogą modyfikować stan troficzny mięśni. Wybrano do badań mięśnie, które działają przeciwstawnie w stawie skokowym: mięsień piszczelowy przedni (TA) i płaszczkowaty (Soleus).

By odpowiedzieć na te pytania, zbadano poziomy transkryptów BDNF za pomocą metody qPCR w próbkach mRNA uzyskanych z (1) segmentów lędźwiowych rdzenia kręgowego; (2) mięśni szczurów z grup Kontrolnej, SCT-PBS i SCT-BDNF. Rycina 7W-A) pokazuje, że w rdzeniu kręgowym zwierząt kontrolnych poziom transkryptów BDNF w dolnych segmentach lędźwiowych (L3-6) jest wysoki (średnia = $3,5 \times 10^{-3}$ BDNF/gen ref), co zgadza się z wcześniejszymi wynikami zespołu (Gajewska-Woźniak i in., 2013; Ziemińska i in., 2014) i potwierdza dużą zasobność tkanki rdzenia w BDNF (Gómez-Pinilla i in., 2002; Macias i in., 2007; Macias i in., 2009). Dwa tygodnie po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego nie wykryto zmiany poziomu transkryptów BDNF w rdzeniu w grupie SCT-PBS. Natomiast iniekcja AAV-BDNF do segmentu L1-2 spowodowała 25-krotny wzrost mRNA BDNF w segmentach L3-6 (Ryc. 7W-A; $p = 0,0043$ w porównaniu z grupą SCT-PBS i $p = 0,0079$ w porównaniu z grupą kontrolną, test U Manna-Whitneya) oraz ponad 200-krotny wzrost w segmencie z iniekcją (Głowacka i in., 2017), potwierdzając skuteczność wektora.

Nadekspresja BDNF była tak znaczna, że zbadano czy w tych warunkach zmienia się potencjał komórek rdzenia kręgowego i mięśni do odpowiedzi na BDNF; mediatorami przekazu sygnału BDNF są receptory komórkowe o dużym (Trk B) i małym powinowactwie (p75). Uzyskane wyniki wykazały, że ani spinalizacja, ani nadekspresja BDNF w segmentach L3-6 rdzenia nie wpłynęły znacząco na segmentalny poziom mRNA receptorów TrkB (Ryc. 7W-B) natomiast w warunkach nadekspresji BDNF zaobserwowano istotny, kilkukrotny wzrost ekspresji receptora o małym powinowactwie p75 (Ryc. 7W-C).

W obu mięśniach w grupie kontrolnej poziomy mRNA BDNF były znacząco niższe niż obserwowane w rdzeniu kręgowym (Ryc. 7W-A), wskazując na mniejszą syntezę i zasobność mięśni w tę neurotrofinę. Wykryto około 50-krotną różnicę między ekspresją mRNA BDNF w mięśniu Sol (średnia = $3,7 \times 10^{-4}$) a mięśniu TA (średnia = $7,1 \times 10^{-6}$) ($p = 0,008$, test Wilcoxon), co sugeruje, że w warunkach fizjologicznych zapotrzebowanie na BDNF i jego produkcja w TA jest niższa niż w Sol. Spinalizacja doprowadziła do znacznego obniżenia (o ponad 90%) poziomu mRNA BDNF w Sol ($p = 0,0002$, test U Manna-Whitneya), ale nie w TA. Co zaskakujące, nadekspresja BDNF wywołana w rdzeniu kręgowym częściowo przeciwdziałała temu deficytowi (grupa SCT-PBS vs. grupa SCT-BDNF, $p = 0,017$, grupa kontrolna vs. grupa SCT-BDNF, $p = 0,075$, test U Manna-Whitneya). Ponadto, w porównaniu ze szczurami z grupy SCT-PBS, wszystkie szczury z grupy SCT-BDNF wykazały wyższą ekspresję mRNA BDNF w Sol a tylko niektóre w TA.

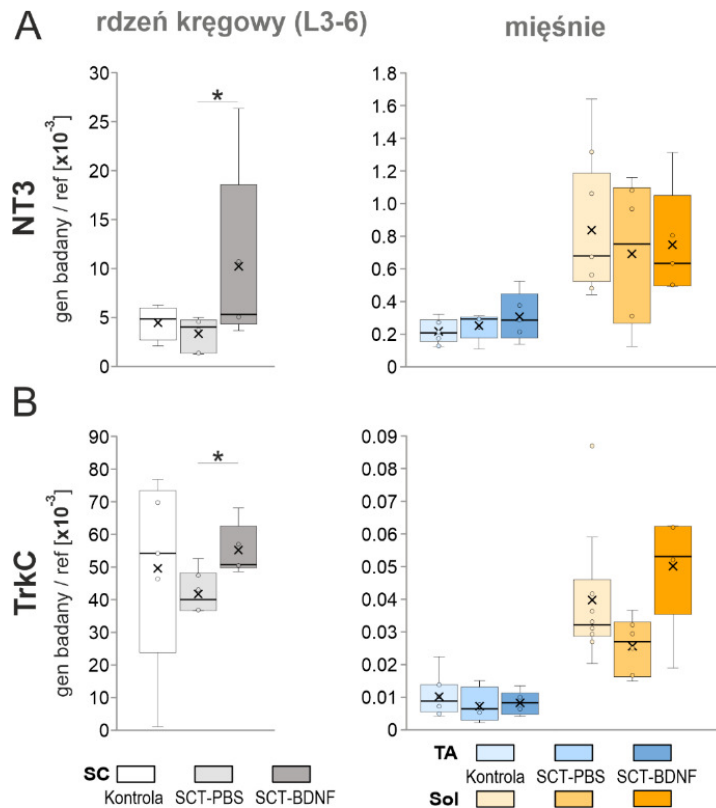


Rycina 7W. Wpływ iniekcji AAV-BDNF do segmentu lędźwiowego L1-2 rdzenia kręgowego na poziom mRNA (A) BDNF, (B) receptora TrkB i (C) receptora p75 w segmentach L3-6 rdzenia kręgowego oraz w mięśni piszczelowym przednim (TA) i płaszczkowatym (Soleus), 2 tygodnie po operacji. Poziomy mRNA BDNF i TrkB mierzono za pomocą metody qPCR. Dane dotyczące rdzenia kręgowego uzyskano w próbkach tkanek pobranych z 5 szczurów z grupy Kontrolnej, 6 szczurów SCT-PBS oraz 5 szczurów SCT-BDNF (segmenty rdzenia L3-6). Dane dotyczące mięśni uzyskano w próbkach z mięśni 9–10 szczurów Kontrolnych, 4–6 szczurów SCT-PBS oraz 5 szczurów SCT-BDNF. Do oceny różnic między grupami eksperymentalnymi użyto testu U Manna-Whitneya (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$). Z: (Głowacka i in., 2022). Różnice pomiędzy wartościami kontrolnymi w Sol i TA opisano w tekście.**

A więc stwierdzono nierównowagę w zasobności w mRNA BDNF w badanych mięśniach, a także inne odpowiedzi na spinalizację i rdzeniową iniekcję AAV-BDNF w Sol i TA. Ta grupa danych sugeruje, że nadprodukcja BDNF w sieci neuronów rdzenia kręgowego może wpływać na stan i aktywność troficzną poszczególnych mięśni i że podatność na sygnał troficzny może być różna między mięśniami. Ta grupa danych sugeruje również wpływ na zachowanie funkcjonalności synaps nerwowo-mięśniowych, mające odzwierciedlenie w poprawie lokomotorycznej.

4.6 Wpływ rdzeniowej nadekspresji BDNF na ekspresję neurotrofiny NT3 oraz receptorów TrkC w segmentach lędźwiowych oraz w mięśniach

Ponieważ receptory mięśniowe i włókna nerwowe, które je unerwiają, wymagają neurotrofiny NT-3 do odzyskania funkcji po uszkodzeniu (Ernfors i in., 1994; Wright i in., 1997), a większość neuronów unerwiających receptory wrzeciona mięśniowego, jak również perisynaptyczne i mielinizujące komórki Schwanna, wykazuje ekspresję mRNA TrkC (Hess i in., 2007; McMahon i in., 1994), postanowiono zbadać, czy nadekspresja BDNF w rdzeniu kręgowym wywiera wpływ na poziom NT-3/TrkC. Przeprowadzono analizę wpływu nadekspresji rdzeniowej BDNF na poziom transkryptów NT-3 i TrkC w rdzeniu kręgowym i w mięśniach TA i Sol. Spinalizacja nie zmieniła ekspresji NT-3 ani TrkC w segmentach rdzenia L3-6 i w mięśniach, natomiast nadekspresja BDNF miała stymulujący wpływ na oba geny na poziomie rdzenia (* $p \leq 0,05$). Analiza ujawniła również dysproporcję w zasobności w mRNA NT-3 i mRNA TrkC w kontrolnych mięśniach, ponownie wskazując na wyższe potrzeby neurotroficzne obwodu Sol. Nie stwierdzono natomiast wpływu nadekspresji BDNF na poziom NT-3 w żadnym z badanych mięśni (Ryc. 8W).



Rycina 8W. Wpływ iniekcji AAV-BDNF do segmentu lędźwiowego L1-2 rdzenia kręgowego na poziom mRNA (A) NT3 i (B) TrkC w segmentach L3-6 rdzenia kręgowego oraz w mięśniach, 2 tygodnie po operacji.

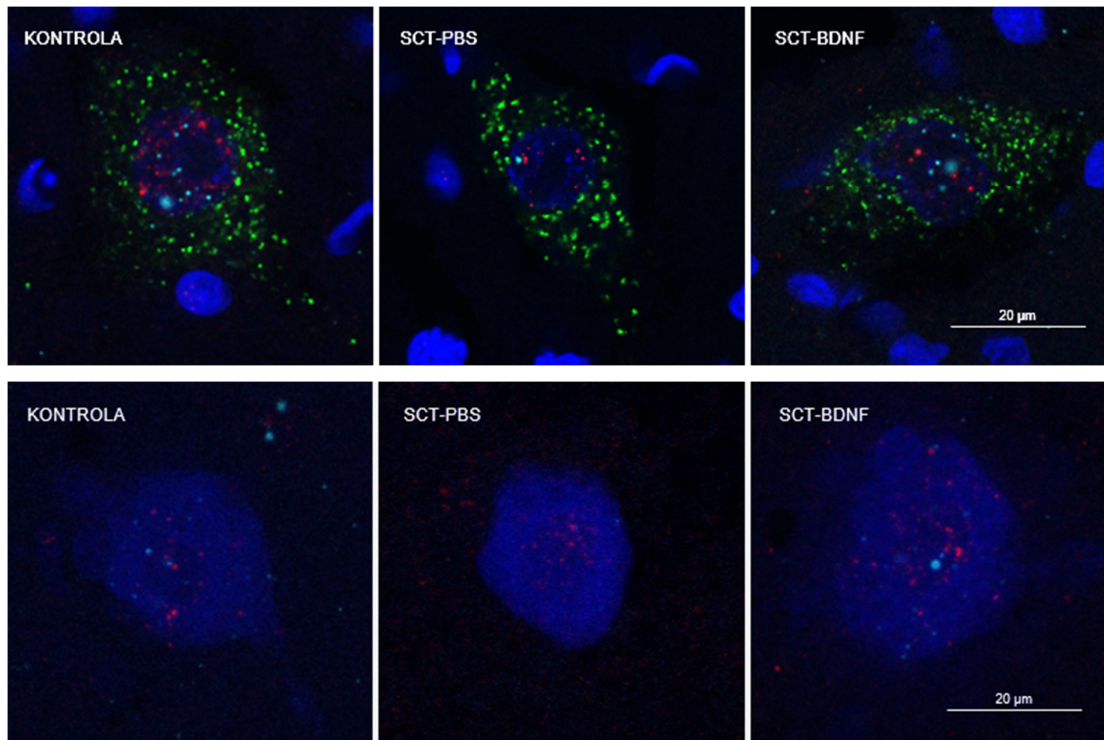
Poziomy mRNA NT3 i TrkC mierzono za pomocą metody qPCR. Dane uzyskano w próbkach tkanek pobranych od 5 szczurów z grupy Kontrolnej, 6 szczurów SCT-PBS oraz 5 szczurów SCT-BDNF (segmenty rdzenia L3-6); 9–10 szczurów Kontrolnych, 4–6 szczurów SCT-PBS oraz 5 szczurów SCT-BDNF (mięśnie). Do oceny różnic między grupami eksperymentalnymi użyto testu U Manna-Whitneya (* $p \leq 0,05$)

Badania ekspresji genów przeprowadzone na materiale pobranym ze środkowej części brzusców mięśniowych, gdzie koncentrują się złącza nerwowo-mięśniowe (NMJ) (Mohan i in., 2015), wskazały na zachodzenie znaczących zmian w poziomie BDNF i rysujące się tendencje do zmian w ekspresji receptorów. Wobec tego, że zastosowana metoda nie umożliwia odpowiedzi na pytanie, w których przedziałach komórkowych zachodzą wykryte zmiany, w następnym kroku pogłębiono analizę o rozmieszczenie komórkowe transkryptów, posługując się reakcją fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ, którą wykorzystano do badań zarówno części rdzeniowej jak i mięśniowej obwodu.

4.7 Analiza ekspresji BDNF oraz receptorów TrkB i p75

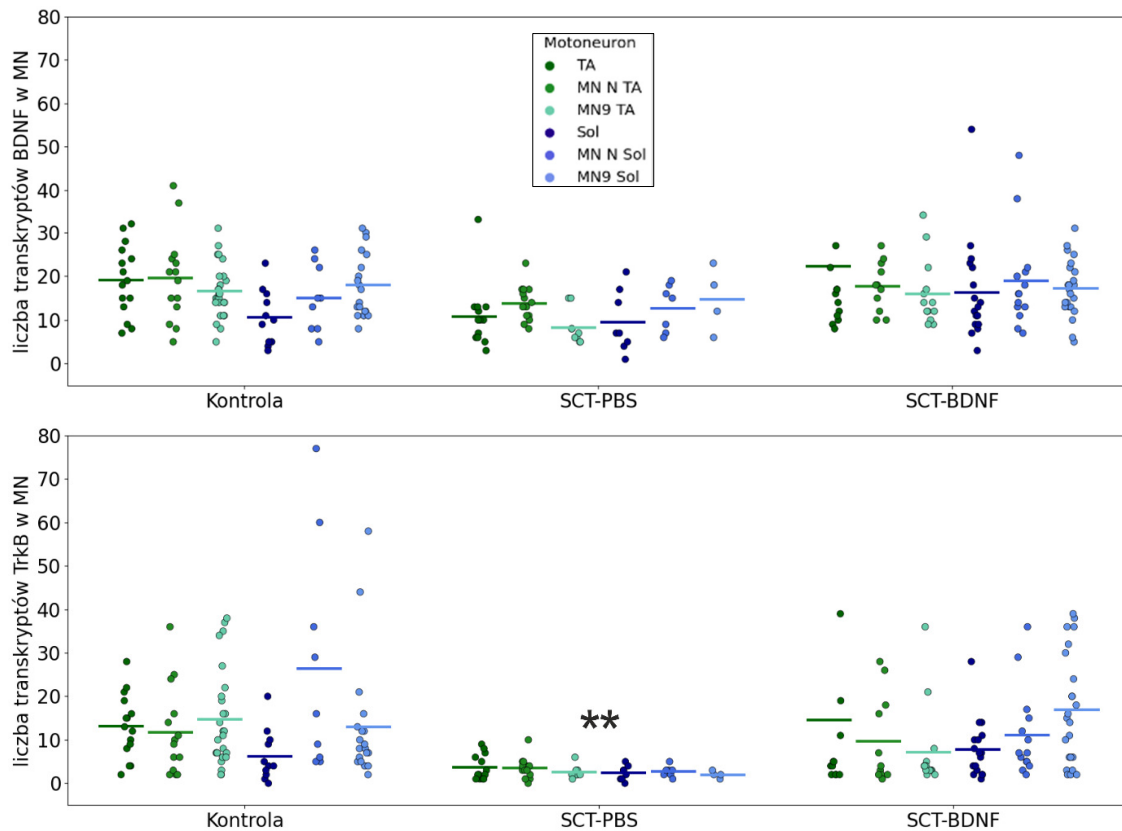
w motoneuronach za pomocą fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ*.

Aby odpowiedzieć na pytanie czy wywołana nadekspresja BDNF w rdzeniu kręgowym wpływa na poziom transkryptów BDNF i czy reguluje ekspresję receptora TrkB i p75 w samych MN unerwiających badane mięśnie TA i Sol tylnych kończyn, użyto metody o dużej czułości i rozdzielczości sygnału: RNAScope (Ryc. 9-12W). Oceniano liczbę transkryptów BDNF i TrkB w MN unerwiających mięśnie TA i Sol, jak również ich lokalizację wewnątrzkomórkową. W MN zwierząt SCT-PBS większość sygnału mRNA dla TrkB obserwowano jako podwójne struktury w jądrze, co prawdopodobnie reprezentuje oba allele genu, z bardzo niewielką ilością sygnału opuszczającego jądro. Obserwacje te sugerują zmniejszoną aktywność transkrypcyjną genu TrkB u tych zwierząt (Ryc. 9W).



Rycina 9W. Transkrypty BDNF oraz jego receptora TrkB w motoneuronach unerwiających mięsień TA (panel górny) i Sol (panel dolny). Najliczniej występujący sygnał mRNA BDNF i TrkB obserwowano w jądrze komórkowym, chociaż obserwowano również cząsteczki mRNA w cytoplazmie i oligodendrocytach. Pokazane są pojedyncze skrawki optyczne z mikroskopu konfokalnego (Leica SP8, obiektyw olejowy 63x). W przypadku MN Sol, przedstawionych na panelu dolnym, ze względu na obecność markera Fast Blue, zastosowano małe stężenie odczynnika Hoechst (1:100000) aby uniknąć zasłonięcia sygnału tracera. Przy tych ustawieniach obrazowania jądra oligodendrocytów są niewidoczne.

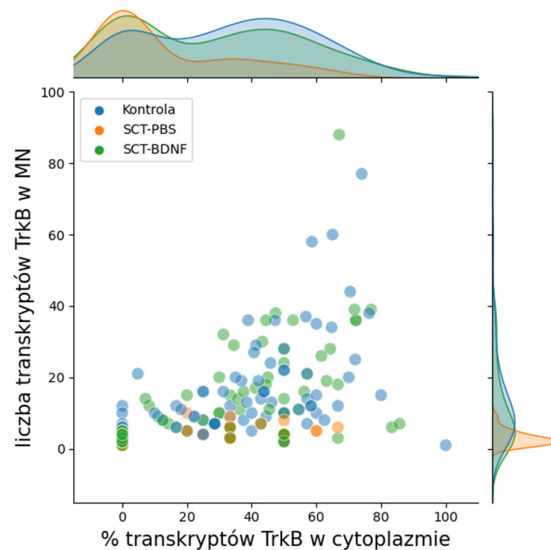
Na Rycinie 10W przedstawiono wyniki ilościowe pomiarów: wykres pokazuje liczbę transkryptów BDNF i jego receptora TrkB w różnych grupach MN łądźwiowych. Każda kropka na wykresie reprezentuje jedną komórkę. Zbadano sygnał w MN TA i Sol, a także w MN sąsiadujących z nimi - ich bliskich i dalekich „sąsiadów”. Przecięcie rdzenia kręgowego nie miało znaczącego wpływu na ekspresję BDNF w motoneuronach. Niemniej jednak, w przypadku MN z grupy SCT-PBS stwierdzono wyraźny spadek ekspresji receptora TrkB. Zastosowanie dordzeniowej iniekcji AAV-BDNF skutecznie zapobiegało temu spadkowi, co sugeruje, iż interneuronalna pula BDNF może odgrywać kluczową rolę w modulacji ekspresji receptora TrkB w motoneuronach.



Rycina 10W. Liczba transkryptów BDNF oraz jego receptora o dużym powinowactwie TrkB w różnych grupach motoneuronów.

TA – MN unerwiające TA; MN N TA – MN w bezpośrednim sąsiedztwie MN TA; MN9 Tib – MN blaszki IX, na poziomie L4 rdzenia kręgowego, gdzie zlokalizowane są MN TA. Sol – MN unerwiające mięsień Soleus; MN N Sol – MN w bezpośrednim sąsiedztwie MN Sol; MN9 Sol – MN blaszki IX, na poziomie L5 rdzenia kręgowego, gdzie zlokalizowane są MN Sol; Dane pochodzą z 3 zwierząt na grupę. W odpowiedzi na całkowite przecięcie rdzenia kręgowego (SCT) zaobserwowano znaczący spadek liczby transkryptów TrkB w MN (grupa SCT-PBS). Dordzeniowa iniekcja AAV-BDNF na poziomie segmentu L1 rdzenia kręgowego spowodowała wzrost ekspresji TrkB w MN TA i Sol (mRNA TrkB $p = 0,0001$; analiza wariancji ANOVA i test post hoc Tukeya). Nie zaobserwowano istotnych różnic między typami motoneuronów.

Dodatkowo zbadano, jak transkrypty tego receptora rozmieszczone są w MN wewnątrzkomórkowo (Ryc. 11W). Wyniki wskazują, że zwiększenie stężenia BDNF w sieci rdzeniowej za pośrednictwem transdukowanych neuronów z segmentu L1 rdzenia kręgowego prowadzi do zwiększenia dostępności transkryptów TrkB w cytoplazmie MN zlokalizowanych w dolnych segmentach lędźwiowych.

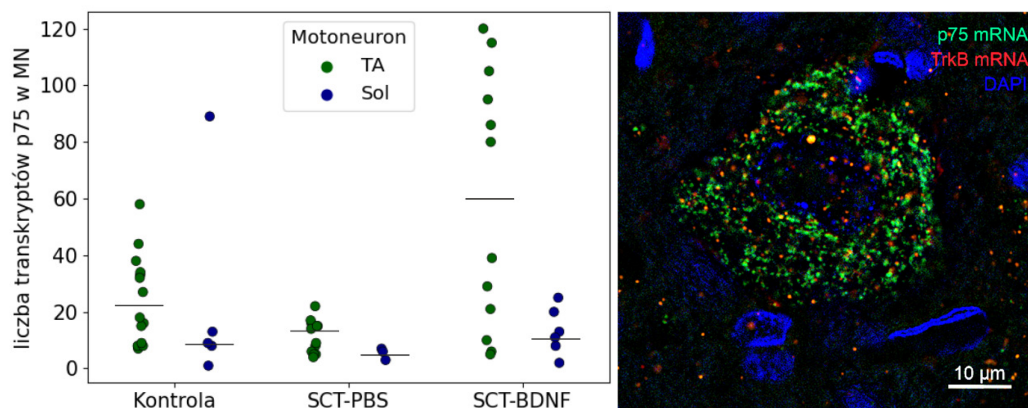


Rycina 11W. Dostępność transkryptów receptora TrkB w cytoplazmie motoneuronów.

Wykres typu jointplot przedstawia rozkład sygnału mRNA w motoneuronach poziomu L4-L5 niezależnie od typu MN. Dane pochodzą z 240 komórek. Różnice w rozkładzie sygnału między grupami sugerują, że wzbogacenie sieci rdzeniowej w BDNF przez transdukowane neurony zwiększa dostępność transkryptów TrkB w MN ($p < 0,001$; analiza wariancji ANOVA i test post hoc Tukeya).

Następnie zbadano ekspresję receptora o niskim powinowactwie p75 w MN mięśni TA i Sol. Zaobserwowano różnicę w kontrolnych poziomach tego receptora i wyraźną odpowiedź MN mięśnia TA na podanie AAV-BDNF, jednak ze względu na małą liczebność zwierząt poddanych analizie w tej grupie (2 zwierzęta) nie uzyskano istotności statystycznej. W wielu MN mięśnia TA obserwowano bardzo duże nagromadzenie sygnału mRNA p75 w postaci aglomeratów (Ryc. 12W, panel prawy, kolor zielony).

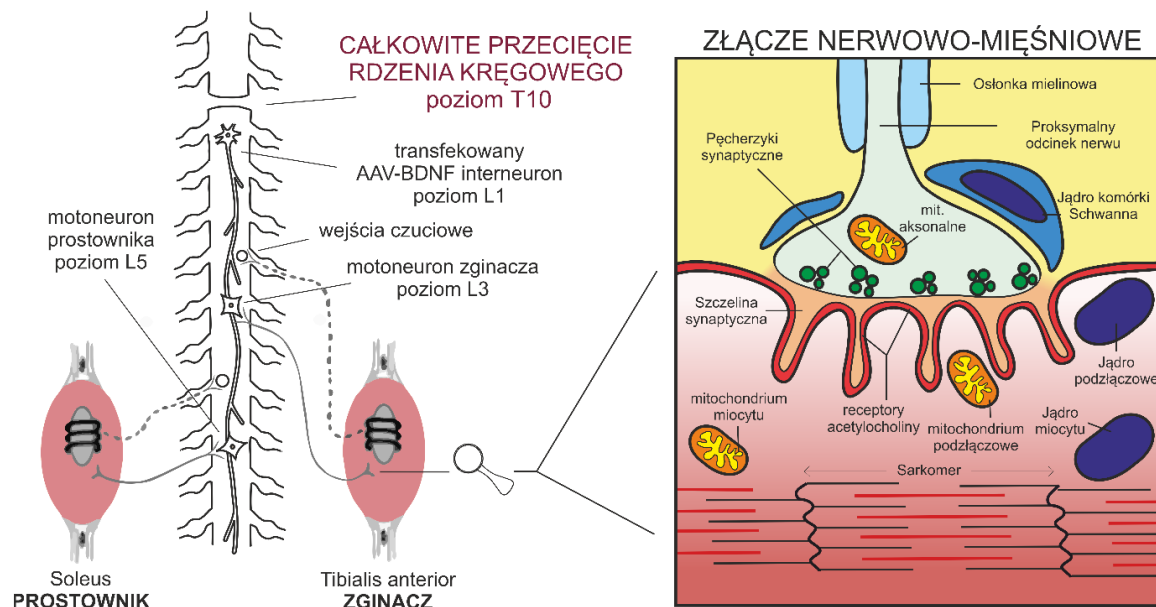
Opisane wyniki pokazały, że zwiększenie ekspresji BDNF w uszkodzonej tkance rdzenia częściowo przywraca jego receptywność na BDNF, sugerując utrzymanie dobrostanu MN. Znaczna poprawa funkcji lokomotorycznych oraz utrzymana receptywność MN kazały przypuszczać, że podanie AAV-BDNF wywiera również pozytywny wpływ na obwodowe zakończenie aksonalne.



Rycina 12W. Analiza ekspresji receptora o niskim powinowactwie p75 w motoneuronach mięśni zginacza i prostownika. Panel lewy. Wykres przedstawia liczbę transkryptów receptora p75 w wyznakowanych wstecznie motoneuronach. Kropka oznacza wynik z pojedynczego neuronu. Dane pochodzą z 54 wyznakowanych motoneuronów od 2-3 zwierząt na grupę (3 KN, 3 SCT-PBS, 2 SCT-BDNF). Panel prawy. Reprezentatywne zdjęcie motoneuronu TA z grupy AAV-BDNF z subpopulacji która bardzo mocno odpowiedziała na transgenizację – na zdjęciu przedstawiono mRNA p75 w kolorze zielonym i mRNA TrkB (pokazane tu dla odniesienia) w kolorze czerwonym.

4.8 Ocena zmian w złączach nerwowo-mięśniowych TA i Sol po SCT i rdzeniowej nadekspresji BDNF

Analiza złącza nerwowo-mięśniowego przeprowadzona w tej pracy skupia się na kilku kluczowych aspektach (Ryc. 13W). W pierwszej kolejności oceniono ekspresję podstawowych składowych badanej ścieżki modulatorowej: BDNF oraz jego receptorów TrkB i p75, w złączach nerwowo-mięśniowych TA i Sol przy użyciu fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ połączonej z immunofluorescencyjnym znakowaniem białek. Następnie, zbadano wpływ uszkodzenia rdzenia kręgowego oraz iniekcji AAV-BDNF na stan złącza nerwowo-mięśniowego, skupiając się na poziomie demielinizacji, ekspresji markerów mieliny, integralności struktur pre- i postsynaptycznych złącza oraz jego ultrastrukturze. Ponadto, zanalizowano wpływ iniekcji AAV-BDNF na ekspresję markerów przekaźnictwa synaptycznego w mięśniu.

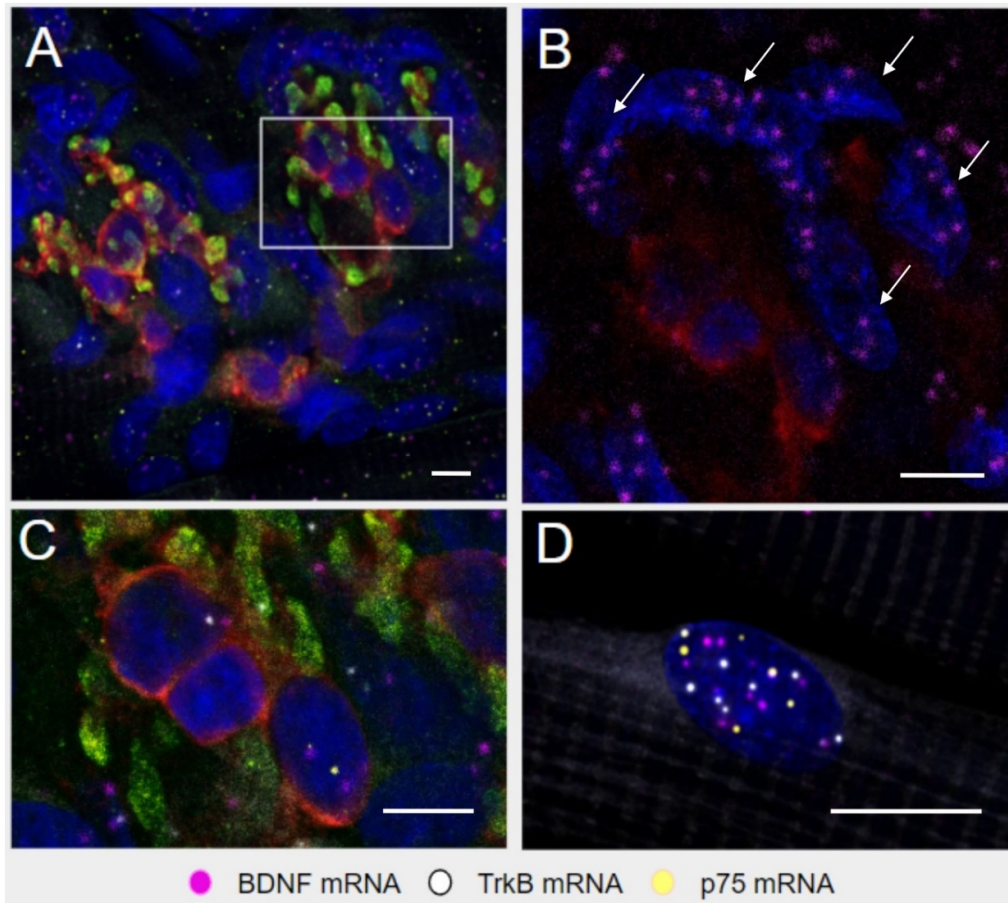


Rycina 13W. Schemat eksperymentu i struktur w NMJ i mięśniu które podlegały ocenie. Lewy panel pokazuje schemat doświadczenia z zaznaczeniem struktur które badano w niniejszej dysertacji. Po prawej stronie, w powiększeniu, przedstawiono schemat złącza nerwowo-mięśniowego i jego składowe poddane analizie. Zbadano ekspresję BDNF i receptora w trzech rodzajach jąder komórkowych, oceniono integralność strukturalną złącza, na koniec zanalizowano ultrastrukturę, w tym parametry mitochondriów pre- i postsynaptycznych, sarkomerów i pęcherzyków synaptycznych.

4.9 Analiza ekspresji BDNF oraz receptorów TrkB i p75 w złączach nerwowo-mięśniowych TA i Sol za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* połączonej z IF

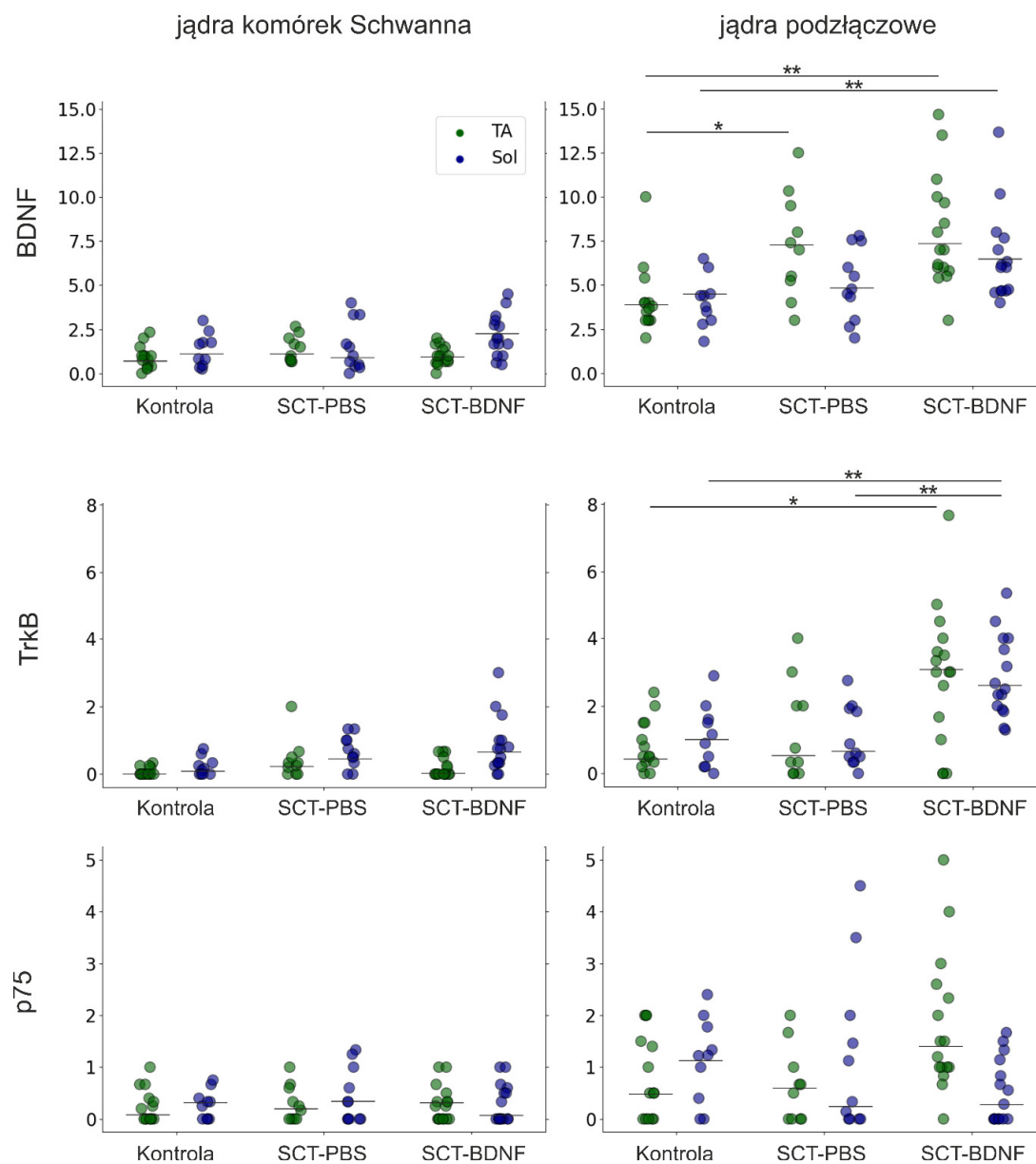
Połączenie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz immunofluorescencji (IF) umożliwiło uzyskanie bezpośrednich danych na temat potencjału transkrypcyjnego BDNF i jego receptorów oraz komórkowej lokalizacji ekspresji. Poziom transkryptów badano w trzech grupach jąder komórkowych: w presynaptycznych jądrach terminalnych komórek Schwanna, postsynaptycznych jądrach podłączowych oraz w jądrach miocytów (Ryc. 14W). W sumie przeanalizowano 722 jądra komórkowe pochodzące z 24 złączy kontrolnych, 21 złączy zwierząt z grupy SCT-PBS oraz 21 złączy z grupy SCT-BDNF. Nie stwierdzono różnic w kontrolnym poziomie mRNA wszystkich badanych genów (BDNF, TrkB, p75) między NMJ mięśni TA i Sol, w żadnej z lokalizacji. Zauważono jednak, że aktywność transkrypcyjna jąder podłączowych i mięśniowych oddalonych od złącza była znacznie wyższa niż ta obserwowana w jądrach komórek Schwanna (Ryc. 15W, dane dla jąder mięśniowych nieuwzględnione na wykresie).

Z badanych trzech transkryptów w największej liczbie w każdej lokalizacji występowało mRNA dla BDNF, a największą dynamikę zmian w aktywności transkrypcyjnej w badanych grupach jąder obserwowano w jądrach przyłączeniowych. Po całkowitym przecięciu rdzenia nastąpił istotny wzrost liczby transkryptów BDNF w jądrach postsynaptycznych mięśnia TA, zarówno podłączonych jak i w jądrach miocytów spoza rejonu złącza. Dordzeniowa iniekcja AAV-BDNF dodatkowo wzmocniła ten efekt w jądrach podłączonych. W złączach mięśnia Sol nie obserwowano zmiany w ilości transkryptów BDNF po SCT, za to podobnie jak w mięśniu TA, w grupie AAV-BDNF w jądrach postsynaptycznych nastąpił istotny wzrost poziomu transkryptów BDNF względem kontroli.



Rycina 14W. Transkrypty BDNF oraz jego receptorów TrkB i p75 w złączach nerwowo-mięśniowych mięśnia TA.

Zdjęcie A przedstawia złącze nerwowo-mięśniowe TA kontrolnego szczura, w projekcji maksymalnej intensywności, uzyskanej z 18 przekrojów optycznych o grubości 0,21 μm . Transkrypty zliczano w trzech grupach jąder komórkowych: jądrach podłączonych (B – strzałki), określane dzięki położeniu względem presynaptycznego znakowania VChT, (A-zielony), jądrach terminalnych komórek Schwanna (C, komórki Schwanna wyznakowane S-100b, czerwony) oraz w jądrach miocytów (D). Zdjęcia B i C przedstawiają powiększony fragment zaznaczony ramką na zdjęciu A, pojedynczy skrawek optyczny wybrany tak aby pokazać jądra określonego typu. Skala graficzna pokazana na każdym zdjęciu to odcinek o długości 10 μm .



Rycina 15W. Analiza ekspresji BDNF oraz receptorów TrkB i p75 w złączach nerwowo-mięśniowych mięśni zginacza (TA, zielony) i prostownika (Sol, niebieski).

Analizowano liczbę transkryptów w jądrach presynaptycznych (terminalnych komórek Schwanna) oraz postsynaptycznych (podzłączowych). Kropka oznacza wynik z pojedynczego złącza. Dane pochodzą z 77 złączy od 2 zwierząt na grupę. Do oceny różnic między grupami eksperymentalnymi użyto testu U Manna-Whitneya (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

W przypadku receptora TrkB przecięcie rdzenia kręgowego nie wywoływało istotnych zmian w poziomie transkrypcji w żadnym z badanych genów. Zaobserwowano natomiast wyraźną odpowiedź na dordzeniową iniekcję AAV-BDNF w jądrach podzłączowych. Wynik ten był znaczący w przypadku obu mięśni. Transkrypty receptora p75 występowały w małej liczbie i nie dały wyraźnej odpowiedzi na uszkodzenie i na nadekspresję BDNF po spinalizacji.

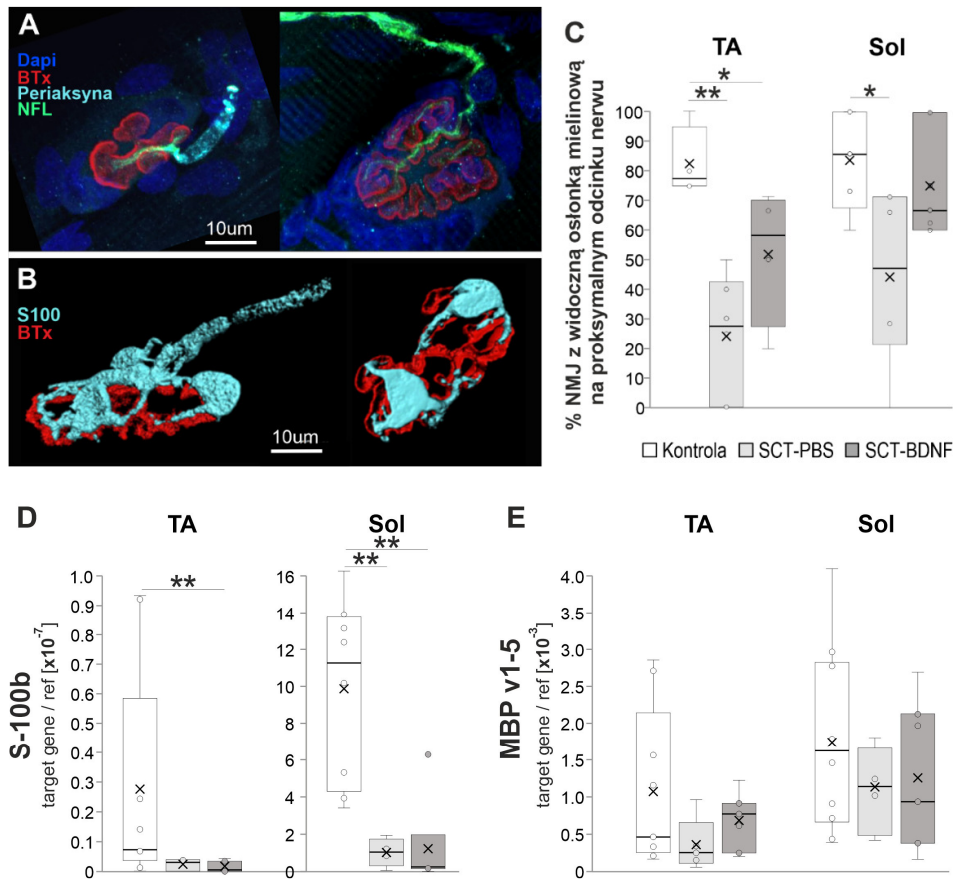
4.10 Wpływ SCT oraz nadekspresji BDNF na stan złącza nerwowo-mięśniowego

4.10.1 Ocena stopnia demielinizacji i ekspresji markerów mieliny

Aby zbadać wpływ całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego oraz nadekspresji BDNF na część obwodową układu rdzeń kręgowy – mięśnie, postanowiono poddać analizie integralność zakończeń nerwowo-mięśniowych (NMJ) i ocenić mielinizację dystalnych odcinków nerwów wchodzących do włókna mięśniowego. Zbadano złącza z wyznakowanymi komórkami Schwanna (TA: n = 79 NMJ, Sol: n = 98 NMJ, Rycina 15W A i B). Każde złącze zrekonstruowano w 3D i poddano jakościowemu badaniu przylegania sygnału IF identyfikującego zmielinizowane nerwy połączone z płytką końcową. Eksperymentator analizował zakodowane losowo obrazy NMJ, odpowiadając na pytanie: „Czy do złącza dochodzą zmielinizowane włókna nerwowe (wyznakowane S-100b)?”.

Analiza sygnału struktur S100b-pozytywnych przeprowadzona w celu oceny ciągłości zmielinizowanych włókien nerwowych ujawniła znaczące zmniejszenie się liczby prawidłowych kontaktów nerwowo-mięśniowych w obu mięśniach po SCT (Rycina 16W-C). Nadekspresja BDNF spowodowała, że zachowała się większa liczba kontaktów o normalnej morfologii niż w grupie SCT-PBS; w mięśniu Sol grupy SCT-BDNF ich liczba utrzymała się na poziomie nie różniącym się znacząco od wyniku w grupie kontrolnej.

Wzór znakowania białka periaksyny, której obecność wskazuje na mielinizującą subpopulację komórek Schwanna (SC), ujawnił, że u zwierząt poddanych przecięciu rdzenia kręgowego, mielinizacja nie obejmowała końcowych gałęzi nerwowych, a sygnał miał charakter bardziej rozproszony niż u szczurów kontrolnych. W większości odnerwionych lub zdemielinizowanych NMJ niemielinizujące tSC wciąż przylegały do płytki końcowej. To zjawisko zostało opisane wcześniej przez Burnsa i współpracowników (Burns i in., 2007). Wynik ten prowadził do kolejnego pytania, o zmiany molekularne w subpopulacji mielinizujących komórek Schwanna w dystalnej części nerwu oraz w towarzyszących im niemielinizujących terminalnych komórkach Schwanna. Analiza ekspresji metodą qPCR pokazała, że poziom mRNA kodującego białko S-100b, charakteryzującego obie populacje komórek był znacząco zmniejszony w po całkowitym przecięciu rdzenia (Rycina 16W-D), co sugerowało utratę tych komórek po spinalizacji lub ich odróżnicowanie (Botticelli i in., 2022). Terapia AAV-BDNF nie wpłynęła na poziom ekspresji tego białka.



Rycina 16W. Wpływ całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego SCT i rdzeniowej nadekspresji BDNF na mielinizację proksymalnych odcinków nerwów w złączach nerwowo-mięśniowych.

(A) Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiają NMJ mięśnia TA w projekcji maksymalnej intensywności. Ukazują przebieg włókien nerwowych (zidentyfikowanych za pomocą przeciwciała na neurofilament NFL) oraz rozmieszczenie mielinizujących komórek Schwanna (zidentyfikowanych za pomocą przeciwciała na periaksynę). W tkance pochodzącej ze szczura z grupy kontrolnej (po lewej) rozgałęzione aksony penetrujące płytkę końcową (część postsynaptyczna zidentyfikowana za pomocą fluorescencyjnie znakowanej alfa-bungarotoksyny (BTx) wiążącej receptor nikotynowy acetylocholin (nAChR)) były otoczone przez mielinizujące SC, podczas gdy w tkance ze szczura z grupy SCT-PBS (po prawej) był widoczny tylko śladowy sygnał mielinizujących SC. (B) Trójwymiarowe rekonstrukcje NMJ przedstawiają komórki Schwanna zidentyfikowane za pomocą przeciwciała wykrywającego białko S-100b. W kontrolnym NMJ (po lewej) zmielinizowany nerw był połączony z płytką końcową, natomiast w NMJ z grupy SCT-PBS (po prawej) zmielinizowany nerw nie był widoczny, chociaż niemielinizujące tSCs wciąż przylegały do płytki końcowej. (C) Wykres pokazujący procent nerwów z zachowaną osłonką mielinową na proksymalnym odcinku nerwu w grupach kontrolnych i SCT. Liczba analizowanych NMJ w mięśniu TA: kontrola—17, SCT-PBS—37, SCT-BDNF—25; w mięśniu Sol: kontrola—20, SCT-PBS—39, SCT-BDNF—39. (D, E) Wpływ SCT i terapii AAV-BDNF na (D) poziomy mRNA S-100 i (E) mRNA MBP (oceniane metodą qPCR) w mięśniach TA i Sol. Zaobserwowano znaczny spadek transkryptów S100b w obu mięśniach u zwierząt po spinalizacji i brak wpływu nadekspresji BDNF. Dane mRNA pochodzą z 10 kontrolnych, 4-5 SCT-PBS i 7 szczurów SCT-BDNF. Do oceny różnic między grupami eksperymentalnymi użyto testu U Manna-Whitneya (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). Wg. Głowacka i wsp., 2022.

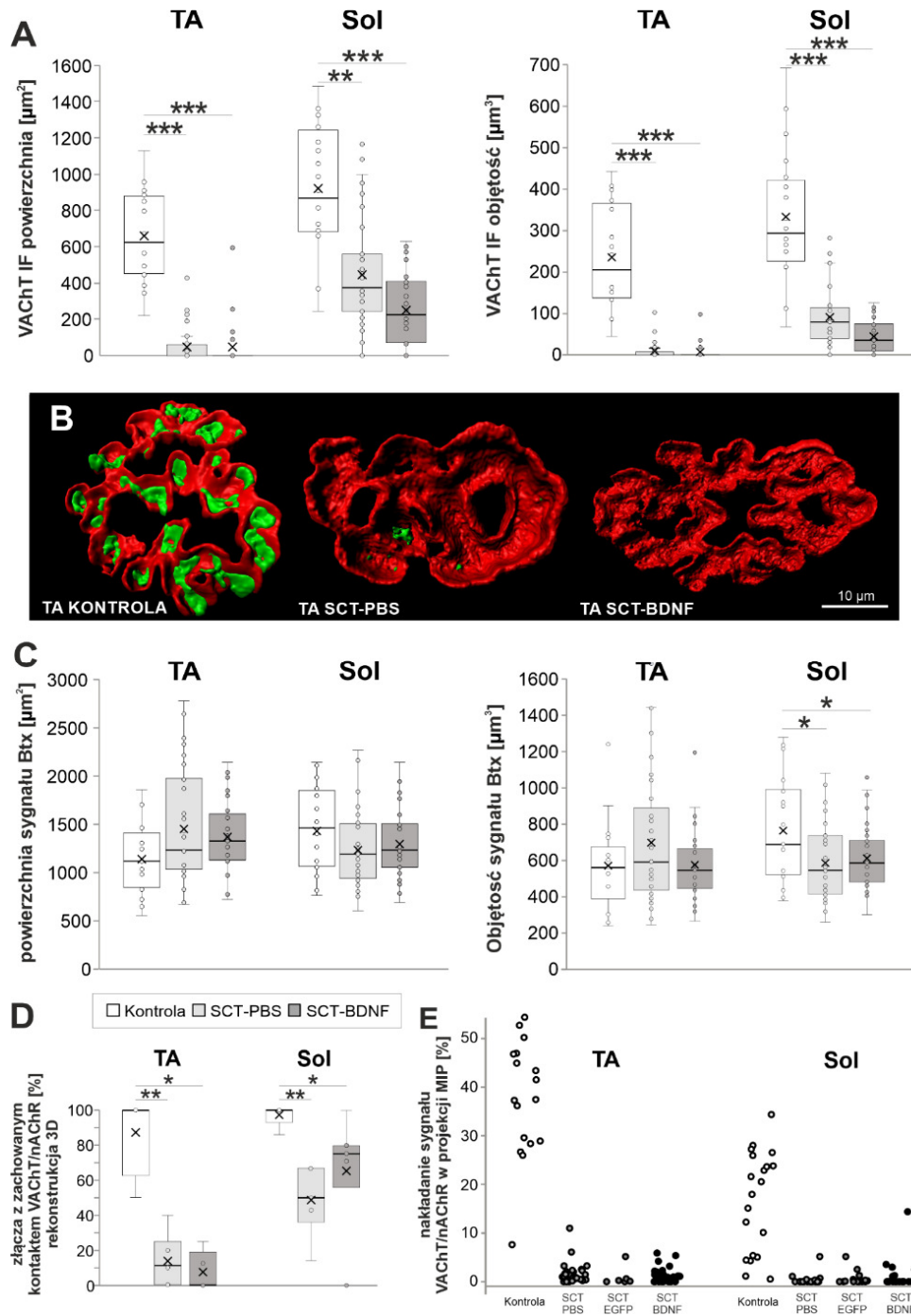
4.10.2 Ocena integralności złącza – znakowanie struktur pre- i postsynaptycznych

W następnym kroku postanowiono zbadać, czy zmieniają się rozmiary części presynaptycznej samego złącza i przyleganie części pre- i postsynaptycznej, które jest warunkiem prawidłowego przekazu sygnałów do mięśni.

Analiza obrazu presynaptycznej części złączy nerwowo-mięśniowych, zidentyfikowanych za pomocą immunofluorescencji VAcHT, ujawniła, że objętość zakończeń aksonalnych zajmowanych przez VAcHT była różna między NMJ TA a NMJ Sol u zwierząt kontrolnych (Rycina 17W). Zakończenia synaptyczne MN Sol charakteryzowały się większym obszarem ($1,4\times$) i objętością ($1,5\times$), niż zakończenia MN TA ($p = 0,052$ i $p = 0,012$, test t dla próbek zależnych). Część postsynaptyczna, zobrazowana za pomocą fluorescencyjnie znakowanej bungarotoksyny (BTx) wiążącej się z nAChR, wykazała podobną cechę: w NMJ Sol obszar błony postsynaptycznej zajmowany przez nAChR był większy ($1,3\times$) niż dla NMJ TA ($p = 0,009$, test t dla próbek zależnych).

Uzyskane wyniki są zgodne z danymi z literatury, w której opisano że u szczurów płytki końcowe mięśni wolnokurczliwych są większe niż płytki mięśni szybkokurczliwych (McArdle & Sansone, 1977; Wood & Slater, 1997). Powierzchnia i objętość sygnału VAcHT IF+ znacząco zmniejszyły się w złączach nerwowo-mięśniowych obu mięśni w odpowiedzi na całkowite przecięcie rdzenia (powierzchnia: TA $p = 0,0002$, Sol $p = 0,0023$; objętość: TA $p = 0,0002$, Sol $p = 0,0002$; analiza wariancji ANOVA i test post hoc Tukeya). Stwierdzono też, że presynaptyczna część NMJ mięśnia TA była bardziej wrażliwa niż w NMJ Sol; w każdej z grup z przeciętym rdzeniem kręgowym, całkowita utrata sygnału VAcHT IF+ w zakończeniach była częstsza w złączu TA. Postsynaptycznie, spinalizacja nie zmieniła powierzchni i objętości zajmowanej przez sygnał receptorów nikotynowych w NMJ TA, podczas gdy w NMJ Sol objętość tych struktur zmniejszyła się (Kontrola vs. SCT-PBS $p = 0,026$, Kontrola vs. SCT-BDNF $p = 0,032$).

Aby zbadać wpływ SCT i nadekspresji BDNF na integralność złączy, trójwymiarowe rekonstrukcje NMJ poddano jakościowemu badaniu przylegania pól wyznakowanych markerami pre- (VAcHT) i postsynaptycznymi (nAChR), które oceniano w rzucie bocznym rekonstrukcji (Rycina 17W-D). Eksperymentator analizował losowo zakodowane obrazy NMJ, odpowiadając na pytanie: „Czy sygnał VAcHT IF+ pozostaje w bezpośrednim kontakcie z sygnałem BTx znakującej nAChR?”. Analiza przylegania sygnałów VAcHT/BTx wykazała



Rycina 17W. Wpływ całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego i nadekspresji BDNF na znakowanie VAcHT i nAChR w złączach nerwowo-mięśniowych mięśni Sol i TA 2 tygodnie po operacji. (A) Zmiany w powierzchni i objętości znakowania VAcHT w zakończeniach synaptycznych analizowane na podstawie trójwymiarowych rekonstrukcji NMJ, zilustrowane na przykładzie NMJ mięśnia TA (B). Wykresy pudełkowe pokazują minimalne i maksymalne wyniki (wąsy), pierwszy i trzeci kwartyl, medianę (linia) oraz średnią (\times). Dane uzyskano na materiale z 9–10 szczurów kontrolnych, 4–6 szczurów SCT-PBS i 5 szczurów SCT-BDNF. (B) Porównanie reprezentatywnych zdjęć NMJ TA po rekonstrukcji. Trójwymiarowe maski sygnału VAcHT IF i Btx utworzono za pomocą oprogramowania Imaris. (C) Zmiany w powierzchni i objętości znakowania receptorów nikotynowych ACh wiążących Btx, zlokalizowanych w błonie postsynaptycznej. (D) Zmiany w integralności NMJ

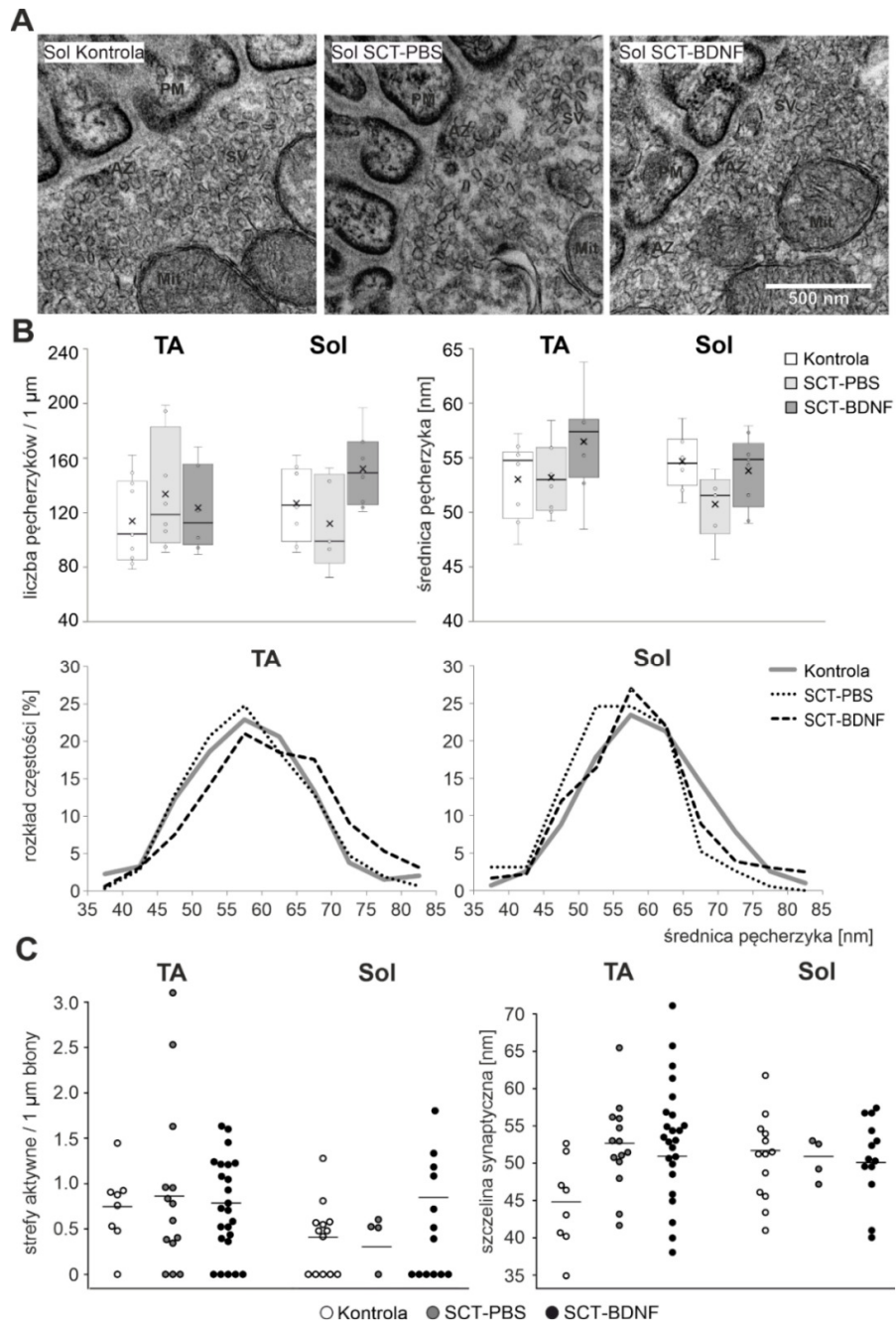
oceniane na podstawie przylegania VAcHT do płytki końcowej na bocznych profilach trójwymiarowych rekonstrukcji NMJ. Liczba analizowanych NMJ: TA: Kontrola—17, SCT-PBS—37, SCT-BDNF—25, Sol: Kontrola—20, SCT-PBS—39, SCT-BDNF—39. (E) Nakładanie znakowania VAcHT/BTx-nAChR na obrazach en-face. Procent nakładania obliczono z użyciem analizy w projekcji maksymalnej intensywności. Liczba analizowanych NMJ: TA: Kontrola—17, SCT-PBS—29, SCT-EGFP—17, SCT-BDNF—22, Sol: Kontrola—17, SCT-PBS—30, SCT-EGFP—6, SCT-BDNF—32. Do oceny różnic między grupami eksperymentalnymi użyto testu U Manna-Whitneya (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

znaczące spadki w grupie SCT-PBS (50–70% synaps straciło kontakt między strukturami pre- i postsynaptycznymi). Spadek wynikał głównie z często zupełnej utraty sygnału VAcHT i był większy dla mięśnia TA. Nadekspresja BDNF w rdzeniu kręgowym częściowo zapobiegła rozpadowi synaps w NMJ Sol (SCT-PBS vs. SCT-BDNF $p = 0,07$, test U Manna-Whitneya), ale nie miała wpływu na ten proces w NMJ TA. Wykonano dodatkową analizę nakładania się znakowania VAcHT/BTx-nAChR na obrazach złączy położonych en-face, z użyciem projekcji maksymalnej intensywności, która potwierdziła głęboki spadek nakładania się części pre- i postsynaptycznych w grupach spinalizowanych, zarówno w NMJ TA, jak i Sol (Rycina 17W-E).

4.10.3 Ocena ultrastruktury złącza

W celu głębszego zbadania wpływu SCT i nadekspresji BDNF na presynaptyczne i postsynaptyczne części NMJ, zbadano ultrastrukturę złącza. Do pomiarów zagęszczenia pęcherzyków synaptycznych (SV), szerokości szczelin synaptycznych oraz liczenia stref aktywnych na 1 μm błony wybrano synapsy z zachowanymi błonami pre- i postsynaptycznymi (Rycina 17W).

Gęstość występowania SV. Całkowite przecięcie rdzenia nie wpłynęło istotnie na średnią gęstość występowania SV w populacjach NMJ z zachowanymi kontaktami synaptycznymi w obu mięśniach, chociaż w niektórych przypadkach w MN Sol obserwowano zmniejszenie gęstości występowania SV, co ilustruje Rycina 15W-A. Ponadto, w NMJ Sol, SCT spowodowało obniżenie częstości występowania dużych SV (Rycina 17W-B, rozkład częstości). Przy zastosowaniu terapii AAV-BDNF, średnia średnica SV utrzymana była na poziomie kontrolnym w obu mięśniach. Zwiększona liczba dużych pęcherzyków w NMJ TA po terapii AAV-BDNF może wskazywać na mechanizm prowadzący do utrzymania rozmiaru SV, i sugeruje modulowanie efektywności uwalniania neuroprzekaznika.



Rysunek 17W. Porównanie rozkładu i gęstości występowania pęcherzyków synaptycznych w zakończeniach nerwowych motoneuronów pomiędzy grupami eksperymentalnymi.

(A) Reprezentatywne mikrografie TEM złączy nerwowo-mięśniowych (NMJ) z zachowanymi kontaktami synaptycznymi z mięśnia Sol u szczurów z grup Kontrolnej, SCT-PBS i SCT-BDNF. Skala-500 nm. SV-pęcherzyki synaptyczne; PM-błona postsynaptyczna. (B) Zagęszczenie pęcherzyków w zakończeniach synaptycznych u szczurów z grup Kontrolnej (8–10 zdjęć), SCT-PBS (5–8 zdjęć) i SCT-BDNF (8–9 zdjęć). Dolny panel pokazuje profile rozkładu częstości występowania SV o różnych średnicach [nm] w tych samych obrazach złączy TA i Sol MN, które analizowano w (A). Dane pochodzą z 1910 zmierzonych pęcherzyków. (C) Porównanie liczby stref aktywnych (AZ) przypadających na 1 μm błony presynaptycznej oraz szerokości szczeliny synaptycznej. Punkty prezentują dane z poszczególnych zdjęć z grup Kontrolnej (8–14 zdjęć), SCT-PBS (4–14 zdjęć) i SCT-BDNF (13–24 zdjęcia).

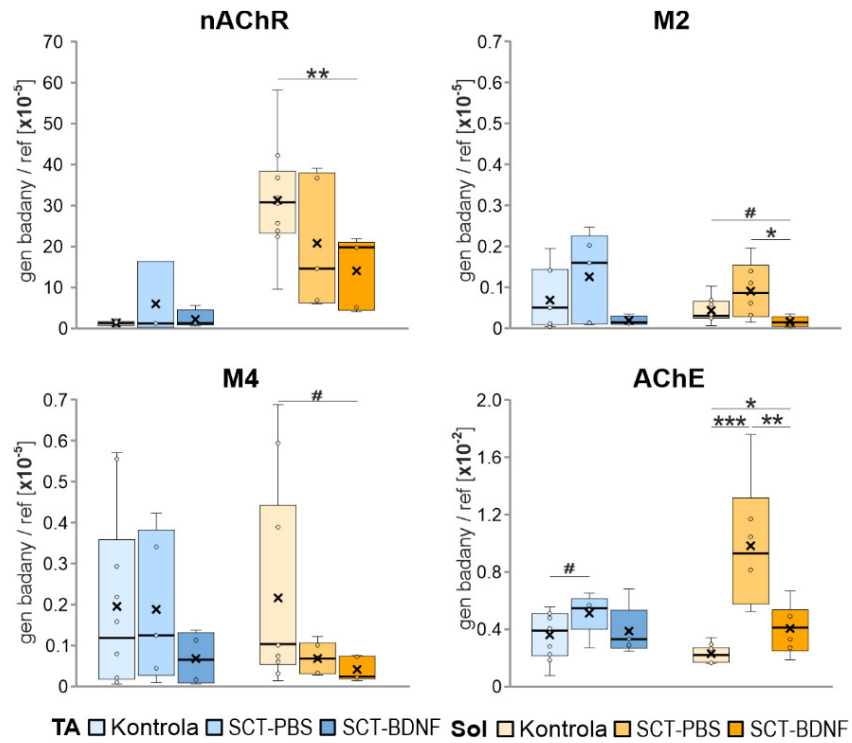
Szerokość szczeliny synaptycznej. Średnia szerokość szczeliny synaptycznej w grupie Kontrolnej wynosiła 44,83 nm (SD = 5,52) w złączach TA i 52,8 (SD = 5,73) w złączach Sol. W obu grupach zwierząt po spinalizacji odległość była porównywalna i wynosiła 51–52 w obu typach NMJ. Liczba aktywnych stref była porównywalna między grupami. A więc w subpopulacji złączy z zachowaną morfologią wszystkie badane parametry morfologiczne utrzymywały się w zakresie kontrolnym.

4.11 Wpływ iniekcji AAV-BDNF na ekspresję markerów neuroprzekątnictwa motoneuronów w mięśni

W celu zbadania, czy dordzeniowa iniekcja AAV-BDNF może przeciwdziałać zmianom jakie następują po urazie w sygnalizacji cholinergiczej w synapsach obwodowych przeprowadzono reakcje PCR w której oznaczono poziom ekspresji markerów pre- i postsynaptycznych, powiązanych z syntezą i degradowaniem acetylocholiny (ACh) oraz z receptywnością mięśni na ACh (Ryc. 18W).

W kontrolnych mięśniach TA i Sol poziomy ekspresji mRNA enzymu acetylocholinoesterazy (AChE) były porównywalne. SCT spowodowało niewielki wzrost poziomu transkryptów AChE w mięśni TA i czterokrotny wzrost transkryptów w mięśni Sol. W grupie AAV-BDNF poziomy transkryptów AChE utrzymały się na poziomie wyników grupy Kontrolnej w obu mięśniach.

Ekspresja postsynaptycznych receptorów nikotynowych nAChR alfa 1, które odgrywają rolę w wiązaniu ACh i otwieraniu kanałów, była zróżnicowana, z dużo wyższą ekspresją w mięśniach Sol (proszę podać wartości i rozrzuty). Nie zaobserwowano znaczących zmian mRNA nAChR po SCT, natomiast nadekspresja BDNF spowodowała znaczne zmniejszenie ekspresji nAChR w mięśniach Sol. Ekspresja muskarynowych receptorów ACh M2 i M4 była niska i silnie skorelowana. W grupie SCT-PBS nie zaobserwowano znaczących zmian w poziomach transkryptów żadnego z receptorów, natomiast nadekspresja BDNF wpłynęła obniżająco na poziom transkryptów M2 w mięśni Sol, w pewnym stopniu przywracając ilościową relację między receptorami.



Rycina 18W. Wpływ SCT i nadekspresji BDNF na poziomy mRNA markerów przekąźnictwa cholinergicznego w tkankach mięśniowych. Wykresy przedstawiają wyniki uzyskane z od 9 szczurów z grupy Kontrolnej, 4-6 z SCT-PBS i 5-6 z SCT-BDNF. Zbadano ekspresję receptorów nikotynowych acetylocholinyl α1 (nAChR), podtypów receptorów muskarynowych (M2, M4, mAChRs) oraz enzymu acetylocholinoesterazy (AChE). Do oceny różnic między grupami eksperymentalnymi użyto testu U Manna-Whitneya (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

5. Dyskusja

W niniejszej dysertacji zastosowano terapię AAV-BDNF w celu pobudzenia układów neuronalnych rdzenia kręgowego zależnych od tej neurotrofiny i wspomaganie tą drogą powrotu funkcji lokomotorycznych po uszkodzeniu rdzenia. Terapia, którą zaplanowano na pierwsze 2 tygodnie po urazie, przyniosła znaczącą poprawę lokomocji u szczurów spinalizowanych, które bez wsparcia BDNF nie wykonują spontanicznych ruchów lokomocyjnych.

Wykazano szereg zmian wskazujących na różnice w odpowiedzi obwodów ruchowych mięśni zginacza (TA, przewaga włókien ‘szybkich’) i prostownika (Sol, przewaga włókien ‘wolnych’) stawu skokowego na uraz rdzenia kręgowego i na eksperymentalną terapię AAV-BDNF. Na podstawie analizy morfologii złącza nerwowo-mięśniowego 2 tygodnie po urazie wykazano większą podatność złączy nerwowo-mięśniowych mięśnia TA na SCT oraz brak odpowiedzi NMJ TA na terapię BDNF. W mięśniu Sol BDNF wpłynął na częściowe zachowanie integralności NMJ i mielinizacji proksymalnych odcinków nerwów. Te wyniki przyczyniają się do naszego zrozumienia regulacji aktywności mięśni wolnych i szybkich, wskazując na BDNF jako modulator sygnalizacji cholinergiczej z selektywnością docelową, co czyni go potencjalnie użytecznym w terapii skierowanej do wybranych pul neuronów ruchowych.

Skutkiem niepożądanym tak zaprojektowanej terapii był wzrost wrażliwości zwierząt na bodźce dotykowe. Ten efekt, choć nieodczuwany przez zwierzę w wybranym do badań modelu całkowitego przecięcia rdzenia, może być przeszkodą w zastosowaniu preparatu BDNF podawanego dordzeniowo w przypadku niepełnych uszkodzeń, które nie znoszą czucia, i wskazuje, że w potencjalnych terapiach z użyciem BDNF celowe będzie zmodyfikowanie sposobu wzbogacania sieci w tę neurotrofinę.

5.1 Poprawa zdolności lokomotorycznych w odpowiedzi na BDNF

Opisane badania jednoznacznie wskazują istotną poprawę funkcjonalną po całkowitym przecięciu rdzenia i dordzeniowej iniekcji AAV-BDNF. Na dużej liczbie zwierząt potwierdzono obserwacje z wcześniejszego doświadczenia chronicznego (Ziemlińska i in., 2014). Szczury z grupy SCT-BDNF wykonywały naprzemienne (alternacja) ruchy podobne do kroczenia, stawiając stopy na podszewie oraz podtrzymując masę ciała, bez stymulacji czuciowej ogona.

Trzeba brać pod uwagę, że mimo iż w niniejszej dysertacji badano tylko mięśnie stawu skokowego, to w miejscu iniekcji wektora znajdują się motoneurony innych mięśni kończyny

tylnej, w szczególności MN mięśnia biceps femoris (mięśnia dwugłowego uda), odpowiadającego za ruchomość w stawie kolanowym. Tak więc efekt w postaci poprawy funkcjonalnej wynika z nieselektywnego działania na różne grupy motoneuronów i mięśni szkieletowych kończyn.

5.2 Wpływ BDNF na przekąźnictwo bólowe

W licznych badaniach przedklinicznych, które oceniały zastosowanie BDNF w leczeniu uszkodzeń układu nerwowego, zaobserwowano negatywny efekt uboczny: zwiększoną wrażliwość na ból (Ding i in., 2015; Zhou i in., 2011; Zhou i in., 2021). Taka reakcja może prowadzić w klinice do nasilenia bólu neuropatycznego, który, jak definiuje Międzynarodowe Stowarzyszenie do Badań nad Bólem, jest bólem spowodowanym przez uszkodzenie lub chorobę somatosensorycznego układu nerwowego (Loeser & Treede, 2008). W niniejszej pracy wykazano, że nadekspresja BDNF istotnie obniża progi wycofywania łapy w odpowiedzi na stymulację włóknami von Freya, co wskazuje na obecność mechanizmów bólu neuropatycznego w izolowanej sieci połączeń przetrwałej części rdzenia kręgowego.

Mimo tych obserwacji, ważne jest podkreślenie, że potencjalna poprawa w zakresie ruchomości i funkcji układu nerwowego, nawet kosztem zwiększonej wrażliwości na ból, może stanowić wartościowy kompromis w kontekście ogólnego postępu w leczeniu uszkodzeń rdzenia kręgowego. Dodatkowo w tym doświadczeniu nadekspresja BDNF była bardzo wysoka. W przyszłości, precyzyjne dostosowanie dawki może pozwolić na zminimalizowanie negatywnych efektów, przy jednoczesnym zachowaniu korzyści terapeutycznych.

5.3 Różnice w ekspresji BDNF/TrkB/p75 między obwodami TA i Sol u zwierząt kontrolnych

W analizie prawidłowych poziomów ekspresji *in situ* transkryptów BDNF i TrkB/p75 w MN TA i Sol nie stwierdzono istotnych różnic między tymi grupami motoneuronów. W poprzednim badaniu przeprowadzonym przez nasz zespół, w którym zbadano poziomy transkryptów w MN wyciętych metodą laserowej mikrodysekcji wyższy poziom mRNA TrkB charakteryzował motoneurony mięśnia TA (Głowacka i in., 2022; Ji i in., 2022). Ten wynik sugerował, że wrażliwość MN TA na działanie ale też niedobór liganda jest większa niż MN Sol. Brak potwierdzenia tego wyniku w przypadku użycia fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* rodzi pytanie o ewentualne zanieczyszczenie próbek przy laserowej mikrodysekcji komórkami glejowymi i wskazuje potrzebę dodatkowych oznaczeń. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają obserwacje z doświadczenia przeprowadzonego przez Liem

i współpracowników metodą hybrydyzacji *in situ* (Liem i in., 2001). We wspomnianym badaniu również nie wykryto różnic w ekspresji mRNA TrkB i BDNF w neuronach ruchowych Sol i EDL (Extensor Digitorum Longus, fizjologicznego zginacza palców).

W złączach nerwowo-mięśniowych nie obserwowano różnic w ekspresji BDNF i obu receptorów, ekspresja utrzymywała się na niskim poziomie w obu typach mięśni, we wszystkich typach jąder komórkowych poddanych analizie metodą hybrydyzacji *in situ*. Jest to interesujące w świetle znacznie wyższego poziomu ekspresji BDNF w mięśniu Sol niż TA, jak wykazano w reakcji PCR na próbkach tkankowych. W doświadczeniu z użyciem hybrydyzacji *in situ* nie analizowano jąder komórek satelitarnych, endotelium naczyń oraz perycytów. Istnieje więc możliwość, że podwyższona ekspresja BDNF pochodzi z tych komórek.

Jak wspomniano w poprzednim akapicie, dopiero na poziomie tkanki mięśniowej opisane wyniki wskazują na zróżnicowanie obu obwodów pod względem zapotrzebowania i wydzielania neurotrofiny BDNF. Pomimo niskiego poziomu ekspresji BDNF w obu typach mięśni określanego za pomocą reakcji qRT-PCR, istniała między nimi różnica, że znacznie wyższą ekspresją BDNF w mięśniu Sol niż w TA. Podobnie, ekspresja innej neurotrofiny NT-3, bardziej związanej z obwodowym układem nerwowym i jej receptora TrkC była również znacząco wyższa w mięśniu Sol niż w TA. Te wyniki mogą odzwierciedlać wyższe zapotrzebowanie obwodu Sol na neurotrofiny, oraz większe wydzielanie BDNF jako miokiny do krwi (Matthews i in., 2009) i mogą być związane z funkcją mięśnia Sol, który jako mięsień antygravitacyjny jest aktywny w ciągu doby siedem razy dłużej niż mięsień TA (Hensbergen & Kernell, 1997). Uzyskane dane są zgodne z wynikami badań opisanymi przez Cefisa i współpracowników (Cefis i in., 2022). Badacze ci wykazali, że ekspresja BDNF i form ufosforylowanych receptorów TrkB była wyższa w mięśniu Sol niż w głowie przyśrodkowej mięśnia brzuchatego łydki (Gastrocnemius Medialis, który zawiera więcej włókien szybkokurczliwych niż Sol). Co ciekawe, równocześnie poziom ekspresji BDNF był wyższy we włóknach typu II, które przeważają w mięśniach szybkokurczliwych. Autor stawia hipotezę, że wyższa ekspresja BDNF w mięśniu Sol może wcale nie być związana głównie z jej ekspresją w miocytach. BDNF ekspresyjną również komórki śródbłonka, a te komórki występują bardzo licznie w Sol, ze względu na bogatą sieć naczyń włosowatych w tym mięśniu (Cefis i in., 2022). Dodatkowo, komórki satelitarne, będące rodzajem komórek macierzystych między błoną podstawną a sarkolemmą, także ekspresyjną BDNF (Mousavi & Jasmin, 2006). Badania liczebności komórek satelitarnych w mięśniach wykazały, że średnia liczba komórek

satelitarnych na mm³ tkanki mięśniowej wynosi 4900 dla mięśnia Sol i tylko 900 dla TA (Schmalbruch & Hellhammer, 1977).

5.4 Różnice w ekspresji BDNF/TrkB/p75 między obwodami TA i Sol u zwierząt spinalizowanych

Analiza ekspresji genów metodą hybrydyzacji *in situ* nie wykazała istotnych różnic w poziomach transkryptów BDNF między grupami SCT i grupą kontrolną w motoneuronach TA i Sol. Wynik ten jest zgodny z badaniami wskazującymi, że niski poziom mRNA BDNF obserwowany w kontrolnych neuronach ruchowych nie ulegał zmianom po SCT (Głowacka i in., 2022; Joseph i in., 2012; Keeler i in., 2012).

Przeciwnie do ekspresji BDNF, poziom transkryptów receptorów o wysokim powinowactwie TrkB, oceniany przy użyciu hybrydyzacji *in situ* uległ istotnemu obniżeniu po urazie rdzenia w obu typach MN. To ciekawy wynik w świetle braku zmian ekspresji TrkB badanego w całych segmentach lędźwiowych metodą qRT-PCR. Stoi to również w częściowej sprzeczności z wcześniejszymi wynikami naszego zespołu: badania z użyciem laserowej mikrodyssekcji pokazały, że poziom mRNA TrkB ulegał znacznemu obniżeniu po SCT w motoneuronach TA, podczas gdy w motoneuronach Sol pozostawał na poziomie kontrolnym (Głowacka i in., 2022). Limitacja metody, podobnie jak opisano w poprzednim podrozdziale, wskazuje ciekawy kierunek badań i rodzi pytanie o udział komórek glejowych w tym wyniku.

Na poziomie złączy nerwowo-mięśniowych, badanych metodą hybrydyzacji *in situ*, zauważono istotny wzrost ekspresji BDNF w jądrach podzłączowych mięśnia TA po urazie, natomiast w tkance mięśniowej, ocenianej metodą qRT-PCR, całkowite przecięcie rdzenia wpłynęło na poziom ekspresji BDNF jedynie w mięśniu Sol, znacząco go obniżając. Biorąc pod uwagę zależną od aktywności ekspresję BDNF, wyniki te są zgodne z różnym stanem tych dwóch mięśni u szczurów sparalizowanych. W mięśniu prostownika stawu skokowego, który jest stale rozluźniony, gdy zwierzę ciągnie łapy po stronie grzbietowej, efekt nieużywania jest wyraźniejszy (Skup i in., 2012). Motoneurony tego mięśnia nie otrzymują typowej informacji proprioceptywnej, która zazwyczaj pochodzi z rozciągniętego mięśnia podczas podtrzymywania ciężaru ciała.

5.5 Różnice w ekspresji BDNF/TrkB/p75 między obwodami TA i Sol u zwierząt z grupy AAV-BDNF

Istnieje bardzo niewiele badań opisujących neuronalną ekspresję BDNF po dordzeniowej iniekcji AAV-BDNF. Wyniki opisane w niniejszej dysertacji zestawione z wcześniejszymi

badaniami naszej grupy (Ziemińska i in., 2014) ukazują rozprzestrzenianie się wektora wraz z upływającym czasem od iniekcji. Sześć tygodni po urazie egzogenne białko BDNF znajdowało się w dużych neuronach rogu brzuszno poziomych L1 i L2, podczas gdy w niższych segmentach lędźwiowych znikoma liczba neuronów ekspresywnała transgen, natomiast wykryto liczne transfekowane wypustki wokół komórek. Obserwacja ta jest zgodna również z doświadczeniem Boyce i współpracowników, opisującym zmiany w tym samym punkcie czasowym po podaniu AAV-BDNF. Transfekowane neurony ruchowe były widoczne na poziomie rdzenia kręgowego L2, ale w segmencie L5 obserwowano tylko pozytywne włókna (Boyce i in., 2012). W niniejszej pracy opisano punkt czasowy dwa tygodnie po SCT i iniekcji, a egzogenne białko było wykrywane w dużych neuronach poziomu L1, w mniejszych neuronach poziomu L2, natomiast w dolnych segmentach lędźwiowych obserwowano ekspresję rBDNF tylko we włóknach nerwowych.

Po SCT i dordzeniowym podaniu AAV-BDNF poziom ekspresji BDNF i TrkB/p75, oceniany metodą hybrydyzacji *in situ*, był niezależny od typu motoneuronu. Poziom ekspresji neurotrofiny BDNF nie ulegał zmianie, natomiast poziom receptorów ulegał podwyższeniu zarówno w przypadku MN TA jak i Sol. W przypadku złączy nerwowo-mięśniowych mięśnie obu typów również odpowiadały podobnie, wzrostem ekspresji BDNF oraz receptora TrkB w jądrach podłączowych.

Po podaniu AAV-BDNF, poziom mRNA BDNF w mięśniu Sol, oceniany metodą qRT-PCR, wzrósł w porównaniu do grupy spinalizowanej i był bliski poziomowi kontrolnemu. W mięśniu TA nie zaobserwowano zmian. Jest to zgodne z wynikami badania dotyczącego wpływu forsownego biegu, który powoduje zależną od aktywności podwyższoną ekspresję BDNF. Wolne włókna mięśniowe cechuje znacznie podwyższony poziom mRNA BDNF w odpowiedzi na trening, natomiast poziom mRNA we włóknach typu szybkiego nie ulega zmianie (Cuppini i in., 2007; Jiménez-Maldonado i in., 2016; Ogborn & Gardiner, 2010).

Mechanizm powstawania zwiększonej ekspresji BDNF w mięśniu Sol wymaga dalszych badań. Można przypuszczać, że nie jest to efekt aksonalnego transportu mRNA transgenu z rdzenia kręgowego, ponieważ nie zaobserwowano żadnego wzrostu ekspresji BDNF w motoneuronach mięśnia Sol, a dodatkowo są one położone w większej odległości od miejsca iniekcji niż MN TA. Prawdopodobnie BDNF ulega ekspresji we włóknach mięśniowych podczas poprawy funkcjonalnej, w sposób zależny od pobudzenia (Gómez-Pinilla i in., 2002; Hurtado i in., 2017; Lu, 2003; Matthews i in., 2009). Druga możliwość to rozprzestrzenianie się AAV-BDNF przez układ krwionośny. Ekspresję BDNF w naczyniach krwionośnych zaobserwował Cefis i współpracownicy (Cefis i in., 2022). Podobną sytuację należy rozważyć

w opisanym w tej pracy modelu eksperymentalnym, ponieważ użyty wektor wirusowy pod promotorem synapsyny, obecnej w neuronach, potencjalnie może ulegać ekspresji również w wykazujących obecność synapsyny-1 komórkach nabłonkowych naczyń krwionośnych (Bustos i in., 2001).

5.6 Brak negatywnej regulacji receptora TrkB w warunkach nadekspresji BDNF

Dordzeniowa iniekcja AAV-BDNF prowadziła do silnej nadekspresji BDNF w segmentach L3–L6 rdzenia kręgowego. Ogólna zdolność układu rdzeniowego do odpowiedzi na terapię została potwierdzona przez segmentalną analizę ekspresji genu TrkB, która wykazała zachowaną receptywność na BDNF. Nie zauważono również obniżenia segmentalnego poziomu ekspresji TrkB po leczeniu AAV-BDNF, które obserwowano w doświadczeniu chronicznym naszego zespołu, po pięciu tygodniach od SCT (Ziemlińska i in., 2014).

Brak potencjalnie spodziewanego obniżenia ekspresji receptora o wysokim powinowactwie może wynikać z faktu, że motoneurony w tych segmentach nie ekspresyjają egzogenego białka, a poziom endogenego BDNF osiąga w komórce wartości kontrolne. Negatywna regulacja może występować bliżej miejsca iniekcji, gdzie motoneurony wytwarzają BDNF w komórce, a receptor może być tłumiony i internalizowany, jednak te segmenty nie były analizowane w niniejszej dysertacji.

Na poziomie L4 i L5, gdzie obserwuje się jedynie włókna transdukowanych neuronów otaczające MN, zaobserwowano wzrost poziomu receptora TrkB w MN. Tutaj może występować mechanizm pozytywnego sprzężenia związany z wydzielaniem neurotrofiny przez włókna. Wynika to z faktu, że BDNF aktywuje wiele czynników transkrypcyjnych, wśród których jeden to CREB, który, jak udowodniono, powoduje wzrost poziomu receptora TrkB (Deogracias i in., 2004; Finkbeiner i in., 1997).

5.7 Wzrost ekspresji p75 w rdzeniu kręgowym i złączu nerwowo-mięśniowym w warunkach nadekspresji BDNF

W odpowiedzi na iniekcję AAV-BDNF doszło do znacznego podwyższenia poziomu ekspresji receptora BDNF o niskim powinowactwie - p75 oznaczanego metodą qRT-PCR w dolnych segmentach lędźwiowych rdzenia, podobny trend obserwowano również w motoneuronach oraz wzrost ekspresji receptora w jądrach podłączowych miocytów. Jest to interesujące zjawisko, które choć może wydawać się niepokojące, nie musi oznaczać negatywnego wpływu.

Jedną z pozytywnych konsekwencji podwyższonego poziomu receptora p75 u szczurów poddanych dordzeniowej iniekcji AAV-BDNF może być przeciwdziałanie demielinizacji włókien. Tolwani i współpracownicy opisali wzrost produkcji mieliny wywołany przez przez aktywowany ligandem receptor p75 (Tolwani i in., 2004). Wykorzystując myszy transgeniczne z nadekspresją BDNF, badacze ci analizowali długoterminowy wpływ BDNF na proces mielinizacji w obwodowym układzie nerwowym *in vivo*. Podwyższenie poziomu BDNF w myszach transgenicznych spowodowało wzrost zarówno tempa, jak i zakresu mielinizacji. To odkrycie pokrywa się z wynikami zaprezentowanymi w niniejszej dysertacji i otwiera nowe perspektywy w zrozumieniu mechanizmów regulacji mielinizacji oraz wskazuje na potencjalne terapeutyczne zastosowanie BDNF w leczeniu chorób demielinizacyjnych.

Opisany został również pozytywny wpływ receptora p75 na przeżywalność komórek nerwowych i aktywację endogennych mechanizmów naprawczych w modelu kompresyjnego uszkodzenia rdzenia kręgowego. Zwierzęta typu dzikiego wykazały znacznie wyższą przeżywalność komórek w miejscu uszkodzenia i lepszą regenerację funkcjonalną 8 tygodni po urazie w porównaniu z myszami pozbawionymi receptora p75 (Chu i in., 2007).

5.8 Wpływ BDNF na neuroprzekaznictwo w złączy nerwowo-mięśniowym

Spadek ekspresji receptorów nikotynowych acetylocholiny w mięśniu Sol, oceniany metodą qRT-PCR, korelował ze spadkiem w objętości ich sygnału immunofluorescencyjnego w złączach nerwowo-mięśniowych mięśnia Sol. Terapia AAV-BDNF nie miała wpływu na ekspresję tych receptorów w mięśniach. Te wyniki są zaskakujące, ponieważ w kontekście zmienionej zasobności w neurotrofiny w mięśniach, spodziewano się pewnych zmian we frakcji receptorów nikotynowych zachowujących zdolność do wiązania ligandów.

Nie stwierdzono wpływu uszkodzenia ani terapii za pomocą AAV-BDNF na pulę pęcherzyków synaptycznych, szerokość szczeliny synaptycznej oraz liczbę stref aktywnych analizowanych z użyciem mikroskopii elektronowej. Natomiast oznaczenia metodą immunofluorescencji wykazały ogromne spadki w objętości znakowania receptora pęcherzykowego acetylocholiny w obu mięśniach. Należy podkreślić, że prezentowany zestaw danych z mikroskopii elektronowej odzwierciedla stan w subpopulacji złączy o zachowanej integralności, gdyż złącza wykazujące rozpad struktur presynaptycznych i fragmentację błony były wykluczone z pomiarów. Również rozbieżność w wynikach dotyczących poziomu białka VAcHT i ilością SVs może być z tym związana. Inną kwestią, którą należy wziąć pod uwagę

jest obecność niefunkcjonalnych lub pustych pęcherzyków synaptycznych u szczurów spinalizowanych. Badania Rodriguesa i współpracowników wskazują, że liczba pęcherzyków w NMJ u myszy z 70% redukcją ekspresji VAChT, była taka sama w porównaniu do myszy typu dzikiego, a jedynie kształt i rozmieszczenie SVs w odpowiedzi na stymulację elektryczną były inne (Rodrigues i in., 2013).

Wyniki przedstawione w dysertacji wskazują na możliwy mechanizm przyczyniający się do regulacji uwalniania ACh przez BDNF. W mięśniach TA i Sol, leczenie AAV-BDNF doprowadziło do zmniejszenia ekspresji receptorów M2 mAChR. Ponieważ presynaptyczne receptory M2 mAChR zostały opisane jako hamujące uwalnianie ACh (Oliveira i in., 2002; Slutsky i in., 2001), ich zmniejszona ekspresja, jeśli idzie w parze ze zmianą ich ilości w błonie - mogła skutkować zwiększonym uwalnianiem ACh. Efektywność przekazywania ACh mogła być dodatkowo zwiększona w mięśniu Sol, gdzie BDNF znormalizował poziom transkryptu AChE, który był początkowo podniesiony po SCT. Mniejsza dostępność AChE po podaniu AAV-BDNF mogła prowadzić do wydłużenia czasu trwania cząsteczek ACh w szczelinie synaptycznej, co kompensowało spadek transkryptów nAChR i w konsekwencji umożliwiło pobudzenie mięśnia.

5.9 Zagadnienie korelacji pomiędzy zachowaniem osłonki mielinowej a poziomem ekspresji markerów mieliny

Badania wykazały, że BDNF wspomaga syntezę białek mieliny i proces mielinizacji zarówno w centralnym, jak i obwodowym układzie nerwowym (Fletcher i in., 2018; Fulmer i in., 2014; Tolwani i in., 2004). Działanie to realizowane jest poprzez aktywację białka Rac1 w połączeniu aksonowo-glejiowym, co jest kluczowym etapem mielinizacji (Tep i in., 2012). Wyniki te sugerują, że BDNF może poprawiać stabilność białek mieliny, potencjalnie przyczyniając się do utrzymania i naprawy osłonek mielinowych w układzie nerwowym. W niniejszej rozprawie, po reakcji immunofluorescencyjnej zauważono zachowane osłonki mielinowe w grupie BDNF. Z drugiej strony reakcja qRT-PCR pokazała duży spadek transkryptów genów S100b i MBP po przecięciu, który pozostawał bez zmian w grupie BDNF. Można spekulować, że BDNF wpływa na stabilność białek mieliny, nie wpływając bezpośrednio na obrót transkryptów, ale trzeba wziąć pod uwagę bardzo niski poziom ekspresji i rozdzielczość metody – być może transkryptów było w próbce zbyt mało aby wykryć różnicę.

Obserwowany spadek poziomów RNA S100b w obu mięśniach można również interpretować jako wynik opisywanego w chorobach motoneuronów odróżnicowania komórek Schwanna (Arthur-Farraj i in., 2012; Neve i in., 2016). Fenotyp, który uległ odróżnicowaniu

nie ekspresuje S100b, co wykazano w eksperymentach *in vitro* (Liu i in., 2015). Biorąc pod uwagę znormalizowaną ekspresję receptora M2 w mięśniu Sol po terapii BDNF, a także w świetle ostatnich odkryć, że receptor M2 jest kluczowy dla ‘przełączania’ komórek Schwanna na fenotyp mielinizujący (Botticelli i in., 2022; Piovesana i in., 2020), nasuwa się hipoteza, że leczenie BDNF sprzyja różnicowaniu do komórek regeneracyjnych, a nie mielinizujących. Udział w zachowaniu struktury złącza, które charakteryzuje ten fenotyp komórek, częściowo tłumaczyłoby większą liczbę złącz zachowujących kontakt pre- i postsynaptyczny w grupie AAV-BDNF w mięśniu Sol.

5.10 Przyczyny mniejszej reprezentacji wyznakowanych motoneuronów oraz złączy nerwowo-mięśniowych po spinalizacji

Zarówno w przypadku motoneuronów jak i złączy nerwowo-mięśniowych liczba zbadanych próbek na grupę była mniejsza dla grupy SCT-PBS, w szczególności dla obwodu mięśnia Sol. Było tak w każdej opisywanej analizie. Odnotowano w protokołach, że u zwierząt po przecięciu rdzenia bardzo trudno było znaleźć dobrze zachowane złącze do analizy z użyciem mikroskopii elektronowej. W rejonie złączy wyznakowanych bungenotoksyną na etapie przygotowania preparatu TEM widziano 1-3 złącza w polu widzenia, a w przypadku mięśni kontrolnych i zwierząt SCT-BDNF ta liczba wynosiła 5-10. W wypadku NMJ liczba połączeń po przecięciu rdzenia zgodnie z literaturą maleje, ze względu na postępującą atrofię, szczególnie silną w przypadku mięśnia Sol, który traci 60% masy w ciągu pierwszych 10 dni (Dupont-Versteegden i in., 1998). Dreyer i współpracownicy udowodnili że atrofia mięśni indukowana paraplegią u szczurów wiąże się z ogólnym obniżeniem aktywności szlaku sygnalizacyjnego mTOR (Dreyer i in., 2008). Ten proces może wskazywać na mechanizm którego skutkiem jest zachowanie połączeń w przypadku grupy AAV-BDNF, w której obserwowano podwyższoną ekspresję tej neurotrofiny w mięśniu Sol.

W przypadku motoneuronów powód tej dysproporcji jest prawdopodobnie inny. Zgodnie z analizą przeprowadzoną w naszym zespole z wykorzystaniem techniki laserowej mikrodysekcji motoneuronów, liczba wyciętych komórek nie różniła się między grupami (Benjun Ji, dane niepublikowane). Efekt który zauważono w przypadku opisanych w niniejszej dysertacji wyników jest związany z procedurą RNAScope, która jest dość inwazyjna dla tkanki, głównie ze względu na wielokrotne płukania w silnym detergencie i trawienie proteazą. Zaobserwowano puste miejsca po motoneuronach po procedurze. Być może neurony w grupie SCT-PBS ulegają większemu obkurczeniu i/lub sieci perineuronalne ulegają większemu rozluźnieniu niż w innych grupach.

5.11 Uzyskane wyniki widziane w aspekcie odległości od miejsca iniekcji

Analizując powyższe wyniki trzeba wziąć pod uwagę, że motoneurony mięśnia TA były położone bliżej miejsca iniekcji w porównaniu z motoneuronami Sol, większe było tym samym prawdopodobieństwo transfekcji neuronalnej MN TA przez AAV-BDNF oraz więcej transfekowanych wypustek interneuronów docierało do tego poziomu (Han i in., 2019; Mohan i in., 2014). Zaobserwowane tworzenie aglomeratów mRNA dla p75 w subpopulacji motoneuronów TA, nieobserwowane w przypadku motoneuronów mięśnia Sol może być związane z dynamiką transportu wektora. W związku z tym należałoby zweryfikować czy w późniejszym okresie pooperacyjnym byłyby one zauważalne w MN mięśnia Sol. Biorąc pod uwagę gorzej wyrażony wpływ AAV-BDNF na stan motoneuronu TA, może być to związane z pojawiającymi się w doświadczeniu chronicznymi objawami niepożądanymi w postaci drgawek i ruchów klonicznych (Ziemlińska i in., 2014). Podwyższona aktywność p75 została powiązana z podobnymi objawami neuropatologicznymi obserwowanymi w chorobie Huntingtona (HD) (Simmons i in., 2016). Zaburzona sygnalizacja p75 przyczynia się do deficytu w sygnalizacji BDNF, a p75 został zidentyfikowany jako potencjalny cel terapeutyczny dla HD. Modulacja tego receptora wykazała obiecujące wyniki w zmniejszaniu objawów HD w modelu mysim. (Plotkin & Surmeier, 2014).

5.12 Ograniczenia metodologiczne pracy i proponowany kierunek badań

Jednym z kluczowych ograniczeń metodologicznych w niniejszej dysertacji jest brak precyzyjnego rozróżnienia typów włókien mięśniowych. Podjęto próby znakowania metodą immunofluorescencji różnych typów łańcuchów miozyny, ale nie przyniosły one sukcesu. Chociaż wiadomo, że mięsień TA składa się głównie z włókien szybkokurczliwych, a Sol z wolnokurczliwych, to dokładniejsze rozróżnienie tych typów mogłoby dostarczyć istotnych informacji. Znaczne rozbieżności w wielu pomiarach mogą wynikać właśnie z niewystarczającej specyfikacji rodzajów włókien.

Wyniki przedstawione w tej pracy otwierają szereg nowych, obiecujących kierunków badawczych. Po pierwsze, istotne byłoby przeprowadzenie analizy ekspresji genów we włóknach mięśniowych różnego typu. Ponadto, warte uwagi jest badanie odpowiedzi komórek glejowych w tym modelu doświadczalnym. Kolejnym istotnym kierunkiem jest zbadanie poziomu markerów neurotroficznych na poziomie białek, czego nie zrobiono ze

względu na niewystarczającą ilość materiału tkankowego. Szczególnie kluczowe wydaje się być oznaczenie stopnia aktywacji receptorów TrkB i p75. Badanie tych aspektów może nie tylko wzbogacić naszą wiedzę o złożonych interakcjach między włóknami mięśniowymi a układem nerwowym, ale także otworzyć drogę do nowych terapii w leczeniu zaburzeń neurologicznych i mięśniowych.

6. WNIOSKI KOŃCOWE

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie przynoszą potwierdzenie potencjału terapeutycznego BDNF, osiągniętego za pomocą wszczepu dordzeniowego AAV-BDNF, do osiągnięcia poprawy funkcjonalnej po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego (Ziemlińska i in., 2014). Jednocześnie zwracają uwagę na konieczność monitorowania w dalszych badaniach pojawiania się bólu neuropatycznego. Zaproponowano kilka mechanizmów mających wpływ na poprawę funkcjonalną u zwierząt, które otrzymały dordzeniową iniekcję AAV-BDNF:

- **Przywrócenie receptywności motoneuronów na BDNF.** Dwa tygodnie po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego następuje znaczące zmniejszenie się ekspresji mRNA TrkB w grupach MN mięśni tylnych kończyn, Sol i TA, operujących w stawie skokowym. Egzogenne białko BDNF, obecne w neuronach górnych odcinków lędźwiowych i włóknach przenikających górne i dolne odcinki lędźwiowe, powoduje zwiększenie ekspresji TrkB w obu grupach MN. Prowadzi również do przywrócenia dostępności transkryptów TrkB w cytoplazmie MN.

Zidentyfikowane rejony działania rekombinowanego BDNF sugerują, że komórkami docelowymi dla tego białka są zarówno neurony leżące w obrębie centralnego generatora lokomocji, jak też egzekwujące skurcz mięśni motoneurony dolnych odcinków lędźwiowych.

- **Podwyższenie ekspresji BDNF oraz TrkB w jądrach podłączowych NMJ** może wskazywać na zwiększoną aktywność troficzną mięśni i ich oddziaływanie ogólnoustrojowe, tym samym przyczyniać się do zachowania integralności złącza nerwowo-mięśniowego.
- **Wykazany hamujący wpływ BDNF na ekspresję receptorów muskarynowych M2 i acetylocholinoesterazy AChE w NMJ** mogą wskazywać na zwiększenie dostępności ACh w synapsie poprzez zwiększenie wyrzutu acetylocholiny z pęcherzyków synaptycznych i zmniejszenie jej enzymatycznej degradacji.
- **Nieprawidłowe nagromadzenie się transkryptów receptora p75** zaobserwowane w licznych MN TA może być rozpatrywane w kontekście specyficznej dla MN TA regulacji sygnału troficznego; w celu zinterpretowania tego wyniku wymagane są dalsze badania.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Ahuja, P., Ng, C. F., Pang, B. P. S., Chan, W. S., Tse, M. C. L., Bi, X., . . . Chan, C. B. (2022). Muscle-generated BDNF (brain derived neurotrophic factor) maintains mitochondrial quality control in female mice. *Autophagy*, *18*(6), 1367-1384. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1985257>
2. Alaimo, M. A., Smith, J. L., Roy, R. R., & Edgerton, V. R. (1984). EMG activity of slow and fast ankle extensors following spinal cord transection. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, *56*(6), 1608-1613. <https://doi.org/10.1152/jappl.1984.56.6.1608>
3. Alonso, M., Medina, J. H., & Pozzo-Miller, L. (2004). ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem*, *11*(2), 172-178. <https://doi.org/10.1101/lm.67804>
4. Anastasia, A., Deinhardt, K., Chao, M. V., Will, N. E., Irmady, K., Lee, F. S., . . . Bracken, C. (2013). Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nat Commun*, *4*, 2490. <https://doi.org/10.1038/ncomms3490>
5. Antri, M., Mouffle, C., Orsal, D., & Barthe, J. Y. (2003). 5-HT1A receptors are involved in short- and long-term processes responsible for 5-HT-induced locomotor function recovery in chronic spinal rat. *Eur J Neurosci*, *18*(7), 1963-1972. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02916.x>
6. Antri, M., Orsal, D., & Barthe, J. Y. (2002). Locomotor recovery in the chronic spinal rat: effects of long-term treatment with a 5-HT2 agonist. *Eur J Neurosci*, *16*(3), 467-476. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02088.x>
7. Arthur-Farraj, P. J., Latouche, M., Wilton, D. K., Quintes, S., Chabrol, E., Banerjee, A., . . . Jessen, K. R. (2012). c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron*, *75*(4), 633-647. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.021>
8. Barbeau, H., & Rossignol, S. (1987). Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res*, *412*(1), 84-95. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91442-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91442-9)
9. Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, *1*(5), 549-553. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x>
10. Bastiaanse, C. M., Duysens, J., & Dietz, V. (2000). Modulation of cutaneous reflexes by load receptor input during human walking. *Exp Brain Res*, *135*(2), 189-198. <https://doi.org/10.1007/s002210000511>
11. Blight, A. R. (1983). Axonal physiology of chronic spinal cord injury in the cat: intracellular recording in vitro. *Neuroscience*, *10*(4), 1471-1486. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90128-8)
12. Botticelli, E., Salazar Intriago, M. S., Piovesana, R., & Tata, A. M. (2022). Analysis of Signal Transduction Pathways Downstream M2 Receptor Activation: Effects on Schwann Cell Migration and Morphology. *Life (Basel)*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/life12020211>
13. Boulanger, L. M., & Poo, M. M. (1999). Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci*, *2*(4), 346-351. <https://doi.org/10.1038/7258>
14. Boyce, V. S., Park, J., Gage, F. H., & Mendell, L. M. (2012). Differential effects of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on hindlimb function in paraplegic rats. *Eur J Neurosci*, *35*(2), 221-232. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07950.x>
15. Bresnahan, J. C., King, J. S., Martin, G. F., & Yashon, D. (1976). A neuroanatomical analysis of spinal cord injury in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neurol Sci*, *28*(4), 521-542. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(76\)90122-2](https://doi.org/10.1016/0022-510x(76)90122-2)
16. Bronfman, F. C., & Fainzilber, M. (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep*, *5*(9), 867-871. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400219>
17. Brooke, M. H., & Kaiser, K. K. (1970). Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem*, *18*(9), 670-672. <https://doi.org/10.1177/18.9.670>

18. Burns, A. S., Jawaid, S., Zhong, H., Yoshihara, H., Bhagat, S., Murray, M., . . . Son, Y. J. (2007). Paralysis elicited by spinal cord injury evokes selective disassembly of neuromuscular synapses with and without terminal sprouting in ankle flexors of the adult rat. *J Comp Neurol*, *500*(1), 116-133. <https://doi.org/10.1002/cne.21143>
19. Bustos, R., Kolen, E. R., Braiterman, L., Baines, A. J., Gorelick, F. S., & Hubbard, A. L. (2001). Synapsin I is expressed in epithelial cells: localization to a unique trans-Golgi compartment. *J Cell Sci*, *114*(Pt 20), 3695-3704. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.20.3695>
20. Castets, P., Ham, D. J., & Rüegg, M. A. (2020). The TOR Pathway at the Neuromuscular Junction: More Than a Metabolic Player? *Front Mol Neurosci*, *13*, 162. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00162>
21. Cefis, M., Chaney, R., Quirié, A., Santini, C., Marie, C., Garnier, P., & Prigent-Tessier, A. (2022). Endothelial cells are an important source of BDNF in rat skeletal muscle. *Sci Rep*, *12*(1), 311. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03740-8>
22. Celichowski, J., Grottel, K., & Bichler, E. (1996). Changes in fusion index during the fatigue test of fast motor units in the medical gastrocnemius muscle of the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *56*(4), 881-887.
23. Celichowski, J., Mrówczyński, W., Krutki, P., Górska, T., Majczyński, H., & Sławińska, U. (2006). Changes in contractile properties of motor units of the rat medial gastrocnemius muscle after spinal cord transection. *Exp Physiol*, *91*(5), 887-895. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.033076>
24. Center, N. S. C. I. S. (2013). *Traumatic Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance.*: Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham
25. Chin, S., He, H., & Gick, G. (1998). Selective induction of Na,K-ATPase alpha3 subunit mRNA abundance in cardiac myocytes by retinoic acid. *J Mol Cell Cardiol*, *30*(11), 2403-2410. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0800>
26. Chu, G. K., Yu, W., & Fehlings, M. G. (2007). The p75 neurotrophin receptor is essential for neuronal cell survival and improvement of functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience*, *148*(3), 668-682. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.05.028>
27. Clow, C., & Jasmin, B. J. (2010). Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol Biol Cell*, *21*(13), 2182-2190. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-02-0154>
28. Copray, S., Liem, R., Brouwer, N., Greenhaff, P., Habens, F., & Fernyhough, P. (2000). Contraction-induced muscle fiber damage is increased in soleus muscle of streptozotocin-diabetic rats and is associated with elevated expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in muscle fibers and activated satellite cells. *Exp Neurol*, *161*(2), 597-608. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7306>
29. Crozier, R. A., Bi, C., Han, Y. R., & Plummer, M. R. (2008). BDNF modulation of NMDA receptors is activity dependent. *J Neurophysiol*, *100*(6), 3264-3274. <https://doi.org/10.1152/jn.90418.2008>
30. Cuppini, R., Sartini, S., Agostini, D., Guescini, M., Ambrogini, P., Betti, M., . . . Stocchi, V. (2007). Bdnf expression in rat skeletal muscle after acute or repeated exercise. *Arch Ital Biol*, *145*(2), 99-110.
31. Delezie, J., Weihrauch, M., Maier, G., Tejero, R., Ham, D. J., Gill, J. F., . . . Handschin, C. (2019). BDNF is a mediator of glycolytic fiber-type specification in mouse skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(32), 16111-16120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900544116>
32. Deogracias, R., Espliguero, G., Iglesias, T., & Rodríguez-Peña, A. (2004). Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci*, *26*(3), 470-480. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.03.007>
33. Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M. S., Deogracias, R., . . . Barde, Y. A. (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol*, *196*(6), 775-788. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201038>
34. Ding, X., Cai, J., Li, S., Liu, X. D., Wan, Y., & Xing, G. G. (2015). BDNF contributes to the development of neuropathic pain by induction of spinal long-term potentiation via SHP2 associated GluN2B-containing NMDA receptors activation in rats with spinal nerve ligation. *Neurobiol Dis*, *73*, 428-451. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.025>

35. Dreyer, H. C., Glynn, E. L., Lujan, H. L., Fry, C. S., DiCarlo, S. E., & Rasmussen, B. B. (2008). Chronic paraplegia-induced muscle atrophy downregulates the mTOR/S6K1 signaling pathway. *J Appl Physiol* (1985), 104(1), 27-33. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00736.2007>
36. Dupont-Versteegden, E. E., Houlié, J. D., Gurley, C. M., & Peterson, C. A. (1998). Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol*, 275(4), C1124-1133. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.4.C1124>
37. Duregotti, E., Negro, S., Scorzeto, M., Zornetta, I., Dickinson, B. C., Chang, C. J., . . . Rigoni, M. (2015). Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(5), E497-505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417108112>
38. Edgerton, V. R., Leon, R. D., Harkema, S. J., Hodgson, J. A., London, N., Reinkensmeyer, D. J., . . . Tobin, A. (2001). Retraining the injured spinal cord. *J Physiol*, 533(Pt 1), 15-22. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0015b.x>
39. Eidelberg, E., Nguyen, L. H., Polich, R., & Walden, J. G. (1989). Transsynaptic degeneration of motoneurons caudal to spinal cord lesions. *Brain Res Bull*, 22(1), 39-45. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90125-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90125-1)
40. Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J., & Jaenisch, R. (1994). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*, 77(4), 503-512. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90213-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90213-5)
41. Festoff, B. W., Hantaï, D., Soria, J., Thomaïdis, A., & Soria, C. (1986). Plasminogen activator in mammalian skeletal muscle: characteristics of effect of denervation on urokinase-like and tissue activator. *J Cell Biol*, 103(4), 1415-1421. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.4.1415>
42. Finkbeiner, S., Tavazoie, S. F., Maloratsky, A., Jacobs, K. M., Harris, K. M., & Greenberg, M. E. (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19(5), 1031-1047. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80395-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80395-5)
43. Fletcher, J. L., Murray, S. S., & Xiao, J. (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Central Nervous System Myelination: A New Mechanism to Promote Myelin Plasticity and Repair. *Int J Mol Sci*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19124131>
44. Fulmer, C. G., VonDran, M. W., Stillman, A. A., Huang, Y., Hempstead, B. L., & Dreyfus, C. F. (2014). Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci*, 34(24), 8186-8196. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4267-13.2014>
45. Gajewska-Woźniak, O. (2017). Reduction in cholinergic and glutamatergic innervation of ankle extensor but not flexor motoneurons after spinalization calls for selective therapies. In (Vol. 13th International Congress Polish Neuroscience Society. Acta Neurobiol Exp (2017) 2017, 77: I-CXLII).
46. Gajewska-Woźniak, O., Skup, M., Kasicki, S., Ziemińska, E., & Czarkowska-Bauch, J. (2013). Enhancing proprioceptive input to motoneurons differentially affects expression of neurotrophin 3 and brain-derived neurotrophic factor in rat hoffmann-reflex circuitry. *PLoS One*, 8(6), e65937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065937>
47. Garcia, N., Tomàs, M., Santafe, M. M., Lanuza, M. A., Besalduch, N., & Tomàs, J. (2010). Localization of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, tropomyosin-related kinase b receptor, and p75 NTR receptor by high-resolution immunohistochemistry on the adult mouse neuromuscular junction. *J Peripher Nerv Syst*, 15(1), 40-49. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2010.00250.x>
48. Garcia, N., Tomàs, M., Santafé, M. M., Besalduch, N., Lanuza, M. A., & Tomàs, J. (2010). The interaction between tropomyosin-related kinase B receptors and presynaptic muscarinic receptors modulates transmitter release in adult rodent motor nerve terminals. *J Neurosci*, 30(49), 16514-16522. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2676-10.2010>
49. Gazula, V. R., Roberts, M., Luzzio, C., Jawad, A. F., & Kalb, R. G. (2004). Effects of limb exercise after spinal cord injury on motor neuron dendrite structure. *J Comp Neurol*, 476(2), 130-145. <https://doi.org/10.1002/cne.20204>

50. Gerrits, H. L., De Haan, A., Hopman, M. T., van Der Woude, L. H., Jones, D. A., & Sargeant, A. J. (1999). Contractile properties of the quadriceps muscle in individuals with spinal cord injury. *Muscle Nerve*, 22(9), 1249-1256. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199909\)22:9<1249::aid-mus13>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199909)22:9<1249::aid-mus13>3.0.co;2-n)
51. Giralt, A., Friedman, H. C., Caneda-Ferrón, B., Urbán, N., Moreno, E., Rubio, N., . . . Alberch, J. (2010). BDNF regulation under GFAP promoter provides engineered astrocytes as a new approach for long-term protection in Huntington's disease. *Gene Ther*, 17(10), 1294-1308. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.71>
52. Gomes, R. A., Hampton, C., El-Sabeawy, F., Sabo, S. L., & McAllister, A. K. (2006). The dynamic distribution of TrkB receptors before, during, and after synapse formation between cortical neurons. *J Neurosci*, 26(44), 11487-11500. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2364-06.2006>
53. Grycz, K., Głowacka, A., Ji, B., Czarkowska-Bauch, J., Gajewska-Woźniak, O., & Skup, M. (2019). Early pre- and postsynaptic decrease in glutamatergic and cholinergic signaling after spinalization is not modified when stimulating proprioceptive input to the ankle extensor α -motoneurons: Anatomical and neurochemical study. *PLoS One*, 14(9), e0222849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222849>
54. Grycz, K., Głowacka, A., Ji, B., Krzywdzińska, K., Charzyńska, A., Czarkowska-Bauch, J., . . . Skup, M. (2022). Regulation of perineuronal net components in the synaptic bouton vicinity on lumbar α -motoneurons in the rat after spinalization and locomotor training: New insights from spatio-temporal changes in gene, protein expression and WFA labeling. *Exp Neurol*, 354, 114098. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114098>
55. Gómez-Pinilla, F., Ying, Z., Opazo, P., Roy, R. R., & Edgerton, V. R. (2001). Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci*, 13(6), 1078-1084. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01484.x>
56. Gómez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R. R., Molteni, R., & Edgerton, V. R. (2002). Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol*, 88(5), 2187-2195. <https://doi.org/10.1152/jn.00152.2002>
57. Głowacka, A., Gajewska-Woźniak, O., Bernadzki, K., Czarkowska-Bauch, J., & Skup, M. (2017). BDNF overexpression partially protects synaptic machinery of neuromuscular junction from disintegration after complete spinal cord transection in adult rats: neurochemical and morphological changes evaluated by histochemical techniques. *Acta Neurobiologiae Experimentalis, Supplement*.
58. Głowacka, A., Ji, B., Szczepankiewicz, A. A., Skup, M., & Gajewska-Woźniak, O. (2022). BDNF Spinal Overexpression after Spinal Cord Injury Partially Protects Soleus Neuromuscular Junction from Disintegration, Increasing VAcHT and AChE Transcripts in Soleus but Not Tibialis Anterior Motoneurons. *Biomedicines*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112851>
59. Han, S., Li, D., Kou, Y., Fu, Z., & Yin, X. (2019). Multiple retrograde tracing methods compatible with 3DISCO clearing. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47(1), 4240-4247. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1687493>
60. Harward, S. C., Hedrick, N. G., Hall, C. E., Parra-Bueno, P., Milner, T. A., Pan, E., . . . McNamara, J. O. (2016). Autocrine BDNF-TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature*, 538(7623), 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature19766>
61. Hensbergen, E., & Kernell, D. (1997). Daily durations of spontaneous activity in cat's ankle muscles. *Exp Brain Res*, 115(2), 325-332. <https://doi.org/10.1007/pl00005701>
62. Hess, D. M., Scott, M. O., Potluri, S., Pitts, E. V., Cisterni, C., & Balice-Gordon, R. J. (2007). Localization of TrkC to Schwann cells and effects of neurotrophin-3 signaling at neuromuscular synapses. *J Comp Neurol*, 501(4), 465-482. <https://doi.org/10.1002/cne.21163>
63. Hu, B., Nikolakopoulou, A. M., & Cohen-Cory, S. (2005). BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. *Development*, 132(19), 4285-4298. <https://doi.org/10.1242/dev.02017>
64. Hurtado, E., Cilleros, V., Nadal, L., Simó, A., Obis, T., Garcia, N., . . . Tomàs, J. (2017). Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through

- Presynaptic cPKC α and cPKC β I. *Front Mol Neurosci*, 10, 147.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00147>
65. Jahromi, B. S., Robitaille, R., & Charlton, M. P. (1992). Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*, 8(6), 1069-1077.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90128-z](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90128-z)
 66. James, N. D., Bartus, K., Grist, J., Bennett, D. L., McMahon, S. B., & Bradbury, E. J. (2011). Conduction failure following spinal cord injury: functional and anatomical changes from acute to chronic stages. *J Neurosci*, 31(50), 18543-18555.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4306-11.2011>
 67. Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Potluri, S., Fu, X. Q., Luo, Z. G., . . . Lu, B. (2013). ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions. *J Neurosci*, 33(24), 9957-9962.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0163-13.2013>
 68. Ji, B., Wojtaś, B., & Skup, M. (2022). Molecular Identification of Pro-Excitogenic Receptor and Channel Phenotypes of the Deafferented Lumbar Motoneurons in the Early Phase after SCT in Rats. *Int J Mol Sci*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911133>
 69. Jiménez-Maldonado, A., Cerna-Cortés, J., Castro-Rodríguez, E. M., Montero, S. A., Muñoz, J., Rodríguez-Hernández, A., . . . De Álvarez-Buylla, E. R. (2016). Effects of moderate- and high-intensity chronic exercise on brain-derived neurotrophic factor expression in fast and slow muscles. *Muscle Nerve*, 53(3), 446-451. <https://doi.org/10.1002/mus.24757>
 70. Jones, R. A., Reich, C. D., Dissanayake, K. N., Kristmundsdottir, F., Findlater, G. S., Ribchester, R. R., . . . Gillingwater, T. H. (2016). NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction. *Open Biol*, 6(12). <https://doi.org/10.1098/rsob.160240>
 71. Joseph, M. S., Tillakaratne, N. J., & de Leon, R. D. (2012). Treadmill training stimulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in motor neurons of the lumbar spinal cord in spinally transected rats. *Neuroscience*, 224, 135-144.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.024>
 72. Just-Borràs, L., Cilleros-Mañé, V., Hurtado, E., Biondi, O., Charbonnier, F., Tomàs, M., . . . Lanuza, M. A. (2021). Running and Swimming Differently Adapt the BDNF/TrkB Pathway to a Slow Molecular Pattern at the NMJ. *Int J Mol Sci*, 22(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms22094577>
 73. Juurlink, B. H., & Paterson, P. G. (1998). Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med*, 21(4), 309-334. <https://doi.org/10.1080/10790268.1998.11719540>
 74. Kandel, E., Koester, J., & Mack, S. (2021). *Principles of Neural Science 6th ed.* Siegelbaum SA.
 75. Kang, H., Tian, L., Mikesh, M., Lichtman, J. W., & Thompson, W. J. (2014). Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *J Neurosci*, 34(18), 6323-6333.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4673-13.2014>
 76. Keeler, B. E., Liu, G., Siegfried, R. N., Zhukareva, V., Murray, M., & Houlié, J. D. (2012). Acute and prolonged hindlimb exercise elicits different gene expression in motoneurons than sensory neurons after spinal cord injury. *Brain Res*, 1438, 8-21.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.015>
 77. Kern, H., Hofer, C., Mödlin, M., Mayr, W., Vindigni, V., Zampieri, S., . . . Carraro, U. (2008). Stable muscle atrophy in long-term paraplegics with complete upper motor neuron lesion from 3- to 20-year SCI. *Spinal Cord*, 46(4), 293-304. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3102131>
 78. Kim, E. S., Kim, G. M., Lu, X., Hsu, C. Y., & Xu, X. M. (2002). Neural circuitry of the adult rat central nervous system after spinal cord injury: a study using fast blue and the Bartha strain of pseudorabies virus. *J Neurotrauma*, 19(6), 787-800.
<https://doi.org/10.1089/08977150260139156>
 79. Kim, J. H., Kim, H. J., Yu, D. H., Kweon, H. S., Huh, Y. H., & Kim, H. R. (2017). Changes in numbers and size of synaptic vesicles of cortical neurons induced by exposure to 835 MHz

- radiofrequency-electromagnetic field. *PLoS One*, 12(10), e0186416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186416>
80. Kitzman, P. (2005). Alteration in axial motoneuronal morphology in the spinal cord injured spastic rat. *Exp Neurol*, 192(1), 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.10.021>
 81. Kitzman, P. (2006). Changes in vesicular glutamate transporter 2, vesicular GABA transporter and vesicular acetylcholine transporter labeling of sacrocaudal motoneurons in the spastic rat. *Exp Neurol*, 197(2), 407-419. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.10.005>
 82. Kobayashi, N. R., Fan, D. P., Giehl, K. M., Bedard, A. M., Wiegand, S. J., & Tetzlaff, W. (1997). BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Talpha1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci*, 17(24), 9583-9595.
 83. Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*, 38(3), 579-593. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
 84. Koyama, R., Yamada, M. K., Fujisawa, S., Katoh-Semba, R., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 24(33), 7215-7224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2045-04.2004>
 85. Kraemer, B. R., Yoon, S. O., & Carter, B. D. (2014). The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. *Handb Exp Pharmacol*, 220, 121-164. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_6
 86. Kuzhandaivel, A., Nistri, A., Mazzone, G. L., & Mladinic, M. (2011). Molecular Mechanisms Underlying Cell Death in Spinal Networks in Relation to Locomotor Activity After Acute Injury in vitro. *Front Cell Neurosci*, 5, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00009>
 87. Kwo, S., Young, W., & Decrescito, V. (1989). Spinal cord sodium, potassium, calcium, and water concentration changes in rats after graded contusion injury. *J Neurotrauma*, 6(1), 13-24. <https://doi.org/10.1089/neu.1989.6.13>
 88. Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294(5548), 1945-1948. <https://doi.org/10.1126/science.1065057>
 89. Li, Y., & Bennett, D. J. (2003). Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J Neurophysiol*, 90(2), 857-869. <https://doi.org/10.1152/jn.00236.2003>
 90. Lian, J. D., al-Jumah, M., Cwik, V., & Brooke, M. H. (1998). Neurotrophic factors decrease the release of creatine kinase and prostaglandin E2 from metabolically stressed muscle. *Neuromuscul Disord*, 8(1), 7-13. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(97\)00122-3](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(97)00122-3)
 91. Liem, R. S., Brouwer, N., & Copray, J. C. (2001). Ultrastructural localisation of intramuscular expression of BDNF mRNA by silver-gold intensified non-radioactive in situ hybridisation. *Histochem Cell Biol*, 116(6), 545-551. <https://doi.org/10.1007/s00418-001-0349-z>
 92. Liu, X. Z., Xu, X. M., Hu, R., Du, C., Zhang, S. X., McDonald, J. W., . . . Choi, D. W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 17(14), 5395-5406. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05395.1997>
 93. Liu, Z., Jin, Y. Q., Chen, L., Wang, Y., Yang, X., Cheng, J., . . . Shen, Z. (2015). Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS One*, 10(4), e0123278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123278>
 94. Loeser, J. D., & Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137(3), 473-477. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>
 95. Lohof, A. M., Ip, N. Y., & Poo, M. M. (1993). Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*, 363(6427), 350-353. <https://doi.org/10.1038/363350a0>
 96. Love, F. M., & Thompson, W. J. (1998). Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration. *J Neurosci*, 18(22), 9376-9385. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-22-09376.1998>

97. Lowry, C. V., Kimmey, J. S., Felder, S., Chi, M. M., Kaiser, K. K., Passonneau, P. N., . . . Lowry, O. H. (1978). Enzyme patterns in single human muscle fibers. *J Biol Chem*, 253(22), 8269-8277.
98. Lu, B. (2003). Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron*, 39(5), 735-738. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00538-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00538-5)
99. Lu, V. B., Colmers, W. F., & Smith, P. A. (2009). Long-term effects of brain-derived neurotrophic factor on the frequency of inhibitory synaptic events in the rat superficial dorsal horn. *Neuroscience*, 161(4), 1135-1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.030>
100. Macias, M., Dwornik, A., Ziemlinska, E., Fehr, S., Schachner, M., Czarkowska-Bauch, J., & Skup, M. (2007). Locomotor exercise alters expression of pro-brain-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB in the spinal cord of adult rats. *Eur J Neurosci*, 25(8), 2425-2444. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05498.x>
101. Macias, M., Fehr, S., Dwornik, A., Sulejczak, D., Wiater, M., Czarkowska-Bauch, J., . . . Schachner, M. (2002). Exercise increases mRNA levels for adhesion molecules N-CAM and L1 correlating with BDNF response. *Neuroreport*, 13(18), 2527-2530. <https://doi.org/10.1097/00001756-200212200-00029>
102. Macias, M., Nowicka, D., Czupryn, A., Sulejczak, D., Skup, M., Skangiel-Kramska, J., & Czarkowska-Bauch, J. (2009). Exercise-induced motor improvement after complete spinal cord transection and its relation to expression of brain-derived neurotrophic factor and presynaptic markers. *BMC Neurosci*, 10, 144. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-144>
103. Mantilla, C. B., Stowe, J. M., Sieck, D. C., Ermilov, L. G., Greising, S. M., Zhang, C., . . . Sieck, G. C. (2014). TrkB kinase activity maintains synaptic function and structural integrity at adult neuromuscular junctions. *J Appl Physiol* (1985), 117(8), 910-920. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01386.2013>
104. Matthews, V. B., Aström, M. B., Chan, M. H., Bruce, C. R., Krabbe, K. S., Prelovsek, O., . . . Febbraio, M. A. (2009). Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*, 52(7), 1409-1418. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1364-1>
105. McAllister, A. K., Lo, D. C., & Katz, L. C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, 15(4), 791-803. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90171-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90171-x)
106. McMahon, S. B., Armanini, M. P., Ling, L. H., & Phillips, H. S. (1994). Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron*, 12(5), 1161-1171. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90323-9)
107. Merighi, A., Salio, C., Ghirri, A., Lossi, L., Ferrini, F., Betelli, C., & Bardoni, R. (2008). BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol*, 85(3), 297-317. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.004>
108. Mitsumoto, H., & Tszuzaka, K. (1999). Neurotrophic factors and neuromuscular disease: I. General comments, the neurotrophin family, and neuropoietic cytokines. *Muscle Nerve*, 22(8), 983-999. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199908\)22:8<983::aid-mus1>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199908)22:8<983::aid-mus1>3.0.co;2-v)
109. Mohan, R., Tosolini, A. P., & Morris, R. (2014). Targeting the motor end plates in the mouse hindlimb gives access to a greater number of spinal cord motor neurons: an approach to maximize retrograde transport. *Neuroscience*, 274, 318-330. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.045>
110. Mohan, R., Tosolini, A. P., & Morris, R. (2015). Intramuscular Injections Along the Motor End Plates: A Minimally Invasive Approach to Shuttle Tracers Directly into Motor Neurons. *J Vis Exp*(101), e52846. <https://doi.org/10.3791/52846>
111. Mousavi, K., & Jasmin, B. J. (2006). BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J Neurosci*, 26(21), 5739-5749. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5398-05.2006>
112. Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, 276(16), 12660-12666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008104200>

113. Murgia, M., Nogara, L., Baraldo, M., Reggiani, C., Mann, M., & Schiaffino, S. (2021). Protein profile of fiber types in human skeletal muscle: a single-fiber proteomics study. *Skeletal Muscle*, *11*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00279-0>
114. Nakajima, H., Uchida, K., Kobayashi, S., Inukai, T., Horiuchi, Y., Yayama, T., . . . Baba, H. (2007). Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene. *J Neurotrauma*, *24*(4), 703-712. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.0004>
115. Nashmi, R., & Fehlings, M. G. (2001). Changes in axonal physiology and morphology after chronic compressive injury of the rat thoracic spinal cord. *Neuroscience*, *104*(1), 235-251. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00009-4)
116. Neve, A., Trüb, J., Saxena, S., & Schümperli, D. (2016). Central and peripheral defects in motor units of the diaphragm of spinal muscular atrophy mice. *Mol Cell Neurosci*, *70*, 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.11.007>
117. Nishimune, H. (2012). Active zones of mammalian neuromuscular junctions: formation, density, and aging. *Ann N Y Acad Sci*, *1274*, 24-32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06836.x>
118. Numakawa, T., Yokomaku, D., Richards, M., Hori, H., Adachi, N., & Kunugi, H. (2010). Functional interactions between steroid hormones and neurotrophin BDNF. *World J Biol Chem*, *1*(5), 133-143. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i5.133>
119. Obis, T., Besalduch, N., Hurtado, E., Nadal, L., Santafe, M. M., Garcia, N., . . . Tomàs, J. (2015). The novel protein kinase C epsilon isoform at the adult neuromuscular synapse: location, regulation by synaptic activity-dependent muscle contraction through TrkB signaling and coupling to ACh release. *Mol Brain*, *8*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0098-x>
120. Ogborn, D. I., & Gardiner, P. F. (2010). Effects of exercise and muscle type on BDNF, NT-4/5, and TrkB expression in skeletal muscle. *Muscle Nerve*, *41*(3), 385-391. <https://doi.org/10.1002/mus.21503>
121. Oliveira, L., Timóteo, M. A., & Correia-de-Sá, P. (2002). Modulation by adenosine of both muscarinic M1-facilitation and M2-inhibition of [3H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Eur J Neurosci*, *15*(11), 1728-1736. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02020.x>
122. Ollivier-Lanvin, K., Lemay, M. A., Tessler, A., & Burns, A. S. (2009). Neuromuscular transmission failure and muscle fatigue in ankle muscles of the adult rat after spinal cord injury. *J Appl Physiol* (1985), *107*(4), 1190-1194. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00282.2009>
123. Oppenheim, R. W., Yin, Q. W., Prevette, D., & Yan, Q. (1992). Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature*, *360*(6406), 755-757. <https://doi.org/10.1038/360755a0>
124. Pajenda, G., Hercher, D., Márton, G., Pajer, K., Feichtinger, G. A., Maléth, J., . . . Nógrádi, A. (2014). Spatiotemporally limited BDNF and GDNF overexpression rescues motoneurons destined to die and induces elongative axon growth. *Exp Neurol*, *261*, 367-376. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.05.019>
125. Park, H., & Poo, M. M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*, *14*(1), 7-23. <https://doi.org/10.1038/nrn3379>
126. Pezet, S., Malcangio, M., & McMahon, S. B. (2002). BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Res Brain Res Rev*, *40*(1-3), 240-249. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(02\)00206-0](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00206-0)
127. Piovesana, R., Faroni, A., Tata, A. M., & Reid, A. J. (2020). Functional Characterization of Muscarinic Receptors in Human Schwann Cells. *Int J Mol Sci*, *21*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186666>
128. Plotkin, J. L., & Surmeier, D. J. (2014). Impaired striatal function in Huntington's disease is due to aberrant p75NTR signaling. *Rare Dis*, *2*(1), e968482. <https://doi.org/10.4161/2167549X.2014.968482>
129. Poo, M. M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*, *2*(1), 24-32. <https://doi.org/10.1038/35049004>

130. Pérez, V., Bermedo-Garcia, F., Zelada, D., Court, F. A., Pérez, M., Fuenzalida, M., . . . Henríquez, J. P. (2019). The p75. *Acta Neuropathol Commun*, 7(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0802-7>
131. Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1473), 1545-1564. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
132. REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*, 17(1), 208-212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
133. Rodrigues, H. A., Fonseca, M. e. C., Camargo, W. L., Lima, P. M., Martinelli, P. M., Naves, L. A., . . . Guatimosim, C. (2013). Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One*, 8(11), e78342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078342>
134. Rose, C. R., Blum, R., Kafitz, K. W., Kovalchuk, Y., & Konnerth, A. (2004). From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays*, 26(11), 1185-1194. <https://doi.org/10.1002/bies.20118>
135. Saha, R. N., Liu, X., & Pahan, K. (2006). Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1(3), 212-222. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9020-8>
136. Salanova, M., Gelfi, C., Moriggi, M., Vasso, M., Viganò, A., Minafra, L., . . . Blottner, D. (2014). Disuse deterioration of human skeletal muscle challenged by resistive exercise superimposed with vibration: evidence from structural and proteomic analysis. *FASEB J*, 28(11), 4748-4763. <https://doi.org/10.1096/fj.14-252825>
137. Santafé, M. M., Garcia, N., Tomàs, M., Obis, T., Lanuza, M. A., Besalduch, N., & Tomàs, J. (2014). The interaction between tropomyosin-related kinase B receptors and serine kinases modulates acetylcholine release in adult neuromuscular junctions. *Neurosci Lett*, 561, 171-175. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.073>
138. Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., & Blum, R. (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch*, 469(5-6), 593-610. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1964-4>
139. Scelsi, R., Marchetti, C., Poggi, P., Lotta, S., & Lommi, G. (1982). Muscle fiber type morphology and distribution in paraplegic patients with traumatic cord lesion. Histochemical and ultrastructural aspects of rectus femoris muscle. *Acta Neuropathol*, 57(4), 243-248. <https://doi.org/10.1007/BF00692178>
140. Schiaffino, S. (2010). Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf)*, 199(4), 451-463. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02130.x>
141. Schiaffino, S. (2018). Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *FEBS J*, 285(20), 3688-3694. <https://doi.org/10.1111/febs.14502>
142. Schmalbruch, H., & Hellhammer, U. (1977). The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat Rec*, 189(2), 169-175. <https://doi.org/10.1002/ar.1091890204>
143. Seif, G. I., Nomura, H., & Tator, C. H. (2007). Retrograde axonal degeneration "dieback" in the corticospinal tract after transection injury of the rat spinal cord: a confocal microscopy study. *J Neurotrauma*, 24(9), 1513-1528. <https://doi.org/10.1089/neu.2007.0323>
144. Sharma, H. S. (2007). A select combination of neurotrophins enhances neuroprotection and functional recovery following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci*, 1122, 95-111. <https://doi.org/10.1196/annals.1403.007>
145. Sieck, G. C., Gransee, H. M., Zhan, W. Z., & Mantilla, C. B. (2021). Acute intrathecal BDNF enhances functional recovery after cervical spinal cord injury in rats. *J Neurophysiol*, 125(6), 2158-2165. <https://doi.org/10.1152/jn.00146.2021>
146. Simmons, D. A., Belichenko, N. P., Ford, E. C., Semaan, S., Monbureau, M., Aiyaswamy, S., . . . Longo, F. M. (2016). A small molecule p75NTR ligand normalizes signalling and reduces Huntington's disease phenotypes in R6/2 and BACHD mice. *Hum Mol Genet*, 25(22), 4920-4938. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw316>
147. Simó, A., Just-Borràs, L., Cilleros-Mañé, V., Hurtado, E., Nadal, L., Tomàs, M., . . . Tomàs, J. (2018). BDNF-TrkB Signaling Coupled to nPKCε and cPKCβI Modulate the Phosphorylation

- of the Exocytotic Protein Munc18-1 During Synaptic Activity at the Neuromuscular Junction. *Front Mol Neurosci*, 11, 207. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00207>
148. Skup, M., Dwornik, A., Macias, M., Sulejczak, D., Wiater, M., & Czarkowska-Bauch, J. (2002). Long-term locomotor training up-regulates TrkB(FL) receptor-like proteins, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. *Exp Neurol*, 176(2), 289-307. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7943>
 149. Skup, M., Gajewska-Wozniak, O., Grygielewicz, P., Mankovskaya, T., & Czarkowska-Bauch, J. (2012). Different effects of spinalization and locomotor training of spinal animals on cholinergic innervation of the soleus and tibialis anterior motoneurons. *Eur J Neurosci*, 36(5), 2679-2688. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08182.x>
 150. Skup, M., Ziemińska, E., Gajewska-Wozniak, O., Platek, R., Maciejewska, A., & Czarkowska-Bauch, J. (2014). The impact of training and neurotrophins on functional recovery after complete spinal cord transection: cellular and molecular mechanisms contributing to motor improvement. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 74(2), 121-141.
 151. Slack, S. E., Pezet, S., McMahon, S. B., Thompson, S. W., & Malcangio, M. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, 20(7), 1769-1778. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03656.x>
 152. Slutsky, I., Silman, I., Parnas, I., & Parnas, H. (2001). Presynaptic M(2) muscarinic receptors are involved in controlling the kinetics of ACh release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, 536(Pt 3), 717-725. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00717.x>
 153. Stein, R. B., Misiaszek, J. E., & Pearson, K. G. (2000). Functional role of muscle reflexes for force generation in the decerebrate walking cat. *J Physiol*, 525 Pt 3(Pt 3), 781-791. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00781.x>
 154. Südhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron*, 75(1), 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
 155. Sławińska, U., Majczyński, H., & Djavadian, R. (2000). Recovery of hindlimb motor functions after spinal cord transection is enhanced by grafts of the embryonic raphe nuclei. *Exp Brain Res*, 132(1), 27-38. <https://doi.org/10.1007/s002219900323>
 156. Sławińska, U., Miazga, K., & Jordan, L. M. (2014). 5-HT₂ and 5-HT₇ receptor agonists facilitate plantar stepping in chronic spinal rats through actions on different populations of spinal neurons. *Front Neural Circuits*, 8, 95. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00095>
 157. Talmadge, R. J., Roy, R. R., Caiozzo, V. J., & Edgerton, V. R. (2002). Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. *J Appl Physiol (1985)*, 93(4), 1487-1497. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00053.2002>
 158. Tator, C. H. (1995). Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol*, 5(4), 407-413. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1995.tb00619.x>
 159. Tator, C. H., & Fehlings, M. G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, 75(1), 15-26. <https://doi.org/10.3171/jns.1991.75.1.0015>
 160. Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., . . . Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 25(22), 5455-5463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
 161. Tep, C., Kim, M. L., Opincariu, L. I., Limpert, A. S., Chan, J. R., Appel, B., . . . Yoon, S. O. (2012). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces polarized signaling of small GTPase (Rac1) protein at the onset of Schwann cell myelination through partitioning-defective 3 (Par3) protein. *J Biol Chem*, 287(2), 1600-1608. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312736>
 162. Tolwani, R. J., Cosgaya, J. M., Varma, S., Jacob, R., Kuo, L. E., & Shooter, E. M. (2004). BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res*, 77(5), 662-669. <https://doi.org/10.1002/jnr.20181>

163. Totoiu, M. O., & Keirstead, H. S. (2005). Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *J Comp Neurol*, 486(4), 373-383. <https://doi.org/10.1002/cne.20517>
164. Uchida, K., Nakajima, H., Hirai, T., Yayama, T., Chen, K., Guerrero, A. R., . . . Baba, H. (2012). The retrograde delivery of adenovirus vector carrying the gene for brain-derived neurotrophic factor protects neurons and oligodendrocytes from apoptosis in the chronically compressed spinal cord of twy/twy mice. *Spine (Phila Pa 1976)*, 37(26), 2125-2135. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182600ef7>
165. Vanelderen, P., Rouwette, T., Kozicz, T., Roubos, E., Van Zundert, J., Heylen, R., & Vissers, K. (2010). The role of brain-derived neurotrophic factor in different animal models of neuropathic pain. *Eur J Pain*, 14(5), 473.e471-479. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.09.006>
166. Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L. C., Bui, S., Nielson, A., . . . Luo, Y. (2012). RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 14(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
167. White, A. R., & Holmes, G. M. (2018). Anatomical and Functional Changes to the Colonic Neuromuscular Compartment after Experimental Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*, 35(9), 1079-1090. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5369>
168. Więckowska, A., Gajewska-Woźniak, O., Głowacka, A., Ji, B., Grycz, K., Czarkowska-Bauch, J., & Skup, M. (2018). Spinalization and locomotor training differentially affect muscarinic acetylcholine receptor type 2 abutting on α -motoneurons innervating the ankle extensor and flexor muscles. *J Neurochem*, 147(3), 361-379. <https://doi.org/10.1111/jnc.14567>
169. Wright, D. E., Zhou, L., Kucera, J., & Snider, W. D. (1997). Introduction of a neurotrophin-3 transgene into muscle selectively rescues proprioceptive neurons in mice lacking endogenous neurotrophin-3. *Neuron*, 19(3), 503-517. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80367-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80367-0)
170. Xiong, G. X., Zhang, J. W., Hong, Y., Guan, Y., & Guan, H. (2008). Motor unit number estimation of the tibialis anterior muscle in spinal cord injury. *Spinal Cord*, 46(10), 696-702. <https://doi.org/10.1038/sc.2008.7>
171. Ye, J. H., & Houle, J. D. (1997). Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Exp Neurol*, 143(1), 70-81. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.6353>
172. Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., . . . Hauser, C. J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 464(7285), 104-107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>
173. Zhou, L. J., Yang, T., Wei, X., Liu, Y., Xin, W. J., Chen, Y., . . . Liu, X. G. (2011). Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat. *Brain Behav Immun*, 25(2), 322-334. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.025>
174. Zhou, L. J., Zhong, Y., Ren, W. J., Li, Y. Y., Zhang, T., & Liu, X. G. (2008). BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Exp Neurol*, 212(2), 507-514. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.04.034>
175. Zhou, W., Xie, Z., Li, C., Xing, Z., Xie, S., Li, M., & Yao, J. (2021). Driving effect of BDNF in the spinal dorsal horn on neuropathic pain. *Neurosci Lett*, 756, 135965. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135965>
176. Ziemlińska, E., Kügler, S., Schachner, M., Wewiór, I., Czarkowska-Bauch, J., & Skup, M. (2014). Overexpression of BDNF increases excitability of the lumbar spinal network and leads to robust early locomotor recovery in completely spinalized rats. *PLoS One*, 9(2), e88833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088833>
177. Zornetta, I., Caccin, P., Fernandez, J., Lomonte, B., Gutierrez, J. M., & Montecucco, C. (2012). Envenomations by Bothrops and Crotalus snakes induce the release of mitochondrial alarmins. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(2), e1526. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001526>

8. SPIS PUBLIKACJI WŁASNYCH

1. **Głowacka A.**, Ji B., Szczepankiewicz A.A., Skup M., Gajewska-Woźniak O. (2022). BDNF Spinal Overexpression after Spinal Cord Injury Partially Protects Soleus Neuromuscular Junction from Disintegration, Increasing VAcHT and AChE Transcripts in Soleus but Not Tibialis Anterior Motoneurons. *Biomedicines*. 10(11):2851. doi: 10.3390/biomedicines10112851.
2. Grycz K., **Głowacka A.**, Ji B., Krzywdzińska K., Charzyńska A., Czarkowska-Bauch J., Gajewska-Woźniak O., Skup M. (2019). Regulation of perineuronal net components in the synaptic bouton vicinity on lumbar α -motoneurons in the rat after spinalization and locomotor training: New insights from spatio-temporal changes in gene, protein expression and WFA labeling. *Exp Neurol*. 354:114098. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114098. Epub 2022 Apr 30. PMID: 35504345.
3. Grycz K., **Głowacka A.**, Ji B., Czarkowska-Bauch J., Gajewska-Woźniak O., Skup M. (2019). Early pre- and postsynaptic decrease in glutamatergic and cholinergic signaling after spinalization is not modified when stimulating proprioceptive input to the ankle extensor α -motoneurons: Anatomical and neurochemical study. *PLoS ONE* 14(9): e0222849.
4. Więckowska, A., Gajewska-Woźniak, O., **Głowacka, A.**, Ji, B., Grycz, K., Czarkowska-Bauch, J. and Skup, M. (2018). Spinalization and locomotor training differentially affect muscarinic acetylcholine receptor type 2 abutting on α -motoneurons innervating the ankle extensor and flexor muscles. *J. Neurochem.*147(3):361-379.
5. Skup M., Ziemińska E., Gajewska-Woźniak O., Płatek R., **Maciejewska A.**, Czarkowska-Bauch J. (2014). The impact of training and neurotrophins on functional recovery after spinal cord transection: cellular and molecular mechanisms contributing to motor improvement. *Acta Neurobiol. Exp.* 2014;74(2):121-41.