

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Chirurgie

**Experimentální léčba poranění míchy a klinická léčba
hrudně-bederních obratlových zlomenin**

**Experimental Treatment of the Spinal Cord Injury and
Clinical Treatment of Thoraco-Lumbar Vertebral Fractures**

MUDr. Petr Krůpa

Školitel: prof. MUDr. Svatopluk Řehák, CSc.
Školitel konzultant: doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Prohlášení autora

Prohlášení:

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

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

Hradec Králové, 2019

podpis autora

Poděkování

Na prvním místě bych s pokorou rád vyjádřil vděčnost všem, kteří mě v mé vědecké práci podporovali.

Svému školiteli, prof. MUDr. Svatoplukovi Řehákovi, CSc., přednostovi Neurochirurgické kliniky Fakultní Nemocnice Hradec Králové, děkuji za cenné rady a umožnění mého doktorského studia. Zvláště bych chtěl poděkovat své školitelce konzultantce, doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D., vedoucí Oddělení regenerace nervové tkáně Ústavu experimentální medicíny AVČR v.v.i za nesmírnou trpělivost, vstřícnost a profesionální vedení mé práce. Velký dík patří též MUDr. Lucii Urdzíkové-Machové, Ph.D. za důvěru a výraznou pomoc v experimentální práci. Děkuji také Ing. Ireně Vackové, CSc. a Lindě Fedorowiczové z Oddělení biomateriálů a biofyzikálních metod AVČR za přípravu mezenchymálních kmenových buněk. Poděkování také patří všem kolegům z oddělení, RNDr. Jiřímu Růžičkovi, Ph.D., Mgr. Kristýně Kekulové, Ph.D., Mgr. Barboře Valáškové Ph.D., Mgr. Janě Dubišové a všem technickým pracovníkům, bez jejichž pomoci by se náročné experimenty neobešly.

Na závěr bych chtěl poděkovat své manželce Markétě a svým rodičům za neutuchající podporu, pozitivní přístup a velkou trpělivost při časově náročném skloubení klinické a experimentální práce.

Obsah

Souhrn	13
Abstract	15
1. Úvod	17
2. Patofyziologie traumatického míšního poranění	20
2.1 Primární poranění.....	20
2.2 Sekundární poranění	23
2.2.1 Okamžitá fáze	24
2.2.2 Akutní fáze.....	25
2.2.2.1 Ischemie, hypoxie.....	25
2.2.2.2 Glutamátová excitotoxicita.....	26
2.2.2.3 Iontová dysbalance.....	26
2.2.2.4 Posttraumatický edém míchy.....	27
2.2.2.5 Oxidativní stres.....	29
2.2.3 Subakutní fáze	30
2.2.3.1 Zánětlivá reakce.....	31
2.2.4 Chronická fáze	36
2.2.4.1 Gliová jizva.....	36
2.2.4.2 Kavítace, syringomyelie.....	38
2.2.4.3 Axonální regenerace a axonální sprouting.....	38
3. Klinické projevy poranění míchy	42
3.1 Klinické hodnocení stupně postižení.....	42
3.2 Míšní šok.....	43
3.2.1 Hypotenze - neurogení šok	44
3.2.2 Dočasná ztráta neurologických funkcí.....	44
3.3 Syndromy míšní léze.....	45
4. Léčba.....	47
4.1 Konzervativní a chirurgická léčba zlomenin Th-L oblasti páteře	47
4.2 Farmakoterapie	50
4.2.1 Antiedematózní terapie - Kortikoidy.....	50
4.2.2 Podpůrná léčba.....	51
4.3 Rehabilitační léčba	52
4.4 Experimentální léčba míšní léze	53

4.4.1	Kmenové buňky.....	53
4.4.1.1	Mezenchymální kmenové buňky.....	54
4.4.1.2	Kurkumin	55
4.4.1.3	Hydrogely.....	55
5.	Hypotézy a cíle práce.....	57
6.	Metody	59
6.1	Použitá experimentální zvířata.....	59
6.1.1	hWJ-MSCs.....	59
6.1.2	Nanokurkumin	59
6.2	Pacienti.....	59
6.3	Experimentální model míšní léze	60
6.4	Aplikace terapeutických buněk/protizánětlivé látky.....	61
6.4.1	hWJ-MSCs.....	61
6.4.2	Nanokurkumin	63
6.5	Operační stabilizace zlomeniny (OPEN, MIS)	64
6.6	Analýza efektu hWJ-MSCs/nanokurkuminu.....	65
6.6.1	Behaviorální testování.....	65
6.6.1.1	BBB	65
6.6.1.2	Chůze po kladině	66
6.6.1.3	MotoRater	66
6.6.2	Imunohistochemická analýza	68
6.6.2.1	Morfometrie šedé a bílé hmoty míšní.....	68
6.6.2.2	Gliová jizva a reaktivní astrocyty	68
6.6.2.3	Axonální sprouting.....	69
6.6.3	qPCR.....	70
6.7	Hodnocení přesnosti zavedených šroubů a dalších klinických parametrů.....	73
6.8	Statistická analýza	74
7.	Výsledky.....	76
7.1	Experimentální léčba míšního poranění pomocí hWJ-MSCs/nanokurkuminu.....	76
7.1.1	Behaviorální testování.....	76
7.1.1.1	hWJ-MSCs.....	76
7.1.1.2	Nanokurkumin.....	78
7.1.2	Histologická a imunohistochemická analýza.....	82
7.1.2.1	hWJ-MSCs.....	82

7.1.2.2	Nanokurkumin.....	84
7.1.3	qPCR.....	87
7.1.3.1	hWJ-MSCs.....	87
7.1.3.2	Nanokurkumin.....	89
7.2	Rozdíly mezi operacemi vedenými MIS a OPEN.....	90
8.	Diskuze.....	95
8.1	hWJ-MSCs.....	95
8.2	Nanokurkumin.....	99
8.3	Klasická versus mini-invazivní technika chirurgické stabilizace	103
9.	Závěry	108
	Seznam citací použité literatury	110

Použité zkratky

AANS	Americká asociace neurochirurgických společností; American Association of Neurological Surgeons
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionát
AOS	Pracovní skupina pro spinální osteosyntetickou problematiku; Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen Spine
AP	předo-zadní; antero-posteriorní
AQP	aquaporin
ATP	adenosin tri fosfát
BBB	Basso, Beattie a Bresnahanovo skóre
Bcl-2	signální molekula; B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	signální molekula; B-cell lymphoma-extra large
BMP	kostní protein; Bone morphogenetic protein
BSCB	bariéra mezi krví a míchou; blood-spinal cord barrier
Ca	vápník; calcium
CNS	centrální nervový systém
CPG	generátor rytmických pohybů; common pattern generator
CSF	mozkomíšní mok, cerebrospinal fluid
CSPGs	chondroitin-sulfátové proteoglykany
CT	počítačová tomografie, computed tomography
EDTA	ethylen-diamino-tetraacetylová kyselina
FGF	fibroblastický růstový faktor; fibroblast growth factor

GST	gluatathion S-transferáza
hWJ-MSCs	lidské mesenchymální kmenové buňky získané z Whartonova rosolu; human mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly
ICAM	signální molekula; intracellular adhesion molecule
IL	interleukin
IP10/CXCL10	signální molekula; interferon-inducible protein 10
iPS	indukované pluripotentní kmenové buňky; induced Pluripotent Stem Cells
K	draslík; kalium
KA	kainátová kyselina; kainic acid
LAT	boční; laterální
LP	lumbální punkce
MAG	myelin-asociované glykoproteiny
MCP-1	signální molekula; monocyte chemotactic protein-1
MCU	mitochondriální kalciový přenašeč (uniporter)
MDA	malondialdehyd
MIP-1 α a MIP-1 β	interleukin; macrophage inflammatory protein-1 α a 1 β
MIP-2	interleukin; macrophage inflammatory protein 2
MMP-9	matrix metalloproteináza-9
MP	methyprednisolon
MR	magnetická rezonance; magnetic resonance
MSC	mezenchymální kmenová buňka; mesenchymal stem cell

Na	sodík; natrium
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfát
NADPO	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfát oxidáza
NASCIS	multicentrická studie míšního poranění; National Acute SCI Study
NG2 ⁺	neuronální gliová protilátka; Neuron-gial antigen 2 ⁺
NMDA	N-methyl-D-aspartátová kyselina
OECs	buňky derivované z olfaktorního bulbu; olfactory ensheathing cells
OMgp	oligodendrocytový myelinový glykoprotein
OPCs	oligodendrocytární prekursor, oligodendrocyte precursor cells
PARP	Poly (ADP-ribózo) polymeráza
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce; quantitative Real-time polymerase chain reaction
RHOA	GTPáza, Ras homolog gene family member A
RNS	reaktivní dusíkaté produkty; reactive nitrogen species
ROS	reaktivní kyslíkové produkty; reactive oxygen species
Rpm	otáčky za minutu, rotates per minute
SCI	poranění míchy; spinal cord injury
SCIWORA	poranění míchy bez radiologického korelátu; Spinal cord injury without radiological abnormality
SOD	superoxid dismutáza
Th-L	hrudně-bederní (torako-lumbální) část páteře
TNF	interleukin; tumour necrosis factor

VBA	úhlová deformita obratle, vertebral body angulation
VBI	poměr komprese obratle, vertebral body index
VCAM	signální molekula; vascular cell adhesion molecule
VECs	vaskulární endotelové buňky; vascular endothelial cells
VEGF	vaskulární růstový faktor; vascular endothelial growth factor

Souhrn

Zlomeniny páteře sdružené s poraněním míchy (SCI) patří k závažným medicínským stavům. Zatímco terapie obratlových zlomenin hrudně-bederní oblasti páteře patří k základním neurochirurgickým operacím, léčba těžkého míšního poranění je klinicky neuspokojivá a odkázána na pokrok na poli experimentální medicíny. Tato práce je zaměřena jak na klinické zhodnocení nového mini-invazivního způsobu stabilizace zlomeniny obratle, tak na experimentální léčbu míšního poranění pomocí podávání lidských mezenchymálních buněk z Whartonova rosolu (hWJ-MSCs) a protizánětlivé látky nanokurkuminu.

Při experimentální léčbě SCI u modelu potkana pomocí hWJ-MSCs byly porovnány různé jednotlivé dávky (0,5 M a 1,5 M) a efekt opakovaného podávání pomocí lumbální punkce při porovnání s kontrolním vzorkem. Léčba byla aplikována v jedné dávce 7. den po SCI, nebo ve třech po sobě jdoucích dávkách vždy v rozmezí 7 dnů. Léčba pomocí inovativní protizánětlivé látky nanokurkuminu v porovnání s prázdným nanonosičem byla aplikována lokálně k místu poranění ihned po vytvoření SCI s následným čtyřtýdenním podkožním podáváním. Efekt léčby byl pravidelně hodnocen sérií behaviorálních testů (BBB, chůze po kladině, motoRater). Po ukončení experimentu, 9. týden po SCI, byla extenzivně vyšetřena míšní tkáň imunohistochemicky (rozsah gliové jizvy, axonální sprouting, počet protoplazmatických astrocytů), histologicky (morfometrie míšní tkáně) a pomocí qPCR exprese vybraných genů (*Gfap*, *Casp3*, *Irf5*, *Cd86*, *Mrc1*, *Cd163*, *Sort1*, *Fgf2*, *Olig2*, *Gap43*, *Vegf*, *Nfkβ*) a cytokinů (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, CCL-5, IL-11, IL-10, IL-13).

Při léčbě pomocí hWJ-MSCs bylo prokázáno signifikantní zlepšení hybnosti dolních končetin u všech skupin s výjimkou dávky 0,5 M. Výsledek histologické a imunohistochemické analýzy pak ukázal, že čím vyšší byla podaná dávka buněk, tím pozitivnější efekt byl zaznamenán na axonální sprouting, zachování šedé a bílé hmoty míšní a snížení rozsahu gliové jizvy. mRNA markery makrofágů a apoptózy byly méně exprimovány po aplikaci 3x1,5 M. Bylo konstatováno, že pozitivní efekt léčby pomocí hWJ-MSCs je závislý na podaném počtu buněk a opakované aplikaci.

Analýza efektu léčby nanokurkuminem odhalila signifikantní změny v pohybu dolních končetin s lepší schopností nosnosti vlastního těla. V histologickém a imunohistochemickém hodnocení míšních řezů byla signifikantně více zachována bílá míšní tkáň, snížený rozsah gliové jizvy a vyšší axonální sprouting ve skupině léčené nanokurkuminem. qPCR zánětlivé odpovědi odhalilo signifikantní změny v expresi zánětlivých cytokinů v prvních dvou týdnech po SCI.

V retrospektivním klinickém porovnání souborů pacientů operovaných klasickou otevřenou zadní transpedikulární stabilizací (OPEN), nebo mini-invazivní perkutánní stabilizací (MIS) byla pozornost zaměřena především na radiologické zhodnocení správnosti pozice umístění pedikulárního šroubu, Cobbův úhel, angulaci obratle (VBA) a index zlomeného obratle (VBI). Dále byly zhodnoceny časy operací a peroperační expoziční časy RTG záření. Při celkovém zhodnocení 147 pacientů v letech 2015-2018 nebyly mezi jednotlivými skupinami nalezeny signifikantní rozdíly v počtu malpozic pedikulárních šroubů ani ve vývoji radiologických parametrů kyfotizace. Naopak byl nalezen signifikantně delší operační čas ve skupině OPEN a signifikantně vyšší expoziční čas RTG záření ve skupině MIS. Metoda MIS byla zhodnocena jako bezpečná alternativa k metodě OPEN u selektivních indikací operací zlomenin páteře.

Klíčová slova: míšní poranění, lidské mezenchymální kmenové buňky z Whartonova rosolu (hWJ-MSCs) - nanokurkumin - zánětlivá odpověď - neuroregenerace - gliová jizva - axonální sprouting - otevřená stabilizace - mini-invazivní perkutánní stabilizace - traumatická zlomenina obratle - pedikulární šroub

Abstract

Vertebral body fractures together with the spinal cord injury (SCI) remain a challenging medical condition. While management of the thoracic-lumbar (Th-L) vertebral fractures belongs to basic neurosurgical procedures with a usually excellent outcome, treatment of the severe spinal cord injury has mostly unsatisfactory results and thus novel approaches are highly in demand. In this study, experimental treatment of the SCI in a rat model using human mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly (WJ-MSCs) and a novel highly water soluble, nano-formulated curcumin is evaluated. Furthermore, a novel method of mini-invasive percutaneous posterior stabilisation (MIS) of Th-L vertebral fractures is retrospectively compared with classical open posterior (OPEN) procedure.

To assess the effectivity of hWJ-MSCs treatment in the ischemic-compression model of SCI in rats, different dosages (0.5 or 1.5 million cells) and repeated applications were compared. Cells or saline were applied intrathecally by lumbar puncture once, or in three consecutive weeks after injury. Nanocurcumin and a vehicle nanocarrier as a control were delivered both locally, immediately after the spinal cord injury, and subcutaneously during the four consecutive weeks after SCI. Rats were assessed for locomotor skills (BBB, flat beam, motoRater) for 9 weeks. Spinal cord tissue was morphometrically analysed for axonal sprouting, sparing of grey and white matter and astrogliosis. The expression of endogenous genes (*Gfap*, *Casp3*, *Irf5*, *Cd86*, *Mrc1*, *Cd163*, *Sort1*, *Fgf2*, *Olig2*, *Gap43*, *Vegf*, *Nfkβ*) and interleukins (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, CCL-5, IL-11, IL-10, IL-13) was studied with qRT PCR.

Significant recovery of functional outcome was observed in all of the hWJ-MSCs treated groups except for the single application of the lowest number of cells (0.5 M). Histochemical analyses revealed a gradually increasing effect of grafted cells, resulting in a significant increase in the number of GAP43⁺ fibers, a higher amount of spared grey matter and reduced astrogliosis. mRNA expression of macrophage markers and apoptosis was downregulated after the repeated application of 1.5 million cells. We conclude that the effect of hWJ-MSCs on spinal cord regeneration is dose-dependent, and potentiated by repeated application.

The behavioural tests revealed a significant improvement of the biomechanics of hind limbs with a better weight-carrying ability in the nanocurcumin treated group, compared to the nanocarrier control. An immunohistochemical and histological analysis confirmed a significant sparing of the white matter tissue, a reduced area of glial scarring and a higher amount of newly sprouted axons in the nanocurcumin treated group. The mRNA expression of endogenous genes and interleukins showed changes in the expression of the inflammatory cytokines in the first two weeks after SCI.

Retrospective clinical analysis of the patients who suffered traumatic vertebral fracture(s) of the lower thoracic and lumbar spine and were operated by classical open posterior stabilisation (group OPEN) or by mini-invasive percutaneous posterior stabilisation (group MIS) was performed. The precise position of the pedicular screws, Cobb's angle, vertebral body angulation (VBA), vertebral body index (VBI), duration of the surgery and exposition to the X-ray was evaluated. In the period 2015-2018 totally 147 patients were analysed. We found no significant difference in number of pedicle screw malpositions, Cobb's angle, VBI and VBA between the groups. While duration of the operation was significantly shorter in the MIS group, exposition time to the X-ray was in the same group significantly higher. MIS procedure was found as a safe and comparable to the classical OPEN surgical procedure.

Key words: spinal cord injury - human mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly (hWJ-MSCs) - nanocurcumin - inflammatory response - neuroregeneration - astrogliosis - axonal sprouting - open stabilisation - mini-invasive percutaneous stabilisation - traumatic vertebral fractures - pedicular screw

1. Úvod

Páteř, jakožto biomechanická jednotka složená z řady kostěných struktur (obratlů), meziobratlových kloubů, destiček a vazivového aparátu (ligament), je nejen základní osovou strukturou lidského těla umožňující vzpřímené držení, ale také poskytuje ochranu pro míchu, která probíhá v chráněném úseku páteřního kanálu (canalis vertebralis). Úrazové zlomeniny páteře jsou způsobené vysokoenergetickým traumatem, přičemž až 80 % je lokalizováno v hrudní a bederní páteři (1, 2). Nejčastější oblastí traumatické fraktury pak bývá tzv. torakolumbální (Th-L) junkce oblasti Th10-L2, kde dochází k přenesení energie z mobilní lumbální části na rigidní torakální část (3). Nejčastější příčinou závažných poranění páteře v České republice (ČR) jsou pády z výšky a automobilové nehody (Tab. 1).

U závažných a složitých zlomenin páteře, při kterých dochází buď k významné dislokaci fragmentu kosti, nebo k distrakčně-rotárnímu pohybu v oblasti páteřního kanálu bývá často následkem zranění různý stupeň poranění míchy.

Poranění míchy (Spinal cord injury, SCI) je závažné mutilující onemocnění, které významně ovlivní život postiženého pacienta, a které ani v 21. století medicína nedokáže uspokojivě léčit, potažmo vyléčit. Incidence míšního poranění ve Spojených státech Amerických (USA) je přibližně 54 případů na 1 milion lidí, v České republice (ČR) je incidence o něco nižší, kdy je ročně léčeno asi 230-300 pacientů (Tab. 1).

	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006
celkový počet	281	278	243	266	285	303	257	263	237	261	249
pohlaví muži	202	203	180	184	220	225	189	186			
ženy	79	75	63	82	65	78	68	77			
průměrný věk	53.9	51.5	51.6	53.9	48.2	48	47.67	49	49.67	42.5	47
výška léze C	125	128	117	113	130	139	105	119	109	115	121
Th	107	99	93	113	114	123	106	105	94	117	88
L	49	51	33	40	41	41	46	36	34	29	37
AIS A	77	83	67	59	85	79	73				
B	32	26	23	27	29	23	15				
C	67	90	69	70	68	113	90				
D	105	79	84	110	103	88	79				
etiologie pád	86	75	78	94	98	87	66	70	64	67	70
auto/moto	45	42	30	31	50	54	48	44	56	70	60
sport	10	15	10	11	12	18	9	24	16	29	19
voda	10	12	13	12	19	19	20	20	21	15	18
jiné trauma	10	11	11	5	9	17	10	18	5	23	19
cévní	25	25	19	18	12	19	16	14	6	12	16
zánět	29	35	26	37	29	18	16	28	19	14	13
tumor	21	24	17	17	17	25	26	20	13	18	11
jiné	45	39	33	41	34	39	42	24	34	11	15

Tab. 1 Celkový počet pacientů léčených ve spinálních rehabilitačních jednotkách v ČR v letech 2006-2016. Vybrané demografické údaje spolu s etiologiemi úrazů. Převzato a upraveno z webových stránek <https://www.spinalcord.cz/cz/statistiky/>.

Výsledný neurologický stav pacienta silně koreluje se stupněm postižení míchy, kdy při úplném přerušení (transekci) prakticky neexistuje naděje na funkčně významné klinické zlepšení. Úplné morfologické přerušení míchy je však i při klinickém obrazu kompletní míšní léze vzácné, ve většině případů se jedná o různý stupeň kontuzně-kompresivního poranění se zachováním alespoň minimálního množství nepřerušené míšní tkáně. Léčba poranění ve většině traumatických případů začíná na neurochirurgickém oddělení nemocnice nejvyššího typu s traumacentrem, kde je provedena repozice a stabilizace zlomeniny páteře spolu s případným uvolněním utlačených nervových struktur (míchy, nervových kořenů). Operační řešení může být provedeno několika různými chirurgickými přístupy. Na chirurgickou terapii navazuje intenzivní podpůrná léčba souvisejících stavů a rehabilitace paralyzovaných funkcí.

V oblasti experimentální medicíny byl v posledních několika dekádách kladen důraz na pochopení patofyziologie probíhajících dějů s hledáním možností jejich terapeutických ovlivnění. Byl alespoň zčásti objasněn význam primárního a sekundárního poranění s rolí vápníku, sodíku, volných radikálů, excitotoxicity, zánětlivých cytokinů, mechanismů neuronální apoptózy a v neposlední řadě i plasticity a regeneračních procesů. Při experimentálních

přístupech v rekonstrukci a regeneraci míšní tkáně je v současné době využíváno mnoha různých typů léčby zahrnujících biologické i elektromechanické metody.

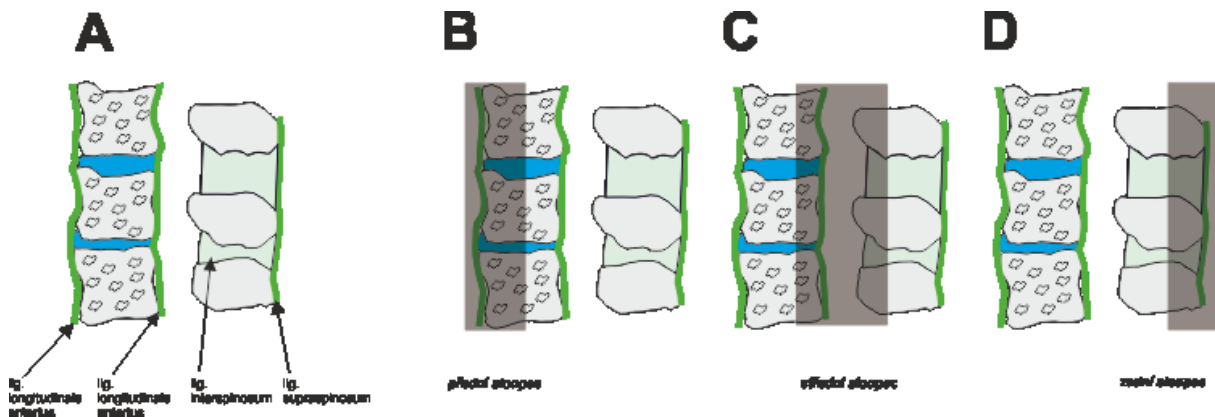
Tato práce se zaměřuje na specifický experimentální výzkum zaměřený na léčbu sekundárního poškození míchy pomocí aplikace lidských mesenchymálních kmenových buněk a protizánětlivého účinku nanokurkuminu a je doplněna o klinické zhodnocení nově zavedené mini-invazivní operační techniky zlomeniny dolní Th-L páteře. Experimentální míšní léze byla vytvořena kompresí míchy na potkaním modelu v úrovni Th8 pomocí zavedené metodiky (4). Přestože se závažné traumatické míšní léze vyskytují v klinické medicíně častěji v krční oblasti, hrudní mícha bývá v experimentální medicíně preferovaná vzhledem k reproducibilitě a nižší mortalitě zvířat. Zároveň však takto vytvořená léze zanechává těžký sensori-motorický deficit na dolních končetinách s poruchou mikce a defekace s velice podobným průběhem patofyziologických míšních jevů. V práci jsou předkládány výsledky porovnávající efekt různých efektivních dávek intratékálně transplantovaných lidských mesenchymálních kmenových buněk získaných z Whartonova rosolu (hWJ-MSCs) a výsledky získané testováním lokálně a celkově podávaného nového protizánětlivého přípravku - nanokurkuminu. V chirurgické části autor práce retrospektivně porovnává přesnost zavedených pedikulárních šroubů klasickou zadní transpedikulární stabilizací zlomeniny s nově zavedenou metodou mini-invazivní perkutánní transpedikulární stabilizace. Vzhledem k návaznosti na experimentální část a také na klinickou relevanci četnosti zlomenin (i bez míšního poškození) byla zvolena jako oblast zájmu dolní hrudní a bederní páteř.

2. Patofyziologie traumatického míšního poranění

2.1 Primární poranění

Primární poranění páteře a míchy je většinou způsobené vysokoenergetickým mechanickým traumatem kombinujícím v sobě síly kompresivní, lacerující, distrakční a/nebo střížné. Tyto síly jsou příčinou lokální deformace, která se projeví jako fraktura kostěných částí páteře často v kombinaci s rupturou diskoligamentózního aparátu (5).

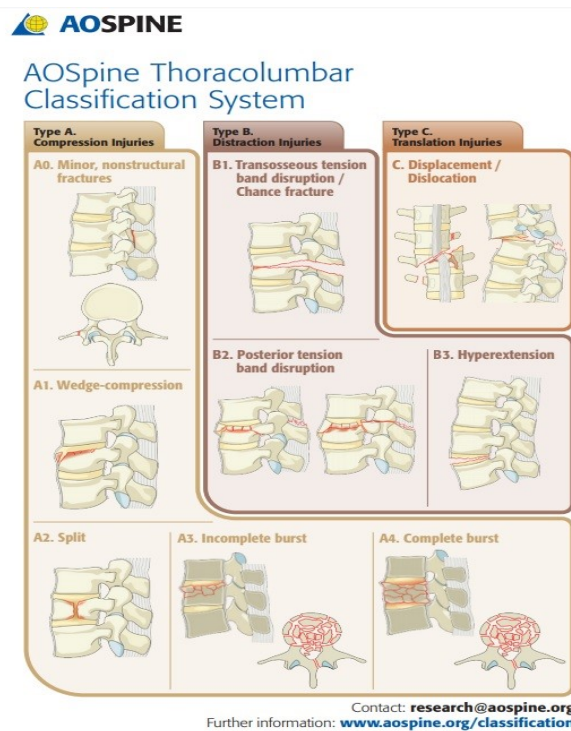
Poranění páteře bylo v průběhu let klasifikováno různými klasifikačními schémata, která kombinovala znalosti anatomické (6), mechanické (7) a kombinace obou (dvou, později tří sloupcový systém) (Obr. 1) (8, 9). V posledních letech je nejčastěji a klinicky relevantně používaný klasifikační systém dle AOS (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen Spine), který rozděluje Th-L zlomeniny dle mechanismu úrazu a závažnosti poranění do kategorií A, B a C (Obr. 2).



Obr. 1 Biomechanický koncept páteře. Při dělení páteře na jednotlivé biomechanické jednotky byl nejprve využit tzv. 2-sloupcový systém, kdy přední a zadní sloupec dělilo lig. longitudinale posteriorius (A). Po dalších biomechanických studiích se následně více prosadil 3-sloupcový koncept dle Denise, který dělí obratel na přední (B), střední (C) a zadní (D) sloupec.

Klasifikační systém AOS uplatňuje 3 sloupcový biomechanický koncept stability páteře dle Denise (9) se zohledněním obecných definic stability páteře dle Whitesidese, který definuje stabilitu páteře jako schopnost odolat axiálně kompresivním, axiálně distrakčním a rotačním

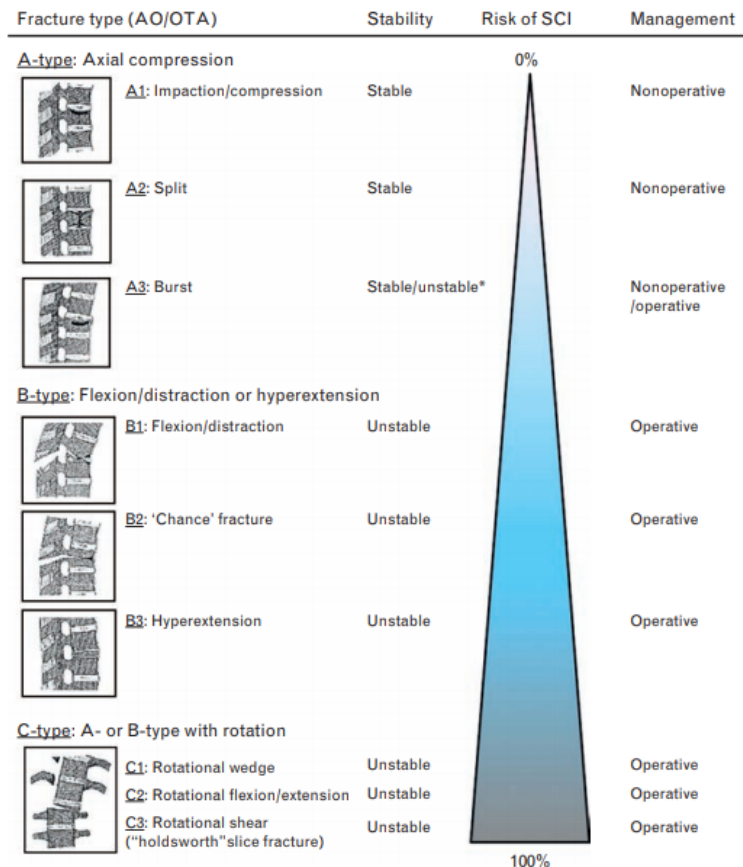
silám (10). Dle Denisova konceptu jsou struktury páteře rozděleny do 3 sloupců. Přední sloupec je tvořen předním podélným vazem (ligamentem), předními 2/3 obratlového těla a předními 2/3 meziobratlové ploténky (Obr. 1 B). Střední sloupec tvoří zadní podélný vaz, zadní 1/3 obratlového těla a zadní 1/3 meziobratlové ploténky (Obr. 1 C). Zadní sloupec pak zahrnuje všechny struktury dorzálně od zadního podélného vazy (Obr. 1 D).



Obr. 2 Klasifikační systém pro zlomeniny obratlů hrudní a bederní části páteře navrhnuty dle AO Spine. Převzato z oficiálních webových stránek AO Spine foundation <https://aospine.aofoundation.org/clinical-library-and-tools/aospine-injury-classification-system>.

Fraktury typu „A“ (A0, A1, A2) jsou výsledkem axiálně působící síly na přední sloupec páteře a jsou ve většině případů považovány za stabilní poranění. Výjimkou jsou poranění typu „A3 - incomplete burst“ a „A4 - complete burst“, které již zahrnují trauma středního páteřního sloupce charakterizované poraněním zadní hrany obratlového těla přímo sousedícího s páteřním kanálem. Tyto zlomeniny mohou být klasifikovány jako potenciálně nestabilní se zvažováním operačního řešení. Skupina poranění typu „B“ reprezentuje nestabilní 3-sloupcové poranění páteře, které je podmíněno flekčně-distrakčním mechanismem (typ B1/B2) nebo hyperextenčním mechanismem (typ B3). Nejtěžším typem poranění jsou pak fraktury typu

„C“, které představují rotačně-translační nestabilní zlomeniny s často úplnou dislokací páteřního kanálu. V závislosti na typu zlomeniny se zvyšuje riziko poranění míchy od 0 % u typu „A1“ až k téměř 100 % v případě nestabilní zlomeniny typu „C3“ (11, 12) (Obr. 3).



Obr. 3 Vztah typu zlomeniny klasifikované dle AOS ke stabilitě páteře, riziku vzniku míšní léze s nejčastějším typem léčby (chirurgická/konzervativní). Se závažností poranění dle AOS se zvyšuje i riziko míšní léze. Převzato z publikace Stahel et al. (13).

Způsob vzniku poranění míchy v závislosti na typu působící energie lze rozdělit do 4 kategorií:

- 1) axiálně působící síla + perzistující míšní komprese
- 2) axiálně působící síla + přechodná míšní komprese
- 3) distrakčně působící síla
- 4) lacerace/transekce míchy

Nejčastějším typem SCI je poranění při trvalé kompresi míchy (14). Vzniká v případě dislokace fragmentu kosti a/nebo při ruptuře a následné hernii intervertebrálního disku do páteřního

kanálu. Druhý mechanismus je způsoben flekčně-extenčním mechanismem v terénu chronických degenerativních změn páteře, kdy se mícha poškodí „otlakem“ a přechodnou ischemií o přítomné věkem podmíněné osteoproduktivní degenerativní změny - osteofyty. Distrakční poranění míchy vzniká při mechanismu flekčně-extenčním, rotačním nebo dislokačním, kdy dochází ke střížnému poranění míšní tkáně a/nebo zásobujících cév. Vzhledem k převážnému poranění měkkotkáňových struktur nebývá tento typ poranění pozorovatelný na běžně zobrazených RTG snímcích a rekonstrukcích počítačové tomografie (CT) a bývá proto označován jako „SCIWORA“ (Spinal cord injury without radiological abnormality). Toto poranění je běžné hlavně u dětí (15), vzácněji i u dospělých (16). Při podezření na tento typ poranění je nutné provedení MR (magnetické rezonance), které odhalí patologii míšní tkáně (17). Lacerace, nebo transekce míchy bývá důsledkem těžkého translačního nebo penetrujícího (střelného, bodného) poranění.

Následkem primárního míšního poranění je pouze vzácně kompletní transekce míchy. Ve většině případů dochází alespoň k částečnému zachování axonů, často v tzv. „subpiální zóně“. Ze zvířecích studií vyplývá, že existence alespoň malého procenta v kontinuitě zachovalých axonů má velký význam pro cílenou terapii a rehabilitaci. Jsou dokumentovány případy, kdy i 5% přežívajících axonů mělo významný dopad na celkový proces rehabilitace neuronálních funkcí (18). V posledních letech tyto zachované axony nabývají i na klinickém významu při jejich možné reaktivaci pomocí epidurální elektrické stimulace míchy (19).

2.2 Sekundární poranění

Rozvoj sekundárního míšního poranění, které ihned navazuje na primární míšní poranění, je následkem kaskády cévních, biochemických a celulárních dějů (20, 21). Dle časové osy lze děje sekundárního poranění rozdělit na okamžitou, akutní, subakutní a chronickou fázi (Tab. 2) (22).

Fáze sekundárního míšního poranění			
okamžitá	akutní	subakutní	chronická
Buněčná smrt z přímého poškození Hemoragie Ischemie	Buněčná smrt z přímého poškození Hemoragie Ischemie Systémová hypotenze a míšní šok Vazospazmy Ischemie Edém míchy Porušení iontové homeostázy Akumulace neurotransmiterů Porušení buněčných membrán	Vazospazmy Ischemie Edém míchy Porušení iontové homeostázy Akumulace neurotransmiterů Porušení buněčných membrán Produkce volných radikálů Peroxidace lipidů Blok nervového vzruchu Snížená tvorba ATP Invaze zánětlivých buněk Produkce cytokinů Zánětem řízená buněčná smrt Inhibice axonálního růstu Centrální chromatolýza Demyelinizace přežívajících axonů Buněčná apoptóza Počínající tvorba kavit Počínající tvorba gliové jizvy	Pokračující demyelinizace Pokračující buněčná apoptóza Pokračující tvorba kavit Dokončení gliové jizvy Regenerativní procesy Axonální sprouting Syringomyelie

Tab. 2. Rozdělení sekundárního míšního poranění s popisem typicky probíhajících dějů v jednotlivých fázích. Upraveno volně dle publikace Oyinbo et al. (23).

2.2.1 Okamžitá fáze

Okamžitou fází poranění jsou chápány probíhající děje v prvních 2 hodinách po primárním inzultu. V této fázi dochází vlivem primárního traumatu k okamžité smrti neuronů a glii s doprovodným klinickým příznakem míšního šoku. K primárnímu mechanickému kompresivnímu poranění míšní tkáně je náchylnější šedá hmota lokalizovaná kolem centrálního míšního kanálku, což je způsobeno především jemnější konzistencí šedé hmoty a vyšší mírou vaskularizace (24). Po mechanickém impaktu vzniká hemoragie do míšní tkáně s lokálním infarktem z poranění cévního zásobení. Udává se, že šedá hmota je ireverzibilně zničena během prvních hodin po primárním poranění, zatímco bílá hmota je více poškozována až následujícími ději sekundárního poranění během dalších 72 hodin. Prakticky ihned po poranění je aktivována mikroglie, která začíná exprimovat zvýšené hladiny IL-1 β a TNF- α (25).

Je také známo, že biomechanika primárního poranění ovlivňuje patofyziologii SCI, kdy celková energie síly způsobující míšní kontuzi koreluje s anatomickou a funkční degenerací. Čím větší kontuzní síla, tím menší je možnost zachování funkční míšní tkáně s následnou možností regenerace (26).

2.2.2 Akutní fáze

Akutní fáze (2 h - 48 h) je charakterizována pokračující hemoragií do kontuzní míšní tkáně s rozvojem ischemických ložisek a nárůstem edematózních změn. Do místa poranění migrují složky imunitního systému s vytvářením zánětlivého prostředí a rozvojem sekundárních procesů zahrnujících tvorbu volných kyslíkových radikálů, akumulaci neurotransmiterů či porušení vnitřního prostředí s iontovou dysbalancí (22). Z klinického hlediska je toto období nejvýznamnější vzhledem k tomu, že je to obvykle čas přijetí pacienta do specializované nemocniční péče s nejvyšší šancí ovlivnění výsledného klinického stavu.

2.2.2.1 Ischemie, hypoxie

U polytraumatizovaných pacientů se současným multiorgánovým postižením s větší krevní ztrátou dochází k hypovolemickému hemodynamickému šoku vedoucímu ke snížené perfúzi míchy s následnou tvorbou ischemických ložisek (27). Následkem traumatu dochází k ruptuře menších intramedulárních cév s následnou extravazací bílých a červených krvinek. Šedá hmota má v porovnání s bílou hmotou pětkrát větší cévní zásobení a je proto mnohem náchylnější k hypoxickým změnám (28). Normální krevní průtok je v bílé hmotě obnoven asi po 15 minutách, zatímco hypoperfúze šedé hmoty trvá minimálně v prvních 24 hodinách (29). Ischemie míšní tkáně vede k buněčné smrti s uvolněním cytoplazmy vedoucí k iontové dysbalanci a glutamátové excitotoxicitě (30). Po obnovení normálního krevního průtoku navíc dochází k reperfúznímu poškození s tvorbou volných kyslíkových radikálů a potenciací zánětlivého prostředí (31, 32).

2.2.2.2 Glutamátová excitotoxicita

Během několika minut po primárním míšním traumatu dochází vlivem buněčného poškození a hypoxicko-ischemických změn k uvolnění většího množství glutamátu kolem synaptických štěrbin. Glutamát reprezentuje hlavní excitační neurotransmitter v centrálním nervovém systému (CNS) (23). Hladina glutamátu dosáhne v extracelulárním prostoru velice rychle neurotoxických hodnot s indukci buněčné smrti (33-36). Při vysokých hodnotách extracelulárního glutamátu jsou aktivovány ionotropní NMDA (N-methyl-D-aspartic acid), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate) a KA (kainic acid) receptory (37). Tyto receptory jsou po aktivaci permeabilní pro Ca^{2+} ionty způsobující tok Ca^{2+} do buňky. Vysoká koncentrace intracelulárního vápníku spolu s další iontovou dysbalancí uvnitř buňky poškozuje citlivé orgány s následující kaskádou dějů indukujících buněčnou smrt (38, 39). Za normálních okolností regulují extracelulární hladiny iontů astrocyty, jejichž struktura je však vlivem peroxidace lipidů po SCI porušena a proto ve své regulační funkci selhávají (32).

2.2.2.3 Iontová dysbalance

Jak již bylo předesláno výše, při kaskádách patologických procesů následujících po míšním traumatu dochází k porušení iontové homeostázy, přičemž k nejdůležitějším změnám patří změny v koncentracích K^+ , Na^+ a Ca^{2+} . Dochází k porušení selektivity iontových kanálů po poškození buněčné membrány peroxidací lipidů spolu s vyšší koncentrací prozánětlivých cytokinů. Zatímco koncentrace Na^+ a Ca^{2+} jsou oproti normálnímu stavu vyšší v buňce, hladiny K^+ a Mg^{2+} jsou zvýšené v mimobuněčném prostoru (40).

Intracelulární koncentrace Ca^{2+} je po SCI zvýšena již za 1 minutu, přičemž maximální koncentrace je dosaženo za 8 hodin od primárního impaktu. Při déletrvajícím vzestupu Ca^{2+} v buňce dochází k poškození především mitochondriálního metabolismu. Vápník vstupuje do mitochondrií pomocí mitochondriálního kalciového uniporteru (MCU) (41, 42). Vysoké koncentrace Ca^{2+} způsobují mitochondriální dysfunkci, acidózu, produkci volných kyslíkových

radikálů a v konečném důsledku aktivací celulárních enzymů nekrózu a apoptózu buňky (43). Pokles mitochondriálního metabolismu se projevuje ve snížení produkce ATP s následným zhroucením ATP-vázaných transportérů, což vede k dalším iontovým změnám (44).

Tok iontů Na^+ do buňky je výsledkem selhání inaktivace Na^+ kanálů spolu se selháním funkčnosti Na^+/K^+ ATPázy (45, 46). Zvýšené hladiny intracelulárního Na^+ vedou k dalšímu pumpování Ca^{2+} do buňky $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transportním mechanismem (47). Spolu s Na^+ vstupuje do buňky také Cl^- a voda, což vede ke vzniku cytotoxického edému (48). Hypernatrémie dále aktivuje Na^+/H^+ výměnu s intracelulární akumulací H^+ vedoucí ke stimulaci fosfolipázové aktivity a nastolení intracelulární acidózy (30, 43). Experimentálním podáváním blokátorů Na^+ kanálů tetrodotoxinu (49, 50), riluzolu (51, 52) a phenytoinu (53, 54) byl potvrzen příznivý efekt na zachování bílé hmoty míšni spolu s funkčním zlepšením neurologických funkcí.

Při disrupci myelinových pochev po primárním traumatu dochází ke změně distribuce a k poškození funkce také iontových K^+ kanálů (55). Porušení iontových K^+ kanálů přispívá k demyelinizaci a poruše vodivosti axonů.

Změna v homeostáze jednotlivých iontů je klíčovým mechanismem vedoucím k porušení vodivé funkce axonů s apoptózou buněk a tím ke zvětšení rozsahu neurologického poškození. Celkově jsou k iontovým změnám náchylnější axony, než těla neuronů, a to vzhledem k vysoké koncentraci napěťově řízených Na^+ kanálů v Ranvierových zářezech (23).

2.2.2.4 Posttraumatický edém míchy

Vznik a postupný nárůst edému v poraněné míše je klinicky velmi významná změna, která vede k sekundárnímu mechanickému poškození neuronů a drobných kapilár, což v důsledku vede ke zhoršení neurologického obrazu (56). Edematózní změny tkáně narůstají z epicentra léze během několika málo minut po primárním poškození, přetrvávají až 14 dnů a mohou přispívat k vytvoření kavit naplněných tekutinou (57). Velikost a lokalizace edematózních změn na zobrazovacích vyšetřeních (MR) koreluje s výsledným neurologickým postižením (58, 59). Narůstající edém je následkem zvýšené kapilární permeability v bezprostřední blízkosti

primárně poškozené míšní tkáň (60). Zvýšená permeabilita je dána jednak poruchou exprese aquaporinů (AQPs) a jednak dysregulací tkáňových faktorů regulujících vaskulární permeabilitu jako je např. VEGF (61, 62). AQPs jsou skupinou transmembránových proteinů usnadňujících transport molekul vody v návaznosti na osmotické změny prostředí a/nebo hydrostatický tlak (63, 64). Doposud bylo objeveno 13 druhů AQPs s různým účinkem (65-67). Edém při míšním poranění je vždy kombinací edému cytotoxického a vazogenního (68).

Cytotoxický edém u SCI, který je vzhledem k senzitivě k hladinám K^+ přítomen více v astrocytech než neuronech, vzniká následkem kombinace účinku lokálních zánětlivých mediátorů, zvýšených hladin kyseliny arachidonové produkované membránovým lipidovým metabolismem, deprivací ATP a zvýšenou expresí AQP 4 (69-72). Vše dohromady vede k dysfunkci Na^+K^+ -ATP pumpy způsobující iontovou dysbalanci vedoucí k nižším koncentracím Na^+ v parenchymu. V důsledku toho dochází k fenoménu „fenestrace“ kapilár s dalším transportem vody přes BSCB (blood-spinal cord barrier) s následujícím vznikem vazogenního edému.

Vazogenní edém je důsledkem rozrušení integrity BSCB. Za normálního stavu molekuly vody, glukózy a některých plasmatických proteinů překračují bariéru jen ve velmi limitovaném množství. Při poranění míšní tkáňe dochází ke zvýšenému prostupování molekul vody do extracelulárního prostoru míšního parenchymu z důvodu rozrušení „tight junctions“ mezi vaskulárními endoteliálními buňkami (VECs) v BSCB a kapilární stěně (73-75).

V současnosti je v klinické praxi k ovlivnění posttraumatického míšního edému využíván methylprednisolon (MP), který také snižuje míru lipidové peroxidace (76). MP je však i léčivem, které má řadu vedlejších účinků, a jehož indikace u míšního poranění zůstává kontroverzním tématem (viz dále). Při ovlivňování posttraumatického míšního edému také byla v nedávné době publikována práce zpochybňující efekt MP ve schopnosti jeho snížení (60).

V rovině experimentálních a klinických zkoušek se při léčbě posttraumatického edému dále zkoumá efekt melatoninu. Melatonin v experimentálních studiích snižuje toxicitu neutrofilů, počet volných kyslíkových radikálů a lipidovou peroxidaci, prostřednictvím snížené exprese

AQP 4 redukuje množství vody v posttraumatické míšní tkáni, což ve výsledku vede ke zlepšené hybnosti parietických končetin ve srovnání s kontrolními skupinami (69, 77, 78).

2.2.2.5 Oxidativní stres

Důležitou roli v patofyziologii sekundárního míšního poškození hraje vznik volných kyslíkatých a dusíkatých radikálů vedoucích k oxidativnímu stresu. Buňky neuronů a glie v míšní tkáni jsou k oxidativnímu stresu více náchylné vzhledem k relativně vysoké koncentraci nenasycených mastných kyselin a většímu počtu mitochondrií. Počet mitochondrií má vliv na vysoký energetický obrat buňky s relativně nízkou schopností antioxidační obrany (79, 80). Volné kyslíkové radikály (Reactive oxygen species, ROS) a volné dusíkaté radikály (Reactive nitrogen species, RNS) jsou generovány během nedokonalé redukce či oxidace kyslíku během aerobního metabolismu. Mitochondriální hyperkalcémie aktivuje nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfát (NADPH) oxidázu s genezí superoxidu elektronovým transportním řetězcem. Porušený transport elektronů mezi kanály I a III vede k mitochondriální dysfunkci a tvorbě většího množství ROS (81, 82). ROS a RNS aktivují cytosolovou poly (ADP-ribózo) polymerázu (PARP). PARP následně spotřebovává NAD^+ , což vede k selhání glykolýzy a depleci ATP vedoucí k buněčné smrti (41). Celý proces urychluje i stav hypermetabolismu, multiorgánového selhání či generalizované infekce se zánětlivou reakcí, které jsou často součástí míšního poranění. Do skupiny ROS patří superoxid (O_2^\bullet), radikál hydroxyly (OH^\bullet), peroxid vodíku (H_2O_2) a nepárový atom kyslíku (O^\bullet). Superoxid se v buňce nachází i za fyziologických podmínek. Tehdy je produkován pomocí enzymu nicotinamid adenin dinucleotid fosfát oxidázy (NADPO) a je využíván k lytickým procesům ve fagocytech (83). Při nadměrné produkci peroxid vodíku proniká buněčnými membránami, je toxický pro procesy v buňce a vzhledem k vysoké reaktivnosti vede ke tvorbě dalších kyslíkatých radikálů (radikál hydroxyly) poškozujících DNA (84-86).

Za fyziologického stavu je v organismu udržována přísná homeostáza hladiny ROS. K udržování množství ROS jsou využívány enzymatické a neenzymatické antioxidační mechanismy (87). Mezi neenzymatické nízkomolekulární antioxidanty patří glutathion, vitamíny C a E či β -

karoten. Enzymy uplatňující se v antioxidační činnosti jsou zejména superoxid dismutáza, kataláza, glutathion reduktáza, glutathion peroxidáza či glutathion S-transferáza, které se využívají pro svou funkci i jako markery při měření míry oxidativního stresu.

Vysoké hodnoty ROS ovlivňují patofyziologické jevy sekundárního míšního poranění přímým i nepřímým mechanismem. Dochází k široké škále oxidativních reakcí ovlivňujících v míšní tkáni především lipidy obsažené v buněčné membráně - nenasycené mastné kyseliny linolenovou, arachidonovou, eicosapentaenoiovou nebo docosahexaenoiovou. Peroxidace těchto nenasycených mastných kyselin vytváří nestabilní lipidové peroxylové radikály, které následně vytváří stabilní či nestabilní koncové produkty. Příkladem stabilního koncového produktu je malondialdehyd obsahující tři atomy uhlíku. Naproti tomu vznikají i vysoce toxické produkty 4-hydroxynonenal nebo 2-propenal (acrolein), které se kovalentně vážou na bazické aminokyseliny (lysin, histidin, arginin, cystein) a tím mění jejich strukturu a biologické vlastnosti vedoucí k porušení mitochondriální bioenergetiky s až nevratným poškozením buňky (88-91).

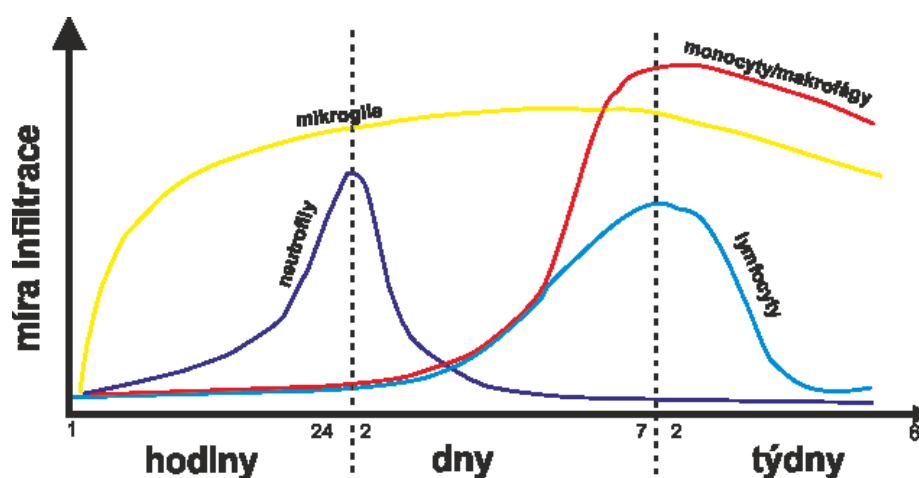
Z látek, které se experimentálně využívají ke snížení volných kyslíkových radikálů, můžeme uvést např. Vitamin E (α -tocopherol) (92), montelukast (93), selegilin ((R) N-methyl-N-(1-phenylpropan-2-yl) prop-1-yn-3-amine) (94), Tetramethylpyrazin (95), kurkumin (96) a mnoho dalších.

2.2.3 Subakutní fáze

Subakutní fáze (2 dny až několik týdnů) je při neléčeném průběhu charakterizována rozšířením postižené míšní tkáně a pokračováním dějů z fáze akutní. Dochází k dalším elektrolytovým posunům, zvětšování míšního edému a nekróze buněk. Hlavním znakem je postupné rozvíjení zánětlivé reakce, která následně zvyšuje tvorbu volných kyslíkových radikálů vedoucí k buněčné apoptóze.

2.2.3.1 Zánětlivá reakce

Rozvoj zánětlivé reakce je komplexním dějem, na kterém se podílí mnoho různých buněk a proteinů. Na poranění nejprve zareagují buňky, které se nacházejí v míšní tkáni - mikroglie, astrocyty, neurony a oligodendrocyty (Obr. 4). Tyto buňky ihned po primárním poranění začínají vytvářet a produkovat prozánětlivé cytokiny, které potencují aktivaci a migraci periferních imunitních složek do místa poranění.



Obr. 4 Ilustrativní obrázek znázorňující postupnou infiltraci poraněné míšní tkáně jednotlivými složkami imunitního systému v řádech hodin, dnů a týdnů. Nejprve na SCI reagují rezidentní buňky míšní tkáně - mikroglie. Následuje infiltrace neutrofilů, monocyto/makrofágového systému a lymfocytů. Volně převzato a překresleno dle Neirincký et al. (97).

Astrocyty

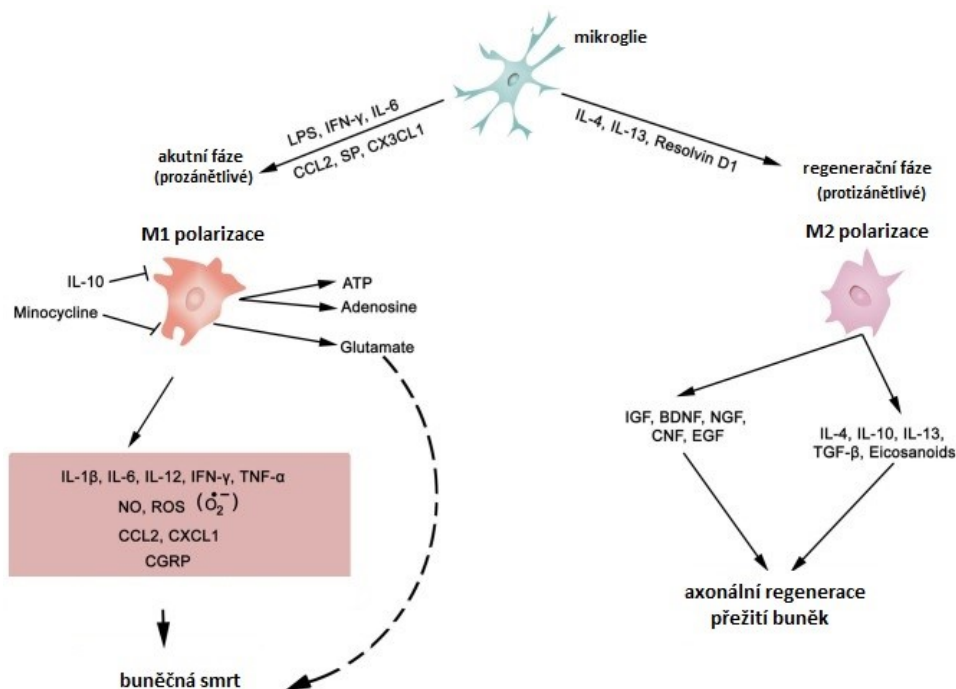
Přestože nejsou astrocyty primárně považovány za buňky účastnící se zánětlivé reakce, svou aktivitou přispívají k zánětlivé odpovědi po SCI změnou exprese intracelulárních signálních drah (98). Po SCI reagují prudkým zvýšením produkce cytokinů (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IFN- γ) a chemokinů (MCP-1, CCL2, CXCL1, CXCL2) a zvyšují expresi ICAM (intracellular adhesion molecule) a VCAM (vascular cell adhesion molecule), které jsou esenciální k extravazaci leukocytů, neutrofilů a makrofágů do zánětlivého prostředí (98-100). Kromě prozánětlivé úlohy v první fázi zánětlivé odpovědi však mají astrocyty v pozdějších fázích i regenerativní účinky v sekreci TGF- β a IL-10 s následnou indukcí M2 makrofágů (101).

Neutrofilly

Z periferní složky imunitního systému vstupují do poraněné míšní tkáně jako první neutrofilly, které dosahují nejvyšších hladin v 24-72 hodinách po poranění (Obr. 4) (102-104). V prvních 12 hodinách po poranění tvoří neutrofilly přes 90 % buněčného infiltrátu v poraněném místě (105). Neutrofilly s sebou nesou řadu oxidativních (NADP oxidáza a myeloperoxidáza) a proteolytických (matrix metalloproteináza-9; MMP-9) enzymů, které rozrušují extracelulární matrix (ECM) a mikrovaskulární strukturu a umožňují tak makrofágům a monocytům transendoteliální migraci (103, 106, 107). Neutrofilly dále sekretují zánětlivé cytokiny a aktivují astrocyty a mikroglie (108). Hlavní úlohou neutrofilů je fagocytóza odumřelé tkáně. I přes jejich aktivaci zánětlivých složek panuje v posledních letech názor, že mají na průběh sekundárního poškození spíše pozitivní účinek. Při experimentální redukci hladin neutrofilů 24 h a 48 h po SCI došlo ke zhoršení neurologického stavu a snížení hladin růstových faktorů FGFs (fibroblastický růstový faktor), VEGFs (vaskulární růstový faktor) a BMPs (kostní morfogenetický protein) (109).

Monocyty/Makrofágy/Mikroglie

Monocyty z periferní cirkulace prostupují do poraněné míšní tkáně zhruba za 2-4 dny, kdy dochází k apoptóze neutrofilů (Obr. 4) (98). Hlavním chemoatraktantem monocytárních buněk jsou MCP-1 (Ccl-2), MIP-1a (Ccl-3) a IL-1 β (110). Monocyty z periferní krve jsou v poškozené míšní tkáni aktivovány na makrofágy a spolu s aktivovanou mikroglíí fagocytují apoptotické neutrofilly (efferocytóza) a tkáňovou debris (111, 112). Přestože makrofágy a mikroglie nesou společné znaky, mají naprosto odlišný původ. Mikroglie jsou imunitní buňky nacházející se v CNS s embryonálním původem z tzv. „žloutkového váčku (Yolk sac)“ (113). Makrofágy jsou odvozeny z krevních monocytů, které pocházejí z buněk kostní dřeně (114). V místě poranění makrofágy infiltrují epicentrum léze, zatímco buňky mikroglie zůstávají spíše na jejím okraji (115). Ve fázi aktivace jsou již od sebe buňky mikroglie a makrofágů morfologicky i imunohistochemicky nerozlišitelné (116). V 72-96 hodinách po míšním poranění tvoří komplex makrofágy/mikroglie až 70% CD45⁺ populace (105). Makrofágy jsou vlivem účinku cytokinů v místě léze polarizovány na tzv. M1 a M2 makrofágy (Obr. 5) (117-119).

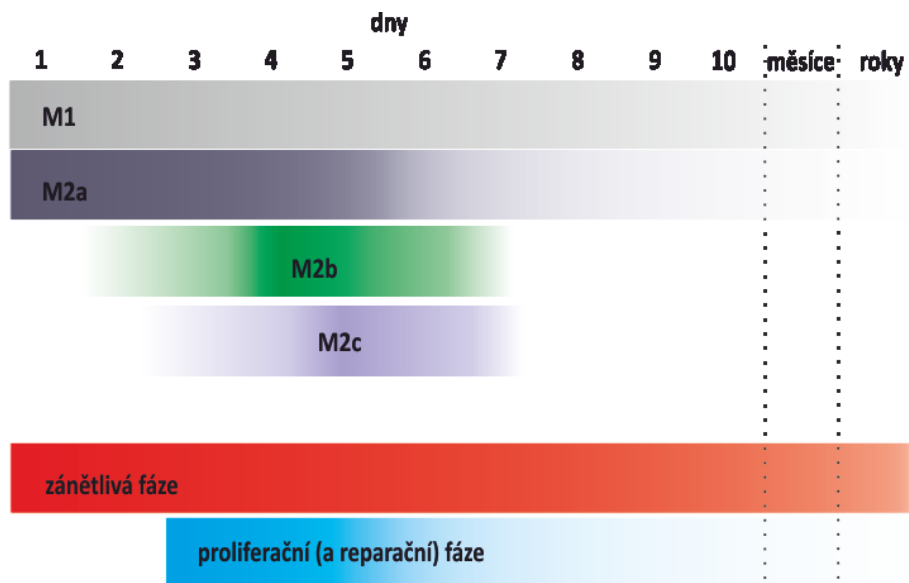


Obr. 5 Ilustrativní obrázek polarizace makrofágů. Makrofágy jsou v akutní fázi polarizovány vlivem prozánětlivých interleukinů IFN- γ a IL-6 na „zánětlivý“ fenotyp M1. V pozdější fázi regenerace převládá sekrece protizánětlivých cytokinů, jejichž vlivem dochází k polarizaci na „regenerační“ fenotyp makrofágů M2. Převzato a upraveno dle publikace Anwar et al. (31).

Zánětlivá odpověď v organismu má typicky průběh ve 3 fázích. Brzká fáze, popisována jako zánětlivá fáze, je charakterizována mohutnou aktivací prozánětlivých M1 makrofágů. V menší míře jsou přítomny i protizánětlivé makrofágy M2a (Obr. 6). Aktivace M1 je doprovázena vysokými hladinami ROS, IL-6, TNF- α , IL-1 β a IL-12 (120, 121). Stimulací imunitního systému potencují fagocytózu nekrotické tkáně. M2a makrofágy podporují regenerační procesy se zvýšenou buněčnou migrací a proliferací při sekreci faktorů arginase-1 a Ym1, protizánětlivých cytokinů (IL-10, IL-4, CD206 a Fizz-1), chemokinů (CCL-17, CCL-18, CCL-22) a růstových faktorů (122, 123).

Následující fáze zánětlivé odpovědi, proliferační fáze, dosahuje svého maxima cca 5 dní po SCI s postupným slábnutím až do 10. dne po SCI (124). V této fázi slábne vliv M1 makrofágů, a naopak většího významu nabývá přítomnost skupiny M2 makrofágů (Obr. 6). Stoupá produkce protizánětlivých cytokinů a růstových faktorů IL-10, TGF- β a Insulin-like faktoru-1 (IGF-1) (125).

M2 makrofágy v této fázi, také charakterizované jako M2b, mají jako hlavní znak sekreci IL-10, s postupným přechodem do M2c typu s rozvinutím regenerační fáze (122). V případě SCI je známo, že hladiny IL-10 po 6. dnu klesají, a proto je správné rozvinutí proliferační a regenerační fáze narušeno (121, 126, 127). V míše přetrvává prozánětlivé prostředí, které dlouhodobě brání regeneraci poškozených axonů.



Obr. 6 Ilustrativní obrázek aktivace a přetrvávání jednotlivých typů makrofágů v míšní tkáni po SCI. Brzká zánětlivá fáze je spojená především s makrofágy typu M1 a M2a, následující reparativní a regenerační procesy jsou spojeny spíše s fenotypem M2b a M2c. Volně překresleno a upraveno dle Gensel et al. (128).

Koncept M1 a M2 makrofágů byl poprvé popsán v roce 2000 Millsem (129). V poslední době se ukazuje, že polarizace mezi M1 a M2 makrofágy je spíše postupný, nežli jednorázový děj (130). Vzhledem k funkci makrofágů v jednotlivých fázích poranění nelze říct, že by přítomnost prozánětlivých makrofágů M1 byla jednoznačně škodlivá. Jde spíše o deregulaci spojenou s dlouhodobou perzistencí v tkáni i ve fázi regenerační, kdy jejich přítomnost přispívá k chronickému zánětlivému stavu, který negativně ovlivňuje neuronální regeneraci (131).

T a B lymfocyty

Lymfocyty představují adaptivní složku zánětlivé odpovědi. Infiltrují místo SCI během prvního týdne po poranění a dlouhodobě přetrvávají v postižené tkáni (132). Podobně jako makrofágy se mohou oba druhy lymfocytů adaptovat různým fenotypem a tímto přispívat jak k zánětlivým, tak reparačním procesům v závislosti na fázi onemocnění (133). Účinky adaptivní složky imunity navíc nejsou omezeny pouze lokálně na míšní tkáň, ale ovlivňují i funkci kardiovaskulárního, renálního a reprodukčního systému (132).

Interleukiny (cytokiny) a chemokiny

Mezi hlavní prozánětlivé interleukiny (IL) patří IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α a IL-18. Exprese interleukinů z rodiny IL-1 (IL-1 α , IL-1 β) má rapidní nástup již v prvních hodinách po poranění s dosažením nejvyšší hladiny po 12 hodinách a hraje tak nejdůležitější roli v nastartování zánětlivé reakce (25, 134-137). TNF- α je v prvních hodinách po poranění uvolňovaný všemi buňkami v CNS. V subakutní fázi je již sekretován pouze aktivovanou mikroglií a makrofágy (138). Zvýšené hladiny TNF- α zvyšují produkci NO (139), indukují zvýšenou infiltraci tkáně neutrofily (140), navozují mikrovaskulární permeabilitu s edémem míchy (141) a konečně významně snižují remyelinizaci a neuroregeneraci (142). Význam IL-6 v zánětlivé reakci je ambivalentní. V akutní fázi je mohutně uvolňován a navazován na receptor IL-6R, který prostřednictvím membránového ligandu rodiny gp130 dále zvyšuje expresi IL-6. Zvýšené hladiny IL-6 atrahují složky zánětlivého systému a zvyšují hladiny neutrofilů (6x) a makrofágů (2x) (143). Na druhou stranu bylo ověřeno, že v chronické fázi zvýšené hladiny IL-6 ovlivňují migraci reaktivních astrocytů a zlepšují regeneraci poškozených axonů (144, 145).

Při regulování zánětlivé reakce se uplatňují i protizánětlivé cytokiny, jejichž exprese je však v brzké fázi míšního poranění potlačena. Mezi studované protizánětlivé cytokiny patří IL-4, IL-10, IL-13, IFN- β , IFN- γ , G-CSF a GM-CSF. IL-4 je produkován aktivovanými T lymfocyty a je asociován s Th2 imunitní odpovědí (146), kdy reguluje aktivaci makrofágů v akutní fázi, řídí produkci M2 fenotypu makrofágů, omezuje tvorbu centrální post-kontuzní kavity a zlepšuje výsledný neurologický stav (147-149). IL-10 je silný protizánětlivý cytokin, který může být syntetizován buňkami monocyto/makrofágového systému, astrocyty nebo mikroglií (150,

151). IL-10 zvyšuje expresi Bcl-2 a Bcl-xl a naopak snižuje produkci TNF- α , IL-1 β a S100 β , čímž podporuje přežívání neuronů (152-155). Protizánětlivý účinek IL-13 spočívá hlavně ve schopnosti polarizace mikroglie a makrofágů směrem k alternativnímu M2a fenotypu (156, 157). Regulační skupina interferonů (IFN- β , IFN- γ) u míšního poranění snižuje peroxidaci lipidů, podporuje sekreci neurotrofních faktorů a moduluje zánětlivou reakci snížením infiltrace místa poranění polymorfonukleárními elementy (158-160). G-CSF a GM-CSF jsou stimulační faktory zabraňující apoptóze neuronů a oligodendrocytů, stimulující angiogenezi, axonální regeneraci a snižující tvorbu gliální jizvy (161-165).

Spolu s cytokiny jsou dalšími důležitými regulačními prvky chemokiny a to zejména MIP-1 α a MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 α and β), MIP-2, MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) a IP10/CXCL10 (interferon-inducible protein 10), které vesměs dosahují nejvyšších hladin v prvních 6 hodinách po poranění (166).

Pomocí cytokinů je regulována infiltrace místa poranění buněčnými složkami imunitního systému.

2.2.4 Chronická fáze

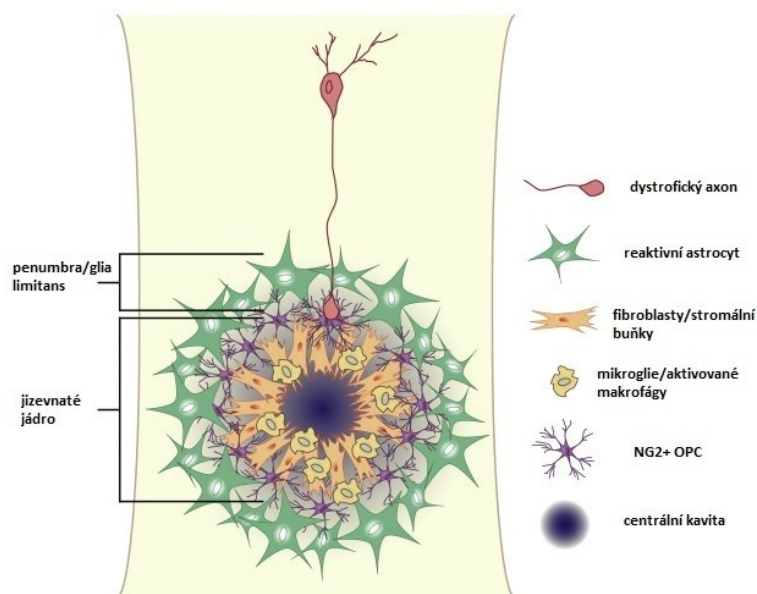
Chronická fáze míšního poranění je konečnou fází nastupující několik týdnů po primárním poranění. V této fázi dochází k dokončení a stabilizaci dějů subakutní fáze - ke stabilizaci gliové jizvy, tvorbě postmalatických pseudocyst a k dokončení axonální demyelinizace a degenerace. Dochází však také ke spontánním regenerativním procesům zahrnujícím remyelinizaci nebo axonální sprouting.

2.2.4.1 Gliová jizva

Tvorba hypertrofické gliové jizvy je považována za vážnou biochemickou a mechanickou překážku při regeneraci míšní neuronální tkáně (167, 168). Po míšním poranění jsou aktivovány astrocyty, pericyty, NG2⁺ oligodendrocytární prekursorů (OPCs) a spolu

s infiltrujícími fibroblasty a Schwannovými buňkami z periferie vytvářejí složku gliové (buněčné) a fibrotické (nebuněčné) jizvy. Jizevnaté jádro je v centru tvořeno migrujícími Schwannovými buňkami a o něco periferněji uloženými fibroblasty. Tyto buňky se pak spojují v neprostupnou síť s lamininem, fibronektinem a kolagenovými depozity (Obr. 7) (169-174). Toto tuhé jádro obsahující složky ECM vytváří neprostupnou bariéru pro regenerující axony (175, 176). V jádře jsou však i další inhibiční komponenty ECM (tenascin, fibronektin, chondroitin sulfátové proteoglykany (CSPGs)) a proteolytické enzymy (177-179), které negativně ovlivňují možnost prorůstání buněk jizvou.

Okolo jizevnatého jádra se shromažďují reaktivní astrocyty, které se v první fázi účastní úklidové reakce poškozené tkáně. Tyto reaktivní astrocyty se po nějakém čase mění na jizvu-tvořící astrocyty, které obklopí tuhé jádro jizevnaté tkáně a demarkují tak tkáň okolní penumbry (glia limitans) (Obr. 7) (180). V poslední době se ukazuje, že je velice důležité tyto dva druhy astrocytů od sebe odlišovat. Reaktivní astrocyty jsou důležitou součástí reparačních procesů a jejich činnost je někdy asociována s přechodným zlepšením neurologických funkcí po neúplné míšňí lézi (181). Naproti tomu jizvu-tvořící astrocyty jsou v chronické fázi míšňího poranění zcela jednoznačně limitujícím faktorem možné regenerace nervové tkáně (182).



Obr. 7 Ilustrativní obrázek buněčného složení gliové jizvy. Jizevnaté jádro je tvořeno především fibroblasty spolu s ECM. Jádro je od zdravé tkáně ohraničeno pomocí glia limitans tvořené reaktivními astrocyty. Převzato a upraveno dle publikace Cregg et al. (183).

Celkový přístup k formaci gliové jizvy se v posledních letech významně změnil. Anderson et al. ve své studii poukázal na nezbytnost přítomnosti gliové jizvy v brzkých fázích po míšním poranění při iniciaci neuroregenerace. Při pokusu o odstranění jizvy byl zaznamenán redukováný axonální sprouting neuronů dorzálního ganglia (184). Přirozený vývoj gliové jizvy tak musí být spíše modulován než úplně odstraněn.

2.2.4.2 Kavitace, syringomyelie

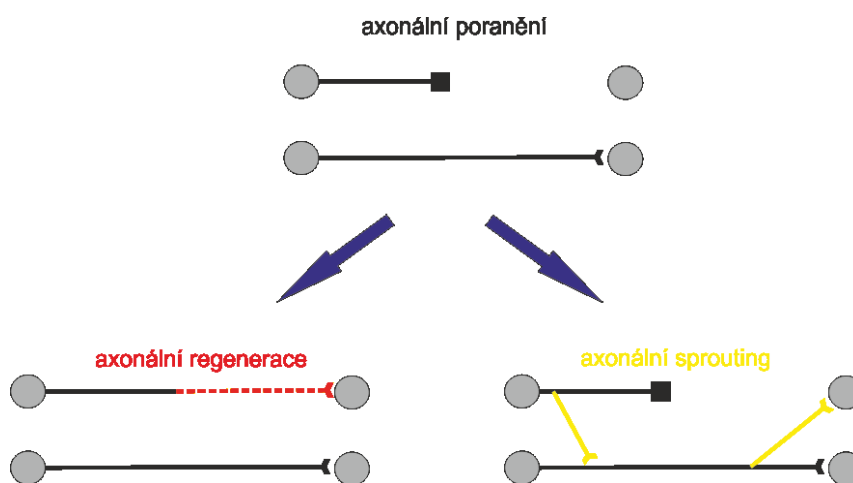
V subakutní fázi poranění jsou následkem degenerace neuronální tkáně tvořeny mechanismem *ex vacuo* formace malých cyst, které jsou vyplněny extracelulární tekutinou, tenkými pruhy pojivové tkáně a makrofágy (104). Postupem času se ve 3-5 % spojují v jednu centrální kavitu, která komunikuje s likvorem centrálního kanálku a přesahuje přes několik míšních segmentů. Tento stav je poté v míše popisován jako syringomyelie s typickými klinickými příznaky. Patofyziologie vzniku syringomyelické dutiny není úplně známa, ale předpokládá se model ventilového mechanismu, kdy dochází k akumulaci mozkomíšního moku (CSF) v parenchymu (185, 186). Posttraumatická kavita brání migraci a prorůstání buněk a tím znemožňuje možnost neuroregenerace (14, 187). Syringomyelická kavita se většinou formuje několik měsíců až let po úraze. V případě progresu velikosti syringomyelie a vzniku klinicky významného myelopatického neurodeficitu přichází v úvahu chirurgické řešení spočívající v operačním zavedení derivace likvoru - shuntu (188).

2.2.4.3 Axonální regenerace a axonální sprouting

Axonální regenerace

Pravou axonální regenerací je myšleno opětovné nastartování růstu poškozených axonů (Obr. 8). Ke studiu axonální regenerace je využíván model transekčního míšního poranění, který zajišťuje kompletní přerušení všech vláken a případně nově zjištěná vlákna naplňují kritéria regenerace dle Stewarda (189). Růst axonů je za normálních okolností inhibován celou řadou

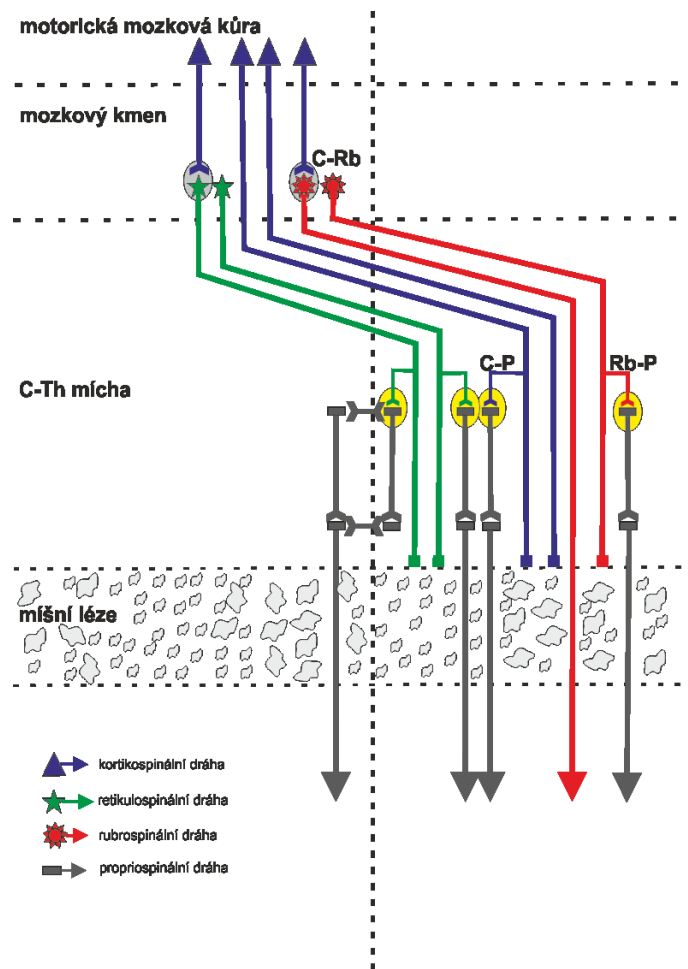
faktorů a molekul. Mezi hlavní faktory patří astrocytární jizva a zánětlivá reakce. Dalším silným inhibičním prostředkem jsou CSPGs. CSPGs (např. neurocan, versican, brevican, phosphacan, a NG2) jsou glykoproteiny extracelulární matrix, které při vyžívání CNS fungují jako regulační a modulační faktory, avšak v dospělosti mají inhibiční vliv na axonální růst, remyelinizaci a vyžívání oligodendrocytů (184, 190). Ve vyžívajících oligodendrocytech jsou pak tvořeny další inhibitory axonálního růstu, jako je myelinový inhibitor Nogo, MAG (myelin-associated glycoprotein) a OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein) (191, 192). Tyto inhibitory se vážou na Nogo receptor a p75 neurotrophin receptor (p75NTR; TNF receptor superfamily member 16), které aktivují RHOA (Ras homolog gene family member A) a Rho-asociovanou proteinovou kinázu (ROCK), které způsobují kolaps růstového konu, axonální retrakci a zvýšené riziko apoptózy (193). Ovlivnění těchto inhibičních molekul a vytvoření pro-regeneračního prostředí podporuje axonální regeneraci. Několik provedených studií potvrdilo přemostění léze nově regenerovanými axony, a to i regenerací dlouhých kortikospinálních či retikulospinálních drah i s následným zlepšením v BBB (Basso, Beattie a Bresnahanovy) skóre (194, 195). Všeobecně je však přijímáno, že počet regenerovaných kortikospinálních vláken je příliš malý na to, aby způsobil funkční zlepšení, a proto se uvažuje o jiných mechanismech v rámci propriospinálních drah a plasticity autonomních generátorů pohybu (CPG) (196). Nutno také podotknout, že řada studií v pokusech o vytvoření funkčního přemostění léze neuspěla, když regenerující axony prorůstaly pouze v rámci hydrogelu (197).



Obr. 8 Schematické vyobrazení rozdílu mezi axonální regenerací a axonálním sproutingem.

Axonální sprouting

Axonální sprouting (pučení) představuje alternativní cestu k neuroregeneraci poškozených axonálních drah (Obr. 8). Pučením je pojmenován růst axonů z poškozených i nepoškozených neuronů a vytváření nových funkčních synapsí. V poslední dekádě bylo dokázáno, že mnoho těchto nově vzniklých synapsí je tvořeno s propriospinálními neurony. Propriospinální dráhy jsou vzestupné i sestupné míšní dráhy, které přes interneurony spojují jednotlivé části míchy. Mezi hrudní a bederní části míchy lze rozlišit dlouhé a krátké ascendentní i descendentní dráhy (198). Různými druhy léčby lze docílit signifikantního zvýšení kolaterálního sproutingu vedoucího k funkčnímu zlepšení (199, 200). Nově utvořené synapse mezi porušenými drahami a propriospinálními drahami mohou vytvořit funkční motorické spojení mezi supraspinálními strukturami a motoneurony pod místem léze (Obr. 9) (201-203).



Obr. 9 Ilustrativní obrázek inkompletní míšní léze s nově vytvořenými kolaterálními drahami. Při vysokoenergetickém traumatu jsou k poranění náchylnější dlouhé motorické dráhy, které posléze mohou pomocí kolaterálního axonálního sproutingu vytvářet nové funkční synapse s neporušenými axony. V nedávné době bylo dokázáno funkční přenesení motorických povelů pod místo léze skrze kortikospino-retikulospinální (C-Rs) (204), kortikospino-rubrospinalní (C-Rb) (205), retikulospino-propriospinalní (R-P) (206) a kortikospino-propriospinalní (C-P) (201) dráhu jako následek kompenzačního axonálního sproutingu po míšním poranění.

3. Klinické projevy poranění míchy

3.1 Klinické hodnocení stupně postižení

Klinické zhodnocení tíže míšní léze zahrnuje hlavně testování motorických a senzorických funkcí. Jedním z prvních široce užívaných klasifikačních systémů je Frankelova škála (207) (Tab. 3). Klasifikace dle Frankela se však časem ukázala jako subjektivní a nepřesná, protože nespécifikovala lokalizační úroveň ztráty míšních funkcí a pouze vágně definovala motorické funkce jako užitečné vs. neužitečné.

Frankel A	Kompletní míšní léze („Complete“)	Bez motorické a senzorické funkce pod oblastí léze
Frankel B	Pouze senzorické funkce („Sensory only“)	Bez motorické funkce, zachovalé některé senzorické funkce pod oblastí léze
Frankel C	Nevyužitelné motorické funkce („Motor useless“)	Zachovalé některé motorické funkce bez praktického využití
Frankel D	Využitelné motorické funkce („Motor useful“)	Zachovalé motorické funkce pod oblastí léze s praktickým využitím
Frankel E	Normální funkce („Recovery“)	Zachovalé motorické i senzorické funkce, mohou být abnormality v reflexech

Tab. 3 Hodnocení stupně míšní léze dle Frankela.

V roce 1982 proto Americká společnost pro míšní poranění (ASIA) představila mezinárodní standardy pro neurologickou klasifikaci míšního poranění, která se následně stala podkladem pro ASIA klasifikační systém v dnešní podobě (208). ASIA standardizované vyšetření se sestává z motorického vyšetření jednotlivých myotomů, senzorického vyšetření jednotlivých dermatomů a anorektálního vyšetření. Motorické vyšetření svalových funkcí je bodováno v rozmezí 0-5, vyšetření citlivosti je bodováno hodnotami 0-2 a anorektální zkouška 0-1. Na základě těchto vyšetření ASIA zhodnocuje neurologické funkce po míšním poranění jako normální, inkompletně ztrátové nebo kompletně ztrátové (Obr. 10).

INTERNATIONAL STANDARDS FOR NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY (ISNCSCI) ASIA

Patient Name _____ Date/Time of Exam _____
 Examiner Name _____ Signature _____

RIGHT MOTOR KEY MUSCLES: C2, C3, C4, C5 (Elbow flexors), C6 (Wrist extensors), C7 (Elbow extensors), C8 (Finger flexors), T1 (Finger abductors), T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, L1, L2 (Hip flexors), L3 (Knee extensors), L4 (Ankle dorsiflexors), L5 (Long toe extensors), S1 (Ankle plantar flexors), S2, S3, S4-5 (VAC)

LEFT MOTOR KEY MUSCLES: C2, C3, C4, C5 (Elbow flexors), C6 (Wrist extensors), C7 (Elbow extensors), C8 (Finger flexors), T1 (Finger abductors), T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, L1, L2 (Hip flexors), L3 (Knee extensors), L4 (Ankle dorsiflexors), L5 (Long toe extensors), S1 (Ankle plantar flexors), S2, S3, S4-5 (DAP)

SENSORY KEY SENSORY POINTS (Light Touch (LT), Pin Prick (PP))

RIGHT TOTALS (MAXIMUM) (50) (56) (56)
LEFT TOTALS (MAXIMUM) (50) (56) (56)

MOTOR SUBSCORES
 UER + UEL = UEMS TOTAL (25) (25)
 LER + LEL = LEMS TOTAL (25) (25)

SENSORY SUBSCORES
 LTR + LTL = LT TOTAL (56) (56)
 PPR + PPL = PP TOTAL (112) (112)

NEUROLOGICAL LEVELS
 1. SENSORY R L
 2. MOTOR R L

3. NEUROLOGICAL LEVEL OF INJURY (NLI)

4. COMPLETE OR INCOMPLETE?
 Incomplete - Any sensory or motor function in S4-5

5. ASIA IMPAIRMENT SCALE (AIS)

ZONE OF PARTIAL PRESERVATION
 All complete levels only. Most caudal level with any preservation.

SENSORY R L
MOTOR R L

ASIA Impairment Scale (AIS)
A = Complete. No sensory or motor function is preserved in the sacral segments S4-5.
B = Sensory Incomplete. Sensory but not motor function is preserved below the neurological level and includes the sacral segments S4-5 (light touch or pin prick at S4-5 or deep anal pressure) AND no motor function is preserved more than three levels below the motor level on either side of the body.
C = Motor Incomplete. Motor function is preserved at the most caudal sacral segments for voluntary anal contraction (VAC) OR the patient meets the criteria for sensory incomplete status (sensory function preserved at the most caudal sacral segments (S4-S5) by LT, PP or DAP), and has some sparing of motor function more than three levels below the ipsilateral motor level on either side of the body. (This includes key or non-key muscle functions to determine motor incomplete status.) For AIS C - less than half of key muscle functions below the single NLI have a muscle grade \geq 3.
D = Motor Incomplete. Motor incomplete status as defined above, with at least half (half or more) of key muscle functions below the single NLI having a muscle grade \geq 3.
E = Normal. If sensation and motor function as tested with the ISNCSCI are graded as normal in all segments, and the patient had prior deficits, then the AIS grade is E. Someone without an initial SCI does not receive an AIS grade.
Using ND: To document the sensory, motor and NLI levels, the ASIA Impairment Scale grade, and/or the zone of partial preservation (ZPP) when they are unable to be determined based on the examination results.

REV 11/15

Obr. 10 Klasifikační schéma při vyšetření pacienta s míšní lézí dle ASIA.

Kromě významu diagnostického má však ASIA skórovací systém také význam prognostický (209, 210). Van Middendorp ve svých publikacích dokumentoval, že zatímco pacienti vedení jako AIS D mají 97,3% šanci propuštění do ambulantní péče, tak pacienti vedení jako AIS A budou v 91,7 % případů odkázáni na trvalou hospitalizační péči.

3.2 Míšní šok

Termín míšní šok poprvé použil v roce 1840 Hall, který popsal sníženou svalovou iritabilitu a vymizení šlachových reflexů v úrovni pod míšní lézí (211). V současné době se termín míšní šok používá pro dva zcela odlišné klinické jevy - celkovou hypotenzi (šok) a dočasnou ztrátu všech nervových funkcí pod místem míšní léze.

3.2.1 Hypotenze - neurogení šok

Hypotenze po míšním poranění má pravděpodobně několik možných příčin. Mezi nejpravděpodobnější patří sekundární hypovolemie při krevní ztrátě, relativní hromadění žilní krve v paralyzovaném atonickém svalstvu a bradykardie. Významná je také generalizovaná vazodilatace při ztrátě sympatického tonu (neurogení šok) (212, 213). Neurogení šok se vyskytuje prakticky pouze u míšní léze lokalizované nad úrovní obratle Th6, protože nad touto úrovní se formují splanchnické nervy, které ovlivňují vaskulární tonus. Neurogení šok se vyskytuje u cca 20 % pacientů s krční míšní lézí, bradykardie je pak přítomna prakticky u všech pacientů s těžkým poškozením krční míchy (214).

3.2.2 Dočasná ztráta neurologických funkcí

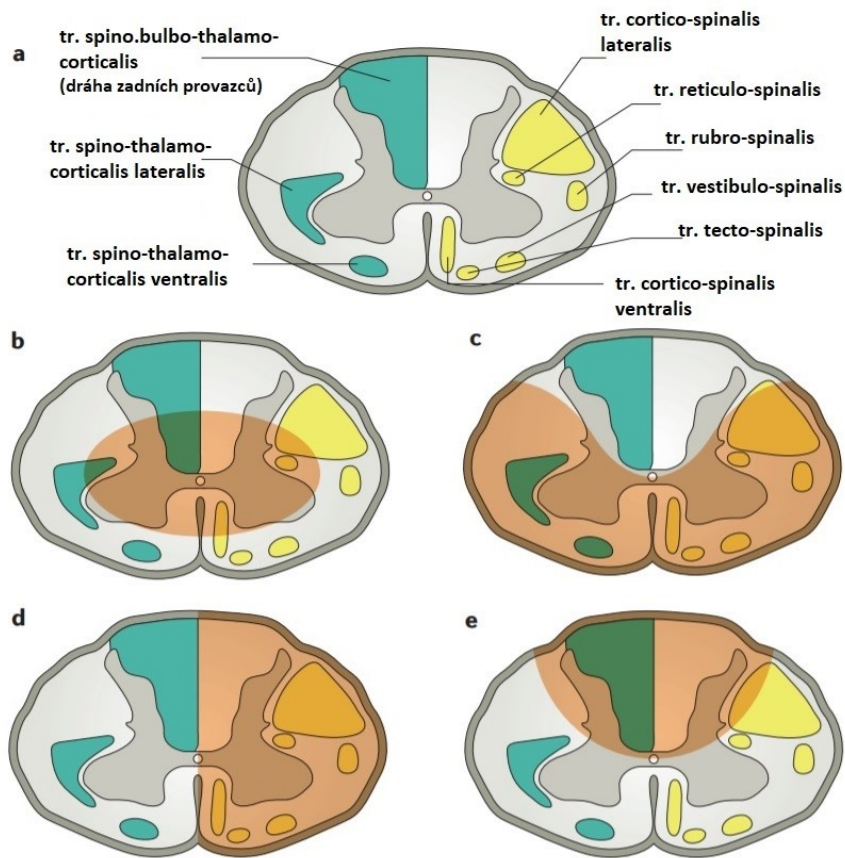
Těžké poranění míchy je charakterizováno úplnou, nebo skoro úplnou ztrátou motorických a sensorických funkcí pod místem léze. Tento stav je dále doprovázen ztrátou svalového tonu a absencí povrchových i hlubokých šlachových reflexů. Tento jev je definován jako míšní šok. Klasicky se míšní šok dělí do 4 fází - fáze areflexie/hyporeflexie, fáze návratu reflexů a fáze brzké a pozdní hyperreflexie (215). Ztráta reflexů, která je spíše patofyziologickým vyústěním poškození míšní tkáně než anatomickým, má obraz těžké chabé svalové paraparézy až paraplegie. Při elektrofyziologických studiích je nacházena nevýbavnost tibiálního H-reflexu a F-vlny (216). Při typickém projevu míšního šoku je ztráta i reflexů sakrální míchy, což zahrnuje ztrátu análního a bulbokavernózního reflexu. Ztráta reflexů se však nevyskytuje absolutně, jsou popsány případy úplné míšní léze s iniciálním zachováním těchto reflexů (217, 218). Dále mohou být tyto reflexy často zachovány u vysokých krčních lézí, kdy však v průběhu hodin či dnů po primárním poranění většinou nakonec vymizí. Po iniciální fázi areflexie dochází v závislosti na míře míšního poškození k různé obnově nervových funkcí a reflexů (219). Míšní šok může přetrvávat dny až týdny, přičemž průměrná doba trvání je 4-6 týdnů a je závislá na celkovém poškození míchy. Definice konce míšního šoku není zcela jasně daná, většina autorů se však shoduje, že míšní šok je ukončen znovunastolením hlubokých šlachových reflexů,

bulbokavernózního reflexu, obnovením funkce detrusoru močového měchýře a přechodem chabé paraplegie (paraparézy) do spastické.

Patofyziologie míšního šoku není dosud zcela jasně objasněna. Bylo publikováno několik teorií, které zahrnují biochemické změny na synapsích neuronů pod lézí, jako je akumulace vysokých hladin glycinu, který je hlavním inhibičním neurotransmiterem (220-222) a jehož hodnoty jsou zvýšené po SCI až čtyřikrát. Takto zvýšené hladiny také souvisí se vznikem chabé paraplegie (paraparézy) po odeznění šoku. Dalším možným mechanismem podílejícím se na vzniku míšního šoku je hyperpolarizace míšních motoneuronů (223, 224) a dysregulace descendentních míšních drah (kortikospinálních, rubrospinálních, vestibulospinálních a retikulospinálních) spojená se zvýšenou lokální segmentální inhibicí motoneuronů (225, 226). Zajímavostí je také přítomnost tzv. Schiff-Sheringtonova fenoménu, kterým je pojmenovaná skutečnost snížených až vymizelých šlachových reflexů spojených s místy nad původní lézí.

3.3 Syndromy míšní léze

Při úrazu míchy určuje výsledný klinický obraz kromě výšky léze také stupeň poškození míšní tkáně. Při úplném přerušení funkčních drah mluvíme o kompletní míšní lézi. Při neúplném přerušení se jedná o inkompletní míšní lézi. Vzhledem k topologii funkčních drah v míše lze inkompletní míšní lézi rozdělit do několika typů, které se vyznačují typickým klinickým obrazem pacienta (Obr. 11 A). Rozdělení vyplývá z anatomického cévního zásobení, kdy při poškození přívodné tepny vzniká infarkt v místě zásobení. Nejčastějším typem je syndrom centrální míšní šedi, kdy při hyperextenčním mechanismu poranění u spondylofytický degenerované páteře dochází k ischemii nejhůře cévně zásobené oblasti kolem centrálního kanálku (227, 228) (Obr. 11 B). Podobným klinickým obrazem se manifestuje i rostoucí syringomyelická kavita. U traumatické dislokace těla obratle do míšního kanálu dochází k syndromu přední míšní arterie s postižením především kortikospinální dráhy (Obr. 11 C). K dalším, již méně častým, syndromům patří syndrom míšní hemisekce (Brown-Séquardův) (Obr. 11 D) a syndrom zadní míšní arterie (Obr. 11 E).



Obr. 11 Ilustrativní obrázky míšních syndromů. Poranění v různých částech míchy vyústí v klinické syndromy vyplývající z anatomie uložení míšních drah (A). Nejčastěji se vyskytující syndromy zahrnují centrální syndrom (B), syndrom přední míšní arterie (C), syndrom míšní hemisekce (D) a syndrom zadní míšní arterie (E). Převzato a upraveno dle publikace Ahuja et al. (229).

4. Léčba

První léčebná opatření jsou prováděna již při podezření na poranění páteře v přednemocniční fázi. Poranění páteře se vyskytuje až u 30 % pacientů s polytraumatem (230). Při známkách poranění páteře by mělo být vždy přistoupeno k externí stabilizaci vakuovou matrací s krčným límcem a implementována strategie minimální manipulace s poraněným společně s jeho rychlým transportem do spádového traumacentra.

4.1 Konzervativní a chirurgická léčba zlomenin Th-L oblasti páteře

Při léčbě zlomenin Th-L oblasti páteře se sleduje jako hlavní cíl bezpečnost léčby vzhledem k udržení pacienta při životě, zabránění poškození nervových struktur, znovunastolení mechanické stability rekonstrukcí anatomických poměrů páteře a navrácení pacienta do běžného pracovního života brzkou mobilizací a rehabilitací. Strategie léčby závisí hlavně na posouzení stability poškozeného segmentu a dále na přítomnosti neurodeficitu. Dle typu zlomeniny se následně zvažuje konzervativní symptomatická terapie nebo operační stabilizace s/bez dekomprese nervových struktur.

Konzervativní léčba je indikována u většiny méně závažných kompresivních zlomenin Th-L oblasti páteře, a to při absenci neurologického deficitu, vyloučení instability a kompresi přední hrany obratle do 25 % jeho původní výšky. Stabilita je posuzována na základě integrity diskoligamentózního komplexu, závisejícího zejména na lig. supraspinosus, lig. interspinosus, lig. flavum a kloubním pouzdru intervertebrálního kloubu (8, 231, 232). Podezření na rupturu vazů lze vyjádřit při zvětšené distanci mezi procc. spinosi a diastáze kloubních facet na RTG snímku či CT vyšetření. Lepší obraz o stavu měkkotkáňových struktur pak lze získat pomocí vyšetření MR, kdy je suspekce na poranění dána zvýšeným signálem na T2 vážených sekvencích při potlačení tukového signálu. MR vyšetření má při porovnání s intraoperačním nálezem vysokou specifitu i senzitivitu (233-237). Konzervativní léčba spočívá v intenzivní léčbě bolesti a po krátkém období klidového režimu v brzké mobilizaci. Je vyžadována spolupráce pacienta při plnění režimových opatření, fyzioterapeuta a praktického lékaře.

Pacient je v pravidelných intervalech kontrolován jak klinicky, tak radiologicky. Klasicky je doporučováno nošení externího fixačního korzetu jako prevence kyfotizace. V poslední době je však účinek korzetu zpochybňován na základě studií, které neprokázaly žádný pozitivní účinek ve srovnání s jeho nenošením (238-240). V přirozeném vývoji zlomeniny je vždy pozorována jistá míra kyfotizace, která však u většiny pacientů s kyfotizací do 30 stupňů nekoreluje s mírou klinických obtíží (241-243).

Chirurgická léčba zlomenin spočívá v instrumentované repozici a stabilizaci postiženého segmentu s ev. doplněním o dekompresi nervových struktur a fakultativním provedením meziobratlové fúze. Přestože se často kritéria k operační léčbě překrývají s konzervativní léčbou, všeobecně přijímanými indikacemi k chirurgické léčbě jsou: otevřené poranění páteře, inkompletní či progresivní neurologický deficit, míšní komprese, dislokace fragmentů, kyfóza větší než 30°, nestabilní zlomenina a nutnost brzké mobilizace. Při kompresi míšní tkáně obratlovými fragmenty je nutné provést dekompresi páteřního kanálu. Dekomprese se provádí buď nepřímá (distrakce, ligamentotaxe) nebo přímá (laminektomie/korporektomie/odstranění fragmentu kosti). Při přítomnosti neurologického deficitu je doporučováno provést dekompresní operaci časně (<24 hod), kdy je dosaženo významně lepších funkčních výsledků při porovnání s dekompresí odloženou („time is spine“) (244). Na většině pracovišť je dekompresní operace prováděna urgentně ve chvíli, kdy je pacient schopen podstoupit celkovou anestezii s operačním výkonem (245, 246).

Při chirurgickém řešení zlomenin Th-L oblasti páteře je popsáno několik operačních technik zahrnující páteřní přístupy zadní, přední nebo kombinované. Žádné studie porovnávající jednotlivé přístupy zatím nebyly provedeny, proto volba přístupu závisí především na přítomné patologii a strategii operátora tak, aby byla provedena dostatečná repozice a stabilizace páteře společně s co nejmenším zatížením pacienta možnými komplikacemi.

Zadní transpedikulární fixace je nejčastější volbou pro většinu zlomenin oblasti Th-L páteře. Provádí se z klasické „mid-line“ incize a bilaterální separace paravertebrálního svalstva. Alternativním, a o něco šetrnějším způsobem je pak přístup dle Wiltseho skrze transmuskulární septum, které běží mezi m. longissimus a m. multifidus (247, 248). V obou případech však dochází při použití retraktorů během operace k těžkému poškození zejména

m. multifidus (249). Mezi výhody zadního transpedikulárního patří dobrá korekční možnost redukce kyfózy a relativně bezpečná trajektorie pro zavádění šroubů, naopak k nevýhodám patří vyšší možnost infekce, selhání instrumentace, vznik pseudoartrózy, vyšší krevní ztráta a riziko nutnosti extrakce instrumentaria (250-253). Transpedikulární trajektorie pro zavádění šroubu je možná také v rámci mini-invazivního perkutánního přístupu.

Technika mini-invazivního perkutánního zavádění pedikulárních šroubů byla poprvé popsána Magerlem v roce 1984, kdy byla použita k externí fixaci zlomeniny (254). Postup perkutánní vnitřní fixace zlomeniny obratlů pomocí pedikulárních šroubů, její indikace a techniku pak poprvé publikoval Assaker v roce 2004 (255). Při této technice nedochází k separaci paravertebrálního svalstva a inserce pedikulárního šroubu se děje pomocí speciálního instrumentaria skrze krátký řez kůží, podkožím a fascií za skiaskopické kontroly. Výhodou mini-invazivního perkutánního přístupu je nižší intraoperační i postoperační krevní ztráta, šetrnější přístup k paravertebrálnímu svalstvu a z toho plynoucí nižší riziko rané infekce (256).

Rekonstrukce předního obratlového pilíře je využívána v případech roztržení obratlového těla („A4 - complete burst fractures“). Fixace je prováděna pomocí expandibilního implantátu nahrazujícího opěrnou funkci předního sloupce s případným doplněním o dlahy se šrouby, které jsou zaváděny do sousedních obratlových těl. Indikací k přední nebo kombinované fixaci zlomeniny jsou nemožnost repozice úlomku obratle z kanálu zadním přístupem a kyfotizace segmentu. Korekce kyfózy je signifikantně lepší u pacientů po rekonstrukci předním přístupem (257). Biomechanické studie také dokázaly lepší mechanickou stabilitu než u pouhé zadní stabilizace (258, 259). Na druhé straně však stojí zvýšená morbidita při transtorakálním přístupu, která může dosahovat až 26 % (260). V poslední době je však rozvoj mini-invazivních technik transtorakálního přístupu, které riziko závažné morbidity významně snižují (261).

4.2 Farmakoterapie

4.2.1 Antiedematózní terapie - kortikoidy

Methylprednisolon (MP) je syntetický glukokortikoid, který byl po dlouhou dobu považován za vysoce efektivní lék při terapii sekundárního míšního poranění. Hall et al. přisuzoval MP efekt na redukcí míry oxidativního stresu a tím na snížení peroxidace lipidů (262). V roce 1984 proběhla první multicentrická randomizovaná studie která u 330 pacientů porovnávala vysoké (1000 mg bolus + 250 mg á 6 hod po dobu 10 dní) a nízké (100 mg bolus + 25 mg á 6 hod po dobu 10 dní) dávkování - NASCIS I (National Acute SCI Study phase I). Vzhledem k názoru nepostradatelnosti podání kortikoidu nebyla zahrnuta kontrolní skupina. Více než 70 % pacientů bylo zlepšeno, avšak studie neodhalila rozdíl ve výsledném klinickém neurologickém obraze pacientů mezi jednotlivými skupinami, a naopak poukázala na vyšší výskyt raných infekcí, sepse, plicní embolie a konečně i smrti ve skupině s vyšším dávkováním (263).

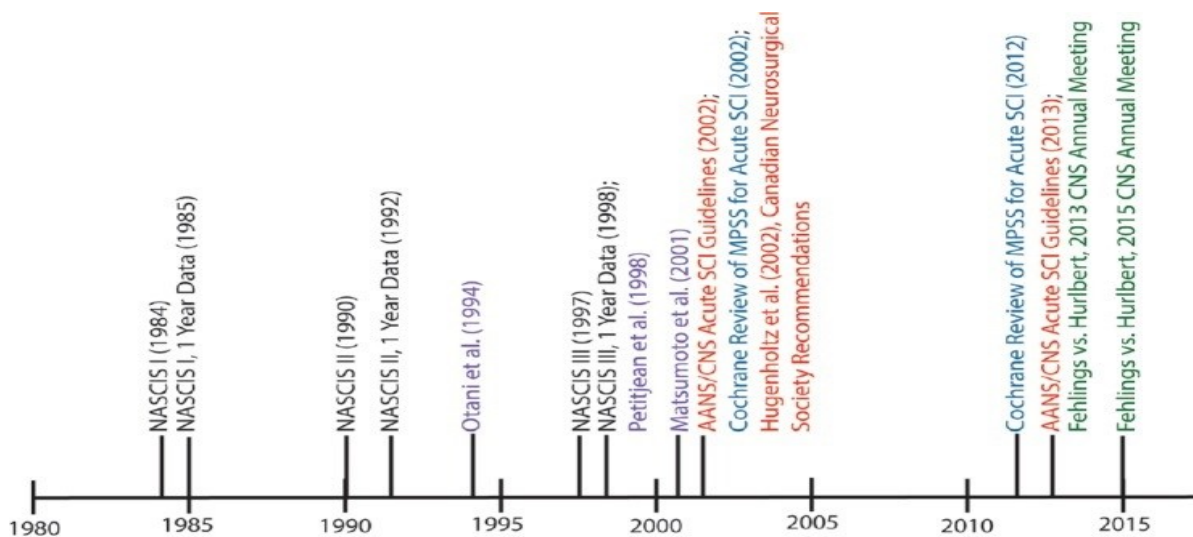
V roce 1990 proběhla studie NASCIS II, který porovnávala MP (30 mg/kg bolus + 5,4 mg/kg/hod po dobu 23 hod), naloxon (5,4 mg/kg + 0,5 mg/kg/hod po dobu 23 hod) a placebo. Při zhodnocení po 1 roce od započetí léčby nebyly nalezeny mezi skupinami žádné signifikantní rozdíly. Teprve následná post-hoc analýza identifikovala podskupinu pacientů zlepšených o 5 bodů v ASIA skórovacím systému po 6 měsících od započetí léčby při podání MP v prvních 8 hodinách po SCI (264). Tyto sekundární výsledky však byly v dalších letech významně zpochybněny pro nehomogenost jednotlivých skupin, uvádění výsledků pouze z pravé poloviny těla a v selhaných pokusech při reprodukci výsledků (265).

NASCIS III v roce 1997 zkoumal efekt prodlouženého podávání MP na 48 hodin, avšak opět nebyl nalezen žádný rozdíl mezi skupinami. Po skončení studie pak byl nahlášen vyšší výskyt těžké pneumonie u pacientů s prodlouženým podáváním (266).

Na základě výše uvedených studií vydala americká asociace neurochirurgů (AANS/CNS) v roce 2002 závazné doporučení (guideline) navrhuující léčbu MP v prvních 24 nebo 48 hodinách jako metodu volby při souběžném posouzení možných vedlejších účinků (267).

V roce 2012 byla nadací Cochrane provedena metaanalýza studií NASCIS a dalších dvou studií se stejným léčebným protokolem. Studie dospěla k výsledku, že vysoké dávky MP podávané po dobu 24 hodin vedou ke zvýšení ASIA skóre o 4 body při porovnání s placebem. Co se týče nežádoucích účinků, byly objeveny pouze nesignifikantní trendy ve zvýšení gastrointestinálního krvácení a rizika infekce rány (268). Po publikaci těchto výsledků začal být MP rutinně využíván u všech pacientů s SCI přijatých do 8 hodin od úrazu, což následně vedlo k široké kritice toho přístupu vyvrcholené vydáním revidované verze závazného doporučení (guideline) AANS/CNS, která již podávání MP při SCI nedoporučuje (Obr. 12) (269).

Vzhledem k výše uvedeným faktům zůstává využívání MP v léčbě SCI velmi kontroverzním tématem (270, 271). Většina současných neurochirurgů se v otázce podávání MP přiklání k vysoce selektivnímu přístupu závislém na konkrétním pacientovi s uvážením dostupné evidence všech rizik i benefitů.



Obr. 12 Přehledná časová osa vydaných stěžejních publikací a závazných doporučení pro využívání terapie methylprednisolonem (272).

4.2.2 Podpůrná léčba

Pacient s potvrzeným míšním poraněním by měl být léčen na jednotce intenzivní péče s personálem vyškoleným v této problematice. Brzké rozpoznání a řešení možných

systemových komplikací po SCI (hypoxie, hypotenze, plicní dysfunkce, oběhová nestabilita) má zcela jistě příznivý dopad na sekundární míšňní poranění a vede k lepší rekonvalescenci (29, 57). Řešení hypotenze jako průvodního jevu SCI je esenciální k udržení dostatečné perfúze míšňní tkáně. Dle závazného doporučení AANS/CNS z roku 2013 je doporučeno udržovat MAP (střední krevňní tlak) mezi 85-90 mmHg v prvních 7 dnech po SCI (273, 274). Dále je nutná dostatečná oxygenoterapie k dosažení $SpO_2 \geq 90\%$ a profylaxe hluboké žilňní trombózy.

4.3 Rehabilitační léčba

Nedílnou součástí terapie při snaze o dosažení co nejlepšího funkčního výsledku je rehabilitace. V akutním a subakutním stadiu je rehabilitace zaměřena především na předcházení komplikací, které mohou při těžkém postižení nastat. Pasivním cvičením s končetinami lze předejít svalovým kontrakturám, zatuhnutí kloubů, svalovým atrofiím, dekubitům a částečně i svalové bolesti. Dechová cvičení jsou zaměřena na edukaci a motivaci pacienta k zapojení jiných svalových skupin k předejití snížení celkové plicňní kapacity. Při započetí rehabilitační léčby jsou definované cíle v závislosti na stupni postižení. Pacienti s lézí nad C3 (pentaplegie) jsou odkázáni na podpůrnou ventilaci. Při lézi v úrovni C4 (tetraplegie) je cílem zajištění spontánní ventilace. Pacienti s lézí C5 mají zachovalou flexi v lokti a po dostatečné rehabilitaci zvládají ovládat elektrické křeslo joystickem. Rehabilitace pacientů s lézí C6 je cílena k posílení extenze zápěstí s facilitovaným úchopem s následným zvládním základňních hygienických potřeb. Pacienti s lézí pod C7-8 (paraplegie) jsou po edukaci a rehabilitaci schopni zvládat většinu základňních potřeb, ovládní manuálního pojízdného křesla s přesunem mezi sedadly, mohou využívat speciálně upravená osobňní vozidla. Pacient je zaučen v intermitentňní katetrizaci močového měchýře a využívání speciálních inkontinenčních pomůcek.

4.4 Experimentální léčba míšní léze

Vzhledem k neuspokojivým klinickým výsledkům při dosavadní dostupné léčbě SCI a následnému ekonomickému dopadu je výzkum nových léčebných metod v popředí zájmu experimentální medicíny. Jak již bylo vysvětleno, hlavním důvodem výsledného neurologického deficitu je vedle přímého poranění také ztráta míšní tkáně v důsledku sekundárních procesů po poranění. Experimentální léčba je proto zaměřena hlavně na možnosti ovlivnění patologicky zvýšené zánětlivé reakce a na nahrazení a regeneraci funkční nervové tkáně. V experimentálním výzkumu se využívají buněčné a nebuněčné přístupy. Mezi buněčné patří hlavně vývoj v oblasti kmenových buněk, které se podle typu mohou uplatňovat při záchraně, ale i při náhradě neuronů. K vytvoření nových neuronů po transplantaci se využívají před-diferenciované neuronální kmenové buňky, derivované z embryonálních nebo indukovaných pluripotentních buněk. U kmenových buněk non-neuronálního typu (mezenchymální kmenové buňky) se využívá jejich parakrinního sekrečního působení a tím ovlivňování buněk zodpovědných za patologicky zvýšenou zánětlivou reakci. K nebuněčným přístupům patří vývoj materiálů, které se využívají k přemostění léze a vytvoření vhodného prostředí k prorůstání poškozených axonů. Tohoto principu využívají různé typy hydrogelů nebo polymerů a na podobném principu jsou založeny i mikročipy.

4.4.1 Kmenové buňky

Při snaze o snížení negativního vlivu sekundární fáze míšního poranění, a naopak při podpoře endogenních regeneračních procesů jsou využívány různé druhy kmenových buněk. Kmenové buňky mají unikátní vlastnost generovat při svém dělení jak dceřinou kmenovou buňku, tak funkční progenitorovou buňku. Tímto asymetrickým dělením zachovávají svou linii jsou do určité míry buňkami „nesmrtelnými“. Kmenové buňky můžeme rozdělit dle potenciálu dceřiných buněk na totipotentní (možnost diferenciaci do všech typů somatických buněk včetně buněk embrya), pluripotentní (možnost diferenciaci do buněk všech 3 zárodečných listů) a multipotentní (možnost diferenciaci do unipotentních somatických prekurzorů). Kromě možné funkce přímé náhrady poškozených a odumřelých buněk míšní tkáně jsou

v posledních letech kmenové buňky studovány hlavně pro jejich schopnost vylučovat množství růstových a imunomodulačních faktorů ovlivňujících průběh sekundární fáze míšního poranění.

4.4.1.1 Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) jsou multipotentní buňky se schopností sebe obnovy a multidiferenciace do buněk především mezenchymálního typu (275-277). Jako zdroj mezenchymálních kmenových buněk byla potvrzena tuková tkáň, periferní krev, plicní a srdeční tkáň, zubní dřeň, stroma rohovky, placenta, endometrium, amniotická membrána či pupečnicková krev nebo tkáň (Whartonův rosol). Přestože byly popsány známky diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk do neuronálních typů buněk (278, 279), je validita těchto dat zpochybňována vzhledem k nespecifitě proteinových markerů neuronální diferenciaci (280, 281). Regenerativní potenciál v léčbě míšního poranění tak spočívá hlavně v parakrinním efektu secernovaných trofických faktorů interagujících s prostředím poraněné tkáně. MSCs podporují v poraněné míšní tkáni revaskularizaci, modulují zánětlivou odpověď (282), produkují růstové faktory a cytokiny (283) a působí protektivně proti oxidativnímu stresu a následně indukované apoptóze (284).

V léčbě míšního poranění jsou používány MSCs z různých zdrojů, zejména pak z tukové tkáně (AT-MSCs), kostní dřeně (BM-MSCs), pupečnickové krve (UB-MSCs) a pupečnickové tkáně - Whartonova rosolu (WJ-MSCs). Whartonův rosol je gelatinózní pojivová tkáň pupečnicku popsaná Thomasem Whartonem v roce 1656. Výhodou MSCs získaných z Whartonova rosolu je ve srovnání s BM-MSCs a AT-MSCs jejich vyšší proliferační potenciál (285), a nižší imunogenicita, která je dána nižší expresí komplexu MHC-I a úplnou absencí komplexu MHC-II (286). I přes vyšší proliferační potenciál je vyloučena možnost tumorigeneze a jsou považovány v tomto ohledu za bezpečné (287). Vzhledem k možnosti klinického využití mají WJ-MSCs nespornou výhodu v možnosti získání zdrojového materiálu. Zatímco kmenové buňky z kostní dřeně či z tukové tkáně je nutné získat invazivními metodami (punkce + aspirace), WJ-MSCs jsou neinvazivně získávány z lehce dostupné pupečnickové tkáně po porodu a nepředstavují tak riziko pro dárce (288).

4.4.1.2 Kurkumin

Kurkumin (1,7-bis[4-hydroxy-3-methoxyfenyl]-1,6-heptadien-3,5-dion) je žlutým extraktem ze stonků rostliny *curcuma longa*, známé též jako indický zázvor. Kurkumin je vzhledem ke svým různým biologickým a neuroprotektivním účinkům při poranění CNS intenzivně studován jako přírodní alternativa k MP (289-291). Kurkumin snižuje produkci ROS, peroxidaci lipidů a produkci NADPH oxidázy (292, 293) a naopak zvyšuje expresi antioxidantních a detoxifikačních enzymů NADPH quinon oxidoreduktázy-1, glutathion S-transferázy P, hem-oxygenázy 1, nebo transkripčního faktoru Nrf2 (292, 294, 295). Při potlačení rozvoje sekundárního míšního poškození se uplatňuje zmírnění zánětlivé reakce potlačením aktivity NF- κ B a p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) (199, 290, 295, 296). Dále byly po aplikaci kurkuminu zjištěny nižší hladiny NLRP3 a prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β (297-300). Potlačení exprese prozánětlivých cytokinů spolu s inhibicí exprese kaspázy-3 a naopak zvýšením exprese Bcl-2 vede k signifikantně nižší mikroglální aktivaci, potlačené zánětlivé reakci a prevenci apoptózy (301). Všechny tyto regulační funkce kurkuminu ve výsledku vedou ke zlepšení neurologických funkcí po SCI (199, 291, 302).

Klinické využití kurkuminu je bohužel limitováno jeho špatnou rozpustitelností ve vodném prostředí a rychlým jaterním a střevním metabolismem (303, 304). Snaha o zlepšení biodistribuce je v posledních letech zjevná na poli nanotechnologií, kdy enkapsulace do nanočástice tvořené fosfolipidy nebo cyklodextriny významně zvýšila koncentraci látky v těle (305, 306).

4.4.1.3 Hydrogely

Při úplné disrupci míšní tkáně je kromě potlačení sekundárního poranění nutné přemostění kavity, která by po vytvoření gliové jizvy bránila prorůstání regenerovaných axonů. K přemostění léze se využívají různě modifikované materiály v čele s hydrogely (307-309). Hydrogely jsou hydrofilické polymery s různými chemickými a fyzikálními vlastnostmi vyrobené z čistě syntetických nebo biologických materiálů, popřípadě kombinací obou

(agaróza, kolagen, hyaluronan, fibrin, alginát, 2-hydroxyetyl metakrylát HEMA). Vytvořené hydrogely jsou povrchově modifikovány různými bioaktivními molekulami (např. laminin, fibronectin) k podpoření buněčné adheze (310-312). Prorůstání regenerovaných axonů je dále umožněno 3D orientací porózního materiálu ve směru regenerace. K potenciaci neuronální regenerace mohou být hydrogely osazeny různými druhy kmenových buněk - indukovanými pluripotentními buňkami (iPSs) (313), buňkami z olfaktorického bulbu (OECs) nebo MSCs (314, 315), popřípadě mohou být zakomponovány různé růstové faktory (BDNF, NT-3, GDNF) a buňky Schwannovy (316-320).

5. Hypotézy a cíle práce

- 1) Léčba míšního poranění pomocí mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z lidského Whartonova rosolu (hWJ-MSCs) u experimentálního potkaního modelu zlepšuje hybnost a koordinaci dolních končetin a je závislá na dávce aplikovaných buněk.

Cíl: Vytvořit experimentální model ischemicko-reperfuzní míšní léze u potkana. Intratékálně pomocí lumbální punkce aplikovat různé množství kmenových buněk, a to buď jednorázově, nebo opakovaně. Sledovat efekt léčby pomocí série behaviorálních testů, analýzou imunohistochemických řezů a měřením exprese genů souvisejících s regenerací tkáně pomocí qPCR.

- 2) Léčba míšního poranění lokálním a systémovým podáním protizánětlivého a antioxidačního léčiva kurkuminu navázaného na nanonosič (nanokurkumin) u experimentálního potkaního modelu moduluje lokální zánětlivou reakci a zlepšuje hybnost dolních končetin.

Cíl: V subakutní fázi experimentálně vytvořeného potkaního modelu míšní léze aplikovat nově vytvořené léčivo nanokurkumin dvěma způsoby: lokálně k místu poranění a podkožně do oblasti zad. V průběhu experimentu sledovat efekt léčby pomocí behaviorálních studií, po skončení experimentu morfometricky a imunohistochemicky analyzovat míšní tkáň a změnu exprese vybraných genů uplatňujících se v imunitní zánětlivé reakci.

- 3) Mini-invazivní perkutánní stabilizace traumatické zlomeniny hrudní a bederní páteře je rovnocennou metodou stabilizace ke klasické otevřené zadní transpedikulární stabilizaci.

Cíl: Retrospektivní analýza operací traumatických zlomenin hrudní a bederní páteře na pracovišti Neurochirurgické kliniky Fakultní Nemocnice v Hradci Králové, které byly provedeny klasickou otevřenou zadní transpedikulární stabilizací a nově zavedenou metodou mini-invazivní perkutánní zadní transpedikulární stabilizací. Porovnání obou operačních metod hodnocením přesnosti postavení zavedených transpedikulárních šroubů, parametrů kyfotizace obratlů, dávky radiačního záření, času operace a celkového počtu reoperací.

6. Metody

6.1 Použitá experimentální zvířata

6.1.1 hWJ-MSCs

K pokusu bylo využito celkem 90 dospělých samců potkana (Wistar) odebraných ze zvěřince Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (AVČR) v Praze. Stáří zvířat na začátku experimentu bylo 10 týdnů a jejich váha se při chirurgickém zákroku pohybovala mezi 275-305 g. Dle typu léčby byli potkani náhodně rozděleni do celkem 5 skupin (viz dále). Celková doba přežívání zvířat závisela na typu analýzy. K behaviorálnímu, histologickému, imunohistochemickému a qPCR testování bylo využito celkem 47 potkanů (n=47) s celkovou dobou trvání experimentu 9 týdnů (9T). Ke qPCR analýze genů 4 týdny po SCI bylo využito dalších 39 potkanů (n=39). K ozřejmění přežívání buněk v mozkomíšním moku po podání 0,5 M nebo 1,5 M hWJ-MSCs 2 týdny po SCI byli využiti 4 potkani (n=4).

6.1.2 Nanokurkumin

K pokusu bylo využito celkem 52 dospělých samců potkana (Wistar) odebraných ze zvěřince Fyziologického ústavu AVČR v Praze. Stáří zvířat na začátku experimentu bylo 10 týdnů a jejich váha při chirurgickém zákroku se pohybovala mezi 270-300 g. Po vytvoření experimentálního modelu míšňí léze byla zvířata náhodně rozdělena na dvě skupiny - skupinu léčenou nanokurkuminem (n=21) a kontrolní skupinu, které byl podán pouze nanonosič bez účinné látky (n=11). Zvířata, která byla zařazena do behaviorální, histologické, imunohistochemické a qPCR studie (n=32) přežívala 9 týdnů. K cytokinové analýze byla zvířata usmrcena 7. a 14. den pokusu (n=20).

6.2 Pacienti

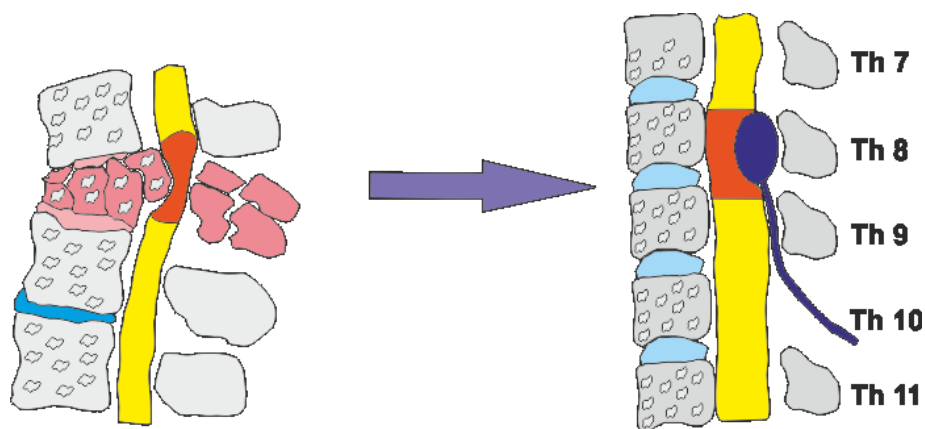
Retrospektivně byl hodnocen soubor pacientů, kteří podstoupili operační stabilizaci traumatické fraktury jednoho, nebo více obratlů v oblasti Th8-L5 na Neurochirurgické klinice

Fakultní nemocnice Hradec Králové v období od ledna 2015 do ledna 2018. V uvedeném období bylo na klinice operováno celkem 184 pacientů. Do studie nebyli zařazeni pacienti s absencí pooperačního vyšetření pomocí CT (celkem 30 pacientů, kteří byli pooperačně kontrolováni pouze prostou skiaskopíí v antero-posteriorní a laterální projekci) a pacienti trpící m. Bechtěrev vzhledem ke změněným anatomickým poměrům (7 pacientů s mnohaetážovou stabilizací). Pacienti byli operováni buďto klasickou otevřenou zadní transpedikulární stabilizací nebo mini-invazivní perkutánní transpedikulární stabilizací. Volba operačního postupu závisela na preferenci operátora. Mini-invazivní perkutánní technika byla na našem pracovišti zavedena v průběhu roku 2014. Studovaný soubor obsahuje celkem 147 pacientů. První skupinu pacientů operovaných klasickou otevřenou technikou (skupina OPEN) tvoří celkem 100 pacientů - 55 mužů a 45 žen s průměrným věkem 48 (19-88) let. K otevřené stabilizaci bylo nejvíce využito instrumentárium s rigidními Schanzovými šrouby (98 pacientů), pouze v minimu případů pak instrumentárium s polyaxiálními šrouby (2 pacienti). Druhá skupina pacientů operovaných mini-invazivní perkutánní technikou (skupina MIS) čítá 47 pacientů - 34 mužů a 13 žen s průměrným věkem 44 (17-72) let. K operaci bylo využito standardní instrumentárium s polyaxiálními šrouby. V předoperačním období byli všichni pacienti vyšetřeni pomocí CT, někteří z nich pak také pomocí MR k odhalení nitrodřeňových zlomenin a poranění měkkotkáňových diskoligamentózních struktur.

6.3 Experimentální model míšňí léze

Jako model míšňí léze byla zvolena metoda balónkové dorzální ischemicko-kompresní léze (4). Operace byly prováděny za standardních podmínek na operačním sále určeném pro malá zvířata na Ústavu experimentální medicíny AVČR v Praze. Před samotnou operací byli potkani uvedeni do celkové inhalační anestezie pomocí Isofluranu (Forane; Abbott Laboratories, Queenborough, UK), analgesie byla zajištěna intramuskulární aplikací carprofenu (Rimadyl, Cymedica, 4 mg/kg) a chirurgická peroperační antimikrobiální profylaxe byla provedena intramuskulárním podáním antibiotika gentamicin sulfát (Lek Pharmaceutical, 5 mg/kg).

Po incizi kůže byly separovány paravertebrální svaly v rozsahu obratlů Th7 až Th12 a po anatomické identifikaci jednotlivých obratlových oblouků byla provedena částečná laminektomie obratle Th10. Následně byl do epidurálního prostoru velmi opatrně zasunut sterilní 2F Fogartyho katétr až do úrovně Th8 (Obr. 13). Po správném umístění katétru byl balónek rychle naplněn 15 μ l fyziologického roztoku a udržován rozepjatý po dobu 5 minut, čímž se vytvořila kompresní míšň lize. Během samotné operace byla inhalační anestezie udržována průtokem Isofluranu 0,3 ml/min a teplota zvířete byla cílena na 37 °C pomocí vyhřívané podložky. Po pěti minutách byl balónek vypuštěn a katétr opatrně extrahován z epidurálního prostoru. Operace byla ukončena suturou paravertebrálních svalů a kůže nevstřebatelným stehem. Neurologicky postižená zvířata byla periodicky kontrolována a po nezbytně nutnou dobu probíhala asistence při krmení a močení. Profylaktické podávání ATB bylo prodlouženo po dobu 7 dní po operaci. Voda i krmení bylo zvířatům poskytováno *ad libitum*.



Obr. 13 Ilustrativní obrázek vytvoření klinicky relevantní ischemicko-kompresivní míšň lize. V levé části obrázku znázorněno poranění mích kompresivní frakturou s porušením všech 3 páteřních sloupců. V pravé části zobrazen balónek Fogartyho katétru v dorzálním epidurálním prostoru na úrovni Th8 rozepjatý 15 μ l fyziologického roztoku zasunutý cestou laminektomie Th10.

6.4 Aplikace terapeutických buněk/protizánětlivé látky

6.4.1 hWJ-MSCs

Buňky hWJ-MSCs byly izolovány a kultivovány z lidských pupečnicků zdravých rodiček po přirozeném porodu ve fakultní nemocnici Plzeň. Všechny pacientky podepsaly informovaný

souhlas o zpracovávání tkáně odsouhlasený institucionální etickou komisí. K dalšímu zpracování byly využity 10-15 cm dlouhé části pupečníku, které byly sterilně transportovány s antibioticko-antimykotickým roztokem při udržování stálé teploty 4 °C. Po odstranění umbilikálních cév byla pupečnicková tkáň fragmentována na cca 1mm řezy a vložena do kultivačního media Nunc (Schoeller, Praha, Česká republika) obsahující „alpha-Minimum Essential Medium“ (α MEM; East Port, Česká republika), destičkový lyzát o koncentraci 5 % (IKEM, Česká republika) a antibiotikum gentamicin sulfát v dávce 10mg/ml. Buňky byly následně kultivovány při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂. Po 10 dnech byla zbylá tkáň odstraněna a zbývající adhezní buňky byly kultivovány po následující 3 týdny a pasážovány za použití 0,05% Trypsin/EDTA (Life Technologies, USA). Po pasáži byly buňky vysazeny do kultivačních nádob (Nunc; Schoeller, Česká republika) o hustotě 5 x 10³ bb/cm². Buňky třetí pasáže byly charakterizovány průtokovou cytometrií s následnou analýzou jejich růstového a diferenciačního potenciálu.

K transplantaci do experimentálního modelu potkana byly použity buňky hWJ-MSCs z třetí pasáže, přičemž jejich aplikace proběhla 7., 14. a 21. den po provedení kompresní míšní léze SCI. Buňky byly podávány cestou lumbální punkce (LP) v etáži L4/5 nebo L3/4 jehlou o tloušťce 25G za krátké celkové anestezie Isofluranem. Jako ověření subarachnoidálního prostoru bylo nejprve nataženo malé množství mozkomíšního moku (CSF) a následně byla aplikována dávka fyziologického roztoku obsahující hWJ-MSCs. Během aplikace buněk bylo možno pozorovat pohyb ocasu jako výsledek mechanického dráždění nervových kořenů oblasti cauda equina. Po injekci buněk byla jehla ponechána in situ po dalších 30 vteřin jako prevence zpětného toku buněk přístupovým kanálem. Zvířata byla rozdělena do 5 skupin podle počtu aplikovaných buněk. První skupině (0,5 M) bylo transplantováno 0,5 milionu buněk v 50 μ l fyziologického roztoku v jedné dávce 7. den po SCI (n=12). Druhá skupina (1,5 M) obdržela 1,5 milionu buněk v 50 μ l fyziologického roztoku v jedné dávce 7. den po SCI (n=9). Třetí skupině (3x0,5 M) byla provedena trojitá transplantace 0,5 milionu buněk v 50 μ l fyziologického roztoku 7., 14. a 21. den po SCI (n=8). Čtvrté skupině (3x1,5 M) byla aplikována trojitá transplantace 1,5 milionu buněk v 50 μ l fyziologického roztoku 7., 14. a 21. den po SCI (n=7). U kontrolní skupiny (kontrola) proběhla jednotlivá, nebo trojitá implantace 50 μ l fyziologického roztoku 7. (14.,

21.) den po SCI (n=11). Vzhledem k tomu, že se výsledky jednotlivé a trojitě aplikace u kontrolní skupiny nelišily, byla tato skupina brána jako homogenní při porovnávání se skupinami ostatními. Den před transplantací buněk byla aplikována všem zvířatům imunosupresivní látka Cyclosporine A intraperitoneální injekcí (10 mg/kg). Imunosuprese byla podávána denně po celou dobu trvání experimentu.

6.4.2 Nanokurkumin

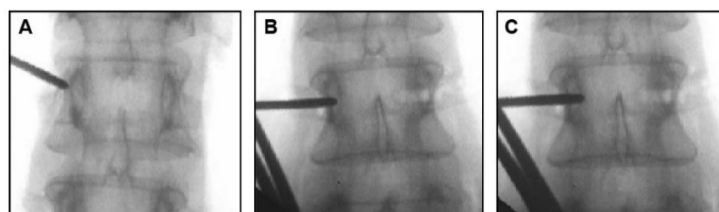
Pro aplikaci byl použitý vysoce purifikovaný syntetický kurkumin obsažený v diskoidní nanočástici na bázi lipidu o velikosti 10-25 nm - LipodisqTM (Malvern Cosmeceutics, Malvern, UK). Tato nanočástice je biodegradabilní a je zkonstruována k inkorporaci hydrofobních, ve vodě nerozpustných látek vhodných k lokálnímu nebo systémovému podání. Na rozdíl od kurkuminu, který je rozpustný pouze v tucích, methanolu, ethanolu, ethyl acetátu, acetonu, methylen chloridu, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu a methylethyl ketonu je nanokurkumin (C₂₁H₂₀O₆) rozpustný ve vodě a dalších fyziologických roztocích.

Aplikace nanokurkuminu do experimentálního modelu potkana s míšní lézí byla prováděna lokálním a podkožním (systémovým) podáváním. Po vytvoření míšní léze byli potkani rozděleni do dvou skupin. První skupině (n=21) byl podán nanokurkumin lokálně kolem dury mater ihned po operaci SCI a poté pomocí minimálně invazivního přístupu 7., 14. a 28. den po SCI. Každá lokální aplikace byla cílena do oblasti laminektomie a byl podán roztok nanokurkuminu o celkové dávce 0,01 ml. Zároveň byl roztok nanokurkuminu aplikován podkožní injekcí v dávce 0,1 ml, která byla podávána dvakrát denně po dobu čtyř týdnů do podkoží v oblasti zad. Druhé skupině potkanů, kontrolní skupině (n=11), byl podáván roztok obsahující nanočástice bez navázané léčivé látky kurkumin lokálně i podkožně podle stejného protokolu jako u první skupiny. Zvířata, která byla použita v behaviorální studii a k histologické a imunohistochemické analýze byla v experimentu sledována po dobu 9 týdnů po indukcii SCI (n=32). Další skupina zvířat byla využita k analýze zánětlivých cytokinů a byla usmrcena 1 a 14 dní po SCI, přičemž bylo použito vždy 5 zvířat na léčnou skupinu a konkrétní časový úsek (n=20).

6.5 Operační stabilizace zlomeniny (OPEN, MIS)

K operačnímu řešení zlomeniny byly využity dvě metody zadní transpedikulární stabilizace - otevřená (OPEN) a mini-invazivní perkutánní (MIS). Klasická otevřená zadní transpedikulární stabilizace je nejčastější chirurgickou metodou léčby thorakolumbálních zlomenin. Operace byla provedena ze středové incize kůže a podkoží následované paraspinozním bilaterálním protnutím dorzální fascie s širokou separací paravertebrálního svalstva a obnažením meziobratlových kloubů. Dle anatomických orientačních bodů byl nalezen vpád nad pedikly obratlů určených k inzerci pedikulárních šroubů. Následná inzerce pedikulárního šroubu proběhla pod kontrolou RTG přístroje v antero-posteriorní (AP) a laterální (LAT) pozici. Hlavy šroubů byly následně spojeny tyčí, a po provedení nepřímých repositionálních manévrů (ligamentotaxe, lordotizace) byl celý systém uzamčen. Při závažných poraněních s impresí kostěných struktur do durálního vaku byla pak navíc provedena dekomprese nervových struktur pomocí jedné, nebo více etážové laminektomie. Operace byla ukončena suturou jednotlivých anatomických vrstev s/bez ponechání Redonova drénu in situ.

Mini-invazivní perkutánní přístup byl veden ze čtyř krátkých (1-2 cm) incizí kůže, podkoží a dorzální fascie nad projektovanými vpády do pediklů. Vpád do pediklu byl vyhledán za použití AP skiaskopie s následnou inzercí pedikulárního šroubu (Obr. 14 A, B, C). Po zkontrolování trajektorie šroubu v AP a LAT projekci byly následně hlavy šroubů spojeny tyčí, která byla protažena skrz paravertebrální svaly pod kůží. Celý systém byl následně uzamknut a jednotlivé kožní vpády suturovány. K mini-invazivní perkutánní metodě nebyli indikováni pacienti s těžším typem zlomeniny než B1 dle klasifikace AOS a s přítomností neurologického deficitu.



Obr. 14 Peroperační fluoroskopie k navigaci inzerce pedikulárního šroubu. Iniciální ideální vstup do pediklu dolní Th-L páteře (A), postup přes pedikl ke hraně obratlového těla (B), konečné postavení pedikulárního šroubu (C). Obrázek převzatý z publikace Bai et al. (321).

6.6 Analýza efektu hWJ-MSCs/nanokurkuminu

6.6.1 Behaviorální testování

6.6.1.1 BBB

Kvalita a rozsah hybnosti zadních končetin společně s jejich koordinací s pohybem předních končetin byla posuzována podle Basso, Beattie a Bresnahanovy (BBB) hodnotící škály (0-21 bodů) při pohybu potkanů v ohraničeném otevřeném prostoru (322) (Tab. 4). Hodnocení probíhalo vždy jednou týdně po celou dobu trvání experimentu. Potkani byli pozorováni při nerušeném pohybu po prostoru a byla posuzována hybnost zadních končetin, kvalita došlapu tlapky, schopnost podpory váhy těla a případná koordinace pohybu všech končetin při chůzi.

body	popis
0	Bez viditelného pohybu zadních končetin.
1	Nepatrný pohyb jednoho nebo dvou kloubů, obvykle kyčle a/nebo kolene.
2	Výrazný pohyb jednoho kloubu, nebo výrazný pohyb jednoho kloubu spolu s nepatrným pohybem dalšího kloubu.
3	Výrazný pohyb dvou kloubů.
4	Nepatrný pohyb všech tří kloubů.
5	Nepatrný pohyb dvou kloubů a současně výrazný pohyb třetího.
6	Výrazný pohyb dvou kloubů a současně nepatrný pohyb třetího.
7	Výrazný pohyb všech tří kloubů.
8	Plantární umístění packy bez váhové podpory.
9	Plantární umístění packy s váhovou podporou pouze ve stoji (ne při chůzi), popřípadě občasná, častá nebo konzistentní chůze po dorsum pedis s váhovou podporou a absencí plantárního umístění packy.
10	Občasné plantární umístění packy s váhovou podporou při chůzi, bez koordinace pohybů mezi zadními a předními končetinami.
11	Časté až konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou, bez koordinace pohybů mezi zadními a předními končetinami.
12	Časté až konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou spolu s občasnou koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami.
13	Časté až konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou spolu s častou koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami.
14	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou s konzistentní koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami. Packa je rotována zevně nebo zevnitř při zvednutí packy a při prvním kontaktu.
15	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou s konzistentní koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami. Žádné nebo občasné zvedání prstců. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu.
16	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou s konzistentní koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami. Časté zvedání prstců. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu a rotována ve fázi zvednutí.

17	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou s konzistentní koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami. Časté zvedání prstců. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí.
18	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou s konzistentní koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami. Konzistentní zvedání prstců. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu a rotována ve fázi zvednutí.
19	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou s konzistentní koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami. Konzistentní zvedání prstců. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí. Ocas většinu doby leží na zemi.
20	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou s konzistentní koordinací pohybů mezi zadními a předními končetinami. Konzistentní zvedání prstců. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí. Nestabilita trupu. Konzistentní zvedání ocasu.
21	ZDRAVÝ POTKAN. Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Stabilita trupu. Konzistentní zvedání ocasu.

Tab. 4 - BBB hodnotící škála k bodování pohybu potkanů dle publikace kolektivu Basso et al. (322).

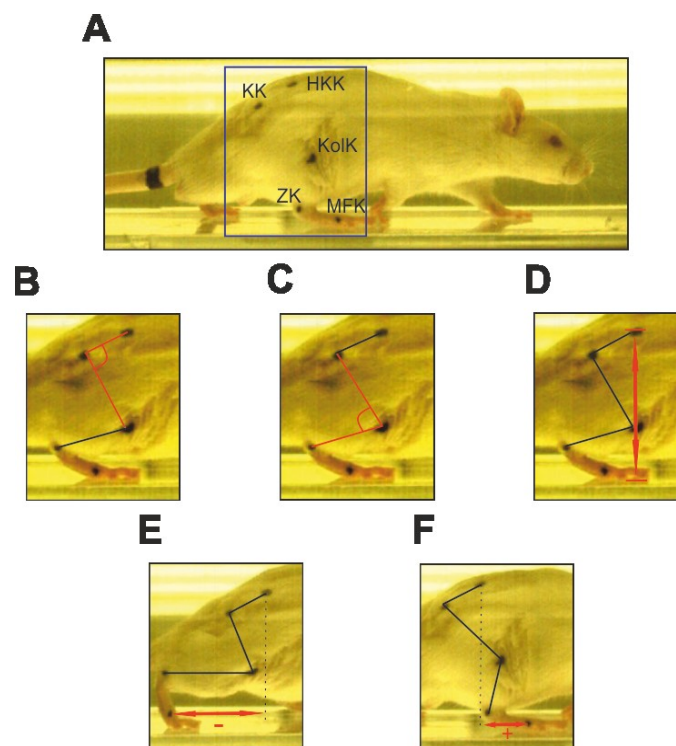
6.6.1.2 Chůze po kladině

Stabilita, vyrovnanost a koordinace pohybu končetin byla dále testována při přecházení 100 cm dlouhé a 3,4 cm široké kladiny. Na jednom konci kladiny byla umístěna úniková krabice s motivačním pamlskem. Pohyb zvířete od startovací pozice jednoho konce kladiny do cílové únikové krabice na druhém konci kladiny byl zaznamenáván pomocí CCD kamery (TSE-Systems Inc., Bad Homburg, Německo). Každý pokus zvířete o zdolání vzdálenosti byl omezen časovým limitem 60 s a bodově hodnocen pomocí modifikovaného skórovacího systému dle Metz a Whishawa (323). Potkani byli před započítáním experimentu v tomto úkolu trénováni. Testování pak probíhalo každý týden počínaje druhým týdnem po indukci SCI až do konce experimentu, přičemž byly provedeny dvě měření za den ve třech po sobě jdoucích dnech.

6.6.1.3 MotoRater

Pokročilá analýza hybnosti dolních končetin byla prováděna za pomoci přístroje MotoRater 303030 a následně vyhodnocována počítačovým programem TSE Motion 8.5.11. Přístroj se sestává ze 150 cm dlouhé trasy, kterou musí zvířata přeběhnout. Jejich pohyb je přitom nahráván na soustavu kamer s vysokým rozlišením (CamRecord CL600x2, 1280 x 1024 pixelů, Stemmer Imaging, Německo). Před započítáním experimentu byly vyznačeny na kůži zvířete

zájmové body (hřeben kosti kyčelní, kyčelní kloub, kolenní kloub, zevní kotník a metatarzofalangeální kloub) pomocí oholení srsti s následným zanesením permanentního podkožního označení za použití tetovacího zařízení (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus) (Obr. 15 A). Získaná pohybová videa byla analyzována pomocí softwaru TSE Motion 8.5.11. Postupně byly vykresleny a spočítány maximální a minimální pohybové úhly v kyčelním (Obr. 15 B) a kolenním kloubu (Obr. 15 C). Dále byla změřena výška hřebenu kosti kyčelní nad zemí značící schopnost zvířete unést vlastní váhu těla (Obr. 15 D). Mechanika pohybu packy byla měřena pomocí retrakce (Obr. 15 E) a protrakce (Obr. 15 F). Zvířata v obou skupinách byla testována ve dvou intervalech - pátý a devátý týden po míšní lézi, a to vždy čtyřikrát za sebou. Z každé skupiny bylo hodnoceno 5 zvířat. Všechny parametry byly ve skupinách zprůměrovány a porovnány s pohybem zdravých potkanů (n=6).



Obr. 15 Analýza pomocí přístroje MotoRater. Předoperačně je potkan označen podkožní tetovází nad hřebenem kosti kyčelní (HKK), kyčelním kloubem (KK), kolenním kloubem (KolK), zevním kotníkem (ZK) a metatarzofalangeálním kloubem (MFK) (A). V intervalech 5. a 9. týdne po SCI jsou vypočítány maximální a minimální rozsahy hybnosti v KK (B) a KolK (C), výška HKK nad zemí (D) a retrakce (E) spolu s protrakcí (F) chodidla.

6.6.2 Imunohistochemická analýza

Experiment byl plánovaně ukončen vždy po 9 týdnech léčby od indukce SCI. Všechna přežívající zvířata byla uvedena do hluboké analgosedace za pomoci ketaminu (100 mg/kg) a xylazinu (20 mg/kg) a následně byla ve speciální operační místnosti provedena transkardiální orgánová perfuse za použití roztoku fosfátového pufru (250 ml) následovaného 4% roztokem paraformaldehydu (200 ml). Po dostatečné fixaci tkáně byla mikrochirurgickou technikou vyjmuta míšň tkáň z páteřního kanálu, která byla dále laboratorně zpracována ke zhotovení parafrínových histologických bločků. Po makroskopické identifikaci středu míšň léze byly pomoci mikrotomu zhotoveny série transverzálních řezů o tloušťce 5 μ m z oblasti 2 cm kolem léze. Z každé jednotlivé skupiny bylo náhodně vybráno 5-7 zvířat, u kterých byly histologické a imunohistochemické řezy analyzovány.

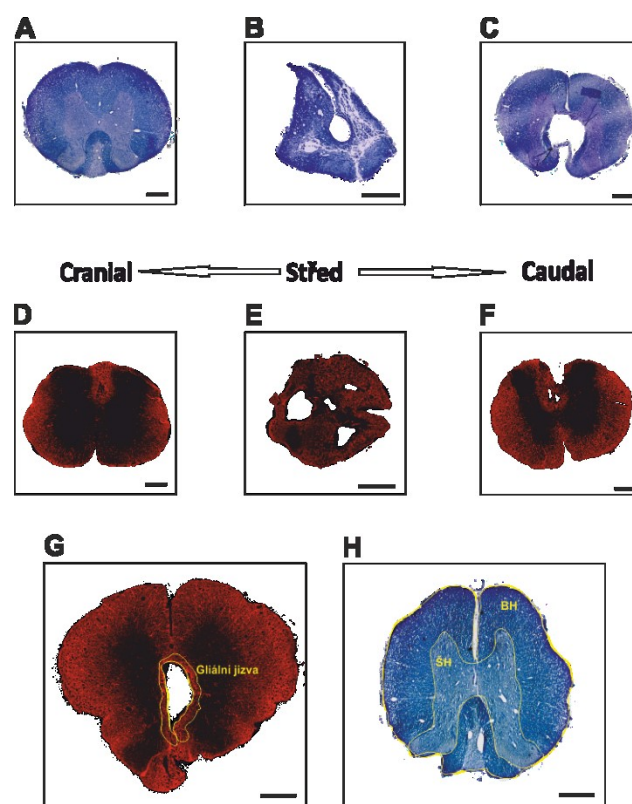
6.6.2.1 Morfometrie šedé a bílé hmoty míšň

K vizualizaci šedé a bílé hmoty míšň v histologických řezech bylo využito barvení „Kresol violeť a luxolová modř“. Z každé skupiny byly analyzovány vzorky z 5-7 zvířat. Z každé míchy bylo zhotoveno celkem 11-15 řezů kolem středu míšň léze s jednotlivými odstupy 1 mm (Obr. 16 A, B, C, H). Řezy byly prohlédnuty a naskenovány v digitální podobě pomoci mikroskopu Axioskop 2 plus (Zeiss, Oberkochen, Německo). Na získaných snímcích byla poté změřena celková plocha bílé a šedé hmoty pomoci programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) s následným porovnáním mezi jednotlivými skupinami.

6.6.2.2 Gliová jizva a reaktivní astrocyty

Gliová jizva vzniká v CNS jako reakce na poranění. Vznik gliové jizvy je všeobecně přijímán jako jedna z bariér možné regenerace poraněných axonů (viz výše). K vizualizaci rozsahu gliové jizvy je využívána protilátka proti GFAP (Sigma, St. Louis, MO, USA). Z každé míchy bylo zhotoveno celkem 11-15 řezů kolem středu míšň léze s jednotlivými odstupy 1 mm (Obr. 16 D, E, F, G).

Řezy byly prohlédnuty a naskenovány v digitální podobě pomocí mikroskopu Axioskop 2 plus (Zeiss, Oberkochen, Německo). Na získaných snímcích byla následně změřena pomocí programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) celková plocha rozsahu zvýšeného signálu reprezentujícího gliovou jizvu kolem centrální traumatické kavity s následným porovnáním mezi jednotlivými skupinami. Na uvedených snímcích byly také manuálně spočítány morfologicky charakteristické tzv. reaktivní astrocyty, jejich počet zaznamenán a následně porovnán mezi jednotlivými skupinami.

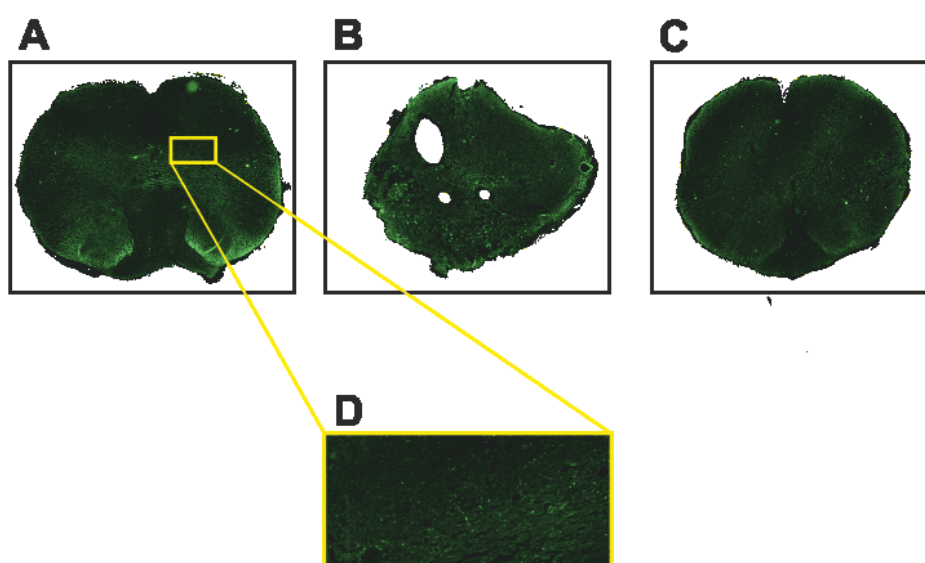


Obr. 16 Imunohistochemická analýza. Příklad transverzálního řezu míchou potkana v oblastech kraniálně, kaudálně a ve středu léze při barvení znázorňující morfologii šedé a bílé hmoty míšní (A, B, C, H) a gliovou jizvu spolu s reaktivními astrocyty (D, E, F, G).

6.6.2.3 Axonální sprouting

Regenerace míšní tkáně je doprovázena pučením axonálních konců (axonální sprouting). Imunohistochemicky lze tento jev vizualizovat protilátkou proti GAP43 (Millipore, Billerica, MA). Z každé skupiny byly analyzovány vzorky z 5-7 zvířat. Z každé míchy bylo zhotoveno

celkem 11-15 řezů kolem středu míšní léze s jednotlivými odstupy 1 mm (Obr. 17 A, B, C). Řezy byly prohlédnuty a naskenovány v digitální podobě pomocí mikroskopu LEICA CTR 6500 s grafickým nástrojem FAXS 4.2.6245.1020 (TissueGnostics, Vídeň, Rakousko). Získané obrázky byly hodnocené pomocí programu Tissue FAXS (Tissue Gnostics, Vídeň, Rakousko). Při analýze imunohistochemického signálu byla hodnocena celková plocha hyperintenzního signálu značícího aktivní pučení konců axonů s následným porovnáním mezi jednotlivými skupinami (Obr. 17 D).



Obr. 17 Imunohistochemická analýza axonálního sproutingu. Znázorněny příklady transverzálních řezů míchou kraniálně (A), kaudálně (B) a ve středu míšní léze (C). Detailní pohled se znázorněním vláken pozitivních při barvení proti GAP43 (D).

6.6.3 qPCR

Zánikové a reparační procesy jsou v CNS charakterizovány zvýšenou, či naopak sníženou expresí celé řady regulačních genů. K posouzení vlivu různých typů experimentální léčby byla exprese zvolených genů (Tab. 5) a cytokinů (Tab. 6) analyzována pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR).

Zkratka	Název	Charakteristika a význam u SCI
Gfap	Glial fibrillary acidic protein	Protein asociovaný s astrocyty, který je zvýšeně exprimován v reaktivních astrocytech a při tvorbě gliální jizvy.
Mrc1 (CD206)	C-type mannose receptor 1	175-kDa velký transmembránový glykoprotein, který je markerem M2 fenotypu makrofágů.
CD163	Cluster of Differentiation 163	Marker M2 fenotypu makrofágů.
Irf5	Interferon Regulatory Factor 5	Regulační faktor s klíčovou úlohou v polarizaci makrofágů k M1 fenotypu.
CD86	Cluster of Differentiation 86	Marker M1 fenotypu makrofágů.
Casp3	cysteine-aspartic acid protease 3	Člen kaspázové rodiny, sekvenční aktivace jednotlivých kaspázových proteáz má klíčovou roli ve spuštění apoptózy - marker apoptózy.
Sort1 (NT-3)	Sortilin 1	Výběrový receptor v Golgiho aparátu. Iniciuje neuronální apoptózu zprostředkováním endocytózy proBDNF a proNGFB.
Egf2	Fibroblast growth factor 2	Růstový faktor, který hraje důležitou roli v regulaci proliferace neuronálních buněk a jejich prekurzorů, podporuje přežívání neuronů.
NF-κB	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	Pleiotropní transkripční faktor přítomný ve většině buněk. U SCI zvýšená exprese potencuje zánětlivou reakci skrze Jak/Stat3 a TLR4-MyD88 transkripční cesty.

Tab. 5 Přehled genů zvolených ke kvantitativnímu zhodnocení exprese po SCI.

Zkratka	Název	Charakteristika a význam u SCI
IL1-β	Interleukin-1 beta	Silný prozánětlivý cytokin. Původně objeven jako významný endogenní pyrogen. Podporuje migraci a aktivaci neutrofilů, aktivaci T-buněk, B-buněk a tvorbu protilátek.
TNF-α	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 2	Silný prozánětlivý cytokin sekretován především aktivovanými makrofágy. Reguluje funkci zánětlivých buněk především v akutní fázi zánětu, kdy může vyvolat i apoptózu buněk.
IFN-γ	Interferon gamma	Protizánětlivý cytokin produkovaný aktivovanými lymfocyty. Antiproliferativní účinek.
IL-6	Interleukin-6	Silný prozánětlivý cytokin hrající hlavní roli v akutní fázi zánětu a při diferenciaci B-buněk na buňky sekreční.
IL-12	Interleukin-12	Prozánětlivý cytokin, který působí jako růstový faktor pro aktivované T a NK-buňky, zvyšuje jejich lytickou aktivitu a stimuluje produkci cytokinu IFN-γ.
CCL-5	Eosinophil chemotactic cytokine (RANTES)	Chemoatraktant pro krevní monocyty, paměťové T-buňky a eozinofily. Způsobuje uvolnění histaminu z bazofilů a aktivuje eozinofily.
IL-11	Interleukin-11	Ambivalentní cytokin, který v rozdílných fázích zánětu působí jak pro-, tak protizánětlivě. Stimuluje produkci hematopoetických kmenových buněk a maturaci megakaryocytů.
IL-10	Interleukin-10	Silný protizánětlivý cytokin produkovaný aktivovanými makrofágy a pomocnými T-buňkami. Inhibuje syntézu cytokinů IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF and GM-CSF.
IL-13	Interleukin-13	Protizánětlivý cytokin, který snižuje tvorbu prozánětlivých interleukinů. Spolu s IL-2 reguluje tvorbu IFN-γ.

Tab. 6 Přehled interleukinů zvolených ke kvantitativnímu zhodnocení exprese po SCI.

Cytokinová studie byla cílena na brzké změny a byla provedena 1 a 14 dnů po SCI. Expresе růstových a zánětlivých genů byla následně prováděna 4 a 9 týdnů po SCI. K analýze bylo vždy využito 5 zvířat z každé léčebné skupiny. Studovaná RNA byla izolována z parafinových bločků obsahujících míšní tkáň pomocí speciální sady „High Pure RNA Paraffin Kit“ (Roche, Penzberg, Německo) nebo RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Německo). Množství získané RNA bylo měřeno spektrofotometricky (NanoPhotometer™ P-Class, Mnichov, Německo). cDNA bylo ze získané RNA izolováno pomocí reverzní transkripce pomocí sady “Transcriptor Universal cDNA Master“ (Roche) a termálního cycleru (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Řetězová reakce qPCR byla provedena pomocí roztoku cDNA, sondy „FastStart Universal

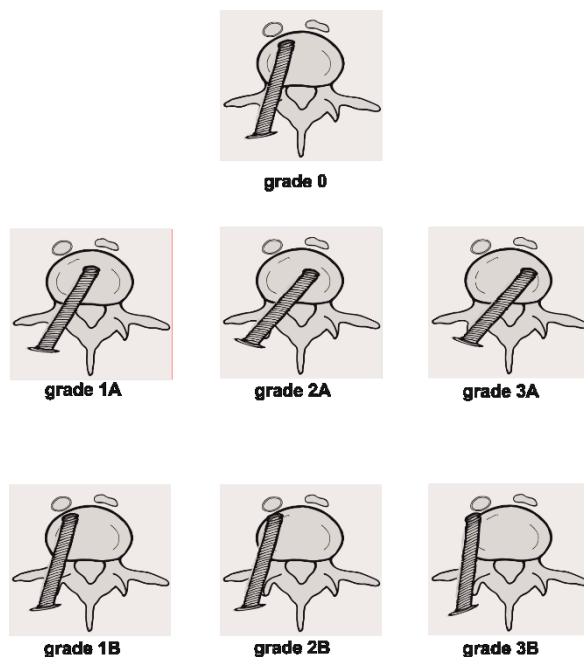
Probe Master“ (Roche, Německo) a transkripčních esejí „TagMan® Gene Expression Assays“ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Výsledný 10µl roztok obsahující 25 ng extrahované RNA byl podroben reverzní transkripci na přístroji StepOnePlus™ real-time PCR cycler (Life Technologies). Proces amplifikace byl opakován za stále stejných podmínek: 120 sekund při 50 °C, 300 sekund při 95 °C s následnými 40 cykly při 95 °C (15 sekund) a při 60 °C (60 sekund). Každý cyklus obsahoval také negativní kontrolu (vodu). Jako referenční gen byl zvolen Gapdh. Metoda $\Delta\Delta Ct$ byla využita pro relativní kvantifikaci genové exprese. Všechny takto získané výsledky byly analyzovány pomocí softwaru StepOnePlus®. Výsledky byly převedeny na log₂ škálu k zobrazení zvýšené, nebo snížené exprese oproti kontrolnímu vzorku, který byl převeden na nulovou hodnotu. Výsledky byly podrobeny statistické analýze pomocí jednocestné analýzy ANOVA s post hoc párovým testováním. Rozdíly byly považovány za signifikantní při $p < 0,05$.

6.7 Hodnocení přesnosti zavedených šroubů a dalších klinických parametrů

Přesnost zavedení transpedikulárních šroubů byla hodnocena na postoperačních rekonstrukčních transverzálních řezech z počítačové tomografie (CT). CT bylo provedeno druhý nebo třetí pooperační den. Ke zhodnocení byla použita modifikovaná 4stupňová klasifikace dle Gertzbeina hodnotící pozici šroubu ve vztahu k zevnímu kortikálnímu okraji pediklu (stupeň 0: bez prolomení l. corticalis, stupeň 1: prolomení <2 mm, stupeň 2: prolomení mezi 2 a 4 mm; stupeň 3: prolomení >4 mm). Vzhledem k odlišné klinické významnosti bylo ještě rozlišováno prolomení pediklu směrem mediálním - typ A a směrem laterálním - typ B (Obr. 18). Následně byly změřeny Cobbův úhel, angulace obratle (vertebral body angulation; VBA) a poměr komprese obratle (vertebral body index; VBI) s porovnáním údajů před operační stabilizací a po ní. Na předoperačním CT byly také změřeny šířky pediklů obratlů, do kterých byly při operaci zavedeny pedikulární šrouby. Délka operace byla extrahována z nemocničního systému, kde je uváděna standardně u každé operace. Expoziční čas a celkový produkt kermy a plochy RTG přístroje byly vyhledány v denících radiologických asistentů, kam je zapisováno

každé použití RTG přístroje. Ke skiaskopii byly využívány přístroje Ziehm Vision RFD (Ziehm Imaging GmbH, Norimberk, Německo) a Philips Veradius (Royal Philips, Amsterdam, Nizozemí).



Obr. 18 Ilustrativní obrázek modifikované klasifikace uložení pedikulárních šroubů dle Gertzbeina.

6.8 Statistická analýza

Výsledky a prezentované grafy byly zprůměrovány a jsou znázorňovány se směrodatnou odchylkou (\pm SEM). Statistická signifikance mezi jednotlivými skupinami byla posuzována pomocí testů „one-way ANOVA“, nebo v případě posuzování i druhého faktoru (čas) pomocí „two-way ANOVA“. V případě nutnosti byla k posouzení signifikance v konkrétním časovém bodě byla využita analýza „post hoc pair-to-pair“. V případě neparametrických hodnot byl k testování využit test „one-way Kruskal-Wallis“ (vše pomocí Sigmastat 3.1, Sisoft Software

Inc., San Jose, CA, USA). Rozdíly ve výsledcích byly považovány za signifikantní při $p < 0,05$ a dále označovány jako * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

7. Výsledky

7.1 Experimentální léčba míšního poranění pomocí hWJ- MSCs/nanokurkuminu

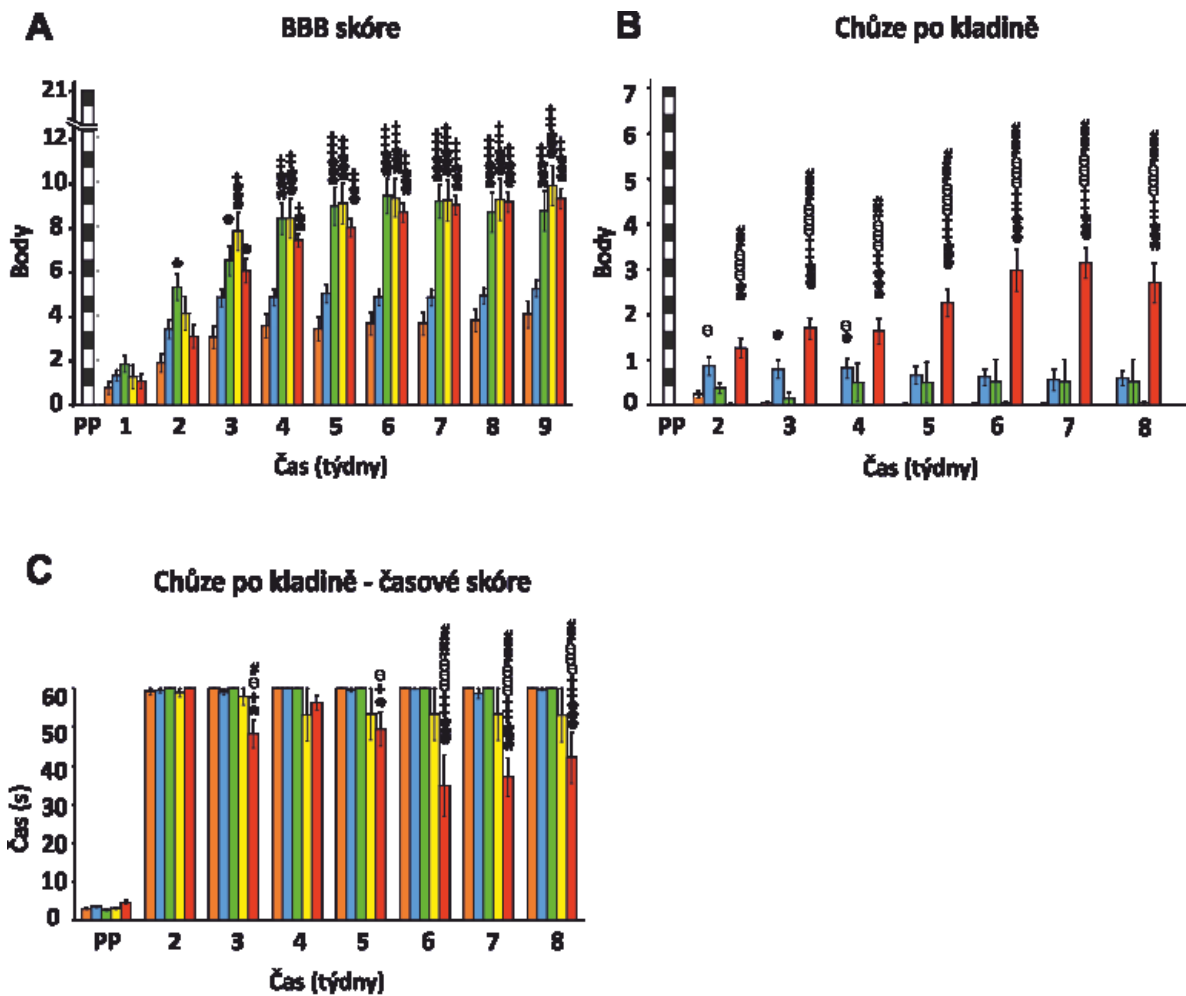
7.1.1 Behaviorální testování

7.1.1.1 hWJ-MSCs

BBB

V prvním týdnu po vytvoření míšní léze měla všechna zvířata bez rozdílu skupiny paraplegii nebo velmi těžkou paraparézu (BBB 0-1). V druhém týdnu bylo zaznamenáno signifikantní zlepšení pohybu končetin u skupiny 1,5 M hWJ-MSCs (skóre $5,28 \pm 0,9$) ve srovnání s kontrolní skupinou ($2,1 \pm 0,43$) ($p < 0,05$). Ve třetím týdnu byla hybnost dolních končetin zvířat ve skupinách 1,5 M, 3x0,5 M a 3x1,5 M signifikantně lepší oproti skupině kontrolní ($p < 0,05$). Zvířata ve skupině 0,5 M zaznamenaly pouze malé zlepšení ve srovnání s kontrolní skupinou, které nebylo hodnoceno jako signifikantní. Od čtvrtého týdne do konce experimentu pokračovalo kontinuální zlepšování schopností dolních končetin u zvířat ve skupinách 1,5 M, 3x0,5 M a 3x1,5 M. Tyto skupiny dosahovaly podobných výsledků a byly signifikantně lepší, než zvířata ve skupině 0,5 M a v kontrolní skupině ($p < 0,05$; $p < 0,001$). Konečné BBB skóre na konci experimentu bylo $4,29 \pm 0,57$ u kontrolní skupiny; $5,19 \pm 0,36$ ve skupině 0,5 M; $9,81 \pm 0,88$ ve skupině 3x0,5 M; $8,67 \pm 0,88$ ve skupině 1,5 M a $9,21 \pm 0,45$ ve skupině 3x1,5 M (Obr. 19 A).

(Two-way RM ANOVA, Dávka; $F = 8,481$, $p < 0,001$)



■ Kontrola ■ 0,5 M MSC ■ 1,5 M MSC ■ 3x 0,5 M MSC ■ 3x 1,5 M MSC
 Obr. 19 Výsledky behaviorálních studií při léčbě pomocí různých dávek hWJ-MSCs s opakováním a bez opakování. Rozsah pohybu dolních končetin při pohybu v otevřeném prostoru byl hodnocen pomocí testu BBB, kde signifikantně lepších výsledků dosáhly skupiny s vyšší dávkou a opakovaným podáváním (A). Pokročilá koordinace končetin byla měřena chůzí po kladině, kde bylo zaznamenáno celkové skóre pohybu s významným zlepšením u skupiny 3x1,5 M (B) a časové skóre opět s jasným rozdílem při podání nejvyšší dávky (C). PP - před poraněním

* p<0,05 versus kontrola; ** p<0,01 versus kontrola *** p<0,001 versus kontrola; + p<0,05 versus 0,5 M MSC; ++ p<0,01 versus 0,5 M MSC; +++ p<0,001 versus 0,5 M MSC; # p<0,05 versus 3x0,5 M MSC; ## p<0,01 versus 3x0,5 M MSC; ### p<0,001 versus 3x0,5 M MSC; ø p<0,05 versus 1,5 M MSC; øø p<0,01 versus 1,5 M MSC; øøø p<0,001 versus 1,5 M MSC; • p<0,05 versus 3x1,5 M MSC; •• p<0,01 versus 3x1,5 M MSC; ••• p<0,001 versus 3x1,5 M MSC

Chůze po kladině

Vzhledem k závažnosti neurologického deficitu nebyla většina zvířat schopná kladinu úspěšně přejít a pouze balancovala na začátku dráhy. V průběhu celého pokusu byla oproti ostatním skupinám signifikantně nejlepší skupina 3x1,5 M s dosažením konečného výsledku $3,1 \pm 0,33$ v 7. týdnu po SCI ($p < 0,01$ - $p < 0,001$) (Obr. 19 C).

(Two-way RM ANOVA, Typ léčby; $F = 20,656$, $p < 0,001$)

Spolu s bodováním pohybu po kladině byl měřen i čas potřebný ke zdolání vzdálenosti. V prvních dvou týdnech zvířata převážně balancovala na začátku dráhy bez pohybu vpřed. V následujících týdnech došlo k výraznému zlepšení pohybu u zvířat ze skupiny 3x1,5 M, která dosahovala signifikantně lepších výsledků při porovnání se všemi ostatními skupinami včetně skupiny kontrolní. Nejlepšího času bylo dosaženo v šestém týdnu ($34,9 \pm 7$ s) (Obr. 19 D).

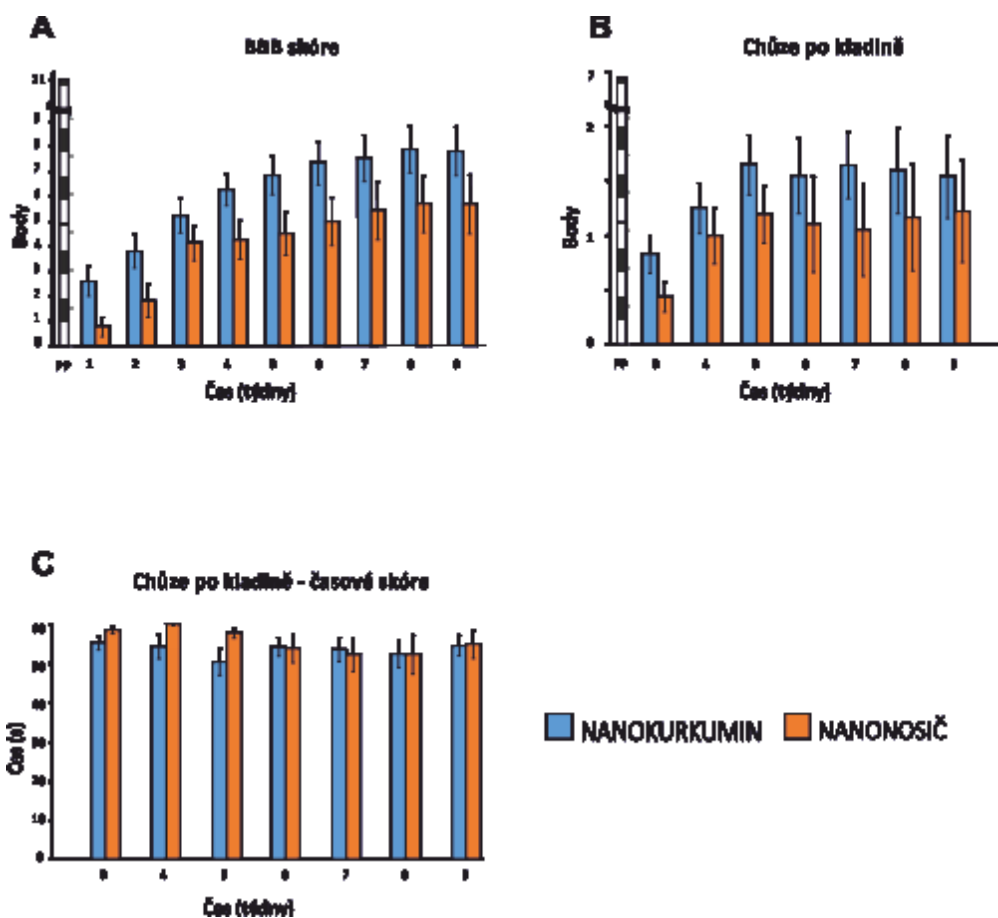
(Two-way RM ANOVA, Typ léčby; $F = 5,001$, $p = 0,002$)

7.1.1.2 Nanokurkumin

BBB

První den po míšňí lézi měla všechna zvířata bez rozdílu skupiny paraplegii nebo velmi těžkou paraparézu (BBB 0-1). V průběhu experimentu bylo pozorováno postupné zlepšení hybnosti končetin u zvířat z obou skupin. Přesto, že po celou dobu experimentu byla hybnost končetin u zvířat léčených nanokurkuminem hodnocena o cca 2 skórovací body lépe než u kontrolní skupiny, nebyl při statistickém zpracování výsledků nalezen signifikantní rozdíl mezi skupinami. Konečné BBB skóre na konci experimentu bylo $7,8 \pm 0,9$ ve skupině léčené nanokurkuminem a $5,7 \pm 1,1$ v kontrolní skupině (Obr. 20 A).

(Two-way RM ANOVA, Typ léčby; $F = 2,720$ $p = 0,110$)



Obr. 20 Výsledky behaviorálních testů při léčbě nanokurkuminem. Při testování pohybu a koordinace dolních končetin byly využity testy BBB (A) a chůze po kladině (B, C). Přestože byl ve všech testech zaznamenán trend při zlepšení hybnosti ve skupině zvířat, kterým byl podáván nanokurkumin, nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami.

Chůze po kladině

V průběhu trvání experimentu došlo k mírnému zlepšení koordinace pohybů u obou skupin, avšak bez signifikantního rozdílu při statistickém testování. Výsledné skóre bylo $1,5 \pm 0,4$ ve skupině léčené nanokurkuminem a $1,2 \pm 0,5$ ve skupině kontrolní (Obr. 20 B).

(Two-way RM ANOVA, Typ léčby; $F=0,273$ $p=0,605$)

Podobných výsledků bylo dosaženo i při měření času zdolávání vzdálenosti, kdy došlo pouze k minimálnímu nesignifikantnímu zlepšení v obou sledovaných skupinách (Obr. 20 C).

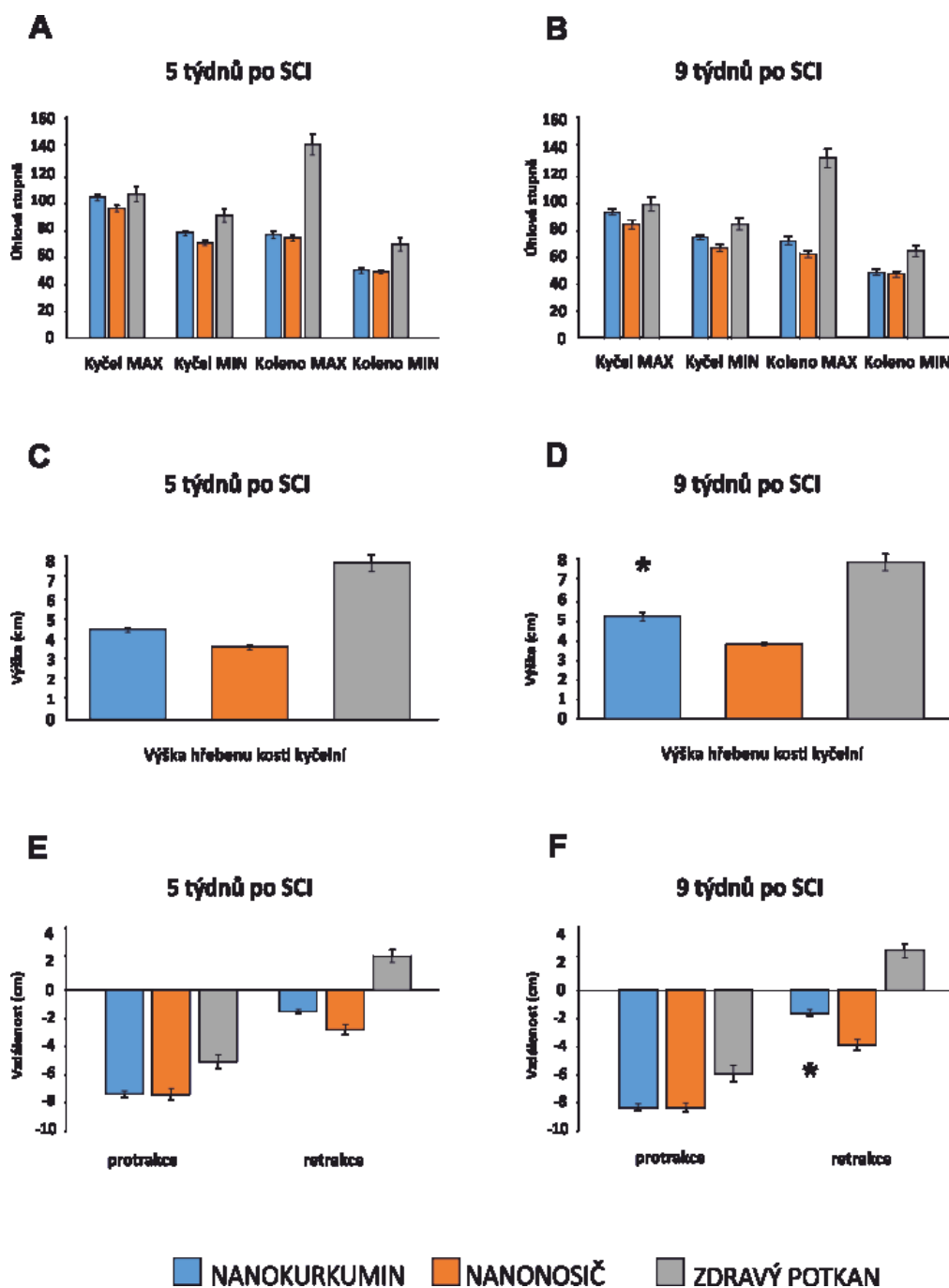
(Two-way RM ANOVA, Typ léčby; $F=0,831$ $p=0,369$)

MotoRater

Pokročilá analýza hybnosti dolních končetin byla prováděna ve dvou intervalech - pátý a devátý týden po míšní lézi. Obě skupiny byly zároveň porovnány s výsledkem zdravých potkanů. Byl měřen maximální a minimální rozsah pohybu v kyčelním a kolenním kloubu (Obr. 21 A, B). Dále byla vypočítána výška hřebenu kosti kyčelní (Obr. 21 C, D) a protrakce/retrakce chodidla (Obr. 21 E, F).

V průběhu experimentu byly zaznamenány jasné změny pohybu dolních končetin mezi zdravými potkany a potkany s míšní lézí. Signifikantně odlišných výsledků bylo dosaženo mezi skupinou zvířat léčených nanokurkuminem a kontrolní skupinou při měření výšky hřebenu kosti kyčelní a retrakci chodidla v devátém týdnu měření (silný trend také v pátém týdnu; $p=0,072$). Ve všech výše uvedených výsledcích pak byla zvířata ze skupiny léčené nanokurkuminem blíže k fyziologickým hodnotám naměřených u zdravých potkanů než zvířata ze skupiny kontrolní.

(Two-way RM ANOVA, hřeben kosti kyčelní, Typ léčby; $F=36,427$ $p<0,001$, SNK test $q=3,010$ $p=0,047$; retrakce chodidla, Typ léčby; $F=57,238$ $p<0,001$, SNK test 9W $q=3,501$ $p=0,021$, 5W $q=2,663$ $p=0,072$)



Obr. 21 Výsledky behaviorální studie kinetiky pohybu pomocí přístroje motoRater při léčbě nanokurkuminem. Měření rozsahu pohybu v kolenním a kyčelním kloubu bylo 5. týden (A) i 9. týden (B) po SCI fyziologičtější ve skupině léčené nanokurkuminem. Schopnost nést váhu vlastního těla zadními končetinami byla hodnocena měřením výšky hřebenu kosti kyčelní od základny (C, D), kdy bylo dosaženo signifikantně vyšších hodnot 9. týden po SCI ve skupině léčené nanokurkuminem. Stejněho výsledku pak bylo dosaženo i při měření retrakce a protrakce packy, kde byly naměřené hodnoty signifikantně bližší fyziologickým hodnotám v léčené skupině (E, F).

* $p < 0,05$

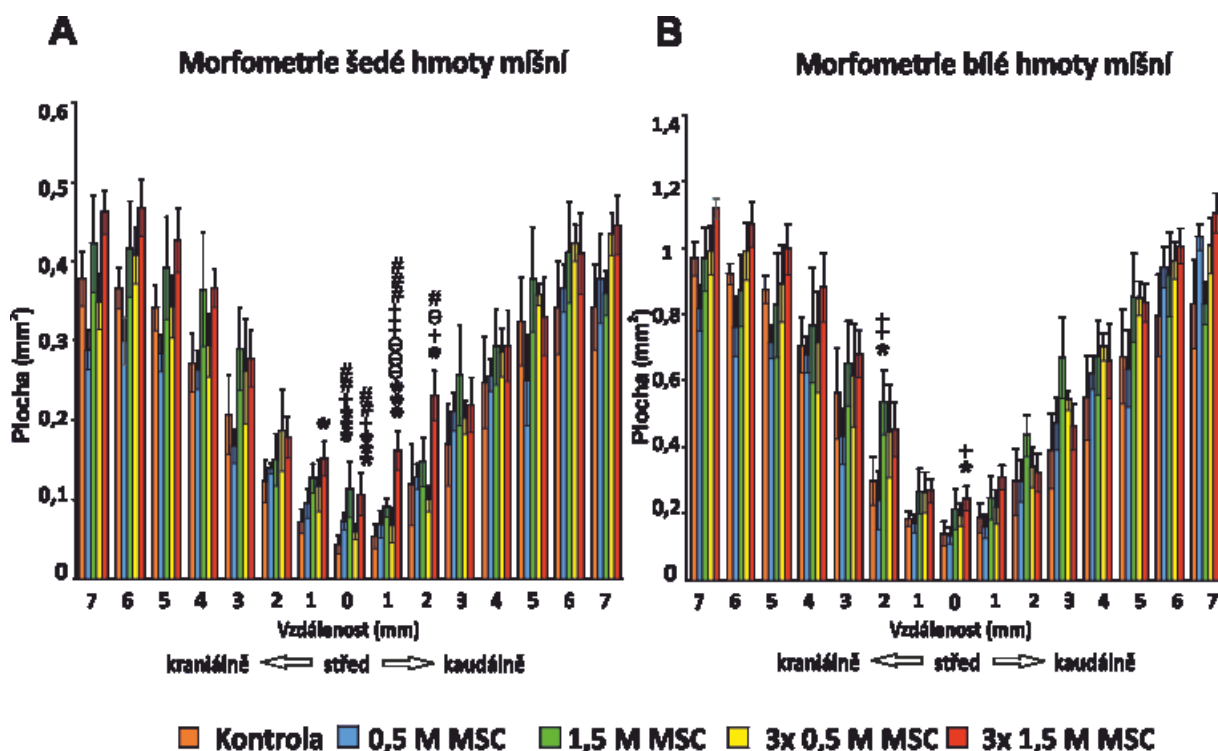
7.1.2 Histologická a imunohistochemická analýza

7.1.2.1 hWJ-MSCs

Morfometrie šedé a bílé hmoty míšň

Morfometrie bílé a šedé hmoty prokázala změny hlavně v oblastech kolem středu léze. Signifikantně více zachovalé šedé i bílé hmoty míšň bylo prokázáno u skupin s vyššími dávkami hWJ-MSCs - 1,5 M a 3x1,5 M (Obr. 22 A, B).

(Two-way RM ANOVA, Typ léčby; šedá hmota míšň – $F=3,341$, $p=0,03$, bílá hmota míšň – $F=1,290$, $p=0,307$)



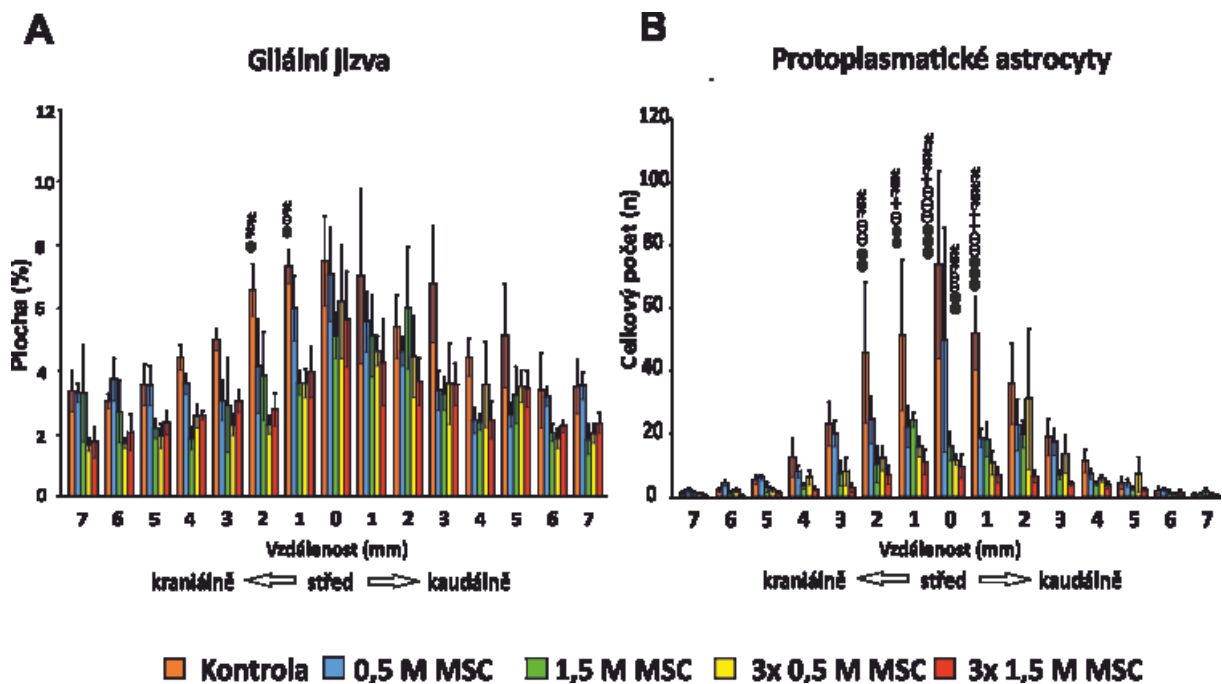
Obr. 22 Výsledky morfometrie šedé a bílé hmoty míšň při léčbě hWJ-MSCs. Signifikantně výraznějšího zachování šedé hmoty míšň kolem středu míšň léze bylo prokázáno ve skupinách 3x1,5 M a 1,5 M (A). Podobného výsledku bylo dosaženo také při porovnávání ploch bílé hmoty míšň (B).

* $p<0,05$ versus kontrola; ** $p<0,01$ versus kontrola; *** $p<0,001$ versus kontrola; + $p<0,05$ versus 0,5 M MSC; ++ $p<0,01$ versus 0,5 M MSC; +++ $p<0,001$ versus 0,5 M MSC; # $p<0,05$ versus 3x0,5 M MSC; ## $p<0,01$ versus 3x0,5 M MSC; ### $p<0,001$ versus 3x0,5 M MSC; e $p<0,05$ versus 1,5 M MSC; ee $p<0,01$ versus 1,5 M MSC; eee $p<0,001$ versus 1,5 M MSC; • $p<0,05$ versus 3x1,5 M MSC; •• $p<0,01$ versus 3x1,5 M MSC; ••• $p<0,001$ versus 3x1,5 M MSC

Gliová jizva a reaktivní astrocyty

Při porovnávání velikosti rozsahu gliové jizvy bylo dosaženo podobných výsledků jako v ostatních imunohistochemických vyšetřeních. Skupina 0,5 M se téměř nelišila od kontrolní skupiny, zatímco ostatní skupiny s vyššími dávkami (3x1,5 M, 3x0,5 M, 1,5 M) měly kolem centrální rozpadové dutiny signifikantně nižší rozsah gliové jizvy (Obr. 23 A) i počet reaktivních protoplasmatických astrocytů (Obr. 23 B).

Two-way RM ANOVA, Typ léčby - gliová jizva; $F=4,026$, $p=0,015$; Typ léčby - protoplasmatické astrocyty; $F=3,997$, $p=0,015$)



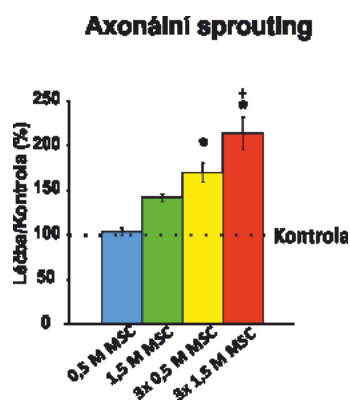
Obr. 23 Výsledky měření rozsahu gliové jizvy a počtu protoplasmatických astrocytů při léčbě h-WJMSCs 9. týden po SCI. Rozsah gliové jizvy byl signifikantně nižší u skupin léčených 3x1,5 M a 3x0,5 M (A). Počet protoplasmatických astrocytů byl signifikantně zvýšený kolem středu léze v kontrolní (neléčené) skupině (B).

+ $p<0,05$ versus 0,5 M MSC; ++ $p<0,01$ versus 0,5 M MSC; +++ $p<0,001$ versus 0,5 M MSC; # $p<0,05$ versus 3x0,5 M MSC; ## $p<0,01$ versus 3x0,5 M MSC; ### $p<0,001$ versus 3x0,5 M MSC; ø $p<0,05$ versus 1,5 M MSC; øø $p<0,01$ versus 1,5 M MSC; øøø $p<0,001$ versus 1,5 M MSC; • $p<0,05$ versus 3x1,5 M MSC; •• $p<0,01$ versus 3x1,5 M MSC; ••• $p<0,001$ versus 3x1,5 M MSC

Axonální sprouting

Při porovnávání jednotlivých skupin bylo dosaženo významných rozdílů. Efekt léčby na počet nově větviček se axonů byl nejen závislý na velikosti dávky, ale také na opakovaném podávání. Dávka 0,5 M, podobně jako při behaviorálním testování, se významněji nelišila od kontrolní skupiny (102 ± 4 %). S postupným zvyšováním či opakováním dávky se zvyšoval rozdíl jednotlivých skupin při porovnání s kontrolní skupinou (1,5 M - 140 ± 4 %, 3x0,5 M - 168 ± 10 %). Nejvýznamnější efekt pak měla podání ve skupině 3x1,5 M, kdy byl celkový počet nově vypučených axonů více než dvojnásobný v porovnání s kontrolní skupinou (3x1,5 M - 212 ± 18 %) ($p < 0,05$) (Obr. 24).

(One-way ANOVA, Typ léčby; $H_4 = 21,844$, $p < 0,001$)



Obr. 24 Výsledky axonálního sproutingu při léčbě hWJ-MSCs v porovnání s kontrolní skupinou, která je brána jako 100 %. Histologická analýza odhalila zvyšující trend v počtu pučících axonů se zvyšováním dávky buněk se signifikantním rozdílem při léčbě ve skupinách s opakovaným podáváním.

* $p < 0,05$ versus kontrola; + $p < 0,05$ versus 0,5 M MSC

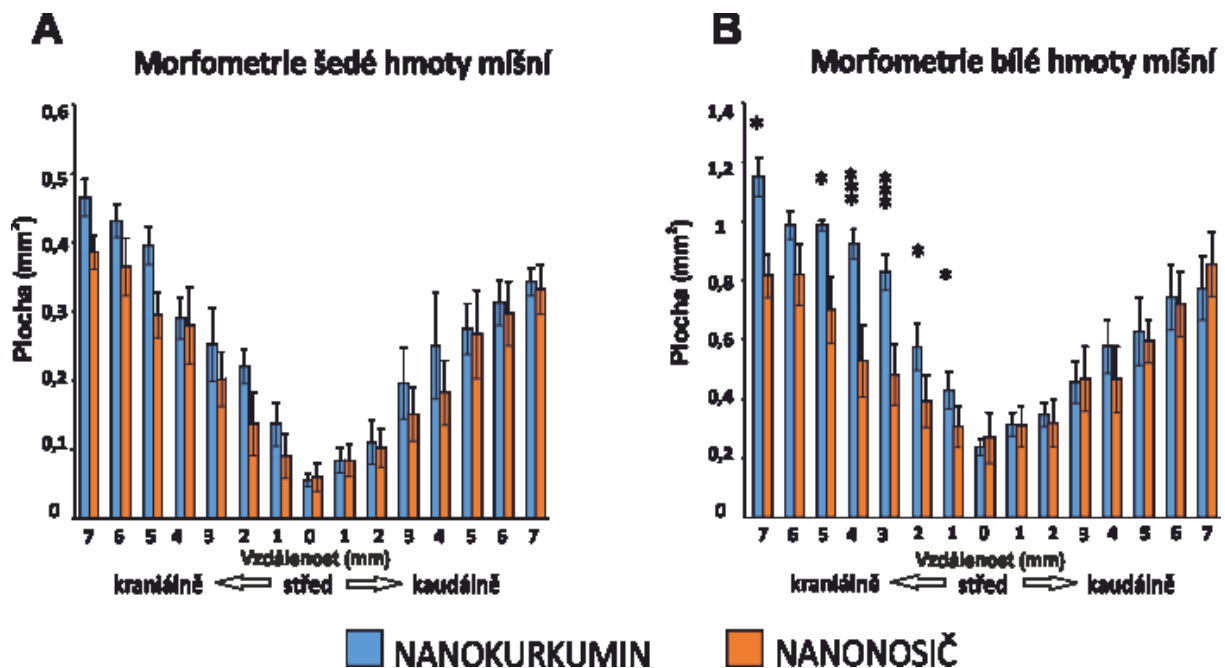
7.1.2.2 Nanokurkumin

Morfometrie šedé a bílé hmoty míšň

Celková plocha šedé hmoty míšň byla lehce větší ve všech zkoumaných řezech míchou, avšak nedosáhla signifikantního rozdílu mezi jednotlivými skupinami (Obr. 25 A).

Morfometrie bílé hmoty míšni prokázala signifikantně více zachovalé tkáně v kraniálních úsecích od centra léze u skupiny léčené nanokurkuminem (Obr. 25 B).

(Two-way RM ANOVA, Typ léčby; šedá hmota míšni $F=1,350$ $p=0,266$, bílá hmota míšni $F=7,216$ $p=0,019$)



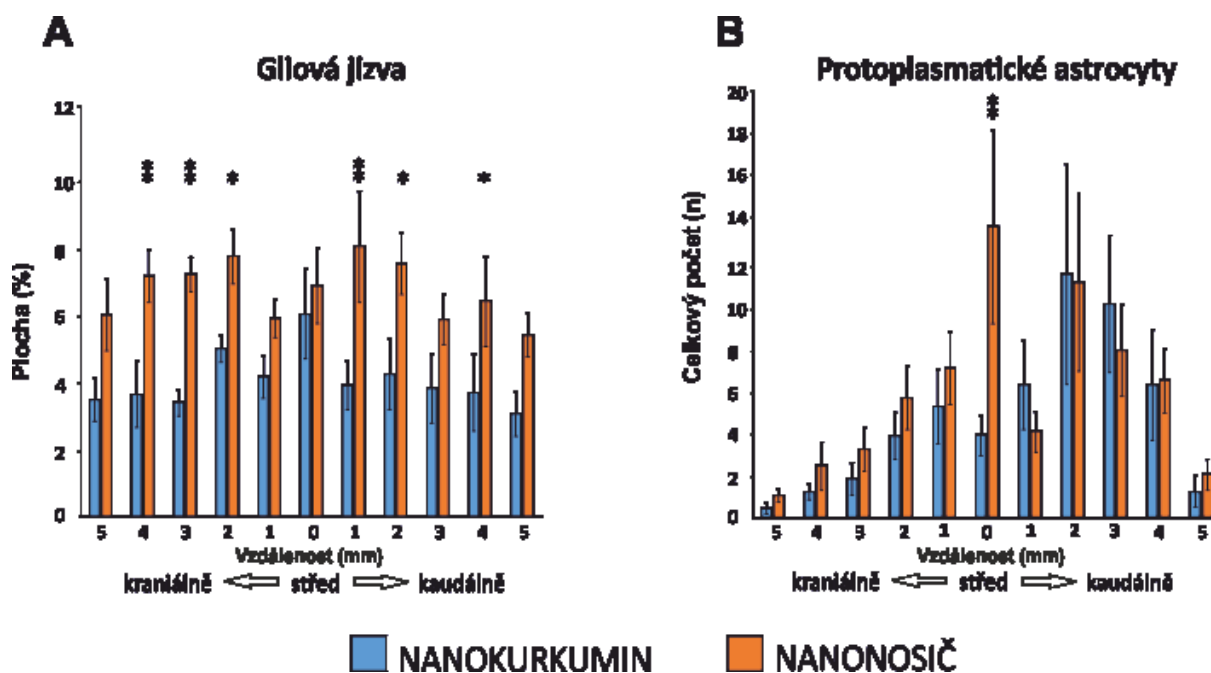
Obr. 25 Výsledky morfometrie šedé a bílé hmoty míšni při léčbě nanokurkuminem. Při porovnávání celkové zachované plochy šedé hmoty byl nalezen trend ke zlepšení ve skupině léčené nanokurkuminem, ale při statistickém průkazu nebyly nalezeny signifikantní rozdíly (A). Bílá hmota míšni byla signifikantně více zachována po SCI u skupiny léčené nanokurkuminem a to v kraniální části míchy od středu léze (B).

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Gliová jizva a reaktivní astrocyty

Skupina léčená pomocí nanokurkuminu měla v porovnání s kontrolní skupinou signifikantně menší zónu gliové jizvy jak kraniálně, tak kaudálně od středu léze. Počet protoplazmatických astrocytů byl v obou skupinách velmi podobný, pouze ve středu léze byl signifikantní nárůst v kontrolní skupině oproti skupině léčené nanokurkuminem (obr. 26 A, B).

(Two-way RM ANOVA, Typ léčby - gliová jizva $F=25,952$ $p<0,001$; Typ léčby - protoplazmatické astrocyty $F=1,020$ $p=0,342$)



Obr. 26 Výsledky měření rozsahu gliové jizvy a počtu protoplasmatických astrocytů při léčbě nanokurkuminem 9. týden po SCI. Rozsah gliové jizvy byl signifikantně zvětšen kranálně i kaudálně od středu léze v kontrolní skupině (A). Počet protoplasmatických astrocytů dosáhl signifikantně rozdílného výsledku pouze ve středu léze, kdy byl zvýšen v kontrolní skupině (B).

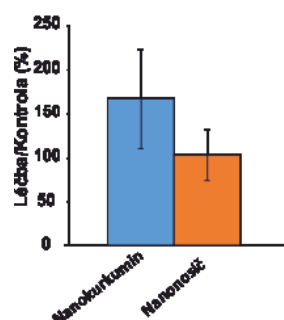
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Axonální sprouting

Skupina léčená nanokurkuminem při porovnání s kontrolní skupinou dosáhla vyššího počtu GAP43 pozitivních axonů, avšak tento rozdíl nebyl hodnocen jako signifikantní (168 ± 55 %) (Obr. 27).

(One-way ANOVA $F=1,111$ $p=0,319$)

Axonální sprouting



Obr. 27 Výsledky axonálního sproutingu při léčbě nanokurkuminem v porovnání s kontrolní skupinou, která byla brána jako 100 %. Přes trend zvýšení pučících vláken ve skupině léčené nanokurkuminem nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.

7.1.3 qPCR

7.1.3.1 hWJ-MSCs

Vzorky k analýze dynamiky exprimovaných genů pomocí qPCR byly odebrány čtvrtý a devátý týden po vytvoření míšní léze. Kontrolní skupina (podáván fyziologický roztok) byla pro porovnávání stanovena na nulové hodnotě. V rámci porovnávání byly analyzovány geny patřící do skupiny M1 makrofágů (*Irf5*, *Cd86*), M2 makrofágů (*Mrc1*, *Cd163*), markerů gliové jizvy (*Gfap*) a markerů apoptózy (*Casp3*).

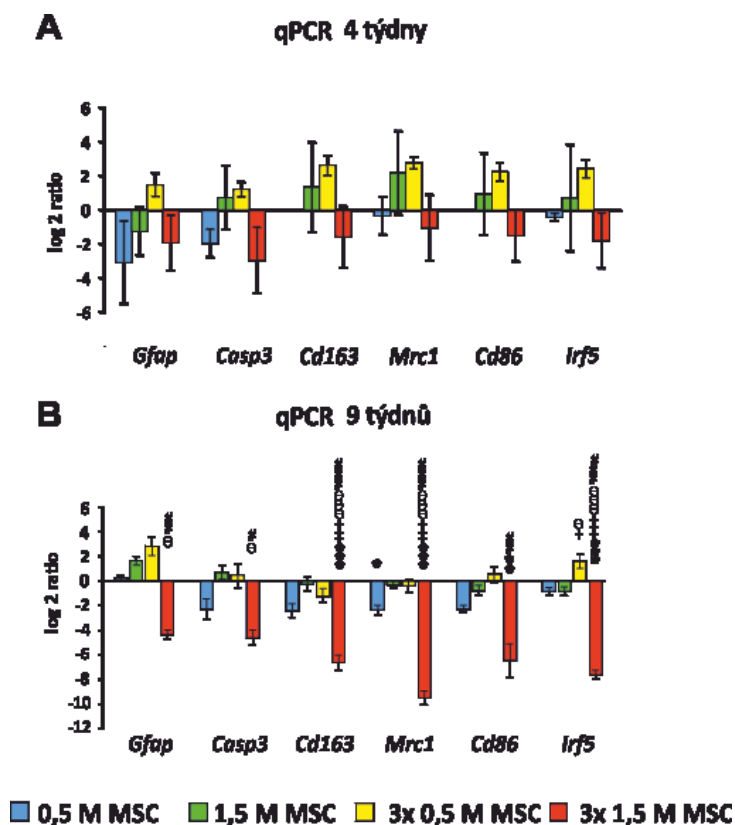
Geny M1 makrofágů, které jsou hodnoceny převážně jako pro-zánětlivé, měly ve 4. týdnu nesignifikantně zvýšenou expresi u skupin 1,5 M a 3x0,5 M, zatímco v 9. týdnu byla exprese snížena u všech sledovaných skupin kromě 3x0,5 M. Signifikantní snížení bylo pouze u skupiny 3x1,5 M ($p < 0,05$).

Geny M2 makrofágů, hodnocené převážně jako proti-zánětlivé, měly ve 4. týdnu nesignifikantní zvýšení exprese u skupin léčených celkovou dávkou buněk 1,5 milionu (1,5 M a 3x0,5 M). V 9. týdnu byla naopak exprese snížena ve všech léčených skupinách se signifikantním rozdílem oproti kontrolní skupině ve skupinách 0,5 M ($p < 0,05$) a 3x1,5 M ($p < 0,001$).

Genová exprese *Gfap* byla ve 4. týdnu nevýznamně snížena ve všech skupinách kromě 3x0,5 M. V 9. týdnu zůstala exprese významně snížena pouze u skupiny 3x1,5 M, což korespondovalo

i s nálezem imunohistochemickým, kdy v této skupině byla i nejnižší gliová jizva. Expres apoptotického genu *Casp3* byla snížena u skupin 0,5 M a 3x1,5 M a zůstala přibližně stejná v obou sledovaných časových intervalech (Obr. 28 A, B).

(One-way ANOVA, Typ léčby; *Gfap* – $H_4=18,454$, $p=0,001$, *Casp3* – $H_4=15,153$, $p=0,004$, *Cd163* – $F=20,243$, $p<0,001$, *Mrc1* – $F=59,317$, $p<0,001$, *Cd86* – $H_4=19,170$, $p<0,001$, *Irf5* – $F=47,495$, $p<0,001$)



Obr. 28 Výsledky qPCR vybraných genů při léčbě hWJ-MSCs 4. a 9. týden po SCI. Zatímco 4 týdny po SCI nebyly zaznamenány žádné významné změny v expresi zkoumaných genů (A), 9. týden byly významně snižené hodnoty u skupiny 3x1,5 M.

* $p<0,05$ versus kontrola; ** $p<0,01$ versus kontrola; *** $p<0,001$ versus kontrola; + $p<0,05$ versus 0,5 M MSC; ++ $p<0,01$ versus 0,5 M MSC; +++ $p<0,001$ versus 0,5 M MSC; # $p<0,05$ versus 3x0,5 M MSC; ## $p<0,01$ versus 3x0,5 M MSC; ### $p<0,001$ versus 3x0,5 M MSC; ø $p<0,05$ versus 1,5 M MSC; øø $p<0,01$ versus 1,5 M MSC; øøø $p<0,001$ versus 1,5 M MSC; • $p<0,05$ versus 3x1,5 M MSC; •• $p<0,01$ versus 3x1,5 M MSC; ••• $p<0,001$ versus 3x1,5 M MSC

7.1.3.2 Nanokurkumin

Genová exprese vybraných genů

V 9. týdnu po míšní lézi byla analyzována pomocí qPCR genová exprese genů asociovaných s růstovou aktivitou (*Sort1*, *Vegfa*, *Fgf2*), tvorbou gliové jizvy (*Gfap*, *Olig2*), axonálním sproutingem (*Gap43*), apoptotickými procesy (*Casp3*) a genů patřících do skupin M1 nebo M2 makrofágů a zánětlivých procesů (*Mrc1*, *Irf5*, *NfkB*). Výsledky odhalily trend snížené exprese hlavně u genů *Mrc1* a *Casp3* ve skupině léčené nanokurkuminem, avšak podle statistického testování nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl (Obr. 29 A).

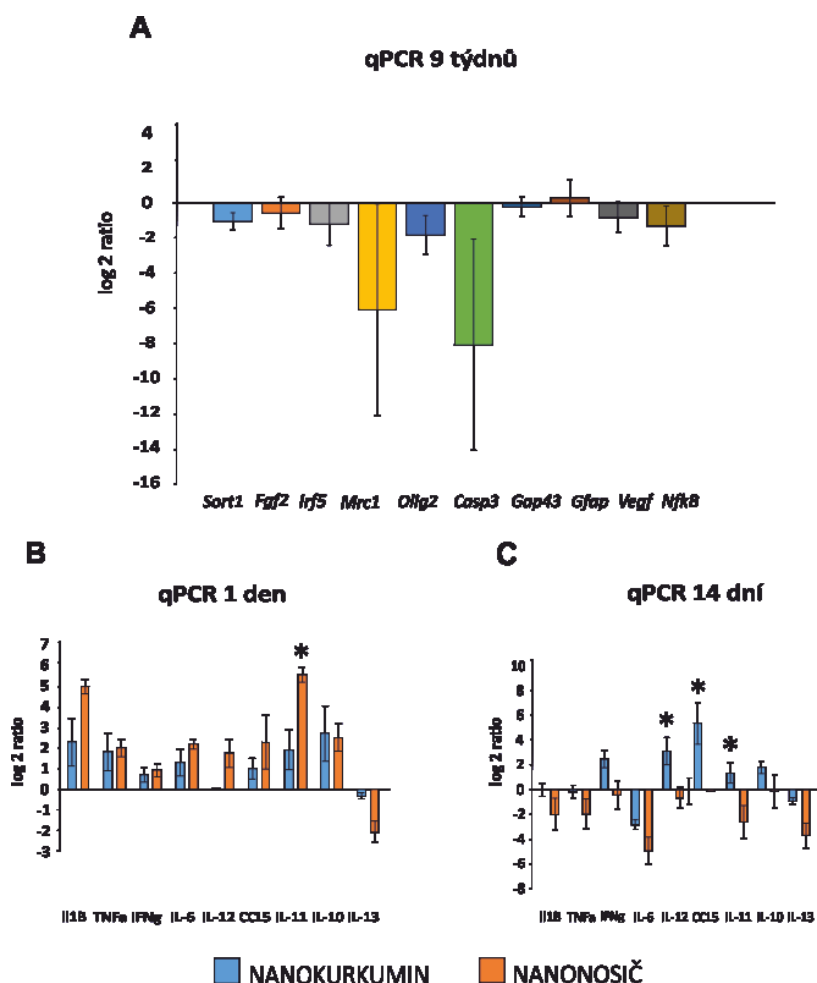
Zánětlivá odpověď

V rámci posuzování zánětlivé odpovědi v reakci na podání protizánětlivého léčiva nanokurkuminu jsme se soustředili na velmi časně změny v expresi interleukinů. Vyšetření qPCR bylo ze vzorků míchy provedeno 1 den (1D) a 14 dní (14D) po míšní lézi. V prvním časovém úseku (1D) byla ve skupině léčené nanokurkuminem významně snížená exprese IL-11 a IL-1 β (Obr. 29 B).

(One-way ANOVA, Typ léčby; IL-11 - $F=10,360$ $p=0,004$, SNK test $q=3,979$ $p=0,019$, IL-1 β - $F=7,644$ $p=0,010$, SNK test $q=2,834$ $p=0,073$)

V druhém časovém intervalu (14D) byla u skupiny léčené nanokurkuminem signifikantně zvýšená exprese genů patřící do skupiny RANTES (*CCL5*), IL-11 a IL-12. Dále byl také pozorován silný trend významnosti u zvýšené exprese genů IL-6 a IL-13 (Obr. 29 C).

(One-way ANOVA, Typ léčby; RANTES - $F=6,551$ $p=0,015$, Holm-Sidak test $t=3,111$ $p=0,022$, IL11 - $F=4,566$ $p=0,039$, Holm-Sidak test $t=2,967$ $p=0,042$, IL12 - $F=5,002$ $p=0,031$, Holm-Sidak test $t=2,929$ $p=0,045$, IL-6 - $F=8,054$ $p=0,008$, Holm-Sidak test $t=2,285$ $p=0,089$, IL13 - $F=5,948$ $p=0,020$, Holm-Sidak test $t=2,407$ $p=0,072$)

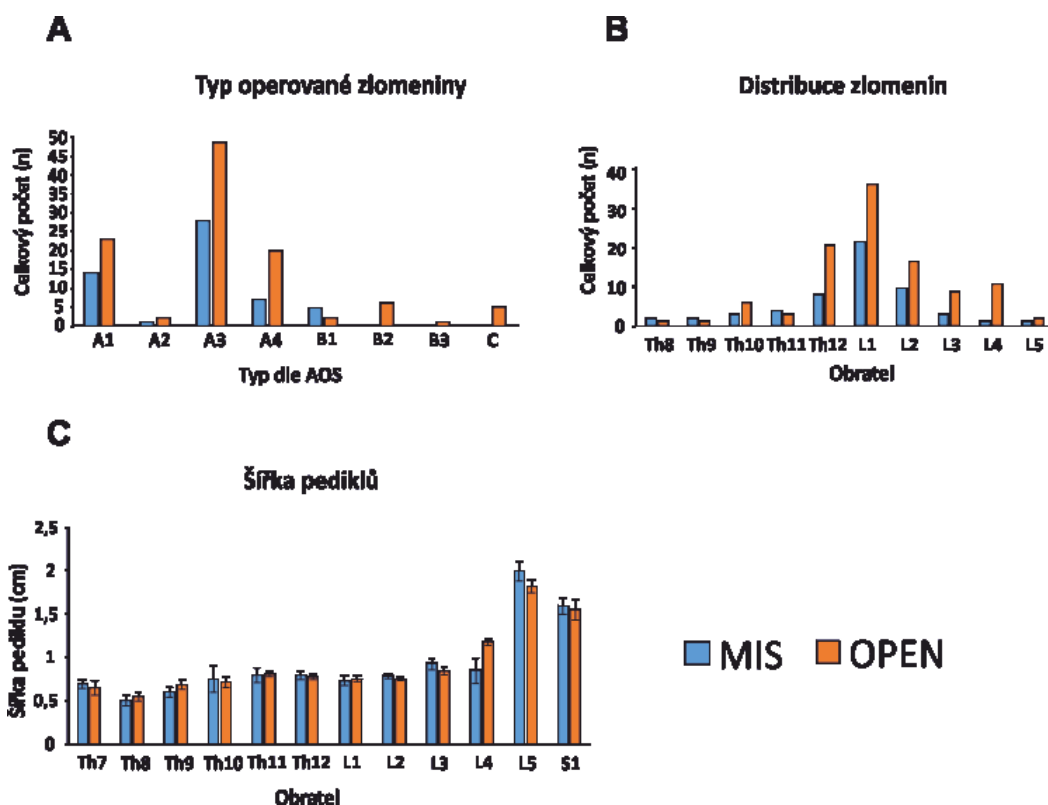


Obr. 29 Výsledky analýzy vybraných genů po léčbě nanokurkuminem. 9 týdnů po SCI nebyly zaznamenány žádné signifikantní změny v expresi zánětlivých, růstových ani apoptotických genů (A). Brzké změny exprese zánětlivých cytokinů byly sledovány 1 den (B) a 14 dní po SCI (C). Byly zaznamenány signifikantní změny v expresi IL-11, IL-12 a CCL 5.

* $p < 0,05$

7.2 Rozdíly mezi operacemi vedenými MIS a OPEN

Celkově bylo zavedeno 632 pedikulárních šroubů. Z tohoto počtu pak 430 otevřenou technikou a 202 pomocí mini-invazivní perkutánní techniky. V obou skupinách byla nejčastější indikací ke stabilizaci fraktura typu A3 (Obr. 30 A) a nejčastěji postižený obratel L1 (Obr. 30 B). Nejčtenějším typem ošetření byla klasická stabilizace pomocí 4 pedikulárních šroubů (podrobnosti v Tab. 7). Tloušťka pediklů, do kterých byly zaváděny pedikulární šrouby, se v jednotlivých skupinách od sebe signifikantně nelišila (obr. 30 C).



Obr. 30 Charakteristika zlomených obratlů. Typy operovaných zlomenin dle klasifikace AOS (A). Počet operovaných obratlů (B) a šířky pediklů, do kterých byly zavedeny pedikulární šrouby (C).

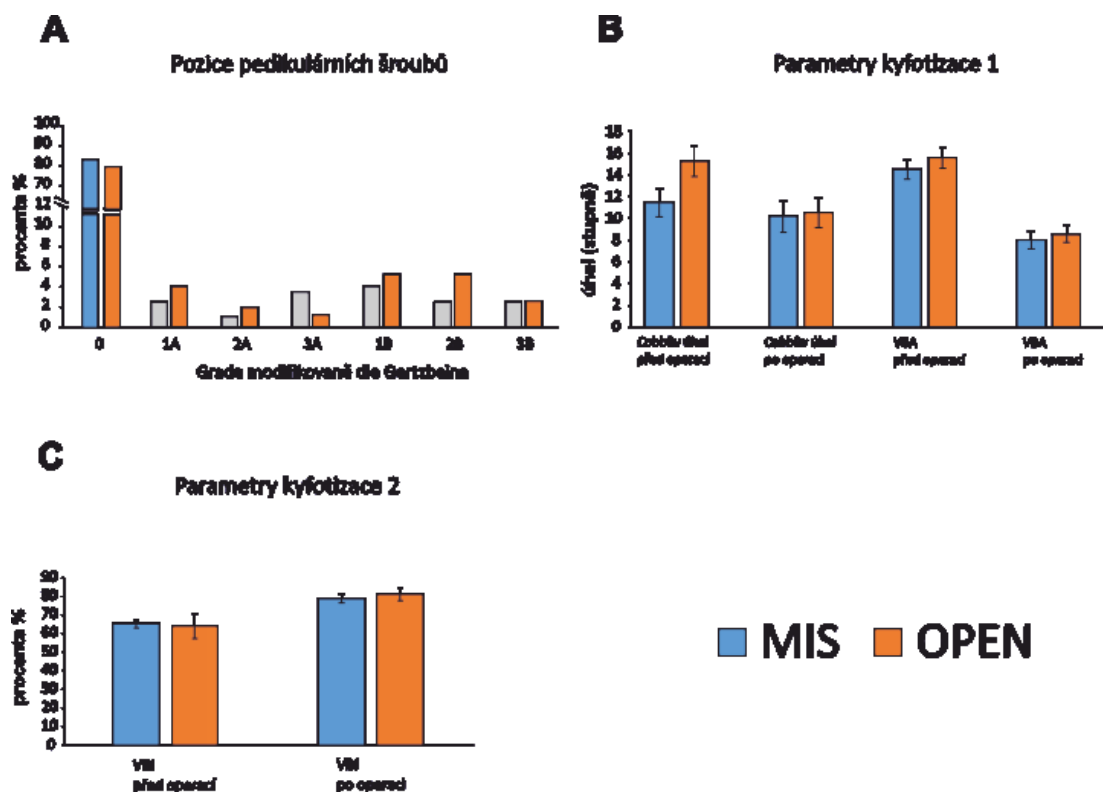
		OPEN	MIS
celkem pacientů		100	47
poměr muži:ženy		55:45	34:13
průměrný věk		48	44
celkem zavedených šroubů		430	202
typ operace	Klasická stabilizace obratle (4 šrouby)	93	41
	Jiný typ stabilizace (6-8 šroubů)	7	6

Tab. 4 – Charakteristika jednotlivých operovaných skupin

Ve skupině OPEN bylo dosaženo zcela bezchybného umístění pedikulárního šroubu-stupeň 0 v 80,2 % případů. Nejčastějším typem malpozice byl stupeň 1B a 2B (shodně 5,1 %), dalšími typy malpozice byly stupeň 1A (3,9 %), stupeň 3B (2,5 %), stupeň 2A (1,8 %) a stupeň 3A (1,1 %) (Obr. 31 A).

Skupina MIS zahrnovala celkem 84,2 % šroubů zavedených bezchybně - tedy hodnocených jako stupeň 0. Malpozičně zavedených šroubů bylo celkem 32 (15,8 %). Stejně jako v přechozí skupině byl nejčastějším typem malpozice stupeň 1B (4,0 %), z dalších typů pak stupeň 3A (3,5 %), stupně 1A, 2B, 3B (shodně 2,5 %) a stupeň 2A (1,0 %) (Obr. 31 A). Rozdíl v uložení pedikulárních šroubů v jednotlivých skupinách nebyl signifikantní ($p=0,319$).

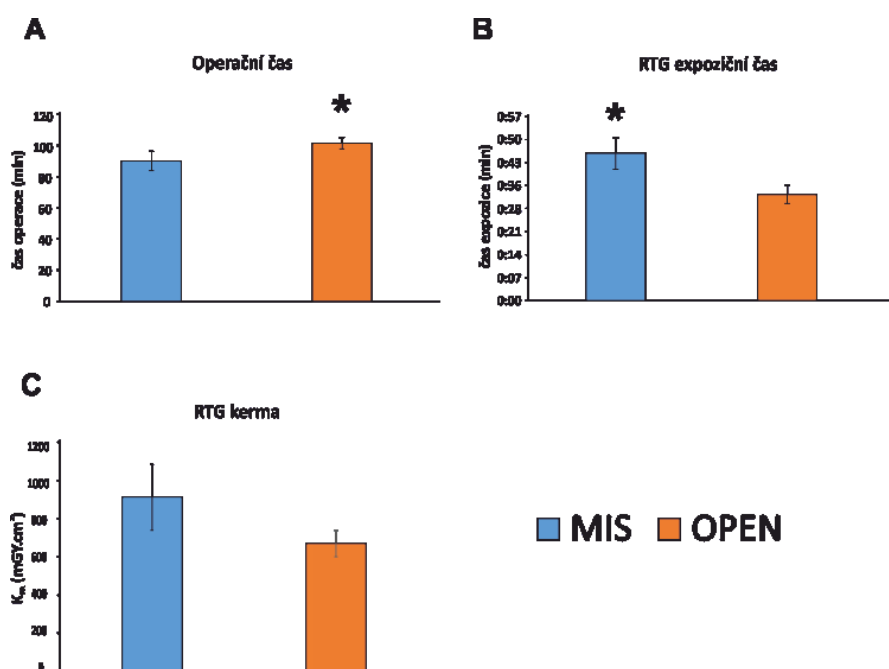
Cobbův úhel před operací byl ve skupině MIS v průměru $11^\circ (\pm 1,3^\circ)$ s redukcí po operaci na $9,8^\circ (\pm 1,4^\circ)$. Ve skupině OPEN byl operačně Cobbův úhel redukován z $14,7^\circ (\pm 1,3^\circ)$ na $10,2^\circ (\pm 1,3^\circ)$. Rozdíl nebyl hodnocen jako signifikantní ($p=0,134$) (Obr. 28 B). V ostatních parametrech kyfotizace se jednotlivé skupiny od sebe taktéž signifikantně nelišily (obr. 31 C).



Obr. 31 Výsledky přesnosti zavedených šroubů dle modifikované Gertzbeinovy škály (A) a radiologických kyfotizačních parametrů (B, C). Rozdíly mezi jednotlivými skupinami nebyly hodnoceny jako signifikantní.

Celková doba operace byla ve skupině OPEN 103 minut a byla signifikantně vyšší než ve skupině MIS, kde operace trvala v průměru 91 minut. ($p=0,36$; $H=4,416$) (obr. 32 A)

Expoziční časy RTG záření byly signifikantně delší ve skupině MIS – 45 s, než ve skupině OPEN – 33 s ($p=0,018$; $q=3,428$) (obr. 32 B). Radiační kerma na plochu byla ve skupině OPEN 670 $mGy.cm^2$, ve skupině MIS 917 $mGy.cm^2$. Rozdíl nebyl hodnocen jako signifikantní ($p=0,215$) (obr. 32 C).



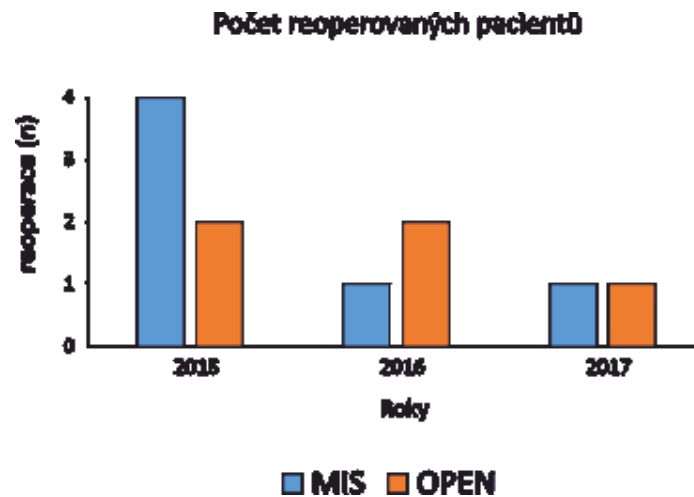
Obr. 32 Zhodnocení celkové operačního času (A), RTG expozičního času (B) a radiační kermy (C). Byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami, kdy operační čas byl signifikantně zvýšen u otevřené metody, zatímco RTG expoziční čas byl signifikantně zvýšen u metody MIS.

* $p<0,05$

Ve skupině OPEN byla z celkového počtu 100 operací celkem v 5 případech indikována reoperace a to pro klinický obraz radikulárního syndromu stranově korelujícího s malpozicí šroubu typu 3A (3×), 3B (1×) a 2A (1×). Další dva pacienti s CT verifikovanou malpozicí typu 3A nebyli revidováni z důvodu negativního klinického nálezu.

Ve skupině MIS bylo z celkem 47 operací nutné přistoupit k revizní operaci u 6 pacientů, a to vždy pro malpozici typu 3A s odpovídající radikulární symptomatikou. Zatímco ve skupině

OPEN zůstal počet reoperací v jednotlivých letech velmi podobný, ve skupině MIS byl zaznamenán větší rozdíl mezi prvním rokem zavedení této techniky a lety následujícími (obr. 33).



Obr. 33 Počet reoperovaných pacientů v jednotlivých sledovaných letech.

Ve skupině OPEN byly zaznamenány celkem dvě infekce rány, které však nevyžadovaly chirurgickou revizi. Ve skupině MIS nebyl problém s hojením rány zaznamenán.

8. Diskuze

8.1 hWJ-MSCs

Po primární akutní chirurgické dekompresi a stabilizaci zlomené páteře se stává cílem terapie sekundárního míšního poranění s minimalizací negativního dopadu patologických jevů. Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) svojí parakrinní sekrecí interagují s okolním mikroprostředím zraněné tkáně. MSCs podporují revaskularizaci, modulují zánětlivou odpověď (282) a produkují různé druhy růstových faktorů a cytokinů (283), čímž pomáhají redukovat oxidativní stres způsobující apoptózu buněk (284).

Lidské mezenchymální buňky lze izolovat z mnoha dospělých tkání zahrnujících kostní dřev, tukovou tkáň, periferní krev, plíce či srdce (324-327). MSCs získané z Whartonova rosolu mají nespornou výhodu ve způsobu získávání, který je neinvazivní, nepředstavuje etický problém a vzhledem k uniformitě buněk po celé délce pupečníku lze z jedné izolované tkáně získat velké množství buněk (328). hWJ-MSCs mají také při porovnání s ostatními MSCs vyšší proliferativní potenciál s nízkou senescencí při pasážování, nižší imunogenicitu vzhledem ke sníženým hodnotám MHC-I a úplné absenci MHC-II a jsou prokazatelně nontumoriformní (285-287, 329).

Způsob podávání kmenových buněk k dosažení ideální distribuce je častým námětem k diskusi především vzhledem k poměru risk/benefit jednotlivých aplikačních metod při možném klinickém využití. Využívá se intravenózní vstup, intratékální aplikace do subarachnoidálního prostoru páteřního kanálu popřípadě přímá implantace do místa léze. Přestože je dokázán vyšší výskyt buněk v místě léze po přímém intraparenchymálním podání (330-332), metaanalýzy neodhalily signifikantně lepší efekt na funkční zlepšení hybnosti dolních končetin (332, 333). Některé studie dokonce zmiňují zlepšení v behaviorálních studiích pouze po intratékálním podání (334). Vzhledem k potenciální klinické translaci byla zvolena mini-invazivní cesta intratékální aplikace lumbální punkcí, která je lehce proveditelná i v podmínkách klinického pracoviště bez významnějšího rizika. Po aplikaci buněk do subarachnoidálního prostoru by měla být zajištěna diseminace buněk v subarachnoidálním

prostoru páteřního kanálu pomocí cirkulace likvoru (335-337). V naší studii jsme však významnější migraci buněk páteřním kanálem nezaznamenali a 2 týdny po aplikaci byla většina přežívajících buněk nalezena v oblasti caudy equina v záhybech mezi nervovými kořeny.

Pro aplikaci buněk byl zvolen 7. pooperační den v subakutní fázi míšního poranění, která je u potkanů definována jako období mezi 3. a 14. dnem po primárním inzultu. V humánní medicíně je toto období definováno jako první dva měsíce po poranění. Tento časový horizont je optimální k cílení buněčné terapie, neboť již postrádá agresivní zánětlivé prostředí akutní fáze, avšak ještě nejsou rozvinuté chronické změny jako gliová jizva či postmalatické kavity (338-340).

V naší experimentální studii jsme porovnávali intratékální podávání různého počtu hWJ-MSCs (0,5 mil. a 1,5 mil.) formou jednotlivého, nebo třikrát opakovaného podání. Vzhledem k udávané době přežití allogeních kmenových buněk v páteřním kanálu v rozmezí několika dnů až dvou týdnů (341-343) byla vyslovena hypotéza, že opakovaným podáváním lze prodloužit trofický a imunomodulační parakrinní efekt hWJ-MSCs.

Množství MSCs potřebných k dosažení dostatečného modulačního parakrinního efektu je často diskutovaným tématem. Většina experimentálních studií zaměřených na posouzení efektu intratékálně podávaných MSCs z různých zdrojů využívala dávku o velikosti 0,2-1 milion buněk aplikovanou jednorázovým podáním (344-348). Při využití opakovaného (1x - 5x) podávání bylo zjištěno, že trojnásobná transplantace buněk může vést k prodlouženému přežívání buněk v hostitelském prostředí vedoucímu ke zlepšení celkového neurologického stavu (340, 349).

Podobně jako ve studii od autorů Himes et al. výsledky funkčních testů hybnosti dolních končetin odhalily parciální závislost na celkovém počtu podaných buněk (345). V testu BBB dosáhly všechny skupiny kromě 0,5 M signifikantně lepších výsledků, které se však již dále dle závislosti celkové dávky neměnily. Pokročilé testování stability a koordinace končetin při chůzi na kladině však odhalilo efekt nejvyšší podané dávky ve skupině 3x1,5 M, která jako jediná měla signifikantně lepší výsledky v porovnání se skupinami ostatními. Obdobné výsledky byly

pozorovány také při léčbě pomocí BM-MSCs o celkové dávce 2M a 5 M na kilogram ve studii od autorů Pal et al. (334).

Vzhledem k limitovanému *in vivo* přežívání hWJ-MSCs v prostředí příjemce je obecně přijímáno, že terapeutický efekt MSCs spočívá v jejich parakrinní sekreci ovlivňující zánětlivou reakci, podporující neovaskularizaci a protekci neuronů před apoptózou (350). Přestože byla popsána *in vitro* diferenciaci MSCs do neuronální tkáně (351, 352), panuje skepse ohledně přímé inkorporace a diferenciaci MSCs do funkční neuronální tkáně *in vivo*. Přestože byla naše studie ve svém protokolu velice podobná naší předchozí studii s využitím hBM-MSCs (353), aplikace 0,5 M hWJ-MSCs nevedla k funkčně významnému zlepšení tak, jako u předchozí studie. Signifikantního efektu bylo dosaženo až při minimálně trojnásobné dávce. Při porovnávání parakrinních účinků hWJ-MSCs s hBM-MSCs a hAT-MSCs ve snaze zhodnotit terapeutický efekt nejsou publikované studie zcela jednotné. *In vitro* byly pozorovány vyšší hladiny sekretovaných neurotrofních faktorů bFGF, NGF, NT3, NT4 a GDNF (354), ale naopak nižší hladiny VEGF (a to až 4x nižší) (285). Při ovlivňování zánětlivé reakce je zmiňován vyšší protizánětlivý efekt hWJ-MSCs při porovnání s hBM-MSCs (355, 356). Všechny výše zmiňované studie však byly prováděny *in vitro*, kde proliferační index hWJ-MSCs (zdvojení populace za 40 h) je mnohem vyšší, než u hBM-MSCs (zdvojení populace za 70 h) (357), což vede k celkově většímu sekretu z většího množství buněk v kultivačním mediu. Tyto časy odpovídají i našim naměřeným výsledkům, kdy hWJ-MSCs zdvojily populaci za 34 h, kdežto hBM-MSCs za 84 h. Dalším přehlíženým faktorem je celkově menší velikost hWJ-MSCs při porovnání s hBM-MSCs, což může vyústit jednak ve větší diluci v hostitelském prostředí a jednak ve snazší únik buněk ze subarachnoidálního prostoru. Menší velikost však může naopak usnadnit pohyb buněk likvorem páteřního kanálu s násobně vyšším efektem po opakovaném podání.

Při hodnocení histologických a imunohistochemických míšních řezů byl znát stoupající pozitivní účinek hWJ-MSCs s počtem transplantovaných buněk. Terapie hWJ-MSCs zvýšila regenerační potenciál zvýšením počtu nově pučících axonálních vláken a naopak snížením počtu reaktivních astrocytů, což vedlo k menší tvorbě gliové jizvy. Podobných výsledků dosáhl i Li et al., který popsal hlavní účinek hWJ-MSCs ve snížení exprese IL-1 β a zvýšení sekrece NGF, kteréžto oba hrají důležitou roli při regulaci axonálního růstu (358). Podobných výsledků bylo dosaženo také při analýze množství zachované šedé a bílé hmoty míšní. Šedá hmota

reprezentována neuronálními těly byla kolem středu léze signifikantně více zachována u skupin 3x1,5 M a o něco méně u 1,5 M. Vzhledem k tomu, že tento efekt závislý na dávce nebyl výrazněji patrný v behaviorálním BBB testu, se domníváme, že trvání experimentu bylo příliš krátké k tomu, aby se plně projevil potenciál zachované míšní tkáně a v dlouhodobějším horizontu by měla zvířata z těchto skupin vyšší šance rehabilitace nervových funkcí. Je evidentní, že k nastartování regeneračních změn vedoucích ke střednědobému funkčnímu zlepšení po SCI je nutné určité minimální množství hWJ-MSCs, které v našem případě reprezentovala dávka 1,5 M. Při detailnější analýze míšní tkáně lze však vyzorovat, že vyšší dávky vedou k dalšímu oslabení sekundární reakce a navýšení neuroprotektivního a neuroregeneračního potenciálu léčby hWJ-MSCs.

Naše studie potvrdila pozitivní účinek léčby SCI u potkanů pomocí hWJ-MSCs s podobnými výsledky, jaké byly dosaženy s využitím MSCs z jiných lidských zdrojů (BM-MSCs, AT-MSCs, UC-MSCs) (334, 345, 348, 359-366). V roce 2014 byla provedena metaanalýza studií využívajících MSCs u SCI s potvrzením jejich pozitivního účinku na funkční výsledek, avšak nebyla schopna detekovat žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými typy buněk (332). Vzhledem k výhodám, které poskytuje získávání hWJ-MSCs, si však myslíme, že tyto buňky mají nejvyšší klinicko-translační potenciál.

Klinické podávání MSCs je povětšinou ve fázi I klinického výzkumu - tedy hodnocení bezpečnosti podání, které zatím neodhalilo vážnější nežádoucí účinky (367-370). Podávání MSCs v klinických studiích je také prováděno převážně v chronické fázi poranění, kdy i přes zmínky parciálního funkčního zlepšení je efekt léčby zatím nejasný (370). Dle serveru clinicaltrials.gov v současné době probíhá 17 klinických studií s využitím MSCs, z toho dvě jsou ve fázi III a jedna studie se zabývá aplikací hWJ-MSCs.

8.2 Nanokurkumin

Vedle buněčné terapie SCI je využívána celá řada nebuněčných protizánětlivých substancí. Kurkumin je přírodním extraktem s širokou škálou neuroprotektivních účinků s ovlivněním patologicky zvýšené zánětlivé reakce, kterou snižuje prostřednictvím blokády NF- κ B s následným snížením klíčových prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-8 a COX-2 (199, 371, 372). Přestože je účinek kurkuminu intenzivně zkoumán v experimentální medicíně, jeho využití v klinické medicíně je značně limitováno jeho rychlým metabolismem, špatnou rozpustností ve vodných roztocích a rychlým systémovým vylučováním z organismu (373, 374). Za účelem zlepšení jeho biodostupnosti byly učiněny pokusy s jeho navázáním na proteinový, cyklodextrinový nebo fosfolipidový nosič (375, 376). V posledních letech je významný pokrok v oblasti nanotechnologií, především v syntéze polymerových nanonosičů, které jsou využívány jako nosiče různých typů léčiv (377-379). Takto upravený kurkumin (nanokurkumin) dosahuje vyšších plasmatických koncentrací (380, 381), působí proti aktivaci glie a napomáhá při obnově myelinu (382). Dále má nanokurkumin signifikantní imunomodulační efekt a při léčbě degenerativních změn mozku má dokonce lepší účinky než kurkumin samotný (383, 384).

V behaviorálních testech jsme pozorovali trend ve zlepšení hybnosti dolních končetin, který byl patrný jak v klasických observačních testech (BBB, chůze po kladině), tak v pokročilé analýze hybnosti nosných kloubů. Celkový rozsah hybnosti v kolenním a kyčelním kloubu spolu s biomechanikou tlapy byl ve skupině léčené nanokurkuminem při analýze přístrojem MotoRater vyhodnocen jako fyziologičtější se signifikantním rozdílem v síle zadních končetin při schopnosti unést váhu vlastního těla.

Základem zachování motorických funkcí je zachování funkčních drah a neuronů. Skupina léčená nanokurkuminem měla kraniálně od centra léze signifikantně více zachovalé bílé míšní tkáň a méně výrazně též šedé míšní tkáň ve srovnání se skupinou kontrolní. Podobných výsledků bylo dosaženo i v naší předešlé studii s použitím samotného kurkuminu bez nanonosiče (199). Kurkumin vykazuje neuroprotektivní účinky modulováním patologicky zvýšené zánětlivé reakce (385-388) a redukcí tvorby ROS (389). Zánětlivá reakce je u míšního poranění

řízena několika regulačními mechanismy. Zatímco negativní stimulace signální cesty PI3K/AKT/IKK/NF-κB snižuje přežívání buněk v řadě tkání (plíce, ledviny, prso) (390-392), pozitivní stimulace pomocí kurkuminu snižuje zánik buněk v CNS tím, že zamezuje autofagii (393). Kurkumin dále pozitivně ovlivňuje regulační mechanismy pomocí Jak/Stat3 a TLR4-MyD88-NF-κB signálních drah (96, 199, 296). NF-κB se obecně považuje za jednoho z nejdůležitějších hráčů v patofyziologii zánětlivé reakce po míšním poranění (394). NF-κB hraje roli prozánětlivého modulátoru a může být aktivován jak oxidativním stresem, tak cytokiny sekretovanými zánětlivými buňkami (395). NF-κB podporuje syntézu prozánětlivého TNF-α, který následně aktivuje NF-κB, čímž vzniká *circulus vitiosus*, který zhoršuje neuronální poškození (396). Kurkumin snižuje hladinu NF-κB indukcí aktivity Nrf2 a snížením prozánětlivých cytokinů TNF-α a IL-6 (385, 397). V naší studii jsme měřili aktivitu NF-κB pomocí qPCR analýzy 9 týdnů po SCI s insignifikantním snížením ve skupině léčené nanokurkuminem. Efekt kurkuminu na snížení NF-κB je tedy největší časně po jeho podání, což podporují studie autorů Hao et al. či Machova et al., kteří měřili aktivitu NF-κB 12 h, 24 h a 72 h, resp. 10 a 28 dní po SCI s aplikací kurkuminu s pouze mírným snížením 24 h, resp 10 dní po SCI (199, 301).

Kromě ovlivnění zánětlivé reakce má kurkumin pozitivní vliv na maturaci míšních progenitorových neuronálních kmenových buněk, kterýžto efekt je přímo závislý na použité dávce (398, 399). Při synergistické léčbě SCI pomocí neurálních kmenových buněk (NSC) a kurkuminu došlo také k potenciaci parakrinního efektu NSC ve srovnání s použitím NSC samotných (400). Při současném podávání kurkuminu a hBM-NSC bylo také popsáno delší přežívání intratékálně aplikovaných buněk oproti skupině s podanými samotnými buňkami (401).

Hlavní mechanickou bariérou bránící prorůstání nově vytvořených axonů je gliová jizva. V primárních astrocytárních kulturách, tedy *in vitro*, ale i *in vivo* kurkumin snižuje množství a formování GFAP jako hlavní složky gliové jizvy (199, 371). V naší studii jsme naměřili signifikantní redukci v objemu gliové jizvy ve skupině léčené nanokurkuminem při použití imunohistochemické analýzy. Tento rozdíl nekoreloval s genovou expresí GFAP na konci experimentu, která zůstala prakticky nezměněna oproti kontrolnímu vzorku. Podobné výsledky však publikovala skupina Tao et al., kteří měřili hodnotu GFAP po SCI s výsledkem, že

nejvyšších hladin jsou dosaženy kolem 28. dne s postupným poklesem k normálním hodnotám kolem 56. dne po SCI (402).

Místo poranění je během prvních hodin infiltrováno neutrofily, aktivovanou mikroglíí, cirkulujícími makrofágy a T-lymfocyty, které dosáhnou maximálních hodnot přibližně 7-14 dní po poranění (403, 404). Aktivaci a migraci zánětlivých buněk řídí celá řada pro a protizánětlivých cytokinů/chemokinů. Excesivní zánětlivá reakce může zvláště v prvních hodinách až dnech po poranění způsobit nezvratné škody a proto ovlivnění tohoto patologicky zvýšeného zánětu může významně zlepšit prognózu. V naší studii jsme se proto také zaměřili na časné změny exprese zánětlivých interleukinů v místě poranění.

V prvních 24 hodinách po poranění jsme ve skupině léčené nanokurkuminem zaznamenali signifikantní snížení exprese IL-11, silný trend ve snížení exprese IL-1 β a mírné snížení exprese ostatních prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6, IFN- γ a RANTES. IL-11 je uznáván jako multifunkční cytokin regulující zánětlivou odpověď. V akutní fázi míšního poranění je sekretován reaktivními astrocyty s nejvyššími hodnotami 24 hodin po SCI (405, 406). IL-1 β je u SCI jedním z hlavních prozánětlivých cytokinů s významnou rolí v regulaci zánětlivé reakce (25, 120). Nanokurkumin potlačuje aktivaci reaktivních astrocytů s následným snížením exprese IL-11 a IL-1 β . Snížení exprese IFN- γ koreluje se snížením IL-12, který produkci IFN- γ pozitivně ovlivňuje (407). Dále byl zaznamenán mírný nesignifikantní vzestup exprese protizánětlivých cytokinů IL-10 a IL-13.

V akutní fázi míšního poranění je přítomnost zánětlivé reakce přirozenou reakcí organismu. Na jednu stranu plní roli obranného mechanismu k eliminaci patogenů a odstranění nekrotické tkáně, ale na druhou stranu má velmi negativní vliv na přežívání poškozených a oslabených buněk v zóně penumbry. V subakutní a chronické fázi SCI však zánětlivé buňky nashodí hojivé procesy, které mohou podporovat remyelinizaci poškozených axonů. Z tohoto důvodu se občas mluví o zánětlivé reakci jako o dvousečné zbrani („two-edged sword“) (408).

K posouzení dynamiky exprese cytokinů jsme provedli další analýzu 14 dní po SCI. U IL-10 a IL-13 jsme významnější změny nezaznamenali a jejich exprese zůstala mírně zvýšená. Jiná situace nastala u exprese IL-12, která byla signifikantně zvýšená a korelovala taktéž se vzestupem

exprese IFN- γ . Je známo, že IL-12 koreluje nejen s IFN- γ , ale také ovlivňuje hladiny protizánětlivého IL-10, jehož hladiny byly v naší studii taktéž zvýšeny (409-411) (412). Regenerační a protizánětlivý účinek IL-12 byl také pozorován ve studii autorů Yaguchi et al., kteří po podání IL-12 pozorovali sníženou tvorbu gliální jizvy, větší množství remyelinizovaných axonů a hlavně zlepšenou motorickou funkci experimentálních zvířat (413). Zvýšené hladiny IL-12 byly také pozorovány v našich předchozích studiích s využitím kurkuminu a indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPS-NPs) (199, 343).

Překvapivým výsledkem byla v naší studii signifikantně zvýšená exprese RANTES. Přestože je účinek RANTES obecně brán jako prozánětlivý a neurodegenerativní, jsou v literatuře zmínky i o jeho neuroprotektivním efektu v chronické fázi onemocnění. Některé geny řídící RANTES hrají důležitou roli v diferenciaci a přežívání neuronálních buněk (414) (415).

Signifikantně zvýšené hladiny byly také detekovány 14 dní po SCI u IL-11. IL-11 je členem cytokinové rodiny gp130 a sdílí jak imunoregulační funkci spolu s IL-6, tak neuroprotektivní funkci s LIF (leukemia inhibitory factor) a CNTF (ciliary neurotropic factor). Dosud byl publikován efekt IL-11 na zvýšený počet oligodendrocytů, omezení demyelinizace s podporou remyelinizace a to jak ve studiích *in vitro*, tak *in vivo* (406, 416, 417). Nicméně přesný mechanismus působení stále není dostatečně objasněn (405).

Naše studie potvrdila pozitivní účinek kurkuminu navázaného na nanonosič (nanokurkumin) na regeneraci po míšním poranění. Nanokurkumin zlepšil pohybové vlastnosti paretických končetin potkanů, zvýšil množství zachované bílé hmoty míšni a snížil objem gliové jizvy. Dále byly pozorovány změny v lokální imunitní odpovědi v časně fázi poranění. Léčba nanokurkuminem je snadno dostupná a může se stát doplňující terapií s cílem zlepšení prognózy těžkého onemocnění, jakým poranění míšni tkáně bezesporu je.

8.3 Klasická versus mini-invazivní technika chirurgické stabilizace

Strategie léčby zlomenin obratlů hrudní a bederní páteře záleží na mnoha faktorech – typ zlomeniny, přítomnost neurologického deficitu, komorbidity pacienta, věk pacienta, celkový stav pacienta a v neposlední řadě i opomíjená zvyklost konkrétního pracoviště.

Zlomeniny typu A0, A1 a A2 jsou ve většině případů indikovány ke konzervativní léčbě. Chirurgické řešení u těchto typů zlomenin připadá v úvahu pouze u signifikantní kyfotizace ($\geq 50\%$) segmentu, popřípadě u nezvladatelných bolestí. Zlomeniny typu B a C jsou jako nestabilní poranění jasnou indikací k chirurgické léčbě, stejně tak jako zlomeniny typu A3 a A4 s neurologickým deficitem. U zlomenin typu A3 a A4 bez neurologického deficitu je vzhledem k nedostatku důkazů typ léčby stále kontroverzním tématem. Metaanalýza autorů Rometsch et al. z roku 2017 neodhalila žádné rozdíly mezi operační a konzervativní léčbou co se týče bolesti nebo morbidit. V současné době probíhá prospektivní observační studie na toto téma sponzorovaná AO s očekávanými výsledky v roce 2022 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02827214>).

Na neurochirurgické klinice v Hradci Králové je při indikaci chirurgické terapie zlomeniny brána jako zlatý standard technika otevřené zadní transpedikulární monosegmentální repozice a fixace bez provedení posterolaterální fúze. V roce 2014 byla pak zavedena nová technika mini-invazivního perkutánního přístupu.

V naší retrospektivní studii jsme se zaměřili na porovnání přesnosti zavedených šroubů při transpedikulární stabilizaci otevřenou, nebo mini-invazivní perkutánní metodou. Mini-invazivní perkutánní technika je nejčastěji zvažována u indikovaných pacientů s frakturami typu A1, A2, A3 a A4 dle AOS a těch, kteří mají vypočítané TLICS (Thoracolumbar Injury Classification and Severity) skóre <5 (253).

K detailní analýze postavení pedikulárního šroubu byla zvolena modifikovaná škála dle Gertzbeina (418). Za vyhovující postavení bylo považováno postavení grade 0, 1A, 1B a 2B. Tohoto umístění pedikulárních šroubů bylo dosaženo v 93 % případů ve skupině MIS a v 94,4 % případů ve skupině OPEN. V literatuře se procento excelentně zavedených šroubů udává

značně variabilně. Laudato et al. udává ve skupině OPEN 70 % správně zavedených šroubů (419), Gertzbein a Robbins publikovali studii s 85 % dobře zavedených šroubů (418). Naproti tomu metaanalýzy publikované v roce 2015 a 2016 australskými a americkými autory udávají pouhé 3 %, respektive 4,2 % malpozičně zavedených šroubů (420, 421). Toto značně variabilní procento malpozic je pravděpodobně dáno ne zcela jasnou definicí malpozice - za malpozici bývá někdy považováno pouze umístění typu grade 3. Vaněk et al. ve své publikaci z roku 2014 udávají 2,8 % malpozic ve skupině MIS a 7,4 % ve skupině OPEN. Nicméně opět není specifikováno o jaký typ malpozice jde, sledováno bylo pouze prolomení mediální, nikoliv laterální hrany pediklu (422).

V nedávno publikované metaanalýze Sun et al. zaměřené čistě na srovnání stabilizací traumatických fraktur autoři nenachází rozdíl mezi přesností zavedených šroubů, což souhlasí s daty naší studie (423). Přestože byl v našem souboru vyšší podíl excelentně zavedených šroubů hodnocených jako grade 0 ve skupině MIS, negativem zůstává vyšší procento malpozičně zavedených šroubů hodnocených jako grade 3A - 3,5 % ve skupině MIS oproti 1,1 % ve skupině OPEN. Z toho vyplývá i vyšší procento reoperací - 12,7 % ve skupině MIS oproti 5 % ve skupině OPEN, které jistě není zanedbatelné. Pishnamaz et al. udávají reoperace ve skupině OPEN 9,3 %, resp. 3,4 % ve skupině MIS (424), Ringel et al. udávají 8,7 % ve skupině MIS (425), Dahdaleh et al. přiznávají 3,3 % reoperací ve skupině MIS (426). Řada studií naopak nepřiznává žádné reoperované pacienty pro malpozici fixačního materiálu (422, 427, 428). Vyšší riziko reoperací v naší skupině je ovlivněno jednak nezařazením pacientů, kteří nebyli kontrolováni pomocí pooperačního CT a revidováni samozřejmě nebyli (MIS 13 pacientů, OPEN 17 pacientů). Dále se na tomto rozdílném čísle významně podílel první rok zavedení mini-invazivní perkutánní techniky, ve kterém byli revidováni celkem 4 pacienti ze 17. V dalších letech se reoperace vyskytly vždy pouze u 1 pacienta ročně (cca 5-6 %).

Operační čas je zmiňován jako jedna z výhod MIS. V našem souboru byly operace vedené mini-invazivní technikou v průměru o 12 minut kratší, což bylo hodnoceno jako statisticky signifikantní rozdíl. Podobné výsledky vykazuje řada publikací a metaanalýz (420-422). Kratší trvání operace je přisuzováno především časově náročnějšímu zavírání otevřené operační rány

než samotnému času zavedení pedikulárních šroubů. Dále je předpoklad ovlivnění délky operace zkušenostmi operátora s celkovým sblížením obou metod (423, 429).

Využití fluoroskopie, či peroperačního CT je pro zavádění pedikulárních šroubů nezbytnost. Při absenci peroperačního CT jsou při plánování trajektorie využívány jak anatomické poměry v daném segmentu, tak AP a LAT fluoroskopická projekce. Vzhledem k minimální vizualizaci obratle při mini-invazivním perkutánním přístupu je technika MIS zcela závislá na peroperační fluoroskopii, z čehož vyplývá větší expozice RTG záření. V naší studii byla expozice RTG záření signifikantně delší ve skupině MIS. Celková dávka kermy na plochu byla nesignifikantně vyšší taktéž ve skupině MIS.

Wanek et al. publikovali práci, ve které prospektivně srovnávali expozici radiačnímu záření při otevřené a mini-invazivní perkutánní stabilizaci páteře. Ve skupině OPEN byl expoziční čas v rozmezí 23-57 s, ve skupině MIS 42-89 s, což odpovídá našim i dalším publikovaným výsledkům (253, 430-432).

Při hodnocení radiologických parametrů kyfotizace (Cobbův úhel, VBA, VBI) nebyly v obou skupinách nalezeny žádné signifikantní rozdíly. Při korekci Cobbova úhlu často panovaly obavy z nedostatečné redukce plynoucí z nevýhody polyaxiálních šroubů používaných u MIS techniky oproti rigidním Schanzovým šroubům u OPEN techniky. Naše výsledky, spolu s ostatními pracemi a metaanalýzami, však tento předpoklad vyvracejí (422, 423, 433, 434).

V literatuře bývá při volbě otevřeného způsobu operace často zmiňována možnost založení posterolaterální fúze jako augmentace pedikulární fixace. Tuto fúzní techniku na našem pracovišti u traumatických fraktur obratlů nepoužíváme a při nutnosti doplnění fixace u vybraných vysoce nestabilních zlomenin využíváme výhradně metodu přední náhrady těla obratle pomocí intervertebrálního expandéru (v našem souboru 31 % pacientů ve skupině OPEN a 15 % ve skupině MIS). Nutnost rutinního provedení artrodézy je zpochybňována v nedávno publikované metaanalýze autorů Diniz et al., kteří konstatovali, že rutinní doplnění posterolaterální fúze nejen zvyšuje čas operace a krevní ztrátu, ale pacienti ve skupině s provedenou fúzí následně trpí větší pooperační bolestí a horší mobilitou (435, 436). Selhání instrumentace se v jednotlivých skupinách signifikantně nelišilo i přes zachování vyšší

pohyblivosti v operovaném segmentu (436). V parametrech kyfotizace taktéž nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl (436). Podobných výsledků bylo dosaženo i v dalších publikacích (437, 438). Domníváme se tedy, že rutinní provádění fúzí u „jednoduchých“ traumatických zlomenin páteře není indikováno a je vyhrazeno pro vysoce nestabilní případy.

Kontroverzním tématem je ideální délka konstrukce. Jako první byla zavedena metoda krátké konstrukce 1/1 (fixace jednoho obratle nad zlomeninou a jednoho obratle pod zlomeninou) s výhodou kratšího operačního času a zachováním hybnosti ve více páteřních segmentech (439). V následujících letech však tato metoda vykazovala vyšší riziko selhání instrumentaria ve srovnání s delšími konstrukcemi (440). V našem souboru byla drtivá většina stabilizací provedena systémem 1/1 a v krátkém sledovacím období jsme žádné selhání nezaznamenali. Současné metaanalýzy ukazují, že přes lepší korekci radiologických parametrů sledovaných u Th-L fraktur dosažených pomocí delších konstrukcí, nejsou statisticky signifikantní rozdíly v klinických parametrech a volba přístupu tak zůstává především na vysoce personalizovaném přístupu (441-443).

Další často diskutovanou otázkou je odstranění konstrukce fixačního materiálu u nonfúzní techniky fixace, popřípadě jeho načasování (444). Vzhledem k rychlosti hojení obratle se za adekvátní dobu odstranění fixačního materiálu považuje perioda 8-18 měsíců po operaci (445, 446). Odstranění fixace však s sebou nese zvýšené riziko morbidity s podstoupením dalšího chirurgického výkonu v celkové anestezii. Na našem pracovišti proto rutinně odstraňujeme fixační materiál pouze u pacientů bez závažných komorbidit a mladších 40 let (bez rozdílu, zda jde o fixační materiál zavedený otevřenou, nebo mini-invazivní perkutánní cestou). U starších pacientů postupujeme přísně individuálně s ohledem na klinické obtíže související s přítomností cizího materiálu. Z dlouhodobého hlediska při ponechání instrumentaria *in situ* vzniká otázka rizika uvolnění konstrukce, či vzniku pseudoartrózy. V našem souboru jsme ani v jedné skupině tuto komplikaci nezaznamenali, avšak podobně jako v ostatních publikacích je doba sledování („follow up“) příliš krátká k objasnění této problematiky (435, 445, 447, 448). Naše pacienty v tomto ohledu budeme jistě sledovat i v budoucnosti.

Výsledky naší studie potvrdily nově zavedenou metodu mini-invazivní perkutánní fixaci Th-L zlomenin páteře jako rovnocennou alternativu k dosud prováděné otevřené stabilizaci. Vyšší

procento reoperací přikládáme efektu tzv. „learning curve“ s potvrzením klesající tendence v letech následujících. Za limitaci naší studie je nutné uvést její retrospektivní charakter, větší počet operatérů, absenci standardizovaného protokolu snímkování pacienta i absenci klinických škál hodnotících bolest, návrat do zaměstnání apod. Cílem studie však bylo zhodnocení reálného potenciálního operačního rizika malpozice šroubu v běžných podmínkách chodu kliniky při dvou vedle sebe probíhajících metodách operační stabilizace traumatické páteře.

9. Závěry

1) Léčba míšního poranění pomocí mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z lidského Whartonova rosolu (hWJ-MSCs) u experimentálního potkaního modelu zlepšuje hybnost a koordinaci dolních končetin a je závislá na dávce aplikovaných buněk.

- V experimentální studii léčby hrudní míšní léze jsme prokázali příznivý vliv hWJ-MSCs, který byl parciálně závislý na opakované a zvýšené dávce transplantovaných buněk. V histologické a imunohistochemické analýze míšní tkáně byl s rostoucí celkovou dávkou jasně patrný stoupající pozitivní efekt na zachování šedé míšní hmoty, snížení gliové jizvy a zvýšený axonální sprouting. Odrazem zachovalejších tkáňových vlastností pak bylo funkční zlepšení hybnosti dolních končetin pozorované od podané dávky 1,5 milionu buněk hWJ-MSCs. U nejvyšší podané dávky (3x1,5 M) byl pak také prokázán imunomodulační a antiapoptotický efekt v potlačené expresi makrofágových a apoptotických genů. Studie byla inovativní ve smyslu porovnání několika efektivních dávek lidských WJ-MSCs s průkazem možnosti bezpečného zvýšení terapeutického účinku při jejich opakované aplikaci.

2) Léčba míšního poranění lokálním a systémovým podáním protizánětlivého a antioxidačního léčiva kurkuminu navázaného na nanonosič (nanokurkumin) u experimentálního potkaního modelu moduluje lokální zánětlivou reakci a zlepšuje hybnost dolních končetin.

- V experimentální studii hrudní míšní léze byl prokázán pozitivní vliv léčiva nanokurkuminu. Bylo pozorováno zlepšení pohybových vlastností dolních končetin, které korespondovalo s imunohistochemickým nálezem zvýšeného zachování bílé hmoty míšní, rozsáhlejším axonálním sproutingem a naopak sníženým rozsahem gliové jizvy. Terapie nanokurkuminem také v prvních týdnech po SCI modulovala zánětlivou odpověď změnou exprese regulačních zánětlivých cytokinů. Studie prokázala terapeutické účinky kurkuminu, který

byl za účelem zlepšené biodistribuce syntetizován ve formě ve vodě rozpustné nanočástice.

- 3) Mini-invazivní perkutánní stabilizace traumatické zlomeniny hrudní a bederní páteře je rovnocennou metodou stabilizace ke klasické otevřené zadní transpedikulární stabilizaci.
- V naší retrospektivní analýze jsme neodhalili signifikantní rozdíly v počtu malpozičně uložených šroubů mezi jednotlivými operačními technikami. Taktéž parametry kyfotizace jako ukazatele dostatečné operační repozice zlomeniny se od sebe v jednotlivých skupinách signifikantně nelišily. Byl nalezen vyšší počet reoperovaných pacientů v prvním roce po zavedení nové techniky. Operace mini-invazivní technikou trvala kratší operační čas, avšak byla zatížena vyšším expozičním časem RTG paprsků. Celkově byla nově zavedená operační technika zhodnocena jako bezpečná a efektivní alternativa u selektovaných indikovaných pacientů.

Seznam citací použité literatury

1. Gertzbein SD. Spine update. Classification of thoracic and lumbar fractures. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(5):626-8.
2. Magerl F, Aebi M, Gertzbein SD, Harms J, Nazarian S. A comprehensive classification of thoracic and lumbar injuries. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 1994;3(4):184-201.
3. Ghobrial GM, Jallo J. Thoracolumbar spine trauma: review of the evidence. *Journal of neurosurgical sciences*. 2013;57(2):115-22.
4. Vanicky I, Urdzikova L, Saganova K, Cizkova D, Galik J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *Journal of neurotrauma*. 2001;18(12):1399-407.
5. Ball JR, Sekhon LH. Timing of decompression and fixation after spinal cord injury--when is surgery optimal? *Critical care and resuscitation : journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine*. 2006;8(1):56-63.
6. Böhler L. *Technik der Knochenbruchbehandlung: Maudrich*; 1930.
7. Ferguson RL, Allen BL, Jr. A mechanistic classification of thoracolumbar spine fractures. *Clinical orthopaedics and related research*. 1984(189):77-88.
8. Holdsworth F. Fractures, dislocations, and fracture-dislocations of the spine. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1970;52(8):1534-51.
9. Denis F. The three column spine and its significance in the classification of acute thoracolumbar spinal injuries. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1983;8(8):817-31.
10. Whitesides TE, Jr. Traumatic kyphosis of the thoracolumbar spine. *Clinical orthopaedics and related research*. 1977(128):78-92.
11. Marsh JL, Slongo TF, Agel J, Broderick JS, Creevey W, DeCoster TA, et al. Fracture and dislocation classification compendium - 2007: Orthopaedic Trauma Association classification, database and outcomes committee. *Journal of orthopaedic trauma*. 2007;21(10 Suppl):S1-133.
12. Yadla S, Leubde B, Tender GC, Sharan AD, Harrop JS, Hilibrand AS, et al. Traumatic spondyloptosis of the thoracolumbar spine. *Journal of neurosurgery Spine*. 2008;9(2):145-51.
13. Stahel PF, VanderHeiden T, Finn MA. Management strategies for acute spinal cord injury: current options and future perspectives. *Current Opinion in Critical Care*. 2012;18(6):651-60.
14. Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 1995;5(4):407-13.
15. Mahajan P, Jaffe DM, Olsen CS, Leonard JR, Nigrovic LE, Rogers AJ, et al. Spinal cord injury without radiologic abnormality in children imaged with magnetic resonance imaging. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2013;75(5):843-7.
16. Sharma S, Singh M, Wani IH, Sharma S, Sharma N, Singh D. Adult Spinal Cord Injury without Radiographic Abnormalities (SCIWORA): Clinical and Radiological Correlations. *J Clin Med Res*. 2009;1(3):165-72.
17. Liu Q, Liu Q, Zhao J, Yu H, Ma X, Wang L. Early MRI finding in adult spinal cord injury without radiologic abnormalities does not correlate with the neurological outcome: a retrospective study. *Spinal cord*. 2015;53(10):750-3.
18. Kakulas BA. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury. *Spinal cord*. 2004;42(10):549-63.

19. Gill ML, Grahn PJ, Calvert JS, Linde MB, Lavrov IA, Strommen JA, et al. Neuromodulation of lumbosacral spinal networks enables independent stepping after complete paraplegia. *Nature medicine*. 2018;24(11):1677-82.
20. Ray SK, Dixon CE, Banik NL. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histology and histopathology*. 2002;17(4):1137-52.
21. Simon CM, Sharif S, Tan RP, LaPlaca MC. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *Journal of neurotrauma*. 2009;26(4):563-74.
22. Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical focus*. 2008;25(5):E2.
23. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2011;71(2):281-99.
24. Wolman L. THE DISTURBANCE OF CIRCULATION IN TRAUMATIC PARAPLEGIA IN ACUTE AND LATE STAGES: A PATHOLOGICAL STUDY. *Paraplegia*. 1965;2:213-26.
25. Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol*. 2007;500(2):267-85.
26. Ghasemlou N, Kerr BJ, David S. Tissue displacement and impact force are important contributors to outcome after spinal cord contusion injury. *Experimental neurology*. 2005;196(1):9-17.
27. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in neurology*. 2019;10:282.
28. Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of neurosurgery*. 1997;86(3):483-92.
29. Ahuja CS, Martin AR, Fehlings M. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000Research*. 2016;5.
30. Agrawal SK, Fehlings MG. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger, and the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(2):545-52.
31. Anwar MA, Al Shehabi TS, Eid AH. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:98.
32. Couillard-Despres S, Bieler L, Vogl M. Pathophysiology of traumatic spinal cord injury. *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury: Springer*; 2017. p. 503-28.
33. McAdoo DJ, Xu GY, Robak G, Hughes MG. Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Experimental neurology*. 1999;159(2):538-44.
34. Liu D, Xu GY, Pan E, McAdoo DJ. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience*. 1999;93(4):1383-9.
35. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England journal of medicine*. 1994;330(9):613-22.
36. Wrathall JR, Teng YD, Marriott R. Delayed antagonism of AMPA/kainate receptors reduces long-term functional deficits resulting from spinal cord trauma. *Experimental neurology*. 1997;145(2 Pt 1):565-73.
37. Káradóttir R, Attwell D. Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience*. 2007;145(4):1426-38.
38. Friedman LK. Calcium: a role for neuroprotection and sustained adaptation. *Molecular interventions*. 2006;6(6):315-29.

39. Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica*. 2009;30(4):379-87.
40. Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, Faden AI. Alterations in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 1987;147(3):1170-5.
41. Duchen MR. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2012;464(1):111-21.
42. Pivovarova NB, Andrews SB. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *The FEBS journal*. 2010;277(18):3622-36.
43. Liu WM, Wu JY, Li FC, Chen QX. Ion channel blockers and spinal cord injury. *Journal of neuroscience research*. 2011;89(6):791-801.
44. Pandya JD, Nukala VN, Sullivan PG. Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters. *Frontiers in neuroenergetics*. 2013;5:10.
45. Stys PK. Anoxic and ischemic injury of myelinated axons in CNS white matter: from mechanistic concepts to therapeutics. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1998;18(1):2-25.
46. Li S, Stys P. Na⁺-K⁺-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na⁺-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience*. 2001;107(4):675-83.
47. Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁺(+)-Ca²⁺ exchanger. *Journal of Neuroscience*. 1992;12(2):430-9.
48. Regan R, Choi D. Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture. *Neuroscience*. 1991;43(2-3):585-91.
49. Rosenberg LJ, Teng YD, Wrathall JR. Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(14):6122-33.
50. Black JA, Cummins TR, Yoshimura N, de Groat WC, Waxman SG. Tetrodotoxin-resistant sodium channels Na_v1.8/SNS and Na_v1.9/NaN in afferent neurons innervating urinary bladder in control and spinal cord injured rats. *Brain Res*. 2003;963(1-2):132-8.
51. Vasconcelos NL, Gomes ED, Oliveira EP, Silva CJ, Lima R, Sousa N, et al. Combining neuroprotective agents: effect of riluzole and magnesium in a rat model of thoracic spinal cord injury. *Spine J*. 2016;16(8):1015-24.
52. Satkunendrarajah K, Nassiri F, Karadimas SK, Lip A, Yao G, Fehlings MG. Riluzole promotes motor and respiratory recovery associated with enhanced neuronal survival and function following high cervical spinal hemisection. *Experimental neurology*. 2016;276:59-71.
53. Kaptanoglu E, Solaroglu I, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E. Blockade of sodium channels by phenytoin protects ultrastructure and attenuates lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Acta neurochirurgica*. 2005;147(4):405-12; discussion 12.
54. Hains BC, Saab CY, Lo AC, Waxman SG. Sodium channel blockade with phenytoin protects spinal cord axons, enhances axonal conduction, and improves functional motor recovery after contusion SCI. *Experimental neurology*. 2004;188(2):365-77.
55. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2015;8:35.
56. Bozzo A, Marcoux J, Radhakrishna M, Pelletier J, Goulet B. The role of magnetic resonance imaging in the management of acute spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2011;28(8):1401-11.
57. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of neurosurgery*. 1991;75(1):15-26.

58. Miyanji F, Furlan JC, Aarabi B, Arnold PM, Fehlings MG. Acute cervical traumatic spinal cord injury: MR imaging findings correlated with neurologic outcome--prospective study with 100 consecutive patients. *Radiology*. 2007;243(3):820-7.
59. Flanders AE, Spettell CM, Friedman DP, Marino RJ, Herbison GJ. The relationship between the functional abilities of patients with cervical spinal cord injury and the severity of damage revealed by MR imaging. *AJNR American journal of neuroradiology*. 1999;20(5):926-34.
60. Cabrera-Aldana EE, Ruelas F, Aranda C, Rincon-Heredia R, Martinez-Cruz A, Reyes-Sanchez A, et al. Methylprednisolone Administration Following Spinal Cord Injury Reduces Aquaporin 4 Expression and Exacerbates Edema. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:4792932.
61. Hsu Y, Tran M, Linninger AA. Dynamic regulation of aquaporin-4 water channels in neurological disorders. *Croatian medical journal*. 2015;56(5):401-21.
62. Vaquero J, Zurita M, de Oya S, Coca S. Vascular endothelial growth/permeability factor in spinal cord injury. *Journal of neurosurgery*. 1999;90(2 Suppl):220-3.
63. Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *American journal of physiology Renal physiology*. 2000;278(1):F13-28.
64. Hub JS, Grubmuller H, de Groot BL. Dynamics and energetics of permeation through aquaporins. What do we learn from molecular dynamics simulations? *Handbook of experimental pharmacology*. 2009(190):57-76.
65. Harries WE, Akhavan D, Miercke LJ, Khademi S, Stroud RM. The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(39):14045-50.
66. Horsefield R, Norden K, Fellert M, Backmark A, Tornroth-Horsefield S, Terwisscha van Scheltinga AC, et al. High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(36):13327-32.
67. Magni F, Sarto C, Ticozzi D, Soldi M, Bosso N, Mocarelli P, et al. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics*. 2006;6(20):5637-49.
68. Nemecek S, Petr R, Suba P, Rozsival V, Melka O. Longitudinal extension of oedema in experimental spinal cord injury--evidence for two types of post-traumatic oedema. *Acta neurochirurgica*. 1977;37(1-2):7-16.
69. Li C, Chen X, Qiao S, Liu X, Liu C, Zhu D, et al. Melatonin lowers edema after spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2014;9(24):2205-10.
70. Faden AI, Chan PH, Longar S. Alterations in lipid metabolism, Na⁺,K⁺-ATPase activity, and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *Journal of neurochemistry*. 1987;48(6):1809-16.
71. Kimelberg HK. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience*. 2004;129(4):851-60.
72. Liu NK, Xu XM. Neuroprotection and its molecular mechanism following spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2012;7(26):2051-62.
73. Kim J, Jung Y. Different expressions of AQP1, AQP4, eNOS, and VEGF proteins in ischemic versus non-ischemic cerebroopathy in rats: potential roles of AQP1 and eNOS in hydrocephalic and vasogenic edema formation. *Anatomy & cell biology*. 2011;44(4):295-303.
74. Okutan O, Turkoglu OF, Gok HB, Beskonakli E. Neuroprotective effect of erythropoietin after experimental cold injury-induced vasogenic brain edema in rats. *Surgical neurology*. 2008;70(5):498-502.
75. Griffiths IR. Vasogenic edema following acute and chronic spinal cord compression in the dog. *Journal of neurosurgery*. 1975;42(2):155-65.

76. Braughler JM, Hall ED. Correlation of methylprednisolone levels in cat spinal cord with its effects on (Na⁺ + K⁺)-ATPase, lipid peroxidation, and alpha motor neuron function. *Journal of neurosurgery*. 1982;56(6):838-44.
77. Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Takagi K. Potent protective effects of melatonin on experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(7):769-75.
78. Schiaveto-de-Souza A, da-Silva CA, Defino HL, Del Bel EA. Effect of melatonin on the functional recovery from experimental traumatic compression of the spinal cord. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2013;46(4):348-58.
79. Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK, Cox JW, Anderson DK. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 1992;9 Suppl 2:S425-42.
80. Hamann K, Durkes A, Ouyang H, Uchida K, Pond A, Shi R. Critical role of acrolein in secondary injury following ex vivo spinal cord trauma. *Journal of neurochemistry*. 2008;107(3):712-21.
81. Bolanos JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(14):1299-315.
82. Bibi H, Vinokur V, Waisman D, Elenberg Y, Landesberg A, Faingersh A, et al. Zn/Ga-DFO iron-chelating complex attenuates the inflammatory process in a mouse model of asthma. *Redox biology*. 2014;2:814-9.
83. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, et al. Gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor, prevents compression-induced spinal cord injury by inhibiting activation of leukocytes in rats. *Critical care medicine*. 1997;25(5):874-9.
84. Jackson JH, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Vosbeck K, Sauerheber R, Weitzman SA, et al. Role of hydroxyl radical in DNA damage. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1987;100:147-57.
85. Muindi JR, Sinha BK, Gianni L, Myers CE. Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex. *FEBS letters*. 1984;172(2):226-30.
86. Muller K, Gurster D. Hydroxyl radical damage to DNA sugar and model membranes induced by anthralin (dithranol). *Biochemical pharmacology*. 1993;46(10):1695-704.
87. Storey KB. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 1996;29(12):1715-33.
88. Hamann K, Shi R. Acrolein scavenging: a potential novel mechanism of attenuating oxidative stress following spinal cord injury. *Journal of neurochemistry*. 2009;111(6):1348-56.
89. Bains M, Hall ED. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822(5):675-84.
90. Hall ED, Vaishnav RA, Mustafa AG. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):51-61.
91. Vaishnav RA, Singh IN, Miller DM, Hall ED. Lipid peroxidation-derived reactive aldehydes directly and differentially impair spinal cord and brain mitochondrial function. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(7):1311-20.
92. Morsy MD, Mostafa OA, Hassan WN. A potential protective effect of alpha-tocopherol on vascular complication in spinal cord reperfusion injury in rats. *Journal of biomedical science*. 2010;17:55.
93. Lafci G, Gedik HS, Korkmaz K, Erdem H, Cicek OF, Nacar OA, et al. Efficacy of iloprost and montelukast combination on spinal cord ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Journal of cardiothoracic surgery*. 2013;8:64.

94. Citrome L, Goldberg JF, Portland KB. Placing transdermal selegiline for major depressive disorder into clinical context: number needed to treat, number needed to harm, and likelihood to be helped or harmed. *Journal of affective disorders*. 2013;151(2):409-17.
95. Fan LH, Wang KZ, Cheng B, Wang CS, Dang XQ. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following spinal cord ischemia in rabbits. *BMC neuroscience*. 2006;7:48.
96. Gokce EC, Kahveci R, Gokce A, Sargon MF, Kisa U, Aksoy N, et al. Curcumin Attenuates Inflammation, Oxidative Stress, and Ultrastructural Damage Induced by Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2016;25(5):1196-207.
97. Neirinckx V, Coste C, Franzen R, Gothot A, Rogister B, Wislet S. Neutrophil contribution to spinal cord injury and repair. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11(1):150.
98. Pineau I, Sun L, Bastien D, Lacroix S. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain, behavior, and immunity*. 2010;24(4):540-53.
99. Cekanaviciute E, Buckwalter MS. Astrocytes: integrative regulators of neuroinflammation in stroke and other neurological diseases. *Neurotherapeutics*. 2016;13(4):685-701.
100. Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM, Wysocka M, Hilliard B, Fujioka T, et al. Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *Journal of neurochemistry*. 2005;95(2):331-40.
101. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of neuroscience*. 2012;32(18):6391-410.
102. Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2008;209(2):378-88.
103. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 12):3249-69.
104. Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *Journal of neurotrauma*. 2004;21(4):429-40.
105. Stirling DP, Yong VW. Dynamics of the inflammatory response after murine spinal cord injury revealed by flow cytometry. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(9):1944-58.
106. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.
107. Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(17):7526-35.
108. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, et al. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*. 1997;79(4):1177-82.
109. Stirling DP, Liu S, Kubes P, Yong VW. Depletion of Ly6G/Gr-1 leukocytes after spinal cord injury in mice alters wound healing and worsens neurological outcome. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(3):753-64.
110. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009;113(4):963-72.
111. Hawthorne AL, Popovich PG. Emerging concepts in myeloid cell biology after spinal cord injury. *Neurotherapeutics*. 2011;8(2):252-61.
112. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(43):13435-44.

113. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;7:45.
114. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. 2014;41(1):21-35.
115. Zhou X, He X, Ren Y. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2014;9(20):1787.
116. David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2011;12(7):388.
117. Ren Y, Young W. Managing inflammation after spinal cord injury through manipulation of macrophage function. *Neural plasticity*. 2013;2013:945034.
118. Shin T, Ahn M, Moon C, Kim S, Sim KB. Alternatively activated macrophages in spinal cord injury and remission: another mechanism for repair? *Molecular neurobiology*. 2013;47(3):1011-9.
119. Shechter R, Schwartz M. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):332-46.
120. Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, et al. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:65.
121. Novak ML, Koh TJ. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *The American journal of pathology*. 2013;183(5):1352-63.
122. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
123. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*. 2011;12(11):1035-44.
124. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21.
125. Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1832(7):989-97.
126. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014;81(2):229-48.
127. Shechter R, Schwartz M. CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends in molecular medicine*. 2013;19(3):135-43.
128. Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res*. 2015;1619:1-11.
129. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;164(12):6166-73.
130. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014;6:13.
131. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in physiology*. 2018;9:419.
132. Jones TB. Lymphocytes and autoimmunity after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2014;258:78-90.
133. Popovich PG, Longbrake EE. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nature Reviews Neuroscience*. 2008;9(6):481.
134. Yang L, Blumbergs PC, Jones NR, Manavis J, Sarvestani GT, Ghabriel MN. Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(9):966-71.

135. Gal P, Kravcukova P, Mokry M, Kluchova D. Chemokines as possible targets in modulation of the secondary damage after acute spinal cord injury: a review. *Cellular and molecular neurobiology*. 2009;29(6-7):1025-35.
136. Pannu R, Barbosa E, Singh AK, Singh I. Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats. *Journal of neuroscience research*. 2005;79(3):340-50.
137. Wang XJ, Kong KM, Qi WL, Ye WL, Song PS. Interleukin-1 beta induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury. *Acta pharmacologica Sinica*. 2005;26(8):934-42.
138. Yang L, Jones NR, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C, Moore EJ, Manavis J, et al. Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2005;12(3):276-84.
139. Lee YB, Yune TY, Baik SY, Shin YH, Du S, Rhim H, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2000;166(1):190-5.
140. Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, Muia C, Esposito E, et al. TNF-alpha blockage in a mouse model of SCI: evidence for improved outcome. *Shock (Augusta, Ga)*. 2008;29(1):32-41.
141. Sharma HS, Winkler T, Stalberg E, Gordh T, Alm P, Westman J. Topical application of TNF-alpha antiserum attenuates spinal cord trauma induced edema formation, microvascular permeability disturbances and cell injury in the rat. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2003;86:407-13.
142. Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Watanabe S, et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36(17):1350-8.
143. Lacroix S, Chang L, Rose-John S, Tuszynski MH. Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol*. 2002;454(3):213-28.
144. Cafferty WB, Gardiner NJ, Das P, Qiu J, McMahon SB, Thompson SW. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(18):4432-43.
145. Penkowa M, Giralt M, Lago N, Camats J, Carrasco J, Hernandez J, et al. Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury. *Experimental neurology*. 2003;181(2):130-48.
146. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology*. 1999;17:701-38.
147. Francos-Quijorna I, Amo-Aparicio J, Martinez-Muriana A, Lopez-Vales R. IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. *Glia*. 2016;64(12):2079-92.
148. Fenn AM, Hall JC, Gensel JC, Popovich PG, Godbout JP. IL-4 signaling drives a unique arginase+/IL-1beta+ microglia phenotype and recruits macrophages to the inflammatory CNS: consequences of age-related deficits in IL-4Ralpha after traumatic spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(26):8904-17.
149. Lee SI, Jeong SR, Kang YM, Han DH, Jin BK, Namgung U, et al. Endogenous expression of interleukin-4 regulates macrophage activation and confines cavity formation after traumatic spinal cord injury. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(11):2409-19.
150. Geng Y, Gulbins E, Altman A, Lotz M. Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(18):8602-6.

151. Mizuno T, Sawada M, Marunouchi T, Suzumura A. Production of interleukin-10 by mouse glial cells in culture. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;205(3):1907-15.
152. Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2009;220(1):183-90.
153. Plunkett JA, Yu CG, Easton JM, Bethea JR, Yeziarski RP. Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Experimental neurology*. 2001;168(1):144-54.
154. Lau D, Harte SE, Morrow TJ, Wang S, Mata M, Fink DJ. Herpes simplex virus vector-mediated expression of interleukin-10 reduces below-level central neuropathic pain after spinal cord injury. *Neurorehabilitation and neural repair*. 2012;26(7):889-97.
155. Margul DJ, Park J, Boehler RM, Smith DR, Johnson MA, McCreedy DA, et al. Reducing neuroinflammation by delivery of IL-10 encoding lentivirus from multiple-channel bridges. *Bioengineering & translational medicine*. 2016;1(2):136-48.
156. Hoornaert CJ, Luyckx E, Reekmans K, Dhainaut M, Guglielmetti C, Le Blon D, et al. In Vivo Interleukin-13-Primed Macrophages Contribute to Reduced Alloantigen-Specific T Cell Activation and Prolong Immunological Survival of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Implants. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2016;34(7):1971-84.
157. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annual review of immunology*. 2013;31:317-43.
158. Nishimura Y, Natsume A, Ito M, Hara M, Motomura K, Fukuyama R, et al. Interferon-beta delivery via human neural stem cell abates glial scar formation in spinal cord injury. *Cell transplantation*. 2013;22(12):2187-201.
159. Sengul G, Coban MK, Cakir M, Coskun S, Aksoy H, Hacimuftuoglu A, et al. Neuroprotective effect of acute interferon-beta 1B treatment after spinal cord injury. *Turkish neurosurgery*. 2013;23(1):45-9.
160. Fujiyoshi T, Kubo T, Chan CC, Koda M, Okawa A, Takahashi K, et al. Interferon-gamma decreases chondroitin sulfate proteoglycan expression and enhances hindlimb function after spinal cord injury in mice. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(12):2283-94.
161. Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(9):1379-91.
162. Kadota R, Koda M, Kawabe J, Hashimoto M, Nishio Y, Mannoji C, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats. *PloS one*. 2012;7(11):e50391.
163. Kawabe J, Koda M, Hashimoto M, Fujiyoshi T, Furuya T, Endo T, et al. Neuroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor and relationship to promotion of angiogenesis after spinal cord injury in rats: laboratory investigation. *Journal of neurosurgery Spine*. 2011;15(4):414-21.
164. Huang X, Kim JM, Kong TH, Park SR, Ha Y, Kim MH, et al. GM-CSF inhibits glial scar formation and shows long-term protective effect after spinal cord injury. *Journal of the neurological sciences*. 2009;277(1-2):87-97.
165. Kim JY, Oh CH, Huang X, Kim MH, Yoon SH, Kim KH, et al. Improvement in sensory function via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rat spinal cord injury models. *Journal of neurosurgery Spine*. 2013;18(1):69-75.
166. Rice T, Larsen J, Rivest S, Yong VW. Characterization of the early neuroinflammation after spinal cord injury in mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2007;66(3):184-95.

167. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews Neuroscience*. 2004;5(2):146-56.
168. Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(3):235-41.
169. Bruce JH, Norenberg MD, Kraydieh S, Puckett W, Marcillo A, Dietrich D. Schwannosis: role of gliosis and proteoglycan in human spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2000;17(9):781-8.
170. Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, et al. Growth-modulating molecules are associated with invading Schwann cells and not astrocytes in human traumatic spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 4):940-53.
171. Zhang SX, Huang F, Gates M, Holmberg EG. Role of endogenous Schwann cells in tissue repair after spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2013;8(2):177-85.
172. Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisen J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science (New York, NY)*. 2011;333(6039):238-42.
173. Soderblom C, Luo X, Blumenthal E, Bray E, Lyapichev K, Ramos J, et al. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(34):13882-7.
174. Zhu Y, Soderblom C, Trojanowsky M, Lee DH, Lee JK. Fibronectin Matrix Assembly after Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma*. 2015;32(15):1158-67.
175. Flanagan LA, Ju YE, Marg B, Osterfield M, Janmey PA. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport*. 2002;13(18):2411-5.
176. Harris GM, Madigan NN, Lancaster KZ, Enquist LW, Windebank AJ, Schwartz J, et al. Nerve Guidance by a Decellularized Fibroblast Extracellular Matrix. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017;60-61:176-89.
177. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. 2016;532(7598):195-200.
178. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(9):2143-55.
179. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999;23(2):297-308.
180. Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(19):8182-98.
181. Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 10):2761-72.
182. Silver J. The glial scar is more than just astrocytes. *Experimental neurology*. 2016;286:147-9.
183. Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology*. 2014;253:197-207.
184. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. 2016;532(7598):195.
185. Brodbelt AR, Stoodley MA. Post-traumatic syringomyelia: a review. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2003;10(4):401-8.
186. Shenoy VS, Sampath R. Syringomyelia. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.; 2019.

187. Milhorat TH, Capocelli AL, Jr., Anzil AP, Kotzen RM, Milhorat RH. Pathological basis of spinal cord cavitation in syringomyelia: analysis of 105 autopsy cases. *Journal of neurosurgery*. 1995;82(5):802-12.
188. Schurch B, Wichmann W, Rossier AB. Post-traumatic syringomyelia (cystic myelopathy): a prospective study of 449 patients with spinal cord injury. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1996;60(1):61-7.
189. Steward O, Zheng B, Tessier-Lavigne M. False resurrections: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system. *J Comp Neurol*. 2003;459(1):1-8.
190. Karus M, Ulc A, Ehrlich M, Czopka T, Hennen E, Fischer J, et al. Regulation of oligodendrocyte precursor maintenance by chondroitin sulphate glycosaminoglycans. *Glia*. 2016;64(2):270-86.
191. Thallmair M, Metz GA, Z'Graggen WJ, Raineteau O, Kartje GL, Schwab ME. Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nature neuroscience*. 1998;1(2):124-31.
192. Lee JK, Geoffroy CG, Chan AF, Tolentino KE, Crawford MJ, Leal MA, et al. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron*. 2010;66(5):663-70.
193. Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(9):703-13.
194. Yang Z, Zhang A, Duan H, Zhang S, Hao P, Ye K, et al. NT3-chitosan elicits robust endogenous neurogenesis to enable functional recovery after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(43):13354-9.
195. Gao M, Lu P, Bednark B, Lynam D, Conner JM, Sakamoto J, et al. Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection. *Biomaterials*. 2013;34(5):1529-36.
196. Thornton MA, Mehta MD, Morad TT, Ingraham KL, Khankan RR, Griffis KG, et al. Evidence of axon connectivity across a spinal cord transection in rats treated with epidural stimulation and motor training combined with olfactory ensheathing cell transplantation. *Experimental neurology*. 2018;309:119-33.
197. Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, Wu D, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell*. 2012;150(6):1264-73.
198. Cowley KC, Zaporozhets E, Schmidt BJ. Propriospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1198:42-53.
199. Machova Urdzikova L, Karova K, Ruzicka J, Kloudova A, Shannon C, Dubisova J, et al. The Anti-Inflammatory Compound Curcumin Enhances Locomotor and Sensory Recovery after Spinal Cord Injury in Rats by Immunomodulation. *International journal of molecular sciences*. 2015;17(1).
200. Krupa P, Vackova I, Ruzicka J, Zaviskova K, Dubisova J, Koci Z, et al. The Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly in Spinal Cord Injury Treatment Is Dose-Dependent and Can Be Facilitated by Repeated Application. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(5).
201. Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nature neuroscience*. 2004;7(3):269-77.
202. Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, et al. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nature medicine*. 2008;14(1):69-74.
203. Vavrek R, Girgis J, Tetzlaff W, Hiebert GW, Fouad K. BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 6):1534-45.

204. Asboth L, Friedli L, Beauparlant J, Martinez-Gonzalez C, Anil S, Rey E, et al. Cortico-reticulo-spinal circuit reorganization enables functional recovery after severe spinal cord contusion. *Nat Neurosci.* 2018;21(4):576-88.
205. Whishaw IQ, Gorny B, Sarna J. Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: behavioral and anatomical dissociations. *Behav Brain Res.* 1998;93(1-2):167-83.
206. May Z, Fenrich KK, Dahlby J, Batty NJ, Torres-Espin A, Fouad K. Following Spinal Cord Injury Transected Reticulospinal Tract Axons Develop New Collateral Inputs to Spinal Interneurons in Parallel with Locomotor Recovery. *Neural Plast.* 2017;2017:1932875.
207. Frankel HL, Hancock DO, Hyslop G, Melzak J, Michaelis LS, Ungar GH, et al. The value of postural reduction in the initial management of closed injuries of the spine with paraplegia and tetraplegia. I. Paraplegia. 1969;7(3):179-92.
208. Association ASI. Standards for neurological classification of spinal injury patients. Chicago: American Spinal Injury Association. 1984.
209. van Middendorp JJ, Hosman AJ, Donders AR, Pouw MH, Ditunno JF, Jr., Curt A, et al. A clinical prediction rule for ambulation outcomes after traumatic spinal cord injury: a longitudinal cohort study. *Lancet (London, England).* 2011;377(9770):1004-10.
210. van Middendorp JJ, Hosman AJ, Pouw MH, Van de Meent H. ASIA impairment scale conversion in traumatic SCI: is it related with the ability to walk? A descriptive comparison with functional ambulation outcome measures in 273 patients. *Spinal cord.* 2009;47(7):555-60.
211. Hall M. Second Memoir on some principles of the pathology of the nervous system. *Medico-chirurgical transactions.* 1840;23:121-67.
212. Ploumis A, Yadlapalli N, Fehlings MG, Kwon BK, Vaccaro AR. A systematic review of the evidence supporting a role for vasopressor support in acute SCI. *Spinal cord.* 2010;48(5):356-62.
213. Lehmann KG, Lane JG, Piepmeier JM, Batsford WP. Cardiovascular abnormalities accompanying acute spinal cord injury in humans: incidence, time course and severity. *Journal of the American College of Cardiology.* 1987;10(1):46-52.
214. Guly HR, Bouamra O, Lecky FE. The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department. *Resuscitation.* 2008;76(1):57-62.
215. Ditunno JF, Little JW, Tessler A, Burns AS. Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal cord.* 2004;42(7):383-95.
216. Hiersemenzel LP, Curt A, Dietz V. From spinal shock to spasticity: neuronal adaptations to a spinal cord injury. *Neurology.* 2000;54(8):1574-82.
217. Atkinson PP, Atkinson JL. Spinal shock. *Mayo Clinic proceedings.* 1996;71(4):384-9.
218. Guttmann L. Spinal shock and reflex behaviour in man. *Paraplegia.* 1970;8(2):100-16.
219. Háková R, Kříž J. Míšní šok – od patofyziologie ke klinickým projevům. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie : časopis českých a slovenských neurologů a neurochirurgů.* 2015;78(3):263-7.
220. Calancie B, Broton JG, Klose KJ, Traad M, Difini J, Ayyar DR. Evidence that alterations in presynaptic inhibition contribute to segmental hypo- and hyperexcitability after spinal cord injury in man. *Electroencephalography and clinical neurophysiology.* 1993;89(3):177-86.
221. Simpson RK, Jr., Robertson CS, Goodman JC. Glycine: an important potential component of spinal shock. *Neurochemical research.* 1993;18(8):887-92.
222. Simpson RK, Jr., Robertson CS, Goodman JC. The role of glycine in spinal shock. *The journal of spinal cord medicine.* 1996;19(4):215-24.
223. Leis AA, Kronenberg MF, Stetkarova I, Paske WC, Stokic DS. Spinal motoneuron excitability after acute spinal cord injury in humans. *Neurology.* 1996;47(1):231-7.

224. Nacimiento W, Noth J. What, if anything, is spinal shock? *Archives of neurology*. 1999;56(8):1033-5.
225. Mendell LM. Physiological aspects of synaptic plasticity: the Ia/motoneuron connection as a model. *Advances in neurology*. 1988;47:337-60.
226. Barnes CD, Schadt JC. Release of function in the spinal cord. *Progress in neurobiology*. 1979;12(1):1-13.
227. Brooks NP. Central Cord Syndrome. *Neurosurgery clinics of North America*. 2017;28(1):41-7.
228. Molliqaj G, Payer M, Schaller K, Tessitore E. Acute traumatic central cord syndrome: a comprehensive review. *Neuro-Chirurgie*. 2014;60(1-2):5-11.
229. Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter MRN, Druschel C, Curt A, et al. Traumatic spinal cord injury. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17018.
230. Laurer H, Maier B, El Saman A, Lehnert M, Wyen H, Marzi I. Distribution of Spinal and Associated Injuries in Multiple Trauma Patients. *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society*. 2007;33(5):476-81.
231. Vaccaro AR, Zeiller SC, Hulbert RJ, Anderson PA, Harris M, Hedlund R, et al. The thoracolumbar injury severity score: a proposed treatment algorithm. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2005;18(3):209-15.
232. Terk MR, Hume-Neal M, Fraipont M, Ahmadi J, Colletti PM. Injury of the posterior ligament complex in patients with acute spinal trauma: evaluation by MR imaging. *AJR American journal of roentgenology*. 1997;168(6):1481-6.
233. Brightman RP, Miller CA, Rea GL, Chakeres DW, Hunt WE. Magnetic resonance imaging of trauma to the thoracic and lumbar spine. The importance of the posterior longitudinal ligament. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1992;17(5):541-50.
234. Emery SE, Pathria MN, Wilber RG, Masaryk T, Bohlman HH. Magnetic resonance imaging of posttraumatic spinal ligament injury. *Journal of spinal disorders*. 1989;2(4):229-33.
235. Petersilge CA, Pathria MN, Emery SE, Masaryk TJ. Thoracolumbar burst fractures: evaluation with MR imaging. *Radiology*. 1995;194(1):49-54.
236. Lee HM, Kim HS, Kim DJ, Suk KS, Park JO, Kim NH. Reliability of magnetic resonance imaging in detecting posterior ligament complex injury in thoracolumbar spinal fractures. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(16):2079-84.
237. Haba H, Taneichi H, Kotani Y, Terae S, Abe S, Yoshikawa H, et al. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging for detecting posterior ligamentous complex injury associated with thoracic and lumbar fractures. *Journal of neurosurgery*. 2003;99(1 Suppl):20-6.
238. Bailey CS, Urquhart JC, Dvorak MF, Nadeau M, Boyd MC, Thomas KC, et al. Orthosis versus no orthosis for the treatment of thoracolumbar burst fractures without neurologic injury: a multicenter prospective randomized equivalence trial. *Spine J*. 2014;14(11):2557-64.
239. Shamji MF, Roffey DM, Young DK, Reindl R, Wai EK. A pilot evaluation of the role of bracing in stable thoracolumbar burst fractures without neurological deficit. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2014;27(7):370-5.
240. Giele BM, Wiertsema SH, Beelen A, van der Schaaf M, Lucas C, Been HD, et al. No evidence for the effectiveness of bracing in patients with thoracolumbar fractures. *Acta orthopaedica*. 2009;80(2):226-32.
241. Weinstein JN, Collalto P, Lehmann TR. Thoracolumbar "burst" fractures treated conservatively: a long-term follow-up. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1988;13(1):33-8.
242. Wood K, Buttermann G, Mehbood A, Garvey T, Jhanjee R, Sechrist V. Operative compared with nonoperative treatment of a thoracolumbar burst fracture without neurological deficit. A prospective, randomized study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2003;85-a(5):773-81.

243. Cantor JB, Lebowitz NH, Garvey T, Eismont FJ. Nonoperative management of stable thoracolumbar burst fractures with early ambulation and bracing. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1993;18(8):971-6.
244. Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, D WC, Harrop JS, et al. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PloS one*. 2012;7(2):e32037.
245. Vaccaro AR, Daugherty RJ, Sheehan TP, Dante SJ, Cotler JM, Balderston RA, et al. Neurologic outcome of early versus late surgery for cervical spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22(22):2609-13.
246. La Rosa G, Conti A, Cardali S, Cacciola F, Tomasello F. Does early decompression improve neurological outcome of spinal cord injured patients? Appraisal of the literature using a meta-analytical approach. *Spinal cord*. 2004;42(9):503-12.
247. Wiltse LL, Bateman JG, Hutchinson RH, Nelson WE. The paraspinal sacrospinalis-splitting approach to the lumbar spine. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1968;50(5):919-26.
248. Pang W, Zhang GL, Tian W, Sun D, Li N, Yuan Q, et al. Surgical treatment of thoracolumbar fracture through an approach via the paravertebral muscle. *Orthopaedic surgery*. 2009;1(3):184-8.
249. Gejo R, Matsui H, Kawaguchi Y, Ishihara H, Tsuji H. Serial changes in trunk muscle performance after posterior lumbar surgery. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(10):1023-8.
250. Alanay A, Acaroglu E, Yazici M, Oznur A, Surat A. Short-segment pedicle instrumentation of thoracolumbar burst fractures: does transpedicular intracorporeal grafting prevent early failure? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(2):213-7.
251. Shin TS, Kim HW, Park KS, Kim JM, Jung CK. Short-segment Pedicle Instrumentation of Thoracolumbar Burst-compression Fractures; Short Term Follow-up Results. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. 2007;42(4):265-70.
252. Xu BS, Tang TS, Yang HL. Long-term results of thoracolumbar and lumbar burst fractures after short-segment pedicle instrumentation, with special reference to implant failure and correction loss. *Orthopaedic surgery*. 2009;1(2):85-93.
253. Grass R, Biewener A, Dickopf A, Rammelt S, Heineck J, Zwipp H. [Percutaneous dorsal versus open instrumentation for fractures of the thoracolumbar border. A comparative, prospective study]. *Der Unfallchirurg*. 2006;109(4):297-305.
254. Magerl FP. Stabilization of the lower thoracic and lumbar spine with external skeletal fixation. *Clinical orthopaedics and related research*. 1984(189):125-41.
255. Assaker R. Minimal access spinal technologies: state-of-the-art, indications, and techniques. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2004;71(6):459-69.
256. Palmisani M, Gasbarrini A, Brodano GB, De Iure F, Cappuccio M, Boriani L, et al. Minimally invasive percutaneous fixation in the treatment of thoracic and lumbar spine fractures. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2009;18 Suppl 1:71-4.
257. Sasso RC, Renkens K, Hanson D, Reilly T, McGuire RA, Jr., Best NM. Unstable thoracolumbar burst fractures: anterior-only versus short-segment posterior fixation. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2006;19(4):242-8.
258. Shono Y, McAfee PC, Cunningham BW. Experimental study of thoracolumbar burst fractures. A radiographic and biomechanical analysis of anterior and posterior instrumentation systems. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(15):1711-22.
259. Gurwitz GS, Dawson JM, McNamara MJ, Federspiel CF, Spengler DM. Biomechanical analysis of three surgical approaches for lumbar burst fractures using short-segment instrumentation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1993;18(8):977-82.

260. Schnake KJ, Stavridis SI, Kandziora F. Five-year clinical and radiological results of combined anteroposterior stabilization of thoracolumbar fractures. *Journal of neurosurgery Spine*. 2014;20(5):497-504.
261. Pingel A, Castein J, Kandziora F. Transthoracic miniopen approach for anterior monosegmental stabilization and fusion. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2017;26(Suppl 3):431-2.
262. Hall ED, Braughler JM. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and Na⁺ + K⁺-ATPase activity. Dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. *Journal of neurosurgery*. 1982;57(2):247-53.
263. Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, Shepard MJ, Wagner FW, Silten RM, et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *Jama*. 1984;251(1):45-52.
264. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *The New England journal of medicine*. 1990;322(20):1405-11.
265. Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassie P, Thicoipe M, et al. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal cord*. 2000;38(2):71-6.
266. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *Jama*. 1997;277(20):1597-604.
267. Hadley MN, Walters BC, Grabb PA, Oyesiku NM, Przybylski GJ, Resnick DK, et al. Pharmacological therapy after acute cervical spinal cord injury. *Neurosurgery*. 2002;50(3 Suppl):S63-72.
268. Bracken MB. Steroids for acute spinal cord injury. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;1:Cd001046.
269. Hurlbert RJ, Hadley MN, Walters BC, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, et al. Pharmacological therapy for acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 2015;76 Suppl 1:S71-83.
270. Hurlbert RJ. Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: point. *Neurosurgery*. 2014;61 Suppl 1:32-5.
271. Fehlings MG, Wilson JR, Cho N. Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: counterpoint. *Neurosurgery*. 2014;61 Suppl 1:36-42.
272. Bowers CA, Kundu B, Hawryluk GW. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an increasingly philosophical debate. *Neural regeneration research*. 2016;11(6):882-5.
273. Resnick DK. Updated Guidelines for the Management of Acute Cervical Spine and Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*. 2013;72 Suppl 2:1.
274. Ryken TC, Hurlbert RJ, Hadley MN, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, et al. The acute cardiopulmonary management of patients with cervical spinal cord injuries. *Neurosurgery*. 2013;72 Suppl 2:84-92.
275. Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Van Den Bos C, Thiede M. Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34⁺ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology*. 1999;140(8):3736-43.
276. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*. 2000;61(4):364-70.
277. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.

278. Takeda YS, Xu Q. Neuronal Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using Exosomes Derived from Differentiating Neuronal Cells. *PloS one*. 2015;10(8):e0135111-e.
279. Mu T, Qin Y, Liu B, He X, Liao Y, Sun J, et al. In Vitro Neural Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Carrying the FTH1 Reporter Gene and Detection with MRI. *BioMed research international*. 2018;2018:1978602-.
280. Foudah D, Scuteri A, Redondo J, Tredici G, Miloso M. Evaluation of neural markers expression in human mesenchymal stem cells after mesengenic differentiation2011.
281. Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, Glogarova K, Kroupova J, Andersson B, et al. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *Journal of neuroscience research*. 2004;76(2):232-43.
282. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009;57(11):1192-203.
283. Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, et al. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *International journal of stem cells*. 2009;2(1):59-68.
284. Torres-Espin A, Corona-Quintanilla DL, Fores J, Allodi I, Gonzalez F, Udina E, et al. Neuroprotection and axonal regeneration after lumbar ventral root avulsion by re-implantation and mesenchymal stem cells transplant combined therapy. *Neurotherapeutics*. 2013;10(2):354-68.
285. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(2):53.
286. Zhou C, Yang B, Tian Y, Jiao H, Zheng W, Wang J, et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cellular immunology*. 2011;272(1):33-8.
287. Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):11692-712.
288. Zhang J, Li Y, Chen J, Yang M, Katakowski M, Lu M, et al. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain Res*. 2004;1030(1):19-27.
289. Zhang J, Wei H, Lin M, Chen C, Wang C, Liu M. Curcumin protects against ischemic spinal cord injury: The pathway effect. *Neural regeneration research*. 2013;8(36):3391-400.
290. Zhu HT, Bian C, Yuan JC, Chu WH, Xiang X, Chen F, et al. Curcumin attenuates acute inflammatory injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling pathway in experimental traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11:59.
291. Ormond DR, Peng H, Zeman R, Das K, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Recovery from spinal cord injury using naturally occurring antiinflammatory compound curcumin: laboratory investigation. *Journal of neurosurgery Spine*. 2012;16(5):497-503.
292. Caillaud M, Chantemargue B, Richard L, Vignaud L, Favreau F, Faye PA, et al. Local low dose curcumin treatment improves functional recovery and remyelination in a rat model of sciatic nerve crush through inhibition of oxidative stress. *Neuropharmacology*. 2018;139:98-116.
293. He LF, Chen HJ, Qian LH, Chen GY, Buzby JS. Curcumin protects pre-oligodendrocytes from activated microglia in vitro and in vivo. *Brain Res*. 2010;1339:60-9.
294. Smejkal K. Selected natural phenolic compounds - potential treatment for peripheral neuropathy? *Ceska a Slovenska farmacie : casopis Ceske farmaceuticke spolcnosti a Slovenske farmaceuticke spolcnosti*. 2014;63(2):55-70.

295. Yu Y, Shen Q, Lai Y, Park SY, Ou X, Lin D, et al. Anti-inflammatory Effects of Curcumin in Microglial Cells. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:386.
296. Ni H, Jin W, Zhu T, Wang J, Yuan B, Jiang J, et al. Curcumin modulates TLR4/NF-kappaB inflammatory signaling pathway following traumatic spinal cord injury in rats. *The journal of spinal cord medicine*. 2015;38(2):199-206.
297. Liu S, Li Q, Zhang MT, Mao-Ying QL, Hu LY, Wu GC, et al. Curcumin ameliorates neuropathic pain by down-regulating spinal IL-1beta via suppressing astroglial NALP1 inflammasome and JAK2-STAT3 signalling. *Scientific reports*. 2016;6:28956.
298. Seth R, Bazz T. Role of Curcumin in Regulation of TNF-alpha Mediated Brain Inflammatory Responses. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*. 2018.
299. Yuan J, Zou M, Xiang X, Zhu H, Chu W, Liu W, et al. Curcumin improves neural function after spinal cord injury by the joint inhibition of the intracellular and extracellular components of glial scar. *The Journal of surgical research*. 2015;195(1):235-45.
300. He Q, Jiang L, Man S, Wu L, Hu Y, Chen W. Curcumin reduces neuronal loss and inhibits the NLRP3 inflammasome activation in an epileptic rat model. *Current neurovascular research*. 2018.
301. Hao Q, Wang HW, Yu Q, Shen J, Zhao L, Shi FF, et al. [Effects of curcumin on the recovery of hind limb function after spinal cord injury in rats and its mechanism]. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology*. 2017;33(5):441-4.
302. Ruzicka J, Urdzikova LM, Svobodova B, Amin AG, Karova K, Dubisova J, et al. Does combined therapy of curcumin and epigallocatechin gallate have a synergistic neuroprotective effect against spinal cord injury? *Neural regeneration research*. 2018;13(1):119-27.
303. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(6):807-18.
304. Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology*. 2007;595:453-70.
305. Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, et al. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of nanobiotechnology*. 2007;5:3.
306. Tiyaboonchai W, Tungpradit W, Plianbangchang P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2007;337(1-2):299-306.
307. Hu BH, Su J, Messersmith PB. Hydrogels cross-linked by native chemical ligation. *Biomacromolecules*. 2009;10(8):2194-200.
308. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)*. 2009;21(32-33):3307-29.
309. Hejcl A, Ruzicka J, Kekulova K, Svobodova B, Proks V, Mackova H, et al. Modified Methacrylate Hydrogels Improve Tissue Repair after Spinal Cord Injury. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9).
310. Ahuja CS, Fehlings M. Concise Review: Bridging the Gap: Novel Neuroregenerative and Neuroprotective Strategies in Spinal Cord Injury. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(7):914-24.
311. Estrada V, Brazda N, Schmitz C, Heller S, Blazyca H, Martini R, et al. Long-lasting significant functional improvement in chronic severe spinal cord injury following scar resection and polyethylene glycol implantation. *Neurobiol Dis*. 2014;67:165-79.
312. Chen BK, Knight AM, de Ruitter GC, Spinner RJ, Yaszemski MJ, Currier BL, et al. Axon regeneration through scaffold into distal spinal cord after transection. *Journal of neurotrauma*. 2009;26(10):1759-71.

313. Ruzicka J, Romanyuk N, Jirakova K, Hejcl A, Janouskova O, Machova LU, et al. The Effect of iPS-Derived Neural Progenitors Seeded on Laminin-Coated pHEMA-MOETACI Hydrogel with Dual Porosity in a Rat Model of Chronic Spinal Cord Injury. *Cell transplantation*. 2019;28(4):400-12.
314. Assunção-Silva RC, Gomes ED, Sousa N, Silva NA, Salgado AJ. Hydrogels and Cell Based Therapies in Spinal Cord Injury Regeneration. *Stem cells international*. 2015;2015:948040-.
315. Hejcl A, Ruzicka J, Proks V, Mackova H, Kubinova S, Tukmachev D, et al. Dynamics of tissue ingrowth in SIKVAV-modified highly superporous PHEMA scaffolds with oriented pores after bridging a spinal cord transection. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2018;29(7):89.
316. Dasari VR, Veeravalli KK, Dinh DH. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. *World journal of stem cells*. 2014;6(2):120-33.
317. Jain A, Kim YT, McKeon RJ, Bellamkonda RV. In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury. *Biomaterials*. 2006;27(3):497-504.
318. Taylor SJ, Rosenzweig ES, McDonald JW, 3rd, Sakiyama-Elbert SE. Delivery of neurotrophin-3 from fibrin enhances neuronal fiber sprouting after spinal cord injury. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006;113(3):226-35.
319. Ansorena E, De Berdt P, Ucakar B, Simon-Yarza T, Jacobs D, Schakman O, et al. Injectable alginate hydrogel loaded with GDNF promotes functional recovery in a hemisection model of spinal cord injury. *International journal of pharmaceutics*. 2013;455(1-2):148-58.
320. Chen BK, Madigan NN, Hakim JS, Dadsetan M, McMahan SS, Yaszemski MJ, et al. GDNF Schwann cells in hydrogel scaffolds promote regional axon regeneration, remyelination and functional improvement after spinal cord transection in rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2018;12(1):e398-e407.
321. Bai J-Y, Zhang W, An J-L, Sun Y-P, Ding W-Y, Shen Y. True anteroposterior view pedicle screw insertion technique. *Therapeutics and clinical risk management*. 2016;12:1039-47.
322. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
323. Metz GA, Whishaw IQ. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2009(28).
324. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in biotechnology*. 2006;24(4):150-4.
325. Cao C, Dong Y, Dong Y. [Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiu fu chongjian wai ke zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*. 2005;19(8):642-7.
326. Griffiths MJ, Bonnet D, Janes SM. Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet (London, England)*. 2005;366(9481):249-60.
327. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
328. Subramanian A, Fong CY, Biswas A, Bongso A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PloS one*. 2015;10(6):e0127992.
329. Bharti D, Shivakumar SB, Park JK, Ullah I, Subbarao RB, Park JS, et al. Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. *Cell and tissue research*. 2018;372(1):51-65.
330. Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I, Neuhuber B. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(4):328-34.

331. Bao X, Wei J, Feng M, Lu S, Li G, Dou W, et al. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2011;1367:103-13.
332. Oliveri RS, Bello S, Biering-Sorensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiol Dis.* 2014;62:338-53.
333. Sareen D, Gowing G, Sahabian A, Staggenborg K, Paradis R, Avalos P, et al. Human induced pluripotent stem cells are a novel source of neural progenitor cells (iNPCs) that migrate and integrate in the rodent spinal cord. *J Comp Neurol.* 2014;522(12):2707-28.
334. Pal R, Gopinath C, Rao NM, Banerjee P, Krishnamoorthy V, Venkataramana NK, et al. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Cytotherapy.* 2010;12(6):792-806.
335. Saito F, Nakatani T, Iwase M, Maeda Y, Murao Y, Suzuki Y, et al. Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor Neurol Neurosci.* 2012;30(2):127-36.
336. Forostyak S, Jendelova P, Sykova E. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury, regenerative medicine and possible clinical applications. *Biochimie.* 2013;95(12):2257-70.
337. Amemori T, Ruzicka J, Romanyuk N, Jhanwar-Uniyal M, Sykova E, Jendelova P. Comparison of intraspinal and intrathecal implantation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors for the treatment of spinal cord injury in rats. *Stem cell research & therapy.* 2015;6:257.
338. Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Katoh H, et al. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2005;19(13):1839-41.
339. Parr AM, Kulbatski I, Tator CH. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury. *Journal of neurotrauma.* 2007;24(5):835-45.
340. Cizkova D, Novotna I, Slovinska L, Vanicky I, Jergova S, Rosocha J, et al. Repetitive intrathecal catheter delivery of bone marrow mesenchymal stromal cells improves functional recovery in a rat model of contusive spinal cord injury. *Journal of neurotrauma.* 2011;28(9):1951-61.
341. Antonic A, Sena ES, Lees JS, Wills TE, Skeers P, Batchelor PE, et al. Stem cell transplantation in traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *PLoS biology.* 2013;11(12):e1001738.
342. Urdzikova LM, Ruzicka J, LaBagnara M, Karova K, Kubinova S, Jirakova K, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Inflammatory Cytokines after Spinal Cord Injury in Rat. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):11275-93.
343. Ruzicka J, Machova-Urdzikova L, Gillick J, Amemori T, Romanyuk N, Karova K, et al. A Comparative Study of Three Different Types of Stem Cells for Treatment of Rat Spinal Cord Injury. *Cell transplantation.* 2017;26(4):585-603.
344. Chen C, Chen F, Yao C, Shu S, Feng J, Hu X, et al. Intrathecal Injection of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Neuropathic Pain in Rats. *Neurochemical research.* 2016;41(12):3250-60.
345. Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, Kushner R, Swanger SA, Kopen GC, et al. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabilitation and neural repair.* 2006;20(2):278-96.
346. Amemori T, Jendelova P, Ruzickova K, Arboleda D, Sykova E. Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat. *Cytotherapy.* 2010;12(2):212-25.

347. Cho SR, Kim YR, Kang HS, Yim SH, Park CI, Min YH, et al. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell transplantation*. 2009;18(12):1359-68.
348. Hu SL, Luo HS, Li JT, Xia YZ, Li L, Zhang LJ, et al. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Critical care medicine*. 2010;38(11):2181-9.
349. Li H, Wen Y, Luo Y, Lan X, Wang D, Sun Z, et al. [Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into spinal cord injury: a comparison of delivery different times]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*. 2010;24(2):180-4.
350. Bollini S, Gentili C, Tasso R, Cancedda R. The Regenerative Role of the Fetal and Adult Stem Cell Secretome. *Journal of clinical medicine*. 2013;2(4):302-27.
351. Zhang K, Liu Z, Li G, Lai BQ, Qin LN, Ding Y, et al. Electro-acupuncture promotes the survival and differentiation of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells pre-induced with neurotrophin-3 and retinoic acid in gelatin sponge scaffold after rat spinal cord transection. *Stem cell reviews*. 2014;10(4):612-25.
352. Wang C, Shi D, Song X, Chen Y, Wang L, Zhang X. Calpain inhibitor attenuates ER stress-induced apoptosis in injured spinal cord after bone mesenchymal stem cells transplantation. *Neurochemistry international*. 2016;97:15-25.
353. Urdzikova LM, Ruzicka J, LaBagnara M, Karova K, Kubinova S, Jirakova K, et al. Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(7):11275-93.
354. Balasubramanian S, Thej C, Venugopal P, Priya N, Zakaria Z, Sundarraj S, et al. Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. *Cell biology international*. 2013;37(5):507-15.
355. Drela K, Lech W, Figiel-Dabrowska A, Zychowicz M, Mikula M, Sarnowska A, et al. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy*. 2016;18(4):497-509.
356. Shi C. Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. *Immunology*. 2012;136(2):133-8.
357. Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y, Wang Y. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *International journal of molecular medicine*. 2014;34(3):695-704.
358. Li C, Chen X, Qiao S, Liu X, Liu C, Zhu D, et al. Effects of Wharton's jelly cells of the human umbilical cord on acute spinal cord injury in rats, and expression of interleukin-1beta and nerve growth factor in spinal cord tissues. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2016;44(5):1254-8.
359. Lee KH, Suh-Kim H, Choi JS, Jeun SS, Kim EJ, Kim SS, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2007;67(1):13-22.
360. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(8):1614-25.
361. Oh JS, Park IS, Kim KN, Yoon DH, Kim SH, Ha Y. Transplantation of an adipose stem cell cluster in a spinal cord injury. *Neuroreport*. 2012;23(5):277-82.
362. Park SI, Lim JY, Jeong CH, Kim SM, Jun JA, Jeun SS, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy promotes functional recovery of contused rat spinal cord through

- enhancement of endogenous cell proliferation and oligogenesis. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:362473.
363. Shang AJ, Hong SQ, Xu Q, Wang HY, Yang Y, Wang ZF, et al. NT-3-secreting human umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantation for the treatment of acute spinal cord injury in rats. *Brain Res*. 2011;1391:102-13.
364. Matyas JJ, Stewart AN, Goldsmith A, Nan Z, Skeel RL, Rossignol J, et al. Effects of Bone-Marrow-Derived MSC Transplantation on Functional Recovery in a Rat Model of Spinal Cord Injury: Comparisons of Transplant Locations and Cell Concentrations. *Cell transplantation*. 2017;26(8):1472-82.
365. Gabr H, El-Kheir WA, Farghali HA, Ismail ZM, Zickri MB, El Maadawi ZM, et al. Intrathecal Transplantation of Autologous Adherent Bone Marrow Cells Induces Functional Neurological Recovery in a Canine Model of Spinal Cord Injury. *Cell transplantation*. 2015;24(9):1813-27.
366. Ryu HH, Kang BJ, Park SS, Kim Y, Sung GJ, Woo HM, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *The Journal of veterinary medical science*. 2012;74(12):1617-30.
367. Geffner LF, Santacruz P, Izurieta M, Flor L, Maldonado B, Auad AH, et al. Administration of autologous bone marrow stem cells into spinal cord injury patients via multiple routes is safe and improves their quality of life: comprehensive case studies. *Cell transplantation*. 2008;17(12):1277-93.
368. Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells and Development*. 2011;20(8):1297-308.
369. Karamouzian S, Nematollahi-Mahani SN, Nakhaee N, Eskandary H. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2012;114(7):935-9.
370. Mendonca MV, Larocca TF, de Freitas Souza BS, Villarreal CF, Silva LF, Matos AC, et al. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(6):126.
371. Lin MS, Lee YH, Chiu WT, Hung KS. Curcumin provides neuroprotection after spinal cord injury. *The Journal of surgical research*. 2011;166(2):280-9.
372. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(1):49-59.
373. Tonnesen HH. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. *Studies of curcumin and curcuminoids, XXVIII. Die Pharmazie*. 2002;57(12):820-4.
374. Metzler M, Pfeiffer E, Schulz SI, Dempe JS. Curcumin uptake and metabolism. *BioFactors (Oxford, England)*. 2013;39(1):14-20.
375. Tonnesen HH, Masson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International journal of pharmaceutics*. 2002;244(1-2):127-35.
376. Liu A, Lou H, Zhao L, Fan P. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2006;40(3):720-7.
377. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharmaceutical research*. 2004;21(10):1818-25.
378. Rakotoarisoa M, Angelova A. Amphiphilic Nanocarrier Systems for Curcumin Delivery in Neurodegenerative Disorders. *Medicines (Basel, Switzerland)*. 2018;5(4).
379. Rafiee Z, Nejatian M, Daeihamed M, Jafari SM. Application of different nanocarriers for encapsulation of curcumin. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2018:1-77.

380. Cheng KK, Yeung CF, Ho SW, Chow SF, Chow AH, Baum L. Highly stabilized curcumin nanoparticles tested in an in vitro blood-brain barrier model and in Alzheimer's disease Tg2576 mice. *The AAPS journal*. 2013;15(2):324-36.
381. Umerska A, Gaucher C, Oyarzun-Ampuero F, Fries-Raeth I, Colin F, Villamizar-Sarmiento MG, et al. Polymeric Nanoparticles for Increasing Oral Bioavailability of Curcumin. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2018;7(4).
382. Naeimi R, Safarpour F, Hashemian M, Tashakorian H, Ahmadian SR, Ashrafpour M, et al. Curcumin-loaded nanoparticles ameliorate glial activation and improve myelin repair in lyolecithin-induced focal demyelination model of rat corpus callosum. *Neuroscience letters*. 2018;674:1-10.
383. Trivedi MK, Mondal SC, Gangwar M, Jana S. Immunomodulatory potential of nanocurcumin-based formulation. *Inflammopharmacology*. 2017;25(6):609-19.
384. Dende C, Meena J, Nagarajan P, Nagaraj VA, Panda AK, Padmanaban G. Nanocurcumin is superior to native curcumin in preventing degenerative changes in Experimental Cerebral Malaria. *Scientific reports*. 2017;7(1):10062.
385. Jin W, Wang J, Zhu T, Yuan B, Ni H, Jiang J, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in experimental spinal cord injury in rats. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2014;63(5):381-7.
386. Koeberle A, Munoz E, Appendino GB, Minassi A, Pace S, Rossi A, et al. SAR studies on curcumin's pro-inflammatory targets: discovery of prenylated pyrazolocurcuminoids as potent and selective novel inhibitors of 5-lipoxygenase. *Journal of medicinal chemistry*. 2014;57(13):5638-48.
387. Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2015;83:111-24.
388. Deguchi A. Curcumin targets in inflammation and cancer. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2015;15(2):88-96.
389. Gonzalez-Reyes S, Guzman-Beltran S, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J. Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:801418.
390. Berrak O, Akkoc Y, Arisan ED, Coker-Gurkan A, Obakan-Yerlikaya P, Palavan-Unsal N. The inhibition of PI3K and NFkappaB promoted curcumin-induced cell cycle arrest at G2/M via altering polyamine metabolism in Bcl-2 overexpressing MCF-7 breast cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2016;77:150-60.
391. Jin H, Qiao F, Wang Y, Xu Y, Shang Y. Curcumin inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human non-small cell lung cancer cells through the upregulation of miR-192-5p and suppression of PI3K/Akt signaling pathway. *Oncology reports*. 2015;34(5):2782-9.
392. Xu X, Qin J, Liu W. Curcumin inhibits the invasion of thyroid cancer cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway. *Gene*. 2014;546(2):226-32.
393. Chen G, Liu S, Pan R, Li G, Tang H, Jiang M, et al. Curcumin Attenuates gp120-Induced Microglial Inflammation by Inhibiting Autophagy via the PI3K Pathway. *Cellular and molecular neurobiology*. 2018.
394. Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yezierski RP. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(9):3251-60.
395. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical chemistry*. 1999;45(1):7-17.

396. Moon DO, Kim MO, Kang SH, Choi YH, Kim GY. Sulforaphane suppresses TNF-alpha-mediated activation of NF-kappaB and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer letters*. 2009;274(1):132-42.
397. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *British journal of pharmacology*. 2013;169(8):1672-92.
398. Bang W-S, Kim K-T, Seo YJ, Cho D-C, Sung J-K, Kim CH. Curcumin Increase the Expression of Neural Stem/Progenitor Cells and Improves Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. 2018;61(1):10-8.
399. Son S, Kim KT, Cho DC, Kim HJ, Sung JK, Bae JS. Curcumin Stimulates Proliferation of Spinal Cord Neural Progenitor Cells via a Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. 2014;56(1):1-4.
400. Ormond DR, Shannon C, Oppenheim J, Zeman R, Das K, Murali R, et al. Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. *PLoS one*. 2014;9(2):e88916.
401. Ruzicka J, Urdzikova LM, Kloudova A, Amin AG, Vallova J, Kubinova S, et al. Anti-inflammatory compound curcumin and mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury in rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2018;78(4):358-74.
402. Tao X, Ming-Kun Y, Wei-Bin S, Hai-Long G, Rui K, Lai-Yong T. Role of telomerase reverse transcriptase in glial scar formation after spinal cord injury in rats. *Neurochemical research*. 2013;38(9):1914-20.
403. Popovich PG, Wei P, Stokes BT. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*. 1997;377(3):443-64.
404. Trivedi A, Olivas AD, Noble-Haeusslein LJ. Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes. *Clinical neuroscience research*. 2006;6(5):283-92.
405. Cho N, Nguyen DH, Satkunendrarajah K, Branch DR, Fehlings MG. Evaluating the role of IL-11, a novel cytokine in the IL-6 family, in a mouse model of spinal cord injury. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:134.
406. Zhang Y, Taveggia C, Melendez-Vasquez C, Einheber S, Raine CS, Salzer JL, et al. Interleukin-11 potentiates oligodendrocyte survival and maturation, and myelin formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(47):12174-85.
407. Cavillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2001;47(4):695-702.
408. Bethea JR. Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. *Progress in brain research*. 2000;128:33-42.
409. Meyaard L, Hovenkamp E, Otto SA, Miedema F. IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(8):2776-82.
410. Jeannin P, Delneste Y, Seveso M, Life P, Bonnefoy JY. IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(9):3159-65.
411. Gerosa F, Paganin C, Peritt D, Paiola F, Scupoli MT, Aste-Amezaga M, et al. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(6):2559-69.
412. Windhagen A, Anderson DE, Carrizosa A, Williams RE, Hafler DA. IL-12 induces human T cells secreting IL-10 with IFN-gamma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;157(3):1127-31.

413. Yaguchi M, Ohta S, Toyama Y, Kawakami Y, Toda M. Functional recovery after spinal cord injury in mice through activation of microglia and dendritic cells after IL-12 administration. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(9):1972-80.
414. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(8):583-94.
415. Tripathy D, Thirumangalakudi L, Grammas P. RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain: a possible neuroprotective role. *Neurobiology of aging*. 2010;31(1):8-16.
416. Mehler MF, Rozental R, Dougherty M, Spray DC, Kessler JA. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature*. 1993;362(6415):62-5.
417. Maheshwari A, Janssens K, Bogie J, Van Den Haute C, Struys T, Lambrichts I, et al. Local overexpression of interleukin-11 in the central nervous system limits demyelination and enhances remyelination. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:685317.
418. Gertzbein SD, Robbins SE. Accuracy of pedicular screw placement in vivo. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990;15(1):11-4.
419. Laudato PA, Pierzchala K, Schizas C. Pedicle Screw Insertion Accuracy Using O-Arm, robotic guidance or freehand technique: A Comparative Study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2017.
420. McAnany SJ, Overley SC, Kim JS, Baird EO, Qureshi SA, Anderson PA. Open Versus Minimally Invasive Fixation Techniques for Thoracolumbar Trauma: A Meta-Analysis. *Global spine journal*. 2016;6(2):186-94.
421. Phan K, Rao PJ, Mobbs RJ. Percutaneous versus open pedicle screw fixation for treatment of thoracolumbar fractures: Systematic review and meta-analysis of comparative studies. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2015;135:85-92.
422. Vanek P, Bradac O, Konopkova R, de Lacy P, Lacman J, Benes V. Treatment of thoracolumbar trauma by short-segment percutaneous transpedicular screw instrumentation: prospective comparative study with a minimum 2-year follow-up. *Journal of neurosurgery Spine*. 2014;20(2):150-6.
423. Sun XY, Zhang XN, Hai Y. Percutaneous versus traditional and paraspinous posterior open approaches for treatment of thoracolumbar fractures without neurologic deficit: a meta-analysis. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2017;26(5):1418-31.
424. Pishnamaz M, Oikonomidis S, Knobe M, Horst K, Pape HC, Kobbe P. Open versus Percutaneous Stabilization of Thoracolumbar Spine Fractures: A Short-Term Functional and Radiological Follow-up. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. 2015;82(4):274-81.
425. Ringel F, Stoffel M, Stuer C, Meyer B. Minimally invasive transmuscular pedicle screw fixation of the thoracic and lumbar spine. *Neurosurgery*. 2006;59(4 Suppl 2):ONS361-6; discussion ONS6-7.
426. Dahdaleh NS, Smith ZA, Hitchon PW. Percutaneous pedicle screw fixation for thoracolumbar fractures. *Neurosurgery clinics of North America*. 2014;25(2):337-46.
427. Korovessis P, Hadjipavlou A, Repantis T. Minimal invasive short posterior instrumentation plus balloon kyphoplasty with calcium phosphate for burst and severe compression lumbar fractures. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(6):658-67.
428. Tinelli M, Matschke S, Adams M, Grutzner PA, Munzberg M, Suda AJ. Correct positioning of pedicle screws with a percutaneous minimal invasive system in spine trauma. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2014;100(4):389-93.
429. Lehmann W, Ushmaev A, Ruecker A, Nuechtern J, Grossterlinden L, Begemann PG, et al. Comparison of open versus percutaneous pedicle screw insertion in a sheep model. *European spine*

- journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society. 2008;17(6):857-63.
430. Wanek T, Adamus M, Novák V, Homola M. Porovnání peroperační radiální expozice při otevřené a miniinvazivní transpedikulární fixaci hrudní a bederní páteře. *Cesk Slov Neurol N*. 2013;2013(76/109(5)):608-13.
431. Kruger A, Rammler K, Ziring E, Zettl R, Ruchholtz S, Frangen TM. Percutaneous minimally invasive instrumentation for traumatic thoracic and lumbar fractures: a prospective analysis. *Acta orthopaedica Belgica*. 2012;78(3):376-81.
432. Wang HW, Li CQ, Zhou Y, Zhang ZF, Wang J, Chu TW. Percutaneous pedicle screw fixation through the pedicle of fractured vertebra in the treatment of type A thoracolumbar fractures using Sextant system: an analysis of 38 cases. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi*. 2010;13(3):137-45.
433. Tian F, Tu LY, Gu WF, Zhang EF, Wang ZB, Chu G, et al. Percutaneous versus open pedicle screw instrumentation in treatment of thoracic and lumbar spine fractures: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2018;97(41):e12535.
434. Wang B, Fan Y, Dong J, Wang H, Wang F, Liu Z, et al. A retrospective study comparing percutaneous and open pedicle screw fixation for thoracolumbar fractures with spinal injuries. *Medicine*. 2017;96(38):e8104.
435. Lee JK, Jang JW, Kim TW, Kim TS, Kim SH, Moon SJ. Percutaneous short-segment pedicle screw placement without fusion in the treatment of thoracolumbar burst fractures: is it effective?: comparative study with open short-segment pedicle screw fixation with posterolateral fusion. *Acta neurochirurgica*. 2013;155(12):2305-12; discussion 12.
436. Diniz JM, Botelho RV. Is fusion necessary for thoracolumbar burst fracture treated with spinal fixation? A systematic review and meta-analysis. *Journal of neurosurgery Spine*. 2017;27(5):584-92.
437. Tian NF, Wu YS, Zhang XL, Wu XL, Chi YL, Mao FM. Fusion versus nonfusion for surgically treated thoracolumbar burst fractures: a meta-analysis. *PloS one*. 2013;8(5):e63995.
438. Lei F, Ye F, Zhou Q, Yang H, Yang J, Feng D, et al. [COMPARISON OF SHORT SEGMENTAL FIXATION WITH AND WITHOUT FUSION IN TREATMENT OF THORACOLUMBAR BURST FRACTURE BY POSTERIOR APPROACH]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waik e zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*. 2016;30(9):1111-7.
439. Sanderson PL, Fraser RD, Hall DJ, Cain CM, Osti OL, Potter GR. Short segment fixation of thoracolumbar burst fractures without fusion. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 1999;8(6):495-500.
440. Serin E, Karakurt L, Yilmaz E, Belhan O, Varol T. Effects of two-levels, four-levels, and four-levels plus offset-hook posterior fixation techniques on protecting the surgical correction of unstable thoracolumbar vertebral fractures: a clinical study. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. 2004;14(1):1-6.
441. Aly TA. Short Segment versus Long Segment Pedicle Screws Fixation in Management of Thoracolumbar Burst Fractures: Meta-Analysis. *Asian Spine J*. 2017;11(1):150-60.
442. Panteliadis P, Musbahi O, Muthian S, Goyal S, Montgomery AS, Ranganathan A. A Comparison of Three Different Methods of Fixation in the Management of Thoracolumbar Fractures. *Int J Spine Surg*. 2018;12(1):1-7.
443. Assunção Filho CA, Simões FC, Prado GO. THORACOLUMBAR BURST FRACTURES, SHORT X LONG FIXATION: A META-ANALYSIS. *Coluna/Columna*. 2016;15:78-84.
444. Dhall SS, Wadhwa R, Wang MY, Tien-Smith A, Mummaneni PV. Traumatic thoracolumbar spinal injury: an algorithm for minimally invasive surgical management. *Neurosurgical focus*. 2014;37(1):E9.

445. Court C, Vincent C. Percutaneous fixation of thoracolumbar fractures: current concepts. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2012;98(8):900-9.
446. Zhao QM, Gu XF, Yang HL, Liu ZT. Surgical outcome of posterior fixation, including fractured vertebra, for thoracolumbar fractures. *Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)*. 2015;20(4):362-7.
447. Grossbach AJ, Dahdaleh NS, Abel TJ, Woods GD, Dlouhy BJ, Hitchon PW. Flexion-distraction injuries of the thoracolumbar spine: open fusion versus percutaneous pedicle screw fixation. *Neurosurgical focus*. 2013;35(2):E2.
448. Kakarla UK, Little AS, Chang SW, Sonntag VK, Theodore N. Placement of percutaneous thoracic pedicle screws using neuronavigation. *World neurosurgery*. 2010;74(6):606-10.