

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

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

Petr Krůpa

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Chirurgie

Hradec Králové
2019

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Chirurgie na Ústavu experimentální medicíny AVČR, v.v.i. v Praze a Neurochirurgické klinice Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Autor: MUDr. Petr Krůpa, Neurochirurgická klinika LF HK a FN HK a
Oddělení regenerace nervové tkáně, Ústav experimentální medicíny AVČR
v.v.i

Školitel: prof. MUDr. Svatopluk Řehák, CSc., Neurochirurgická klinika LF HK a FN HK

Školitel konzultant: doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D., Oddělení regenerace nervové tkáně, Ústav
experimentální medicíny AVČR v.v.i

Oponenti: MUDr. Aleš Hejčl, Ph.D., Neurochirurgická klinika UJEP, Masarykova
nemocnice Ústí nad Labem

prof. MUDr. Lumír Hrabálek, Ph.D., Neurochirurgická klinika FN Olomouc

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR dne v
..... od hod.

(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)

Tato práce vznikla za podpory grantu *(pokud tomu tak bylo)*.....

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

doc. MUDr. RNDr. Milan Kaška, Ph.D.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací

v doktorském studijním programu CHIRURGIE

Garant studijního programu

Obsah

Souhrn	5
Abstract	6
1. Úvod do problematiky	7
2. Cíle disertační práce	9
3. Materiál a metodika	10
3.1. Použitá experimentální zvířata	10
3.2. Pacienti	10
3.3. Experimentální model míšní léze	10
3.4. Aplikace terapeutických buněk/protizánětlivé látky	11
3.4.1. hWJ-MSCs	11
3.4.2. Nanokurkumin	11
3.5. Operační stabilizace zlomeniny (OPEN, MIS)	12
3.6. Analýza efektu hWJ-MSCs/nanokurkuminu	12
3.6.1. Behaviorální testování	12
3.6.2. Imunohistochemická analýza	13
3.6.3. qPCR	14
3.7. Hodnocení přesnosti zavedených šroubů a dalších klinických parametrů	14
3.8. Statistická analýza	14
4. Výsledky	15
4.1. Experimentální léčba míšního poranění pomocí hWJ-MSCs/nanokurkuminu	15
4.1.1. Behaviorální testování	15
4.1.2. Histologická a imunohistochemická analýza	16
4.1.3. qPCR	18
4.2. Klinické hodnocení stabilizace ve skupinách MIS a OPEN	19
5. Diskuze	20
7.1 hWJ-MSCs	20
7.2 Nanokurkumin	21
7.3 Klasická versus mini-invazivní technika chirurgické stabilizace	22
6. Závěry	23
7. Použitá literatura	24
8. Přehled publikační činnosti autora	29

Souhrn

Tato práce je zaměřena na experimentální léčbu míšního poranění (SCI) pomocí podávání lidských mezenchymálních buněk z Whartonova rosolu (hWJ-MSCs) a protizánětlivé látky nanokurkuminu a je doplněna o klinické zhodnocení nového mini-invazivního způsobu stabilizace hrudně-bederních obratlových zlomenin.

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), imunohistochemicky (rozsah gliové jizvy, axonální sprouting, počet protoplazmatických astrocytů), histologicky (morfometrie míšní tkáně) a pomocí qPCR vybraných genů (*Gfap*, *Casp3*, *Irf5*, *Cd86*, *Mrc1*, *Cd163*, *Sort1*, *Fgf2*, *Olig2*, *Gap43*, *Vegf*, *Nfkβ*) a cytokinů (IL-1β, 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 0,5 M a byl potvrzen stoupající efekt zvyšujících se dávek na robustnější 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.

Analýza efektu léčby nanokurkuminem odhalila signifikantní změny v pohybu dolních končetin s lepší schopností nosnosti vlastního těla, byla signifikantně více zachována bílá hmota míšní tkáně, snížený rozsah gliové jizvy a vyšší axonální sprouting. qPCR analýza zánětlivé odpovědi odhalila signifikantní změny v expresi zánětlivých cytokinů v prvních dvou týdnech po SCI.

Při retrospektivním 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 bylo dosaženo signifikantně delšího operačního času ve skupině OPEN a signifikantně vyššího expozičního času RTG záření ve skupině MIS. Metoda MIS byla zhodnocena jako bezpečná alternativa k metodě OPEN u selektivních operací zlomenin páteře.

Abstract

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 the treatment of the ischemic-compression model of SCI in rats with hWJ-MSCs different dosages (0.5 or 1.5 million cells) and repeated applications were compared. Cells or saline were applied intrathecally by lumbar puncture for one week only, 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 4 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. 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.

Behavioral tests revealed a significant improvement of the biomechanics of hindlimbs with a better weight-carrying ability in the nanocurcumin treated group, compared to the nanocarrier control. An immunohistochemical and histological analysis proved a significant preservation 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 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.

1. Úvod do problematiky

Zlomeniny páteře spolu 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.

Úrazové zlomeniny páteře jsou způsobené vysokoenergetickým traumatem, přičemž až 80 % je lokalizováno v hrudní a bederní páteři (1, 2). Nečastější 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 jsou pády z výšky a automobilové nehody. U závažných a složitých zlomenin páteře, při kterých dochází buď k významné dislokaci fragmentu kosti, nebo k distrakčně-rotacímu pohybu v oblasti páteřního kanálu, bývá následkem zranění různý stupeň poranění míchy s výsledným neurologickým deficitem.

Konečný stupeň poranění míchy, který koreluje s definitivním klinickým obrazem je výsledkem dvou patofyziologických dějů - primárního a sekundárního poranění. Primární poranění reprezentuje prvotní trauma z přímého impaktu. Sekundární poranění, které je pro jednotlivé charakteristické děje členěno na akutní, subakutní a chronické, je kaskádou tkáňových procesů, které zahrnují lokální imunitní reakci, iontové změny, tvorbu gliové jizvy a apoptózu buněk (4). Vzhledem k omezené endogenní schopnosti regenerace nervové tkáně je současná terapie cílena převážně na ochranu tkáně, která nebyla zničena během prvotního traumatu, avšak je v ohrožení sekundárními změnami (5). V klinické praxi se jako protektivní látka využívá účinku methylprednisolonu, který má však řadu nežádoucích účinků a jeho vliv na výsledný neurologický stav pacienta je spíše sporný. V experimentální medicíně bylo při snížení negativního dopadu patologicky zvýšené zánětlivé reakce dosaženo slibných výsledků využíváním parakrinního účinku mezenchymálních kmenových buněk, nebo protizánětlivé přírodní látky kurkumin (6).

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) jsou multipotentní buňky se schopností multi-diferenciace (např. do buněk osteocytů, osteoblastů, adipocytů nebo chondrocytů) a sebe obnovy (7-9). Jako zdroj MSCs byla potvrzena řada tkání a orgánů - tuková tkáň, plíce, srdce, placenta, endometrium, pupečnicková krev či Whartonův rosol. U míšního poranění je jejich účinek převážně parakrinní, kdy produkují řadu cytokinů a růstových faktorů, které interagují s okolním prostředím. Při jejich využití u poranění nervové tkáně tak MSCs podporují revaskularizaci a modulují zánětlivou reakci, čímž podporují přežívání nervových buněk (10-12). MSCs derivované z lidského Whartonova rosolu (hWJ-MSCs), jakožto velmi mladé MSCs, mají vyšší proliferační potenciál, nižší imunogenicitu pramenící z absence histokompatibilních komplexů MHC-I a MHC-II a navíc jsou prokázány jako bezpečné stran možnosti tvorby nádorů (13-15). Další výhodou je jejich relativně jednoduché a hlavně neinvazivní získávání z tkáně po porodu, které nepředstavuje žádné nebezpečí pro dárce (16).

Kurkumin je přírodní polyfenolový derivát rostliny *Curcuma longa*, který je intenzivně studován pro své protizánětlivé, antioxidační a jiné neuroprotektivní účinky (17-20). Předchozí studie jeho účinku u SCI prokázaly jeho vliv na snížení zánětlivé reakce inhibicí kanonické NF- κ B zánětlivé cesty a redukcí tvorby zánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β , prevenci apoptózy a hlavně na zlepšení funkčního neurologického stavu po poranění (6, 18,

19, 21-24). Jeho klinické využití je však velmi omezeno vzhledem k jeho nízké rozpustnosti ve vodě a rychlé eliminaci z organismu cestou jaterního a střevního metabolismu (25, 26). Pro zvýšení biodostupnosti byla učiněna celá řada pokusů o navázání kurkuminu na jiný, biologicky přívětivější nosič (cyklodextrin, fosfolipid apod.) (27-30). Pro účely naší studie byl kurkumin navázán na nanonosič na bázi lipidu (Lipodisq™). Výsledná sloučenina je rozpustná ve vodě a v dalších fyziologických roztocích a je proto vhodná pro topické i systematické podání.

V experimentálních studiích jsme využili ischemicko-kompresivní model míšního poranění u potkana Wistar. Při transplantaci hWJ-MSCs byl využit klinicky relevantní model intratékálního podání cestou lumbální punkce. Vzhledem k tomu, že přežití allogenních buněk v hostitelském prostředí je v řádu 1 až 2 týdnů (31), byla vyslovena hypotéza, že opakované podávání prodlouží parakrinní efekt MSCs alepší výsledný neurologický stav poraněných zvířat (32). Potkani proto byli rozděleni do skupin s různými efektivními dávkami hWJ-MSCs (0,5 M a 1,5 M) a s jednotlivým, nebo trojitým podáním buněk. Nanokurkumin byl podáván jednak cestou invazivního lokálního podání k místu poranění ihned po kontuzi míchy, ale také cestou mini-invazivního systémového podkožního podání po dobu 4 týdnů. Léčená zvířata byla vždy porovnávána s neléčenou kontrolní skupinou. Výsledky byly hodnoceny sérií behaviorálních testů (BBB, chůze po kladině, motoRater), imunohistochemicky, histologicky a pomocí analýzy qPCR vybraných genů.

Management zlomenin obratlů Th-L oblasti se řídí závažností zlomeniny a přítomností neurologického deficitu. Při rozhodnutí o chirurgické strategii léčby je zlatým standardem zadní transpedikulární stabilizace zlomeného segmentu s případným doplněním o dekompresi utlačených nervových struktur. Otevřená transpedikulární metoda zadního přístupu vede vzhledem k širokému přístupu a separaci paravertebrálních svalů k denervaci a ischemické nekróze svalstva. Atrofované svalstvo není schopno unést dynamické nároky páteře a u pacienta může vést až k blokovému „flat back“ postavení s jen těžko ovlivnitelnou bolestí zad (33). Poškození svalu lze měřit pomocí sérových hodnot kreatin-kinázy, kdy byly publikovány vyšší hladiny při otevřené technice v porovnání s mini-invazivní technikou v experimentální studii (34). Další nevýhodou otevřeného přístupu je větší krevní ztráta, která se v průměru většinou pohybuje v rozmezí 500 ml až 1200 ml (35). K výhodám této otevřené metody však patří lepší možnost repozice zlomeného obratlového těla.

Vzhledem k výše uvedeným nedostatkům dosud nepoužívanější operační techniky bylo zavedeno nové mini-invazivní perkutánní zavádění pedikulárních šroubů (36). 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 kontroly RTG paprsků. K významnějšímu rozvoji perkutánních mini-invazivních technik dochází v poslední dekádě hlavně díky vývoji nových instrumentárií, které se dostávají s odstupem i na český trh. Výhodou mini-invazivního perkutánního přístupu je nižší intraoperační i postoperační krevní ztráta a z toho plynoucí nižší riziko rané infekce (37).

Nová operační technika byla zavedena na Neurochirurgické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové v roce 2014. V naší retrospektivní studii jsme se zaměřili na celkový počet malpozičně zavedených šroubů, délku operace a expozici RTG záření v porovnání mezi oběma skupinami.

2. Cíle disertační 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 podkožním podáním 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 přesnosti zavedených transpedikulárních šroubů, parametrů kyfotizace obratlů, dávky radiačního záření, času operace, celkového počtu reoperací a infekčních komplikací.

3. Materiál a metodika

3.1. Použitá experimentální zvířata

K pokusu byli využiti dospělí samci potkana Wistar (hWJ-MSCs n=90, nanokurkumin n=52) 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. Po vytvoření míšní léze byli potkani rozděleni do jednotlivých léčebných skupin. Trvání experimentu v behaviorální, a posléze histologické, imunohistochemické a qPCR části pokusu bylo 9 týdnů. Zvířata, která byla využita k další qPCR a cytokinové analýze v dalších časových intervalech, nebyla součástí behaviorální studie.

3.2. 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 skiaskopií 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. První skupinu pacientů operovaných klasickou otevřenou technikou (skupina OPEN) tvoří celkem 100 pacientů. Druhá skupina pacientů operovaná mini-invazivní perkutánní technikou (skupina MIS) čítá 47 pacientů. 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.

3.3. Experimentální model míšní léze

Jako model míšní léze byla zvolena metoda balónkové ischemicko-kompresní léze (38). 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, 4mg/kg) a chirurgická pooperační 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 provedena částečná laminektomie obratle Th10. Následně byl do epidurálního prostoru velmi opatrně zasunut sterilní 2F Fogartyho katétr až do úrovně Th8. Po správném umístění katétru byl balónek rychle naplněn 15 μ l fyziologického roztoku a udržován rozepjatý po dobu 5 minut, čímž se vytvořila kompresní míšní léze. 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*.

3.4. Aplikace terapeutických buněk/protizánětlivé látky

3.4.1. 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 zpracování tkáně odsouhlasený institucionální etickou komisí. K dalšímu zpracování byly využity 10-15 cm dlouhé části pupečnicku, které byly sterilně transportovány s antibioticko-antimykotickým roztokem při udržování stálé teploty 4 °C za účelem zpracování tkáně s následným kultivováním a pasážováním buněk.

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 25 G 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. Zvířata byla rozdělena do 5 skupin podle počtu aplikovaných buněk. První skupině (0,5 M) bylo transplantováno 0,5 milionu buněk v 50 µl fyziologického roztoku v jedné dávce 7. den po SCI (n=12). Druhá skupina (1,5 M) obdržela 1,5 milionu buněk v 50 µl 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 µl 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 µl fyziologického roztoku 7., 14. a 21. den po SCI (n=7). U kontrolní skupiny (kontrola) proběhla jednotlivá, nebo trojitá implantace 50 µl fyziologického roztoku 7. (14., 21.) den po SCI (n=11). Vzhledem k tomu, že se výsledky jednotlivé, nebo trojité 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.

3.4.2. Nanokurkumin

Pro aplikaci byl použit vysoce purifikovaný syntetický kurkumin obsažený v diskoidní nanočástici na bázi lipidu o velikosti 10-25 nm - LipodisqTM (Malvern Cosmeceutics, Malvern, UK).

Aplikace nanokurkuminu do experimentálního modelu potkana s míšní lézí byla prováděna lokálním a podkožním 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.

3.5. Operační stabilizace zlomeniny (OPEN, MIS)

K operačnímu řešení zlomeniny byly využity dvě metody zadní transpedikulární stabilizace - otevřená (OPEN) a mini-invazivní perkutánní (MIS). Otevřená stabilizace byla provedena ze středové incize kůže a podkoží následované paraspinálním 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 skioskopie s následnou inzercí pedikulárního šroubu. 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 pacienti s přítomností neurologického deficitu.

3.6. Analýza efektu hWJ-MSCs/nanokurkuminu

3.6.1. Behaviorální testování

3.6.1.1. 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 (39). 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 tlapy, schopnost podpory váhy těla a případná koordinace pohybu všech končetin při chůzi.

3.6.1.2. 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, Germany). Každý pokus zvířete o zdolání vzdálenosti byl omezen časovým limitem 60 s a bodově hodnocen pomocí modifikovaného skórovacího systému dle Metz a Whishawa (40). 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.

3.6.1.3. *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 pixel, 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). Získaná pohybová videa byla analyzována pomocí softwaru TSE Motion 8.5.11. Postupně byly vykresleny a spočítány maximální a minimální pohybové úhly v kyčelním a kolenním kloubu. Dále byla změřena výška hřebenu kosti kyčelní nad zemí značící schopnost zvířete unést vlastní váhu. Mechanika pohybu packy byla měřena pomocí retrakce a protrakce. 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).

3.6.2. 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 perfúze za použití roztoku fosfátového pufru (250 ml) následovaného 4% roztokem paraformaldehydu (200 ml). 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. Řezy byly prohlédnuty a naskenovány v digitální podobě pomocí mikroskopu Axioskop 2 plus (Zeiss, Oberkochen, Německo), nebo LEICA CTR 6500 s grafickým nástrojem FAXS 4.2.6245.1020 (TissueGnostics, Vídeň, Rakousko). Na získaných snímcích byla poté změřena celková plocha bílé a šedé hmoty, rozsah gliové jizvy, počet reaktivních astrocytů a axonální sprouting pomocí programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA), nebo Tissue FAXS (Tissue Gnostics, Vídeň, Rakousko) s následným porovnáním mezi jednotlivými skupinami.

K vizualizaci šedé a bílé hmoty míšní v histologických řezech bylo využito barvení „Kresol violet a luxolová modř“. K vizualizaci rozsahu gliové jizvy byla využívána protilátka proti GFAP (Sigma, St. Louis, MO, USA). Na uvedených snímcích byly také manuálně spočítány morfologicky charakteristické tzv. reaktivní astrocyty. Imunohistochemická vizualizace nově pučících axonálních konců byla analyzována po barvení protilátkou proti GAP43 (Millipore, Billerica, MA). Při analýze imunohistochemického signálu byla hodnocena celková plocha hyperintenzního signálu značícího aktivní pučení konců axonů s následným porovnáním mezi jednotlivými skupinami.

3.6.3. 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 (*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) analyzována pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR).

Cytokinová studie byla cílena na brzké změny a byla provedena 1 a 14 dnů po SCI. Expresie 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).

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.

3.7. 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. 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).

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

4. Výsledky

4.1. Experimentální léčba míšního poranění pomocí hWJ-MSCs/nanokurkuminu

4.1.1. Behaviorální testování

4.1.1.1. hWJ-MSCs

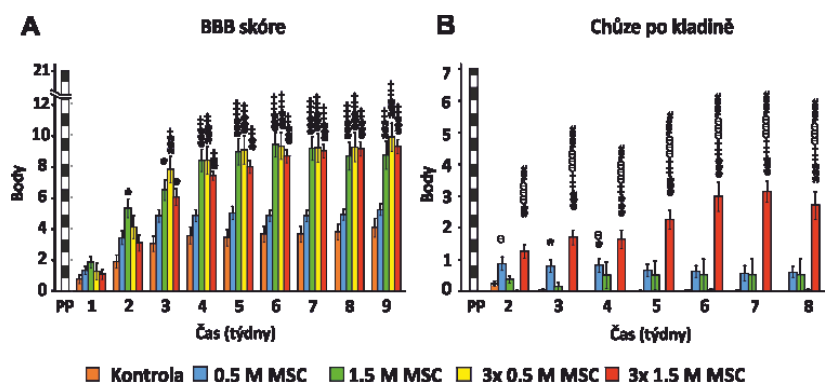
BBB

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 ($2,1 \pm 0,43$). Od třetího 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. 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. 1 A).

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 (Obr. 1 B).

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.



Obr. 1 Výsledky behaviorální studie hWJ-MSCs. Při testování hybnosti dolních končetin při volném pohybu (BBB) dosáhly signifikantně lepšího výsledku skupiny se zvýšeným a opakovaným podáním transplantovaných buněk (A). Zlepšená pokročilejší koordinace končetin nutná pro úspěšné přejítí kladiny se projevila u skupiny s nejvyšším podáním (3x1,5 M) (B).

4.1.1.2. 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.

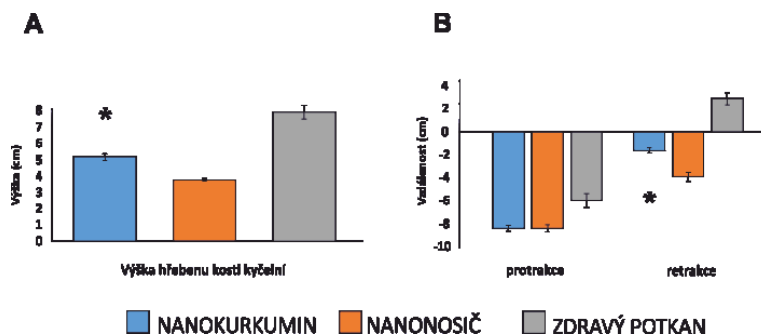
Chůze po kladině

V průběhu trvání experimentu došlo k mírnému zlepšení koordinace pohybů u obou skupin, avšak bez signifikantního rozdílu při statistickém testování.

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

MotoRater

V průběhu experimentu byly zaznamenány jasné změny pohybu dolních končetin mezi zdravými potkany a potkany s míšňí 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; $p=0,072$) (Obr. 2 A, B). 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.



Obr. 2 Pokročilé mapování pohybu potkana 9. týden po SCI pomocí přístroje MotoRater odhalilo signifikantně lepší nosnost vlastního těla při vyšším postavení hřebenu kosti kyčelní (A) a fyziologičtější biomechaniku při retrakčním pohybu packy (B) u skupiny léčené nanokurkuminem.

4.1.2. Histologická a imunohistochemická analýza

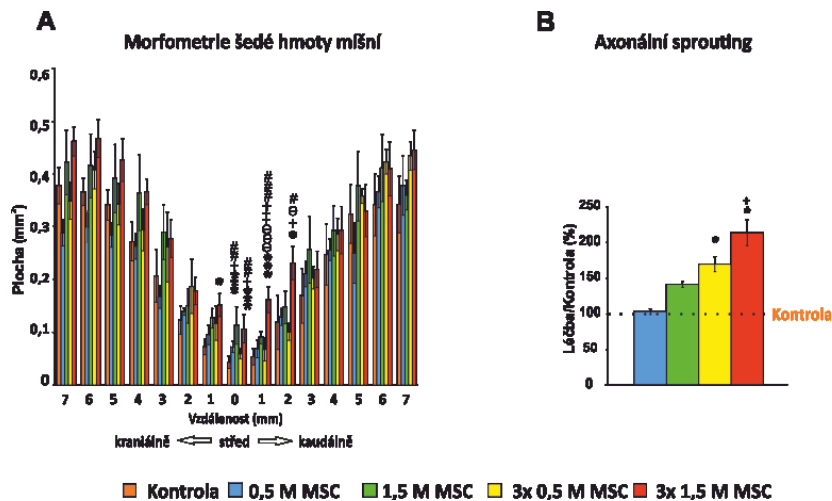
4.1.2.1. hWJ-MSCs

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

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 i počet reaktivních protoplazmatických astrocytů.

Efekt léčby na počet nově větvičích 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 opakovaním dávky se zvyšoval rozdíl jednotlivých skupin při porovnání s kontrolní skupinou (1,5 M - 140 ± 4 %, $3 \times 0,5$ M - 168 ± 10 %). Nejvýznamnější efekt pak měla podání ve skupině $3 \times 1,5$ M, kdy byl celkový počet nově vypučených axonů více než dvojnásobný v porovnání s kontrolní skupinou ($3 \times 1,5$ M - 212 ± 18 %) (Obr. 3 B).



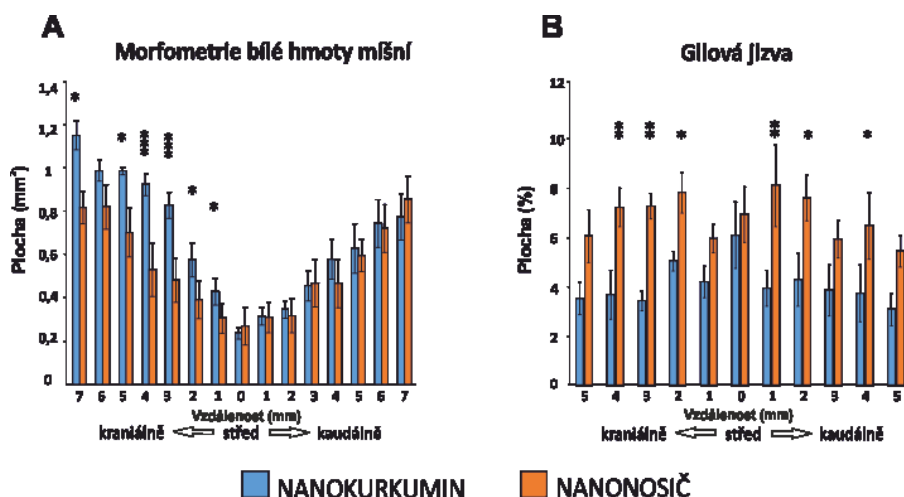
Obr. 3 Pozitivní účinek vyššího podávání hWJ-MSCs byl potvrzen signifikantně zvýšeným zachováním šedé hmoty míšní kolem středu léze (A) a gradientně narůstajícím axonálním sproutingem (B).

4.1.2.2. Nanokurkumin

Celková plocha šedé hmoty míšní byla lehce větší ve všech zkoumaných řezech míchou, avšak nedosáhla signifikantního rozdílu mezi jednotlivými skupinami. Morfometrie bílé hmoty míšní prokázala signifikantně více zachovalé tkáně v kranálních úsecích od centra léze u skupiny léčené nanokurkuminem (Obr. 4 A).

Skupina léčená pomocí nanokurkuminu měla v porovnání s kontrolní skupinou signifikantně menší zónu gliové jizvy jak kranálně, tak kaudálně od středu léze (Obr. 4 B). Počet protoplazmatických astrocytů byl v obou skupinách velmi podobný, pouze ve středu léze byl signifikantní nárůst v kontrolní skupině oproti skupině léčené nanokurkuminem.

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



Obr. 4 Signifikantně vyšší zachování bílé hmoty míšní kranálně od centra léze (A) a povšechně menší rozsah gliové jizvy (B) byl prokázán u skupiny léčené nanokurkuminem při srovnání s kontrolní skupinou.

4.1.3. qPCR

4.1.3.1. *hWJ-MSCs*

Geny M1 (*Irf5*, *Cd86*) 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 (*Mrc1*, *Cd163*) 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. Exprese apoptotického genu *Casp3* byla snížena u skupin 0,5 M a 3x1,5 M a zůstala přibližně stejná v obou sledovaných časových intervalech.

4.1.3.2. *Nanokurkumin*

V 9. týdnu po míšní lézi byla analyzována pomocí qPCR genová exprese vybraných genů. Výsledky odhalily trend snížené exprese hlavně u genů *Mrc1* a *Casp3* ve skupině léčené nanokurkuminem, avšak podle statistického testování nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl.

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 snížena exprese IL-11 a IL-1 β .

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.

4.2. Klinické hodnocení stabilizace ve skupinách MIS a OPEN

Celkově bylo zavedeno 632 pedikulárních šroubů. Z tohoto počtu pak 430 otevřenou technikou a 202 pomocí mini-invazivní perkutánní techniky.

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 %).

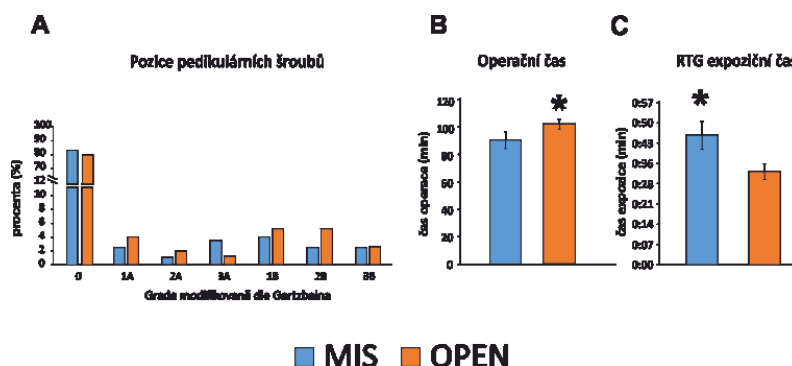
Skupina MIS zahrnovala celkem 84,2 % šroubů zavedených bezchybně - tedy hodnocených jako stupeň 0. Malpozičně zavedených šroubů bylo celkem 32 (15,8 %). Stejně jako v přechodí skupině byl nejčastějším typem malpozice stupeň 1B (4,0 %), z dalších typů pak stupeň 3A (3,5 %), stupně 1A, 2B, 3B (shodně 2,5 %) a stupeň 2A (1,0 %). 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 ($p=0,134$). V ostatních parametrech kyfotizace se jednotlivé skupiny od sebe taktéž signifikantně nelišily.

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

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

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.



Obr. 5 Při analýze pozic zavedených pedikulárních šroubů byly odhaleny pouze minimální nesignifikantní rozdíly v počtu malpozic (A). Naopak signifikantní změny mezi oběma skupinami byly nalezeny při srovnání celkového operačního času (B) a RTG expozičního času (C).

5. Diskuze

7.1 hWJ-MSCs

Role mezenchymálních kmenových buněk (MSCs) při ovlivňování nepříznivého vývoje po míšním poranění spočívá především v parakrinní sekreci, kterou MSCs podporují revaskularizaci, modulují zánětlivou odpověď (10) a produkují různé druhy růstových faktorů a cytokinů (11), čímž pomáhají redukovat oxidativní stres způsobující apoptózu buněk (12).

MSCs získané z Whartonova rosolu mají ve srovnání s ostatními MSCs nespornou výhodu v neinvazivním způsobu získávání, vyšším proliferativním potenciálu s nízkou senescencí při pasážování a nižší imunogenicitě vzhledem ke sníženým hodnotám MHC-I a úplné absenci MHC-II (13-15, 41).

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 allogenních kmenových buněk v páteřním kanálu v rozmezí několika dnů až dvou týdnů (42-44) byla vyslovena hypotéza, že opakovaným podáváním lze prodloužit trofický a imunomodulační parakrinní efekt hWJ-MSCs.

Výsledky funkčních testů hybnosti dolních končetin odhalily parciální závislost na celkovém počtu podaných buněk, kdy v testu BBB dosáhly všechny skupiny kromě 0,5 M podobných, signifikantně lepších výsledků, avšak chůze po kladině odhalila 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 2 M a 5 M na kilogram ve studii od autorů Pal et al. (45).

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 (46). Při morfometrii míšní hmoty byla šedá i bílá hmota 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 zachovalé míšní tkáně a v dlouhodobějším horizontu by měla zvířata z těchto skupin vyšší šance rehabilitace nervových funkcí. Naše výsledky napovídají, že k nastartování neuroprotektivního efektu vedoucího k funkčnímu zlepšení je zapotřebí určité minimální množství buněk, které v našem případě znamenalo dávku 1,5 M.

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) (45, 47-56).

7.2 Nanokurkumin

Kurkumin je přírodním extraktem s širokou škálou neuroprotektivních účinků. Naneštěstí je však využití nanokurkuminu limitováno jeho rychlým metabolismem, špatnou rozpustností ve vodných roztocích a rychlým systémovým vylučováním z organismu (57, 58). Inkorporace kurkuminu do nanonosiče dramaticky zvyšuje jeho biodostupnost, kdy dosahuje vyšších plasmatických koncentrací (59, 60). Při léčbě SCI se využívá jeho imunomodulačních účinků se snížením prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-8 a COX-2a proregeneračního působení (6, 61-63).

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 tlapky 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 nano-nosiče (6). Zachování míšní hmoty kraniálně od místa léze spolu s prokázaným nižším rozsahem gliové jizvy a vyšší mírou axonálního sproutingu přispívá k tvorbě nových synapsí s možností vytváření nových funkčních drah k přemostění přerušené kortikospinální dráhy (64).

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.

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 (65-68). 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 (69). Zvýšené hladiny IL-12 byly také pozorovány v našich předchozích studiích s využitím kurkuminu a indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPS-NPs) (6, 44).

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 míšní 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.

7.3 Klasická versus mini-invazivní technika chirurgické stabilizace

Volba typu léčby zlomenin obratlů hrudně-bederní oblasti se odvíjí od typu zlomeniny, přítomnosti neurologického deficitu, komorbidit, věku a celkového stavu pacienta.

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.

Mini-invazivní technika zcela jednoznačně není vhodnou technikou pro všechny typy zlomenin. Mini-invazivní perkutánní technika je nejčastěji zvažována u pacientů indikovaných k chirurgické terapii s frakturami typu A1, A2, A3 a A4 dle AOS a těch, kteří mají vypočítané TLICS (Thoracolumbar Injury Classification and Severity) skóre <5 (35).

K detailní analýze postavení pedikulárního šroubu byla zvolena modifikovaná škála dle Gertzbeina (70). Za vyhovující postavení bylo považováno postavení grade 0, 1A, 1B a 2B, které nese uspokojivé biomechanické vlastnosti celé konstrukce. 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 - 70 % (71), 85 % (70), 97 % (72, 73). Tento rozptyl je pravděpodobně dán ne zcela jasnou definicí samotné malpozice šroubu - za malpozici bývá někdy považováno pouze umístění typu grade 3. 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 (74).

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 (74-77)

Vzhledem k minimální časové náročnosti operačního přístupu u mini-invazivní techniky je operace ve většině případů kratší (72, 73, 75), což potvrdily i naše výsledky. Naopak vzhledem k absenci přímého vizuálního vjemu při cílení šroubu není překvapením vyšší peroperační využití RTG záření - opět v souladu s literaturou (35, 78-80).

6. 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 (3x1,5M) 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 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 pacientů.

7. Použitá literatura

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. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain research bulletin*. 1999;49(6):377-91.
5. Zai LJ, Wrathall JR. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia*. 2005;50(3):247-57.
6. 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).
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.

19. 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.
20. Bonfanti R, Musumeci T, Russo C, Pellitteri R. The protective effect of curcumin in Olfactory Ensheathing Cells exposed to hypoxia. *European journal of pharmacology*. 2017;796:62-8.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(6):807-18.
26. Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology*. 2007;595:453-70.
27. 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.
28. 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.
29. Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, Sitterberg J, Bakowsky U, Ravi Kumar MN. Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharmaceutical research*. 2006;23(1):184-95.
30. Italia JL, Bhatt DK, Bhardwaj V, Tikoo K, Kumar MN. PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2007;119(2):197-206.
31. 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.
32. 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.
33. Kim KT, Lee SH, Suk KS, Bae SC. The quantitative analysis of tissue injury markers after mini-open lumbar fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(6):712-6.
34. 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.
35. 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.
36. Assaker R. Minimal access spinal technologies: state-of-the-art, indications, and techniques. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2004;71(6):459-69.
37. 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.
38. 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.
 39. 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.
 40. Metz GA, Whishaw IQ. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2009(28).
 41. 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.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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. *Cytherapy*. 2010;12(6):792-806.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. 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.
 50. 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.
 51. 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.
 52. 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.
 53. 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.
 54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Metzler M, Pfeiffer E, Schulz SI, Dempe JS. Curcumin uptake and metabolism. *BioFactors* (Oxford, England). 2013;39(1):14-20.
59. 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.
60. 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).
61. 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.
62. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(1):49-59.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Gertzbein SD, Robbins SE. Accuracy of pedicular screw placement in vivo. *Spine* (Phila Pa 1976). 1990;15(1):11-4.
71. 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.
72. 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.

73. 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.
74. Sun XY, Zhang XN, Hai Y. Percutaneous versus traditional and paraspinal 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. Wanek T, Adamus M, Novák V, Homola M. Porovnání peroperační radiační expozice při otevřené a miniinvazivní transpedikulární fixaci hrudní a bederní páteře. *Cesk Slov Neurol N*. 2013;2013(76/109(5)):608-13.
79. 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.
80. 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.

8. Přehled publikační činnosti autora

8.1. Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

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). **IF 4,183**

Krupa P, Svobodova B, Dubisova J, Kubinova S, Jendelova P, Machova Urdzikova L. Nano-formulated curcumin (Lipodisq) modulates the local inflammatory response, reduces glial scar and preserves the white matter after spinal cord injury in rats. *Neuropharmacology*. 2019;155:54-64. **IF 4,367**

Krůpa P, Bartoš M, Česák T, Málek V, Hosszú T. A comparison of mini-invasive percutaneous versus classic open pedicle screw fixation of thoracolumbar fractures - retrospective analysis. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2018, 81/114(6), 678-685. **IF 0,588**

Skarkova V, Krupova M, Vitovcova B, Skarka A, Kasparova P, Krupa P, et al. The Evaluation of Glioblastoma Cell Dissociation and Its Influence on Its Behavior. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18). **IF 4,183**

8.2. ostatní práce v impaktovaném časopise

Koci Z, Boran T, Krupa P, Kubinova S. The Current State of Advanced Therapy Medicinal Products in the Czech Republic. *Human gene therapy Clinical development*. 2018;29(3):132-47. **IF 2,778**

Stejskal V, Šteiner I, Hornychová H, Krůpa P, Kanta M. Moyamoya disease associated with fibromuscular dysplasia of intrapulmonary bronchial arteries - a case report

- **V 2. kole recenzního řízení v *Journal of Cardiovascular Pathology* IF 1,765**

8.3. Ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

Krupa P, Rehak S, Diaz-Garcia D, Filip S. Nanotechnology - New Trends in the Treatment of Brain Tumours. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2014, 57(4), 142-150.

Válková M, Kašparová P, Adamkov J, Krůpa P. Jaká je Vaše diagnóza? Dysplastický cerebelární gangliogliom, *Cesk Patol*. 2018 Fall;63(4):195,201

8.4. Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních

Přednášky

Experimental treatment of induced spinal cord injury by mesenchymal stem cells derived from human wharton jelly

- Název akce: 12th Postgraduate Medical Students Conference
- Termín a místo konání: 24.-26.října 2016
- Autoři: Petr Krůpa, Irena Vackova, Jiri Ruzicka, Kristyna Zaviskova, Jana Dubisova, Zuzana Koci, Karolina Turnovcova, Lucia Machova Urdzikova, Sarka Kubinova, Svatopluk Rehak, Pavla Jendelova

Experimental Treatment of the Spinal Cord Injury by Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Wharton's Jelly (WJ-MSJ)

- Název akce: 13th INTERNATIONAL MEDICAL POSTGRADUATE CONFERENCE Hradec Králové
- Termín a místo konání: 24.-25. listopadu 2016
- Autoři: Petr Krůpa, Irena Vackova, Jiri Ruzicka, Kristyna Zaviskova, Jana Dubisova, Zuzana Koci, Karolina Turnovcova, Lucia Machova Urdzikova, Sarka Kubinova, Svatopluk Rehak, Pavla Jendelova

Petrova cena, přednáška laureáta - Experimentální léčba míšního poranění s využitím lidských mezenchymálních kmenových buněk

- Název akce: Postgraduální kurz v neurochirurgii
- Termín a místo konání: 10.-12. dubna 2019, Hradec Králové
- Autoři: Petr Krůpa, Irena Vackova, Jiri Ruzicka, Kristyna Zaviskova, Jana Dubisova, Zuzana Koci, Karolina Turnovcova, Lucia Machova Urdzikova, Sarka Kubinova, Svatopluk Rehak, Pavla Jendelova

Experimentální léčba glioblastomu multiforme termoablací za použití superparamagnetických nanočástic nesoucích doxorubicin

- Název akce: XXIII. VĚDECKÁ KONFERENCE LFHK a FNHK
- Termín a místo konání: 23. ledna 2019
- Autoři: Petr Krůpa, Veronika Skarková

Intrakraniální komplikace způsobené antikoagulací

- Název akce: IV. Mezioborové sympozium - Bolesti zad
- Termín a místo konání: Lázně Bělohrad 21.-22. září 2017
- Autoři: Petr Krůpa

Abscesy krční páteře

- Název akce: II. Mezioborové sympozium - problematika krční páteře
- Termín a místo konání: Lázně Bělohrad 10.-11. září 2015
- Autoři: Petr Krůpa

Degenerativní postižení bederní páteře – možnosti dekompresivních výkonů

- Název akce: Konference Lázně Velichovky 1897
- Termín a místo konání: Lázně Velichovky, 13. října 2016
- Autoři: Petr Krůpa, Tomáš Hosszú, Václav Málek

Desmoplastický gangliogliom - kazuistika a přehled literatury

- Název akce: Brněnské neurochirurgické dny
- Termín a místo konání: Velké Bílovice 19.-20.11.2015
- Autoři: Petr Krůpa, Michael Bartoš

Plakátová sdělení

Comparison of Human MSCs from Bone Marrow, Adipose Tissue and Umbilical Cord Tissue and their Use in Pre-Clinical Studies

- Název akce: 2017 PDA Europe Conference on Advanced Therapy Medical Products
- Termín a místo konání: Valencie, Španělsko 26.-29. května 2017
- Autoři: Irena Vacková, Zuzana Kočí, Petr Krůpa, Kristýna Závíšková, Karolína Turnovcová, Lucie Wolfová, Jana Dubišová, Šárka Kubinová

The effect of hWJ-MSCs in spinal cord injury treatment is dose-dependent and can be facilitated by repeated application

- Název akce: 11. konference České společnosti pro neurovědy
- Termín a místo konání: Fyziologický ústav Akademie věd v Praze - Krči, 28.–29. listopadu 2017
- Autoři: Petr Krůpa, Jiří Růžička, Lucie Machová-Urdzíková, Pavla Jendelová

8.5. Kapitoly v knize

10. kapitola v e-knize “Top 10 Contributions on Molecular Biology”

ISBN: 978-93-88170-11-6, Publikováno v roce 2018, Avid Science