

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Vliv modifikace extracelulární matrix na změnu struktury a  
regeneraci nervové tkáně**

**Regeneration and structural changes of the nerve tissue after the  
extracellular matrix modification.**

**Jana Vallová**

Praha, 2022

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Neurovědy na Ústavu experimentální medicíny AVČR, v.v.i, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč; Česká republika

Školitel: MUDr. Lucia Machová Urdzíková, Ph.D.; Ústav experimentální medicíny AVČR, v.v.i, Oddělení regenerace nervové tkáně; Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč, Česká republika

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Neurovědy dne ..... v ..... od .....  
hod. .... Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:  
*prof. MUDr. Jan Laczó, Ph.D., Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5*

Děkan fakulty: *prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.*

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

## Obsah

Abstrakt .....	5
Abstract.....	6
1. Úvod do problematiky.....	7
1.1. Extracelulární matrix.....	7
1.1.1. Složení extracelulární matrix.....	8
1.2. Perineuronální síť.....	8
1.2.1. Perineuronální síť a paměť.....	10
1.3. ECM využívaná jako lešení pro opravu poškozené CNS.....	11
2. Hypotézy a cíle disertační práce.....	12
2.1. Stanovené hypotézy.....	13
2.2. Dílčí cíle práce.....	13
3. Materiály a metody.....	14
3.1. Experimentální zvířata.....	14
3.2. Sledování účinků 4-MU na myším modelu.....	14
3.2.1. Behaviorální testy.....	14
3.2.2. Extrakce a kvantifikace glykosaminoglykanu (GAG).....	15
3.2.3. Imunohistochemická analýza PNNs.....	15
3.2.4. Analýza genové exprese.....	15
3.2.5. Histopatologické hodnocení.....	15
3.3. Decelularizace a příprava ECM; ECM/G hydrogelů z pupečníku.....	16
3.3.1. <i>In vitro</i> charakterizace ECM.....	16
3.3.2. Injekce hydrogelů do potkaního modelu kortikální fototrombotické léze.....	16
4. Výsledky a diskuse.....	17
4.1. Modifikace ECM blokad syntézy kyseliny hyaluronové.....	17
4.2. 4-MU zlepšilo zachování paměti v behaviorálním testování.....	17
4.2.1. Podávání 4-MU zredukovalo množství PNN v oblasti hipokampu.....	19
4.3. Použití ECM vytvořené z lidských pupečnicků ve fototrombotické lézi a její stabilizace.....	21
4.3.1. Příprava UC-ECM z lidských pupečnicků.....	22
4.3.2. Potvrzení buněčné proliferace a podpora neuronového růstu <i>in vitro</i> a biokompatibility <i>in vivo</i> na modelu fototrombotické léze.....	23
4.3.3. Ověření biokompatibility ECM a ECM/G <i>in vivo</i> na modelu fototrombotické léze.....	26

5.	Závěr.....	28
6.	Souhrn .....	31
7.	Summary .....	32
8.	Literatura .....	33
9.	Původní práce, které jsou podkladem disertační práce .....	39
10.	Publikace autorky, které nemají vztah k disertační práci.....	40

# Vliv modifikace extracelulární matrix na změnu struktury a regeneraci nervové tkáně

## Abstrakt

Extracelulární matrix (ECM) je nebuněčná 3D struktura, která se nachází ve všech typech tkání a podílí se nejen na tvorbě struktury a fyzikální podpory tkání, ale aktivně vstupuje do biologických dějů a homeostázy. Modifikace ECM může přispět k změnám plasticity nervové tkáně. Proto je v naší studii použit 4-Methylumbelliferone (4-MU) který narušil strukturu perineuronálních sítí, obklopující některé typy neuronů, které jsou zodpovědné za tvorbu paměťových stop. Myši byly po dobu 6 měsíců krmena krmivem s příměsí 4-MU (6,7mg/g/den), což zlepšilo jejich paměťové schopnosti, testované v testu spontánní rekognice, bez výraznějšího negativního vlivu na ledviny, játra či klouby. V další části naší studie byl vytvořen biomimetický hydrogel pomocí decelularizace extracelulární matrix derivované z fetální lidské pupečnickové tkáně. Vzhledem k nízké stabilitě vytvořené UC-ECM a její rychlé degradaci byla struktura stabilizována kovalentní genipinovou vazbou (ECM/G). Stabilizace při použití 1mM genipinu zvýšila biologickou stabilitu materiálu. UC-ECM tak jako ECM/G neprokazoval toxicitu v testech *in vitro*, kdy nebyla negativně ovlivněna proliferace mezenchymálních kmenových buněk, axonální pučení nebo růst a diferenciacie nervových kmenových buněk. Biokompatibilita obou materiálů byla *in vivo* ověřovaná pomocí aplikace materiálu do intrakortikální fototrombotické potkaní léze, kde byla pozorována gelace a infiltrace léze a hydrogelu hostitelskými buňkami po 1 a 14 dnech od aplikace. Závěrem se dá poukázat, že ECM je důležitá struktura nervové tkáně, která má jak vliv na správnou fyziologickou funkci, neuromodulaci a mimo jiného na proces učení, tak také ovlivňuje reparační procesy po zranění nervové tkáně.

## Klíčová slova

4-Methylumbelliferone, extracelulární matrix, hydrogel, kolagen, kyselina hyaluronová, neuroplasticita, paměť, perineuronální síť, pupečník

## **Regeneration and structural changes of the nerve tissue after the extracellular matrix modification.**

### **Abstract**

ECM modification may contribute to changes in nerve tissue plasticity. Therefore, 4-methylubulliferone is used in our study, which disrupted the structure of the perineuronal networks surrounding some types of neurons responsible for the formation of memory traces. Mice were fed a 4-MU diet (6.7 mg / g / day) for 6 months, which improved their memory skills in a spontaneous recognition test without a significant adverse effect on the kidneys, liver, or joints. In the next part of the study, an extracellular matrix (UC-ECM) was derived from fetal human umbilical cord tissue also generated as biomimetic hydrogel. Due to the generated UC-ECM's low stability and rapid degradation, the structure was stabilized by covalent genipin bonding. Stabilization with 1 mM genipine increased the biological stability of the material. UC-ECM as well as ECM/G didn't show toxicity *in vitro* in mesenchymal stem cell proliferation; axonal budding or neural stem cell growth and differentiation were not adversely affected. The biocompatibility of both materials was verified *in vivo* by applying the material to an intracortical photothrombotic rat lesion, where gelation and infiltration of the lesion and hydrogel by host cells were observed 1 and 14 days after application. In conclusion, ECM is an essential structure of nervous tissue that affects both proper physiological function, neuromodulation, and among other things, the learning process. Also, it affects repair processes in nerve tissue injury.

### **Keywords**

4-Methylumbelliferone, collagen, extracellular matrix, hyaluronic acid, hydrogel, memory, neuroplasticity, perineuronal nets, umbilical cord

## **1. Úvod do problematiky**

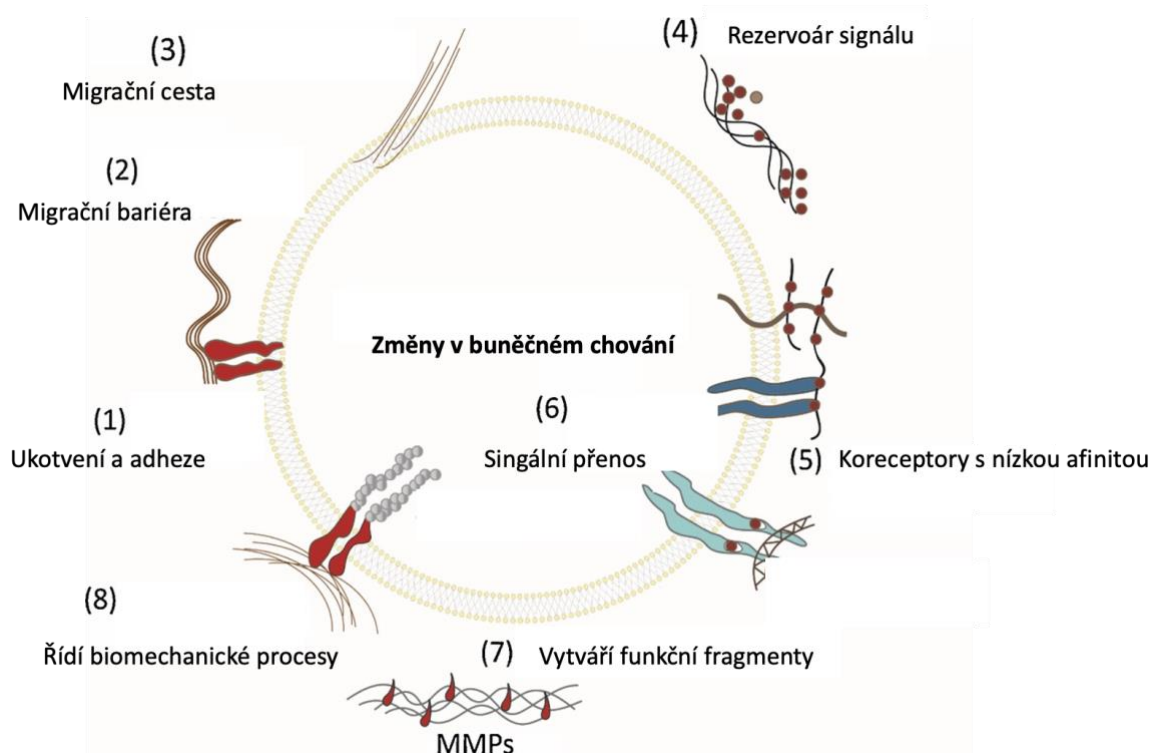
Základní strukturní a funkční jednotkou CNS jsou neurony, což jsou buňky specializované na příjem, vedení a zpracovávání informací. Mají širokou škálu tvarů a velikostí, které se liší v závislosti na jejich funkci. Gliové buňky jsou další buněčnou součástí CNS. Dělí se na buňky, které mají neuroektodermální původ, což jsou makroglie a buňky mezodermálního původu, mikroglie, které migrují do CNS z krevního řečiště. Extracelulární prostor (ECS-*extracellular space*) tvoří přibližně 15-20% objemu CNS. Je důležitou komunikační cestou mezi neurony a gliovými buňkami. Kromě iontů a jiných anorganických molekul obsahuje makromolekuly, syntetizované v neuronech a gliových buňkách a jsou označovány jako extracelulární matrix (ECM). Ta je tvořena hlavně glykoproteiny, proteoglykany, glykosaminoglykany a jinými makromolekulami. Iontové prostředí ECM není stálé, závisí na neuronové aktivitě a obsahuje difundující neuroaktivní látky, které se vážou na mimosynaptických vysoce afinitních vazebných místech neuronů, axonů a gliových buněk (difuzní přenos). Některé molekuly ECM vytvářejí struktury, které obklopují neurony, na které jsou vázány ve formě perineuronálních sítí.

### **1.1.Extracelulární matrix**

Extracelulární matrix (ECM) je komplexní nebuněčná struktura, nacházející se ve všech typech tkání a orgánů, kde netvoří jenom základní fyzikální podpůrnou strukturu pro buňky, ale rovněž iniciuje klíčové biochemické a biomechanické podněty, které jsou nutné pro morfogenezi, diferenciaci, a pro homeostázy tkání. Důležitost ECM je názorně ilustrována širokým spektrem syndromů a poruch, které vyplývají z genetických abnormalit v proteinech ECM a které mohou mít méně závažné až závažné zdravotní důsledky (Järveläinen et al. 2009).

### 1.1.1. Složení extracelulární matrix

ECM se skládá ze dvou hlavních tříd makromolekul: proteoglykanů (PG) a skleroproteinů (Jarvelainen a kol., 2009; Schaefer a Schaefer, 2010). Řada makromolekul, které tvoří ECM mohou být řazena do čtyř kategorií: kolageny, glykosaminoglykany (GAGs), nekolágenové glykoproteíny a elastin.



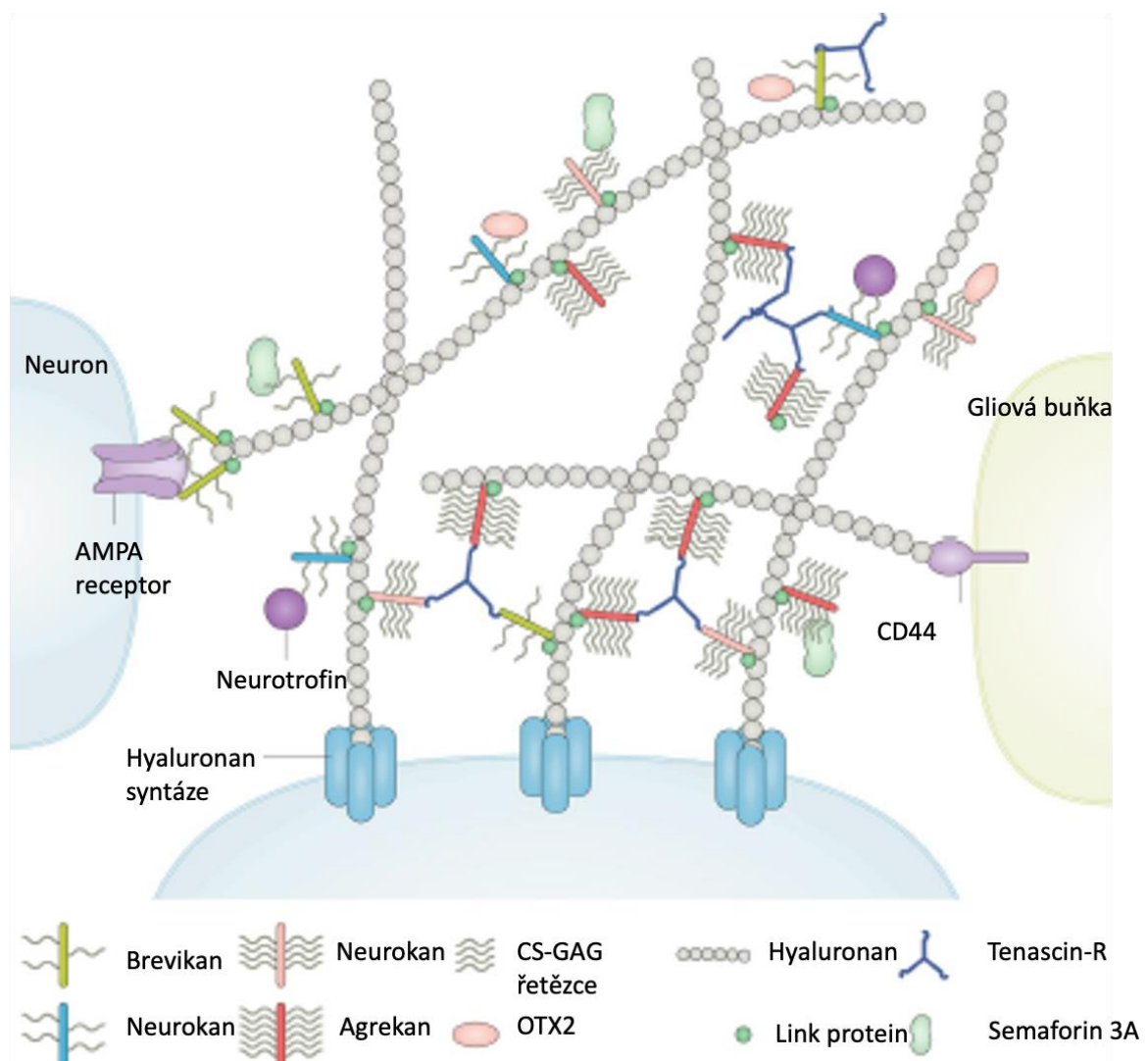
**Obr. 1** Funkce ECM (1) Ukotvení a adheze (2) Migrační bariéra (3) Migrační cesta (4) Rezervoár signálu (5) Koreceptory s nízkou afinitou (6) Přenos signálu (7) Vytváří funkční fragmenty (8) Řídí biomechanické procesy. (M. Su et al. 2021)

### 1.2. Perineuronální síť

ECM může formovat jako difúzní tak i kondenzovanou formu sítě, těsně obklopující buňky a hraje důležitou roli ve vývoji neuronů, plasticitě a patofyziologii. (Miyata and Kitagawa 2017). Nejčastější formou kondenzované ECM v centrálním nervovém systému (CNS) jsou perineuronální síť (PNN), které obklopují tělo a



proximální dendrity různých neuronálních subpopulací. PNN jsou struktury pericelulární kondenzované extracelulární matrix (ECM), které obklopují soma a proximální a střední dendrity neuronů, často se rozšiřují tak, že zahrnují počáteční segment axonu. Synapse, které narážejí na neurony v těchto oblastech, jsou obklopeny a zabudovány do PNN (Blosa et al. 2013; Vo et al. 2013). PNN v podstatě sestává z hlavního řetězce složeného z glykosaminoglykanu (GAG) hyaluronanu, na který jsou vázány CSPG. Matrix je stabilizována vazebnými proteiny a tenascin-R doplňuje strukturu (Kwok, Foscari, and Fawcett 2015; Oohashi et al. 2015). Složení PNN je poněkud proměnlivé; nicméně mechanismus, kterým se tvoří nejběžnější typy PNN, je obecně dobře znám.



**Obr. 2** Klíčové komponenty tvořící PNN (*Fawcett, Oohashi, and Pizzorusso 2019*)

Manipulace s PNN může mít vliv na synapse, plasticitu, paměť, chování a psychiatrické stavy (Sorg et al. 2016). Efekt PNN je většinou zprostředkován pomocí jejich CSPG. Pouze 2 % celkových CSPG v nervovém systému se nacházejí v PNN, zatímco zbývajících 98 % je přítomno v difúzní matrix (Deepa et al. 2006). Obecně platí, že proteoglykany (včetně CSPG) uplatňují své účinky buď přímým působením na receptory, nebo častěji přitahováním a lokalizací efektorových molekul na místa, kde mohou interagovat s lokálními receptory nebo působit jako součást tripartitního receptoru-ligand-GAG komplexu. Vazebné vlastnosti a interakce řetězců CS-GAG jsou určeny motivy náboje, které jsou produktem jejich vzoru sulfatace (Gama et al. 2006; Mikami, Yasunaga, and Kitagawa 2009; Mikami and Kitagawa 2013; Sugahara and Mikami 2007). Mobilita těchto membránových proteinů je omezena přítomností molekul ECM a štěpení nebo odstranění specifických složek PNN může ovlivnit krátkodobou synaptickou plasticitu a funkci excitačních spojení na interneurony PV+ (Favuzzi et al., 2017; Frischknecht et al., 2009). Obecně se ukázalo, že PNN jsou zodpovědné za synaptickou stabilizaci a shlukování receptorů, což v konečném důsledku omezuje plasticitu (Fawcett, Oohashi, and Pizzorusso 2019; Frischknecht et al. 2009; Pyka et al. 2011). Rovněž se prokázalo se, že PNN přispívají k mnoha fyziologickým mozkovým funkcím, včetně učení a paměti, a jsou zapojeny do mnoha poruch nebo patologií, jako jsou zotavení z poranění míchy, schizofrenie, neurodegenerativní onemocnění, epilepsie, autismus a drogová závislost (Sorg et al., 2016; Pantazopoulos a Berretta, 2016; Bozzelli et al., 2018).

### **1.2.1. Perineuronální síť a paměť**

Vzhledem k tomu, že paměť je formou plasticity, která se opírá o krátkodobé a dlouhodobé synaptické změny, je role ECM v této kognitivní funkci velice zajímavá. V paradigmatu podmiňování strachu, který závisí na aktivitě v amygdale (ve které je mnoho neuronů obklopeno PNN), injekce ChABC do amygdaly zvýšily ztrátu

paměti. Toto umožnilo vymazat paměť strachu (*fear memory*) u dospělých myší, což je efekt plasticity „neučení“, který je obvykle možný pouze u mladých myší (Gogolla et al. 2009). Podobně podávání ChABC do sluchové kůry myší inhibovalo podmiňování „sluchového strachu“ a injekce ChABC do sekundární zrakové kůry ovlivnila dlouhodobé vzpomínání na podmiňování „zrakového strachu“ (Thompson et al. 2018). Tyto studie naznačují, že schopnost odnaučit se stresovým vzpomínkám, která je obvykle spojována s mladými zvířaty, může být dospělým obnovena trávením CS-GAG, pravděpodobně prostřednictvím modifikace PNN.

### **1.3.ECM využívaná jako řešení pro opravu poškozené CNS**

Omezená reparační kapacita centrálního nervového systému (CNS) je značnou lékařskou výzvou, protože v současné době neexistuje žádná dostupná léčba, která by umožnila obnovu poškozených spojení. Biologické řešení obsahující nativní extracelulární matrix (ECM) představují struktury velmi podobné strukturám neporaněné hostitelské tkáně s mnohými výhodami, jako je komplexní přírodní složení, trojrozměrná struktura, retence růstových faktorů a bioaktivní vlastnosti, včetně stimulace angiogeneze a migrace endogenních progenitorových buněk nebo modulace imunitní reakce. (Crapo, Gilbert, and Badylak 2011). Tyto jedinečné vlastnosti řešení ECM zajišťují funkční remodelaci postižené oblasti, což je na rozdíl od tvorby zjizvené tkáně, která obvykle probíhá při standardním hojení (Badylak 2002) Věk dárčovské tkáně je důležitým parametrem, který způsobuje významné rozdíly mezi vlastnostmi ECM získané ze stejného zdroje. Ukázalo se, že s věkem narůstá zesíťování ECM v důsledku neenzymatické glykace proteinů (Semba, Nicklett, and Ferrucci 2010) a ukládání tukové tkáně a fibrózy, zatímco biologické materiály pocházející z mladších zvířat jsou spojeny s konstruktivnější tkání vhodnou pro dané místo. (Sicari et al. 2012; Tottey et al. 2011). V tomto kontextu představuje lidský pupečník (UC- *umbilical cord*) vhodný zdroj neonatální tkáně, který je snadno dostupný v dostatečném množství bez jakýchkoli etických omezení. Za zmínku stojí, že UC se běžně používá v regenerativní medicíně pro izolaci

mezenchymálních kmenových buněk (MSC) a endoteliálních buněk a může také sloužit jako zdroj pro izolaci kyseliny hyaluronové. Protože jde o extraembryonální tkáň, odstraňuje překážky související s věkem, jako je remodelace ECM, fibróza, oxidační stres a další negativní změny (Kurtz and Oh 2012) Za účelem vytvoření injekčních hydrogelů lze ECM z různých decelularizovaných tkání enzymaticky solubilizovat do kapalné formy, která se za fyziologického pH a teploty sama sestaví do formy hydrogelu (Badylak et al. 2005; DeQuach et al. 2010; Okada et al. 2010). Dříve popsané injekční hydrogely ECM připravené decelularizací prasečího mozku (B-ECM), míchy (SC-ECM) a prasečího močového měchýře (UB-ECM) odhalily *in vitro* neurotrofické vlastnosti v prostředí po injekci do experimentálně vyvolané dutiny po mrtvici (Ghuman et al. 2016) nebo poranění míchy (Tukmachev et al. 2016) *in vivo*.

## **2. Hypotézy a cíle disertační práce**

Poslední léta výzkumu jasně ukazují, že ECM je nejenže stabilizační struktura pro nervový systém, ale aktivně se podílí i na neuromodulačních dějích, plasticitě CNS a v aktivaci i inhibici různých drah. Ovlivnění perineuronálních sítí už v minulosti prokázalo zlepšení paměťových stop a návrat schopností modulace paměti do juvenilních stádií. V této studii jsme použili inhibitor vzniku hyaluronanu (4-methylumbilliferon) podávaný perorálně a sledovali jeho vlivy na modulaci paměti.

Rovněž bylo zjištěno, že materiály a hydrogely vytvořené z ECM jsou schopné ovlivňovat regeneraci tkání, kvůli jejich biomimetičnosti, trojrozměrné struktuře a biologické aktivitě jejich molekul, které mohou aktivně působit v místě poranění podpůrně, chemotakticky a protizánětlivě. Proto jsme vyvinuly materiály derivované z lidské neonatální lidské tkáně pupečníku, jejichž vlastnosti jsme ověřovali jak *in vitro* na různých buněčných liniích, tak *in vivo* na modelu kortikální fotochemické léze.

## 2.1. Stanovené hypotézy

- Perineuronální sítě jsou struktury tvořené hlavně chondroitinsulfáty ukotvenými na kostře z hyaluronanu. Je možné pomocí perorálního podání 4-methylumbilliferonu, který je blokátor syntézy kyseliny hyaluronové, rozvolnit perineuronální sítě a tím zlepšit krátkodobou paměť? Bude mít systémové podání léčiva negativní efekt na další orgány a motoriku?
- Hydrogely vytvořené z extracelulární matrix se ukazují jako vhodné řešení při poranění tkání. Je možné vytvořit hydrogel z lidské fetální tkáně pupečníku, který by podporoval reparační procesy v hojení po poškození nervového systému?
- V minulých studiích bylo pozorováno, že hydrogel derivovaný z ECM je v místě poranění relativně rychle degradován. Je možné strukturu vytvořenou z lidského pupečníku stabilizovat pomocí genipinu a tím prodloužit dobu degradace *in vivo*?

## 2.2. Dílčí cíle práce

- Sledování efektivity rozvolnění PNN po perorálním podání 4-MU pomocí imunohistochemických a biochemických analýz mozku a míchy.
- Pomocí behaviorálního testování zjistit efektivitu 4-MU léčby na zlepšení paměti po 2/3/6 měsících léčby a zjistit, zda efekt bude přetrvávat i měsíc po vysazení léčby.
- Pomocí motorických testů zjistit vliv na motorické schopnosti myši po 6 měsíční léčbě a pomocí histochemické analýzy sledovat efekt na klouby, slezinu, játra a ledviny.

- Vytvoření extracelulární matrix z lidského pupečníku, jeho stabilizace pomocí zesíťování a ověření biokompatibility *in vitro* na mezenchymálních kmenových buňkách, DRG explantátech a spinální fetální linii.
- Ověření biokompatibility nově syntetizovaného gelu z ECM, jeho gelace a migrace makrofágů *in vivo* na potkaním modelu fototrombotické léze v intervalech 1 a 14 dní po implantaci.

### **3. Materiály a metody**

#### **3.1. Experimentální zvířata**

Studie byly prováděny na myším kmenu C57BL/6JOLA<sup>Hsd</sup>, kde bylo použito 24 myši ve věku 3 měsíců a potkaním kmenu Wistar o váze (330±30g).

Zvířata byla chována v klecích s 12h režimem světla a tmy a neomezeným přístupem k vodě a potravě. Všechny behaviorální testy byli provedeny v průběhu denní fáze cyklu.

#### **3.2. Sledování účinků 4-MU na myším modelu**

Myši byly krmeny *ad libitum* krmivem s příchutí čokolády s obsahem 4-MU 6,5mg/g/deň nebo s čokoládovým kontrolním krmivem. po dobu 6 měsíců. Část zvířat byla usmrcena přímo po 6 měsících léčby a orgány byly vypreparovány a použity pro biochemické, histologické nebo qPCR analýzy.

##### **3.2.1. Behaviorální testy**

K pozorování účinku 4-MU byly provedeny série paměťových a funkčních lokomočních testů. Test spontánní alternace (SA) testuje pozornost vůči novým

podnětům a prostorovou paměť, které jsou závislé na hipokampu a test spontánního rozpoznávání objektů (SOR) byl k určení rozpoznávací paměti myši.

Rotarod a test síly úchopu byly použity pro ověření dopadu léku na motorické funkce, pohyblivost kloubů a svalovou degeneraci.

### **3.2.2. Extrakce a kvantifikace glykosaminoglykanu (GAG)**

GAG analýzy byly provedeny na 3 zvířatech na skupinu. Purifikace GAGs byla provedena podle protokolu z (Lin et al. 2011).

### **3.2.3. Imunohistochemická analýza PNNs**

Počet WFA pozitivních (WFA+) neuronů jsme stanovily v hipokampální CA1-3. Intenzita barvení WFA byla měřena z WFA+ neuronů nacházejících se v hipokampální oblasti CA1-3. Fluorescenční snímky neuronů z hipokampální oblasti CA2/CA3 obarvených na agrekan byly 3D trasovány a byly použity k provedení podrobné analýzy morfologické struktury.

### **3.2.4. Analýza genové exprese**

Změny v genové exprese mRNA souvisejících se syntézou HA, hyaluronidázami, proteoglykany chondroitin sulfátu, tenascinem-C, synaptickým růstem a receptory pro HA, byly stanoveny pomocí kvantitativní real-time PCR (qPCR).

### **3.2.5. Histopatologické hodnocení**

Pro histopatologické hodnocení byly odebrány vzorky sleziny, jater, ledvin a chrupavky. Slezina, játra a ledviny byly obarveny na hematoxilin-eosin,

chrupavky byli obarveny Alcianovou modří. Vzorky byly poté mikroskopicky analyzovány.

### **3.3. Decelularizace a příprava ECM; ECM/G hydrogelů z pupečníku**

Pro přípravu ECM hydrogelu z lidských pupečnicků (UC-ECM) byly pupečníky získány od zdravých donošených novorozenců po spontánním porodu. Pro přípravu hydrogelů byly práškové vzorky ECM solubilizovány. Pro vytvoření zesíťovaného ECM (ECM/G) byl neutralizovaný pregel společně s genipinem v koncentraci 1mM.

#### **3.3.1. *In vitro* charakterizace ECM**

Všechny vytvořené hydrogely byly charakterizovány *in vitro* pomocí stanovení proliferace hMSC v rozličných intervalech, pomocí sledování růstu a diferenciaci neurálních kmenových buněk a pomocí kultivace explantátů gangliích dorzálních kořenů míšních na vytvořených ECM.

#### **3.3.2. Injekce hydrogelů do potkaního modelu kortikální fototrombotické léze**

Pro testování biokompatibility hydrogelů *in vivo* byla vytvořena fokální mozková fotochemická léze v motorickém kortexu u potkanů, do které byly implantovány vytvořené hydrogely. Mozkové řezy byly obarveny na buněčná jádra, na CD68 a CD206 a vimentin. Relativní počet mikroglií/makrofágů (CD68+) a (CD206+) v oblasti byl stanoven z řezů nasnímaných fluorescenčním mikroskopem. Množství ED1 pozitivních a CD206 pozitivních makrofágů bylo vztaženo k počtu všech buněčných jader obarvených na DAPI v oblasti obklopující léze.



## 4. Výsledky a diskuse

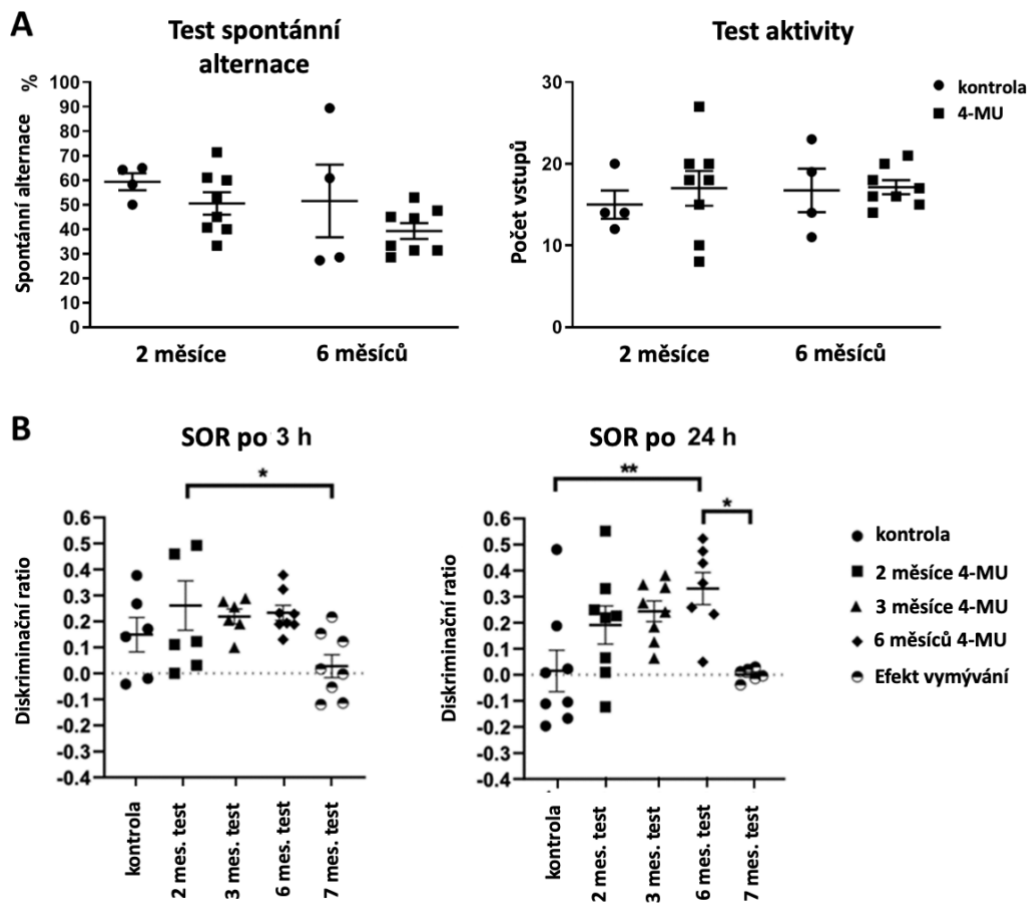
### 4.1. Modifikace ECM blokací syntézy kyseliny hyaluronové

PNN představují slibný cíl léčby pro mnohá onemocnění mozku nebo poranění CNS. Proto 4-Methylumbelliferone (4-MU), jakožto inhibitor syntézy HA, může mít široký potenciál ve funkční modulaci struktur bohatých na HA. 4-MU je lék schválený pro klinické použití. Denní perorální dávka ve výši 1200 mg/den po dobu 3 měsíců je u lidí dobře tolerována, nevykazuje závažné nežádoucí účinky a rovněž slouží jako dávka používána pro zkoumání nových indikací léčiva (Nagy et al. 2015; Trabucchi et al. 1986). (Nagy et al. 2015). V této studii jsme použili perorální dávku ~6,7 mg/g/den (5 % 4-MU v krmivu), které bylo již dříve prokázáno jako dobře tolerované a účinné terapeutikum (Hedwich F. Kuipers et al. 2016; H. F. Kuipers et al. 2016; Nagy et al. 2015).

#### 4.2. 4-MU zlepšilo zachování paměti v behaviorálním testování

Nejprve jsme zkoumali spontánní alternaci (SA) po 2. a 6. měsících léčby 4-MU (**Obr. 3A**). Tento test kvantifikuje ochotu hlodavců zkoumat nové prostředí a také krátkodobou prostorovou paměť. Mezi skupinami nebyl pozorován žádný rozdíl v celkové aktivitě nebo alternaci. Poté jsme testovali rozpoznávací paměť pomocí SOR testu po 2, 3 a 6 měsících léčby 4-MU a 1 měsíc po léčbě. Zvířata jsou testována v různých časech po vystavení objektům, čímž se měří paměťová perzistence. Signifikantní zlepšení paměti bylo zjištěno po 2 měsících léčby ve 3hodinovém intervalu ve srovnání s kontrolní skupinou a taky signifikantní zlepšení paměti po 6 měsících léčby v intervalu po 24 hodinách ve srovnání s kontrolní skupinou a skupinou, která byla měsíc po léčbě. Obdobné pozorování zlepšení paměti po 24 hodinovém intervalu bylo dříve pozorováno u knock-outovaných myší, kterým chyběl gen *Hapln1*, který kóduje spojovací protein nezbytný pro tvorbu PNN v CNS, a rovněž po enzymatické degradaci struktur PNN pomocí chondroitinázy ABC v

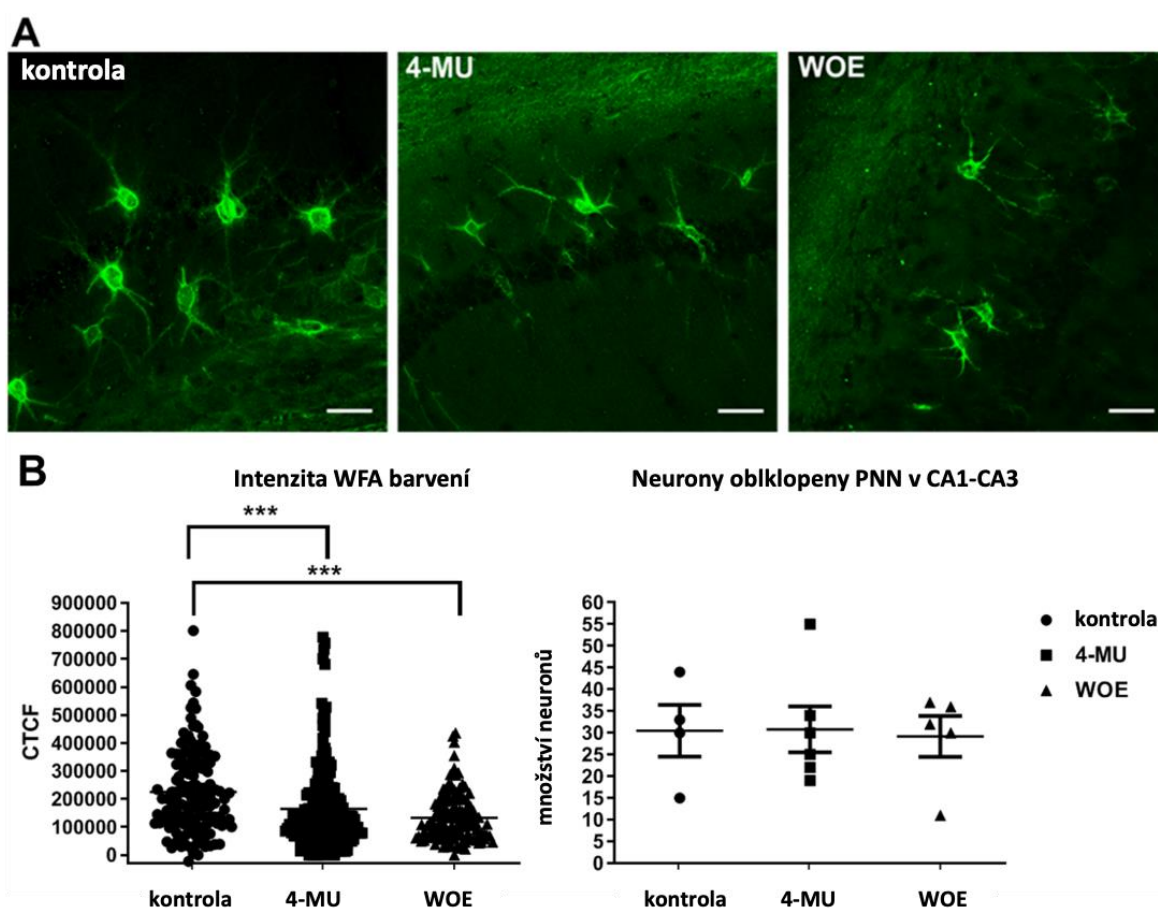
perirhinálním kortexu (Romberg et al. 2013). Naše výsledky naznačují, že perorální léčba 4-MU by mohla prostřednictvím down-regulace PNN zlepšit paměť. Zjistili jsme, že účinek 4-MU po 1 měsíci nepřetrvává a hodnoty v SOR teste se vrátili na skóre před léčbou. Výsledky tím naznačují zapojení dalšího mechanismu v řízení paměti při rozpoznávání objektů, který je nezávislý na PNN. Ukázalo se, že HA reguluje obnovu, proliferaci a diferenciaci nervových kmenových buněk v gyrus dentatus hipokampu (W. Su et al. 2017). Je možné, že přetrvávající nízká hladina HA vyvolaná prodlouženým podáváním 4-MU brání hipokampální neurogenезi, která je nezbytná pro získávání a tvorbu paměti.



**Obr. 3** Test spontánní alternace (SA) a aktivity po 2 a 6-ti měsících léčby pomocí 4-MU (**A**). Test SOR byl proveden po 2/3/6-ti měsících léčby 4-MU a poté po 1 měsíc po léčbě (vymytí) (**B**)

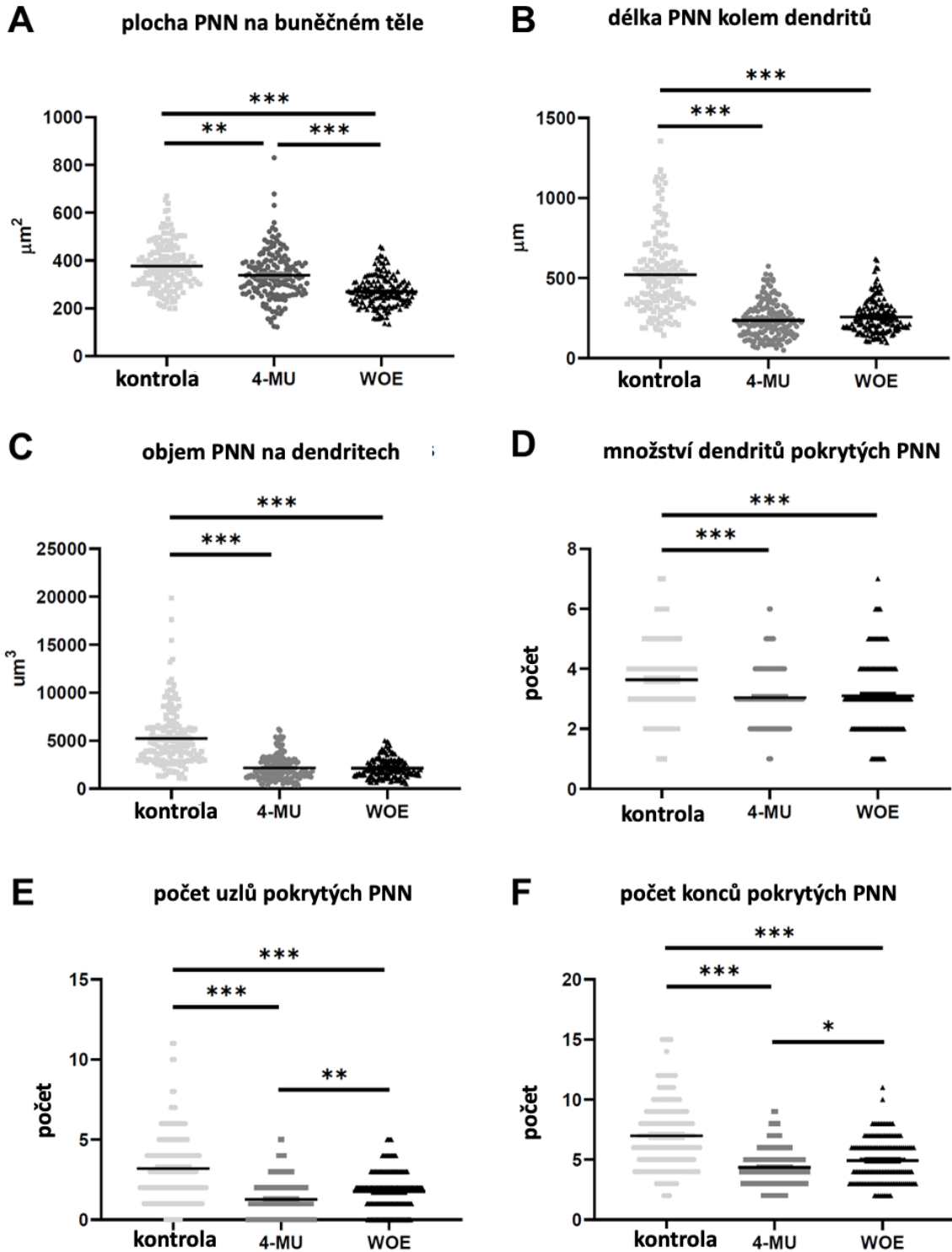
#### 4.2.1. Podávání 4-MU zredukovalo množství PNN v oblasti hipokampu

Již dříve bylo prokázáno, že rozpoznávací paměť souvisí s hipokampem a přilehlými kortikálními oblastmi včetně entorhinálního, perirhinálního a parahipokampálního kortexu, které se podílejí na normální funkci paměti (Baxter 2010). V předchozích studiích redukci PNN za pomoci chondroitinázy ABC v perirhinálním kortexu se zvýšilo dosažené skóre v SOR testu (Romberg et al. 2013; Yang et al. 2015). V naší studii jsme potvrdili snížení PNN po léčbě 4-MU v hipokampu. Pro zobrazení PNN jsme použili barvení pomocí WFA a agrekanu, čímž jsme nejprve vyhodnotili účinek 4-MU na intenzitu PNN a celkový počet neuronů nimi obklopených (**Obr. 4A**). Zatímco celkový počet WFA pozitivních neuronů zůstává podobný, dochází k významnému poklesu intenzity WFA kolem těl neuronů jak ve skupině léčené 6 měsíců 4-MU, tak ve skupině, která byla měsíc po léčbě (**Obr. 4B**)



**Obr. 4 (A)** Reprezentativní snímky imunofluorescenčního barvení WFA v CA1-CA3 oblasti hipokampu u kontrolních myší, myší léčených 4-MU po dobu 6-ti měsíců a myší 1 měsíc po léčbě

(WOE-wash out effect- efekt vymývání). **(B)** Intenzita barvení WFA a celkový počet buněk pozitivních na WFA stanovený v oblasti hipokampu (CA1-CA3). Významný pokles intenzity barvení WFA byl pozorován po 6 měsících léčby 4-MU a přetrvával i 1 měsíc po léčbě ve srovnání s kontrolní skupinou.



**Obr. 5** Morfologické parametry PNN obarvené pomocí agrekanu v hipokampální oblasti CA2/CA3 u kontrolní skupiny, skupiny s 4-MU po 6 měsících léčby a ve skupině 1 měsíc po léčbě.

Naše výsledky naznačují korelaci zlepšení rozpoznávací paměti a snížení PNN po 6 měsících léčby 4-MU. Toto zjištění také souhlasí s předchozí studií, která prokázala, že zlepšení rozpoznávací paměti souvisí s redukcí PNN v hipokampu a jeho přidružených oblastech, jako je perirhinální kortex (Romberg et al. 2013). Naše výsledky naznačují korelaci zlepšení rozpoznávací paměti a snížení PNN po 6 měsících léčby 4-MU. Toto zjištění také souhlasí s předchozí studií, která prokázala, že zlepšení rozpoznávací paměti souvisí s redukcí PNN v hipokampu a jeho přidružených oblastech, jako je perirhinální kortex (Romberg et al. 2013).

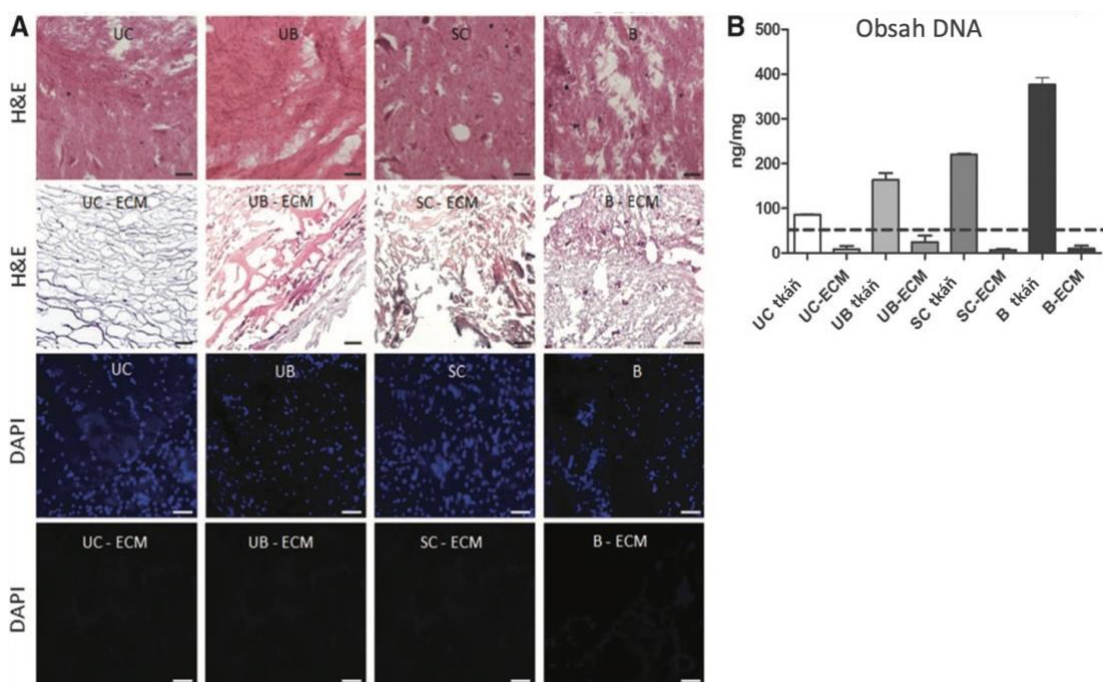
#### **4.3. Použití ECM vytvořené z lidských pupečnicků ve fototrombotické lézi a její stabilizace**

Decelularizované tkáně mohou být transformovány na lešení přírodního původu a v různých aplikacích použité v tkáňovém inženýrství (Spang and Christman 2018). Tyto biologické nosiče, složené z nativní extracelulární matrix (ECM), mají mnoho výhod, včetně trojrozměrné (3D) struktury, nízké imunogenicity a komplexního biomolekulárního složení (Kubinova 2017; Saldin et al. 2017), které slouží jako biologické lešení. Pro rekonstrukci nervových nebo jiných měkkých tkání jsou ECM ve formě hydrogelů klinicky přijatelnější, neboť tyto materiály si zachovávají svou biologickou aktivitu v kombinaci s výhodou možnosti injekční aplikace a *in situ* polymerizace. Injikovatelné ECM hydrogely z různých tkání byly už dříve použity pro léčbu poraněné míchy (Tukmachev et al. 2016), mrtvice (Freytes et al. 2008), po infarktu myokardu (Singelyn and Christman 2010), kritické ischemie končetiny (Ungerleider et al. 2016) a vývoje nové tukové tkáně (Young et al. 2011). V následujících studiích jsme připravovali ECM z prasečí a lidské tkáně. ECM z lidských pupečnicků byla posléze implantována do fototrombotické léze, kde byla

sledovaná její degradace a imunogenicita. Rovněž jsme se zaměřily na degradaci vytvořeného materiálu a jeho stabilizaci pomocí kovalentního zesíťování genipinem.

#### 4.3.1. Příprava UC-ECM z lidských pupečnicků

V této studii jsme optimalizovali protokol decelularizace, jak popsal (Medberry et al. 2013), abychom připravili injikovatelný hydrogel z lidské pupečnickové tkáně, který kombinuje výhody neonatální tkáně lidského původu se snadnou dostupností, bez jakýchkoli etických nebo regulačních opatření. UC-ECM byla úspěšně decelularizována s minimálním buněčným obsahem v skeletu Barvení H&E a DAPI potvrdilo nepřítomnost reziduálních buněčných jader.

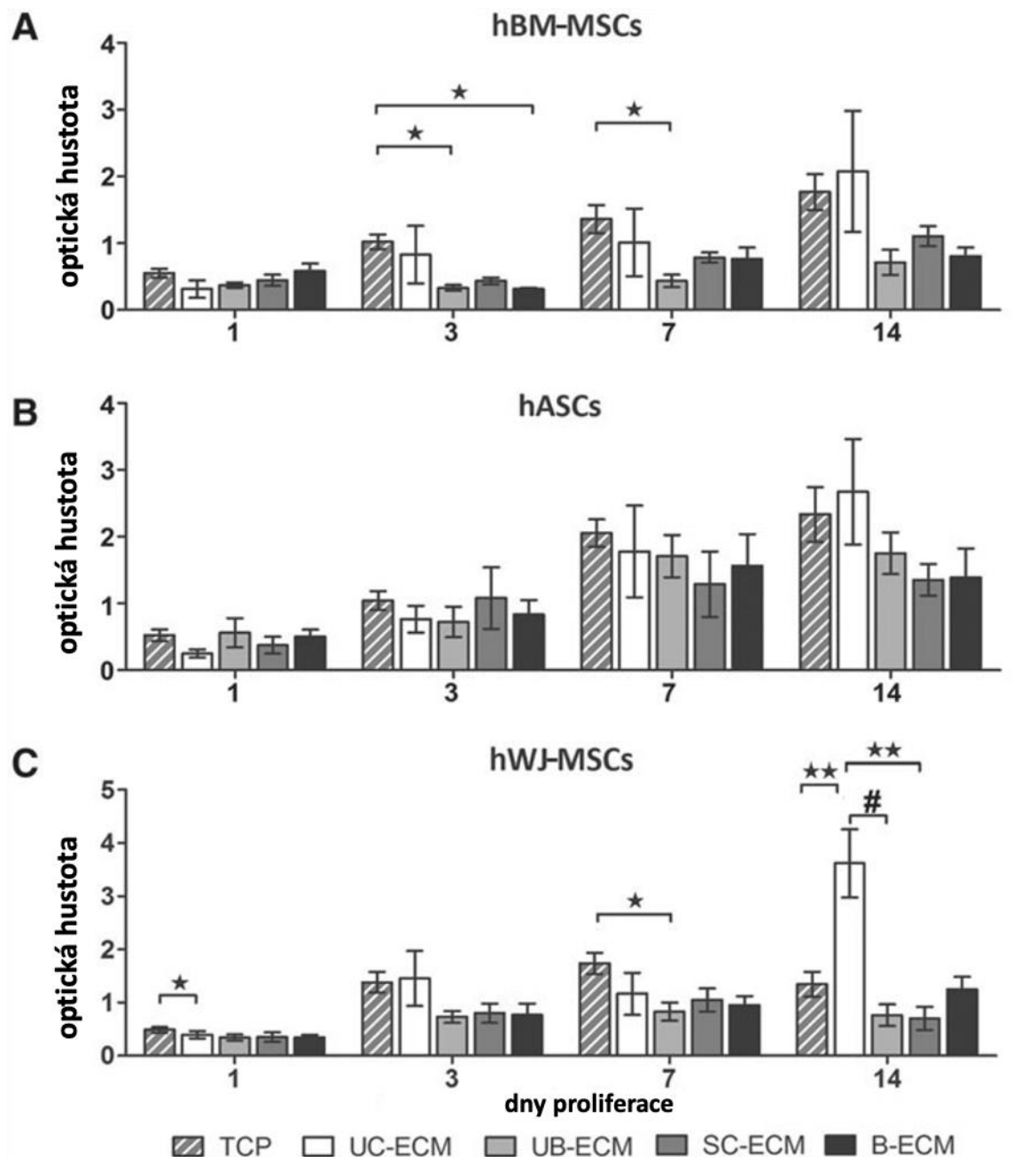


**Obr. 6 (A)** První řada: H&E barvení (zleva doprava) řezů UC, UB, míchy (SC) a mozku (B) před decelularizací. Druhá řada: H&E barvení UC-ECM, UB-ECM, SC-ECM a B-ECM po decelularizaci. Třetí řádek: DAPI barvení na DNA (zleva doprava) UC, UB, SC a B řezů tkáně před decelularizací. Čtvrtý řádek: Barvení DAPI na obsah zbytkové DNA v UC-ECM, UB-ECM, SC-ECM a B-ECM. Měřítko představuje 50  $\mu$ m. **(B)** kvantifikace dsDNA

### **4.3.2. Potvrzení buněčné proliferace a podpora neuronového růstu *in vitro* a biokompatibility *in vivo* na modelu fototrombotické léze**

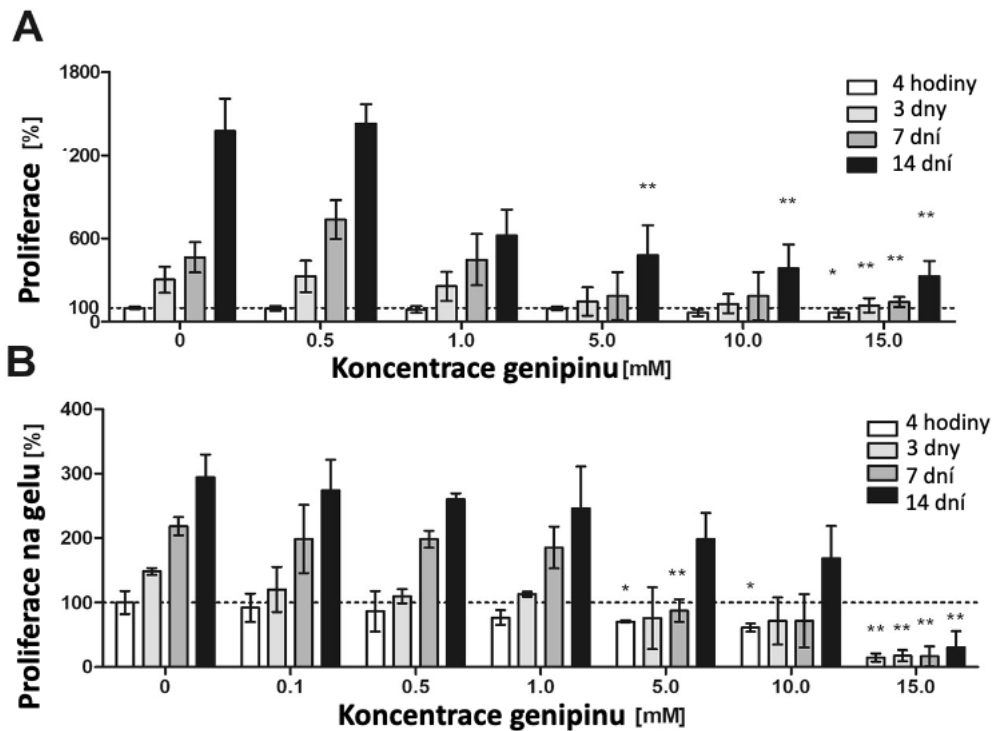
Pro zjištění kompatibility námi vytvořeného UC-ECM a zesíťovaného ECM/G jsme materiál testovaly *in vitro* ve 4 typech testů, a to proliferace a chemotaxe hMSC, podpora prorůstání neuritů za použití explantátových kultur z potkaních DRG a určení neuronové diferenciace NSC. Rovněž jsme sledovali kompatibilitu UC-ECM a ECM/G v mozkové tkáni *in vivo* pomocí aplikace do fototrombotické léze v potkaním modelu. Z některých studií vyplývá, že ECM nosič, který je odvozen z původního typu tkáně, nacházející se v místě poranění, může mít jedinečné složení molekulárních složek pro indukci konstruktivní tkáňově specifické remodelace.

Například srdeční ECM prokázalo schopnost poskytovat tkáňově specifické podněty pro růst a diferenciaci srdečních buněk (Wang and Christman 2016). Rovněž ECM ze skeletálního svalu specifického pro tkáň odhalilo lepší výsledky při léčbě kritické ischemie končetiny ve srovnání s UC-ECM (Ungerleider et al. 2016). Naproti tomu, jiné studie neprokázaly výhodu ECM odvozených z CNS oproti materiálům ECM nepocházejícím z CNS, pokud jde o jejich účinky na *in vitro* růst neuritů (Crapo et al. 2012; Leung, Crombleholme, and Keswani 2012), nebo *in vivo* neurotrofické vlastnosti při opravě poranění míchy (Tukmachev et al. 2016). Při sledování proliferace jsme v naší studii pomocí eseje WST-1 po 1/3/7 a 14-tich dnech. Vyšší proliferace buněk hWJ-MSCs byla zjištěna po 14tich dnech kultivace na UC-ECM v porovnání s kontrolní skupinou. V intervalech 1, 3 a 7 dní jsme nepozorovali signifikantní rozdíly mezi skupinami.



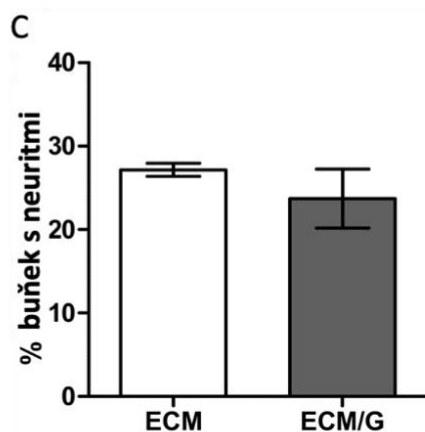
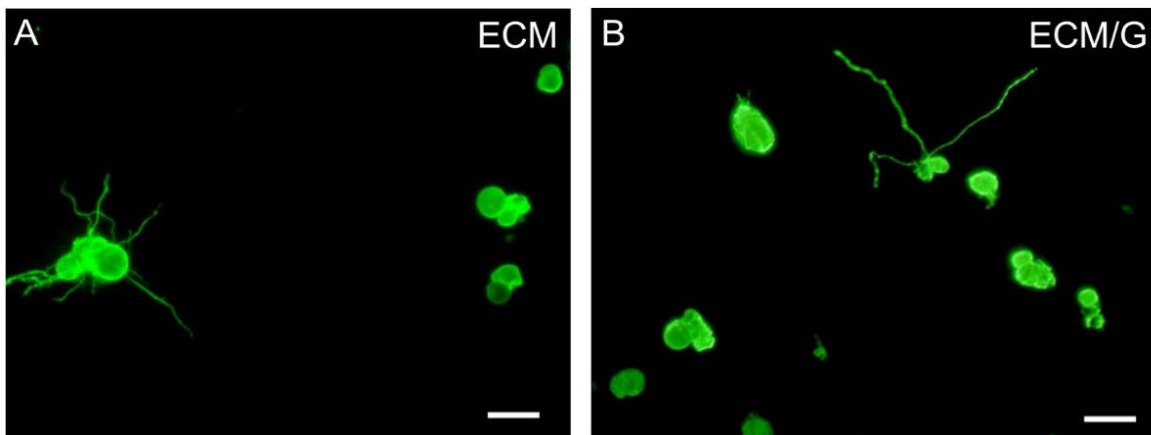
**Obr. 7 (A)** Porovnání proliferace hBM-MSC, **(B)** hASC, **(C)** a hWJ-MSC na lidské UC-ECM, prasečí UB-ECM, SC-ECM, B-ECM a kontrolní TCP na 1, 3, 7 a 14 dní s použitím činidla WST-1. Rychlost proliferace byla hodnocena na spektrofotometru a znázorněna jako optická hustota.





**Obr. 8** Proliferace MSC v rozličných koncentracích **(A)** volného genipinu a na hydrogelech ECM/G zesíťovaných různými koncentracemi genipinu **(B)**. Buněčná proliferace byla hodnocena pomocí testu Alamar Blue. Data jsou normalizována na počáteční hodnoty získané na začátku experimentu na nezesíťovaném ECM, které byly nastaveny jako 100% životaschopnost buněk (tečkovaná základní čára), (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. nezesíťovaný ECM,  $n = 6$ ).

Sledovali jsme účinek také zesíťovaného ECM/G hydrogelu s 1 mM genipinem pomocí analýzy axonálního růstu senzorických neuronů, tentokrát izolovaných z dospělých DRG.



**Obr. 9** Axonální růst disociovaných neuronů ganglií dorzálních kořenů dospělých potkanů (DRG) na hydrogelech ECM, ECM/G s koncentrací genipinu 1 mM. **(A–B)** DRG kultura na ECM hydrogelech barvených na beta-III-tubulin. **(C)** Procento buněk s neurity delšími než tělo buňky. Měřítka představuje 50  $\mu\text{m}$  ( $n = 3$ )

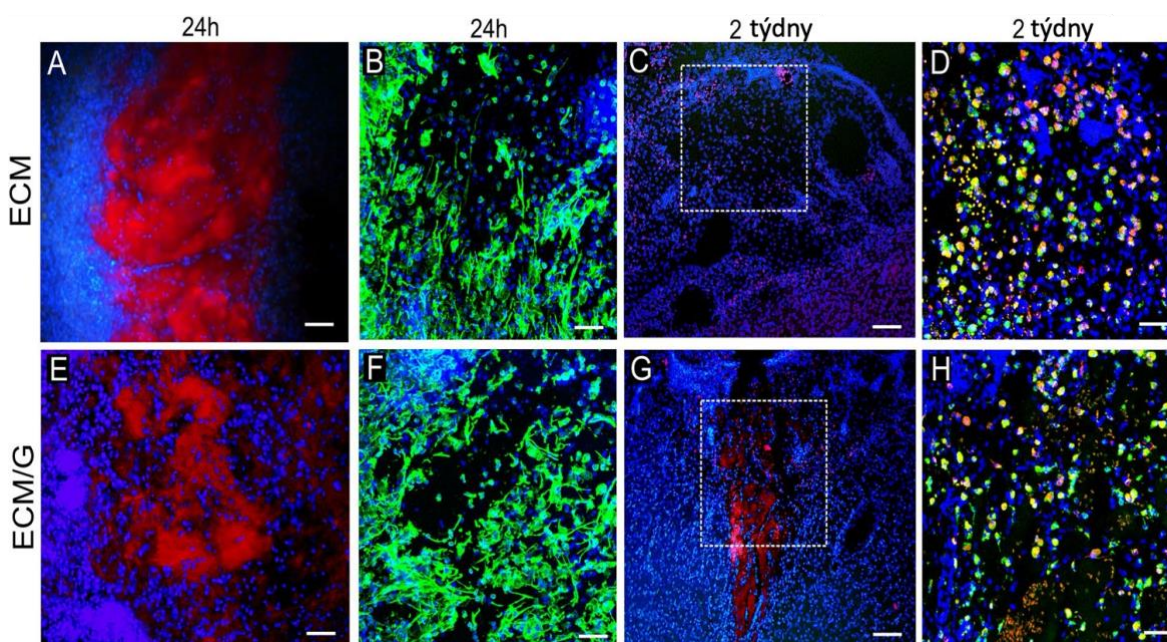
#### 4.3.3. Ověření biokompatibility ECM a ECM/G *in vivo* na modelu fototrombotické léze

Aby se prokázala *in vivo* biokompatibilita a stabilita ECM a ECM/G, i v této studii jsme po vzoru předešlé práce (Kočí et al. 2017) injikovali hydrogely *in situ* do fokální ischemické léze vytvořené v motorické kůře potkana. ECM a ECM/G vytvořili gely v místě implantace, které byly infiltrovány hostitelskými buňkami. Rovněž bylo sledováno zvýšení retence zesíťovaného hydrogelu ECM/G po dobu 2 týdnů od injekce *in situ* v porovnání s ECM bez genipinu. Po 2 týdnech byl analyzován relativní počet mikroglíí/makrofágů pozitivních na CD68 (ED1) a CD206 (ED2) v oblasti obklopující léze (**Tab .1**).

**Tab. 1** Procento ED1 a CD206 pozitivních buněk v oblasti léze po injekci ECM a ECM/G do ischemické kortikální léze. (*n* = počet zvířat).

	ECM	ECM/G
ED1 (% cell number)	33.84 ± 1.09 (n = 5)	35.56 ± 3.17 (n = 5)
CD206 (% cell number)	28.05 ± 2.97 (n = 5)	30.09 ± 1.91 (n = 5)

V této studii reakce makrofágů neodhalila žádné významné změny, které by naznačovaly zvýšenou imunogenicitu ECM/G ve srovnání s nezesíťovaným ECM. Kromě toho byla prevalence CD206+ makrofágů podobných M2 zjištěna jak ve skupinách ECM, tak ECM/G, podobně jako v našich předchozích studiích (Kočí et al. 2017; Tukmachev et al. 2016). Jak je znázorněno na **Obr. 10A,E** na barvení kolagenu, ECM i ECM/G vytvořily po 24 hodinách kompaktní hydrogel uvnitř léze a ten byl osídlen hostitelskými buňkami, jako jsou fibroblasty nebo makrofágy.



**Obr. 10** Koronální řezy mozku ilustrující gelaci a buněčnou infiltraci hydrogelů ECM (**A-D**) a ECM/G (**E-H**) *in vivo*, v intervalech (**A,B,E,F**) 1 den a (**C,D,G, H**) 2 týdny po injekci do fototrombotické ischemické léze v motorickém kortexu potkana. (**A,C,E,G**) Barvení na kolagen I (červená) a buněčná jádra (DAPI, modrá). (**B,F**) Barvení na vimentin (zelená) a DAPI (modrá). (**D,H**) Infiltrace makrofágů (ED1, zelená) do léze pomocí (**D**) nezesíťovaného ECM hydrogelu a (**H**) ECM/G 2 týdny po injekci hydrogelu do oblasti léze. Buněčná jádra byla obarvena na DAPI

(modrá). Tečkované čtverečky v **C, G** ukazují plochu zobrazovanou v **D, H**. Měřítko: (**A,E,C,G**) 100  $\mu\text{m}$ , (**B,D,F,H**) 50  $\mu\text{m}$ .

## 5. Závěr

Tato práce sleduje roli extracelulární matrix v modifikaci funkcí nervové soustavy jak pomocí inhibice syntézy hyaluronanu po systematickém podání 4 – Methylumbilliferonu, tak i možností použití ECM jako podpůrného lešení po poranění mozkové tkáně. Extracelulární matrix (ECM) je struktura vyplňující mezibuněčný prostor ve všech typech tkání. V mozku tvoří 20% obsahu a vyskytuje se jak v difuzní, tak i v kondenzované podobě. Tato síť má nejen podpůrnou a strukturální funkci, ale i aktivně zasahuje do fyziologických i patologických procesů v CNS. Je důležitou komunikační cestou mezi neurony a gliovými buňkami. Kromě iontů a jiných anorganických molekul obsahuje makromolekuly, syntetizované v neuronech a gliových buňkách. Iontové prostředí ECM není stále, závisí na neuronové aktivitě a obsahuje difundující neuroaktivní látky, které se vážou i na mimo-synaptických vysoce afinitních vazebných místech neuronů, axonů a gliových buněk. Při zkoumání vlivu systémového použití léčiva perorální dávkou 6,7mg/g/den po dobu 6 měsíců léčby a měsíc po jejím ukončení jsme pozorovaly jak v behaviorálním testování paměti, tak i pomocí imunohistologie a analýzy genové exprese, změny poukazující na snížení množství PNN sítí v mozku i míše. Behaviorální testování paměti bylo prováděno po 2/3/6 měsících a měsíc po ukončení léčby. Sice jsme nepozorovaly rozdíly v testu spontánní alternace, ani v aktivitě sledovaných jedinců, ale v testu, zaměřeném na krátkodobou paměť (SOR) jsme sledovali trend zlepšení paměti ve všech sledovaných intervalech. Zároveň byl pozorovaný signifikantní rozdíl v 24hodinovém intervalu mezi skupinou testovanou po 6 měsících a to jak vůči kontrolní skupině, tak i skupině měsíc po léčbě. Tyto výsledky naznačují, že účinek 4-MU není permanentní a časem upadá. Imunohistochemická analýza rovněž podpořila naši hypotézu možností ovlivnění PNN pomocí 4-MU. Barvení neuronů na WFA i agrekan neukazovali

snížení počtu neuronů obklopených PNN, ale intenzita barvení na WFA byla vyšší u kontrolní skupiny v porovnání se skupinou léčenou 6 měsíců, tak i skupinou 1 měsíc po léčbě. Podobné výsledky jsme pozorovali při analýze délky a plochy neuronů pokrytých PNN při barvení na agrekan. Tady jsme rovněž pozorovali významní redukci PNN u skupiny léčené 6 měsíců, tak i u skupiny měsíc po léčbě. Imunohistologické výsledky PNN po měsíci léčby ukázali, že sítě nebyly obnoveny po měsíčním intervalu po vysazení léčiva, i když jsme pozorovali behaviorální změny v paměťových testech, kdy se výsledky vrátili na úroveň kontrolní skupiny. Důvod může být ten, že PNN nejsou jediná struktura, která se projevuje na změnách chování při testování paměti a může to znamenat určitou kompenzaci jiných systémů v neuroplasticitě. Rovněž genová analýza ukazovala zajímavé výsledky, hlavně v jednom sledovaném genu a to CD44, což je receptor pro HA. Po 6 měsících léčby jsme sledovali signifikantní pokles tohoto receptoru, zatím co 1 měsíc po vysazení léčby byl tento gen signifikantně up-regulován. Toto pozorování také naznačuje, že léčba 4-MU nemá permanentní účinky a po její vysazení se receptory pro HA začínají obnovovat. Závěrem této práce jsme sledovali negativní účinky systémové léčby na motorické schopnosti myši a histologickou analýzu vybraných orgánů, a to hlavně kloubů. Důvodem bylo, že perorální léčba 4-MU, který neselektivně inhibuje HAS, když je podávána systémově, může blokovat tento enzym v tkáních, což může způsobovat různé defekty. Zaměřily jsme se hlavně na motoriku, z důvodu velkého množství HA v této struktuře. Motorické testy sice neprokázaly žádné změny po léčby, ale histologická analýza kloubů poukazovala na atrofii chrupavky. V zbylých sledovaných orgánech (slezina, játra, ledviny) jsme nepozorovaly žádné závažné změny, které by poukazovali na vysokou toxicitu dané léčby i při tak dlouhodobém užívání.

Ve druhé studii, zaměřené na ECM jsme vytvořili materiál pomocí decelularizace lidské pupečnickové tkáně. Jak bylo ukázáno v předešlých částech této práce, věkem narůstá zesíťování ECM v důsledku neenzymatické glykace proteinů (Semba,

Nicklett, and Ferrucci 2010) a ukládání tukové tkáně a fibrózy. Rovněž při použití xenotransplantátů existuje riziko vzniku imunitní odpovědi hostitele proti implantované tkáni či struktuře. Jako vhodné řešení se nabízí použití fetální tkáně z lidských pupečnicků. Tato možnost řeší oba předešlé problémy se stářím tkáně a rovněž s xenotransplantáty a je získatelná poměrně jednoduše a bez etických problémů. V prvním kroku jsme vytvořili hydrogel UC-ECM z pupečnicku, kterého vlastnosti byli porovnané se třemi hydrogely derivovanými z prasečích tkání, kterých vlastnosti byli potvrzené už v předešlých studiích. Tento hydrogel byl sledován jak *in vitro* kde bylo prokázána podpora proliferace WJ-MSC (derivované z pupečnicku), podpora prorůstání axonů a neurální kmenové buňky, které rostli na hydrogelu UC-ECM a po 7 dnech vykazovaly expresi časného neuronálního markeru NF70. V testu UC-ECM *in vivo* jsme prokázali gelaci *in situ* v místě implantace a rovněž infiltraci hostitelskýma makrofágy. Vzhledem k poznatkům z minulých studií, které ukazovali, že hydrogely derivované z ECM jsou relativně rychle degradovány, jsme se snažili najít způsob stabilizace, která by zachovala pozitivní vlastnosti ECM a zároveň degradace by byla redukována. Pro tento cíl jsme si vybrali genipin, který kovalentně síťuje vytvořenou ECM. Zjistili jsme netoxickou koncentraci stabilizátoru, co je 1mM genipin a tento hydrogel jsme opět testovali *in vitro* v porovnání s nezesíťovaným UC-ECM. Nový hydrogel (ECM/G) nepotlačoval buněčnou proliferaci MSC, prorůstání axonů ani diferenciaci NSC. Rovněž v *in vivo* aplikaci *in situ* do fototrombotické léze jsme pozorovali gelování, infiltraci hostitelskými makrofágy a existenci gelu ve vytvořené lézi ještě po 2 týdnech od implantace.

V uvedených studiích byl můj přínos jak přípravě a návrhu realizace dílčích studií, tak po realizační stránce, a to v behaviorálních analýzách, přípravách vzorků, v imunohistochemickém a histochemickém vyhodnocování dat, a mikroskopických a molekulárních analýzách.

## 6. Souhrn

ECM je nejen podpůrná fyzikální struktura nervové soustavy a jiných tkání, ale podle posledních poznatků je to aktivní systém, zapojený do celkové homeostázy a funkce tkání. Rovněž hydrogely vytvořené z extracelulární matrix jsou schopné, po jejich aplikaci do místa zranění nebo léze, modulovat odpovědi nervového systému. V nervové soustavě je možné její modifikaci na různých úrovních měnit a tím modulovat aktivitu, motilitu i imunitní odpověď organismu na různé vstupy.

V této práci jsme překázali, že rozvolnění PNN, které jsou jednou z forem ECM v CNS, pomocí inhibice syntézy hyaluronanu, mělo efekt na struktury, zodpovědné za paměť a podporovalo neuroplasticitu.

Tento systémový efekt byl prokázán jak behaviorálním testováním, tak imunohistochemickou a molekulární analýzou.

Při zkoumání motorických funkcí jsme nepozorovali rozdíly mezi léčenou a neléčenou skupinou a rovněž při analýze orgánů jsme nezaznamenali patologické změny, které by mohli být způsobeny systémovou inhibicí HA v organismu.

V další části práce jsme se snažili vytvořit novou formu hydrogelu z lidského pupečníku, který by svými fetálními vlastnostmi mohl fungovat jako lešení nebo nosič při poraněních nervového systému. Vzhledem k tomu, že samostatné hydrogely tvořené ECM mají relativně rychlou degradaci, našli jsme způsob netoxického kovalentního zesíťování pomocí 1mM genipinu.

UC-ECM i ECM/G nevykazovali negativní účinky na MSC proliferaci a axonální růst senzorických neuronů DRG *in vitro* a rovněž vykazovali stabilní gelaci *in situ* po aplikaci do fototrombotické léze *in vivo*.

Stejně tak jsme pozorovali kompaktní strukturu gelu v lézi 14 dní po aplikaci ECM/G infiltrovanou hostitelskýma makrofágy, což naznačuje, že kovalentní stabilizace byla úspěšná a podporovala protizánětlivé děje v místě léze.

## 7. Summary

ECM is not only a supporting physical structure of the nervous system and other tissues, but according to the latest findings, it is an active system involved in general homeostasis and tissue function. Also, hydrogels formed from the extracellular matrix can modulate the nervous system's responses upon their application to the site of injury or lesion.

In the nervous system, it is possible to change it at various levels and thus modulate the body's activity, motility, and immune response to various inputs.

In this work, we demonstrated that the release of PNNs, which are one of the forms of ECM in the CNS, by inhibiting hyaluronan synthesis affected the structures responsible for memory and promoted neuroplasticity.

This systemic effect has been demonstrated by both behavioral testing and immunohistochemical and molecular analysis.

We did not observe differences between the treated and untreated groups when examining motor functions, nor did we observe severe defects in organ analysis that could be caused by systemic inhibition of HA in the body.

In the next part of the work, we tried to create a new form of hydrogel from the human umbilical cord, which with its fetal properties, could act as a scaffold or carrier for injuries to the nervous system. Since the individual hydrogels formed by ECM have a relatively rapid degradation, we found a method of non-toxic covalent crosslinking using 1 mM genipine.

Both UC-ECM and ECM/G did not show adverse effects on MSC proliferation and axonal growth *in vitro* and also showed stable *in situ* gelation after application to a photothrombotic lesion *in vivo*.

We also observed a compact gel structure in the lesion 14 days after application of ECM/G infiltrated by host macrophages, suggesting that covalent stabilization was successful and promoted anti-inflammatory events at the lesion site.



## 8. Literatura

1. Badylak, Stephen F. 2002. "The Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Reconstruction." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13 (5): 377–83. <https://doi.org/10.1016/s1084952102000940>.
2. Badylak, Stephen F., David A. Vorp, Alan R. Spievack, Abby Simmons-Byrd, Joseph Hanke, Donald O. Freytes, Anil Thapa, Thomas W. Gilbert, and Alejandro Nieponice. 2005. "Esophageal Reconstruction with ECM and Muscle Tissue in a Dog Model." *The Journal of Surgical Research* 128 (1): 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.03.002>.
3. Baxter, Mark G. 2010. "'I've Seen It All before': Explaining Age-Related Impairments in Object Recognition. Theoretical Comment on Burke et al. (2010)." *Behavioral Neuroscience* 124 (5): 706–9. <https://doi.org/10.1037/a0021029>.
4. Blosa, M., M. Sonntag, G. Brückner, C. Jäger, G. Seeger, R.T. Matthews, R. Rübsamen, T. Arendt, and M. Morawski. 2013. "Unique Features of Extracellular Matrix in the Mouse Medial Nucleus of Trapezoid Body – Implications for Physiological Functions." *Neuroscience* 228 (January): 215–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.003>.
5. Crapo, Peter M., Thomas W. Gilbert, and Stephen F. Badylak. 2011. "An Overview of Tissue and Whole Organ Decellularization Processes." *Biomaterials* 32 (12): 3233–43. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>.
6. Crapo, Peter M., Christopher J. Medberry, Janet E. Reing, Stephen Tottey, Yolandi van der Merwe, Kristen E. Jones, and Stephen F. Badylak. 2012. "Biologic Scaffolds Composed of Central Nervous System Extracellular Matrix." *Biomaterials* 33 (13): 3539–47. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.044>.
7. Deepa, Sarama Sathyaseelan, Daniela Carulli, Clare Galtrey, Kate Rhodes, Junko Fukuda, Tadahisa Mikami, Kazuyuki Sugahara, and James W. Fawcett. 2006. "Composition of Perineuronal Net Extracellular Matrix in Rat Brain: A Different Disaccharide Composition for the Net-Associated Proteoglycans." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (26): 17789–800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600544200>.
8. DeQuach, Jessica A., Valeria Mezzano, Amar Miglani, Stephan Lange, Gordon M. Keller, Farah Sheikh, and Karen L. Christman. 2010. "Simple and High Yielding Method for Preparing Tissue Specific Extracellular Matrix Coatings for Cell Culture." *PloS One* 5 (9): e13039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013039>.
9. Fawcett, James W., Toshitaka Oohashi, and Tommaso Pizzorusso. 2019. "The Roles of Perineuronal Nets and the Perinodal Extracellular Matrix in Neuronal Function." *Nature Reviews Neuroscience* 20 (8): 451–65. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0196-3>.

10. Freytes, Donald O., Jeffrey Martin, Sachin S. Velankar, Annie S. Lee, and Stephen F. Badylak. 2008. "Preparation and Rheological Characterization of a Gel Form of the Porcine Urinary Bladder Matrix." *Biomaterials* 29 (11): 1630–37. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.014>.
11. Frischknecht, Renato, Martin Heine, David Perrais, Constanze I Seidenbecher, Daniel Choquet, and Eckart D Gundelfinger. 2009. "Brain Extracellular Matrix Affects AMPA Receptor Lateral Mobility and Short-Term Synaptic Plasticity." *Nature Neuroscience* 12 (7): 897–904. <https://doi.org/10.1038/nn.2338>.
12. Gama, Cristal I., Sarah E. Tully, Naoki Sotogaku, Peter M. Clark, Manish Rawat, Nagarajan Vaidehi, William A. Goddard, Akinori Nishi, and Linda C. Hsieh-Wilson. 2006. "Sulfation Patterns of Glycosaminoglycans Encode Molecular Recognition and Activity." *Nature Chemical Biology* 2 (9): 467–73. <https://doi.org/10.1038/nchembio810>.
13. Ghuman, Harmanvir, Andre R. Massensini, Julia Donnelly, Sung-Min Kim, Christopher J. Medberry, Stephen F. Badylak, and Michel Modo. 2016. "ECM Hydrogel for the Treatment of Stroke: Characterization of the Host Cell Infiltrate." *Biomaterials* 91 (June): 166–81. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.014>.
14. Gogolla, Nadine, Pico Caroni, Andreas Lüthi, and Cyril Herry. 2009. "Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure." *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945): 1258–61. <https://doi.org/10.1126/science.1174146>.
15. Järveläinen, Hannu, Annele Sainio, Markku Koulu, Thomas N. Wight, and Risto Penttinen. 2009. "Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy." *Pharmacological Reviews* 61 (2): 198–223. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001289>.
16. Kočí, Zuzana, Karel Výborný, Jana Dubišová, Irena Vacková, Aleš Jäger, Oleg Lunov, Klára Jiráková, and Šárka Kubinová. 2017. "Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 23 (6): 333–45. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0089>.
17. Kubinova, Sarka. 2017. "Extracellular Matrix Based Biomaterials for Central Nervous System Tissue Repair: The Benefits and Drawbacks." *Neural Regeneration Research* 12 (9): 1430. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.215249>.
18. Kuipers, H. F., N. Nagy, S. M. Ruppert, V. G. Sunkari, P. L. Marshall, J. A. Gebe, H. D. Ishak, et al. 2016. "The Pharmacokinetics and Dosing of Oral 4-Methylumbelliferone for Inhibition of Hyaluronan Synthesis in Mice." *Clinical and Experimental Immunology* 185 (3): 372–81. <https://doi.org/10.1111/cei.12815>.
19. Kuipers, Hedwich F., Mary Rieck, Irina Gurevich, Nadine Nagy, Manish J. Butte, Robert S. Negrin, Thomas N. Wight, Lawrence Steinman, and Paul L. Bollyky. 2016. "Hyaluronan Synthesis Is Necessary for Autoreactive T-Cell

- Trafficking, Activation, and Th1 Polarization.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (5): 1339–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525086113>.
20. Kurtz, Andreas, and Su-Jun Oh. 2012. “Age Related Changes of the Extracellular Matrix and Stem Cell Maintenance.” *Preventive Medicine* 54 Suppl (May): S50-56. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2012.01.003>.
21. Kwok, Jessica C. F., Simona Foscari, and James W. Fawcett. 2015. “Perineuronal Nets: A Special Structure in the Central Nervous System Extracellular Matrix.” In *Extracellular Matrix*, edited by Jennie B. Leach and Elizabeth M. Powell, 93:23–32. *Neuromethods*. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2083-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2083-9_3).
22. Leung, Alice, Timothy M. Crombleholme, and Sundeep G. Keswani. 2012. “Fetal Wound Healing: Implications for Minimal Scar Formation.” *Current Opinion in Pediatrics* 24 (3): 371–78. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283535790>.
23. Lin, Rachel, Thomas W. Rosahl, Paul J. Whiting, James W. Fawcett, and Jessica C. F. Kwok. 2011. “6-Sulphated Chondroitins Have a Positive Influence on Axonal Regeneration.” Edited by David I. Finkelstein. *PLoS ONE* 6 (7): e21499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021499>.
24. Medberry, Christopher J., Peter M. Crapo, Bernard F. Siu, Christopher A. Carruthers, Matthew T. Wolf, Shailesh P. Nagarkar, Vineet Agrawal, et al. 2013. “Hydrogels Derived from Central Nervous System Extracellular Matrix.” *Biomaterials* 34 (4): 1033–40. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.062>.
25. Mikami, Tadahisa, and Hiroshi Kitagawa. 2013. “Biosynthesis and Function of Chondroitin Sulfate.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1830 (10): 4719–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.006>.
26. Mikami, Tadahisa, Daiki Yasunaga, and Hiroshi Kitagawa. 2009. “Contactin-1 Is a Functional Receptor for Neuroregulatory Chondroitin Sulfate-E.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (7): 4494–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809227200>.
27. Miyata, Shinji, and Hiroshi Kitagawa. 2017. “Formation and Remodeling of the Brain Extracellular Matrix in Neural Plasticity: Roles of Chondroitin Sulfate and Hyaluronan.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861 (10): 2420–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.06.010>.
28. Nagy, Nadine, Hedwich F. Kuipers, Adam R. Frymoyer, Heather D. Ishak, Jennifer B. Bollyky, Thomas N. Wight, and Paul L. Bollyky. 2015. “4-Methylumbelliferone Treatment and Hyaluronan Inhibition as a Therapeutic Strategy in Inflammation, Autoimmunity, and Cancer.” *Frontiers in Immunology* 6 (March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00123>.
29. Okada, Masaho, Thomas R. Payne, Hideki Oshima, Nobuo Momoi, Kimimasa Tobita, and Johnny Huard. 2010. “Differential Efficacy of Gels Derived from Small Intestinal Submucosa as an Injectable Biomaterial for

- Myocardial Infarct Repair.” *Biomaterials* 31 (30): 7678–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.056>.
30. Oohashi, Toshitaka, Midori Edamatsu, Yoko Bekku, and Daniela Carulli. 2015. “The Hyaluronan and Proteoglycan Link Proteins: Organizers of the Brain Extracellular Matrix and Key Molecules for Neuronal Function and Plasticity.” *Experimental Neurology* 274 (Pt B): 134–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.010>.
  31. Pyka, Martin, Christian Wetzel, Ainhara Aguado, Maren Geissler, Hanns Hatt, and Andreas Faissner. 2011. “Chondroitin Sulfate Proteoglycans Regulate Astrocyte-Dependent Synaptogenesis and Modulate Synaptic Activity in Primary Embryonic Hippocampal Neurons: Proteoglycans Regulate Synaptogenesis.” *European Journal of Neuroscience* 33 (12): 2187–2202. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07690.x>.
  32. Romberg, Carola, Sujeong Yang, Riccardo Melani, Melissa R. Andrews, Alexa E. Horner, Maria G. Spillantini, Timothy J. Bussey, James W. Fawcett, Tommaso Pizzorusso, and Lisa M. Saksida. 2013. “Depletion of Perineuronal Nets Enhances Recognition Memory and Long-Term Depression in the Perirhinal Cortex.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (16): 7057–65.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013>.
  33. Saldin, Lindsey T., Madeline C. Cramer, Sachin S. Velankar, Lisa J. White, and Stephen F. Badylak. 2017. “Extracellular Matrix Hydrogels from Decellularized Tissues: Structure and Function.” *Acta Biomaterialia* 49 (February): 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068>.
  34. Semba, Richard D., Emily J. Nicklett, and Luigi Ferrucci. 2010. “Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype?” *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 65 (9): 963–75.  
<https://doi.org/10.1093/gerona/glq074>.
  35. Sicari, Brian M., Scott A. Johnson, Bernard F. Siu, Peter M. Crapo, Kerry A. Daly, Hongbin Jiang, Christopher J. Medberry, Stephen Tottey, Neill J. Turner, and Stephen F. Badylak. 2012. “The Effect of Source Animal Age upon the in Vivo Remodeling Characteristics of an Extracellular Matrix Scaffold.” *Biomaterials* 33 (22): 5524–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.017>.
  36. Singelyn, Jennifer M., and Karen L. Christman. 2010. “Injectable Materials for the Treatment of Myocardial Infarction and Heart Failure: The Promise of Decellularized Matrices.” *Journal of Cardiovascular Translational Research* 3 (5): 478–86. <https://doi.org/10.1007/s12265-010-9202-x>.
  37. Sorg, Barbara A., Sabina Berretta, Jordan M. Blacktop, James W. Fawcett, Hiroshi Kitagawa, Jessica C.F. Kwok, and Marta Miquel. 2016. “Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity.” *The Journal of Neuroscience* 36 (45): 11459–68.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2351-16.2016>.

38. Spang, Martin T., and Karen L. Christman. 2018. "Extracellular Matrix Hydrogel Therapies: In Vivo Applications and Development." *Acta Biomaterialia* 68 (March): 1–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.019>.
39. Su, Min, Shahid Hussain Soomro, Jifu Jie, and Hui Fu. 2021. "Effects of the Extracellular Matrix on Myelin Development and Regeneration in the Central Nervous System." *Tissue & Cell* 69 (April): 101444.  
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101444>.
40. Su, Weiping, Scott C. Foster, Rubing Xing, Kerstin Feistel, Reid H. J. Olsen, Summer F. Acevedo, Jacob Raber, and Larry S. Sherman. 2017. "CD44 Transmembrane Receptor and Hyaluronan Regulate Adult Hippocampal Neural Stem Cell Quiescence and Differentiation." *The Journal of Biological Chemistry* 292 (11): 4434–45.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774109>.
41. Sugahara, Kazuyuki, and Tadahisa Mikami. 2007. "Chondroitin/Dermatan Sulfate in the Central Nervous System." *Current Opinion in Structural Biology* 17 (5): 536–45. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.015>.
42. Thompson, Elise Holter, Kristian Kinden Lensjø, Mattis Brønne Wigestrang, Anders Malthe-Sørensen, Torkel Hafting, and Marianne Fyhn. 2018. "Removal of Perineuronal Nets Disrupts Recall of a Remote Fear Memory." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (3): 607–12.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1713530115>.
43. Tottey, Stephen, Scott A. Johnson, Peter M. Crapo, Janet E. Reing, Li Zhang, Hongbin Jiang, Christopher J. Medberry, Brandon Reines, and Stephen F. Badylak. 2011. "The Effect of Source Animal Age upon Extracellular Matrix Scaffold Properties." *Biomaterials* 32 (1): 128–36.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.006>.
44. Trabucchi, E., C. Baratti, A. Centemero, M. Zuin, E. Rizzitelli, and R. Colombo. 1986. "Controlled Study of the Effects of Tiropramide on Biliary Dyskinesia." *Pharmatherapeutica* 4 (9): 541–50.
45. Tukmachev, Dmitry, Serhiy Forostyak, Zuzana Koci, Kristyna Zaviskova, Irena Vackova, Karel Vyborny, Ioanna Sandvig, et al. 2016. "Injectable Extracellular Matrix Hydrogels as Scaffolds for Spinal Cord Injury Repair." *Tissue Engineering. Part A* 22 (3–4): 306–17.  
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0422>.
46. Ungerleider, Jessica L., Todd D. Johnson, Melissa J. Hernandez, Dean I. Elhag, Rebecca L. Braden, Monika Dzieciatkowska, Kent G. Osborn, Kirk C. Hansen, Ehtisham Mahmud, and Karen L. Christman. 2016. "Extracellular Matrix Hydrogel Promotes Tissue Remodeling, Arteriogenesis, and Perfusion in a Rat Hindlimb Ischemia Model." *JACC. Basic to Translational Science* 1 (1–2): 32–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.01.009>.

47. Vo, Tam, Daniela Carulli, Erich M.E. Ehlert, Jessica C.F. Kwok, Gunnar Dick, Vasil Mecollari, Elizabeth B. Moloney, et al. 2013. “The Chemorepulsive Axon Guidance Protein Semaphorin3A Is a Constituent of Perineuronal Nets in the Adult Rodent Brain.” *Molecular and Cellular Neuroscience* 56 (September): 186–200.  
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.009>.
48. Wang, Raymond M., and Karen L. Christman. 2016. “Decellularized Myocardial Matrix Hydrogels: In Basic Research and Preclinical Studies.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 96 (January): 77–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.002>.
49. Yang, Sujeong, Matthias Cacquevel, Lisa M. Saksida, Timothy J. Bussey, Bernard L. Schneider, Patrick Aebischer, Riccardo Melani, Tommaso Pizzorusso, James W. Fawcett, and Maria Grazia Spillantini. 2015. “Perineuronal Net Digestion with Chondroitinase Restores Memory in Mice with Tau Pathology.” *Experimental Neurology* 265 (March): 48–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.11.013>.
50. Young, D. Adam, Dina O. Ibrahim, Diane Hu, and Karen L. Christman. 2011. “Injectable Hydrogel Scaffold from Decellularized Human Lipoaspirate.” *Acta Biomaterialia* 7 (3): 1040–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.09.035>.

## 9. Původní práce, které jsou podkladem disertační práce

Dubisova, Jana, Jana Svobodova Burianova, Lucie Svobodova, Pavol Makovicky, Noelia Martinez-Varea, Anda Cimpean, James W. Fawcett, Jessica C.F. Kwok, and Sarka Kubinova. 2022. "Oral Treatment of 4-Methylumbelliferone Reduced Perineuronal Nets and Improved Recognition Memory in Mice." *Brain Research Bulletin* 181 (April): 144–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.011>.

**(IF 4,077)**

Kočí, Zuzana, Karel Výborný, Jana Dubišová, Irena Vacková, Aleš Jäger, Oleg Lunov, Klára Jiráková, and Šárka Kubinová. 2017. "Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 23 (6): 333–45.  
<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0089>.

**(IF 3.508)**

Výborný, Karel, Jana Vallová, Zuzana Kočí, Kristýna Kekulová, Klára Jiráková, Pavla Jendelová, Jiří Hodan, and Šárka Kubinová. 2019. "Genipin and EDC Crosslinking of Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord for Neural Tissue Repair." *Scientific Reports* 9 (1): 10674.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47059-x>.

**(IF 4,011)**

## 10. Publikace autorky, které nemají vztah k disertační práci

Krupa, Petr, Barbora Svobodova, Jana Dubisova, Sarka Kubinova, Pavla Jendelova, and Lucia Machova Urdzikova. 2019. "Nano-Formulated Curcumin (Lipodisq™) Modulates the Local Inflammatory Response, Reduces Glial Scar and Preserves the White Matter after Spinal Cord Injury in Rats." *Neuropharmacology* 155 (September): 54–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.05.018>.

**(IF 4,376)**

Krupa, Petr, Irena Vackova, Jiri Ruzicka, Kristyna Zaviskova, Jana Dubisova, Zuzana Koci, Karolina Turnovcova, et al. 2018. "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* 19 (5): 1503.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19051503>.

**(IF 4,183)**

Machova Urdzikova, Lucia, Kristyna Karova, Jiri Ruzicka, Anna Kloudova, Craig Shannon, Jana Dubisova, Raj Murali, et al. 2015. "The Anti-Inflammatory Compound Curcumin Enhances Locomotor and Sensory Recovery after Spinal Cord Injury in Rats by Immunomodulation." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1): 49. <https://doi.org/10.3390/ijms17010049>.

**(IF 3,257)**

Machova Urdzikova, Lucia, Jiri Ruzicka, Kristyna Karova, Anna Kloudova, Barbora Svobodova, Anubhav Amin, Jana Dubisova, et al. 2017. "A Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Enhances Neuroregeneration after Spinal Cord Injury by Altering Levels of Inflammatory Cytokines." *Neuropharmacology* 126 (November): 213–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.006>.

**(IF 4,249)**

Ruzicka, Jiri, Lucia Machova-Urdzikova, John Gillick, Takashi Amemori, Nataliya Romanyuk, Kristyna Karova, Kristyna Zaviskova, et al. 2017. "A Comparative Study of Three Different Types of Stem Cells for Treatment of Rat Spinal Cord Injury." *Cell Transplantation* 26 (4): 585–603.  
<https://doi.org/10.3727/096368916X693671>.

**(IF 2.885)**

Ruzicka, Jiri, Lucia Machova Urdzikova, Anna Kloudova, Anubhav G. Amin, Jana Vallova, Sarka Kubinova, Meic H. Schmidt, Meena Jhanwar-Uniyal, and Pavla Jendelova. 2018. "Anti-Inflammatory Compound Curcumin and



Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury in Rats.”  
*Acta Neurobiologiae Experimentalis* 78 (4): 358–74.

**(IF 1,529)**

Ruzicka, Jiri, LuciaMachova Urdzikova, Barbora Svobodova, AnubhavG Amin, Kristyna Karova, Jana Dubisova, Kristyna Zaviskova, et al. 2018. “Does Combined Therapy of Curcumin and Epigallocatechin Gallate Have a Synergistic Neuroprotective Effect against Spinal Cord Injury?” *Neural Regeneration Research* 13 (1): 119. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.224379>.

**(IF 2,472)**

Zaviskova, Kristyna, Dmitry Tukmachev, Jana Dubisova, Irena Vackova, Ales Hejcl, Julie Bystronova, Martin Pravda, et al. 2018. “Injectable Hydroxyphenyl Derivative of Hyaluronic Acid Hydrogel Modified with RGD as Scaffold for Spinal Cord Injury Repair: Hyaluronic Acid Hydrogel for Spinal Cord Injury Repair.” *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 106 (4): 1129–40. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36311>.

**(IF 3,221)**