



**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce

**Experimentální přemostění míšního poranění pomocí
hydrogelů**

MUDr. Aleš Hejčl

Praha 2009

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav experimentální medicíny
AVČR, v.v.i.

Autor: MUDr. Aleš Hejčl

Školitel: prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.

Oponenti:
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde

.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 1. lékařské
fakulty Univerzity Karlovy v Praze

OBSAH

Souhrn	3
Summary	4
1. Úvod	5
2. Cíle práce.....	6
3. Metody	7
4. Výsledky	12
5. Diskuze	18
6. Závěry	20
7. Literatura	21
8. Přehled publikací autora.....	22

SOUHRN

Hydrogely patří mezi biomateriály užívané k rekonstrukci experimentálního poranění míchy (spinal cord injury, SCI). V modelu akutního SCI jsme implantovali hydrogely na bázi 2-hydroxyethylmetakrylátu (HEMA) a hydroxypropylmetakrylamidu (HPMA). Po 1 měsíci hydrogely přemostily posttraumatickou kavitu, dobře adherovaly k míšní tkáni a vytvořily permisivní prostředí, kam vrůstaly cévy, axony a Schwannovy buňky.

Fyzikální modifikace (např. povrchový náboj) hydrogelů mohou zlepšit přemostění akutního SCI. V hemisekci míšni jsme implantovali hydrogely na bázi HEMA s povrchovými náboji a porovnali s hydrogelem bez náboje. Hydrogely s povrchovým nábojem po 1 měsíci podpořily adhezi pojivových buněk a růst axonů do implantátu v porovnání s hydrogelem bez náboje.

Vstřebatelné hydrogely mohou přemostit míšní lézi a následně se vstřebat. V modelu akutního SCI jsme implantovali hydrogely na bázi kopolymeru HPMA a etoxyethylmetakrylátu (EOEMA), které se vstřebávaly směrem z periferie, jež byla po 1 měsíci nahrazena novou tkání, směrem do centra, tvořeného amorfní hmotou zbytku hydrogelu s minimem vrostlé tkáně.

Přemostění míšní léze můžeme zlepšit odloženou implantací hydrogelu. V transekcii míchy jsme implantovali hydrogel na bázi HEMA akutně a odloženě (po 7 dnech). Odložená implantace redukovala objem posttraumatické kavity po 3 měsících v porovnání s akutní implantací hydrogelu. Také implantace hydrogelu (akutně či odloženě) významně

redukovala objem posttraumatické kavity v porovnání s transekcí.

V modelu chronického SCI jsme po 5 týdnech implantovali hydrogely na bázi HPMA (s MSCs nebo bez MSCs) a porovnali s vývojem chronického SCI bez léčby. Hydrogely po 6 měsících dobře přemostily kavitu, byly prorostlé cévami, axony, Schwannovými buňkami a také astrocyty. Implantace hydrogelu s MSCs vedla k významné redukci atrofie míšní tkáně. Implantace hydrogelu s MSCs vyvolala významné zlepšení v motorických i senzitivních funkcích v porovnání s chronickým SCI bez terapie.

SUMMARY

Hydrogels are biomaterials used in the treatment of experimental spinal cord injury (SCI). In a model of acute SCI, we implanted hydrogels based on 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) and hydroxypropylmethacrylamide (HPMA). One month after implantation the hydrogels bridged the cavity, adhered well to the spinal cord and created permissive environment, infiltrated with blood vessels, axons and Schwann cells.

Physical modifications (e.g. surface charge) of hydrogels may improve bridging of acute SCI. We implanted hydrogels based on HEMA with a surface charge in spinal cord hemisection and compared with a hydrogel without charge. Hydrogels with surface charge improved connective tissue adhesion and growth of axons compared to a hydrogel without charge.

Biodegradable hydrogels may bridge a lesion followed by complete resorption. In a model of acute SCI we implanted hydrogels based on the copolymer of HPMA and

etoxyethylmethacrylate (EOMA) degraded from the periphery, which was substituted with new tissue after 1 month, to the center, comprising amorphous residuals of the hydrogel.

Delayed hydrogel implantation may improve bridging of spinal cord lesion. We implanted hydrogels based on HEMA acutely or in a delayed fashion (after 7 days) in spinal cord transection. Delayed implantation reduced the volume of the cavity after 3 months compared to acute implantation of hydrogel. Hydrogel implantation (acute or delayed) significantly reduced the volume of the posttraumatic cavity compared to transection.

In a model of chronic SCI we implanted hydrogels based on HEMA (alone or with MSCs) after 5 weeks and compared to chronic SCI without treatment. Hydrogels bridged the cavity after 6 months and were infiltrated with blood vessels, axons, Schwann cells and astrocytes. Hydrogels with MSCs led to a statistically significant reduction of spinal cord atrophy. The implantation of hydrogels with MSCs led to a significant improvement in both motor and sensory function compared to chronic SCI without therapy.

1. ÚVOD

Poranění míchy (SCI, spinal cord injury) je významný zdravotní i společenský problém převážně v ekonomicky rozvinutých zemích světa. V současnosti není k dispozici léčba, která by zrekonstruovala poškozenou míšní tkáň a umožnila restituci poškozených funkcí. V laboratorních podmínkách je testováno mnoho různých metod k v experimentální terapii SCI, jako je využití kmenových buněk (olfaktorická glie, mezenchymální buňky kostní dřeně,

neurální kmenové buňky, apod.), manipulace autoimunitní odpovědi, blokáda inhibičních molekul nebo užití biomateriálů k přemostění míšního poranění.

Sekundární poranění míchy má za následek rozvoj astrogliální jizvy, atrofie míchy a posttraumatické kavity. Přemostění posttraumatické kavity pomocí hydrogelů je jednou z významných oblastí experimentální léčby míšního poranění. Hydrogely jsou biokompatibilní syntetické polymery s vysokým obsahem vody (70-90%), póry o velikosti 50-90 μm a mají velký povrch. Jejich chemické i fyzikální vlastnosti jsou široce modifikovatelné. V medicíně jsou využívány, např. při výrobě kontaktních čoček.

Mezenchymální buňky kostní dřeně (MSCs, mesenchymal stem cells) jsou somatické kmenové buňky, které mají schopnost migrovat do místa postižení v závislosti na místních indukčních signálech. Implantace MSCs statisticky významně zlepšuje motoriku a čítí zadních končetin potkanů. Morfometrická analýza také prokázala statisticky významné zvýšení objemu zachovalé bílé hmoty (Urdzíkova *et al.* 2006).

V naší práci jsme implantovali hydrogely na bázi 2-hydroxyetyl-metakrylátu (HEMA) a hydroxypropylmetakrylamidu (HPMA), samotné nebo v kombinaci s MSCs, s cílem přemostit experimentální SCI. Hodnotili jsme integraci hydrogelu do místa poranění, vrůstání elementů nervové tkáně, atrofii míšní tkáně a vliv implantace hydrogelu na motorické a senzitivní funkce zadních končetin laboratorního potkana.

2. CÍLE PRÁCE

1. Přemostit akutní SCI hydrogely na bázi HEMA a HPMA. Vytvořit v akutní míšňí lézi permissivní prostředí pro regeneraci elementů nervové tkáně.
2. Zlepšit přemostění akutního míšňího poranění hydrogelem s povrchovým nábojem. Podpořit buněčnou infiltraci hydrogelu a regeneraci axonů modifikací hydrogelů povrchovými náboji (pozitivní, negativní, pozitivní i negativní, bez náboje).
3. Sledovat rozsah přemostění posttraumatické kavity v závislosti na rychlosti vstřebávání biodegradabilních hydrogelů. Na modelu akutního SCI použít vstřebatelné hydrogely na bázi kopolymeru HPMA a etoxyetylnetakrylátu (EOEMA) a nalézt vztah mezi rozsahem přemostěné posttraumatické kavity a rychlostí vstřebávání hydrogelu.
4. Odloženou implantací hydrogelu (po 7 dnech) eliminovat rozvoj posttraumatické kavity. V modelu transekce míchy zjistit, zdali odložená implantace hydrogelu na bázi HEMA zmenší objem posttraumatické kavity v porovnání s akutní implantací.
5. Přemostit chronickou míšňí lézi hydrogelem na bázi HPMA, buď s MSCs nebo bez MSCs. Implantací hydrogelu do chronického SCI vytvořit permissivní prostředí, a tak zlepšit regeneraci axonů v chronické míšňí lézi a zmírnit atrofii míchy.
6. Zlepšit motorické a senzitivní funkce zadních končetin u laboratorních potkanů s chronickým SCI implantací hydrogelu na bázi HPMA nebo hydrogelu na bázi HPMA ošetého MSCs.

3. METODY

3.1. Laboratorní zvířata, anestézie

Pokusy s poraněním míchy byly prováděny na dva měsíce starých laboratorních potkanech, samcích kmene Wistar. Všechny implantace hydrogelu byly prováděny v celkové anestézii (pentobarbital i.p., 10mg/ml v dávce 6 ml/1kg). Antibiotika jsme aplikovali bolusově před operací (ampicilin 0,3 ml i.m. nebo gentamicin 0,05 ml i.m.). Celá operace byla provedena pod operačním mikroskopem (Zeiss) při 15-25 násobném zvětšení v aseptických podmínkách.

3.2. Modely akutního poranění míchy

Hemisekce míchy

Hemisekce je chirurgické vytětí poloviny míchy obvykle v rozsahu 1-2 mm. Prováděli jsme hemisekci v úrovni Th8-9. Z lineárního kožního řezu o délce 2-3 cm ve střední čáře jsme stříhli podkožní tukovou tkáň. Dále jsme separovali paraaxiální svalstvo a skeletizovali hrudní laminy v rozsahu přibližně Th7-Th10. Provedli jsme laminektomii Th8 či Th9 se snesením processus spinosus přiléhajícího vyššího obratlového oblouku. Provedli jsme transversální durotomii od střední čáry směrem k pravému okraji míchy s následnou hemisekcí, tedy vytětím segmentu pravé poloviny míšní tkáně o délce přibližně 2mm.

Transekce míchy

Transekce míchy je kompletní přetětí míchy. Transekci jsme prováděli v úrovni Th8 a přístup byl stejný jako v případě hemisekce. Jen durotomie byla provedena oboustranně od střední čáry v délce 3 mm. Poté jsme provedli vlastní transekci, tedy kompletní přerušování míchy s vytětím tkáně v délce přibližně 2 mm.

3.3. Model chronického poranění míchy

Balónková kompresní léze

Balónková kompresní léze je model tupého poranění míchy. Vedli jsme 2-centimetrový řez kůže ve střední čáře v úrovni Th10-L1. Laminy Th10-L1 jsme skeletizovali a svaly jsme odtáhli laterálně pomocí retraktoru. Vybrusili jsme díрку do laminy Th10 pomocí zubního brousáku. Poté byl zaveden 2F Fogartyho katétr (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA) naplněný destilovanou vodou a napojen na 50 μ L Hamiltonovu stříkačku 1 cm kraniálně do dorzálního epidurálního prostoru. Balónek byl rychle naplněn vodou na objem 15 μ l pomocí mikromanipulátoru. Po 5 minutách byl balónek vypuštěn a vytažen. Svaly a kůže byly zašity ve dvou vrstvách.

3.4. Implantace hydrogelu do modelu akutního poranění míchy

Implantace hydrogelu do hemisekce

U hemisekce jsme provedli excizi míšní tkáně, čímž jsme vytvořili dutinou o velikost přibližně 2x2x2mm. Provedli jsme dostatečnou hemostázu, aby byla dutina čistá a nevytvořil se hematoma. Jeho pozdější resorpce by měla za následek vznik pseudocysty. Do posttraumatické dutiny jsme vložili hydrogel. Velikost implantátu jsme přizpůsobili velikosti a tvaru

vytvořené dutiny. Zašili jsme tvrdou plenu pokračujícím stehem (10/0, BBraun). Následně jsme pokračujícím stehem sešili svaly a kůži (4/0, Chirmax).

Akutní a odložená (po 7 dnech) implantace hydrogelu do transektce

U transektce jsme provedli kompletní vytěť míchy v délce přibližně 2 mm. Ověřili jsme si, že je mícha úplně přerušena, zvláště v laterálních částech páteřního kanálu, které mohou být hůře přehledné z běžného přístupu. Do takto vytvořené dutiny jsme implantovali hydrogel. Tato implantace se řídí podobnými pravidly jako hemisektce. Výhodou transektce je možnost odložené implantace hydrogelu, na rozdíl od hemisektce míchy, kde existuje vysoké riziko poranění míšní tkáně.

V naší studii jsme prováděli implantaci hydrogelu do transektce míchy odloženě po 7 dnech. Po znovutevření rány a protěť jizevnaté tkáně jsme odhalili sešitou tvrdou plenu. Extrahovali jsme suturu tvrdé pleny, odsáli buněčný detritus v místě transektce a odstranili jizevnatou tkáň. Do takto „očištěné“ dutiny jsme implantovali hydrogel. Velikost a tvar jsme opět upravili dle pooperační velikosti a tvaru kavity. Poté jsme znovu zašili tvrdou plenu, svalovou vrstvu a kůži.

3.5. Implantace hydrogelu do modelu chronického poranění míchy

Implantace hydrogelu do balónkové kompresní léze

Z lineárního kožního řezu o délce 3-4 cm ve střední čáře jsme prostříhli tukovou tkáň. Dále jsme separovali paraaxiální svalstvo a skeletizovali hrudní laminy v rozsahu Th7-Th11. Provedli jsme laminektomii Th7-10. Rozsah laminektomie

jsme upravili dle peroperačního nálezu poranění míchy (výška poranění, rozsah poranění). Po zajištění hemostázy jsme provedli longitudinální durotomii ve střední čáře v délce 1-3cm. Nad centrem míšního poranění jsme provedli longitudinální dorzální myelotomii. Pronikli jsme do kavity a evakuovali buněčný detritus. Do této kavity jsme implantovali přemosťující materiál. Velikost implantovaného hydrogelu jsme přizpůsobili velikosti kavity tak, abychom ji vyplnili v celém rozsahu, ale přitom nepůsobili nadměrným tlakem na okolní míšní tkáň. Tvrdá plena byla zašita pokračujícím stehem (10/0, BBraun). Následně jsme pokračujícím stehem sešili svaly a kůži (4/0, Chirmax).

3.6. Behaviorální testování

K testování motorických funkcí zadních končetin jsme použili BBB test dle Bassa, Bresnaha a Beattieho (Basso *et al.*, 1995). Škála je v rozsahu 0 až 21 bodů; 0 znamená žádný pohyb, tedy paraplegii, 21 pak úplná hybnost dolních končetin. K testování senzitivity u potkanů s poškozením míchy jsme využili tzv. plantární test (Plantar test – Ugo Basile, Comerio, USA). Tento test měří rychlost reakce (odtažení packy) na tepelný stimulus. Zvířata jsme testovali 1x týdně, každou ze zadních končetin zvlášť.

3.7. Hodnocení magnetickou rezonancí

Mícha byla vyšetřena na experimentálním přístroji MR Bruker Biospec 47/20 o síle 4,7 T s vnitřním průměrem magnetu 20 cm s gradientním systémem o síle 200mT/m a páteřní cívkou vlastní výroby. Sagitální řezy (obrazová matice 512x160 bodů, zorné pole o velikost 10x3cm, tloušťka řezu 0,5mm s

mezerou mezi řezy 0,5mm, TE = 70ms a TR = 800 ms) byly snímány běžnými RARE sekvencemi s turbo faktorem 8.

3.8. Retrográdní barvení

Provedli jsme laminektomii Th12 a Th13 v celkové inhalační anestézii (isofluran). Stereotakticky jsme injikovali 2 μ l 2% hydroxystilbamidinu (Fluorogold, Invitrogen) pomocí přístroje Nano-Injector (Stoelting Co.) do dorzálních sloupců. Po 2 dnech byla zvířata perfundována fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem (PBS) a 4% paraformaldehydem. Následně byly míchy standardně vyjmuty z páteřního kanálu a nakrájeny na 40 μ m silné řezy. Řezy byly nejprve inkubovány s protilátkou antifluorogold (1:10 000, Chemicon International) s kozí sekundární protilátkou proti králíkovi (1:1000, Vector Labs). Následně byl na řezy aplikován Vectastain ABC reagent (Vector Labs) a diaminobenzidin (Vector Labs).

3.9. Histologické zpracování

Potkany jsme perfundovali pentobarbitalem. Úsek míchy o délce 5 cm, s epicentrem poranění uprostřed, jsme vyjmulí, zmrazili a následně nařezali na kryostatu na podélné řezy o síle 16 a 40 μ m. Pro následné hodnocení integrace hydrogelu do oblasti míšní léze bylo použito standardní barvení hematoxylinem a eosinem (HE). Pro hodnocení infiltrace pórů hydrogelu buňkami pak barvení kresyl violetí (CV). Pro morfometrické měření zachovalé míšní tkáň bylo použito barvení luxolovou modří (LFB – luxol fast blue).

K identifikaci elementů infiltrujících hydrogely jsme použili imunohistochemické metody: GFAP-Cy3 (1:200, Sigma-Aldrich) barvení na astrocyty, NF 160 (1:200, Sigma-

Aldrich) barvení na axony, p75 (1:100, Chemicon International) k identifikaci Schwannových buněk, RECA-1 (1:50, Abcam) k identifikaci vrůstajících cév, ED-1 (1:100, Invitrogen) pro hodnocení makrofágů. Použili jsme následující sekundární protilátky: Alexa Fluor 488 s kozí sekundární protilátkou proti králíkovi IgG (1:200, Invitrogen), IgM Cy3 (1:100, Chemicon International), a Alexa Fluor 594 s kozí sekundární protilátkou proti králíkovi IgG (1:500, Invitrogen).

3.10. Elektronová mikroskopie

Míchy byly podélně nařezány na 60 μm silné řezy a přeneseny na sklíčka, fixovány v 2,5% glutaraldehydu v 0,1M Sørensenova pufru a barveny v 1% osmium tetraoxidu v 0,1M Sørensenově pufru po dobu 2 hodin. Histologické řezy byly následně dehydratovány v etanolu, ponořeny do propylénoxidu a zality v Eponu 812 s použitím želatinových kapslí. Po polymerizaci (72 hodin v 60 °C) bylo krytí odstraněno tekutým dusíkem. Vybrané oblasti jsme nařezali na ultratenké řezy (65 nm) ultramikrotomem (Ultracut) a hodnotili pomocí transmisního elektronového mikroskopu Philips Morgagni 268D (FEI Inc., Hillsboro, OR, USA).

3.11. Morfometrie kavit

K měření velikost kavit jsme použili řezy barvené luxolovou modří a krezyl violetí. K morfometrii jsme použili každý pátý řez a tyto snímali pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 25x. Snímky byly digitálně přeneseny do PC. V programu Image J a Neurolucida, verze 5.05.4 jsme provedli měření plochy kavit v jednotlivých řezech a násobili silou řezů. Součtem jednotlivých hodnot jsme získali celkový objem kavit.

3.12. Statistická analýza

Všechna data byla analyzována s použitím aritmetického průměru \pm standardní chyba průměru (S.E.M.) K porovnávání dvou početních celků jsme použili Studentův t-test a k porovnání tří početních celků jsme použili jednostranného testu ANOVA s post-hoc LSD testem na hladině významnosti $p < 0.05$ (označené *). Dále jsme použili neparametrický Kruskal-Wallisův test a Mann-Whitney test.

4. VÝSLEDKY

4. 1. Přemostění akutního SCI hydrogely na bázi HEMA a HPMA

Hydrogely na bázi HEMA a HPMA jsme implantovali do modelu akutního SCI (hemisekce) a histologicky hodnotili přemostění kavity a infiltraci hydrogelu elementy nervové tkáně po 4 týdnech. Hydrogely vytvořily přemostění přes kavitu a dobře adherovaly k okolní míšní tkáni. Póry hydrogelů byly infiltrovány rostlými pojivovými buňkami. Nebyla zaznamenána významná reakce proti cizímu tělesu. Do hydrogelů vrůstaly cévy, axony a Schwannovy buňky z míšních kořenů, které rostly v úzkém kontaktu s axony. Elektronová mikroskopie prokázala, že Schwannovy buňky skutečně myelinizují axony hydrogelu. Astrocyty vrůstaly do okrajových částí hydrogelů jen minimálně.

Implantované hydrogely na bázi HEMA a HPMA vytvořily přemostění akutního míšního poranění a umožnily vrůstání elementů nervového tkáně do místa poranění 4 týdny po SCI.

4. 2. Přemostění akutního SCI hydrogelem s povrchovým nábojem

Do hemisekce míchy jsme implantovali 4 typy hydrogelů s různým povrchovým nábojem (kladný, záporný, kladný i záporný, bez náboje) a hodnotili infiltraci hydrogelů elementy nervové tkáně po 4 týdnech. Hydrogely s povrchovým nábojem měly póry jen infiltrovány buňkami pojivové tkáně, zvláště pak hydrogely, které měly na povrchu pozitivní náboj (+ nebo +/-). Minimum buněk infiltrovalo hydrogely bez náboje.

Axony vrůstaly do okrajových částí hydrogelů s nábojem, ať záporným či kladným. U hydrogelů s kladným nábojem pak infiltrovaly i centrální části hydrogelu, zatímco u hydrogelů se záporným nábojem jich bylo méně. Minimum axonů vrůstalo do okrajových částí hydrogelů bez náboje. Minimální množství astrocytů vrůstalo jen do okrajových částí hydrogelů bez náboje a hydrogelů se záporným nábojem. Žádné astrocyty pak neinfiltrovaly hydrogely s kladným nábojem.

Povrchový náboj hydrogelu v porovnání s hydrogely bez náboje podpořil vrůstání axonů a buněčnou infiltraci hydrogelu u akutního míšního poranění. Hydrogely s pozitivním povrchovým nábojem podpořily vrůstání axonů do centrálních částí implantátu.

4.3. Přemostění akutního SCI vstřebatelnými hydrogely

Čtyři typy vstřebatelných hydrogelů na bázi kopolymerů HPMA a etoxyetylmetakrylátu (EOEMA) jsme implantovali do hemisekce míchy. Tyto hydrogely měly různou dobu vstřebatelnosti (7 dnů, 9 dnů, 34 dnů a nedegradabilní) na podkladě hydrolýzy. Histologické hodnocení míšní léze jsme provedli po 4 týdnech. Všechny 4 typy hydrogelů byly dobře

tolerovány, nepozorovali jsme reakci proti cizímu tělesu. Po 28 dnech od implantace nebyl žádný z hydrogelů plně degradován. Oblast kavity vyplněné implantovaným hydrogelem bylo možno rozdělit na 2 části. Periferní, vstřebaná, část hydrogelu a centrální, nevstřebaná, část hydrogelu. Velikost či poměr obou částí závisel na rychlosti vstřebatelnosti hydrogelu. Největší periferní zóna byla patrná u hydrogelu s dobou vstřebatelnosti 7 dnů, menší periferní část byla u hydrogelu s dobou vstřebatelnosti 9 dnů a minimální u hydrogelu s dobou vstřebatelnosti 34 dnů. V periferní části byly patrné makrofágy a nově tvořená tkáň řídkého vaziva obsahujícího cévy, výběžky axonů a v okrajových částech též astrocytů. Centrální část byla tvořena amorfní hmotou, kam vrůstaly jen elementy pojivové tkáně. V centrální části jsme nepozorovali výběžky axonů či astrocytů.

Vstřebatelné hydrogely přemostily posttraumatickou kavitu od periferie směrem k centru. Objem přemostěné kavity byl závislý na rychlosti degradace hydrogelů.

4.4. Akutní a odložené přemostění posttraumatické kavity hydrogelem v modelu akutního SCI

Implantovali jsme hydrogely na bázi HEMA s pozitivním povrchovým nábojem do transekce míchy v úrovni Th8 u dvou skupin laboratorních potkanů. U 1. skupiny jsme provedli implantaci ihned po provedení transekce míšní (akutní), u 2. skupiny pak 7 dnů po transekcii míchy (odložená). Třetí skupina pak byla kontrolní; u této jsme provedli transekcii bez implantace hydrogelu. Po 3 měsících jsme provedli volumetrické hodnocení posttraumatické kavity. Odložená implantace hydrogelu vedla ke statisticky významné redukci objemu posttraumatické kavity v porovnání s okamžitou

implantací hydrogelu. Implantace hydrogelu (obě skupiny) statisticky významně redukovala objem posttraumatické kavity v porovnání s kontrolní skupinou (pouhá transektce). Hydrogely byly u obou skupin (akutní i odložená implantace) infiltrovány buňkami. Celý objem hydrogelu byl prorostlý cévami, axony, i Schwannovými buňkami nikoliv však astrocyty.

Odložená implantace hydrogelu redukovala objem posttraumatické kavity v porovnání s akutní implantací hydrogelu. Implantace hydrogelu (akutní či odložená) redukovala objem posttraumatické pseudocysty v porovnání s transekcí míchy.

4.5. Vliv implantace hydrogelu a hydrogelu s MSCs na míšňí lézi a atrofii míchy v modelu chronického SCI

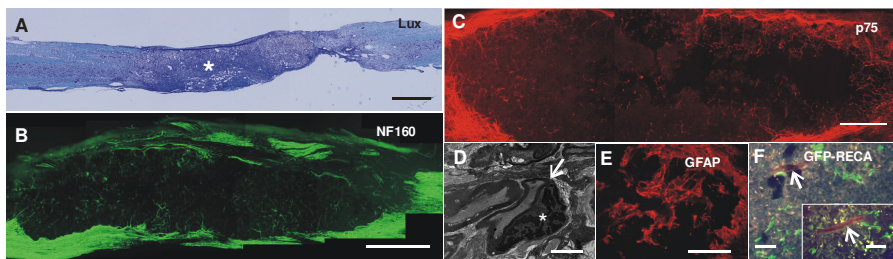
Hydrogely HPMA-RGD (hydrogel HPMA s navázanými aminokyselinami arginin-glycin-aspartát) jsme implantovali v modelu chronického SCI (balónková kompresní léze). Byly hodnoceny 3 skupiny laboratorních potkanů: 1. SCI + implantovaný hydrogel HPMA-RGD osázený MSCs 2. SCI + implantovaný hydrogel HPMA-RGD 3. SCI. Hydrogely byly implantovány 5 týdnů po provedení SCI. Po 6 měsících od SCI jsme provedli perfúzi a vyhodnotili míchy. Hodnotili jsme přemostění chronické míšňí léze hydrogelem, infiltraci elementů nervové tkáně do hydrogelu, přežití MSCs v hydrogelech a atrofii míšňí tkáně. Míšňí léze byla u kontrolní skupiny tvořená posttraumatickými cystami s minimální reziduální míšňí tkání. V okolí cyst byla

astrogliální jizva a na okrajích cyst residuální tkáň s nervovými výběžky. U obou skupin s implantovaným hydrogelem HPMA-RGD tyto vytvářely přemostění přes kavitu a byly infiltrovány cévami, axony, Schwannovými buňkami i astrocyty. Vrstávající axony v hydrogelu byly Schwannovými buňkami myelinizovány. U skupiny s implantovaným hydrogelem osázeným MSCs byly kmenové buňky patrné i 5 měsíců po implantaci. V okolí těchto buněk bylo patrné zvýšené množství vrůstajících cév.

Kontrolní míchy byly 6 měsíců po SCI atrofické v porovnání s oběma skupinami s implantovaným hydrogelem. Při morfometrické analýze míšní tkáně jsme zjistili, že implantace hydrogelu osázeného MSCs vedla ke statisticky významné redukci míšní atrofie kaudálně a kranálně od centra poškození.

Implantovaný hydrogel HPMA-RGD si bez MSCs přemostil chronické míšní poranění. Hydrogel HPMA-RGD osázený MSCs redukoval atrofii míchy v porovnání se SCI.

Obr. 1



Chronická míšní léze po implantaci hydrogelu s MSC (6 měsíců po SCI).

A. Hydrogel (bílá hvězdička) vytváří přemostění přes centrum léze (měřítko = 2 mm).

B. Hydrogel je v celém svém rozsahu infiltrován vrůstajícími nervovými výběžky

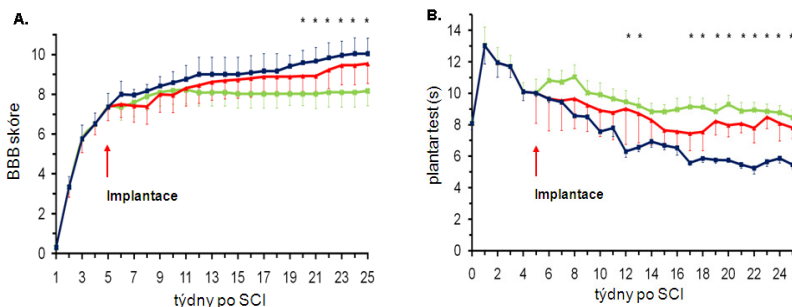
(měřítko = 500 μm). C. Také Schwannovy buňky infiltrovaly celý objem hydrogelu (měřítko = 500 μm). D. Myelinizace axonu (bílá šipka) Schwannovou buňkou (bílá hvězdička) v obraze elektronové mikroskopie (měřítko = 12 μm). E. Astrocyty a jejich výběžky nejenže tvořily astroglální jizvu kolem implantovaného hydrogelu, ale také vrůstaly do implantátu. Hojně infiltrovaly periferní části hydrogelu (měřítko = 25 μm). F. Pět měsíců po implantaci hydrogelu do míšního poranění tento implantát stále obsahuje živé MSCs. MSCs podpořily infiltraci hydrogelu nově vrůstajícími cévami (bílé hvězdičky), neboť mnoho cév vrostlo do hydrogelu v těsné blízkosti kmenových buněk (detail ve vloženém obrázku, měřítko = 15 μm).

4.6. Vliv implantace hydrogelu a hydrogelu s MSCs na motoriku a senzitivitu zadních končetin v modelu chronického SCI

Ve studii na modelu chronického SCI, jejíž design je specifikován v předchozím bodě, jsme testovali také funkční vliv implantace hydrogelu na bázi HPMA-RGD a hydrogelu HPMA-RGD osázeného MSCs na motorické a senzitivní funkce zadních končetin laboratorních potkanů. Zvířata jsme testovali 1x týdně po dobu 6 měsíců. U zvířat s implantovaným hydrogelem osázeným MSCs došlo po implantaci k signifikantnímu zlepšení motoriky i senzitivity. Ke zlepšení senzitivních funkcí došlo již v 7. a 8. týdnu po implantaci hydrogelu a následně pak od 12. týdne až do ukončení pokusu. Ke zlepšení motorických funkcí došlo od 15. týdne po implantaci hydrogelu a bylo stabilní až do ukončení pokusu. I u skupiny s implantovaným samotným hydrogelem byla tendence ke zlepšení, hlavně ve složce motorické, ale tento rozdíl nebyl v porovnání s kontrolní skupinou statisticky významný.

Hydrogel HPMA-RGD osázený buňkami kostní dřeně zlepšuje motoriku i senzitivitu zadních končetin v modelu chronického SCI laboratorního potkana.

Obr. 2



Behaviorální testování u chronického SCI po implantaci hydrogelu a hydrogelu s MSCs. A, Hodnocení A, motorické (BBB skóre) a B, sensitivní (plantar test) funkce zadních končetin u laboratorního potkana. Po 5 týdnech od vzniku poranění (šipka) byl implantován u 1 skupiny pouze hydrogel (červená čára), u 2. skupiny hydrogel s vyšetřimi kmenovými buňkami (MSC, modrá čára) a 3. skupina, pouhé SCI, sloužila jako kontrolní (zelená čára). V motorickém i sensitivním testování se u skupiny potkanů s implantovaným hydrogelem MSC statisticky významně zlepily funkce v porovnání se skupinou kontrolní ($p < 0.05$, ANOVA test s post hoc LSD).

5. DISKUZE

Přímá rekonstrukce poraněné míšňí tkáně není v klinické praxi v současnosti k dispozici. Probíhá zatím jen v experimentálních podmínkách. Hydrogely patří do skupiny bioimplantátů užívaných v experimentálním přemostění SCI.

Naše výsledky i studie z jiných pracovišť ukazují, že implantace hydrogelů na bázi HEMA či HPMA do akutního SCI vede k přemostění posttraumatické kavity. Hydrogely dobře adherují k okolní míšňí tkáni a vytvoří permissivní prostředí pro vrůstání axonů, Schwannových buněk či cév bez toho, aby vyvolávaly reakci proti cizímu tělesu; jsou tedy biokompatibilní (Hejčl *et al.*, 2008a,b; Woerly *et al.*, 2001).

Fyzikální vlastnosti hydrogelů, syntetických polymerů, můžeme měnit. Mezi takové vlastnosti patří povrchový náboj hydrogelu. V naší studii jsme ukázali, že povrchový náboj podporuje regeneraci míšní tkáně, zvláště pak náboj pozitivní (Hejčl *et al.*, 2008b). Nicméně v literatuře zatím není jednoznačný konsenzus o vlivu různých nábojů na buněčnou adhezivitu. Zatímco podle některých prací je vyšší adhezivita buněk na pozitivně nabitých površích s polykationtovými funkčními skupinami (Richert *et al.*, 2004a), dle jiných byla zjištěna nejsilnější adhezivita a šíření buněk po površích s negativním nábojem (Kidambi *et al.*, 2004).

Významnou podskupinou hydrogelů jsou biodegradabilní hydrogely. Jejich výhodou je to, že mohou poskytnout základní strukturální kostru pro regeneraci elementů nervové a poté, co je defekt přemostěn novou tkání, se struktura gelu postupně rozpadne. Existuje několik málo prací, které se zabývají užitím biodegradabilních hydrogelů u SCI (Novikova *et al.*, 2003). Vhodným využitím biodegradabilních hydrogelů je kombinace např. s růstovými faktory, kde postupná degradace zajistí kontrolované uvolňování růstového faktoru do okolí (Piantino *et al.*, 2006). V naší studii jsme zjistili, že u biodegradabilních hydrogelů na bázi kopolymeru HPMA a EOEMA se implantát postupně rozpadá z periferních částí směrem k centru (Hejčl *et al.*, 2008b). Tato část je nahrazena novou tkání, obsahující cévy, nervové výběžky. Bude nutno zjistit ideální rozpadovou rychlost hydrogelu, která umožní nově vznikající tkáni plně přerůst místo defektu a zároveň zajistí kompletní degradaci implantátu.

Aby experimentální situace co nejlépe napodobila klinické SCI, existuje několik faktorů, které je nutno přizpůsobit

klinické realitě, jako je časování implantace a typ míšního poranění. Ve většině experimentálních prací se implantuje hydrogel akutně. Nicméně, taková situace není klinicky reálná. Navíc prostředí akutního SCI je hostilní k regenerativním procesům. Proto je nutné hodnotit aplikace hydrogelu i odloženě a porovnat ji s aplikací akutní. V jedné z našich studií jsme ukázali, že odložená implantace hydrogelu o týden v modelu transekce míchy redukuje objem posttraumatické pseudocysty v porovnání s implantací akutní (Hejčl *et al.*, 2008a).

Klinická SCI jsou dominantně způsobena kompresí míchy (Bunge *et al.*, 1993), na rozdíl od většiny experimentálních SCI, které využívají ostrých modelů poranění míchy (Woerly *et al.*, 2001). Reálnou klinickou situaci dobře napodobuje model balónkové kompresní léze, kdy se posttraumatická kavita vyvine s odstupem několika týdnů. Avšak terapie u chronického SCI zatím nedosahuje výsledků u akutního SCI. Výhodou může být využití kombinované léčby, například hydrogely s kmenovými buňkami. MSCs mohou zachránit poraněné buňky (angl. RESCUE). Mohou tak působit pomocí neurotrofinů, indukovat proliferaci endogenních kmenových buněk, podpořit myelinizaci axonů nebo podpořit revaskularizaci poraněné míšní tkáně (Chopp a Li, 2002). Léčba míšního poranění pomocí kmenových buněk kostní dřevě statisticky významně zlepšuje motorické a senzitivní funkce zadních končetin vede k redukci atrofie míšní (Urdzíkova *et al.*, 2006). Přitom některé práce dokazují, že lokální léčba má lepší výsledky nežli systémová aplikace (Vaquero *et al.*, 2006). Navíc MSC mohou mít pozitivní vliv na motorickou funkci i regeneraci poraněné míchy i v chronické fázi SCI (Zurita *et al.*, 2006). Hydrogel tedy může

sloužit nejen jako základní struktura pro regeneraci elementů míšní tkáně, ale i jako nosič kmenových buněk. Dle naší studie jsou schopny MSCs přežít v hydrogelu minimálně po dobu 5 měsíců od implantace. Implantací hydrogelu s vyšetými MSCs můžeme zajistit lokální působení kmenových buněk a kombinovat přínos obou modalit a zlepšit funkční výsledky (Hejčl *et al.*, zasláno k publikaci).

6. ZÁVĚRY

1. Hydrogely na bázi HEMA a HPMA v modelu akutního SCI po 1 měsíci od implantace přemostily míšní lézi a dobře adhovaly k okolní míšní tkáni. Póry hydrogelů byly infiltrovány axony, Schwannovými buňkami a cévami. Astrocyty vrůstaly do hydrogelů v akutní fázi minimálně.
2. Do hydrogelů na bázi HEMA s povrchovým nábojem vrůstalo po 1 měsíci od implantace větší množství axonů a pojivových elementů v porovnání s hydrogelem bez náboje. Hydrogely s pozitivním povrchovým nábojem podpořily vrůstání axonů i do centrálních částí implantátu v porovnání s negativním povrchovým nábojem.
3. Vstřebatelné hydrogely na bázi HPMA se po 1 měsíci od implantace do modelu akutního SCI postupně vstřebávaly od periferie do středu. Periferní část hydrogelu byla nahrazena novou tkání, obsahující regenerující axony. Velikost periferní části byla přímo úměrná rychlosti vstřebávání hydrogelu.

4. Transekce míchy má za následek rozvoj progresivně se zvětšující posttraumatické kavity. Odložená implantace hydrogelu (po 7 dnech) po 3 měsících statisticky významně redukovala objem posttraumatické kavity v porovnání s okamžitou implantací. Implantace hydrogelu statisticky významně zmenšuje objem kavity v porovnání s transekcí míchy.
5. Hydrogel na bázi HPMA, buď s MSCs nebo bez MSCs, přemostil chronickou míšní lézi. Do implantátu vrůstaly axony, Schwannovy buňky, astrocyty, cévy i pojivová tkáň. MSCs byly přítomny v hydrogelu i 5 měsíců po implantaci. Implantace hydrogelu ošetěho MSCs u chronického SCI statisticky významně redukovala atrofii míšní tkáň.
6. Implantace hydrogelu ošetěho MSCs do chronického SCI, na rozdíl od implantace hydrogelu samotného, vedla ke statisticky významnému zlepšení motorické i senzitivní funkce zadních končetin u laboratorního potkana ve srovnání s chronickým SCI bez léčby.

7. LITERATURA

1. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12:1-21.
2. Bunge RP, Puckett WR, Baccera JL, Marcillo A, Quencer RM. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol*. 1993; 59:75-89.
3. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells.

Lancet Neurol. 2002; 1:92-100.

4. Hejčl A, Urdzíkova L, Lesný P, Příkladný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Zámečník J, Jendelová P, Syková E. Acute and delayed implantation of positively charged HEMA scaffold in spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurosurgery (Spine)*. 2008a; 8: 67-73.

5. Hejčl A, Lesný P, Příkladný M, Michálek J, Jendelová P, Syková E. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol Res*. 2008b; 57:S121-32.

6. Kidambi S, Lee I, Chan C. Controlling primary hepatocyte adhesion and spreading on protein-free polyelectrolyte multilayer films. *J Am Chem Soc*. 2004; 126:16286-7.

7. Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. *Curr Opin Neurol*. 2003; 16:711-5.

8. Piantino J, Burdick JA, Goldberg D, Langer R, Benowitz LI. An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2006; 201:359-67.

9. Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules*. 2004; 5:284-94.

10. Urdzíkova L, Jendelová P, Glogarová K, Burian M, Hájek M, Syková E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006; 23:1379-91.

11. Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci Lett*. 2006; 398:129-34.
12. Woerly S, Pinet E, de Robertis L, Van Diep D, Bousmina M. Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel). *Biomaterials*. 2001; 22:1095-111.
13. Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: Functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neuroscience Letters*. 2006; 402:51-56.

8. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA

8.1. Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce

1. Hejčl A, Lesný P, Přádný M, Šedý J, Zámečník J, Jendelová P, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 6: 3D hydrogels with positive and negative surface charges and polyelectrolyte complexes in spinal cord injury repair. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20:1571-7. (*IF 2007 1,581*)
2. Hejčl A, Urdzíková L, Lesný P, Přádný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Zámečník J, Jendelová P, Syková E: Acute and delayed implantation of positively charged HEMA scaffold in spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurosurgery (Spine)*. 2008; 8:67-73. (*IF 2006 1,478*)
3. Hejčl A, Lesný P, Přádný M, Michálek J, Jendelová P, Syková E.: Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol Res*. 2008; 57 Suppl 3:S121-32. (*IF 2006 2,093*)

4. Příkladný M, Michálek J, Lesný P, Hejčl A, Vacík J, Šlouf M, Syková E: Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 5. Hydrolytically degradable materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006; 17:1357-64. (IF 2005 1,248)
5. Syková E, Jendelová P, Urdzíková L, Lesný P, Hejčl A: Bone Marrow Stem Cells and Polymer Hydrogel-Two Strategie for Spinal Cord Injury Repair. 2006; 26:1111-27. (IF 2005 2,022)
6. Hejčl A, Šedý J, Kapcalová M, Arboleda Toro D, Amemori T, Lesný P, Likavčanová- Mašínová K, Burian M, Krumbholcová E, Příkladný M, Michálek J, Hájek M, Jendelová P, Syková E. HEMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *zasláno k publikaci Stem Cells and Development*.
7. Šedý J, Urdzíková L, Likavčanová K, Hejčl A, Jendelová P, Syková E: A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rat. *Neuroscience Letters*. 2007; 423:167-171. (IF 2006 2,092)
8. Šedý J, Likavčanová K, Urdzíková L, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Jendelová P, Syková E: Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses*. 2008; 70:308-313 (IF 2006 1,299)
9. Šedý J, Urdzíková L, Likavčanová K, Hejčl A, Burian M, Jendelová P, Zicha J, Kuneš J, Syková E: Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma*. 2007; 24:1487-501. (IF 2006 3,453)

10. Sedy J, Zicha J, Kunes J, Hejcl A, Sykova E. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats: the effect of preventive interventions. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009; 297:R1111-7. (IF 2007 3,661)

11. Hejčl A, Jendelová P, Syková E. Adult bone marrow stem cells and biocompatible polymers in SCI repair. In: Tanya C. Berkovsky, ed. Handbook of Spinal Cord Injuries: Types, Treatments and Prognosis. Nova Science Publishers, NY, USA. *in press*.

12. Hejčl A, Jendelová P, Syková E. Adult bone marrow stem cells and biocompatible polymers in SCI repair. In: Stein DB, ed. Handbook of Hydrogels: Properties, Preparation & Applications. Nova Science Publishers, NY, USA. *in press*.

Publikace 7-10 souvisejí s tématem dizertační práce, ale nejsou přímým podkladem. Impakt faktor prací, které jsou podkladem či souvisejí s dizertační prací: 18,927

8.2. Ostatní publikace autora

13. Hejčl A, Bolcha M, Procházka J, Sameš M. Multimodální monitorace u pacientů s těžkým poraněním mozku a subarachnoidálním krvácením. Cesk Slov Neurol N 2009; 72:383-7. (IF 2008 0,319)

14. Hejčl A, Sameš M. Mikrodialýza v neurochirurgii. Cesk Slov Neurol N. 2009; 72:511-517. (IF 2008 0,319)

15. Bartoš R, Jech R, Vymazal J, Petrovický P, Vachata P, Hejčl A, Zolal A, Sameš M. Validity of primary motor area localization with fMRI versus electric cortical stimulation: A

comparative study. *Acta Neurochir (Wien)*. 2009; 151:1071-80. (IF 2007 1,391)

16. Bartoš R, Sameš M, Zolal A, Radovnický T, Hejčl A, Vachata P, Cihlář F, Bejšovec D, Petrovický P. Resekce gliomů inzuly – volumetrické hodnocení radikality. *Cesk Slov Neurol N*. 2009; 72:534-541. (IF 2008 0,319)

17. Bartoš R, Jech R, Vymazal J, Cihlář F, Hejčl A, Sameš M: Spolehlivost lokalizace primární motorické oblasti pomocí funkční magnetické rezonance. *Cesk Slov Neurol N* 2006; 69:189-194. (IF 2006 0,07)

18. Bartoš R, Ceé J, Zolal A, Hejčl A, Bolcha M, Prokšová J, Sameš M.: Extraoperativní mapování pomocí kortikálního gridu před resekci difúzního oligodendrogliomu v řečově dominantní hemisféře – alternativa „awake kraniotomie“ – kazuistika. *Cesk Slov Neurol N* 2008; 71:718-721. (IF 2006 0,07)

19. Hejčl A, Bartoš R, Humhej I, Bolcha M, Bejšovec D, Procházka J, Sameš M: Dekompresivní kraniektomie v léčbě posttraumatického edému mozku a přínos nových monitorovacích metod. *Cas Lek Cesk*. 2007;146:307-12; discussion 312-3.

20. Cihlář F, Pavlov V, Sameš M, Derner M, Hejčl A, Bartoš R: MDCTA a MRA v diagnostice zdroje subarachnoidálního krvácení. *Česká radiologie*. 2006; 60:149-156.

IF všech publikací: 21,415