

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Kloudová

Experimentální modely traumatického poranění míchy u potkana
Experimental rat models in traumatic spinal cord injury research

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Lucia Machová Urdzíková, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 4. 2014

Anna Kloudová

Abstrakt

Na světě dochází každoročně k velkému množství úrazů páteře, při kterých je poraněna také mícha. Poškození míšní tkáně vede k řadě dysfunkcí, které výrazně snižují kvalitu života. Vývoji účinné léčebné terapie je proto věnována značná pozornost. Velkým přínosem pro studium míšního poranění je využití zvířecích modelů, které nám poskytují reálnou představu o probíhajících patofyziologických procesech, a na nichž je možné testovat nové léčebné postupy. Nejčastěji využívaným modelem je potkan, u kterého existuje řada způsobů, jak experimentální míšní lézi vytvořit. Velmi precizní je kontuzní model, při kterém je simulováno pohmoždění míchy pomocí počítačově řízeného přístroje. Pro studium patofyziologie je zase vhodný kompresní model, kde se kromě pohmoždění uplatňuje i přetrvávající komprese míchy. Transekce a hemisekce jsou určené pro výzkum regenerace axonů, jelikož pouze u nich lze s jistotou odlišit nově rostoucí vlákna od zachovaných. Méně často jsou využívány fotochemický a excitotoxický model, dále se můžeme setkat s dislokací a distrakcí obratlů, případně může být mícha poškozena teplem či naopak chladem. Každý model má své unikátní vlastnosti, které jej předurčují k využití v rozdílných oblastech výzkumu poraněné míchy, a výběr jednoho z nich by se tak měl řídit požadavky konkrétní studie.

Klíčová slova:

poranění míchy, zvířecí modely, potkan, neurotrauma, neuroregenerace

Abstract

A large number of spinal injuries that cause damage to the spinal cord occur every year. Such damage to spinal cord tissue leads to a number of dysfunctions that significantly reduce quality of life and therefore the development of effective therapies remains a very important issue. The use of animal models is considered the major tool of this research field, enabling the testing of new treatments as well as observing ongoing pathophysiological processes. Rats are the most frequently used animal model due to the many possible ways of creating a spinal cord lesion on them. The contusion model uses a computer-controlled device to simulate the spinal cord contusion and therefore is highly precise. However, a compression model seems to be the most suitable model for pathophysiological studying. Besides contusion it enables persistent compression to the spinal cord. Transection and hemisection methods are intended for axonal regeneration research, as only these models can reliably distinguish new growing fibers from the preserved ones. Less often photochemical and excitotoxic models are used. Lastly, dislocation and distraction of vertebrae or damage to the spinal cord using heat or cold can be carried out. Each of the models have their own unique features that make them optimal to use in different research fields. Consequently, they must be selected according to the specific requirements of the study.

Keywords:

spinal cord injury, animal models, rat, neurotrauma, neuroregeneration

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce MUDr. Lucii Machové Urdzíkové, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost a cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem ostatním, kteří mě při psaní podporovali a pomáhali mi.

Seznam použitých zkratk

AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát

IH – Infinite Horizons, zařízení používané k vytváření kontuzního modelu SCI

NMDA – N-methyl-D-aspartát

NYU – New York University, přeneseně pojmenování pro zařízení používané k vytváření kontuzního modelu SCI

OSU – Ohio State University, přeneseně pojmenování pro zařízení používané k vytváření kontuzního modelu SCI

QUIS – quisqualátová kyselina

ROS – reaktivní sloučeniny kyslíku (reactive oxygen species)

SCI – poranění míchy (spinal cord injury)

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Patofyziologie poranění míchy	3
2.1	Primární poranění	3
2.2	Sekundární poranění	3
3	Potkan jako zvířecí model SCI	6
4	Modely SCI	9
4.1	Kontuzní model	9
4.1.1	NYU.....	9
4.1.2	OSU.....	9
4.1.3	IH.....	10
4.2	Kompresní model	10
4.2.1	Svorkový kompresní model	11
4.2.2	Statický kompresní model	12
4.2.3	Balónkový kompresní model	13
4.3	Transekce, hemisekce	15
4.4	Fotochemický model	16
4.5	Excitotoxický model.....	17
4.6	Ostatní modely.....	19
5	Závěr	22
6	Seznam použitých zdrojů.....	23
6.1	Literární zdroje	23
6.2	Internetové zdroje.....	30

1 Úvod

Poranění míchy (spinal cord injury, SCI) patří mezi nejvíce devastující úrazy nejen po fyzické, ale také po psychické stránce. Dochází k poruchám ovládní končetin, vyměšování, citlivosti a respiračních funkcí a člověk se tak stává závislým na pomoci ostatních. O to horší je fakt, že k míšním poraněním dochází nejčastěji v mladém věku, například v USA se polovina případů odehraje mezi 16. a 30. rokem. Nejčastějšími příčinami tam jsou dopravní nehody, pády a násilí. Zajímavým faktem je, že k úrazům postihujícím míchu dochází mnohem více u mužů, kteří v celkových statistikách tvoří okolo 80 %¹. V České republice se vyskytne ročně 200 až 300 nových případů, přesnější statistiky však chybí².

Pod pojem SCI spadá série procesů, které jsou výsledkem síly působící v okamžiku zranění na míchu. Tyto procesy se vzájemně ovlivňují a společně vedou k poškození nervové tkáně, jehož rozsah a lokalizace určují stav pacienta. Tento stav je obvykle permanentní, jelikož prostředí centrální nervové soustavy nepodporuje růst a regeneraci nervových vláken. K jejich samovolné obnově a tedy i návratu motorických či sensorických funkcí tak dochází jen minimálně a prozatím neexistuje žádná spolehlivá a účinná léčba, která by tento problém vyřešila. V současnosti je obvyklým klinickým postupem fixace páteře a aplikace kortikosteroidů, následovaná dlouhodobou rehabilitací. Tento postup však nepřináší dostatečná zlepšení, a tak je výzkumu nových terapeutických možností věnováno velké úsilí.

Zkoumání patofyziologie SCI a jeho léčby je založeno na experimentálních zvířecích modelech. Bez nich by nebylo možné porozumět komplexním procesům, které probíhají v poraněné míše, a poté navrhnout a aplikovat léčebné postupy. Nejpoužívanějším zvířetem je potkan, u kterého bylo vyvinuto množství modelů, kterými lze vytvořit míšní lézi v laboratorních podmínkách. Výběr vhodného modelu je přitom klíčový, aby získané výsledky byly relevantní a šly uplatnit i u člověka.

¹ Převzato z: <https://www.nscisc.uab.edu/>

² Převzato z: <http://www.spinalcord.cz/cz/statistiky/>

Cílem této práce je popsat nejpoužívanější traumatické modely SCI u potkanů, které jsou ve výzkumu míšního poranění a jeho léčby uplatňovány. V první části bude shrnut mechanismus poranění míchy společně s patofyziologickými procesy, které mají zásadní vliv na poškození nervové tkáně. Druhá část se bude zabývat výběrem potkana jako pokusného zvířete a obecnými zásadami, které jsou při tomto výběru dodržovány. Třetí část pak bude popisovat nejvýznamnější traumatické modely, které jsou v současnosti používány k vytvoření SCI u potkanů, včetně jejich případných výhod či nevýhod.

2 Patofyziologie poranění míchy

Mícha jako součást centrální nervové soustavy je velmi choulostivá a její zranění vede k rozsáhlým fyziologickým změnám, které mají za následek poškození nervových drah i neuronů samotných. To v konečném důsledku vede k nejrůznějším motorickým i sensorickým poruchám v závislosti na lokalizaci a rozsahu poranění. Dle chronologické návaznosti rozlišujeme primární a sekundární poranění.

2.1 Primární poranění

Primární poranění je přímým důsledkem mechanického působení na míchu. Tlakem, tahem nebo lacerací dochází k poškození krevních cév, axonů a buněčných membrán. Během několika minut dochází k hemorrhagii (zejména v bohatě vaskularizované šedé hmotě) a k otoku. Otékající mícha vyplní veškerý prostor páteřního kanálu a jakmile tlak uvnitř přesáhne tlak v krevních cévách, dochází k ischemii (Becker et al. 2003). Z poškozených buněk se do extracelulárního prostoru dostávají toxické látky a buňky podléhají nekróze. Všechny tyto procesy pak spouštějí kaskádu událostí, které se podílejí na dalším rozvoji míšní léze, a jsou příčinou sekundárního poranění.

2.2 Sekundární poranění

Sekundární poranění se rozvíjí jako odpověď organismu na trauma a často poškozuje míchu v daleko větší míře než samotné primární zranění. Mechanismy, kterými k tomu dochází, lze zařadit do 25 kategorií (Oyinbo 2011). Nejvýznamnější z nich je glutamátová excitotoxicita, poškození volnými radikály, zánět, formování gliové jizvy, apoptóza, nekróza a demyelinizace.

Z neuronů a axonů poškozených během primární fáze se do extracelulárního prostředí dostává excitační neurotransmitter glutamát. Brzy po zranění dochází ke kumulaci glutamátu v daném místě a jeho množství se stává pro přítomné buňky toxickým (Liu et al. 1999). Glutamát totiž způsobuje depolarizaci buněčných membrán, aktivaci napětově ovládaných kalciových kanálů a vtoku kalciových iontů do buňky; překročí-li intracelulární koncentrace Ca^{2+} jistou mez, dojde ke spuštění autodestruktivních mechanismů vedoucích k apoptóze. Zvýšené množství Ca^{2+} také

poškozuje mitochondrie, což má za následek selhání elektrontransportního řetězce a tvorbu reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) (Azbill et al. 1997). ROS jsou vysoce toxické látky degradující proteiny i nukleové kyseliny a způsobující peroxidaci lipidů, což v případě lipidů buněčné membrány může nakonec vést k lýze membrány a smrti buňky. K excitotoxickému poškození jsou nejvíce náchylné neurony a oligodendrocyty, protože exprimují velké množství glutamátových receptorů. Úbytek neuronů a demyelinizace axonů způsobené excitotoxickou smrtí oligodendrocytů (Xu et al. 2004) mají za následek lokální blok ve vedení signálu.

V místě poranění se také výrazně zvyšuje produkce prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α (Streit et al. 1998), které se podílejí na aktivaci krevních leukocytů a rezidentní mikroglie. Během několika málo hodin dochází k infiltraci neutrofilů, které mají schopnost fagocytózy a sekretují látky přispívající k rozvoji místního zánětu. Tato imunitní odpověď organismu je důležitá pro odstranění zbytků poškozené tkáně, ale často naruší i původně zdravou tkáň. Koncentrace neutrofilů dosahuje vrcholu po 24 hodinách; následuje druhá vlna makrofágů (Carlson et al. 1998). Aktivace rezidentní mikroglie je provázena regionální degenerací přiléhajících axonů (Popovich et al. 1997). Zánět nakonec může vyústit v rozšiřující se kavitu ohraničenou gliovou jizvou, která je tvořena zejména astrocyty produkujícími zvýšené množství proteoglykanů, a v sekundární smrt axonů (Fitch et al. 1999). Samotná gliová jizva funguje jako bariéra v regeneraci axonů, ale zároveň také zabraňuje migraci imunitních buněk a tak i šíření zánětu.

Jak neurony, tak glie podléhají po míšním poranění nekróze i apoptóze. Nekróza je spíše součástí primárního zranění jako důsledek mechanického poškození buněk, zatímco apoptóza probíhá později během sekundární fáze a je výsledkem porušení rovnováhy vnitřního mikroprostředí míchy a patofyziologických procesů. Apoptóza navíc není omezena pouze na místo nebo čas zranění – ačkoliv probíhá převážně během prvních 24 hodin po zranění (Liu et al. 1997b), proximálně i distálně od místa léze se objevuje také opožděná smrt oligodendrocytů, která zřejmě souvisí s degenerací axonů (Liu et al. 1997b; Stirling et al. 2004).

Demyelinizace axonů jednak vlivem apoptózy či nekrózy oligodendrocytů, ale i přímou mechanickou disrupcí myelinové vrstvy, vrcholí dle Totoiu (Totoiu et al. 2005)

24 hodin po SCI a je soustředěna okolo místa zranění. Po 7 až 14 dnech pak dochází k opětovné remyelinizaci, ale tloušťka myelinového obalu již nikdy nedosáhne původního stavu. K demyelinizaci navíc dochází i více než rok po zranění; tato chronická demyelinizace může být překážkou v celkové regeneraci (Totoiu et al. 2005).

3 Potkan jako zvířecí model SCI

Potkan (*Rattus norvegicus*) patří mezi nejpoužívanější laboratorní zvířata. Dle Státní veterinární správy³ bylo v ČR v roce 2012 na pokusné účely využito 31 683 potkanů, což tvoří 8,1 % z celkového počtu použitých laboratorních zvířat⁴. Svou roli jistě hrají jak nízké pořizovací náklady, tak malá náročnost na péči a manipulaci. Z hlediska výzkumu SCI jsou potkani výhodnějším modelem než myši z důvodu větších rozměrů a tedy i snadnějšího provedení drobných chirurgických zákroků. Oproti morčatům mají zase jednu důležitou vlastnost, a to odolnost. Dokáží tak víceméně bez problémů přežít a zotavit se i z tak vážného traumatu jako je poranění míchy.

Nejběžnější inbrední kmeny potkanů používané ve výzkumu jsou Wistar, Sprague-Dawley, Long-Evans, Lewis a Fischer. Pro účely dané studie by měl být použit vždy jen jeden určitý kmen. U jedinců rozdílných kmenů byly totiž po experimentálním poranění míchy pozorovány odchylky v genové expresi různých proteinů, což může vést k odlišným imunitním odpovědím a regenerativním procesům (Schmitt et al. 2006).

Ve studiích zaměřených na výzkum SCI jsou používáni jak samci, tak samice. Samičky mají tu výhodu, že díky kratší močové trubici je u nich manuální vyprazdňování, které je po zákroku obvykle nutností, snadnější. Nevýhodou jsou estrální cykly a kolísání hormonálních hladin, což může výrazně ovlivňovat stav a chování zvířat. Estrogeny navíc vykazují neuroprotektivní efekt (Ritz et al. 2008; Samantaray et al. 2011); u progesteronu nejsou tyto účinky zcela prokázány (Thomas et al. 1999; Fee et al. 2007; Labombarda et al. 2010). Z těchto důvodů je tedy nutné používat vždy buď samečky, anebo samičky.

Poranění míchy v experimentálních podmínkách lze teoreticky provést na jakékoli úrovni, obvykle to však bývá buď v cervikální nebo thorakální oblasti. Thorakální oblast je využívána nejčastěji, pro což existují v zásadě dva důvody. Prvním z nich je mortalita zvířat, která při zákrocích v cervikální oblasti dosahuje v průměru 12,2 % (Pearse et al. 2005), může to však být až 50 % (Choo et al. 2009). U thorakálních

³ Převzato z: <http://eagri.cz/public/web/svs/portal/dokumenty-a-publikace/prehled-podle-let/x2013/animal-welfare-program-ochrany-zvirat-2012.html>

⁴ Dle platné legislativy jsou v ČR za pokusná zvířata považováni i kroužkovaní ptáci, kteří tvoří v této statistice až 40 %.

zranění je toto procento výrazně nižší, dle Pearse méně než 1,2 % (Pearse et al. 2005). Druhým důvodem je pooperační péče o zvířata. Po cervikálním zranění míchy ztrácejí schopnost ovládat přední i zadní nohy – jsou kvadruplegická (Anderson et al. 2009). To s sebou přináší nutnost krmit je ručně nebo aspoň umisťovat potravu na dosažitelná místa, například na dno klece. Po zranění v thorakální části jsou postiženy pouze zadní končetiny (paraplegie). Další komplikací jsou poruchy činnosti bránice a z toho plynoucí respirační obtíže (Stamegna et al. 2011). Na druhou stranu, více než polovina SCI u lidí je právě v cervikální oblasti⁵. Mícha zde má navíc oproti thorakální oblasti jinou distribuci krevních cév, šedé a bílé hmoty a funkčních segmentů, takže patofyziologické procesy po poranění tkáně se mohou lišit (Iwasaki et al. 2014). Vytváření cervikálních zvířecích modelů SCI je tedy i přes obtíže velmi žádoucí.

Při vytváření míšních léze je také velmi důležitá hmotnost pokusných zvířat. Ta se obvykle pohybuje mezi 200 až 300 gramy a u jedinců dané skupiny by měla být co nejpodobnější. Při velkých rozdílech v hmotnosti může dojít k tomu, že léze nebude u všech zvířat stejně velká, a funkční výstupy tak budou záviset spíše na velikosti zvířete než například na použité léčbě.

Teplota zvířat v průběhu operace je většinou udržována stabilně na 37°C, aby nedošlo k prochladnutí, což by mohlo způsobit zdravotní komplikace. Hypotermie po skončení zákroku má však dle některých studií pozitivní účinky na zachování šedé a bílé hmoty a na lokomoční funkce (Lo et al. 2009; Grulova et al. 2013). Posttraumatická hypertermie naopak vykazuje negativní dopad na návrat motorických schopností (Urdzikova et al. 2006).

Po operaci by zvířata měla obdržet patřičné léky jako analgetika, antibiotika a v případě transplantací buněk rovněž imunosupresiva. Po přerušení míšních drah dochází také k poruše ovládní močového měchýře - retenci, takže je nutné vyprazdňovat jej manuálně, ze začátku alespoň dvakrát denně. Dále je třeba mít na paměti i to, že potkani jsou společenská zvířata. Přítomnost více jedinců v kleci tak napomáhá omezit stres, což může mít příznivé účinky na rekonvalescenci. Zvířata si ale na sebe musí zvyknout ještě v adaptační periodě před zákrokem, jinak může stres

⁵ Převezato z: <https://www.nscisc.uab.edu/reports.aspx>

vyvolaný operací a přítomnost neznámého jedince v kleci vyústit ve vážné napadení druhého zvířete.

4 Modely SCI

4.1 Kontuzní model

Kontuze neboli pohmoždění míchy je výsledkem prudkého úderu, který způsobí zlomení a dislokace obratle (Beattie et al. 1997). Kontuzní modely se tento mechanismus snaží napodobovat. Jako první přišel s tímto experimentálním způsobem vytváření míšní léze, tzv. *weight drop* modelem, Allen již v roce 1911 (Kwon et al. 2002). Tento model ovšem nebyl příliš spolehlivý a reprodukovatelný, takže od té doby došlo ještě mnohokrát k jeho modifikaci. Toto úsilí nakonec vyústilo ve vznik prvního počítačově řízeného modelu. V současné době jsou dostupná tři mírně odlišná zařízení – zařízení vyvinuto na newyorské Univerzitě (dále jen NYU dle New York University), na Univerzitě v Ohiu (dále jen OSU dle Ohio State University) a zařízení nazývané Infinite Horizons (dále jen IH).

4.1.1 NYU

Součástí tohoto zařízení je kovová tyčinka o hmotnosti 10 gramů, která je pečlivě vycentrována nad odhalený povrch míchy. Poté je opatrně snižována, až se její špička dotkne *dura mater* – tato úroveň je považována za nulovou výšku. Tyčinku je pak možné pouštět z výšky 6,25, 12,5, 25 nebo 50 mm, přičemž platí závislost čím větší výška, tím větší poškození míchy (Beattie et al. 1997). Jako proměnná tady vystupuje výška, ostatní faktory (jako rychlost nárazu a míru stlačení míchy) lze dopočítat. Tento model se jeví v rámci zachované míšní hmoty a lokomočních výsledků jako konzistentní u výšek 12,5, 25 a 50 mm; při dopadu tyčinky z výšky 6,25 mm je variabilita lézí větší (Basso et al. 1996).

4.1.2 OSU

Princip zařízení OSU je velmi podobný tomu, jak byl popsán výše u NYU. Jediný rozdíl je v tom, že proměnnou zde není výška, z jaké je úder spouštěn, ale míra stlačení míchy, přičemž povrch míchy je brán opět jako výchozí bod. Stlačení míchy o 0,80 mm vznikne mírné, o 0,95 mm středně závažné a o 1,10 mm vážné poranění míchy; doba komprese nepřesahuje 20 ms (Pearse et al. 2005). Celou dobu řídí pohyb tělesa počítač.

Těleso tedy neodskakuje jako u NYU při dopadu z výšky, ale je aktivně staženo, což napomáhá odstranit variabilitu v energii pohlcené míchou. Míra stlačení míchy jako ukazatel závažnosti poranění může ovšem přinést i nepřesnosti, a to kvůli pohybům míchy v rámci páteřního kanálu v průběhu procesu stlačování (Scheff et al. 2003).

4.1.3 IH

Nastavitelná proměnná u IH není ani výška, ani míra stlačení, ale aplikovaná síla. Těleso je spouštěno po jednotlivých krocích; tyto kroky jsou velmi malé a rychlé, takže se celkový pohyb jeví plynule. Po každém kroku senzor zkontroluje, zda byla dosažena požadovaná síla. Pokud ne, je zařazen další krok, pokud ano, je těleso okamžitě zdviženo, přičemž je zaznamenána skutečná aktuální síla (Scheff et al. 2003). Scheff také uvádí, že laminektomie, tedy odstranění zadních obratlových oblouků, v thorakální oblasti stačí jen o trochu větší, než je 2,5mm špička tělesa. Při vytváření léze v cervikální oblasti je však potřeba použít špičku širokou asi 3,5 mm, jelikož mícha má v této oblasti větší průměr (Anderson et al. 2009).

Obecně vzato jsou počítačově řízené kontuzní modely SCI velmi precizní při vytváření míšní léze, s možností nastavení požadovaných biomechanických parametrů a jejich zpětné kontroly. To umožňuje použít pouze ta zvířata, u nichž naměřené hodnoty spadají do určitého rozmezí, a odstranit tak nežádoucí variabilitu. Všechny kontuzní modely vyžadují provedení laminektomie.

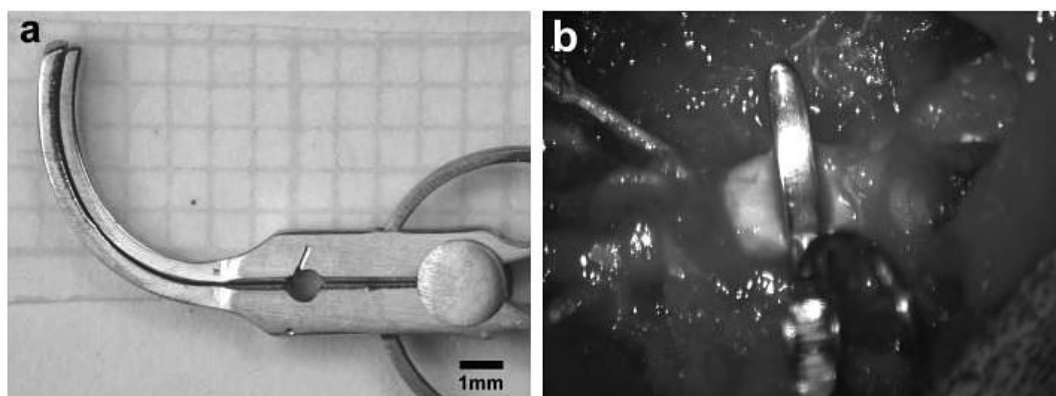
4.2 Kompresní model

Kompresní spolu s kontuzním modelem patří mezi nejčastěji využívané způsoby, kterými dochází k vytváření experimentální míšní léze. Kompresní model má však tu výhodu, že po prvotním mechanickém stimulu indukujícím míšní lézi se zde výrazně uplatňuje přetrvávající stlačení míchy, ke kterému většinou dochází i při poranění páteře u lidí. Kromě mechanického poškození tak dochází i k poškození vaskulatury, což se projeví hemoragií a ischémií (Zhang et al. 2013) a na to navazujícími sekundárními procesy; tyto procesy jsou zásadní pro další rozvoj léze. Kompresní model tedy v tomto ohledu lépe napodobuje skutečnou patofyziologii míšního poranění a pro její výzkum je vhodnější.

V zásadě existují tři typy kompresního modelu: svorkový, statický a balónkový.

4.2.1 Svorkový kompresní model

Tento model je vytvářen pomocí modifikované aneurysmální svorky (obr. 1). Před jejím použitím musí být provedena kompletní laminektomie, aby došlo k odhalení míchy na požadované úrovni a aby byl získán dostatek prostoru pro manipulaci (Poon et al. 2007). Poté je svorka v otevřené pozici uchopena do držáku a její dolní rameno je opatrně vsunuto pod míchu. V této fázi je třeba postupovat velmi opatrně, aby bylo zamezeno jakémukoli pohybu míchy nebo poškození nervových kořenů. Následuje rychlé uzavření svorky, čímž dojde k prudkému stlačení míchy a následné kompresi. Míru poškození míchy a z toho plynoucí funkční a histologické výstupy lze regulovat jak uzavírací silou ramen svorky (Bruce et al. 2002), tak dobou, po kterou je mícha stlačena (Jazayeri et al. 2013).



Obrázek 1. (a) Modifikovaná aneurysmální svorka používaná k vytváření kompresního poranění míchy. (b) Fotka pořízená v průběhu zákroku ukazující svorku během komprese míchy (Poon et al. 2007).

Ačkoli převládá stlačování míchy v dorzoventrálním směru (Bruce et al. 2002; Poon et al. 2007; Jazayeri et al. 2013), používá se někdy také laterální komprese (von Euler et al. 1997; Roussos et al. 2005). Dle von Eulerové (von Euler et al. 1997) poškozují dorzoventrální a laterální směry působení jiné nervové dráhy a mají tak rozdílný vliv zejména na funkční výstupy po SCI.

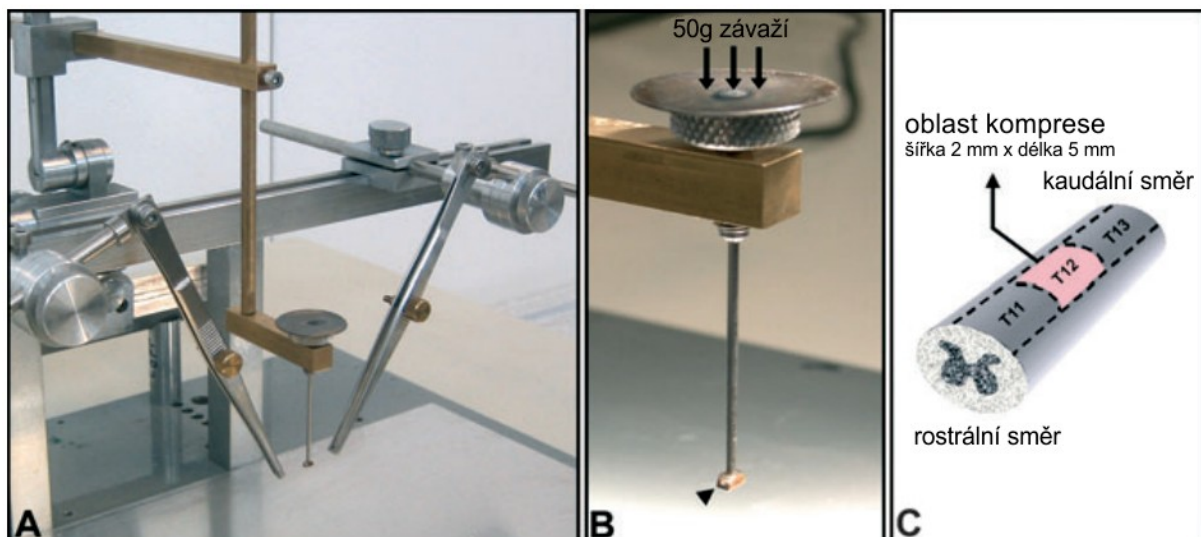
Alternativně lze místo aneurysmální svorky použít pinzetu s plochými konci, která je kalibrována na stlačení míchy na určitou tloušťku pomocí rozpěry (Vaughn et al.

2013). Stlačování zde však probíhá pomaleji (po dobu 1 až 2 sekund) a chybí tak prudký náraz, který způsobí puštěná svorka a který je většinou přítomný při úrazech páteře.

Svorkový kompresní model je relativně jednoduchý, spolehlivý a rychlý – Gruner udává, že vytvoření jedné léze včetně anestézie trvá asi 20 minut (Gruner et al. 1996). Jeho hlavní výhodou je však zejména nenáročnost na vybavení laboratoře a dobrá simulace reálných podmínek při poranění míchy u lidí.

4.2.2 Statický kompresní model

Statický kompresní model již vyžaduje specializovaný aparát. U Huang (Huang et al. 2007) se skládá ze dvou upevněných pinzet a pohyblivého ramene, ke kterému je přichycena kovová tyčinka zakončená kompresní ploškou o rozměrech 2 mm x 5 mm (obr. 2).



Obrázek 2. Statický kompresní model SCI. (A) Zařízení na kompresi míchy. (B) Zvětšený pohled; kompresní ploška je označena šipkou. Kompresní oblast je znázorněna růžovou barvou na obrázku (C) (Huang et al. 2007).

Pinzety slouží k uchycení obratlů nad a pod místem laminektomie, aby byla páteř fixována ve stabilní poloze. Tyčinka je pak opatrně přiblížena k míše tak, aby se ploškou dotkla povrchu míchy; nesmí zde však dojít k žádnému tlaku, a tak je lepší, je-li vše mikroskopicky sledováno. Poté je na mističku připevněnou na pohyblivém rameni položeno závaží o definované hmotnosti. Závaží působí tlakem na kovovou tyčinku a ta

přenáší tento tlak přes plošku na míchu. Dochází tak ke kompresi oblasti vymezené rozměry plošky.

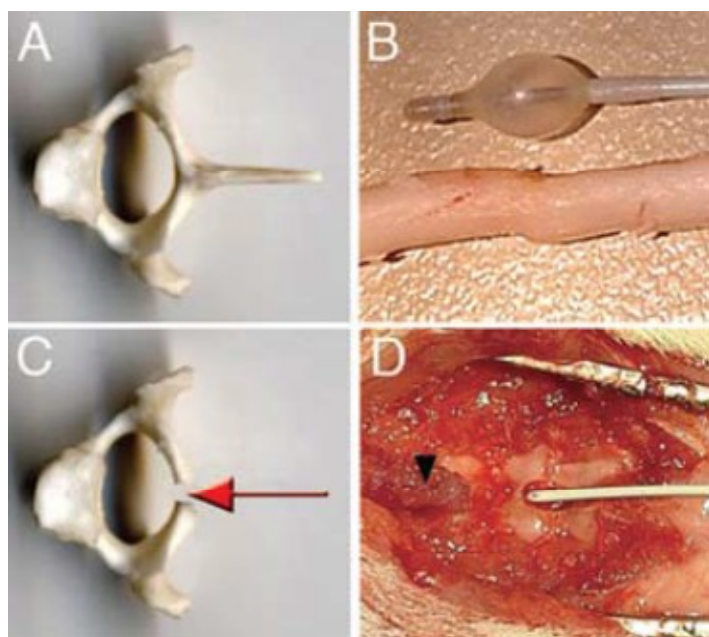
Jiný typ zařízení používá Zhang (Zhang et al. 2013). Kovová tyčinka s plastovým hrotem širokým 2,6 – 2,9 mm (dle průměru míchy) a tlustým 0,5 mm je připevněna ke stereotaktickému aparátu. Hrot je umístěn tak, aby se lehce dotýkal míchy. Následně je tyčinka spouštěna rychlostí 0,5 mm za minutu, až se hrot dotkne dna páteřního kanálu. Mícha je tak úplně stlačena; toto stlačení je po nějakou dobu udržováno a poté je pomalu uvolněno.

Výhodou statického kompresního modelu je v případě Huanga (Huang et al. 2007) menší laminektomie než u svorkového modelu, u Zhanga (Zhang et al. 2013) zase větší preciznost počítačově řízeného modelu, ačkoliv ke stlačování míchy zde dochází velmi pomalu, což zcela neodpovídá reálným okolnostem při poranění míchy u lidí.

4.2.3 Balónkový kompresní model

K vytvoření tohoto modelu u potkanů je používán běžně dostupný 2F Fogartyho katetr s nafukovacím balónkem na konci, který v humánní medicíně slouží k odstraňování akutních tepenných uzávěrů. Ten je naplněn tekutinou, většinou fyziologickým roztokem, a připojen k Hamiltonově stříkačce, která je umístěna v precizním dávkovači. Samotný operační zákrok, jak jej popisuje Vanický (Vanicky et al. 2001), pak začíná stabilizací páteře pomocí peánu připevněného k stereotaktickému rámu. Následuje odstranění trnových výběžků obratlů T10 a T11⁶, načež je do T10 vyvrtán zubní vrtačkou malý otvor o průměru asi 1,5 mm sloužící k zavedení katetru. Pro usnadnění je možné vyvrtat v T11 podélnou drážku, která vede katetr správným směrem a drží jej uprostřed. Katetr je poté vsunut do epidurálního prostoru asi 1 cm hluboko, takže střed balónku se nachází mezi obratli T8 a T9, a balónek je rychle naplněn předem určeným množstvím tekutiny (obr. 3). Rozsah léze se tedy dá ovlivnit jak velikostí balónku, tak i délkou komprese.

⁶ Konkrétní obratle jsou zde uváděny pro lepší orientaci, jinak lze tento model aplikovat i na jiné úrovně páteře.



Obrázek 3. Fotografie ilustrující techniku balónkové léze. (A) Neporušený thorakální obratel potkana (T9). (B) Průměr balónku naplněného 15 μ l tekutiny (2,5 mm) v porovnání s průměrem míchy (2,8 – 3 mm). (C) Provrtaný thorakální obratel (T9). (D) Fogartyho katetr zasunutý otvorem v obratli T10; léze je lokalizována v úrovni T8 – T9 (šipka) (Lonjon et al. 2010).

V jiné studii modifikující tento postup (Chung et al. 2013) je přístup do epidurálního prostoru získán pouze perkutánně skrz lumbosakrální kloub pomocí duté jehly. Touto jehlou je pak zaveden libovolně hluboko i Fogartyho katetr. Pokud je balónek naplněn nějakou kontrastní látkou (například roztokem iohexolu), lze přesnou pozici balónku sledovat fluoroskopicky.

Největší výhodou balónkového kompresního modelu je kromě nenáročnosti na vybavení to, že nevyžaduje laminectomii. Předoperační laminectomie totiž poškozuje okolní měkké tkáně a zvyšuje pravděpodobnost infekce (Chung et al. 2013). Laminectomie sama o sobě je zároveň léčebnou procedurou (dekomprese míšního poranění v humánní medicíně), protože poskytuje míše prostor pro expanzi při otoku. Variabilita rozsahu laminectomie u jednotlivých zvířat tak způsobuje také variabilitu ve velikosti míšního poškození (Vanicky et al. 2001). Nevýhodou tohoto modelu je možnost sklouznutí katetru při zavádění na stranu. Funkční výstupy pak nemusí být zcela stabilní v závislosti na nervových drahách, které byly nejvíce zasaženy.

4.3 Transekce, hemisekce

Transekce je model, při kterém dochází k úplnému přerušení míchy v transversálním směru. I při kompletním SCI u lidí, po kterém následuje úplná paraplegie či kvadruplegie, se jen málokdy stane, že je mícha zcela přerušena. Transekce tedy nemá oproti kompresním nebo kontuzním modelům za cíl co nejvěrněji napodobovat SCI u lidí. Smyslem transekce je studium regenerace axonů a její případné podpory pomocí kmenových buněk, růstových faktorů apod. Pouze jsou-li všechna vlákna přerušena, je možné určit počet regenerovaných vláken; u ostatních modelů totiž nelze rozlišit mezi tím, co zregenerovalo a co zůstalo ušetřeno.

Samotné provedení transekce je poměrně náročné a vyžaduje zkušenost a zručnost. Po kompletní laminektomii je veden podélný řez *durou*, která po dokončení zákroku musí být opět zašita. Mícha je přerušena mikronůžkami (Centenaro et al. 2013), skalpelem (Toksoz et al. 2013) nebo aspirací pomocí vakuové pumpy (Reynolds et al. 2008). Pro ujištění, že transekce byla provedena řádně a žádné vlákno nezůstalo zachováno, je vhodné vzniklou mezerou protáhnout třeba tenkou jehlu (Centenaro et al. 2013). Kromě pouhého přerušení je často určitý segment míchy zcela vyjmut. Na jeho místo je pak možné umístit například biomateriálovou matici uvolňující růstové faktory, sloužící jako opora pro regenerující axony (obr. 4) (Shi et al. 2014).

Péče o zvířata po míšní transekcii je velmi náročná. Je potřeba zajišťovat vyprazdňování střev a močového měchýře a zabránit vzniku proleženin a autofáгии. Proto bývá někdy místo úplné transekce aplikována hemisekce, kdy dojde k přerušení pouze části míchy, běžně levé nebo pravé poloviny (Xia et al. 2013; Shi et al. 2014). Funkce střev a močového měchýře tak zůstává do jisté míry zachována a zároveň je možné zkoumat regeneraci vláken. Hemisekce umožňuje také porovnání histologických pozorování mezi poškozenou a nepoškozenou stranou. Občas je však u tohoto modelu těžké určit, jestli je zlepšení funkčních výstupů výsledkem regenerace axonů nebo kompenzace nepoškozenou stranou (Kwon et al. 2002). Při hemisekcii mohou také transplantované kmenové buňky silněji projevit svou plasticitu, než jak tomu bývá u transekce (Xia et al. 2013).



Obrázek 4. Dorzální pohled na míchu potkana 8 týdnů po hemisekci. Černá šipka ukazuje mezeru po vyjmutém segmentu, bílá šipka ukazuje vyplnění mezery pomocí kolagenové matrice (Shi et al. 2014).

4.4 Fotochemický model

Některá barviva jsou citlivá na světlo a po ozáření světlem o vlnové délce odpovídající maximu jejich absorpce snadno přecházejí do excitovaného stavu. K indukci míšního poranění se často využívá barvivo bengálská červeň (Bengal Rose, 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetrajodofluorescein), které se po ozáření stává zdrojem singletového kyslíku (Verdu et al. 2003). Tato forma kyslíku je vysoce reaktivní a může se podílet na peroxidaci lipidů a oxidativním poškození proteinů a nukleových kyselin. Navíc bylo prokázáno, že inhibuje činnost katalázy a superoxid dismutázy (Kim et al. 2001), důležitých enzymů, které slouží jako ochrana před oxidativním poškozením. V míše mají tyto procesy za následek hemorrhagii, edém, nekrózu šedé hmoty, poškození myelinu a dystrofii axonů (Verdu et al. 2003), tedy mechanismy odpovídající patofyziologii SCI u lidí. Kromě bengálské červeně se používá také erythrosin B (disodná sůl 2',4',5',7'-tetrajodofluoresceinu) s podobnými účinky (von Euler et al. 1996).

Aplikace těchto barviv je možná minimálně dvěma způsoby. Verdu (Verdu et al. 2003) zvolil laminectomii, rozříznutí *dury* a poté nalití roztoku barviva přímo na odhalenou míchu. Roztok snadno penetroval míšním parenchymem a po ozáření došlo k poškození převážně šedé hmoty, přičemž velikost kavity se odvíjela od doby ozáření.

Tento způsob je vhodné zvolit, je-li třeba ihned po poranění aplikovat na poraněnou tkáň nějakou látku nebo buňky. Von Eulerová (von Euler et al. 1996) zase podala barvivo intravenózně. Po dokonalém očištění obratle pak byla mícha přes kost ozářena laserovým paprskem s vlnovou délkou odpovídající absorpčnímu spektru barviva, což způsobilo oxidativní poškození vnitřního povrchu kapilár. Krevní destičky se začaly shlukovat a vytvořily trombus, následovala ischemie a později i hemorragie, vasogenní edém, dále rozpad tkáně a kavitace (von Euler et al. 1997). Výhodou tohoto způsobu je to, že nevyžaduje laminectomii. Neporušený páteřní kanál tak umožňuje výzkum procesů, například otoku, které mohou být uzavřeným prostředím ovlivněny (von Euler et al. 1997).

Fotochemické poranění míchy tedy svou patofyziologií zhruba odpovídá procesům, které se odehrávají po zranění u lidí, navíc jeho závažnost může být stupňována dobou ozáření nebo koncentrací barviva. Chybí u něj ale prvotní mechanický stimul, který většinou míšní lézi u lidí způsobuje, a je těžké odhadnout, do jaké míry tato okolnost ovlivňuje mikroprostředí centrální nervové soustavy a procesy, které v něm probíhají.

4.5 Excitotoxický model

Excitotoxický model využívá poznatku, že po poranění míchy dochází k mimořádnému zvýšení extracelulární koncentrace excitační aminokyseliny glutamátu. To následně způsobí prodloužení doby depolarizace a iniciaci kaskády buněčných procesů, které nakonec vedou ke smrti nervových a gliových buněk (viz 2.2 Sekundární poranění). Bylo zjištěno, že k excitotoxickému efektu zvýšené glutamátové hladiny v míše přispívají jak NMDA, tak non-NMDA glutamátové receptory (Liu et al. 1997a). K indukci míšního poranění lze tedy využít agonisty obou typů receptorů.

Nejběžněji se při vytváření excitotoxického modelu využívá quisqualátová kyselina (QUIS), agonista ionotropních (AMPA) i metabotropních glutamátových receptorů (Yeziarski et al. 1998; Vierck et al. 2013). Iontropní receptory regulují otevírání napětově závislých iontových kanálů a umožňují tak vtok kalciových iontů z extracelulárního prostředí do buňky, zatímco metabotropní receptory aktivují přes G-proteiny fosfolipázu C, která se účastní přenosu signálu mobilizujícího intracelulární

zásoby kalcia (Liu et al. 1997a). Obojí vede ke zvýšení koncentrace kalcia uvnitř buňky a následným degradačním procesům. Podobných účinků lze dosáhnout také využitím NMDA (Leem et al. 2010), který se váže na ionotropní NMDA glutamátové receptory.

Aplikace těchto látek do míchy probíhá následovně (Vierck et al. 2013). Po provedení laminektomie je porušena *dura mater*. Pomocí tenké skleněné mikropipety, která je připojena k Hamiltonově stříkačce a naplněna roztokem QUIS nebo NMDA, je mícha kolmo propíchnuta mezi vstupem zadních míšních kořenů a dorzální žílou. Obsah stříkačky je poté aplikován do libovolné vzdálenosti od povrchu míchy.

Po vystavení míchy QUIS i NMDA dochází ke ztrátě neuronů a kavitaci odpovídající množství injikované látky (Yeziarski et al. 1998; Leem et al. 2010). Poškození endotelu také může vést k porušení hematospinální bariéry, infiltraci krevních buněk a vzniku akutního zánětu (Leem et al. 2010). Co se týče funkčních projevů, vyskytují se u excitotoxického modelu velmi často projevy centrální bolesti (Yeziarski et al. 1998) nebo hyperalgie, tedy zvýšené vnímání bolesti, vůči tepelným a mechanickým stimulům (Yeziarski et al. 1998; Vierck et al. 2013).

Excitotoxický model představuje vhodný přístup ke studiu mechanismů zodpovědných za změny v senzoryckých funkcích a bolesti, které se nezřídka vyskytují u pacientů po SCI. Objemem dávky a přesným místem injekce je navíc možné selektivně poškodit různé oblasti šedé hmoty (Yeziarski et al. 1998). Indukce poranění je však poměrně jednostranná a stejně jako u fotochemického modelu i zde chybí prvotní mechanický stimul. Pozorované patofyziologické procesy tak nemusí být zcela totožné s těmi, které probíhají po zranění míchy u lidí.

	Výhody	Nevýhody
Kontuzní model	Precizní provedení, možnost nastavení požadovaných biomechanických parametrů, menší variabilita lézí	Aplikace jen na dorzální straně, pouze mechanické poškození, náročnost na vybavení laboratoře
Kompresní model	Dobrá simulace mechanismu SCI u lidí, mechanické i vaskulární poškození, u balónkového typu pouze malá laminektomie a vznik léze v uzavřeném prostředí	Provedení (až na statický typ) závisí na lidském faktoru, větší variabilita lézí
Transekce, hemisekce	Lze rozlišit regenerované axony od ušetřených, možnost vložit biomateriálové matrice, nosiče buněk	Náročnější na provedení i péči o zvířata, neodpovídá mechanismu SCI u lidí
Fotochemický model	Nemusí být provedena laminektomie – vznik léze v uzavřeném prostředí	Neodpovídá mechanismu SCI u lidí, ačkoliv následné patofyziologické procesy jsou podobné
Excitotoxický model	Možnost selektivně poškodit vybrané oblasti, vyšší výskyt centrální bolesti a hyperalgie – vhodný model pro jejich studium	Neodpovídá mechanismu SCI u lidí, ačkoliv následné patofyziologické procesy jsou podobné

Tabulka 1. Nejběžnější experimentální modely SCI u potkanů - shrnutí jejich výhod a nevýhod.

4.6 Ostatní modely

V předchozích kapitolách byly zmíněny nejčastěji používané modely, kterými dochází k experimentálnímu vytváření traumatické míšní léze. Tyto modely jsou ověřeny mnoha pokusy, je znám jejich princip i rizika, která s nimi vyvstávají. Existují však i jiné, méně používané; některé budou pro ilustraci stručně popsány.

Choo (Choo et al. 2009) použil zařízení, které kromě kontuze dokáže modelovat i dislokaci (posun obratlů vůči sobě laterálně nebo dorzoventrálně) a distrakci (odtažení obratlů od sebe) páteře. Dle něj jsou tyto mechanismy poranění míchy u lidí časté, ale v ostatních modelech jsou přesto opomíjeny. Zmíněné zařízení se skládá ze dvou svorek, jedné stacionární a druhé pohyblivé. Do těchto svorek jsou upevněny sousední obratle a poté je pohyblivá svorka vytažena směrem vzhůru (dislokace) nebo oddálena od stacionární (distrakce) rychlostí 100 cm/s (obr. 4). Pro uchycení do svorek musí být ovšem obratle velmi pečlivě očištěny a z tohoto důvodu je provedení distrakce a dislokace časově náročnější než kontuze (Choo et al. 2009). Choo proto doporučuje

použít tyto modely až jako doplňující. Distrakci jako alternativní způsob poškození nervové tkáně používá také Dabney (Dabney et al. 2004), jehož model ovšem vyžaduje laminektomii, a Seifert (Seifert et al. 2011), který navrhuje tento model využít k výzkumu neuroprotektivních strategií zabráňujících poranění míchy při korekčních operacích skoliózy.



Obr. 4. Obrázky znázorňující pohyb svorek při dislokaci (vlevo) a distrakci (Choo et al. 2009).

Další možností je poškození míchy nízkou nebo naopak vysokou teplotou. West (West et al. 2001) použil kryogenní sondu, jejíž konec byl tvořen smyčkou z hadičky, kterou proudil methanol vychlazený na $-5,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sondu přikládal na povrch míchy po dobu 30 minut a poté pozoroval rozpad axonů a myelinových vrstev. Poškození buněk v tomto případě způsobila mimo jiné dehydratace, jelikož intracelulární voda při použité teplotě nezamrzla a došlo tak k vytvoření osmotického gradientu (West et al. 2001). V jiné studii byla mícha chladově poškozena pomocí tekutého dusíku (Kwiatkoski et al. 2012), přičemž k degradaci došlo převážně v oblastech přilehlých k místu aplikace. Sakamoto si jako škodlivý faktor vybral teplo (Sakamoto et al. 1998). Úsek páteře uzavřel do plastové komory ve tvaru písmene U, ve které byly dvě měděné elektrody připojené k radiofrekvenčnímu generátoru. Aplikací vysokofrekvenčních vln se elektrody zahřály a tepelně poškodily míchu uvnitř páteřního kanálu.

V jiné studii (Marcol et al. 2012) byl zase využit proud vzduchu pod tlakem až 500 kPa, který byl vypuštěn z trysky dotýkající se *dury*. Náraz vzduchu způsobil pohmoždění tkáně a tento model se tak svým principem vlastně podobá kontuznímu modelu. Na rozdíl od kontuze zde však došlo k tvorbě kavit téměř výhradně v bílé

hmotě. Tento způsob je tedy vhodný spíše k výzkumu regenerace axonů a myelinizace než patofyziologie jako celku.

Všechny vyvinuté modely ovšem nemusí být příliš použitelné. Příkladem může být technika nazvaná „*strapping*“ (da Costa et al. 2008). V popisu je uvedeno, že tělo potkana bylo od lebeční báze po ocas rozděleno na čtyři stejné části. Mezi 3. a 4. částí pak byla přes kůži opatrně zavedena zakřivená jehla s nití pod úhlem 45° tak, že mířila na pravý meziobratlový otvor. Tudy byla zavedena do epidurálního prostoru, opatrně obkroužila celou míchu a levým meziobratlovým otvorem byla vyvedena zase ven. Vzniklá smyčka byla poté utažena pomocí kladky a závaží o definované hmotnosti. Takový způsob provedení působí poněkud nepravděpodobně, tento dojem navíc umocňuje fakt, že popsaný model nebyl již nikdy využit.

5 Závěr

Výzkum poranění míchy je velkou výzvou. Přestože je mu věnováno velké úsilí, neexistuje dosud žádná účinná a spolehlivá léčba, která by dokázala výrazněji zlepšit stav pacientů po SCI. V poslední době byl však zaznamenán velký pokrok, zejména díky využití kmenových buněk a jejich potenciálu v regeneraci nervové tkáně. To by však nebylo možné nebýt zvířecích modelů. U těch je totiž možné pozorovat, co se ve skutečnosti odehrává v poraněné míše a jak nervové buňky a axony reagují na aplikovanou léčbu.

V současnosti je nejčastěji využívaným zvířetem potkan. U něj bylo vyvinuto množství modelů, kterými lze vytvořit poranění míchy. Mezi nejvíce využívané patří model kontuzní, jehož výhodou je preciznost počítačově řízeného modelu a možnost nastavení biomechanických parametrů. Kompresní model zase zřejmě nejlépe simuluje reálné podmínky zranění míchy u lidí a je také méně náročný na vybavenost laboratoře. Balónkový typ navíc poskytuje tu výhodu, že léze je vytvářena v uzavřeném prostředí, což snižuje riziko infekce a variabilitu poškození. Transekce je vhodná k výzkumu regenerace axonů, protože jedině u tohoto modelu lze rozlišit mezi ušetřenými a nově zregenerovanými vlákny. Péče o zvířata po transekci je však náročná, proto se někdy využívá její alternativa hemisekce. Fotochemický a excitotoxický model jsou vytvářeny na chemické bázi a ačkoliv poměrně dobře simulují patofyziologii SCI, chybí zde prvotní mechanický stimul, který indukuje poranění míchy u lidí. Do jaké míry však tato okolnost ovlivňuje probíhající jevy, je těžké určit. Dále je možné míchu poškodit dislokací nebo distrakcí obratlů, provedení však zabere relativně hodně času, takže je doporučeno využít tyto modely jen jako doplňující. Míchu lze také poškodit teplem nebo naopak chladem, případně vysokotlakým vzduchem.

Každý experimentální model poranění míchy má své výhody a nevýhody a výběr jednoho z nich tak záleží na požadavcích dané studie. Výběru je však vhodné věnovat patřičnou pozornost, protože jen při použití vhodného modelu lze dosáhnout relevantních výsledků, které bude možné uplatnit v dalším výzkumu.

6 Seznam použitých zdrojů

6.1 Literární zdroje

Anderson, K. D., K. G. Sharp and O. Steward (2009). "Bilateral cervical contusion spinal cord injury in rats." Exp Neurol 220(1): 9-22.

Azbill, R. D., X. Mu, A. J. Bruce-Keller, M. P. Mattson and J. E. Springer (1997). "Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury." Brain Res 765(2): 283-90.

Basso, D. M., M. S. Beattie and J. C. Bresnahan (1996). "Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection." Exp Neurol 139(2): 244-56.

Beattie, M. S., J. C. Bresnahan, J. Komon, C. A. Tovar, M. Van Meter, D. K. Anderson, A. I. Faden, C. Y. Hsu, L. J. Noble, S. Salzman and W. Young (1997). "Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat." Exp Neurol 148(2): 453-63.

Becker, D., C. L. Sadowsky and J. W. McDonald (2003). "Restoring function after spinal cord injury." Neurologist 9(1): 1-15.

Bruce, J. C., M. A. Oatway and L. C. Weaver (2002). "Chronic pain after clip-compression injury of the rat spinal cord." Exp Neurol 178(1): 33-48.

Carlson, S. L., M. E. Parrish, J. E. Springer, K. Doty and L. Dossett (1998). "Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury." Exp Neurol 151(1): 77-88.

Centenaro, L. A., M. da Cunha Jaeger, J. Ilha, M. A. de Souza, L. F. Balbinot, P. S. do Nascimento, S. Marcuzzo and M. Achaval (2013). "Implications of olfactory lamina propria transplantation on hyperreflexia and myelinated fiber regeneration in rats with complete spinal cord transection." Neurochem Res 38(2): 371-81.

da Costa, E. S., A. L. Carvalho, A. M. Martinez, B. De-Ary-Pires, M. A. Pires-Neto and R. de Ary-Pires (2008). "Strapping the spinal cord: an innovative experimental model of CNS injury in rats." J Neurosci Methods 170(1): 130-9.

Dabney, K. W., M. Ehrenshteyn, C. A. Agresta, J. L. Twiss, G. Stern, L. Tice and S. K. Salzman (2004). "A model of experimental spinal cord trauma based on computer-controlled intervertebral distraction: characterization of graded injury." Spine (Phila Pa 1976) 29(21): 2357-64.

Fee, D. B., K. R. Swartz, K. M. Joy, K. N. Roberts, N. N. Scheff and S. W. Scheff (2007). "Effects of progesterone on experimental spinal cord injury." Brain Res 1137(1): 146-52.

Fitch, M. T., C. Doller, C. K. Combs, G. E. Landreth and J. Silver (1999). "Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma." J Neurosci 19(19): 8182-98.

Grulova, I., L. Slovinska, M. Nagyova, M. Cizek and D. Cizkova (2013). "The effect of hypothermia on sensory-motor function and tissue sparing after spinal cord injury." Spine J 13(12): 1881-91.

Gruner, J. A., A. K. Yee and A. R. Blight (1996). "Histological and functional evaluation of experimental spinal cord injury: evidence of a stepwise response to graded compression." Brain Res 729(1): 90-101.

Huang, W. L., K. J. George, V. Ibba, M. C. Liu, S. Averill, M. Quartu, P. J. Hamlyn and J. V. Priestley (2007). "The characteristics of neuronal injury in a static compression model of spinal cord injury in adult rats." Eur J Neurosci 25(2): 362-72.

Choo, A. M., J. Liu, Z. Liu, M. Dvorak, W. Tetzlaff and T. R. Oxland (2009). "Modeling spinal cord contusion, dislocation, and distraction: characterization of vertebral clamps, injury severities, and node of Ranvier deformations." J Neurosci Methods 181(1): 6-17.

Chung, W. H., J. H. Lee, D. J. Chung, W. J. Yang, A. J. Lee, C. B. Choi, H. S. Chang, D. H. Kim, H. J. Chung, H. J. Suh, S. H. Hwang, H. Han, S. H. Do and H. Y. Kim (2013). "Improved rat

spinal cord injury model using spinal cord compression by percutaneous method." J Vet Sci 14(3): 329-35.

Iwasaki, M., J. T. Wilcox, Y. Nishimura, K. Zweckberger, H. Suzuki, J. Wang, Y. Liu, S. K. Karadimas and M. G. Fehlings (2014). "Synergistic effects of self-assembling peptide and neural stem/progenitor cells to promote tissue repair and forelimb functional recovery in cervical spinal cord injury." Biomaterials 35(9): 2617-29.

Jazayeri, S. B., M. Firouzi, S. Abdollah Zadegan, N. Saeedi, E. Pirouz, M. Nategh, I. Jahanzad, A. Mohebbi Ashtiani and V. Rahimi-Movaghar (2013). "The effect of timing of decompression on neurologic recovery and histopathologic findings after spinal cord compression in a rat model." Acta Med Iran 51(7): 431-7.

Kim, S. Y., O. J. Kwon and J. W. Park (2001). "Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye." Biochimie 83(5): 437-44.

Kwiatkoski, M., F. S. Guimaraes and E. Del-Bel (2012). "Cannabidiol-treated rats exhibited higher motor score after cryogenic spinal cord injury." Neurotox Res 21(3): 271-80.

Kwon, B. K., T. R. Oxland and W. Tetzlaff (2002). "Animal models used in spinal cord regeneration research." Spine (Phila Pa 1976) 27(14): 1504-10.

Labombarda, F., M. C. Gonzalez Deniselle, A. F. De Nicola and S. L. Gonzalez (2010). "Progesterone and the spinal cord: good friends in bad times." Neuroimmunomodulation 17(3): 146-9.

Leem, Y. J., J. W. Joh, K. W. Joeng, J. H. Suh, J. W. Shin and J. G. Leem (2010). "Central Pain from Excitotoxic Spinal Cord Injury Induced by Intraspinal NMDA Injection: A Pilot Study." Korean J Pain 23(2): 109-15.

Liu, D., G. Y. Xu, E. Pan and D. J. McAdoo (1999). "Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury." Neuroscience 93(4): 1383-9.

Liu, S., G. L. Ruenes and R. P. Yeziarski (1997a). "NMDA and non-NMDA receptor antagonists protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord." Brain Res 756(1-2): 160-7.

Liu, X. Z., X. M. Xu, R. Hu, C. Du, S. X. Zhang, J. W. McDonald, H. X. Dong, Y. J. Wu, G. S. Fan, M. F. Jacquin, C. Y. Hsu and D. W. Choi (1997b). "Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury." J Neurosci 17(14): 5395-406.

Lo, T. P., Jr., K. S. Cho, M. S. Garg, M. P. Lynch, A. E. Marcillo, D. L. Koivisto, M. Stagg, R. M. Abril, S. Patel, W. D. Dietrich and D. D. Pearse (2009). "Systemic hypothermia improves histological and functional outcome after cervical spinal cord contusion in rats." J Comp Neurol 514(5): 433-48.

Lonjon, N., P. Kouyoumdjian, M. Prieto, L. Bauchet, H. Haton, M. Gaviria, A. Privat and F. E. Perrin (2010). "Early functional outcomes and histological analysis after spinal cord compression injury in rats." J Neurosurg Spine 12(1): 106-13.

Marcol, W., W. Slusarczyk, M. Gzik, M. Larysz-Brysz, M. Bobrowski, B. Grynkiewicz-Bylina, P. Rosicka, K. Kalita, W. Weglarz, J. J. Barski, K. Kotulska, K. Labuzek and J. Lewin-Kowalik (2012). "Air gun impactor--a novel model of graded white matter spinal cord injury in rodents." J Reconstr Microsurg 28(8): 561-8.

Oyinbo, C. A. (2011). "Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade." Acta Neurobiol Exp (Wars) 71(2): 281-99.

Pearse, D. D., T. P. Lo, Jr., K. S. Cho, M. P. Lynch, M. S. Garg, A. E. Marcillo, A. R. Sanchez, Y. Cruz and W. D. Dietrich (2005). "Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat." J Neurotrauma 22(6): 680-702.

Poon, P. C., D. Gupta, M. S. Shoichet and C. H. Tator (2007). "Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates." Spine (Phila Pa 1976) 32(25): 2853-9.

Popovich, P. G., P. Wei and B. T. Stokes (1997). "Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats." J Comp Neurol 377(3): 443-64.

Reynolds, L. F., M. C. Bren, B. C. Wilson, G. D. Gibson, M. S. Shoichet and R. J. Murphy (2008). "Transplantation of porous tubes following spinal cord transection improves hindlimb function in the rat." Spinal Cord 46(1): 58-64.

Ritz, M. F. and O. N. Hausmann (2008). "Effect of 17beta-estradiol on functional outcome, release of cytokines, astrocyte reactivity and inflammatory spreading after spinal cord injury in male rats." Brain Res 1203: 177-88.

Roussos, I., M. Rodriguez, D. Villan, A. Ariza, L. Rodriguez and J. Garcia (2005). "Development of a rat model of spinal cord injury and cellular transplantation." Transplant Proc 37(9): 4127-30.

Sakamoto, T., W. W. Monafu, W. F. Hickey and S. G. Eliasson (1998). "Noncontusive segmental spinal cord injury using radiofrequency current." J Trauma 45(2): 345-52.

Samantaray, S., J. A. Smith, A. Das, D. D. Matzelle, A. K. Varma, S. K. Ray and N. L. Banik (2011). "Low dose estrogen prevents neuronal degeneration and microglial reactivity in an acute model of spinal cord injury: effect of dosing, route of administration, and therapy delay." Neurochem Res 36(10): 1809-16.

Seifert, J. L., J. E. Bell, B. B. Elmer, D. J. Sucato and M. I. Romero (2011). "Characterization of a novel bidirectional distraction spinal cord injury animal model." J Neurosci Methods 197(1): 97-103.

Shi, Q., W. Gao, X. Han, X. Zhu, J. Sun, F. Xie, X. Hou, H. Yang, J. Dai and L. Chen (2014). "Collagen scaffolds modified with collagen-binding bFGF promotes the neural regeneration in a rat hemisectioned spinal cord injury model." Sci China Life Sci 57(2): 232-40.

Scheff, S. W., A. G. Rabchevsky, I. Fugaccia, J. A. Main and J. E. Lump, Jr. (2003). "Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device." J Neurotrauma 20(2): 179-93.

Schmitt, C., G. S. Miranpuri, V. K. Dhodda, J. Isaacson, R. Vemuganti and D. K. Resnick (2006). "Changes in spinal cord injury-induced gene expression in rat are strain-dependent." Spine J 6(2): 113-9.

Stamegna, J. C., M. S. Felix, J. Roux-Peyronnet, V. Rossi, F. Feron, P. Gauthier and V. Matarazzo (2011). "Nasal OEC transplantation promotes respiratory recovery in a subchronic rat model of cervical spinal cord contusion." Exp Neurol 229(1): 120-31.

Stirling, D. P., K. Khodarahmi, J. Liu, L. T. McPhail, C. B. McBride, J. D. Steeves, M. S. Ramer and W. Tetzlaff (2004). "Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury." J Neurosci 24(9): 2182-90.

Streit, W. J., S. L. Semple-Rowland, S. D. Hurley, R. C. Miller, P. G. Popovich and B. T. Stokes (1998). "Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis." Exp Neurol 152(1): 74-87.

Thomas, A. J., R. P. Nockels, H. Q. Pan, C. I. Shaffrey and M. Chopp (1999). "Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats." Spine (Phila Pa 1976) 24(20): 2134-8.

Toksoz, S., S. R. Erdem, C. L. Peskircioglu and U. Keskin (2013). "The effect of long-term oral tadalafil treatment on corpus cavernosum function in an experimental spinal cord transection rat model." Spinal Cord 51(9): 663-7.

Totoiu, M. O. and H. S. Keirstead (2005). "Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination." J Comp Neurol 486(4): 373-83.

Urdzikova, L. and I. Vanicky (2006). "Post-traumatic moderate systemic hyperthermia worsens behavioural outcome after spinal cord injury in the rat." Spinal Cord 44(2): 113-9.

Vanicky, I., L. Urdzikova, K. Saganova, D. Cizkova and J. Galik (2001). "A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat." J Neurotrauma 18(12): 1399-407.

Vaughn, C. N., J. L. Iafrate, J. B. Henley, E. K. Stevenson, I. G. Shlifer and T. B. Jones (2013). "Cellular neuroinflammation in a lateral forceps compression model of spinal cord injury." Anat Rec (Hoboken) 296(8): 1229-46.

Verdu, E., G. Garcia-Alias, J. Fores, J. M. Vela, J. Cuadras, R. Lopez-Vales and X. Navarro (2003). "Morphological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat." J Neurotrauma 20(5): 483-99.

Vierck, C. J., C. D. King, S. A. Berens and R. P. Yeziarski (2013). "Excitotoxic injury to thoracolumbar gray matter alters sympathetic activation and thermal pain sensitivity." Exp Brain Res 231(1): 19-26.

von Euler, M., E. Akesson, E. B. Samuelsson, A. Seiger and E. Sundstrom (1996). "Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats." Exp Neurol 137(2): 242-54.

von Euler, M., A. Seiger and E. Sundstrom (1997). "Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations." Exp Neurol 145(2 Pt 1): 502-10.

von Euler, M., E. Sundstrom and A. Seiger (1997). "Morphological characterization of the evolving rat spinal cord injury after photochemically induced ischemia." Acta Neuropathol 94(3): 232-9.

West, N. R., V. Leblanc and G. H. Collins (2001). "Support of axonal regrowth by endogenous mechanisms following spinal cord injury in adult rats." Neuropathology 21(3): 188-202.

Xia, G. N., Y. Zou, Y. C. Wang, Q. J. Xia, B. T. Lu, T. H. Wang and J. G. Qi (2013). "Neural stem cells grafts decrease neural apoptosis associated with caspase-7 downregulation and

BDNF upregulation in rats following spinal cord hemisection." *Cell Mol Neurobiol* 33(7): 1013-22.

Xu, G. Y., M. G. Hughes, Z. Ye, C. E. Hulsebosch and D. J. McAdoo (2004). "Concentrations of glutamate released following spinal cord injury kill oligodendrocytes in the spinal cord." *Exp Neurol* 187(2): 329-36.

Yeziarski, R. P., S. Liu, G. L. Ruenes, K. J. Kajander and K. L. Brewer (1998). "Excitotoxic spinal cord injury: behavioral and morphological characteristics of a central pain model." *Pain* 75(1): 141-55.

Zhang, Y. K., J. T. Liu, Z. W. Peng, H. Fan, A. H. Yao, P. Cheng, L. Liu, G. Ju and F. Kuang (2013). "Different TLR4 expression and microglia/macrophage activation induced by hemorrhage in the rat spinal cord after compressive injury." *J Neuroinflammation* 10: 112.

6.2 Internetové zdroje

Facts and Figures at a Glance. *NSCISC National Spinal Cord Injury Statistical Center* [online]. 2013 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <https://www.nscisc.uab.edu/>

Statistiky. *Česká společnost pro míšňí léze ČLS JEP* [online]. 2014 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://www.spinalcord.cz/cz/statistiky/>

Animal Welfare - Program ochrany zvířat, situace v roce 2012. *Státní veterinární správa* [online]. 2013 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/svs/portal/dokumenty-a-publikace/prehled-podle-let/x2013/animal-welfare-program-ochrany-zvirat-2012.html>

Annual Statistical Reports. *NSCISC National Spinal Cord Injury Statistical Center* [online]. 2013 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <https://www.nscisc.uab.edu/reports.aspx>