

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

2.lékařská fakulta

a

Ústav Experimentální Medicíny, AVČR, v. v. i.



**Mgr. Jiří Růžička**

**Léčba míšního poranění s využitím kmenových buněk a modifikovaných biomateriálů**

Doktorská práce

Školitel: Doc. RNDr. Pavla Jendelová, PhD.

Praha 2015

## **Poděkování**

Velmi rád bych poděkoval své školitelce Doc. RNDr Pavle Jendelové, PhD. za její trpělivé vedení a rady, jež mi poskytovala během celého mého studia a její vstřícnost, se kterou mi pomohla vše dokončit řádně, včas a s přesvědčením, že chci nadále pokračovat cestou vědy. Dále bych rád poděkoval všem mým kolegům a technickým pracovníkům za jejich podíl na experimentech a trpělivost, s níž mne naučili všechny potřebné techniky. Neméně rád bych poděkoval profesorům z 2. lékařské fakulty za znalosti, podporu a vřelý přístup během mého doktorandského studia.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 27.11.2015

Mgr. Jiří Růžička

**Identifikační záznam:**

RŮŽIČKA, Jiří. *Léčba míšního poranění s využitím kmenových buněk a modifikovaných biomateriálů [Stem cells and biomaterials for the treatment of experimental models of spinal cord injury]*. Praha, 2015. 133 str., 4 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Ústav neurověd 2. LF Univerzity Karlovy v Praze. Školitel- doc. RNDr. Pavla Jendelová Ph.D.

**Klíčová slova:** Míšní poranění, kmenové buňky, hydrogely, hematopoetické faktory

**Key words:** Spinal cord injury, Stem cells, Hydrogels, Hematopoetic factors

## Publikace autora

### Publikace autora relevantní k disertační práci

**J. Ruzicka**, N. Romanyuk, A. Hejcl, M. Vetric, M. Hruby, G. Cocks, J. Cihlar, M. Pradny, J. Price, E. Sykova and P. Jendelova "Treating spinal cord injury in rats with a combination of human fetal neural stem cells and hydrogels modified with serotonin." (2013) Acta Neurobiol Exp (Wars) **73**(1): 102-15. **IF 1,286**

*Podíl studenta: 40%; behaviorální testy, mikroskopie, imunohistochemická analýza, analýza dat, statistika a psaní článku*

**J. Růžička**, L. Machová Urdzíkova, J. Gillick, T. Amemori, N. Romanyuk, K. Kárová, K. Závísková, J. Dubišová, Š. Kubinová, R. Murali, E. Syková<sup>1,2</sup>, M. Jhanwar-Uniyal<sup>3</sup> and P. Jendelová "A comparative study of stem cells (mesenchymal, spinal precursor and iPS derived neural precursors) for treatment of spinal cord injury, in rat" **submitted**

*Podíl studenta: 30 %; operace a implantace (částečně), behaviorální testy (částečně), mikroskopie, histologické a imunohistochemické analýzy, analýza dat a statistika, psaní článku.*

A. Hejcl, **J. Ruzicka**, M. Kapcalova, K. Turnovcova, E. Krumbholcova, M. Pradny, J. Michalek, J. Cihlar, P. Jendelova and E. Sykova "Adjusting the chemical and physical properties of hydrogels leads to improved stem cell survival and tissue ingrowth in spinal cord injury reconstruction: a comparative study of four methacrylate hydrogels." (2013) Stem Cells Dev **22**(20): 2794-805. **IF 3,727**

*Podíl studenta: 25%; mikroskopie, analýza růstu a přežívání MSC in vitro a in vivo, analýza tkáňové kompatibility a vrůstání axonů a kapilár do materiálu in vivo*

L. Urdzikova, K. Likavcanova-Masinova, V. Vanecek, **J. Ruzicka**, J. Sedy, E. Sykova and P. Jendelova "Flt3 ligand synergizes with granulocyte-colony-stimulating factor in bone marrow mobilization to improve functional outcome after spinal cord injury in the rat." (2011) Cytotherapy **13**(9): 1090-104. **IF 3,293**

*Podíl studenta: 10%; mikroskopie, Imunohistochemická analýza a analýza dat (částečně)*

## **Další publikace autora**

L. M. Urdzikova, **J. Ruzicka**, M. LaBagnara, K. Karova, S. Kubinova, K. Jirakova, R. Murali, E. Sykova, M. Jhanwar-Uniyal and P. Jendelova "Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat."(2014) Int J Mol Sci **15**(7): 11275-93. **IF 2,862**

V. Vanecek, V. Zablotskii, S. Forostyak, **J. Ruzicka**, V. Herynek, M. Babic, P. Jendelova, S. Kubinova, A. Dejneka and E. Sykova "Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury." (2012) Int J Nanomedicine **7**: 3719-30. **IF 4,383**

L. M. Urdzikova, R. Sedlacek, T. Suchy, T. Amemori, **J. Ruzicka**, P. Lesny, V. Havlas, E. Sykova and P. Jendelova "Human multipotent mesenchymal stem cells improve healing after collagenase tendon injury in the rat." (2014) Biomed Eng Online **13**(1): 42. **IF 1,427**

T. Amemori, P. Jendelova, **J. Ruzicka**, L. M. Urdzikova, E. Sykova. Alzheimer's Disease: Mechanism and Approach to Cell Therapy.(2015) Int J Mol Sci Nov 4;**16**(11):26417-51. Review. **IF 2,983**

## Obsah

Poděkování.....	2
Publikace autora.....	5
Publikace autora relevantní k disertační práci.....	5
Další publikace autora.....	6
Seznam zkratk .....	11
Úvod.....	14
Patofyziologie míšního poranění, primární poranění.....	16
Okamžitá fáze poranění.....	19
Sekundární fáze poranění.....	20
Akutní fáze poranění.....	20
Subakutní fáze poranění.....	22
Chronická fáze poranění .....	23
Mechanismy endogenní regenerace a jejich omezení.....	25
Ependymální buňky .....	25
Kolaterální sprouting.....	26
Omezení regenerace CNS .....	27
Faktory urychlující endogenní regeneraci.....	29
Neurotrofní a jiné růstové faktory.....	30
Molekuly zvyšující plasticitu systému .....	32
Kmenové buňky v léčbě míšního poranění.....	33
Embryonální kmenové buňky .....	34

Indukované pluripotentní buňky .....	36
Fetální kmenové buňky .....	38
Dospělé kmenové buňky .....	40
Biomateriály pro implantaci do míšního poranění .....	43
Hydrogely .....	45
Kombinované terapie po MP .....	51
Experimentální modely míšního poranění .....	52
Sekční modely .....	52
Neostré modely .....	54
Hypotézy a cíle práce .....	58
Materiál a metodika práce .....	60
Pokusná zvířata .....	60
Balonková kompresní léze .....	60
Laterální hemisekce míchy .....	61
Intravenózní Aplikace Flt3 ligandu a G-CSF .....	61
Implantace kmenových buněk .....	61
Typy použitých buněk .....	62
Implantace hydrogelu .....	64
Typy použitých hydrogelů .....	64
Behaviorální testy .....	66
Open field, BBB .....	66
Chůze po kladině .....	68



Rotarod test .....	68
Plantar test.....	68
Zpracování tkáně, histologie a imunohistochemie.....	69
Bílá a šedá hmota míšni .....	69
Axonální sprouting.....	70
Axony a kapilární řečiště .....	70
Gliová jizva .....	70
Detekce a diferenciacie buněk <i>in vitro</i> nebo <i>in vivo</i> .....	71
Cytokinová analýza-Luminex .....	71
Statistická analýza.....	72
Výsledky .....	73
Aplikace Flt3 ligandu spolu s G-CSF vede k synergickému efektu v léčbě míšního poranění u potkana. ....	73
Implantace lidských mesenchymálních kmenových buněk, neurálních prekursorů z fetální míchy (SPC-01), či diferenciovaných z iPS (NP-iPS) vede k zlepšení neurologických funkcí po MP, ale využívá různé mechanismy účinku. ....	78
Modifikace povrchu metakrylátových hydrogelů peptidickými sekvencemi a různý tvar pórů ovlivňují adhezi, růst a přežívání kmenových buněk v hydrogelovém implantátu <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> .....	89
PHEMA hydrogel s navázaným serotoninem vede k zvýšené diferenciaci spinálních fetálních prekursorů, avšak ne k funkčnímu zlepšení v experimentálním modelu hemisekce míchy.....	96
Diskuze.....	103

Osud kmenových buněk po implantaci- vliv prostředí na přežívání buněk, proliferaci a diferenciaci.....	104
Vliv léčby na zachování bílé a šedé hmoty míšni .....	106
Modulace gliové jizvy a axonální sprouting .....	107
Původ kmenových buněk má vliv na imunitní odpověď tkáně .....	109
Tvar pórů a modifikace povrchu hydrogelů má zásadní vliv na infiltraci specifických elementů míšni tkáně.....	111
Vliv buněčné terapie na navrácení lokomoční funkce po MP.....	112
Závěry .....	115
Souhrn .....	116
Summary .....	117
Reference .....	118

## **Seznam zkratek**

AK- Aminokyselina

BBB test- Basso Beattie a Bresnahan test

BDNF- Brain derived neurotrophic factor (z mozku derivovaný neurotrofický faktor)

BI- before injury (Před indukcí léze)

CNS- Centrální nervový systém

CNTF- Ciliary neurotrophic factor (řasinkový neurotrofický faktor)

ESC- Embryonic stem cells (Embryonální kmenové buňky)

FR- Fyziologický roztok

FGF- fibroblast growth factor (fibroblastový růstový faktor)

GAP43- Growth associated protein 43 (s růstem asociovaný protein43)

G-CSF- Granulocyte colony- stimulating factor (factor stimulující kolonie granulocytů)

GD- Gyrus dentatus

GDNF- Glial derived neurotrophic factor (z glií derivovaný neurotrofický faktor)

GFAP- Glial fibrillary acidic protein (gliální fibrilární acidický faktor)

GFP- Green fluorescence protein (zelený flourescenční protein)

GM-CSF- Granulocyte macrophage colony- stimulating factor (factor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů)

GMP- Good manufacturing practice

HEB- hematoencefalická bariera

HEMA- Hydroxyethylmetakrylát

HPMA- Hydroxypropylmetakrylamid

IL- interleukin

iPS(C)- induced pluripotent stem cells (indukované pluripotentní buňky)

LIF- Leukemia inhibitory factor (Leukemii inhibující faktor)

MAG- Myelin associated glycoprotein (myelin asociované glykoproteiny)

MCP- Monocyte chemotactic protein (chemotaktický protein monocytů)

MIP1 $\alpha$ - Macrophage inflammatory factor 1a (zánětlivý faktor makrofágů 1a)

MSC- Mesenchymal stem cells (mesenchymální kmenové buňky)

MP- míšň poranění (SCI, spinal cord injury)

NF- Neurofilamenta

NGF- Nerve growth factor (nervový růstový faktor)

Nogo- Neurite outgrowth inhibitor (inhibitor růstu neuritů)

NP- Neurální prekurzor

NSC- Neural stem cells (neurální kmenové buňky)

NT3- Neurotrophin 3 (Neurotrofin 3)

OMGP- Oligodendrocyte myelin glycoprotein (oligodendrocytové myelin glykoproteiny)

PB- Phosphate buffer (fosfátový pufr)

PNS- Periferní nervový systém

qPCR- Quantitative polymerase chain reaction (kvantitativní polymerázová řetězová reakce)

RANTES- Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (po aktivaci regulovaný, normálními T-buňkami exprimovaný a vylučovaný faktor)

RECA- Rat endothelial cell antibody (potkaní protilátka proti endoteliálním buňkám)

RGD- Primární sekvence AK (Arg-Gly-Asp)

SIKVAV- Primární sekvence AK (Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val)

SGZ- Subgranulární zóna

SVZ- Subventrikulární zóna

TNF $\alpha$ - Tumor necrosis factor  $\alpha$  (nádor nekrotizující faktor  $\alpha$ )

TR- Transplantation (Transplantace (buněk))

Trk A, B, C – tropomyosin related kinase A, B, C (s tropomyosinem spojená kináza A, B, C)

## Úvod

Poranění míchy je jednou z nejčastějších příčin invalidity a úmrtí po celém světě. Světově je k již existujícím milionům pacientů roční nárůst jedinců s míšním poraněním (MP) o 130 tisíc. Nejčastější příčinou traumatických míšních poranění jsou autonehody a pády, i když se zvyšujícím se věkem zároveň přibývá i velké procento netraumatických poškození míchy (van den Berg, Castellote, Mahillo-Fernandez, & de Pedro-Cuesta, 2010). První poznatky o míšním poranění jsou známy již z roku 3000 př. n. l. a jsou připisovány slavnému lékaři Imhotepovi, Tyto poznámky popisují poranění míchy jako „nemoc, která nemůže být ošetřena“. Tato velmi pesimistická diagnóza prochází napříč historií až do počátku 20. století. Během první a především pak druhé světové války dochází k zásadním pokrokům v moderní medicíně, které tuto diagnózu pozměňují z „nemoci, jež nemůže být ošetřena“ na nemoc, jejíž důsledky nemohou být kompletně vyléčeny, avšak jejíž ošetření je nejen možné, ale i významně zlepšuje prognózu pacientů. Hlavní změna přicházela s výrazně delším přežíváním pacientů s MP a s jejich možností se začlenit nazpět do sociálního života. K tomuto pokroku vedlo především zavedení komplexního přístupu k pacientům s MP. Myšlenka komplexního přístupu vedla Donalda Munroa již v roce 1936 k založení prvního spinálního centra a to v Bostonské městské nemocnici (Boston, USA). V roce 1944 bylo založeno sírem Ludwigem Guttmanem národní spinální centrum ve Stoke Mandeville (Buckingham, UK), které posléze sloužilo jak vzor pro vznik center tohoto typu v okolních evropských zemích. V této době začal být uplatňován multidisciplinární přístup k léčbě míšního poranění (Donovan, 2007). Jednou z ústředních postav paraplegiologie v České republice je prof. Beneš, který v roce 1961 vydal monografii „Poranění míchy“, v níž popisuje ucelenou ošetrovatelskou a rehabilitační péči s odkazem právě na Ludwiga Guttmana. Tato koncepce vedla k významnému snížení úmrtnosti pacientů s MP. Ve své monografii klade důraz na včasnou dekompresi poraněné míchy s ohledem na kaskády sekundárních procesů poranění. Zároveň předkládá nutnost specializovaných spinálních jednotek, kam jsou pacienti po diagnóze co nejdříve převezeni a komplexně ošetřováni i z hlediska přidružených komplikací. Dále klade důraz na propojení těchto specializovaných center

s centry rehabilitačními (Benes, 1987). První spinální jednotku v České republice se podařilo vybudovat až v roce 1992 prof. Wendschemu a to v Brněnské úrazové nemocnici. Dnešními klinickými nástroji jsou především včasná chirurgická dekomprese poraněné míchy a stabilizace páteře (Fehlings, Rabin, Sears, Cadotte, & Aarabi, 2010), zpomalení procesů navazujících na primární poranění, například lokálním ochlazením (Ahmad, Wang, & Levi, 2014), použití kortikosteroidů (Bracken, 2012) a správně načasovaná a dlouhodobá rehabilitace, či jejich vzájemná kombinace (Hansebout & Hansebout, 2014). Od dlouhodobě používaných kortikosteroidů se v dnešní době často ustupuje. Kontroverzní debata o jejich účinnosti a vedlejších účincích léčby provází jejich používání již přes 20 let (Breslin & Agrawal, 2012). Přestože lékařská péče výrazně zvýšila přežívání pacientů s MP, nadále zůstává úmrtnost pacientů až třikrát vyšší ve srovnání s věkově relevantní zdravou populací (van den Berg, Castellote, de Pedro-Cuesta, & Mahillo-Fernandez, 2010). Navzdory dnešní moderní medicíně neexistuje funkční klinická léčba míšního poranění. Složitost patologie míšního poranění a celkově nervového systému vyžaduje víceúrovňové léčebné postupy zajišťující stabilizaci prostředí, poskytnutí opěrného systému pro přemostění vzniklé kavity, zesílení přirozené regenerace systému a nahrazení odumřelých neuronů a glií. Takový přístup musí zahrnovat kombinaci účinných terapií, vyznačujících se správným načasováním a synergistickým efektem. Experimentální metody regenerativní medicíny zahrnují aplikace kmenových buněk či jejich produktů, implantace biomateriálů pro přemostění léze a využití celé řady růstových či imunomodulačních faktorů vykazujících dlouhodobě slibné preklinické a v poslední době i klinické výsledky.

Tato práce se zabývá studiem experimentálních prostředků využitelných v léčbě míšního poranění. Porovnává nejčastěji používané typy kmenových buněk, jejich využití v kombinaci s bioaktivními hydrogely, mechanismy působení terapie na sekundární procesy poranění a na obnovu lokomočních funkcí po poranění míchy.

## Patofyziologie míšního poranění, primární poranění

Primární poškození vzniká v důsledku mechanického impulsu překonávajícího strukturální limity buněk a tkáně. Je charakterizováno jednak nespecifickou ztrátou neuronů a glií a jednak subletálním poškozením buněk (LaPlaca, Simon, Prado, & Cullen, 2007). Přeživší poškozená tkáň se tak stává citlivá ke kaskádě sekundárních procesů poranění, jež zahrnují vaskulární, biochemické a prozánětlivé změny vedoucí k prodloužené apoptóze a degeneraci tkáně, (Kwon, Tetzlaff, Grauer, Beiner, & Vaccaro, 2004; Rowland, Hawryluk, Kwon, & Fehlings, 2008). Dvěma základními parametry biomechaniky míšního poranění jsou síla působení a napětí, které vedou k deformaci a natažení, či rotaci míšní tkáně. Dle biomechanického impaktu se MP dělí na kontuzi, kompresi, maceraci a laceraci. MP dále dělíme na otevřená a uzavřená. Otevřená MP vznikají především vniknutím ostrého předmětu do páteřního kanálu, a tudíž jsou většinou traumatického typu. Uzavřená poškození míchy mohou vznikat z různých příčin a to jak traumatických, jako jsou nehody, pády, či střelná poranění, tak z vnitřních příčin, jako je tlak vznikajícího nádoru na páteřní kanál či ischemická léze. Z hlediska klinického projevu zásadní roli hrají míra a segment poškození. Míra poškození je kategorizována pomocí stupnic, z nichž nejznámější je hodnotící škála American Spinal Injury Association (ASIA, Tab. 1.) a Frankelova škála (Tab. 2.). Mezinárodní standard pro neurologickou klasifikaci míšního poranění zahrnuje 5 stupňů A-E, kde A označuje kompletní lézi, kde není zachována žádná lokomoční ani sensorická funkce, až po E, jakožto zdravého jedince. Úroveň poranění pak určuje, od jakého segmentu níže bude mít pacient disfunkční sensorické a lokomoční dráhy a zároveň jaké vedlejší procesy poranění budou následovat. Základní rozdělení při kompletním poranění je na paraplegii (poškození v thorako-lumbální úrovni), tetraplegii (poškození v úrovni cervikothorakální úrovni) a pentaplegii (poškození ve vyšší cervikální úrovni) (Obr. 1.). Kompletní poranění je málo časté. Ve většině případů zůstává zachována část přežívající tkáně, kde v případě účinné léčby je možnost alespoň částečného návratu funkce. Ovlivnění sekundárních patologických procesů, které hrají významnou roli v konečné velikosti léze, může proto vést k výraznému funkčnímu zlepšení po MP.





**Tabulka 1. hodnotící škála dle American Spinal Injury Association**

ASIA	Popis postižení
A	Kompletní transversální léze míšní. Žádná senzitivní či motorická funkce míchy v segmentu S <sub>4-5</sub>
B	Inkompletní léze míšní. Zachovaná senzitivní, ale žádná motorická funkce, včetně segmentů S <sub>4-5</sub>
C	Inkompletní léze míšní. Zachovaná motorická funkce pod místem poranění, více než polovina klíčových svalů síla méně než 3.
D	Inkompletní léze míšní. Zachovaná motorická funkce pod místem poranění, více než polovina klíčových svalů síla 3 a výše.
E	Normální motorické a senzitivní funkce pod místem poranění.

*Tabulka 1. Překlad hodnotící škály dle ASIA (www.asia-spinalinjury.org).*

**Tabulka 2. Frankelova hodnotící škála**

Frankel	Popis postižení
A	Žádná motorická či senzitivní funkce pod místem poranění.
B	Přítomnost pouze senzitivních funkcí, nikoliv motorických.
C	Přítomnost motorické funkce, ale neužitečné.
D	Přítomnost užitečné motorické funkce.
E	Normální motorické a senzitivní funkce.

*Tabulka2. Překlad hodnotící škály dle Frankela.( http://www.surgicalneurology.org/spine/)*

## Obrázek 1. American Spinal Injury Association protokol hodnocení

Patient Name \_\_\_\_\_  
 Examiner Name \_\_\_\_\_ Date/Time of Exam \_\_\_\_\_

**ASIA** INTERNATIONAL STANDARDS FOR NEUROLOGICAL **ISCOS**  
 AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY

**MOTOR**  
 KEY MUSCLES (scoring on reverse side)

	R	L	
C5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Elbow flexors
C6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Wrist extensors
C7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Elbow extensors
C8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Finger flexors (distal phalanx of middle finger)
T1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Finger abductors (little finger)

UPPER LIMB TOTAL (MAXIMUM)  +  =   
 (25) (25) (50)

Comments: \_\_\_\_\_

**SENSORY**  
 KEY SENSORY POINTS

0 = absent  
 1 = altered  
 2 = normal  
 NT = not testable

LIGHT TOUCH PIN PRICK  
 R L R L

C2				
C3				
C4				
C5				
C6				
C7				
C8				
T1				
T2				
T3				
T4				
T5				
T6				
T7				
T8				
T9				
T10				
T11				
T12				
L1				
L2				
L3				
L4				
L5				
S1				
S2				
S3				
S4-5				

TOTALS (MAXIMUM)  (56)  (56) =  (56)

(DAP) Deep anal pressure (yes/no)   
 PIN PRICK SCORE (max 112)   
 LIGHT TOUCH SCORE (max 112)

**NEUROLOGICAL LEVEL**  
 The most caudal segment with normal function

SENSORY MOTOR R L

**SINGLE NEUROLOGICAL LEVEL**

**COMPLETE OR INCOMPLETE?**   
 Incomplete = Any sensory or motor function in S4-S5

**ASIA IMPAIRMENT SCALE (AIS)**

**ZONE OF PARTIAL PRESERVATION**  
 (in complete [tetraplex] only)  
 Most caudal level with any innervation

SENSORY MOTOR R L

• Key Sensory Points

This form may be copied freely but should not be altered without permission from the American Spinal Injury Association. REV 0411

Obrázek 1. ASIA protokol pro hodnocení pohyblivosti a senzorických vjemů v jednotlivých dermatomech a myotomech ([www.asia-spinalinjury.org](http://www.asia-spinalinjury.org)).

### Okamžitá fáze poranění

Okamžitá fáze poranění se vyznačuje lokálními i systémovými změnami. Tyto děje probíhají v rámci sekund po poranění. V důsledku primárního impaktu dochází k poškození cévního řečiště, a tudíž ke krvácení, intravaskulární trombóze a otoku, což vede k následné ischemizaci tkáně a tvorbě kyslíkových radikálů. Následkem kombinace nekrotické smrti buněk, oxidativního stresu a poškození buněčných membrán dochází k vzniku iontové disbalance a blokadě přenosu signálu. Intracelulární komponenty a excitotoxické molekuly (některé neurotransmitery, např. glutamát) ve zvýšené koncentraci dále poškozují neurony v okolí léze. Porucha funkce neuronů přispívá k rozvoji míšního šoku a následné ztrátě funkce míšní tkáně pod úrovní poranění (Kwon *et al.*, 2004).

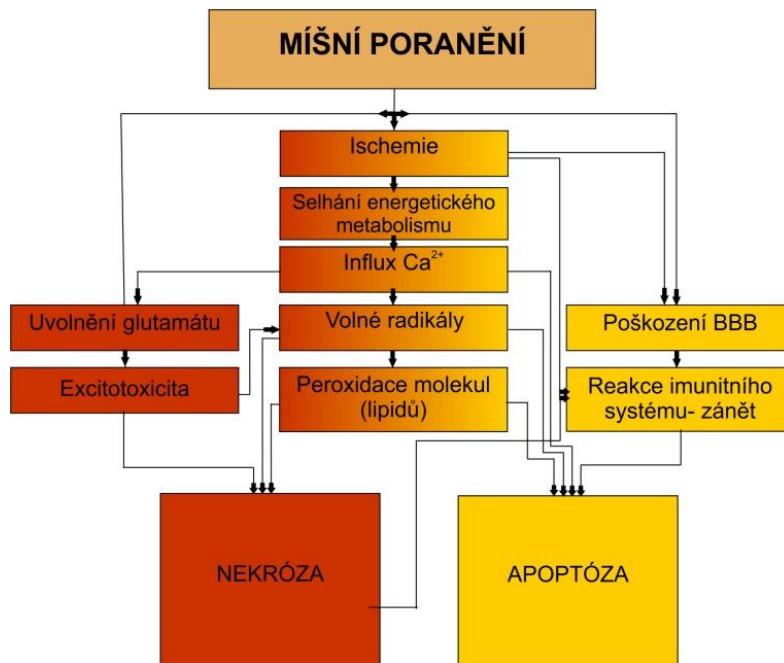
## Sekundární fáze poranění

### Akutní fáze poranění

Akutní fáze míšního poranění probíhá 2-48h po primárním poškození. V této fázi se dále rozvíjejí procesy okamžité fáze poranění, což vede k zvětšení původní velikosti léze (Obr. 2.). V důsledku výrazně zvýšené koncentrace iontů a aktivních molekul v extracelulárním prostoru dochází k hypertrofii a aktivaci gliových buněk, které nezvládají pufrovat extracelulární prostředí, a následné akceleraci sekundárních poškození. Nadále narůstá extracelulární koncentrace glutamátu, formace volných radikálů a díky porušené hematoencephalické bariéry (HEB) dochází k aktivaci imunitního systému a zánětlivé reakci (Rowland *et al.*, 2008; Tator & Fehlings, 1991). Propustnost HEB je pak dále zvyšována neuroimunitní odpovědí astrocytů a mikroglíí, čímž je usnadněna infiltrace leukocytů, makrofágů a dalších složek imunitního systému vedoucích k rychlejšímu rozvoji zánětu. Role jednotlivých složek imunitního systému není vždy jednosměrná a může mít rozdílný efekt v působení na neurony a glie. Zánětlivá imunitní odpověď na MP, zahrnující čistící mechanismy vedoucí ke stabilizaci poškozené oblasti, je velmi komplexní a může mít jak negativní tak i pozitivní vliv na regeneraci systému (Gal, Kravcukova, Mokry, & Kluchova, 2009). Modulace imunitní odpovědi může výrazně změnit míru poranění a tedy zachování funkce po MP. U modelu míšní léze u potkana byly nalezeny zvýšené hladiny IL-8, IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-13, MCP-1, MIP1 $\alpha$ , RANTES, a TNF $\alpha$ , naproti tomu byl pozorován výrazný pokles IL-12p70. U pacientů byly v cerebrospinální tekutině naměřeny především IL-6, IL-8, a MCP-1. Tyto cytokiny mohou velmi dobře sloužit jako markery efektivity léčby, jež zmírňuje sekundární procesy poranění (Stammers, Liu, & Kwon, 2012). Například vysoké hladiny TNF $\alpha$  v míšní tkáni spolu se zvýšeným intracelulárním Fe vedou k polarizaci makrofágů do prozánětlivého (M1) stavu (Kroner *et al.*, 2014). Podání IL10 vedlo ke snížení hladiny TNF $\alpha$  a k funkčnímu zlepšení po MP (Bethea *et al.*, 1999). V případě využití protilátek proti IL-6 receptoru bylo opětovně pozorováno funkční zlepšení (Arima *et al.*, 2014). Na druhé straně zvýšení koncentrace faktorů, jejichž hladiny jsou sníženy

po MP jako je IL12P70, vedlo rovněž k zlepšení funkce (Yaguchi, Ohta, Toyama, Kawakami, & Toda, 2008).

## Obrázek 2. Sekundární procesy míšního poranění



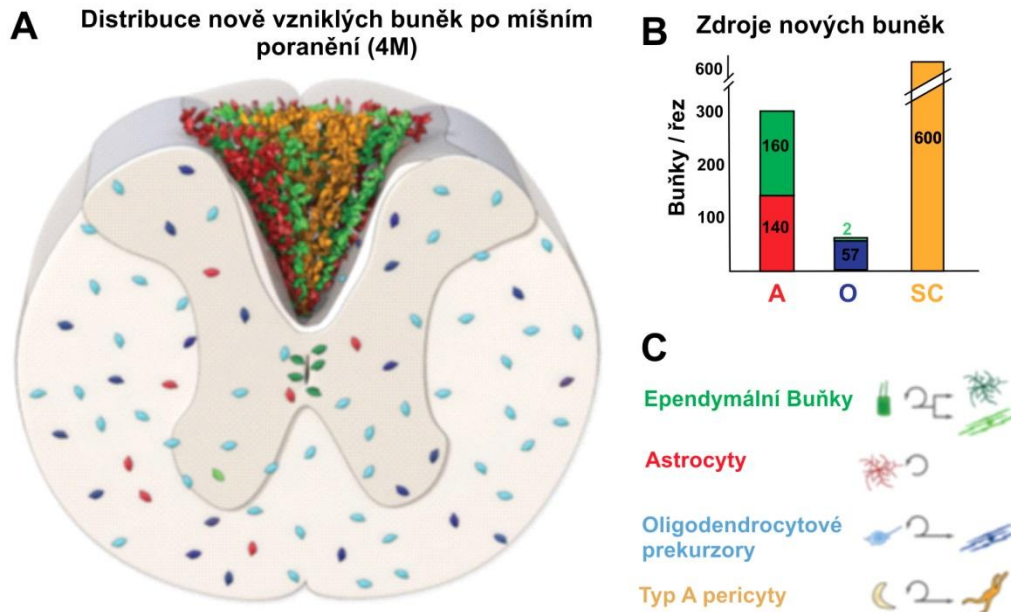
Obrázek 2. Síť sekundárních procesů poranění vedoucí k rozvoji léze a apoptotické či nekrotické smrti neuronů a glií (Klussmann & Martin-Villalba, 2005)

V průběhu akutní fáze dochází k buněčné smrti a to jak nekrotickou tak apoptotickou. Po MP u neuronů poraněných jednak mechanicky, či vystavených excitotoxickému působení, převažuje nekrotická buněčná smrt a apoptóza bývá pozorována zřídka. Na druhé straně u oligodendrocytů, jež vytvářejí myelinovou pochvu v centrálním nervovém systému (CNS), byla apoptóza pozorována často jak v akutních tak pozdějších fázích poranění (X. Z. Liu *et al.*, 1997) a je jednou z příčin wallerianské degenerace axonů (David, 2002). Imunomodulace tudíž může být účinným nástrojem pro zmírnění průběhu míšního poranění. Avšak ambivalence a složitost IO vyžaduje detailní znalosti korelace jednotlivých složek IS (Gal *et al.*, 2009).

### **Subakutní fáze poranění**

Subakutní fáze probíhá přibližně od 2 dnů do dvou týdnů po poranění. V této fázi dochází k dalšímu rozšiřování centrální kavity. Vliv cytotoxického prostředí mění produkci faktorů gliových buněk, vznikají tzv. reaktivní astrocyty, které spolu s dalšími gliovými buňkami (např. NG2 glie) vytvářejí prostředí utlumující spontánní regeneraci a podílejí se na vzniku gliové jizvy. Gliová jizva je multimodální útvar skládající se z několika druhů buněk. Je tvořena astrocyty různého stupně aktivace a vývoje (Meletis *et al.*, 2008); další složkou gliové jizvy jsou fibroblastům podobné stromální buňky, jež tvoří jádro jizvy (Barnabe-Heider *et al.*, 2010; Camand, Morel, Faissner, Sotelo, & Dusart, 2004) (Obr. 3.). Do buněk participujících na tvorbě jizvy se poslední dobou počítají i NG2 glie, které mohou přispívat k inhibici růstu axonů (Buss *et al.*, 2009; Tan, Zhang, & Levine, 2005). Buňky v jizvě vylučují molekuly extracelulární matrix, či repelentní faktory, jež znemožňují růst a migraci neurálních buněk přes vytvořenou kavitu (Barnabe-Heider *et al.*, 2010). V této fázi jsou zároveň aktivovány mikroglie, jež přispívají k vyčištění myelinového debrisu a částečně tak napomáhají k zvýšení regeneračního potenciálu (David & Kroner, 2011). Poškozené axony se pokoušejí o tvorbu nového růstového konu, avšak oproti axonům periferního nervového systému (PNS) postrádají potřebné komponenty pro jejich tvorbu a v prostředí poškozené míchy vytváří většinou jen disfunkční ztluštělé axonální kony. Poškozené axony bez potřebných signálů tak degenerují anterogradně i retrogradně od místa poranění (Eva & Fawcett, 2014). Oproti akutní fázi již dochází ke snížení otoku a je možné diagnostikovat míru poranění.

**Obrázek 3. Distribuce nově vzniklých buněk po MP/ tvorba gliové jizvy**



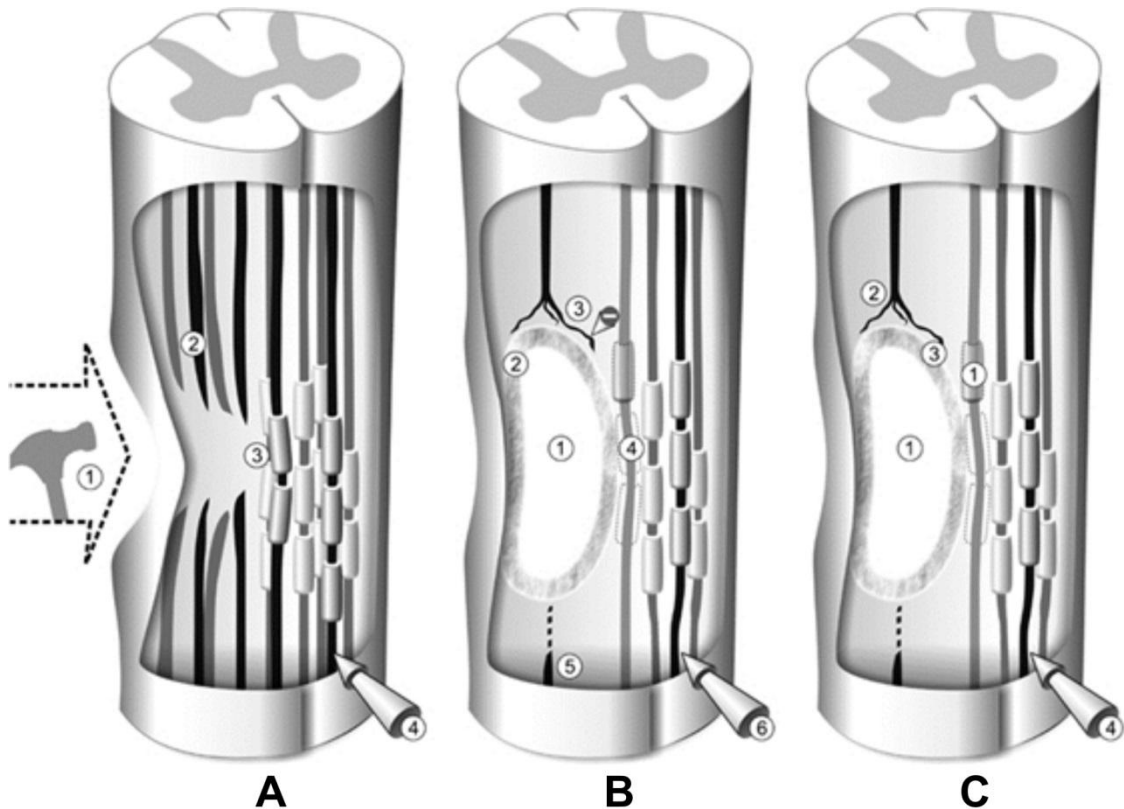
Obrázek.3. (A-C) Distribuce lézí indukovaných progenitorů z ependymálních buněk (zelené), astrocytů (červené), oligodendrocytálních progenitorů (modré) a pericytů typu A (oranžové) 4 měsíce po sekci zadních provazců míšních (A.). Původ nových astrocytů (A), oligodendrocytů (O) a stromálních buněk (SC) 4 měsíce po poranění (B.). Barva sloupků grafu naznačuje původ buněk dle barevného schématu (C). Schématický obrázek zachycující osud ependymálních buněk, astrocytů oligodendrocytů a pericytů typu A po míšní lézi (C) (Sabelstrom et al).

### Chronická fáze poranění

Poškození míchy přechází do chronické fáze několik týdnů po poranění a setrvává v ní řadu let. V průběhu chronické fáze je neurologický stav pacienta stabilizován (McDonald & Belegu, 2006). Tato fáze je charakterizována pokračující apoptózou, modulací a stabilizací gliové jizvy, tvorbou cyst (vedoucí k rozvoji syringomyelie) a demyelinizací zachované okolní tkáně (Christensen & Hulsebosch, 1997). Demyelinizace axonů je primárně způsobena apoptotickou smrtí a v menší míře špatnou funkcí poškozených oligodendrocytů zajišťujících vytváření myelinové pochvy (Fawcett & Asher, 1999) (Obr. 4.). V této fázi poranění míšní tkáň vykazuje známky endogenní regenerace a tvorby nových axonů, což může vést k částečné reinervaci, jež je ovšem náhodná a nese rizika např. vzniku chronické bolesti. Zároveň

chronická fáze poškození sebou nese celou řadu sekundárních komplikací, jako jsou spasticita, patologická bolest, osteoporóza etc. (Christensen & Hulsebosch, 1997; Sezer, Akkus, & Ugurlu, 2015).

**Obrázek 4. Rozvoj míšní léze a možnosti experimentální léčby**



Obrázek 4. Schématická presentace patologických procesů po MP v akutní a chronické fázi a základní možnosti experimentální léčby. A- Akutní fáze; 1) přímý impakt, 2) lacerované axony, 3) kontuzně poškozené axony, 4) nárůst počtu inflamatorních buněk. B- Chronická fáze; 1) centrální kavita, 2) zajižená tkáň, 3) Inhibice regenerace axonů, 4) demyelinizace, 5) retrakce/degenerace axonů, 6) nárůst počtu inflamatorních buněk. C- Možnosti léčby; 1) buněčná/ tkáňová terapie, 2) blokáce inhibičních molekul axonálního růstu, 3) posílení přirozených procesů axonální regenerace, 4) modulace zánětlivé odpovědi (Ronsyn, Berneman, Van Tendeloo, Jorens, & Ponsaerts, 2008).

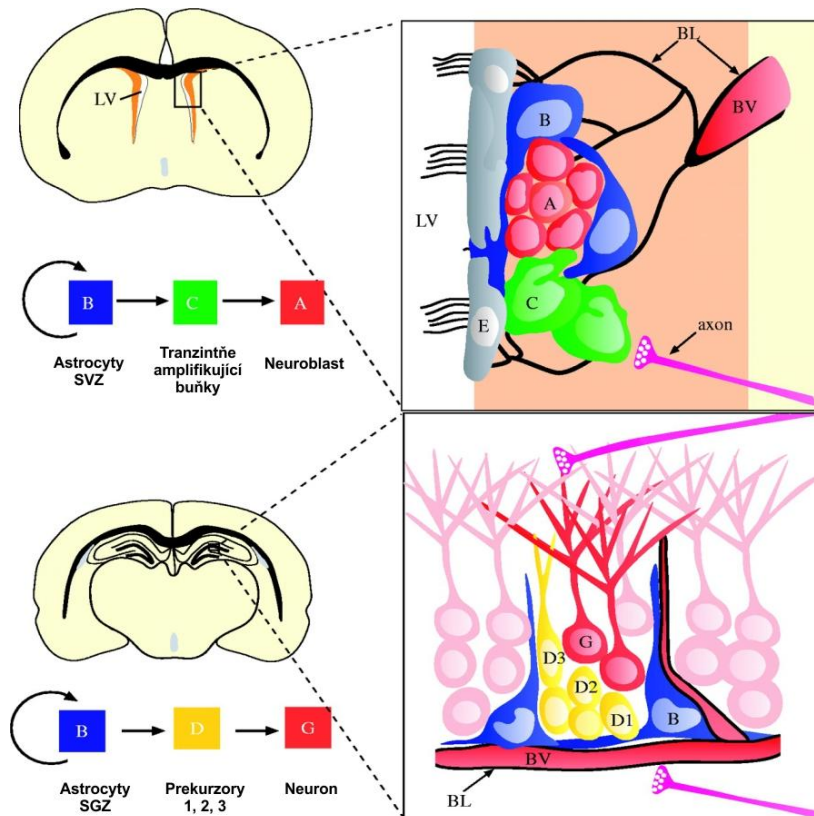


## **Mechanismy endogenní regenerace a jejich omezení**

### **Ependymální buňky**

V dospělém CNS existují neurogenní a gliogenní zóny obsahující neurální prekuzory (dospělé kmenové buňky), jež za fyziologické situace jsou dostačujícím zdrojem pro specifické obnovení například neuronů v čichovém laloku. Tyto zóny se vyskytují ve vyvíjejícím se CNS podél stěn komor a centrálního kanálku míchy. U savců v časném stadiu vývoje byly popsány regenerace descendentních vláken a částečná reorganizace míšního poranění právě ependymálními buňkami míchy (Iwashita, Kawaguchi, & Murata, 1994; X. M. Wang, Terman, & Martin, 1996). V dospělém organismu pak zůstávají dvě oblasti, subventrikulární zóna (SVZ) a subgranulární zóna (SGZ) v gyru dentatu, jež si zachovávají neurogenní potenciál. Ostatní subependymální zóny (např. centrální míšní kanál) obsahují ependymální buňky, jež mají spíše gliogenní charakter, avšak vzhledem k jejich pozitivnímu vlivu na poškozenou tkáň mohou sloužit jako zdroj buněčné terapie (Obr. 5). Ependymální buňky v reakci na míšní poškození až 50-ti násobně zvýší svůj proliferační potenciál a podílí se nejen na tvorbě gliové jizvy (ependymální astrocyty), ale mohou dát vzniknout spolu s gliálními restriktními prekuzory oligodendrocytům, které mohou sloužit k obnově myelinizace (Stenudd, Sabelstrom, & Frisen, 2015). Zároveň byl u pacientů s poraněním CNS zjištěn nárůst nestin pozitivních ependymálních buněk v míšní tkáni, avšak jejich původ a podíl na regeneraci je stále diskutován (Cawsey, Duflou, Shannon-Weikert, & Gorrie, 2015). Při výraznějším poškození CNS sice prekuzory vytvořené těmito zónami putují k místu poranění, avšak jejich počet není dostatečný pro obnovení funkce a často jejich účast není plně objasněna.

**Obrázek 6. Dospělé kmenové buňky subventrikulární a subgranulární zóny**



*Obrázek 5. Buněčné typy a anatomie niky SVZ a SGZ. Schéma frontálního řezu*

*dospělým myším mozkiem ukazujícím SVZ (a) a SGZ(b). Astrocyty SVZ (a, B, modrá) fungují jako dospělé kmenové buňky, které dávají vzniknout migrujícím neuroblastům (A, červená) určeným pro olfaktoriální lalok přes stádium dělicích tranzitně-amplifikujících buňek (C, zelená). Astrocyty SGZ (b, B, modrá) se dělí do intermediálních prekurzorů (typ D buněk, žlutá), následně progresivně generují zralejší prekurzory (typ D1 → typ D2 → typ D3), které pak dozrávají do granulocytárních neuronů (G, červená). Oba typy zón tvoří specifickou niku a s kontaktem s axony i s kapilárním řečištěm (BV) a basální laminou (BL), komunikující s kmenovými buňkami a vzájemné signály určují osud prekurzorů (Riquelme, Drapeau, & Doetsch, 2008).*

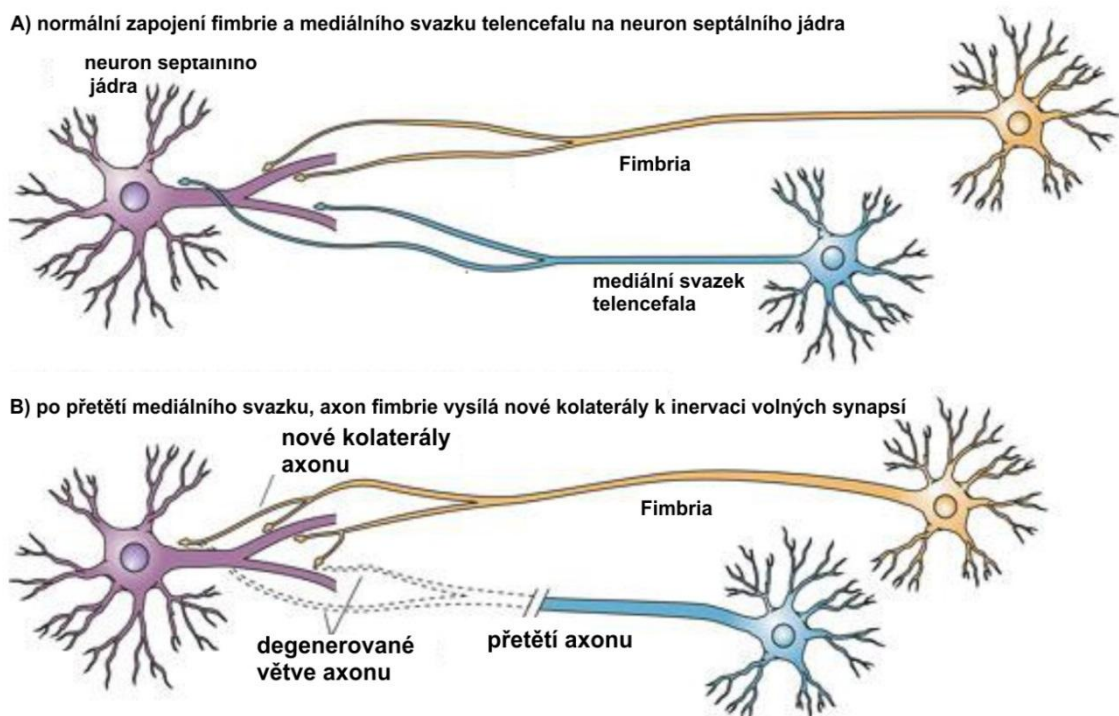
### **Kolaterální sprouting**

Druhým mechanismem endogenní regenerace je kolaterální sprouting neboli pučení, jež bylo poprvé popsáno právě v míše (C. N. Liu & Chambers, 1958). Kolaterální sprouting může

být spuštěn různými impulsy (poraněním mozku či míchy, neurodegenerativním onemocněním, etc.), které vedou k deafferentaci určité části CNS (Moore and Zigmond 1994; Chevassus-Au-Louis et al., 1997) (Obr. 6). Na přeživších axonech tak vznikají nové kolaterály, jež však v prostředí léze bez správného signálu nezajišťují původní spojení ale spíše re-inervaci deafferentovaných částí a nová náhodná spojení. Akcelerace kolaterálního sproutingu tudíž může kromě funkčního zlepšení vést například i ke stavům patologické bolesti (Christensen & Hulsebosch, 1997; Sezer *et al.*, 2015).

### Obrázek 6. Sprouting axonů

e



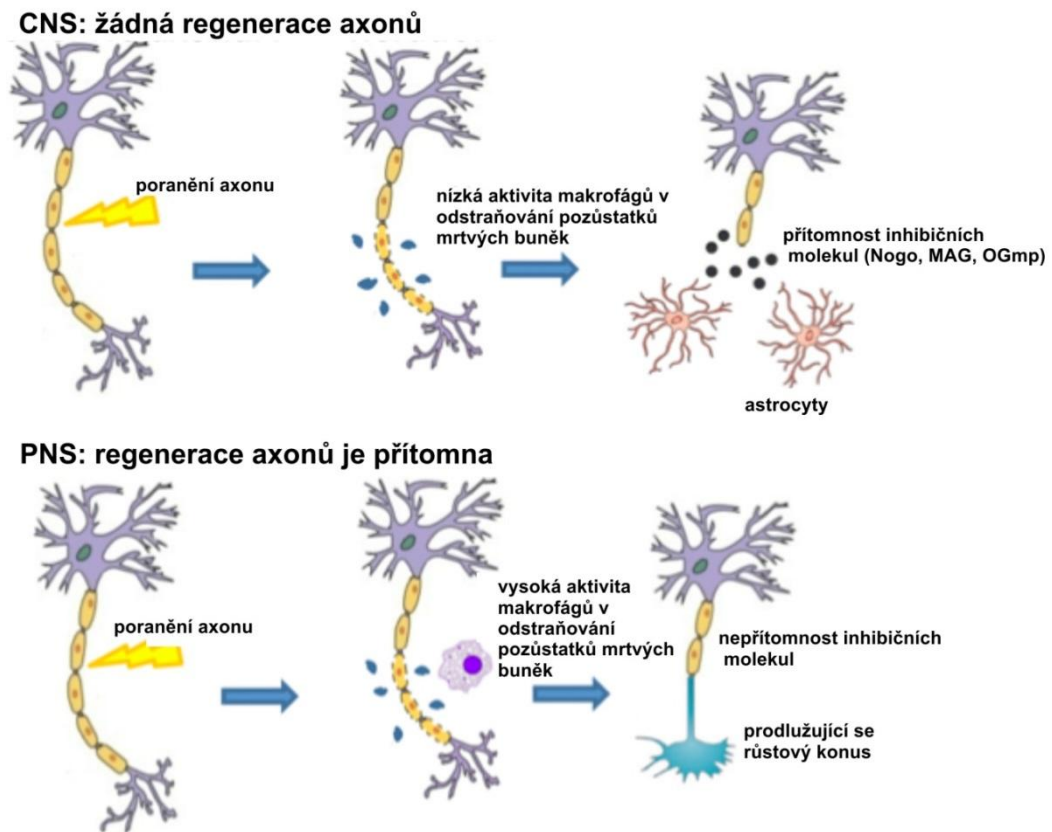
Obrázek 6. Sprouting fimbriálních axonů po přetěti a degeneraci mediálního svazku předního mozku (Raisman, 1978)

### Omezení regenerace CNS

Poškození v CNS zahrnuje nejen ztrátu buněk samotných a axonálních spojení, ale i množství inhibičních molekul v oblasti poškození a přirozeně nízkou regenerační kapacitu neuronů CNS (K. Liu, Tedeschi, Park, & He, 2011) (Obr. 7.). Oproti PNS se v dospělém CNS

nevyskytují některé prvky potřebné pro růst axonů na dlouhou vzdálenost. V axonech neuronů CNS jsou molekuly integrinů inaktivovány inhibičními molekulami a v některých typech axonů nedochází ani k jejich transportu do růstového konu. Kontakt integrinů s fokálními adhezivními proteiny a extracelulární matrix pomáhá při růstu axonálního konu a je jedním z fungujících mechanismů PNS (Eva & Fawcett, 2014). Oproti PNS je v CNS omezení růstu axonů spojené s absencí deacetylase tubulinu jakožto nezbytného kroku pro tvorbu mikrotubulů pro transport podjednotek růstu axonálního konu (Cho & Cavalli, 2012). Terapie, zabývající se zpřístupněním těchto kroků v CNS, mohou výrazně pomoci regeneraci poškozené míchy. Buňky astrocytů a NG2 glií vytváří mechanickou a funkční bariéru gliové jizvy, jež jako pasivní prvek regenerace uzavírá extrémně škodlivé prostředí centrální léze před okolní tkání. Zároveň nadprodukce inhibičních molekul jako jsou Nogo-a, s myelinem asociované glykoproteiny (MAG) a oligodendrocytové myelin glykoproteiny (OMGP) brání růstu nových vláken v místě poškození. V důsledku kombinace těchto faktorů vznikají spíše krátké kolaterály, které se za ideálních podmínek či externího přispění propojují přes skupiny interneuronů na možné funkční dráhy a dlouhá zapojení se vyskytují jen vzácně. Z krátkodobého hlediska jsou tyto mechanismy stabilizační, avšak z dlouhodobé perspektivy nemohou nahradit regeneraci axonů v poškozené míše.

## Obrázek 7. CNS VS. PNS



Obrázek 7. Okolí poškozených axonů CNS a PNS nastavuje rozdílný potenciál pro endogenní regeneraci (Strittmatter, 2010).

### Faktory urychlující endogenní regeneraci

Z důvodu nedostatečné schopnosti endogenní regenerace byly zkoumány látky, které by pozitivně ovlivnily regeneraci poškozené míchy. Apoptóza a nekróza jsou častým jevem v sekundárních procesech míšního poranění a jelikož zachování i malého procenta (cca 5- 10%) myelizovaných funkčních vláken může vést k zachování velké části lokomočních či senzorických funkcí (Oudega & Perez, 2012; Weishaupt, Hurd, Wei, & Fouad, 2013), hraje využití externích růstových faktorů či antiapoptotických molekul důležitou roli při léčbě poškozené míchy. Celá řada neurotrofických (E. J. Huang & Reichardt, 2001; Liebl, Huang, Young, & Parada, 2001; Namiki, Kojima, & Tator, 2000). a jiných růstových faktorů (Gorio *et*

*al.*, 2002; H. M. Kim, Hwang, Lee, Kim, & Kim, 2009) vedla k morfologickým i funkčním zlepšením v léčbě míšního poranění.

### **Neurotrofni a jiné růstové faktory**

Ve vyvíjejícím se i v dospělém organismu jsou za fyziologických i patofyziologických situací produkovány neurotrofni látky, které přes systémy kaskád ovlivňují expresi buněk a mohou tak rozhodovat o přežívání neuronů a glií a růstu a sproutingu axonů. Neurotrofické faktory působí převážně přes trk A, B, C (tropomyosin related kinase A, B, C) či přes p75 receptor spřažený s neurotrofickými faktory. Vliv trk receptorů je spojený s přežíváním neuronů či růstem axonů. U p75 receptoru je však funkce ambivalentní a může rozhodovat jak o přežití, tak o přechodu do apoptózy (E. J. Huang & Reichardt, 2001; Liebl *et al.*, 2001; Namiki *et al.*, 2000) (Obr. 8.). Mezi nejznámější a stále jedny z nejčastěji používaných faktorů v experimentální léčbě míšního poranění patří následující růstové faktory:

NGF (Nerve growth factor) byl prvním neurotrofním faktorem, který byl popsán a charakterizován (Cowan, 2001). Později byla identifikována jeho funkce podporující přežití neuronů a růst a větvení axonů. NGF působí přes trkA receptory u malých senzoričkých neuronů (E. J. Huang & Reichardt, 2001; Mendell & Arvanian, 2002). V regeneraci motoneuronů vliv NGF pozorovaný nebyl (Tuszynski *et al.*, 1996). Jeho produkce po poranění míchy se zvyšuje jak v proximálních tak distálních segmentech míchy (Heumann *et al.*, 1987).

BDNF (Brain derived neurotrophic factor) podporuje přežívání a růst axonů u senzoričkých neuronů (Erickson *et al.*, 1996; Oudega & Hagg, 1999) i motoneuronů (Braun, Croizat, Lagrange, Warter, & Poindron, 1996; Liebl *et al.*, 2001). BDNF působí přes trkB receptory (v některých případech ho může zastoupit neurotrofin NT4), jeho působení je široké a v některých případech se překrývá s účinky NT3 a NT4/5 neurotrofinů, což vedlo k jeho velké popularizaci. Jeho aplikace ukazuje významný vliv na zachování kortikospinální i rubrospinální dráhy (Hiebert, Khodarahmi, McGraw, Steeves, & Tetzlaff, 2002; Namiki *et al.*, 2000). Výsledný efekt však velmi záleží na místě podání, dávce a trvání aplikace a může sebou nést i negativní

dopad léčby aktivací bolestivých drah. I když celá řada publikací ukazuje další pozitivní efekty aplikace BDNF po MP, jejich interpretace není vždy jednoduchá, konzistentní a míra účinků se výrazně liší (Weishaupt, Blesch, & Fouad, 2012).

NT3 (neurotrophin 3) podobně jako NGF zvyšuje přežívání sensorických aferentních spojů, avšak oproti NGF, podporuje přežívání neuronů s receptorem trkC (E. J. Huang & Reichardt, 2001). Zároveň, podobně jako BDNF, podporuje přežívání motoneuronů. NT-3 navíc podporuje vrůstání PNS axonů do míchy (Priestley, Ramer, King, McMahon, & Brown, 2002) a významně se podílí na regeneraci periferních nervů i míchy (Fortun, Puzis, Pearse, Gage, & Bunge, 2009).

CNTF (ciliary neurotrophic factor) podporuje přežití, růst a větvení motoneuronů (Siegel, Patton, & English, 2000; Ye *et al.*, 2004) a zároveň má významný vliv na přežívání a maturaci oligodendrocytů. Aplikace prekursorů oligodendrocytů se zvýšenou expresí CNTF vedla k signifikantně zvýšené myelinizaci a zlepšení lokomoční funkce (Cao *et al.*, 2010). Na druhou stranu jeho podpora gliální diferenciace je spojována i s tvorbou gliové jizvy (Ye *et al.*, 2004).

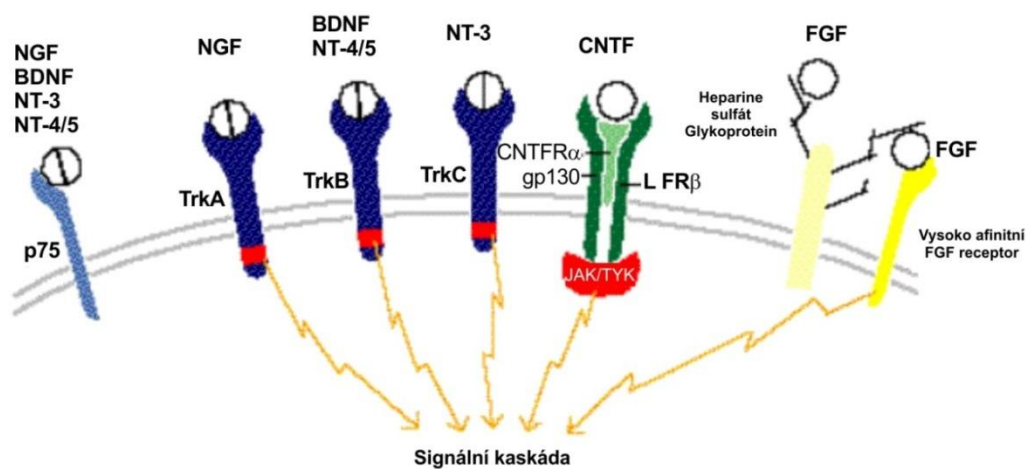
GDNF (glial derived neurotrophic factor) podporuje přežití jak motorických (Watabe *et al.*, 2001) tak sensorických neuronů i neuronů autonomního systému (Buj-Bello, Buchman, Horton, Rosenthal, & Davies, 1995; Matheson *et al.*, 1997). Aplikace GDNF signifikantně zvyšuje růst motorických i sensorických axonů a navíc indukuje migraci Schwannových buněk do místa poranění a tak přispívá k remyelinizaci axonů (Blesch & Tuszynski, 2003). Zároveň aplikace GDNF může vést k modulaci systémů bolesti (Ogun-Muyiwa, Helliwell, McIntyre, & Winter, 1999; Sakai, Asada, Seno, & Suzuki, 2008; Skoff, Resta, Swamydas, & Adler, 2003).

a/b FGF (acidic / basic fibroblast growth factors) podporují regeneraci míchy podporou přežívání neuronů, ale zároveň působí i na angiogenezi a mohou tak nepřímo zvýšit přirozenou regeneraci po MP (Kuo *et al.*, 2011; Tsai, Shen, Kuo, Cheng, & Chak, 2008; W. Wang, Yang, Liu, & Pei, 2014). Použití aFGF je již testováno samostatně či v kombinované terapii v rámci

klinických studií (Wu *et al.*, 2011; Wu, Huang, Tsai, Chen, & Cheng, 2008). Zároveň aplikace FGF může zabránit degeneraci motorických plotének po MP (J. Wang *et al.*, 2013).

LIF (Leukemia inhibitory factor) snižuje několika mechanismy, zahrnujícími signální dráhy JAK/STAT a Akt, apoptózu oligodendrocytů po MP, čímž zabraňuje sekundární vlně demyelinizace po MP (Azari *et al.*, 2006).

**Obrázek 8. Neurotrofické růstové faktory a jejich receptory**



*Obrázek 8. Přehled receptorů rodiny nervových růstových faktorů*

(<http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/neurotrophins/REGCNTRL.HTM> L).

### Molekuly zvyšující plasticitu systému

Avšak i při zachování míšní tkáně zde zůstává otázka velmi nízké plasticity systému pro potenciální regeneraci a to především kvůli nadprodukci inhibičních molekul asociovaných s myelinem a prvků extracelulární matrix produkovaných oligodendrocyty a astrocyty. Experimentální terapie proti inhibičním faktorům oligodendrocytů (Nogo-A, MAG a OMGP), cílicí na jejich společný receptor NgR (P. Yu *et al.*, 2008), či jeho komponenty jako je Lingo-1 (Lv *et al.*, 2010), je důležitým krokem v léčbě míšního poranění. Druhým mechanismem, blokujícím regeneraci, je gliová jizva tvořená především chondroitin sulfát proteoglykany. Její rozpuštění dle autorů zvyšuje plasticitu systému, a tudíž může vést k morfoloickému i



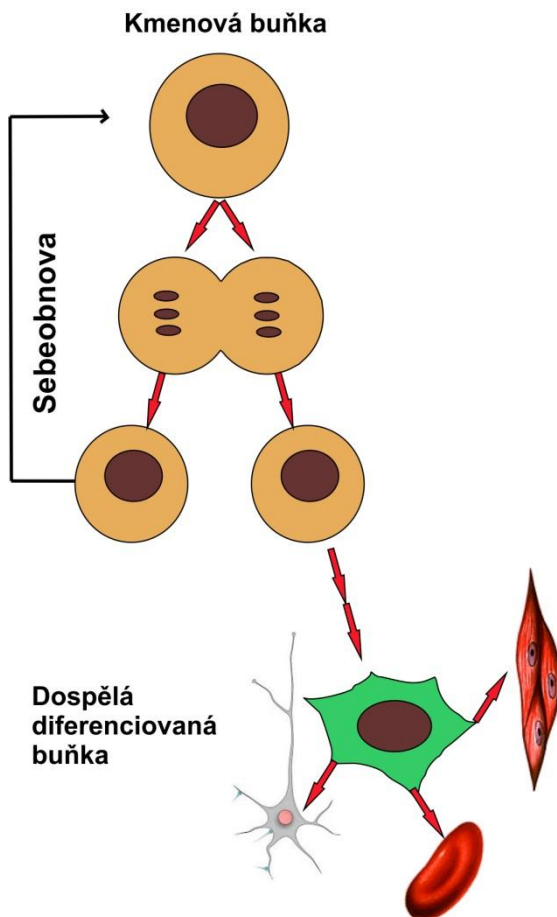
funkčnímu zlepšení. Zatím nejvíce používaným enzymem je chondroitináza ABC (Barritt *et al.*, 2006; Kwok, Afshari, Garcia-Alias, & Fawcett, 2008).

## **Kmenové buňky v léčbě míšního poranění**

Kmenové buňky jsou definovány schopností „neomezeného“ dělení (přesahující Hayflickovu mez dělení, cca 40-60 dělicích cyklů), které dává vzniknout buď kopiím kmenových buněk samotných, nebo buňkám dceřiným, které se dále diferencují a vytváří složky organismu (epitely, tkáně atd.) (Obr. 9.). Tyto buňky se nacházejí po celou dobu ontogeneze s postupně se snižujícím potenciálem sebe obnovy a schopností diferenciací směrem k dospělejšímu organismu. Jako totipotentní označujeme kmenové buňky schopné dát vzniknout celému embryu. Tento typ kmenových buněk může být nalezen pouze v zygotě. Jako pluripotentní se označují kmenové buňky, jež jsou schopny dát vzniknout všem třem zárodečným liniím; buňkám ektodermu, mezodermu a endodermu. Jedná se o buňky embryoblastu do stádia rané blastocysty. Dále se v ontogenetickém vývoji nacházejí kmenové buňky multipotentní, a to jak ve fetální tkáni, tak v dospělém jedinci. Tyto typy kmenových buněk pak dávají vzniknout několika typům progenitorů (unipotentních kmenových buněk), jež vedou k tvorbě buněk somatických. Kmenové buňky jsou však nejen zdrojem buněk somatických, ale zároveň produkují celou řadu růstových a jiných (například imunomodulačních) faktorů. Jejich aplikace v léčbě poškozených tkání, orgánů či degenerativních onemocnění má tak dva základní efekty „rescue“ a „replace“. Takzvaný „rescue“ efekt je prakticky přítomný vždy a využívá produkce celé řady faktorů, které poškozenou tkáň stimulují k nastartování nebo posílení endogenních procesů regenerace. „Replace“ efekt je závislý na míře poškození, přežívání aplikovaných buněk, plasticitě daného systému a tedy na pravděpodobnosti funkčního propojení. Funkčním propojením se pak rozumí samotné zapojení diferenciované buňky do systému vedoucího směrem k navrácení původní funkce segmentu. Experimentální regenerativní medicína nabízí kmenové buňky z velkého množství zdrojů a proto je velmi důležité nejen jejich poznání ale i rozdíly mezi zdroji, jež

mohou nabídnout nové přístupy k léčbě poškozené míchy a řady dalších poškození a degenerativních onemocnění.

**Obrázek 9. Základní princip dělení kmenových buněk**



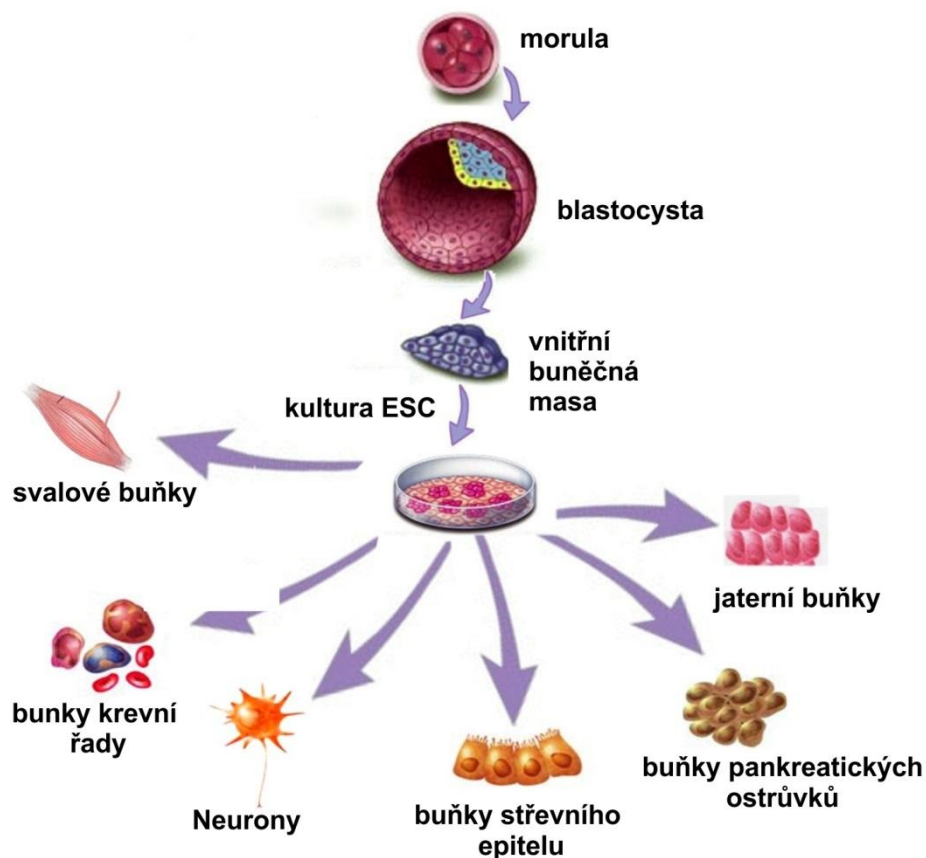
*Obrázek 9. Základní vlastnosti kmenových buněk jako je schopnost sebeobnovy a schopnost tvorby dceřiných buněk.*

### **Embryonální kmenové buňky**

Embryonální kmenové buňky (ESC) jsou pluripotentní kmenové buňky izolované z vnitřní buněčné masy blastocysty. Tyto buňky jsou schopny neomezeného dělení *in vitro* a udržují si schopnost diferenciace do buněk všech tří zárodečných typů (Obr. 10.). Pluripotence těchto buněk je potvrzena tvorbou teratomu, obsahujícího buňky všech tří zárodečných listů, po aplikaci do imunodeficientního potkana (Thomson *et al.*, 1998). Vlastnosti ESC vedly

k velkému zájmu o jejich využití nejen v náhradě mrtvých buněk poškozených orgánů a tkání. Za pomoci specifických protokolů zahrnujících celé spektrum morfogenů a růstových faktorů je možno diferenciovat ESC do specifického buněčného typu pro účely diagnostiky a výzkumu onemocnění, či vytvořit buněčnou terapii pro náhradu buněk v léčbě poškozené tkáně. Diferenciace ESC do dopaminergních a serotonergních neuronů středního a zadního mozku (S. H. Lee, Lumelsky, Studer, Auerbach, & McKay, 2000) či do prekursorů telencefalických neuronů (Watanabe *et al.*, 2005) ukazuje na možnost funkční náhrady specifických částí poškozených neurálních okruhů. V experimentální léčbě míšního poranění u různých zvířecích modelů bylo a je úspěšně používáno prekursorů neuronů či glií diferenciovaných z ESCs, které vedou k funkčnímu zlepšení neurologického deficitu (Kerr *et al.*, 2010; Salewski, Mitchell, Shen, & Fehlings, 2015; Shimada *et al.*, 2012). Nediferencované ESC jsou používány spíše výjimečně (Bottai *et al.*, 2010), právě z důvodu jejich silného teratogenního potenciálu (Thomson *et al.*, 1998). Je vysoce důležité, že v pokuse zahrnujícím v léčbě MP použití gliálních prekursorů vzniklých ze sekundárních neurosfér ESC, došlo k většímu funkčnímu zlepšení zvířat než v případě použití čistě neurálních prekursorů z ESC primárních neurosfér (Kumagai *et al.*, 2009). Tento příklad vede k důležitému poznání, že k obnově funkce jsou zapotřebí nejen náhrady poškozených a ztracených neuronů ale zároveň i náhrady gliových buněk, které mohou být potřebné i na částečnou obnovu funkce přežívajících neuronů a zachovaných spojení. Krom mnoha pozitiv se ovšem objevují bariery pro jejich použití. Studie ESC *in vitro* ukazují na nestabilitu genomu a dělicího se aparátu v rámci dlouhodobé proliferace buněk (Holubcova *et al.*, 2011; Kruta *et al.*, 2014), což částečně vymezuje časový horizont pro jejich využití. Zároveň se ukazuje, že už samotná kultivace *in vitro* bez modulačních aditiv mění jejich vlastnosti (Baker *et al.*, 2007; Draper, Moore, Ruban, Gokhale, & Andrews, 2004). Tento problém částečně řeší využití vhodných diferenciačních protokolů snižujících tumorogenicitu implantátu při zachování potenciálu raných neurálních prekursorů. (Kozubenko *et al.*, 2010). Kromě biologických aspektů zde však také hraje roli etická stránka izolace lidských ESC, která vedla ke snaze o implantaci kmenových buněk z pozdějších ontogenetických fází (Denker, 2006).

**Obrázek 10 Embryonální kmenové buňky a jejich využití**



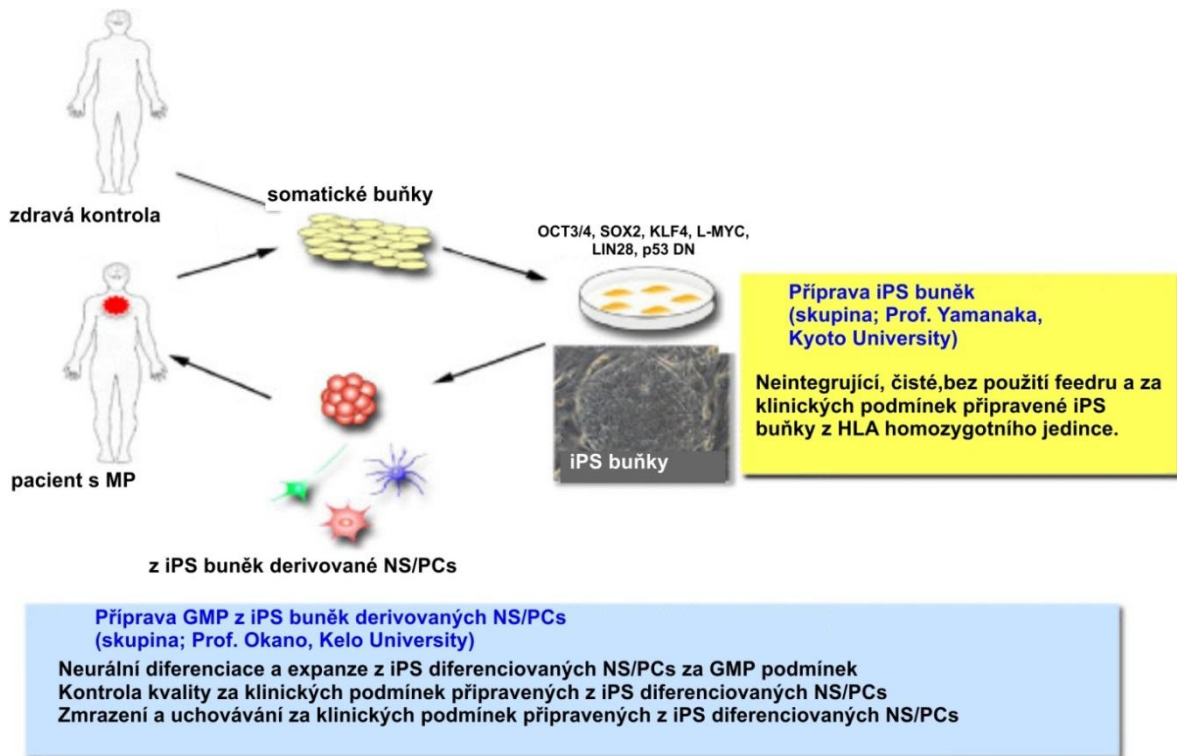
*Obrázek 10. Původ ESC z vnitřní buněčné masy blastocysty a příklady možné diferenciace (Mirella, Andrea, & Yvan, 2011)*

### **Indukované pluripotentní buňky**

Indukované pluripotentní buňky (iPS), které v roce 2006 daly vzniknout celému odvětví regenerativní medicíny, se zdají být odpovědí na problémy buněčné terapie, zahrnujících imunokompatibilitu, obtížné získání zdroje buněk či problémy etického rázu. Dospělé či fetální buňky mohou být s pomocí indukce genů OCT3/4, sox2, c-Myc a Klf4 reprogramovány do typu buněk podobným ESC, které vykazují stejné morfologické a růstové vlastnosti (Obr. 11.). Po podkožní implantaci iPS do imunodeficientních myši dochází stejně jako u ESC k tvorbě teratomu se všemi třemi zárodečnými vrstvami. Po injekci iPS do blastocysty se implantované buňky podílejí na jejím dalším vývoji a vzniká chiméra (Takahashi & Yamanaka, 2006). Za více než 10 let vývoje vznikla celá řada iPS linií a jejich porovnání poukázalo na několik

důležitých faktorů, které mají zásadní význam pro jejich budoucí klinické využití, jako například inter- a intra- lineární variabilita (Cahan & Daley, 2013; Sancho-Martinez, Ocampo, & Izpisua Belmonte, 2014). Použití buněk připravených z iPS se díky buněčné paměti vyrovnává s problematikou odpovědi imunitního systému recipienta (dostává své vlastní buňky) a umožňuje výzkum geneticky podmíněných onemocnění daného pacienta (Peitz, Jungverdorben, & Brustle, 2013; Qiu, Farnsworth, Mishra, & Hornsby, 2013), farmakologické výzkumy na specifických typech buněk (Sekino, Sato, Kanda, & Ishida, 2013) i experimentální *de novo* tvorbu orgánů či epitelů nebo recelularizaci decelularizovaných konstruktů pro tkáňové inženýrství (Sareen, Saghizadeh *et al.*, 2014; Taylor, 2009). Zároveň se ukazuje, že se iPS částečně liší od ESC i v parametrech důležitých pro dlouhodobou kultivaci, jako je nižší frekvence mutací a vznik disfunkčního buněčného dělení (Holubcova *et al.*, 2011; Kruta *et al.*, 2014). V léčbě míšního poranění se v závislosti na zdroji iPS výsledky mohou lišit, ale neurální prekursorů diferenciovaných z iPS vykazují funkční zlepšení, dlouhodobé přežívání v místě poranění i migraci v rámci CNS. Zároveň velmi dobře diferencují a komunikují s prostředím míchy (Sareen, Gowing *et al.*, 2014). Na našem oddělení práce s iPS v oblasti poškození CNS dosahuje významných výsledků v experimentální léčbě iktu (Polentes *et al.*, 2012) či míšního poranění (Romanyuk *et al.*, 2014) na modelu potkana. V současné době pronikají z iPS diferenciované buněčné produkty do klinických zkoušek především v oblasti degenerativních onemocnění oka (*Nature* doi: 10.1038/nature.2014.15897). V ohnisku zájmu jsou nyní modifikace metodiky získávání indukovaných pluripotentních buněk bez nutné integrace možných tumorových genů do DNA či metoda přímého reprogramování bez nutnosti přechodu přes stav pluripotence (Caiazzo *et al.*, 2015; Lau, Rylander Ottosson, Jakobsson, & Parmar, 2014; Velasco *et al.*, 2014; J. Yu *et al.*, 2009).

**Obrázek 11. Indukované pluripotentní buňky a jejich využití**



Obrázek 11. Zdroj, příprava a možnosti využití iPS buněk v klinice. Příprava iPS buněk dle protokolu skupiny Prof. Yamanaky (Okano & Yamanaka, 2014)

### Fetální kmenové buňky

Určité kompromisem mezi vysokým potenciálem proliferace a diferenciaci, ale silnou tumorogenní aktivitou embryonálních buněk a relativní bezpečností, ale výrazně nižším potenciálem dospělých kmenových buněk, jsou buňky fetálního původu. Fetální kmenové buňky jsou již částečně diferenciovány v daném směrem, ale přesto si zachovávají silný proliferativní a migratorní potenciál a širší schopnost diferenciaci. Ve vyvíjejícím se organismu se nachází několik zdrojů neurálních či neuroepiteliálních kmenových buněk. Neurální kmenové buňky (NSC) jsou sebeobnovující se multipotentní buňky, které generují hlavní fenotypy nacházející se v nervovém systému a během ontogenetického vývoje se podílejí na jeho vzniku. Hlavním zdrojem budoucích neuronů a glií jsou ependymální buňky, nacházející podél kanálu budoucí míchy, kde dávají vzniknout předním a zadním rohům míšním, a v budoucích komorách, kde tvoří podkorové a korové struktury mozku (Urban & Guillemot, 2014). Malá

část těchto zón zastává produkci neuronů i v dospělém organismu (Okano & Sawamoto, 2008). Druhým větším zdrojem neurální diferenciace jsou pak kmenové buňky neurální lišty. Jejich působení je však více disperzní, migratorní část neurální lišty je směs zahrnující jak populace pluripotentních buněk, tak specifické prekurzory, které se podílejí na tvorbě specifických neuronů v předním mozku, sensorického či sympatického a parasympatického systému, ale i jiných ektodermálních částí těla (Delfino-Machin, Chipperfield, Rodrigues, & Kelsh, 2007; Sieber-Blum & Hu, 2008).

Implantované NSC, izolované z fetálního mozku, dlouhodobě přežívají, migrují a integrují se v poškozené míše a mohou vést k funkčnímu zlepšení po MP (Salazar, Uchida, Hamers, Cummings, & Anderson, 2010). Využití fetálních NSC v regeneraci míšního poranění má velké uplatnění, avšak pro nedostatek primární tkáně a komplikované izolace buněk je zapotřebí stabilního zdroje fetálních kmenových buněk. Ten může vzniknout jednak diferenciací iPS/ESC (Saadai *et al.*, 2013) či vytvořením kondiciované linie fetálních kmenových buněk (Pollock *et al.*, 2006).

Linie fetálních NSC, které za specifických kultivačních podmínek trvale proliferují a při implantaci či změně podmínek diferencují do neurálních prekurzorů, mohou velmi dobře sloužit jako stabilní zdroj pro léčbu poškozené CNS (H. M. Kim *et al.*, 2009; H. J. Lee *et al.*, 2007; Pollock *et al.*, 2006). Lidské fetální kortikální NSC (CTX0E03) připravené technikou 4-hydroxytamoxifenem inducibilního genu Cmyc (technologie Cmyc<sup>ERTam</sup>) jsou již v klinické studii fáze II v léčbě iktu v UK (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT02117635>). Stejnou technikou jsou připravené lidské fetální NSC derivované z 8 týdenní míchy a nejvhodnější z nich (SPC-01) byla testována v naší laboratoři se slibnými výsledky při léčbě experimentálních modelů míšního poranění v samostatné (Amemori *et al.*, 2013; Cocks *et al.*, 2013) či kombinované implantaci s hydrogelovým materiálem (Ruzicka *et al.*, 2013). Přes pozitivní výsledky aplikací fetálních NSC stále zůstává legislativně nejjednodušší cestou aplikace dospělých nemodifikovaných kmenových buněk.

## **Dospělé kmenové buňky**

V dnešní době se předpokládá, a výsledky tomu odpovídají, že naprostá většina tkání a orgánů má do jistého věku k dispozici dospělé kmenové buňky / prekurzory pro svou částečnou obnovu či remodelaci. Ne vždy se jedná jen o unipotentní prekurzory. Byla objevena celá řada multipotentních zdrojů kmenových buněk jako jsou neurální prekurzory SVZ a GD (Okano & Sawamoto, 2008; Ortega-Perez, Murray, & Lledo, 2007), různé typy kmenových buněk mesenchymálního původu (Gao *et al.*, 2014; Kolar, Kingham, Novikova, Wiberg, & Novikov, 2014; Pittenger *et al.*, 1999; Tantrawatpan *et al.*, 2013), nebo kmenové buňky vlasových folikulů (Mokos & Mosler, 2014), či kmenové buňky zubního lůžka (Xiao & Nasu, 2014). Dospělé kmenové buňky jsou dnes stále častěji jedním ze zdrojů buněk pro tkáňové inženýrství a velká řada klinických studií tkáňových náhrad zahrnuje jejich použití.

## **Neurální kmenové buňky**

NSC jsou multipotentní kmenové buňky schopné diferenciovat do neuronů, astrocytů a oligodendrocytů. V mozku reprezentuje nejaktivnější oblast především SVZ a GD, které jsou za fyziologických podmínek zdrojem neuronů a gliových buněk pro čichový lalok a hipokampus (Ortega-Perez *et al.*, 2007). V ostatních částech CNS mají ependymální buňky nacházející se v oblasti komor a míšního kanálku především gliogenní potenciál s převládající diferenciací do astrocytárního fenotypu (Okano & Sawamoto, 2008; Sabelstrom, Stenudd, & Frisen, 2014). Podíl endogenních NSC na regeneraci poškozené CNS je za patofyziologických stavů, vyžadujících náhradu mrtvých či poškozených neuronů a glií, nedostatečný. Cesty k využití dospělých NSC jsou pak zaměřeny buď na jejich externí stimulaci po poškození CNS různými růstovými a jinými faktory (Y. Lee *et al.*, 2014; C. Su *et al.*, 2013), nebo na jejich izolaci, kultivaci a následnou implantaci do místa poškození (H. Su *et al.*, 2012). V potkaních modelech míšního poranění NSC dobře přežívaly (Emgard *et al.*, 2009) a významně se podílely na remyelinizaci axonů a zlepšení lokomoční funkce (Karimi-Abdolrezaee, Eftekharpour, Wang, Morshead, & Fehlings, 2006; Wilcox, Satkunendrarajah, Zuccato, Nassiri, & Fehlings, 2014), Pokud byly NSC modifikovány tak, aby nebyly schopné produkovat myelin, nedocházelo



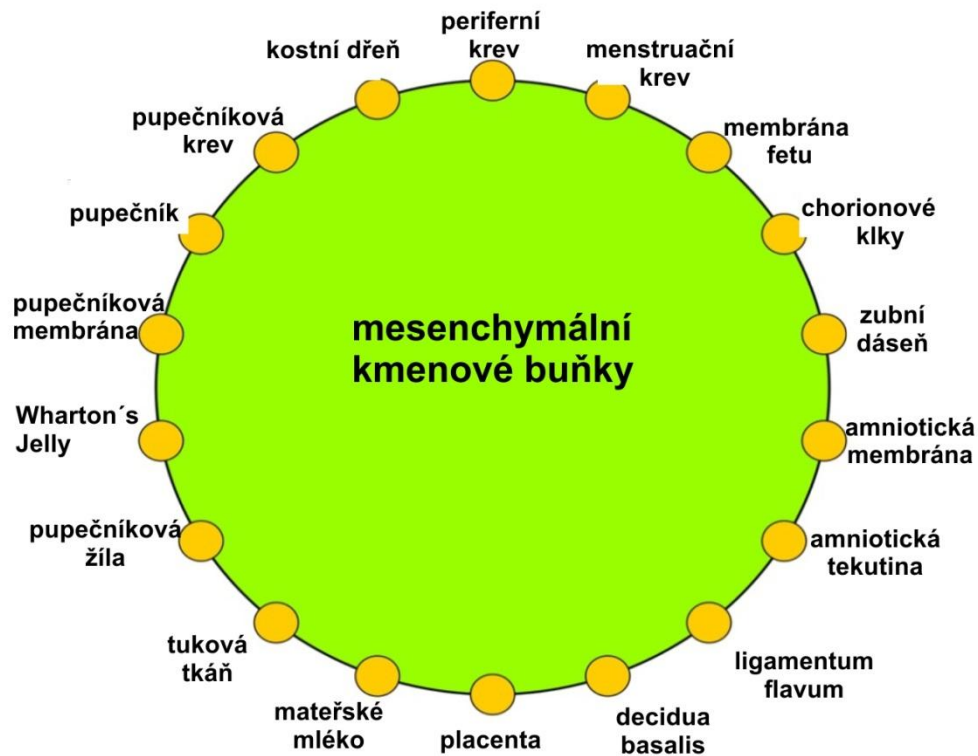
k takovému zlepšení jako v případě „wild type“ NPs (Hawryluk *et al.*, 2014). NSC jsou tedy jedním z vhodných kandidátů pro buněčnou terapii zejména díky jejich schopnosti migrace do místa poranění, produkci celé řady podpůrných faktorů (Hawryluk *et al.*, 2012) a možnosti funkčního zapojení do poškozeného systému míchy (Sabelstrom *et al.*, 2014).

### **Mesenchymální kmenové buňky**

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) byly prvně izolovány z kostní dřeně, ale posléze byl jejich výskyt objeven v řadě dalších tkání, jako je tuková tkáň, pupečnicková krev / tkáň či periferní nebo menstruační krev a další (Obr. 12.). MSC jsou multipotentní buňky, které jsou schopné diferenciovat *in vitro* a *in vivo* zejména do tkání mesenchymálního fenotypu (Parekkadan & Milwid, 2010) (kost, chrupavka, šlacha, či tuk). Za určitých podmínek byla popsána diferenciace MSC i do neuronálního fenotypu (Nandy, Mohanty, Singh, Behari, & Airan, 2014; Parloff, 1986; Tantrawatpan *et al.*, 2013), avšak diferenciace do plně funkčních neuronů jsou předmětem diskuze (Jendelova *et al.*, 2004; Lu, Blesch, & Tuszynski, 2004). Velkou výhodou je jejich, relativně snadná izolace, kultivace a aplikace *in vivo* v celé řadě tkáňových defektů či degenerativních onemocnění včetně poškozené CNS (Bae, Jin, Lee, Richardson, & Carter, 2013; Forostyak *et al.*, 2014; Teixeira, Carvalho, Sousa, & Salgado, 2013; L. Urdzikova *et al.*, 2006; Zanier *et al.*, 2014). Jejich působení v léčbě míšního poranění má především „rescue“ efekt a to na několika úrovních. Ve svém „sekretomu“, souboru všech látek produkovaných do extracelulárního prostředí, MSC produkují celou řadu růstových faktorů (VEGF, NGF) z nichž je stále řada teprve identifikována. Zároveň při implantaci produkují faktory ovlivňující IO, jež mohou posouvat poměr M1 (spíše prozánětlivý) a M2 (spíše proregenerativní) typu makrofágů (Gao *et al.*, 2014; L. M. Urdzikova *et al.*, 2014; Zanier *et al.*, 2014). V posledních letech se utváří názor, že již samotný „sekretom“ kmenových buněk může být postačující k vyvolání morfologických i funkčních zlepšení v regeneraci CNS (Teixeira *et al.*, 2013). MSC z kostní dřeně (Jendelova *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2007), tukové tkáně (Arboleda *et al.*, 2011; Kolar *et al.*, 2014) či pupečnickové krve (Cui, Li, Yang, & Wang, 2014; Ning *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2008) po implantaci do poškozené míchy ovlivňují funkční

zlepšení pomocí protektivních účinků zachovávajících bílou hmotu v oblasti léze nebo snižujících míru apoptózy.

**Obrázek 12. Zdroje kmenových buněk mesenchymálního fenotypu**



*Obrázek 12. Zdroje fetálních a dospělých kmenových buněk mesenchymálního charakteru*

*(<http://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research/stem-cell-therapy-for-islet-regeneration#SEC7>)*

## **Biomateriály pro implantaci do míšního poranění**

Vytvořené pseudocysty a centrální kavita v míšní lézi obklopená gliovou jizvou je hlavní překážkou pro regeneraci axonů, glií i kapilárního systému. Absence specifického kontaktu v kavitách a nepříznivé prostředí plné inhibičních molekul nedodává potřebný signál pro přežívání a proliferaci neurálních buněk a růst axonálního konu. Jednou z metod léčby experimentálních modelů míšního poranění je implantace biomateriálů, které přemostí vzniklé kavity a díky svým vlastnostem, orientovaným pórům, vláknům či jinak upravenému povrchu, mohou přemostit míšní tkáň přes jinak nepermissivní prostředí léze. Ideální materiál by měl splňovat níže uvedené vlastnosti:

1. Biomateriál by měl být imunologicky inertní a neindukovat reakci proti cizímu tělesu.
2. Jeho fyzikální vlastnosti by měly být co nejbližší vlastnostem extracelulárního prostředí CNS a umožňovat difúzi růstových faktorů, buněčných metabolitů etc.
3. Biomateriál by měl míšní tkáni (axonům, gliovým buňkám, cévám, apod.) poskytovat podpůrnou strukturu pro její regeneraci.
4. Biomateriál by měl být natolik měkký, aby při jeho aplikaci nedocházelo k poranění okolní tkáně otláčením a zároveň by měl dobře adherovat k míšní tkáni a zajistit tak ideální vyplnění vytvořené kavity.

Podle původu můžeme biomateriály rozdělit na přírodní (např. kolagen, alginát, želatina, či kyselina hyaluronová) nebo syntetické. Přírodní biomateriály, například alginát, mají schopnost po implantaci podporovat vrůstání endogenních neurálních buněk do míšního poranění (Kataoka *et al.*, 2001). Po jejich implantaci se mohou vytvořit ve vyplněné kavitě funkční spoje. (Suzuki *et al.*, 2002). Ovšem jako nosiče pro implantaci s kmenovými buňkami se bez dalších modifikací neosvědčily. Nespornou výhodou je jejich biodegradabilita, navíc jsou rozpoznatelné integriny buněk endogenní tkáně. Bez dalších modifikací je však degradace materiálu příliš rychlá a nestihne se v něm vytvořit nová tkáň. Jejich povrch je atraktivní pouze pro vybrané typy buněk (Novikova *et al.*, 2006). Mezi přírodními materiály má výborné

vlastnosti decelularizovaná matrix, která obsahuje i celou řadu růstových a jiných faktorů a může být použita jak v původní decelularizované, tak v lyofilizované formě (Londono & Badylak, 2015). Syntetické materiály se oproti přírodním vyznačují relativně snadnou přípravou, modifikovatelností chemických a fyzikálních parametrů a možností vytváření 3D konstruktů či vícevrstevných kopolymerů (Kubinova *et al.*, 2010; Y. L. Yu *et al.*, 2010), nanovláknenných nosičů (Tysseling-Mattiace *et al.*, 2008) či hydrogelů (Aizawa, Leipzig, Zahir, & Shoichet, 2008; Estrada *et al.*, 2014; Hejcl *et al.*, 2009; Hejcl *et al.*, 2010; Novikova *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2010). Syntetické nebo kompozitní biomateriály mohou dát vzniknout za pomoci různých variant síťování jak degradabilním tak nedegradabilním implantátům. Jejich nespornou výhodou je, že mohou být připravovány ve velkém množství, v předstihu a bez nutnosti odběru tkáně pacienta (či jiného dárce). V neposlední řadě díky těmto vlastnostem mohou být součástí kombinovaných terapií, kde díky správným modifikacím slouží jako nosič buněčné terapie či farmakoterapie při léčbě poškozené tkáně (Hoffman, 2002). Biodegradabilní polymery používané k experimentální léčbě míšního poranění jsou například fibronectin, poly- $\alpha$ -hydroxy kyseliny, polyetylen glykol (PEG) či komerčně vyráběný matrigel. Samotné fibronectinové materiály nemají tak velký vliv na regeneraci axonů, na druhou stranu se velmi dobře kombinují se Schwannovými buňkami, které mají pozitivní vliv na regeneraci míšní tkáně (Priestley *et al.*, 2002). Fibrinové materiály často slouží jako nosiče růstových a jiných modulačních faktorů, avšak jejich zásadní nevýhodou je velmi rychlý poločas rozpadu (1-2 týdny) (Novikova, Novikov, & Kellerth, 2003). Kyselina poly-glykolová či polylaktát, ať už ve formě nanovláknenných nosičů nebo hydrogelů, jsou velmi známé pro svou biokompatibilitu. Samotné, či v kombinované terapii, vedly ke snížení kavitace a funkčnímu zlepšení po MP. S modifikovanými orientovanými kanály je tento materiál určený k vedení specifických drah (Friedman *et al.*, 2002). Implantace PEG materiálů, ať už s modifikovaným povrchem či póry, vede k vrůstání míšní tkáně do implantátu a k funkčnímu zlepšení i u experimentální léčby chronického modelu míšního poranění (Estrada *et al.*, 2014; Krsko *et al.*, 2009; Lieb *et al.*, 2005; Pertici *et al.*, 2014; Roman, Niedzielko, Haddon, Parpura, & Floyd, 2011). Při testování biomateriálů, jakožto funkčních nosičů pro buněčnou terapii po MP, Matrigel stimuloval

proliferaci a zachovával morfologii implantovaných buněk (DRG neurony, MSC, olfaktorální glie, či Schwannovi buňky) (Novikova *et al.*, 2006). Na druhé straně pak stojí materiály nedegradabilní, či komposity, které se skládají z pevného obalu a biodegradabilního či permanentního jádra. Mezi nejpoužívanější nedegradabilní biomateriály patří Neurogel (hydroxypropylmetakrylamid (HPMA)) (Hejcl *et al.*, 2010; Lesny *et al.*, 2002; Sykova, Jendelova, Urdzikova, Lesny, & Hejcl, 2006; Woerly, Doan, Evans-Martin, Paramore, & Peduzzi, 2001; Woerly, Doan, Sosa, de Vellis, & Espinosa-Jeffrey, 2004) a gely založené na bázi hydroxyetylmetakrylátu (HEMA) (Colak *et al.*, 2008; Guan, Hong, Ma, & Wagner, 2008; Hejcl *et al.*, 2009; Kubinova *et al.*, 2010; Lesny *et al.*, 2006; T. T. Yu & Shoichet, 2005). Syntetické biomateriály mohou být biodegradabilní, injekovatelné, či polymerizovat za tělesné teploty. Tato vysoká flexibilita polymerů na bázi N-isopropylakrylamidu, akrylové kyseliny, N-akryloxysukcinimidu, či makromerů polyaktid-hydroxyetyl metakrylátu, otvírá široké pole působnosti pro aplikace v regenerativní medicíně a v tkáňovém inženýrství (Guan *et al.*, 2008). Specifickou formou biomateriálů pro tkáňové inženýrství jsou hydrogely.

### **Hydrogely**

Hydrogely jsou syntetické hydrofilní polymery, s vysokou porozitou (velikost pórů 10-100  $\mu$ m) a vysokým obsahem vody. Obsah vody u hydrogelů se může pohybovat od 10-20% (vázaná voda) do tisícnásobku jejich suché váhy (Hoffman, 2002; Lesny *et al.*, 2002). Molekuly vody v hydrogelu jsou jednak vázané fyzikálními interakcemi a jednak volné. Vázaná voda může být primárně vázaná voda, jež interaguje s nejvíce polárními hydrofilními skupinami nebo sekundárně vázaná voda, která se váže na exponované hydrofobní molekuly. Obsah takzvané „volné“ vody je pak hnán osmotickými silami a naopak omezován kovalentními či fyzikálními vazbami a tím je balancován objem hydrogelu. Hydrogely lze z hlediska vazby rozdělit na fyzikální (reversibilní) či chemické (permanentní). Jako fyzikální gely jsou označovány takové materiály, které jsou drženy pohromadě molekulárními interakcemi, jako jsou iontové interakce, vodíkové můstky či hydrofobní síly. Jejich změna stavu sol / gel je pak

závislá na změně fyzikálních faktorů jako je teplota či pH. Naproti tomu chemické hydrogely jsou tvořeny kovalentními vazbami a sít'ováním (Hoffman, 2002).

V biomedicině má použití hydrogelových materiálů dlouhou historii. V roce 1960 pionýrská práce prof. Wichterleho (Wichterle and Lim, 1960) na zesít'ovaných HEMA hydrogelech přinesla významné poznatky a pro jejich hydrofilní a biokompatibilní vlastnosti jsou v ohnisku zájmu mnohých vědeckých pracovišť dodnes (Bergethon, Trinkaus-Randall, & Franzblau, 1989; Costantini, Luciani, Silvestri, Tescione, & Branda, 2008; Guvendiren & Burdick, 2010; Hejcl *et al.*, 2009; Hejcl *et al.*, 2008). V léčbě experimentálních modelů míšního poranění se hydrogely používají jako matrice pro přemostění vzniklé kavity, které mají za úkol podpořit regeneraci poškozených axonů a umožnit nová neurální spojení mezi kraniálním a kaudálním okrajem poškozené míchy. Hydrogely využívají výhody syntetických biomateriálů a díky pokrokům v chemii syntetických polymerů představují významnou oblast výzkumu tkáňového inženýrství (Hoffman, 2002; Jia & Kiick, 2009; Khetan & Burdick, 2009).

### **Hydrogely na bázi hydroxyethylmetakrylátu (HEMA) a hydroxypropylmetakrylamidu (HPMA)**

Hydrogelové materiály na bázi HEMA a HPMA mají dlouhou historii od již prvních vnějších použití až po implantace do modelu míšního poranění. Bylo ukázáno, že materiály na bázi HEMA a HPMA mají fyzikální (viskoelastické) vlastnosti velmi podobné raně postnatální nervové tkáni CNS (Lesny *et al.*, 2002). Navíc tyto viskoelastické vlastnosti mohou být dle potřeby dále upravovány například i pro potřeby tkáňové náhrady kostí a jiných tvrdých tkání (Costantini *et al.*, 2008). Aplikace pHEMA a PHPMA materiálů podpořila endogenní regeneraci míšní tkáně jak v akutních tak v subakutních (Hejcl *et al.*, 2008) a chronických (Woerly, Doan, Evans-Martin *et al.*, 2001) poraněních. V případě implantace hydrogelu v subakutní fázi poranění míchy, materiál lépe adhezuje a přirůstá, což vede k menší tvorbě pseudocyst v okolí materiálu (Hejcl *et al.*, 2008). Samotné zvrásnění pHEMA povrchu po polymerizaci významně zvyšuje osídlení MSC *in vitro* (Guvendiren & Burdick, 2010). Jejich

jednoduchá příprava a veliké množství možných modifikací pórů a povrchu hydrogelu výrazně přispívá k jejich dlouhodobému a stále trvajícimu využití.

### **Povrchové modifikace**

Vlastnosti povrchu hydrogelů jsou dány podjednotkami materiálu a podjednotkami síťovací molekuly a to jejich chemickými vlastnostmi (polarita, síla pozitivních/ negativních nábojů etc.) a drsností povrchu, jež vytváří. Tyto základní povrchové vlastnosti ovšem nemusí být dostatečné pro zajištění adheze, přežívání, proliferaci a diferenciaci endogenních či aplikovaných buněk v modelech míšního poranění (Bergethon *et al.*, 1989). Jednou ze základních vlastností povrchu je jeho náboj. Při použití HEMA materiálu jakožto buněčného nosiče se ukázalo, že úprava povrchu molekulami s pozitivním či negativním nábojem výrazně ovlivnila počet adherovaných MSC v celém materiálu. V případě negativně nabitého či polyelektrolytického povrchu (pozitivní i negativní náboje) byly buňky rovnoměrně distribuované jak ve středu materiálu, tak na jeho okrajích, kdežto při použití pozitivně nabitého povrchu se výrazně zvýšil počet buněk pouze na okraji materiálu (Lesny *et al.*, 2006). Změna náboje povrchu hydrogelu může spolu s dalšími úpravami zásadně ovlivnit diferenciaci aplikovaných buněk (J. F. Liu *et al.*, 2011). Při implantaci nábojem upravených hydrogelů do míšního poranění vykazovala pozitivně nabitá HEMA nejvýraznější osídlení materiálu tkáňovými elementy. Při detailním pohledu na infiltraci axonů do implantovaného materiálu, všechny nabitě materiály infiltraci neuritů podporovaly, avšak u pozitivně nabitého materiálu axony prorůstaly ve větší míře i do středu implantátu (Hejcl *et al.*, 2009). Kromě těchto všeobecných modifikací materiálu se v průběhu experimentů osvědčily modifikace důležitými primárními sekvencemi aminokyselin (AK), složek extracelulární matrix nervové tkáně. Nejčastěji používané primární sekvence AK jsou RGD (Arg-Gly-Asp) (Hejcl *et al.*, 2010; Lieb *et al.*, 2005) či (S)IKVAV (Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val) (Kubinova *et al.*, 2010; Tysseling-Mattiace *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2007), které se vyskytují v proteinech extracelulární matrix a jsou rozeznávány molekulami integrinů. Použití RGD sekvence u HPMA hydrogelu výrazně zvýšilo adhezi a přežívání kmenových buněk *in vitro* a *in vivo* a vedlo k funkčnímu zlepšení

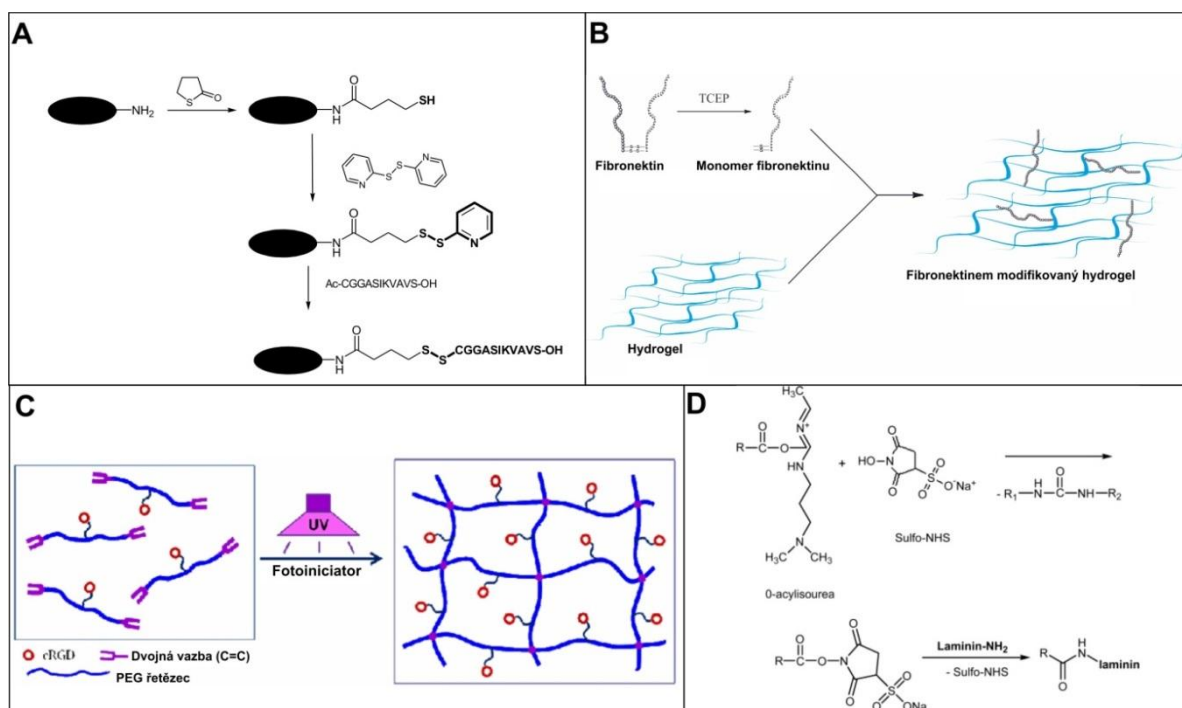
zvířat s míšním poraněním (Hejcl *et al.*, 2013; Hejcl *et al.*, 2010; T. T. Yu & Shoichet, 2005).

V případě modifikace RGD sekvence na její cyklickou formu byla posílena adheze pro endoteliální buňky (Zhu, Tang, Kottke-Marchant, & Marchant, 2009). Avšak modifikace SIKVAV sekvencí lamininu je více atraktivní pro implantované buňky a endogenní tkáň nejen z hlediska adheze ale i z hlediska jejich morfologie (Jung *et al.*, 2009; Kubinova *et al.*, 2010; T. T. Yu & Shoichet, 2005). SIKVAV sekvence navíc ukazuje výraznou podporu pro růst neurální tkáně (Wei *et al.*, 2007) a diferenciaci neurálních prekurzorů (Kubinova *et al.*, 2010).

Nanovlákná Ampiphilinu modifikované sekvencí SIKVAV navíc potlačovala tvorbu gliové jizvy, snižovala buněčnou smrt a zvyšovala počty oligodendrocytů v místě poranění (Tysseling-Mattiace *et al.*, 2008). Povrchové modifikace mohou být i velmi cílené či provedené nekovalentní vazbou, sloužící tak jako zdroj růstových faktorů či enzymů, podporující přirozenou regeneraci poškozené míšní tkáně (Obr. 13). Kovalentní vazba či postupné uvolňování růstových faktorů může vést k morfologickým změnám, urychlené diferenciaci aplikovaných buněk, či funkčnímu zlepšení po MP (Aizawa *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2013; Willerth, Fixel, Gottlieb, & Sakiyama-Elbert, 2007). Například, v případě použití enzymů jako jsou chondroitináza ABC (Hyatt, Wang, Kwok, Fawcett, & Martin, 2010; Kwok *et al.*, 2008) či protilátek proti nogo-66 receptoru (Wei *et al.*, 2010), které štěpí gliovou jizvu nebo blokují inhibiční molekuly v prostředí léze, tak dochází k zvýšení plasticity prostředí a díky zapouzdření v hydrogelu a teplotní stabilizaci enzymu vzniká prodloužený efekt, který může vést k ještě významnějšímu morfologickému a funkčnímu zlepšení (H. Lee, McKeon, & Bellamkonda, 2010).



### Obrázek 13. Modifikace povrchu hydrogelů



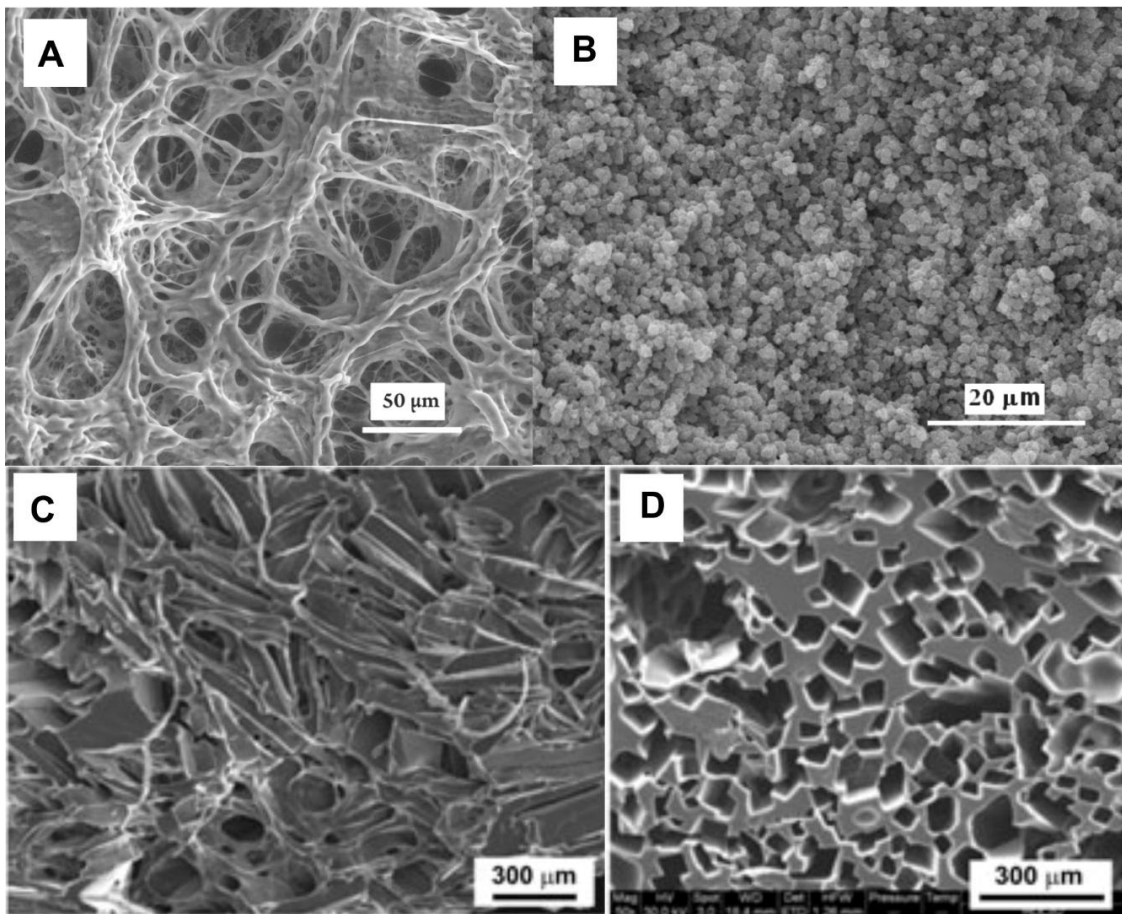
Obrázek 13. Příklady modifikací povrchu hydrogelů pro zvýšení bioadhezivitu materiálu (A, unpublished part of (Kubínova et al., 2014)) (Kubínova et al., 2010; Kubínova, Horak, & Sykova, 2009; Zhu et al., 2009) (B, D, C).

### Porozita

Difúzní parametry hydrogelů, které ovlivňují dostupnost živin pro endogenní či aplikované buňky a odvod metabolitů, významně ovlivňují póry hydrogelu a jejich propojení (Somo et al., 2015). Póry mohou být tvořeny několika cestami (Obr. 14.). Ve snaze o tvorbu co nejpřirozenější porézní struktury, která účelně propojuje a směřuje růst tkáňových elementů lézí, jsou póry tvořeny buď heterofázovou separací (HS), nebo mohou vznikat jako menší póry v rámci sítě mezi podjednotkami (Hejcl et al., 2013; Kubínova et al., 2009), či mohou být tvořeny například inkorporací nanovláknenných struktur do materiálu, ze kterého jsou po procesu polymerace šetrně odstraněny (Hammer, Han, Tong, & Yang, 2014). Průměrná velikost pórů, distribuce velkých a malých pórů a jejich interkonektivita jsou důležitými faktory každého materiálu a mají velký vliv právě na difúzní parametry materiálu (tortuozitu) (Hoffman, 2002). Kromě velikosti pórů, jež rozhoduje o tom, jaké populace buněk budou vrůstat do materiálu, je

druhým parametrem jejich orientace. V léčbě míšního poranění může aplikace HEMA hydrogelu modifikovaného SIKVAV sekvencí s orientovanými póry vést k zvýšení efektivity léčby (Kubinova *et al.*, 2013). Nicméně k vyvinutí efektivní léčby je zapotřebí kombinované léčby, ve které hydrogelové materiály se specifickými povrchovými úpravami a orientovanými póry mohou být jedním z prvků této terapie.

**Obrázek 14. Rozličnost struktury pórů v hydrogelových materiálech**



*Obrázek 14. Porozita materiálů tvořená různými technikami. Technika tvorby hydrogelových pórů využívající solidního porogenu (SP) (A), či HS (B) (Hejcl *et al.*, 2013). Technika SP může být použita k tvorbě jak neorientovaných (C), tak orientovaných pórů (D) (Kubinova *et al.*, 2013).*

## Kombinované terapie po MP

Vzhledem k složitosti CNS a komplexitě míšního poranění vedou jednotlivé léčby především k specifickým změnám a jen částečnému morfologickému či funkčnímu zlepšení. Z tohoto důvodu kombinace úspěšných léčeb do jedné účinné terapie může přinést synergistický efekt, jež povede k výraznému zlepšení po MP (Iwasaki *et al.*, 2014; Karimi-Abdolrezaee, Eftekharpour, Wang, Schut, & Fehlings, 2010). U kombinovaných terapií však ještě více vyvstává otázka správného načasování jednotlivých kroků a cesty podání. V mnoha případech se ukazuje, že vždy neplatí, že více složek terapie se rovná lepší regeneraci (D. Y. Park *et al.*, 2013). Kombinované terapie se většinou snaží několika mechanismy podpořit jeden z hlavních aspektů regenerace (zachování tkáně, zvýšení plasticity systému, náhrada spojení, neuronů a glií) nebo zacílit na více prvků poranění bránících regeneraci (Alluin *et al.*, 2014; Iwasaki *et al.*, 2014; Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2010). Například terapie zahrnující akutně podanou protilátku proti Nogo-a (Anti-Nogo-a) a subakutní aplikace chondroitinázy (3 týdny po poranění) přinesla synergický efekt vedoucí k mnohem většímu axonálnímu sproutingu, než aplikace jednotlivých léčeb, což se projevilo větším funkčním zlepšením během rehabilitace (Zhao *et al.*, 2013). Podobným případem bylo úspěšné použití chondroitinázy ABC dohromady s neurotrofinem NT-3 a NMDA-NR2d pro celkové zvýšení plasticity a zároveň snížení probíhající apoptózy (Garcia-Alias *et al.*, 2011). Takováto kombinovaná léčba byla efektivní i v případě, kdy v kombinaci s NT-3 a NMDA-NR2D byla použita protilátka proti NOGO-A (Schnell *et al.*, 2011). Aplikace kmenových buněk do agresivního prostředí míšní léze nenastavuje ideální podmínky pro jejich působení a v případě dospělých kmenových buněk, jako jsou MSC, může vést k rapidnímu snížení jejich počtu i jejich efektivity. Implantace kmenových buněk spolu s biomateriály umožňuje tyto podmínky upravit a navíc i zapojit efekt léčby hydrogelem samotným, jenž v dnešní době není jen pasivním nosičem, ale může podporovat kmenové buňky i míšní tkáň celou řadou faktorů, urychlit proliferaci či diferenciaci neurálních prekurzorů, či vytvořit aktivní lešení pro propojení konců poškozené míchy (Hejcl *et al.*, 2010; Iwasaki *et al.*, 2014; Mothe, Tam, Zahir, Tator, & Shoichet, 2013). Hledání ideálních kandidátů pro

kombinovanou terapii míšního poranění je vzhledem k neustále narůstajícímu množství kmenových buněk, materiálů a růstových a jiných faktorů poměrně složité a dlouhodobé. Navíc v dnešní době přibývá nejen experimentálních metodik léčby, ale i klinických studií zahrnujících neurální prekuzory (Feldman *et al.*, 2014; Luan *et al.*, 2013) či MSC (Dai *et al.*, 2013; Chernykh *et al.*, 2007; Karamouzian, Nematollahi-Mahani, Nakhaee, & Eskandary, 2012; Sykova, Homola *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2007) v léčbě celé řady neurodegenerativních onemocnění či poranění CNS. Proto je velice důležité porovnávat více parametrů léčby a jejich klinickou relevanci na jednotných modelech, jež se co nejvíce blíží klinickým situacím.

## **Experimentální modely míšního poranění**

Přes dlouhodobý výzkum problematiky míšního poranění jednotlivé mechanismy procesů následujících po poškození míchy nejsou odhaleny. Z tohoto důvodu je prozatím velmi nesnadné a nepřesné zkoumat možnou léčbu poškozené tkáně CNS na *in silico* modelech. Na druhou stranu *in vitro* modely buněk či řezů míchy jsou příliš zjednodušující, a ačkoliv dodávají zásadní informace výzkumu poraněné míchy, *in vivo* modely pro nejčastější typy poranění jsou dnes největším zdrojem informací. K posouzení vlivu experimentální léčby na procesy míšního poranění je dobrý zvířecí model velmi důležitý. Nejčastějším modelovým zvířetem pro MP je potkan, následován myši, s mnoha transgenními modifikacemi. Existuje celá řada modelů míšního poranění. Jejich základní rozdělení je na modely chirurgické a chemické. Chirurgické modely můžeme rozdělit na ostré (hemisekce, transekce) a neostré (komprese, kontuze). Speciálním příkladem nechirurgických modelů může být model fotochemické léze či excitotoxický model.

### **Sekční modely**

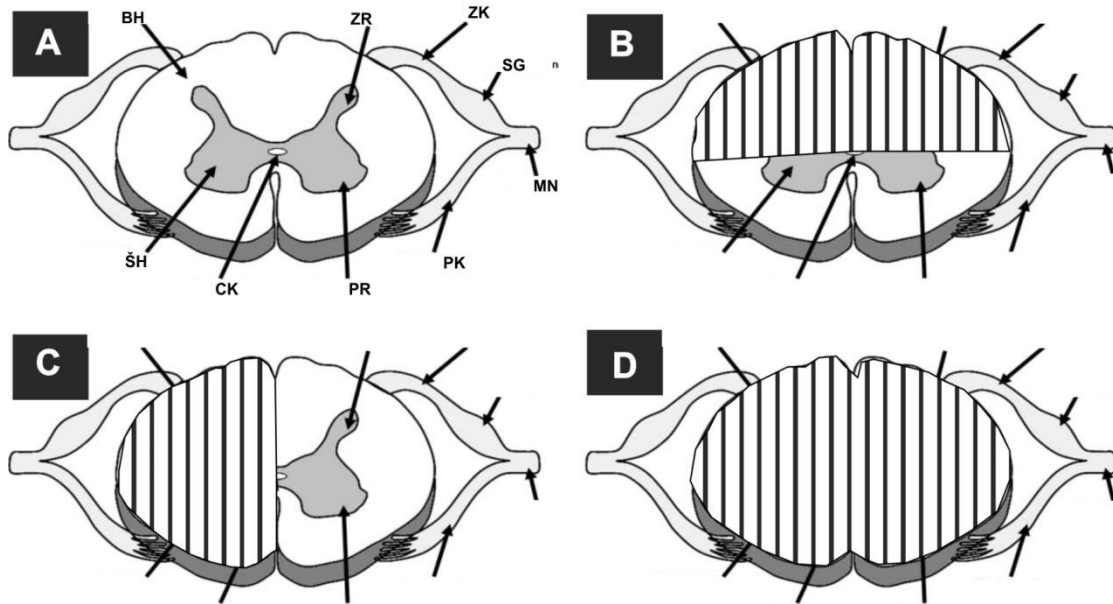
Model transekce zahrnuje kompletní přetěti míchy a v některých případech i vynětí části tkáně (např. o velikosti míšního segmentu). Při transekci jsou přetnuty jak míšní provazce, tak šedá hmota míšní a v závislosti na kraniokaudálním umístění dochází buď ke kompletní paraplegii či kvadruplegii (pentaplegické modely se obvykle nevyužívají) se všemi klinickými následky jako je ztráta lokomočních a sensorických dovedností pod inervací přerušeno

segmentu, poruchy močení se vznikem neurogenního močového měchýře atd. V klinickém prostředí se tato situace kompletního přerušení stává jen málokdy, většinou zůstává část funkčních axonů zachována. Nespornou výhodou tohoto modelu je možnost sledování počtu regenerujících vláken a možnosti testování biomateriálů, nabízející jasné rozhraní mezi implantovanými biomateriály a tkání a sledování jejího postupného pronikání do arteficiálního prostředí. Další výhodou tohoto modelu je využití behaviorálních testů, které jasně ukazují vliv léčby na motorické dovednosti potkana (bez léčby stále paraplegický). Nevýhodou tohoto modelu je však náročná péče o zvířata především během prvních několika týdnů po poranění.

Model hemisekce míchy se vyznačuje přetětím poloviny míšního segmentu (laterální nebo dorzální), po kterém většinou následuje vyjmutí části tkáně (většinou v délce jednoho segmentu). Při laterální hemisekci je přetnuta polovina míšních drah a ipsilaterální část šedé hmoty míšní. Tento zásah pak vede ke klinickým projevům, jako jsou ztráta motoriky a propriocepce v ipsilaterální končetině a porucha čítí (bolesti a tepla) na straně kontralaterální. Klinicky relevantní této situaci je Brown-Séquardův syndrom. V případě dorzální hemisekce dochází ke ztrátě senzoryky jak na ipsilaterální tak kontralaterální straně bez závažnější ztráty lokomočních funkcí. Výhodou hemisekčních modelů je nízký dopad poranění na modelové zvíře z hlediska lokomoce a menší sekundární komplikace než v případě transekce či vyšších nesekčních poranění (Obr. 15).

Ostré modely se často používají pro testování biokompatibility materiálů či sledování regenerace specifických elementů míšní tkáně včetně vaskularizace (Garcia-Alias *et al.*, 2011; Hejcl *et al.*, 2009; Schnell *et al.*, 2011). Novotvorba axonů či laterální sprouting pak může být pozorován za pomoci technik retrográdního či anterográdního barvení. Velkou nevýhodou modelu jsou laminektomie a durotomie, čímž se snižuje klinická relevance modelů. Zároveň laminektomie slouží jako chirurgická dekomprese a snižuje průběh sekundárních procesů poranění. Laminektomie nejen u ostrých modelů, ale i u některých modelů kontuze a komprese, sebou přináší i následné poškození okolní tkáně a zvýšení pravděpodobnosti infekce (Chung *et al.* 2013).

**Obrázek 15. Sekční modely poranění míchy**



*Obrázek 15. Řez zdravou míšní tkání (A) a jednotlivé sekční modely; Dorzální hemisekce míšní (B), laterální hemisekce míšní (C) a transekce míchy (D). BH - bílá hmota, CK - centrální kanálek, MN - míšní nerv, PK - přední kořeny, PR přední roh, SG sympatický ganglion, ŠH šedá hmota, ZK zadní kořeny, ZR zadní roh.*

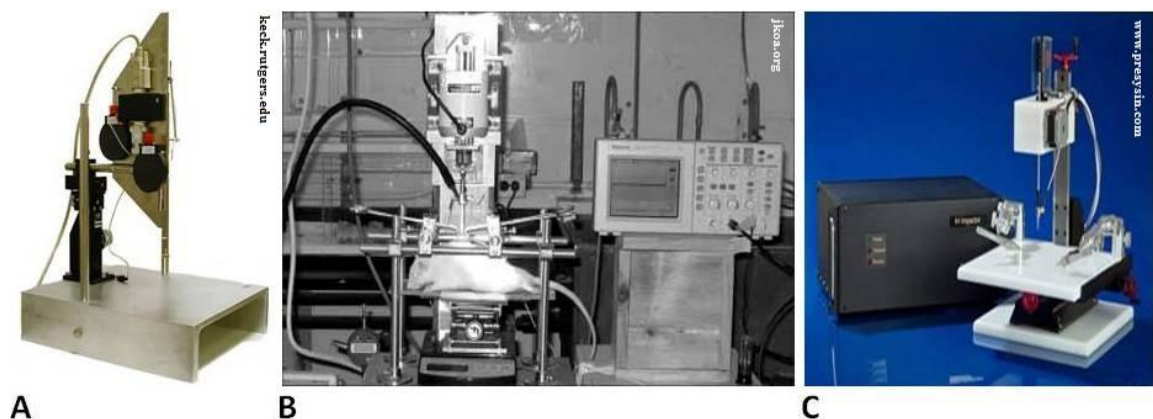
### **Neostré modely**

Většina klinických míšních poranění je složená z prvků kontuze i komprese. Primární poranění vzniká v důsledku prudkého krátkodobého impulsu (modely kontuze), které se dále rozvíjí kompresí vzniklou poškozením oblouku či těla obratle, jenž dále tlačí na poškozenou míchu (modely komprese). Poměr kompresních a kontuzních prvků poranění následně určují průběh sekundárních procesů včetně ischemicko reperfučního poškození a odpovědi imunitního systému.

## ***Kontuze míchy***

Modely kontuze míchy (pohmoždění míchy) jsou důsledkem rychlého impaktu i o menší či střední síle, jenž má krátké trvání (v rámci sekund). Zobrazují klinické situace, ruptury či dislokace obratle při prudkém nárazu. Nejstarším modelem kontuze je „Weight drop model“, jenž byl zaveden již v roce 1911 (Allen 1911), který se posléze dočkal celé řady modifikací (Obr. 16.). V současnosti je tento model velmi propracovaný a v celé řadě případů může být řízen počítačově. Dnes se používají jeho tři varianty a to NYU (New York University) (M. J. Walker *et al.*, 2015) OSU (Ohio State University) (Mann *et al.*, 2010) impaktor či IH (Infinite Horizon) (Strejiger *et al.*, 2013). Všechny tři modely využívají kinetiky dopadu specifického závaží na odhalenou míchu, ale liší se proměnnou funkcí. U NYU impaktoru je proměnnou, která určuje velikost poranění, počáteční výška impaktoru před indukcí léze, kdežto u OSU impaktoru je tímto faktorem míra stlačení míchy. U IH metody je určující veličinou naměřená síla impaktu. Díky elektronickému záznamu vstupních dat je možno přímou selekcí dosáhnout nízké variability mezi jedinci. Nevýhodou ovšem stále zůstává absence prvků komprese a to jednak modelem samotným a jednak provedenou laminectomií.

**Obrázek 16. Kontuzní modely poranění míchy**



*Obrázek 16. Vyobrazení NYU (A), OSU (B) a IH (C) impaktoru, jakožto hlavních technik kontuzního modelu míšního poranění (Mahdi & Vafa, 2014).*

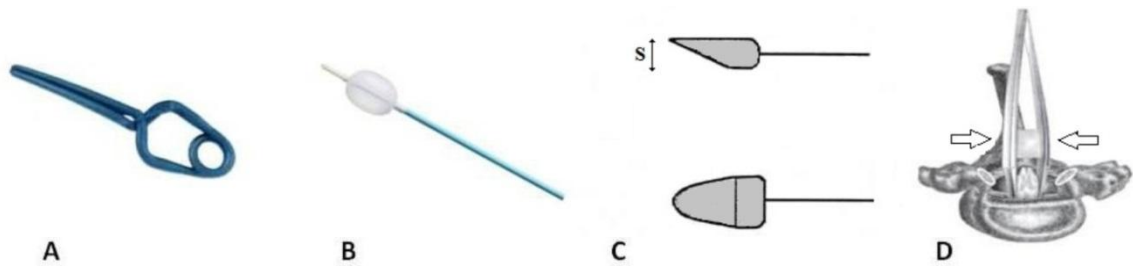
### ***Kompresní modely***

Další podskupinou neostrých modelů poranění míchy je komprese míchy (Obr. 17). Tento typ modelů se ještě více blíží klinické situaci u pacientů, neboť kromě primárního impaktu dochází i k přetrvávajícímu (i když ne permanentnímu) stlačení míchy. Díky tomuto faktoru model umožňuje zaměřit terapii i na přidružené sekundární procesy poranění. Navíc některé typy experimentální komprese mích nevyžadují ani částečnou laminektomii v místě poranění, čímž dochází v modelu i k edému a dalším patologickým krokům po MP. Tyto procesy jsou velmi zásadní v rozvoji léze. Kompresní modely mohou být velmi jednoduché, jako například komprese aneurismální svorkou (Rivlin & Tator, 1978), nebo složitější, jako je statický kompresní model (W. L. Huang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013) či balonkový kompresní model (Oro, Gibbs, & Haghghi, 1999; L. M. Urdzikova *et al.*, 2014; Vanicky, Urdzikova, Saganova, Cizkova, & Galik, 2001). Výhodou těchto modelů je tudíž i nenáročnost na vybavení operačních prostor laboratoře. Více specializované modely, jako je model statický, umožňuje menší velikost laminektomie a větší unifikaci velikosti poranění. V některých podtypech statického modelu však dochází až ke klinicky nerelevantně pomalému stlačení míchy (Zhang *et al.*, 2013). Modelem, který je nejbližší klinické situaci, je balonkový kompresní model, který dobře napodobuje reálnou klinickou situaci v případech kompresní fraktury obratlového těla či výhřezu ploténky. Zároveň má tento model několik výhod, které vedou k plnému rozvinutí míšní léze a relativně snadné kontrole velikosti a místa poranění. Zavedením 2F Fogartyho katedru o 2 segmenty níže, než je oblast plánované míšní léze, nedochází k laminektomii v místě poranění a tudíž zde dochází k minimálnímu jizvení tkáně, což je důležitým faktorem při subakutních terapiích jako například *in situ* implantaci kmenových buněk či biomateriálu bez nutné resekce. Velikost léze se pak dá ovlivnit dvěma faktory a to jednak objemem kapaliny v balonku katedru a jednak délkou působení. Díky podobnosti s klinickou situací se během subakutní fáze modelu v centru léze rozvíjí nekróza, krvácení a edém tkáně, na což navazují procesy vytváření posttraumatických pseudocyst ohraničených gliální jizvou. Postupně se rozvíjí chronická fáze se zvyšující se atrofií míšní tkáně. Tento model je tudíž velmi vhodný nejen k subakutním modelům léčby, ale může zacílit i



na akutní fázi poranění například léčbou modulující imunitní odpověď či na fázi chronickou s využitím různých biomateriálů na vyplnění vzniklých kavit (Estrada *et al.*, 2014) kombinovaných s buněčnou (Hejcl *et al.*, 2010) terapií či experimentálních léčeb zvyšujících plasticitu nervové tkáně (Alluin *et al.*, 2014).

### Obrázek 17. Kompresní modely poranění míchy



Obrázek 17. Nejčastější techniky modelu kompresního poranění míchy. Aneurismální svorka (A), 2F Fogartyho katetr (B), rozpěra (C), lékařské kleště (D). Šířka rozpěry (s) (Mahdi & Vafa, 2014)

## Hypotézy a cíle práce

Souhrnným cílem této práce bylo studovat nové možnosti kombinované terapie experimentálních modelů poranění míchy u potkana, především pak zhodnotit jednotlivé možné složky těchto terapií, jejich vliv na poškozenou míšní tkáň a možnosti vzájemného ovlivnění jednotlivých složek terapie.

Cílem práce bylo ověření následujících hypotéz

1) Intravenózní aplikací Flt3 ligandu, G-CSF či jejich kombinací lze mobilizovat endogenní MSC a tím dosáhnout funkčního zlepšení po MP

Cíl: Potkanům s balonkovou kompresní lézí podat Flt3 ligand a G-CSF nebo jejich kombinaci a pomocí behaviorálních testů, morfometrickou analýzou poškozené míchy a imunohistochemickou analýzou ověřit efekt léčby.

2) Lidské kmenové buňky z různých zdrojů (kostní dřeň, fetální tkáň, indukované pluripotentní buňky) po implantaci do MP využívají odlišné mechanismy ke zlepšení lokomoční funkce potkanů po MP.

Cíl: Potkanům s balonkovým modelem kompresního poranění míchy transplantovat MSC z kostní dřene, immortalizované buňky fetálních spinálních progenitorů SPC-01 a neurální prekursor derivované z indukovaných pluripotentních buněk a pomocí histologických a imunohistochemických analýz, kvantitativní PCR a detekce hladiny prozánětlivých cytokinů zhodnotit regeneraci míšní tkáně a výsledky korelovat se zlepšením motorických funkcí.

3) Povrchová modifikace primární sekvencí AK molekul extracelulární matrix (RGD) a různé typy pórů v hydrogelu ovlivňují přežívání aplikovaných kmenových buněk a infiltraci endogenní tkáně do hydrogelového implantátu v léčbě experimentálního modelu poranění míchy.

Cíl: Čtyři typy gelů na bázi metakrylátu osadit mezenchymálními kmenovými buňkami exprimujícími zelený fluorescenční protein (GFP+MSC). Pomocí imunocytochemické a imunohistochemické analýzy porovnat přežívání aplikovaných buněk in vitro a in vivo v modelu hemisekce míchy potkana a jejich schopnost podpořit vrůstání jednotlivých buněk míšní tkáně (cévy a axony).

4) pHEMA hydrogel s povrchovou modifikací molekulami serotoninu vede k zvýšené diferenciaci implantovaných spinálních fetálních prekurzorů a k synergistickému efektu léčby a funkčnímu zlepšení v experimentálním modelu hemisekce míchy.

Cíl: Osít pHEMA-5HT hydrogel SPC-01 buňkami a imunohistochemicky a obrazovou analýzou zhodnotit vliv pHEMA-5HT hydrogelu na přežívání, růst proliferaci a diferenciaci SPC-01 neurálních prekurzorů in vitro a in vivo v modelu hemisekce míchy. Pomocí behaviorálních testů zhodnotit lokomoční a sensorické funkce potkanů po implantaci pHEMA-5HT hydrogelu s SPC buňkami.

## **Materiál a metodika práce**

### **Pokusná zvířata**

Veškeré experimenty, které zahrnovaly použití laboratorních zvířat, byly prováděny v souladu se směrnicemi Evropské rady z 22. Září 2010 (2010/63/EU) a zároveň dle protokolů schválených komisí pro péči o laboratorní zvířata na Ústavu experimentální medicíny AVČR.

Ke studiu vlivu kmenových buněk a biomateriálů při léčbě experimentálních modelů míšního poranění, byli použiti potkaní samci kmene Whistar ve věku 2 měsíců a váze  $300 \pm 10$ g (Anlab). Potkani byli umístěni v párech v systému individuálně ventilovaných klecí (IVC, Tecniplast) při teplotě  $22^{\circ}\text{C}$  a 12 hodinovém střídání světla a tmy. Voda a jídlo bylo dostupné *ad libitum*. V průběhu experimentu byli potkani týdně váženi a veškeré medikamenty byly následně přepočítány dle aktuální váhy zvířete. Doprovodné léky (antibiotika, imunosuprese, léky proti bolesti) byly aplikovány všem potkanům bez ohledu na léčebnou či kontrolní skupinu z důvodu zachování stejných podmínek experimentu. Analgetika byla podávána jednorázově vždy po operačním zákroku. Antibiotika byla podávána prvních 10 dní po experimentu. Imunosuprese byla podávána po celou dobu experimentu.

### **Balonková kompresní léze**

Balonková kompresní léze, která byla použita jako uzavřený model míšního poranění, napodobuje sekundární procesy probíhající po kompresních poraněních míchy u pacientů a zároveň je vysoce reprodukovatelná (L. Urdzikova *et al.*, 2006). Před zahájením operačního zákroku byla zvířata uvedena do celkové anestezie (Isoflurane, 3%, 300ml/min), která byla sledována a regulována během celého zákroku. Po absenci odpovědi na středně bolestivý stimulus, byla vyholena oblast hrudních obratlů a poté byl proveden řez střední čarou podél processu spinosi. Následně byla provedena separace paravertebrálních svalů obratlů Th9-Th13, byly odstraněny processu spinosi Th10-11 a provedena částečná laminektomie Th10. Do vzniklého epidurálního prostoru byl zaveden 1cm experimentálního katetru s centrem balonku v oblasti Th8. Bylo provedeno měření tělesné teploty ( $37^{\circ}\text{C}$ ) a frekvence a hloubky dechu. Po

stabilizačním intervalu (5 minut) byla indukována léze naplněním balonku 18 $\mu$ l fyziologického roztoku (FR). Po dobu 5-ti minut tento tlak přetrval, poté byl balonek velmi rychle vypuštěn a vyjmut. Následně byl potkan zašit po jednotlivých vrstvách a byly injikovány léky proti bolesti a antibiotika.

### **Laterální hemisekce míchy**

Laterální hemisekce míchy, která byla použita jako otevřený model poranění, se podobá klinickým projevům Brown-Sequardova syndromu či poraněním vzniklým vniknutím ostrého předmětu do míšní tkáně. Před zahájením operačního zákroku byla intraperitoneálně indukována celková anestezie (Pentobarbital, 1g/100ml, 6ml/kg), intramuskulárně podána antibiotika (Gentamicin 0,05ml i.m., Lek Pharmaceutical) a atropin (0,2ml s.c. 1:5) ke snížení salivace během operačního zákroku. Během celé operace byl používán operační mikroskop (15-25X, Zeiss, Německo). Po absenci odpovědi na středně bolestivý stimulus byla vyholena oblast hrudních obratlů Th8-9 a poté byl proveden 1-2 cm dlouhý řez střední čarou podél processu spinosi. Pomocí skalpelu byly šetrně odstraněny paravertebrální svaly a posléze provedena laminektomie na úrovni Th8. Následná durotomie byla vedena ve střední čáře segmentu a 2mm široký pás dury byl oddělen od střední čáry k pravému okraji míchy. Následně byla vyjmuta polovina míšního segmentu (cca 1mm<sup>3</sup>).

### **Intravenózní Aplikace Flt3 ligandu a G-CSF**

Sedm dní po MP byl aplikován Flt3 ligand (Amgen, Inc., 50  $\mu$ g/kg, i.v.), G-CSF (Neupogen, Amgen, Inc., 50  $\mu$ g/kg, i.v.), či jejich vzájemná kombinace (G-CSF 25  $\mu$ g/kg + Flt3 ligand 25  $\mu$ g/kg, i.v.) (v případě neléčené kontroly FR (1 ml/kg, i.v.)). Aplikace probíhala opakovaně vždy ve stejný čas po dobu 5-ti dnů.

### **Implantace kmenových buněk**

Sedm dní po MP byly implantovány kmenové buňky. Oblast implantace byla vyholena, a poté byl proveden podélný řez kůží nad processu spinosi. V případě MSC byly buňky aplikovány injekčně ve FR ( $5 \times 10^5 / 50 \mu$ l) intratekálně do oblasti L4-5. V případě neurálních

prekurzorů byly buňky podány ve FR ( $5 \times 10^5 / 5 \mu\text{l}$ ) pomocí mikro-injekčního automatizovaného systému (KOPF, Tujunga, CA, USA) přímo do místa poranění. Po implantaci byly jednotlivé vrstvy zašity a zvíře ošetřeno. Imunosupresi tvořila kombinace Cyklosporinu (10mg/kg, Sandimmun, Novartis) a sodium azathioprinu (2mg/kg).

## **Typy použitých buněk**

### **Mesenchymální kmenové buňky potkana**

Mesenchymální kmenové buňky potkana (rMSC) byly izolovány z kostní dřevě 4 týdenních potkanů (Wistar, Anlab) a GFP pozitivní rMSC ze 4 týdenních potkanů transgenní linie kmene Sprague-Dowley (kód linie: TgN acro/act EGFP-4Os). Zvířata byla hluboce anestetizována Isofluranem, dekapitována, femury a tibie byly vyjmuty a důkladně očištěny od měkkých tkání. V laminárním boxu byly odštipnuty epifýzy kostí a kostní dřevě vymyta do zkumavky s použitím injekční stříkačky a jehly naplněné Dullbecem modifikovaným médiem podle Eagla (DMEM) s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) a antibiotikem Primocinem (2  $\mu\text{l/ml}$ ). Obsah zkumavky byl následně jemně resuspendován a suspenze byla vysazena na Petriho misku. Po 24 hodinách proběhla výměna media, čímž byly zároveň odstraněny neadherující buňky. Medium bylo dále vyměňováno 2x týdně. Po dosažení přibližně 80% konfluence byly adherované buňky pasážovány pomocí roztoku trypsinu a EDTA. Buňky byly kultivovány v inkubátoru, v 5% atmosféře  $\text{CO}_2$  při 37 °C. V experimentech byly použity buňky druhé a třetí pasáže. Adipogenní, chondrogenní a osteogenní diferenciací byla provedena na ověření multipotentního potenciálu buněk. Typická morfologie buněk v kultuře byla monitorována mikroskopicky.

### **Lidské mesenchymální kmenové buňky**

Lidské mesenchymální kmenové buňky (hMSC) byly připraveny za GMP (Good manufacturing practice) podmínek. Mononukleární frakce byla separována od kostní krve gradientovou centrifugací za použití 25% gelofusinu (B.Braun, Melsungen, Německo). Buňky byly následně vysety a expandovány v mediu obsahujícím  $\alpha\text{MEM}$  bez přítomnosti

ribonukleotidů, deoxiribonukleotidů a UltraGlutaminu (Lonza, Basel, Švýcarsko) suplementovaném 5% alogenním destičkovým lyzátem (Bioinova, Praha, Česká Republika) a 10 µg/ml gentamycinu (Lek Pharmaceuticals, Ljublanja, Slovenia). MSC z druhé pasáže byly analyzovány za pomoci průtokové cytometrie (FACS) (FACS Aria flow cytometer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) a použity pro implantaci. Buňky byly pozitivní na následující markery CD105, CD73 a CD90, a zároveň negativní na CD45, CD34, CD14 a CD11b, CD79alpha a HLA-DR (Human Leukocyte Antigens locus DR) povrchové molekuly. Adipogenní, chondrogenní a osteogenní diferenciací byla provedena na ověření multipotentního potenciálu buněk. Typická morfologie buněk v kultuře byla monitorována mikroskopicky.

### **Lidské fetální neurální prekursor z míchy**

Stabilní kondiciovaná imortalizovaná linie lidských fetálních neurálních prekursorů (SPC-01) byla derivována z 8 týdenní lidské fetální míchy a imortalizována v Laboratoři Jacka Price v Kings College v Londýně (Pollock *et al.*, 2006) za pomoci retrovirem vloženého konstruktů c-mycER<sup>TAM</sup>. Produkt toho genu stimuluje proliferaci buněk v přítomnosti 4-hydroxytamoxifenu, jenž aktivuje transkripci přes element hormonální odpovědi c-mycER<sup>TAM</sup>. V nepřítomnosti tamoxifenu se tak proliferace buněk zastaví a buňky mohou diferencovat do neuronů a astrocytů. SPC-01 buňky byly pro lepší detekci ve tkáni příjemce transdukovány zeleným fluorescenčním proteinem GFP3. Buňky SPC-01 byly kultivovány v mediu, které obsahovalo DMEM/F12, 3% lidský sérový albumin, lidský apo-transferrin (100 µg/ml), putrescin DiHCL (16,2µg/ml), lidský rekombinantní insulin (5µg/ml), progesteron (60 ng/ml), L-glutamin (2 mM), selenit sodný (40 ng/ml), HEGF (20 ng/ml), 4-hydroxytamoxifen (100 nM) a lidský b-FGF (10ng/ml). Po dosažení přibližně 70-90% konfluence byly buňky pasážovány s použitím 0,25% TrypZeanu a 0.25 mg/ml trypsinového inhibitoru ze sojových bobů (Lonza, Basel, Switzerland) a využity v experimentech.

### **Lidské neurální prekursor derivované z indukovaných pluripotentních buněk**

Neurální prekursor derivované z lidských indukovaných pluripotentních buněk (NP-iPS) byly připraveny v laboratoři Bridgitte Onteniente v Paříži (Polentes et al.2012). Lidská iPS linie

byla připravena z fetálních plicních fibroblastů (IMR90) (ATCC, USA), transdukována lentivirem s kombinací OCT4, SOX2, NANOG a LIN28 lidské cDNA (Polentes et al., 2012). Rané neurální prekurzory byly produkovány v nízko adhezivním prostředí v přítomnosti několika faktorů; Noggin (500 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN), inhibitoru dráhy TGF- $\beta$  SB 431542 (10 nM) (Sigma, St. Louis, MO), bFGF (10  $\mu$ g/ml) a BDNF (20  $\mu$ g/ml) (Pepro Tech, London, UK). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích potažených poly-L-ornithinem (0,002% v destilované vodě) a lamininem (10  $\mu$ g/ml v DMEM:F12). Růstové medium se skládalo z DMEM:F12 a Neurobazálního media (1:1), B27 supplementu (1:50), N2 supplementu (1:100) (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY), L-glutaminu (2 mM) (Sigma), penicillinu and streptomycinu (50 U/ml) (GIBCO), FGF (10 ng/ml), EGF (10 ng/ml) and BDNF (20 ng/ml) (PeproTech, London, UK). Před implantací byly NP-iPS předdiferencovány 7 dní ve stejném mediu, avšak bez přítomnosti FGF a EGF.

### **Implantace hydrogelu**

Do předem připravené laterální hemisekce byl vložen hydrogel (nebo hydrogel osetý kmenovými buňkami) o velikosti 1 mm<sup>3</sup>, podle velikosti hemisekce, aby implantát vyplnil co nejlépe lézi a nedocházelo tak ke tvorbě kavit na přechodu tkáně a materiálu a zároveň, aby nebyla tkáň vystavena mechanickému útlaku ze strany materiálu a nedocházelo tak k tvorbě cyst. Po implantaci materiálu byla zašita dura mater a následně jednotlivé další vrstvy. V případě materiálů osazených kmenovými buňkami byla použita imunosuprese pomocí kombinace Cyklosporinu (10mg/kg, Sandimmun, Novartis) a Metyl prednisolon sodium sukcinátu (1,7mg/kg, Solu-medrol, Pfizer).

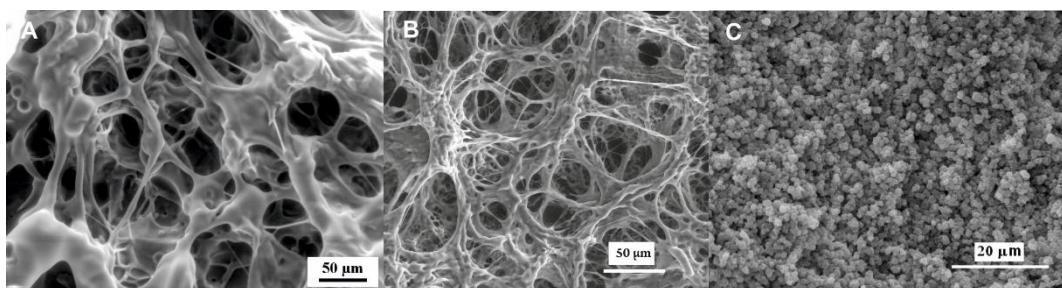
### **Typy použitých hydrogelů**

Hydrogely na bázi HPMA a HEMA byly modifikovány na svém povrchu kovalentně vázaným serotoninem nebo peptidickou sekvencí RGD. Zároveň byly použity dvě rozdílné techniky přípravy pórů hydrogelu. Jako první byla použita metoda heterofázní separace (HS), kdy se mezi podjednotkami hydrogelu během procesu polymerace vytváří prostor, jež dává vznik pórům materiálu. Druhou použitou technikou tvorby pórů byla metoda polymerace



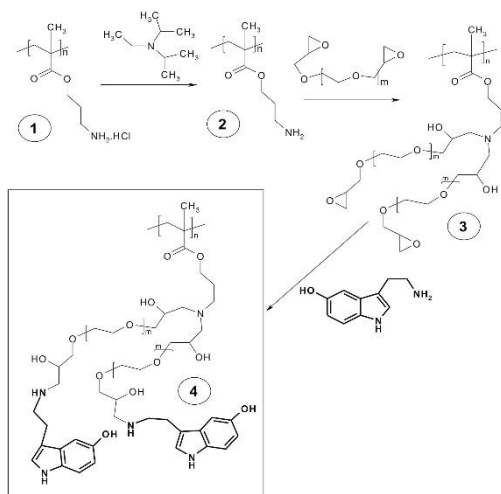
v přítomnosti solidního porogenu (SP), kdy mezi podjednotkami během polymerizace vznikají krystalky soli, které jsou pak následně vymyty a dávají vzniknout širším pórům s odlišnou strukturou než v případě HS metody. HEMA-MOETACl (SP typ pórů) (Obr. 18. A), HPMA-SP (Obr. 18. B), HPMA-SP-RGD (Obr. 18. B) a HPMA-HS-RGD (Obr. 18 C) byly připraveny dle protokolů podrobně posaných v publikaci (Hejcl *et al.*, 2013). HEMA-5HT(SP typ pórů) (Obr. 19.) hydrogel byl připraven dle protokolů podrobně popsanych v publikaci (Ruzicka *et al.*, 2013)

**Obrázek 18. SP a HS typy pórů**



*Obrázek 18. Příklad ultrastruktury HEMA a HPMA hydrogelů. Struktura pavoučí sítě pHEMA hydrogelu (A) či HPMA materiálu po vymytí SP (NaCl) (B). Póry tvořené mikroglobulárními doménami u HS metody přípravy HPMA gelu (C)*

**Obrázek 19. Úprava povrchu pHEMA materiálu**



Obrázek 19. Molekuly serotoninu (5 hydroxy triptaminu, 5HT) jsou navázány na HEMA podjednotky hydrogelu.

## Behaviorální testy

### Open field, BBB

Schopnost lokomoce byla hodnocena za použití Basso Beattie a Bresnahanovy hodnotící škály (0-21b) v otevřené aréně (Basso, Beattie, & Bresnahan, 1995) (Tab. 3.). Dva nezávislí pozorovatelé hodnotili pohybové schopnosti potkanů po MP vždy alespoň po dobu 4 minut jednou týdně po dobu celého experimentu. Potkani byli vloženi do středu kruhové arény o průměru 1m, následně byla pozorována hybnost zadních končetin, umístění tlapek, či podpora váhy a koordinace končetin při chůzi.

**Tabulka 3. Hodnotící škála BBB testu**

Hodnota	Charakteristika
0	Žádný viditelný pohyb zadních končetin.
1	Nepatrný pohyb jednoho nebo dvou kloubů, obvykle kyčle a/nebo kolene.
2	Výrazný pohyb jednoho kloubu. Výrazný pohyb jednoho kloubu a nepatrný pohyb dalšího kloubu.
3	Výrazný pohyb dvou kloubů.
4	Nepatrný pohyb všech tří kloubů.
5	Nepatrný pohyb dvou kloubů a současně výrazný pohyb třetího.
6	Výrazný pohyb dvou kloubů a současně nepatrný pohyb třetího.
7	Výrazný pohyb všech tří kloubů.
8	Zametání bez váhové podpory. Plantární umístění packy bez váhové podpory.
9	Plantární umístění packy s váhovou podporou pouze ve stoji.

	Občasná, častá nebo konzistentní chůze po dorsum pedis s váhovou podporou a absencí plantárního umístění packy.
10	Občasné plantární umístění packy s váhovou podporou a žádná předožadní koordinace.
11	Časté až konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a žádná předožadní koordinace.
12	Časté až konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a občasná předožadní koordinace.
13	Časté až konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a častá předožadní koordinace.
14	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Packa je rotována zevně nebo zevnitř při zvednutí packy a při prvním kontaktu.
15	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Žádné nebo občasná zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu.
16	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Časté zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu a rotována ve fázi zvednutí.
17	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Časté zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí.
18	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu a rotována ve fázi zvednutí.
19	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí. Ocas je při zemi část nebo celou dobu.
20	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí. Nestabilita trupu. Konzistentní zvedání ocasu.
21	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Stabilita trupu. Konzistentní zvedání ocasu.

Tabulka 3. Hodnotící škála základního BBB testu upraveno podle (Basso et al., 1995).

### **Chůze po kladině**

Pokročilá lokomoční funkce zahrnující koordinaci předních a zadních končetin a podporu váhy byla testována při přecházení 3,4cm široké a 140cm dlouhé kladině. Test byl zaznamenáván CCD kamerou a kladina byla softwarově rozdělena na 3 základní segmenty; startovací pozice, polovina tyče a cílová zóna (TSE-Systems Inc., Bad Homburg, Germany). Časový interval max. 60s byl vyčleněn pro jedno měření. Po tréninkových měřeních byla každý den provedena dvě měření ve třech po sobě následujících dnech. Toto měření bylo prováděno od třetího týdne po MP až do konce experimentu. Stupnice 0-5 modifikovaná z práce Goldsteina (Goldstein, 1997) byla použita k vyhodnocení lokomočních schopností. Hodnotící škála začínala neschopností potkana udržet se na vyvýšené kladině, přes schopnost se postupně dostávat na cílovou zónu, až po koordinaci pohybů předních a zadních končetin s podporou váhy. Při dosažení cílové zóny byla měřena rychlost tohoto úkonu.

### **Rotarod test**

Stabilita lokomoční funkce zahrnující koordinaci zadních končetin, dlouhodobou podporu váhy a vytrvalost svalové síly byla měřena za pomoci rotujícího válce o průměru 7cm s podélnými vroubkami pro 4 paralelní měření oddělené přepážkou (Ugo Basile, Comerio, Italy). Při tréninkových měřeních byl válec konstitutivně akcelerován z 5rpm na 10rpm po dobu 5 minut po 5 po sobě následujících dnů. Od třetího týdne po indukci léze až do konce studie probíhalo pětidenní testování zvířat se čtyřmi pokusy jednou za 14 dní (3w, 5w, 7w, 9w) při fixní rychlosti 5rpm a maximálním intervalu měření 60s. Latence pádu byla automaticky zaznamenávána.

### **Plantar test**

Plantar test byl prováděn za pomoci standartního přístroje Ugo Basile (Ugo Basile, Comerio, Italy). Do akrylového boxu byl vložen potkan a infračervená lampa s pohybovým senzorem byla umístěna pod testovanou zadní tlapku. Po spuštění termálního stimulu pohybový sensor zaznamenal reakci potkana stejně jako latenci (sec.) odpovědi na bolestivý stimulus. Každá zadní tlapka byla měřena 5 krát s dostatečnými pauzami mezi měřeními. Záznam Plantar

testu byl prováděn před i po MP. Po indukci léze bylo prováděno měření jednou týdně až do konce experimentu. Hyperalgesie (zvýšená citlivost na bolestivý stimulus) byla definována jakožto signifikantní snížení latence reakce.

## **Zpracování tkáně, histologie a imunohistochemie**

Na konci experimentu byli potkani přivedeni do hluboké anestezie (Isoflurane 5% 500ml/min, chloralhydrate 100mg/kg i.p.) a následně perfundováni 150ml fosfátového pufru (PB) a 150ml 4% roztoku paraformaldehydu v 0.1M PB. Posléze byla vyjmuta páteř C1-L3 a fixována přes noc v 4% paraformaldehydu. Míšní tkáň byla vyjmuta 12 hodin po perfúzi a převedena do roztoku PBS. Dva cm dlouhý segment s centrem léze uprostřed byl poté nakrájen na mikrotomu (HM550, Microm International, Walldorf, Germany) na longitudinální (tloušťka řezu 20 $\mu$ m) či transversální řezy (tloušťka řezu 5 $\mu$ m). Ty byly nabarveny na vybrané znaky, zamontovány a překryty krycím sklíčkem.

Pro získání snímků a hodnocení histologických a imunohistochemických preparátů byl použit spektrální konfokální mikroskop (LSM 5 DUO, Zeiss, Germany) vybavený Ar/HeNe laserem či ZEISS AXIO Observer D1 (Zeiss, Germany). Pro konfokální mikroskopii byly použity vlnové délky 405 nm (DAPI), 560 nm (gamAF594), and 488 nm (Ar, gamAF488). Konfokální mikroskop byl použit především pro stanovení stupně diferenciacie a přežívání buněk aplikovaných do míšního poranění a jejich interakce s okolní tkání. Mikroskop Observer D1 byl použit pro zhodnocení odpovědi tkáně na specifickou léčbu a měření míry osídlení implantovaných materiálů.

## **Bílá a šedá hmota míšní**

Vliv buněk na zachování šedé a bílé hmoty po MP byl hodnocen pomocí barvení Cresyl violet (0.25 g cresyl violet rozpuštěné v 100 ml destilované vody s 1 ml 10% kyseliny octové) / Luxol-fast blue (1 g Luxol-fast blue byl rozpuštěný ve 100 ml 96% etanol s 5 ml 10% kyseliny octové). Z každé míchy byla v 15 příčných řezech vzdálených od sebe 1mm, s prostředním řezem v centru léze, hodnocena velikost zachované plochy šedé a bílé hmoty míšní. Analýza

obrazu probíhala s využitím softwaru Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Výsledné hodnoty v  $\mu\text{m}^2$  léčených skupin byly zobrazeny procentuálně ve srovnání s průměrnou hodnotou neléčené kontroly dané oblasti. (průměr FR= 100%).

### **Axonální sprouting**

Počet nově rostoucích axonů po MP byl hodnocen za použití barvení proti proteinu spojeného s růstem (GAP43, Millipore, Billerica, MA, USA), což je znak růstového konu axonů. Hodnocení bylo provedeno na 15 příčných řezech vzdálených od sebe 1mm s prostředním řezem v centru léze. Počet GAP43 pozitivních vláken byl počítán manuálně.

### **Axony a kapilární řečiště**

Podíl axonů nebo kapilár v poškozené tkáni/ hydrogelu byl měřen za použití barvení proti neurofilamentům 160 kD (NF160, Chemicon, Temecula, CA, USA) nebo proti protilátce 1 endoteliálních buněk (RECA 1, Abcam, Cambridge, UK). Z dorzoventrálních longitudinálních řezů (vzatý byl každý třetí řez) bylo měřeno pět oblastí (zvětšení 200x) 2 na kraniální straně léze, 2 na kaudální straně a 1 v centru léze (MP). Výsledek byl vyjádřen v procentech. V případě kvantifikace vrůstání funkční tkáně do biomateriálu byl hydrogel analyzován v kraniální, kaudální a středové oblasti materiálu.

### **Gliová jizva**

Vliv aplikované léčby na tvorbu a modulaci gliové jizvy byl měřen na základě velikosti plochy ( $\mu\text{m}^2$ ) v okolí centrální léze, která byla pozitivní na gliální fibrilární acidický protein (GFAP-CY3, Sigma, St. Louis, MO, USA) (marker subpopulace astrocytů). Měření probíhalo podle dvou protokolů. Z dorzoventrálních longitudinálních řezů (každý třetí řez) bylo měřeno pět oblastí, 2 na kraniální straně léze, 2 na kaudální straně a 1 v centru léze (MP) či laterálně k implantovanému materiálu (hemisekce). Z transverzálních řezů byla pomocí programu Image J změřena plocha signálu přímo navazujícího na hlavní kavitu centrální léze. Hodnocení bylo provedeno na 15 příčných řezech vzdálených od sebe 1mm, s prostředním řezem v centru léze. Výsledky byly zobrazeny jako podíl zajizvené tkáně na plochu řezu (vždy při stejném zvětšení)

v procentech. Z transverzálních řezů byl navíc v každé skupině spočítán průměrný počet protoplasmických astrocytů na řez.

### **Detekce a diferenciacce buněk *in vitro* nebo *in vivo***

Aplikované kmenové buňky byly v *in vivo* modelech míšní léze detekovány pomocí GFP proteinu ( rMSC, SPC-01), Karboxy-fluorescein diacetát succinimidyl esteru (CFDA-SE) (hMSC), či použitím protilátek proti lidským mitochondriím (MTCO2, 1:125, Chemicon, Temecula, CA) nebo jadernému proteinu (Human nuclei, HUNU1:42, Abcam, Cambridge, UK) (SPC-01 a NP-iPS). Pro zjištění míry diferenciacce aplikovaných NP *in vitro* a *in vivo* byly použity následující protilátky; NF70 (Chemicon, Temecula, CA, USA), NCAM (Chemicon, Temecula, CA, USA), Nestin (Millipore, UK), Synaptophysin (Chemicon, Temecula, CA, USA),  $\beta$ 3Tubulin (Sigma, St. Louis, MO, USA), GFAP(-CY3) (Sigma, St. Louis, MO, USA), ChAT (Choline acetyl transferase, Abcam, Cambridge, UK), Tau (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), NKX.6.1. (DSHB, Iowa City, IA, USA), OLIG2 (Abcam, Cambridge, UK), DCX (doublecortin, Santa Cruz, Heidelberg, Germany Abcam, Cambridge, UK), MAP2 (Microtubule-associated protein 2.). Pro vizualizaci reaktivity primárních protilátek byly použity odpovídající sekundární protilátky; Goat anti mouse IgG- konjugovaná s Alexa-Fluor 488 či 594, či případně Goat anti rabbit konjugovaná s Alexa fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

### **Cytokinová analýza-Luminex**

Hladina prozánětlivých cytokinů byla měřena pro zjištění vlivu kmenových buněk na odpověď IS 10,14 a 28 dní po MP. Izolovaná část míchy s centrem poranění byla inkubována v buněčném mediu DMEM (Sigma) s přidáním fetálního hovězího sérum (10%) a primocinem (0,2%). Pro stanovení hladin sekretovaných cytokinů bylo odebráno medium po 24h inkubaci a následně byla provedena analýza s použitím sady na detekci zánětlivých cytokinů potkana (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ) Millipore, Billerica, MA, USA) a odpovídajícího softwaru (Magpix instrumentation). Dle protokolu byla použita 96 jamková destička s filtrem s protilátkami obalenými kuličkami o koncentraci 5000/ marker. Pro měření

hladiny cytokinů na systému Luminex x MAP 200 byla použita Biotinem detekovaná protilátka se streptavidin-RPE (streptavidin-R-Phycoerythrin) komplexem. Tato reakce byla následně analyzována Magpix softwarem. Výsledná data zahrnující střední intenzitu fluorescence (MFI) byla použita pro spočítání koncentrace jednotlivých cytokinů ve vzorku. Pěti stupňová standardní křivka byla generovaná pro každý cytokin ze sedmi standardů. Dolní limit kvantifikace byl stanoven použitím MFI nejnižšího standardu o hodnotě 3krát vyšší než MFI hodnota pozadí. Naměřené výsledky jsou zobrazeny jakožto procentuální poměr k hodnotám zdravých kontrol (100%).

### **Statistická analýza**

Veškerá data jsou graficky znázorněna jako aritmetický průměr $\pm$  střední chyba průměru. Pro zjištění míry signifikance rozdílů v průměrných hodnotách mezi léčebnými skupinami byla použita one way ANOVA, či v případě přidaného druhého faktoru (čas) byla použita two way ANOVA. Ve speciálních případech opakovaného měření (behaviorální testy, tkáňová distribuce efektu léčby) byla použita two way repeated measurement ANOVA. Jakožto Post hoc pair-to-pair srovnávací test byl použit Student Newman-Keuls test (či jeho neparametrická verze). Rozdíly byly považovány jako signifikantní v případě, že  $p < 0.05$ .



## Výsledky

**Aplikace Flt3 ligandu spolu s G-CSF vede k synergickému efektu v léčbě míšního poranění u potkana.**

**(Urdzikova, L., Likavcanova-Masinova, K., Vanecek, V., Ruzicka, J., Sedy, J., Sykova, E., and Jendelova, P. (2011) Flt3 ligand synergizes with granulocyte-colony-stimulating factor in bone marrow mobilization to improve functional outcome after spinal cord injury in the rat. *Cytotherapy* Oct;13(9):1090-1104.)**

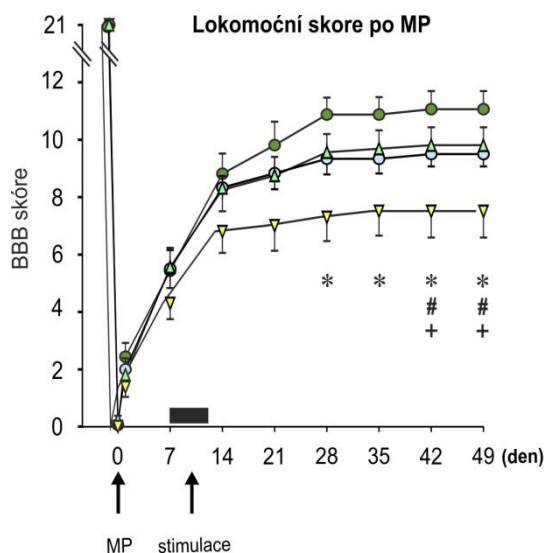
Aplikace molekul mobilizujících endogenní kmenové buňky a vykazujících neuroprotektivní či neurogenní efekt jsou jedním z velmi častých typů experimentální léčby po MP. Výhodou těchto molekul je relativně snadné použití a definice jejich účinku a tudíž i lehčí přenos těchto poznatků do kliniky. Jejich použití je primárně cíleno pro akutní a subakutní fáze poranění k nastartování procesu regenerace. Jednotlivé molekuly však mají lokální, specifické účinky. Vhodná kombinace molekul, jež by stimulovala poškozenou míchu na úrovni zachování tkáně ale i její rekonstrukci, vedoucí k výraznému lokomočnímu zlepšení, je předmětem zájmu vědecké komunity. Na základě preklinických dat je aplikace faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF) či faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a monocytů (GM-CSF) při léčbě MP v dnešní době ve fázi I/II několika klinických studií. Flt3 je tyrosinkinázový receptor, jenž hraje důležitou roli ve zrání a mobilizaci kmenových buněk hematopoetické řady a progenitorových buněk. V této práci jsme porovnávali aplikaci G-CSF, Flt3 ligandu a jejich možný synergický účinek v léčbě klinicky relevantního modelu balónkové kompresní léze potkana.

***Intravenózní aplikace Flt3 ligandu, G-CSF či jejich kombinace vede k zlepšení lokomočních funkcí po MP***

V případě jednotlivých aplikací Flt3 ligandu či G-CSF bylo funkční zlepšení signifikantní od 6. týdne po poranění. V případě kombinace obou terapií však vlivem vzájemné synergie byla pozorována statisticky signifikantní změna již od čtvrtého týdne. (Obr. 20).

## Obrázek 20. Vliv kombinované léčby na lokomoci po MP

Obrázek 20. Vliv léčby Flt3 ligandem, G-CSF či jejich kombinací na lokomoci po MP; měřeno



pomocí BBB testu. Signifikance;

\* FR vs. GCSF+Flt3  $p < 0,05$ , #

FR vs. Flt3  $p < 0,05$ , + FR vs.

GCSF  $p < 0,05$

**Kombinace Flt3 ligandu a G-**

**CSF vede k zvýšenému**

**zachování bílé a šedé hmoty po**

**MP**

Všechna zvířata, ať už léčená Flt3, G-CSF, či jejich kombinací, dosáhla statisticky

signifikantního zachování hmoty míšni ve srovnání s neléčenou kontrolou (Obr. 21). Po

rozdělení na bílou (Obr. 22 A) a šedou (Obr. 22 B) hmotu a kranio-kaudální segmentaci se tyto

změny projeví především v oblastech vzdálených 4-5 mm od centra léze. Lokální statistické

signifikance pak dosahovaly především kombinace obou faktorů a to jak v bílé, tak šedé

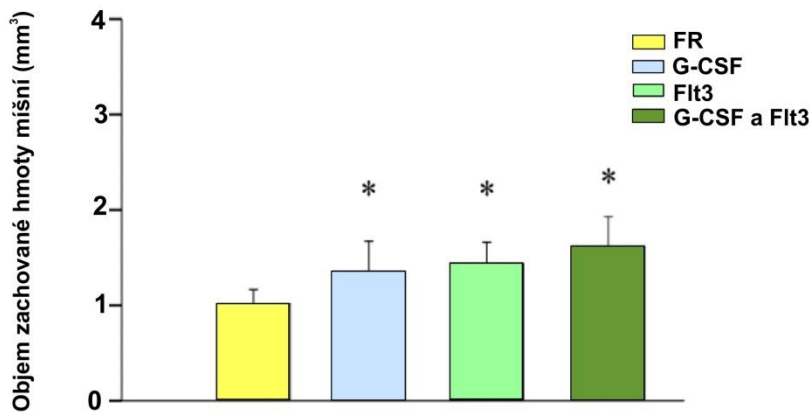
hmotě byl efekt lokální léčby pozorován pouze v kraniiální oblasti. V případě léčby samotným

G-CSF byl pozorován pouze lokální efekt v porovnání s neléčenou kontrolou v kraniiální oblasti

bílé hmoty. Flt3 ligand především v kombinaci s G-CSF vykazoval silný trend v zachování

hmoty míšni v celé měřené oblasti jak bílé, tak šedé hmoty (Obr. 22 A, B).

**Obrázek 21. Celkové zachování hmoty míšň**



Obrázek 21. Vliv

léčby Flt3

ligandem, G-

CSF či jejich

kombinací na

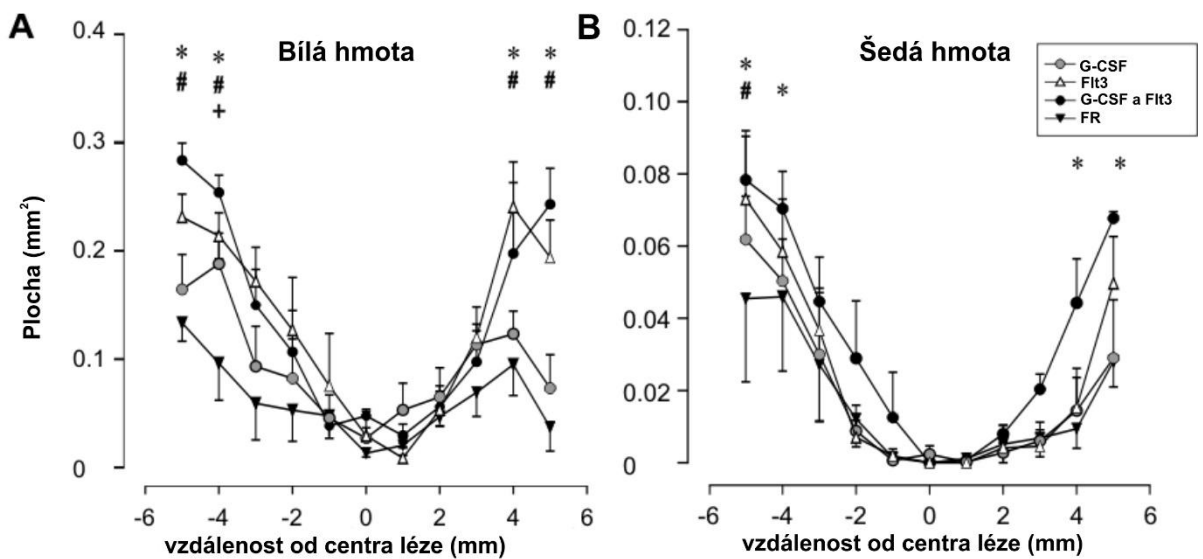
zachování hmoty

míšň po MP.

Signifikance; \*

vs. FR  $p < 0,05$ ,

**Obrázek 22. Vliv kombinované léčby na zachování bílé a šedé hmoty míšň**



Obrázek 22. Vliv léčby Flt3 ligandem, G-CSF či jejich kombinací na zachování bílé (A) a šedé

(B) hmoty po MP. Signifikance; \* FR vs. GCSF+Flt3  $p < 0,05$ , # FR vs. Flt3  $p < 0,05$ , + FR vs.

G-CSF  $p < 0,05$

### ***Flt3 ligand zesiluje vliv G-CSF na axonální sprouting***

U všech skupin byl sledován vliv léčby na axonální sprouting. K detekci růstového konu axonů na příčných řezech míchou byla použita protilátka proti GAP43. Průměrný počet GAP43<sup>+</sup> axonů na řez byl signifikantně zvýšen při použití samotného G-CSF ( $14.84 \pm 3.36$ ) či jeho kombinace s Flt3 ligandem ( $33.56 \pm 0.89$ ) a to jak v porovnání s neléčenou kontrolou ( $6.26 \pm 0.94$ ) tak s podáním samotného Flt3 ligandu ( $5.04 \pm 0.60$ ). U zvířat léčených pouze Flt3 ligandem se GAP43<sup>+</sup> axony nacházely pouze v okolí centrálního kanálku míchy, zatímco v případě G-CSF, či jeho kombinace s Flt3, se GAP43<sup>+</sup> axony vyskytovaly v oblasti celé léze (Obr. 23. A).

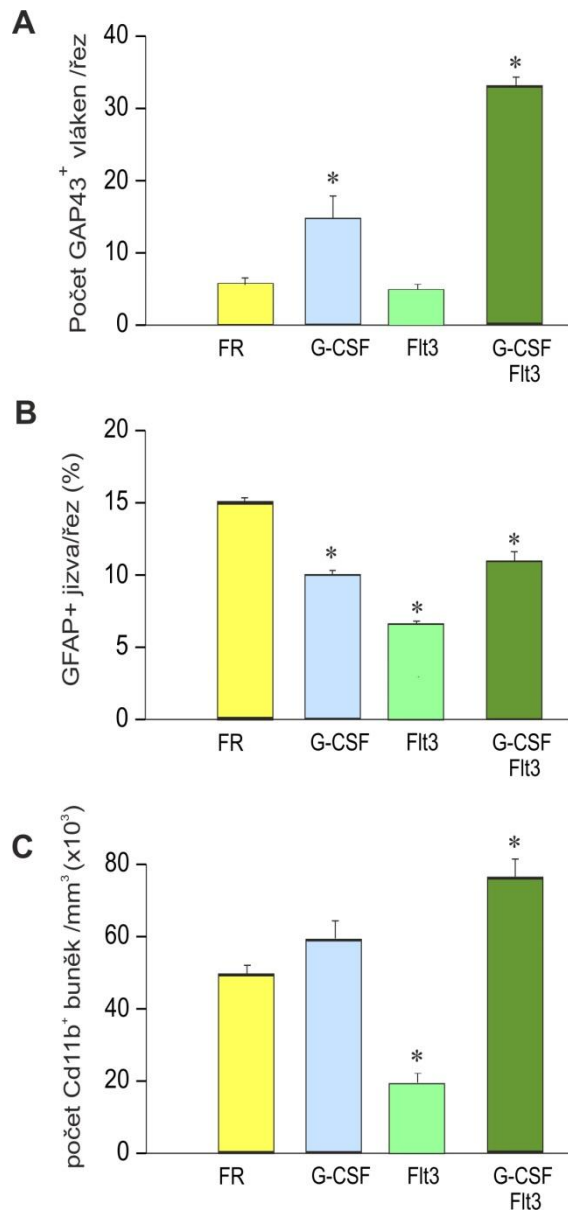
### ***Flt3 ligand výrazně snižuje velikost gliové jizvy po MP.***

Všechny typy léčby měly pozitivní vliv na zmenšení velikosti gliové jizvy v porovnání s neléčenou kontrolou ( $15.88 \pm 0.16\%$ ). Nejvýraznější efekt byl pozorován u aplikace Flt3 ligandu ( $5.74 \pm 0.31\%$ ). Aplikace G-CSF ( $10.05 \pm 0.25\%$ ) či kombinace G-CSF a Flt3 ligandu ( $11.06 \pm 0.58\%$ ) měla nižší účinnost než samotný Flt3 ligand (Obr. 23. B).

### ***Kombinace Flt3 ligandu a G-CSF zvyšuje počet CD11+ buněk v místě poranění.***

V porovnání s kontrolní skupinou ( $49,072 \pm 2556$ ) aplikace samotného Flt3 ligandu počet CD11+ buněk v míšní lézi výrazně snižovala ( $19,458 \pm 2890$ ) a aplikace samotného G-CSF naopak mírně zvyšovala ( $59,343 \pm 4939$ ). Ovšem jejich vzájemná kombinace měla za důsledek významné zvýšení CD11+ buněk v oblasti míšní léze ( $78,561 \pm 4943$ ) (Obr. 23. C).

**Obrázek 23. Vliv léčby kombinované léčby na mikrostrukturální změny po MP**



*Obrázek 23. Vliv léčby Flt3 ligandem, G-CSF či jejich kombinací na axonální sprouting (A) potlačení tvorby gliové jizvy (B) a infiltraci CD11<sup>+</sup> buněk po MP (C). Signifikance; \* vs. FR p<0,05.*

**Implantace lidských mesenchymálních kmenových buněk, neurálních prekursorů z fetální míchy (SPC-01), či diferenciovaných z iPS (NP-iPS) vede k zlepšení neurologických funkcí po MP, ale využívá různé mechanismy účinku.**

**(J. Ruzicka, L. Machova Urdzikova, J. Gillick, T. Amemori, N. Romanyuk, K. Karova, K. Zaviskova, J. Dubisova, S. Kubinova, R. Murali, E. Sykova, M. Jhanwar-Uniyal and P. Jendelova (Submitted) Neural Precursors derived from Spinal Progenitors or iPS cells are superior to Mesenchymal Stem cells in achieving recovery from spinal cord injury in rat.)**

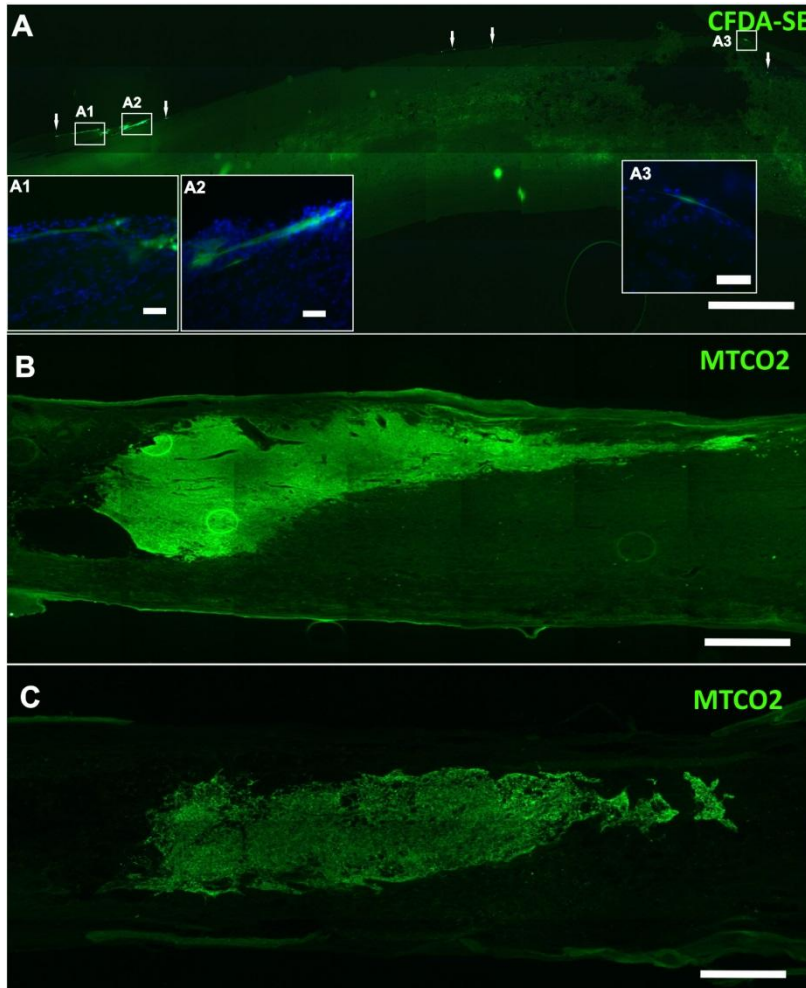
Aplikace kmenových buněk v experimentálních modelech míšního poranění se stává jedním z častých prvků samostatné či kombinované buněčné terapie. Na základě preklinických dat ze zvířecích modelů zahrnují klinické studie fáze I a II v léčbě míšního poranění aplikaci lidských mezenchymálních kmenových buněk a neurálních prekursorů různého původu. Většinou preklinických studií však chybí přímé srovnání chování jednotlivých typů kmenových buněk v jednotném modelu míšního poranění. V této práci jsme porovnávali lidské MSC (připravené za GMP podmínek) a dva typy neurálních prekursorů pocházejících jednak z linie lidských fetálních spinálních prekursorů (SPC-01), které byly připraveny za stejných podmínek jako CTX0E03 linie, která je v současné době v klinické studii pro léčbu iktu (PISCES), a jednak lidské neurální prekursory derivované z indukovaných pluripotentních buněk (NP-iPS) v léčbě klinicky relevantního modelu balónkové kompresní léze potkana. Neurální prekursory byly podány přímo do míchy, zatímco hMSC byly aplikovány intratekálně. Způsob podání odpovídá možným klinickým aplikacím.

### ***Osud buněk implantovaných po MP***

Přežívání implantovaných buněk bylo ověřeno 2 týdny po jejich aplikaci, kdy bylo pozorováno robustní přežívání obou typů NP, avšak byl detekován jen malý počet aplikovaných MSC (Obr.24. A, A1, A2). Dva měsíce po aplikaci buněk oba typy NP (Obr. 24 B, C) velmi dobře přežívaly v místě poranění (17%±3% SPC-01 a 10%±3% NP-iPS) přítomnost MSC však již nebyla prokázána. Přestože buňky velmi dobře přežívaly v místě poranění, dva měsíce po implantaci byly stále velmi nezralé. SPC-01 buňky byly pozitivní především na GFAP či na

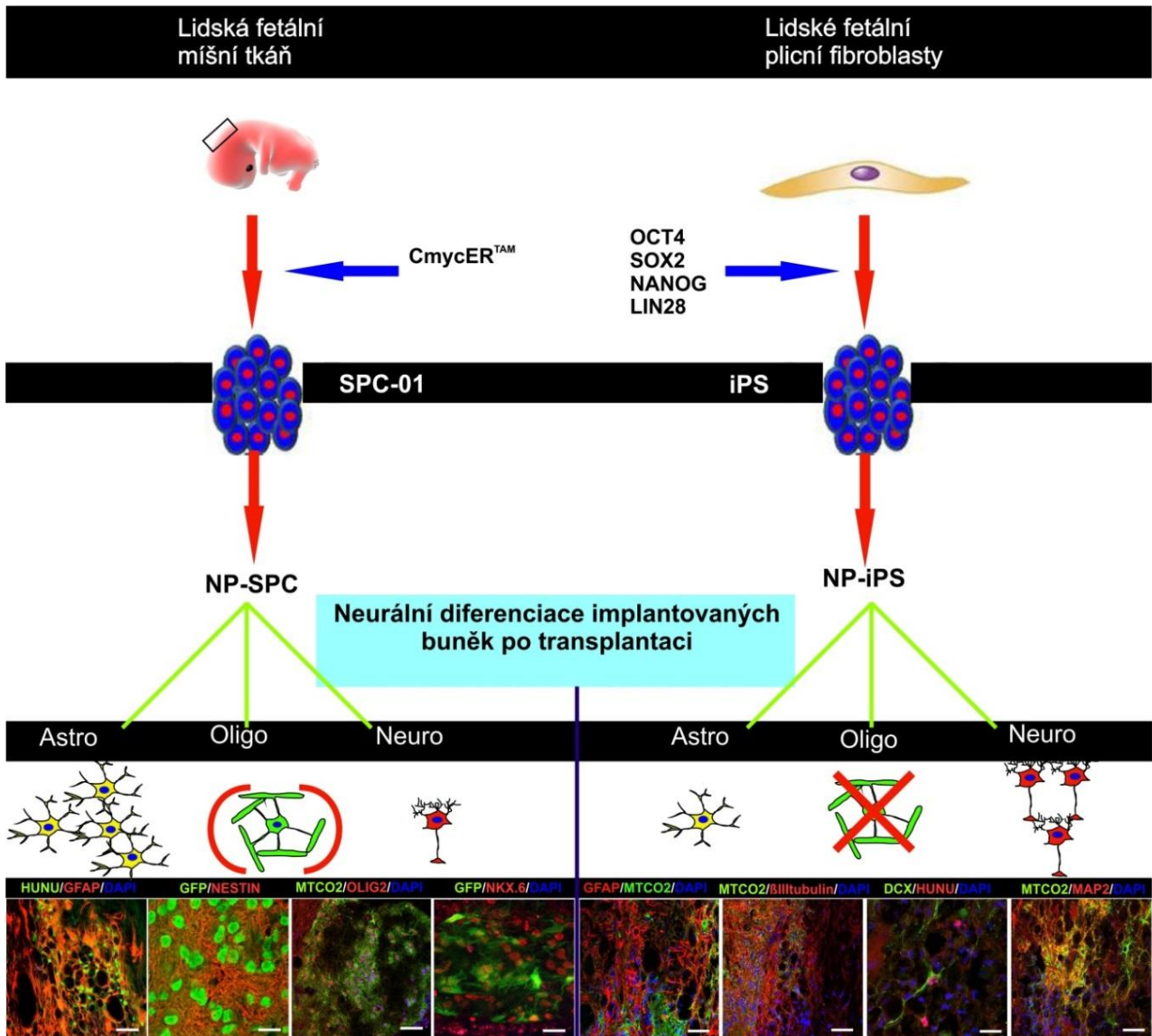
rané neurální markery, jako jsou nestin, olig2 a Nkx6.1. Naproti tomu většina NP-iPS byla pozitivní na MAP2 a DCX a jen malá část buněk vykazovala pozitivitu na GFAP (Obr. 25).

#### Obrázek 24. Přežívání implantovaných buněk po MP



Obrázek 24. Přežívání buněk po subakutní implantaci (7 dní od léze) po MP. MSC byly nalezeny pouze 14 dní po implantaci (A, A1, A2, A3). Oba typy neurálních prekurzorů SPC-01 (B) a NP-iPS (C) velmi dobře přežívaly minimálně po dobu 2 měsíců po implantaci. Lipofilní barvení CFDA-SE (A) a protilátka proti lidským mitochondriím MTCO2 (B, C) byla použita k detekování implantátu *in vivo*. Měřítka 300 $\mu$ m (A) and 500  $\mu$ m (B, C).

Obrázek 25. Osud neurálních precursorů 2 měsíce po implantaci



Obrázek 25. Schéma porovnávající použité SPC-01 a NP-iPS buňky, jejich původ a in vivo fenotyp aplikovaných buněk 2 měsíce po jejich implantaci. SPC-01 buňky byly 2 měsíce po implantaci pozitivní především na GFAP a dále pak na Nestin, NKX.6 and OLIG2. NP-iPS buňky byly pozitivní na DCX, MAP2,  $\beta$ III-tubulin, a jen malá část buněk vykazovala pozitivitu na GFAP. Buňky pozitivní na GFP či barvení proti MTCO2 a HUNU byly použity k detekci implantátu. Jádra byla dobarvena DAPI. Měřítka 20  $\mu$ m (NESTIN, NKX.6, DCX) a 50  $\mu$ m (GFAP, OLIG2, MAP2,  $\beta$ III-Tubulin).



### ***Implantace kmenových buněk zlepšuje lokomoční funkce po MP***

Pro detekci vlivu implantace MSC, SPC-01 a NP-iPS na lokomoční funkci po MP byla použita sada behaviorálních testů zahrnujících klasický BBB test, chůzi po kladině a rotarod test. V těchto testech se zvyšuje náročnost na podporu váhy a koordinaci pohybů končetin a proto dobře ukazují rozsah a typ zlepšení lokomoce po poranění míchy.

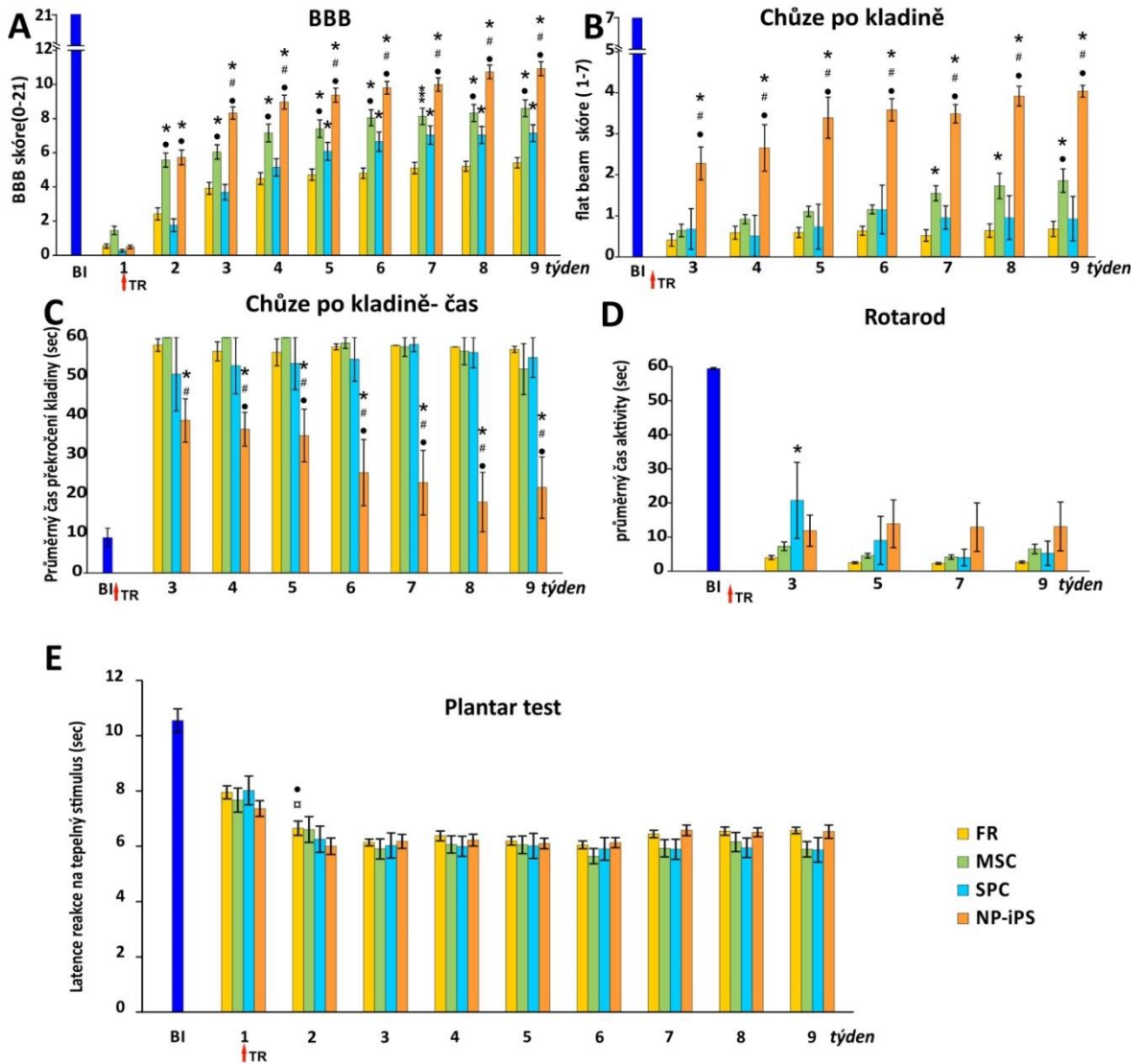
Týden po indukci poranění všechna zvířata vykazovala nulový či jen minimální pohyb zadních končetin. Od druhého týdne bylo pozorováno částečné spontánní navrácení lokomoční funkce (BBB, Obr. 26. A). Aplikace všech tří typů kmenových buněk vedla u experimentálních zvířat k signifikantně vyššímu lokomočnímu skóre ve srovnání s kontrolní skupinou, která v průběhu experimentu nedosáhla pohybu všech částí zadních končetin a podpory váhy (BBB skóre devátý týden po poranění  $5,43 \pm 0,3$ ). Již týden po implantaci kmenových buněk (2 týdny po poranění) byl pozorován signifikantní vliv MSC a NP-iPS na zlepšení lokomočních dovedností. Potkani léčení SPC-01 buňkami se v BBB testu zlepšili až od 5 týdne po poranění. Zvířata s NP-iPS a MSC vykazovala signifikantně vyšší skóre nejen vůči kontrole ale i vůči SPC-01 skupině.

Ve více náročném testu na podporu váhy a koordinaci pohybu končetin (chůze po kladině) se ještě více prohloubily rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Většina testovaných zvířat začínala pouze s malou či žádnou schopností udržet se na ploché tyči, bez pohybu k cílové zóně. Stejně jako v testech základní lokomoce, i v pokročilém testu nejlepších výsledků dosáhla skupina s NP-iPS, která vykazovala statisticky signifikantní vyšší hodnoty nejen lokálně, ale i celkově vyšší efekt léčby ve srovnání se všemi ostatními skupinami. Skupina potkanů léčených MSC se od sedmého týdne zlepšila vůči kontrolní skupině a v posledních měřeních i vůči skupině SPC-01. SPC-01 léčená skupina nevykazovala žádné zlepšení vůči kontrole či jiné léčené skupině (Obr. 26. B, C).

V případě již velmi náročného testu (Rotarod test), který vyžaduje velkou svalovou sílu a dlouhodobou podporu váhy po dobu až 60ti sekund, byly pozorovány limity léčby. U žádného

z typů aplikovaných kmenových buněk v tomto experimentu nebyl v testu pozorován statisticky signifikantní efekt léčby. Přesto ve skupině potkanů léčených NP-iPS byl pozorován stabilní avšak statisticky nesignifikantní trend ve zvýšené lokomoční dovednosti (Obr. 26 D).

**Obrázek 26. Lokomoční a senzoričné změny po MP**



Obrázek 26. Vliv implantace buněk na zlepšení lokomočních schopností a senzoričky po MP. Rozdíly ve vlivu buněk na lokomoční zlepšení byly detekovány za pomoci sady testů; open field BBB(A) chůze po kladině (B, C) a rotarod test (D). Vliv buněčné terapie na termální nocicepci byl testován za pomoci plantar testu (E). Signifikance vs. kontrola \*  $p < 0.05$ ; Signifikance vs. MSC #  $p < 0.05$ ; Signifikance vs. SPC-01 •  $p < 0.05$ .

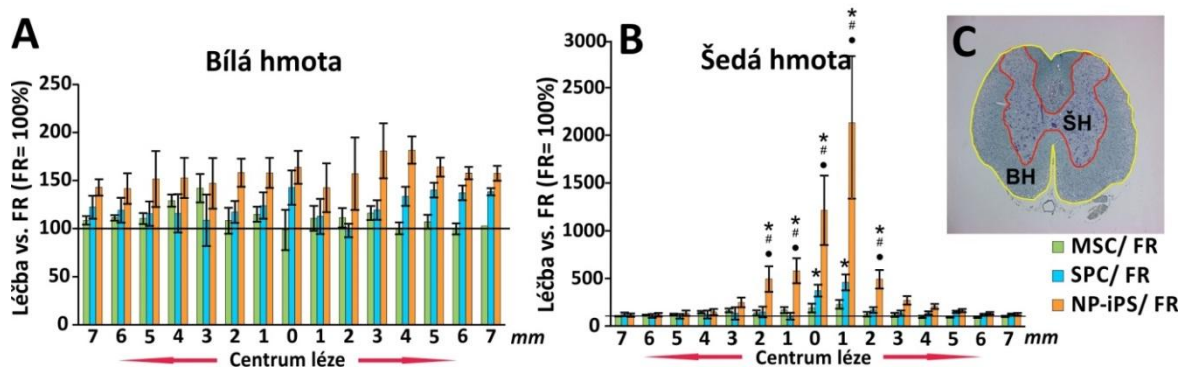
### ***Aplikace kmenových buněk neprohlubuje hyperalgezií termocepce indukovanou MP***

Zvýšená senzitivita na termální podnět byla měřena za pomoci plantar testu (Ugo Basile, Italy). Zvýšené senzitivita na termální podnět (hyperalgezie) byla nalezena u všech zvířat bez ohledu na skupinu. Tato termální forma hyperalgezie je velmi pravděpodobně spojena s patologickými procesy po MP a zároveň adaptací subjektů na opakované dlouhodobé měření. Žádné další zvýšení hyperalgezie v důsledku aplikace buněk nebylo zaznamenáno v žádné testované skupině. Bylo pozorováno pouze několik málo lokálních změn.

### ***Zachování míšní tkáně je jedním z hlavních efektů kmenových buněk vedoucích k navrácení lokomoce.***

Množství zachované bílé (Obr. 27. A, C) a šedé (Obr. 27. B, C) hmoty míšní bylo měřeno na transversálních řezech míšních (barvení cresyl violet- luxol). Výsledná plocha u skupin léčených kmenovými buňkami byla přepočítána jako procentuální poměr vůči neléčené kontrole (FR = 100%). Všechny léčené skupiny vykazovaly zachování bílé a šedé hmoty vůči kontrole. Avšak pouze ve skupině NP-iPS byl tento rozdíl v zachování šedé i bílé hmoty statisticky signifikantní, a to nejen vůči kontrole, ale i vůči ostatním implantovaným skupinám (šedá hmota <0,001). Statisticky signifikantní lokální změny v bílé hmotě míšní nebyly pozorovány. Lokální signifikantní změny v šedé hmotě byly zaznamenány především u NP-iPS skupiny v centrální části míšní léze. U zvířat, kterým byly podány SPC-01 buňky, byla signifikantně zachována vůči kontrolní skupině šedá hmota v centru léze. V případě aplikace MSC byl pozorován pouze nesignifikantní trend v zachování šedé hmoty míšní.

Obrázek 27. Vliv implantace kmenových buněk na zachování bílé a šedé hmoty míšni.

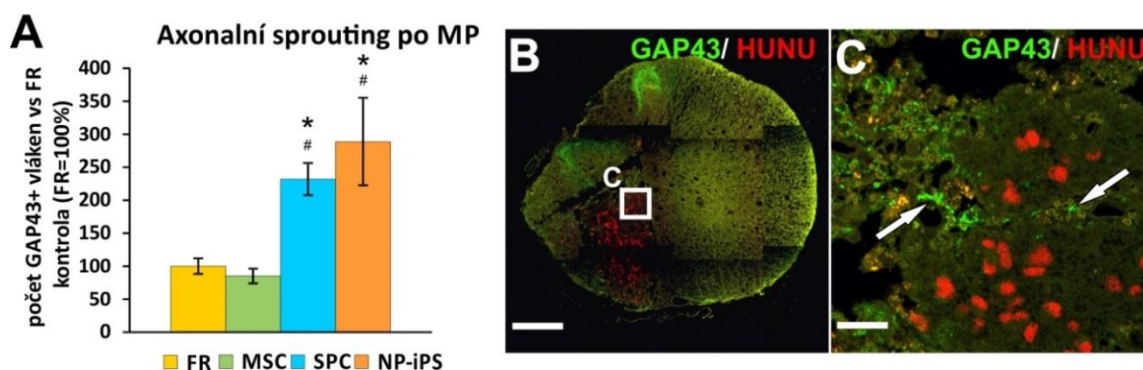


Obrázek 27. Vliv implantace kmenových buněk na zachování bílé/šedé hmoty po MP byl pozorován 2 měsíce po indukci míšni léze. Skupina „FR“ je rovna 100%, jak je naznačeno v grafu. Signifikance vs. FR \*  $p < 0.05$ ; Signifikance vs. MSC #  $p < 0.05$ ; Signifikance vs. SPC-01 •  $p < 0.05$ .

#### Implantace neurálních prekursorů významně zvyšuje axonální sprouting v poškozené míše

Počet GAP43 pozitivních vláken byl měřen na transversálních řezech míchy po MP (Obr. 28 B, C). Naměřené hodnoty byly porovnávány s neléčenou kontrolou (FR= 100%). Byl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinami léčenými jednotlivými typy kmenových buněk. Poškozené míchy léčené NP (SPC-01 =231%, NP-iPS = 288%) vykazovaly více GAP43 signálu ve srovnání s kontrolními (100%) i MSC (85%) léčenými zvířaty (Obr. 28. A).

## Obrázek 28. Vliv implantace kmenových buněk na axonální sprouting po MP



Obrázek 28. Vliv implantace kmenových buněk na axonální sprouting po MP. Signifikance vs. FR \*  $p < 0.05$ ; Signifikance vs. MSC #  $p < 0.05$ ; Měřítka 500  $\mu\text{m}$  (B) and 20  $\mu\text{m}$  (C). Šipky ukazují GAP43 pozitivní struktury.

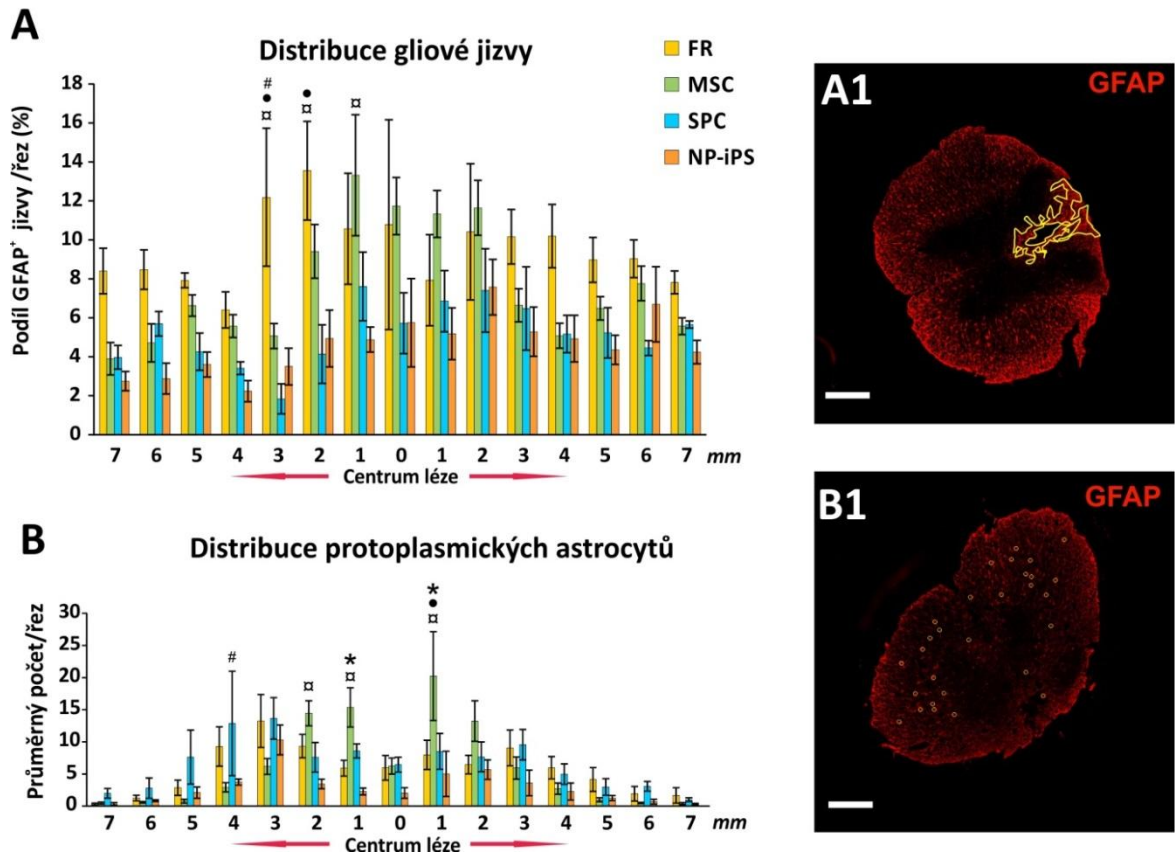
### Aplikace kmenových buněk moduluje a snižuje tvorbu gliové jizvy po MP

Velikost gliové jizvy obklopující centrální kavitu léze byla měřena na transverzálních řezech poškozené míchy (barvení GFAP-CY3). Získaná data byla převedena na hodnoty v procentech v poměru k ploše míšního řezu. Kromě velikosti gliové jizvy byl hodnocen počet protoplasmických astrocytů daného řezu. Byl pozorován signifikantní rozdíl mezi léčnými skupinami a kontrolou. Všechny typy kmenových buněk celkově zmenšily GFAP pozitivní oblasti v poškozené míše (Obr. 29 A). Skupiny se ovšem lišily distribucí signálu. Zároveň aplikace obou typů NP snížila GFAP signál ve srovnání se skupinou MSC implantovaných potkanů. Statisticky signifikantní lokální změny byly pozorovány především v oblasti centra léze. Kontrolní skupina měla v oblasti léze signifikantně větší plochu GFAP signálu ve srovnání se všemi léčnými skupinami. Skupina léčená MSC vykazovala ve středu poranění větší plochu GFAP signálu v porovnání se skupinou NP-iPS.

Mezi testovanými skupinami byl naměřen statisticky významný rozdíl v počtu protoplasmických astrocytů na průměrný řez (Obr. 29 B). Kontrolní skupina a potkani léčení MSC či SPC-01 buňkami vykazovali signifikantně větší počet protoplasmických astrocytů v porovnání s NP-iPS skupinou. Statisticky významné lokální změny byly pozorované

především v oblasti centra léze. Skupina MSC léčených potkanů vykazovala signifikantně vyšší počet protoplasmických astrocytů v centru léze v porovnání s ostatními léčenými skupinami a neléčenou kontrolou.

**Obrázek 29. Vliv léčby kmenovými buňkami na remodelaci gliové jizvy a morfologii astrocytů**

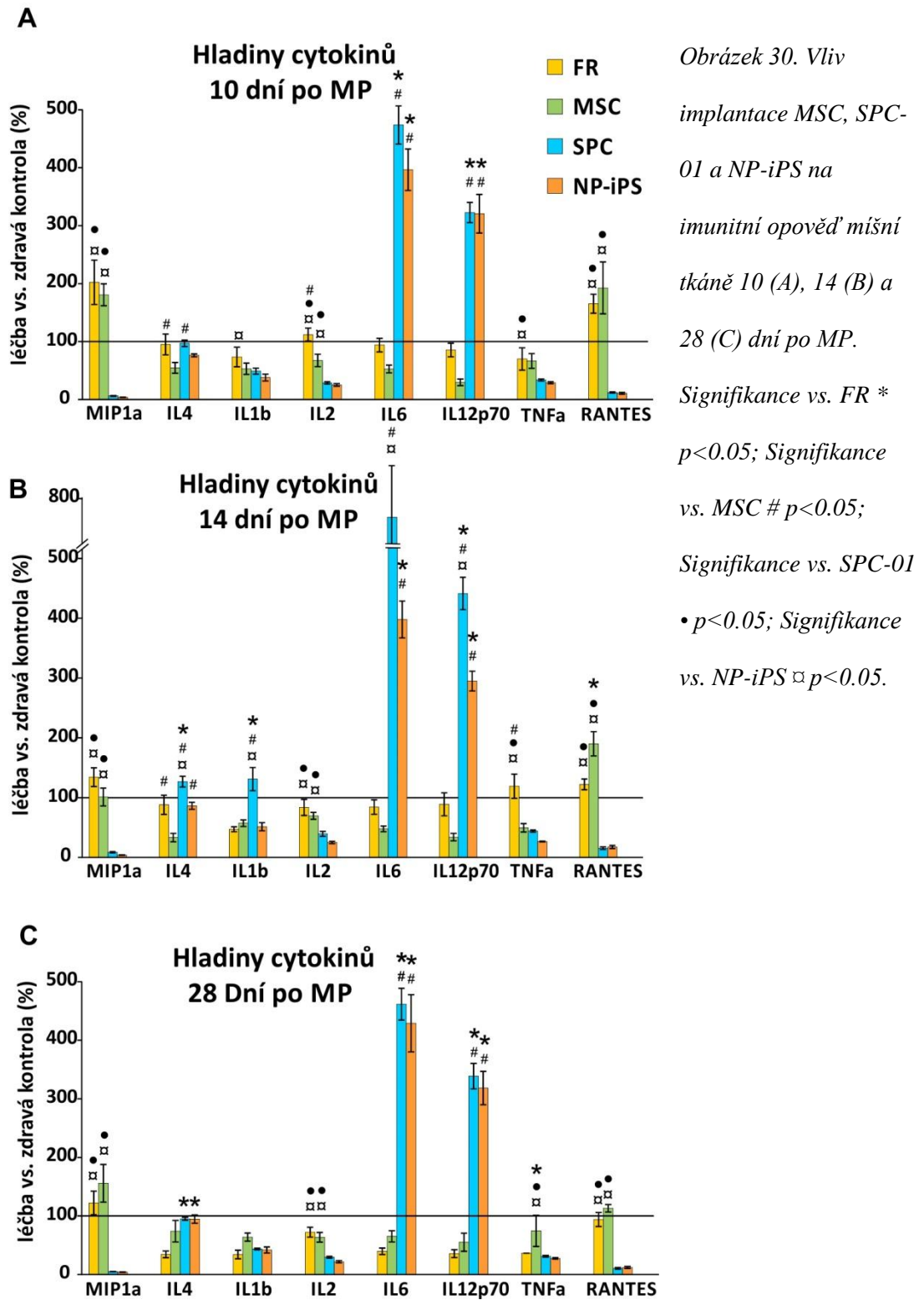


Obrázek 29. Vliv implantace kmenových buněk na tvorbu gliové jizvy v okolí centrální kavity (A, A1) a na množství protoplasmických astrocytů (B, B1) Signifikance vs. FR \*  $p < 0.05$ ; Signifikance vs. MSC #  $p < 0.05$ ; Signifikance vs. SPC-01 •  $p < 0.05$ ; Signifikance vs. NP-iPS □  $p < 0.05$ . Ilustrativní obrázky metody hodnocení (A1, B1). Měřítko 500  $\mu\text{m}$  (A1, B1)

***Kmenové buňky modulují a snižují prozánětlivou odpověď poškozené míchy v závislosti na svém původu***

Ke stanovení vlivu implantace MSC, SPC-01 a NP-iPS buněk na imunitní odpověď po MP byly naměřeny hladiny prozánětlivých cytokinů (MIP-1 $\alpha$ , IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL12p70, TNF- $\alpha$  a RANTES) 10, 14 a 28 dní po MP (Obr. 30 A, B, C). Deset dní po poranění byly hladiny MIP-1 $\alpha$ , IL-2 a TNF- $\alpha$  sníženy vůči neléčené kontrole u všech typů kmenových buněk, avšak NP-iPS byly nejúčinnější ve snižování jejich koncentrace. Detekované hladiny MIP-1 $\alpha$ , IL-2 a TNF- $\alpha$  zůstávaly snižené do 14 dnů po poranění. Dvacet osm dní po poranění u obou NP zůstávaly hladiny těchto cytokinů nadále snižené, avšak u MSC skupiny se jejich hladiny opět zvýšily. Tento efekt je pravděpodobně spojený s nižším přežíváním MSC v poškozené míše. Hladiny RANTES byly po dobu experimentu sniženy u obou NP, avšak implantace MSC tyto hladiny mírně zvyšovala oproti neléčené kontrole. Hladiny IL-4 10 dní po poranění byly u skupiny MSC a NP-iPS mírně snižené. Naproti tomu skupina s aplikovanými SPC-01 buňkami byla 10 dní po poranění na hladině srovnatelná s neléčenou kontrolou a 14 a 28 dní po poranění dokonce významně vyšší. Hladiny IL-4 u skupiny s MSC a NP-iPS se do 28. dne také zvýšily, avšak pouze skupina s NP-iPS dosáhla signifikantního rozdílu v porovnání s neléčenou kontrolou. Hladina IL-1 $\beta$  10 dní po poranění byla mírně snížena u všech skupin léčených kmenovými buňkami. 14 dní po poranění SPC-01 buňky signifikantně zvyšovaly hladinu IL-1 $\beta$  vůči všem ostatním skupinám. 28 dní po poranění rozdíly v hladině IL-1 $\beta$  mezi skupinami vymizely. 10 dní po poranění byly hladiny IL-6 a IL12p70 signifikantně zvýšené u obou NP jak vůči neléčené kontrole, tak vůči potkanům léčeným MSC, kteří měli navíc hladiny IL-6 a IL12p70 nesignifikantně snižené oproti neléčené kontrole. Tento trend se opakoval s menšími změnami jak 14, tak 28 dní po poranění.

Obrázek 30. Imunitní odpověď míšní tkáně na implantaci kmenových buněk po MP





**Modifikace povrchu metakrylátových hydrogelů peptidickými sekvencemi a různý tvar pórů ovlivňují adhezi, růst a přežívání kmenových buněk v hydrogelovém implantátu *in vivo* a *in vitro*.**

**(Hejcl, A., Ruzicka, J., Kapcalova, M., Turnovcova, K., Krumbholcova, E., Pradny, M., Michalek, J., Cihlar, J., Jendelova, P., and Sykova, E. (2013) Adjusting the chemical and physical properties of hydrogels leads to improved stem cell survival and tissue ingrowth in spinal cord injury reconstruction: a comparative study of four methacrylate hydrogels. *Stem Cells Dev* Oct 15;22(20):2794-2805))**

Biomateriály pro tkáňové inženýrství jsou rychle se vyvíjejícím odvětvím regenerativní medicíny. Využití hydrogelů na bázi pHEMA či pHPMA v léčbě experimentálních modelů míšního poranění přináší dlouhodobě pozitivní výsledky v mikrostrukturálních změnách vedoucích k reparaci nervové tkáně a zlepšení lokomoční funkce. Modifikace povrchu materiálu a typ porozity určují do velké míry vhodnost biomateriálu pro aplikace *in vitro* a *in vivo*. V této práci jsme zkoumali synergistický efekt porozity a povrchových modifikací na přežívání a růst MSC-GFP *in vitro* a *in vivo* v modelu hemisekce míchy u potkana. MSC byly vysety na čtyři typy hydrogelů; pHPMA-RGD připravený heterofázovou separací (pHPMA-HS-RGD) a tři typy hydrogelů připravených metodou polymerace v přítomnosti pevného porogenu, pHPMA-SP, pHPMA-SP-RGD a pHEMA-MOETACl. Jejich schopnost adheze a přežívání byla hodnocena 1, 7 a 14 dní po nasazení. Osazené materiály byly zároveň implantovány do modelu hemisekce míchy. Měsíc po implantaci bylo hodnoceno přežívání aplikovaných buněk a míra vrůstání míšní tkáně do hydrogelu (především axony a kapiláry).

***Kombinace tvorby pórů a povrchové modifikace zvyšuje přežívání a adhezi MSC-GFP *in vitro****

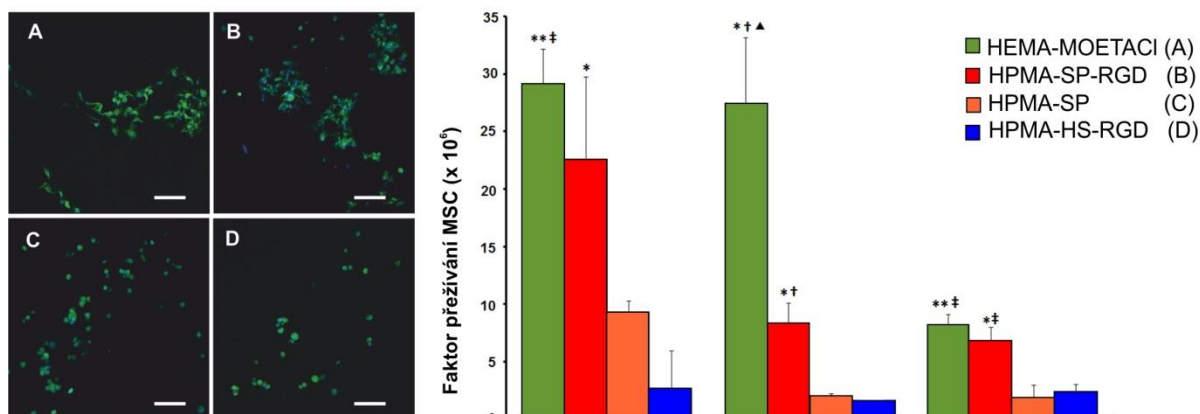
V případě pHEMA-MOETACl hydrogelu první den po nasazení MSC-GFP přežívaly ve vysokém počtu a v naprosté většině řezů na povrchu materiálu, často tvořily shluky buněk a více jak 90% buněk vykazovalo vřetenovitý tvar, značící vysokou míru adheze k materiálu.

Sedm dní po nasazení nebyl zaznamenán signifikantní pokles počtu buněk, avšak buňky se vyskytovaly již více v centrální oblasti materiálu. Čtrnáct dní od nasazení byl zaznamenán statisticky významný pokles v množství detekovaných buněk na materiálu a to jak vůči 1 tak 7 dni po nasazení. Buňky si zachovávaly vřetenovitý tvar.

Druhý typ hydrogelu připravený pomocí pevného porogenu s povrchovou modifikací peptidickou sekvencí RGD pHPMA-SP-RGD vykazoval první den po nasazení srovnatelné množství MSC-GFP jako pHEMA-MOETACl, avšak většina (90%) buněk zaujímala spíše sférický tvar. Sedmý a čtrnáctý den po nasazení byl pozorován postupný pokles počtu MSC, avšak tento trend nebyl statisticky signifikantní. Od 7. do 14. dne byla již více jak polovina pozorovaných buněk vřetenovitého tvaru a tudíž adherovala na povrch materiálu.

Materiály pHPMA SP i pHPMA-HS-RGD vykazovaly významně nižší počet přeživších MSC ve srovnání s pHEMA-MOETACl a pHPMA-SP-RGD. První den od nasazení se vyskytovala většina buněk na povrchu materiálů, zatímco 7 a 14 dní po nasazení byly MSC-GFP více difúzně rozmístěny v periferních i centrálních částech materiálů. Jen malá část buněk (10%) nasazených na pHPMA-SP vykazovala vřetenovitý tvar. Všechny buňky na pHPMA-HS-RGD hydrogelu byly ve formě kuliček, které jsou důkazem velmi nízké adheze buněk (Obr. 31).

**Obrázek 31. Vliv modifikace hydrogelu na přežívání MSC *in vitro***

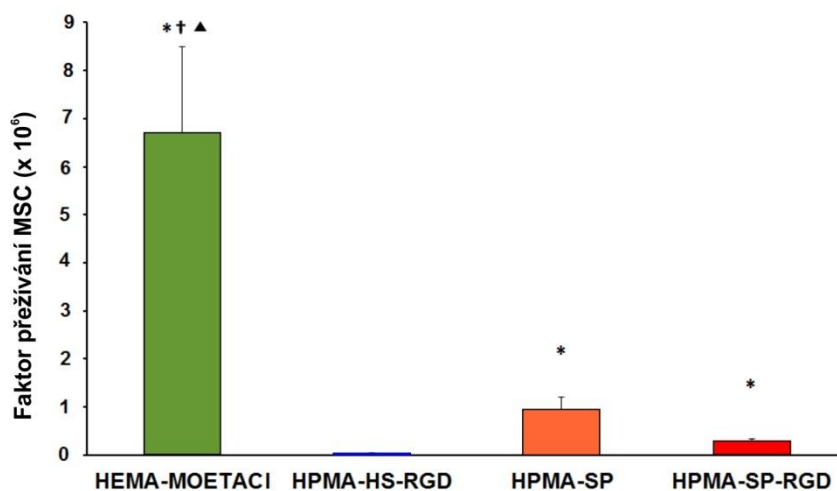


Obrázek 31. Vliv typu pórů a povrchové modifikace na přežívání MSC do 14 dnů po nasazení. Vzorové obrázky přežívání MSC v kombinaci s HEMA-MOETACI (A), HPMA-SP-RGD (B), HPMA-SP (C), HPMA-HS-RGD (D) po 24h *in vitro*. Signifikance \* vs. HPMA-HS RGD \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ ., Signifikance vs HPMA-SP †  $p < 0.05$  ‡  $p < 0.01$ , Signifikance vs HPMA-SP-RGD ^  $p < 0.05$ . Měřítko 50  $\mu\text{m}$

### **Typ pórů a povrchová modifikace mají vliv na přežívání buněk *in vivo* v modelu míšního poranění**

Všechny typy hydrogelů osetých MSC-GFP byly transplantovány do míšní hemisekce potkana s přežitím 4 týdny. Póry pHEMA –MOETACI a pHPMA-HS-RGD byly hustě prorostlé pojivovou tkání, zatímco póry obou typů pHPMA-SP byly pojivovou tkání prorostlé jen částečně. MSC byly měsíc po implantaci nalezeny v centrální i periferní části všech implantovaných hydrogelů, a v oblasti gliové jizvy. V oblasti materiálu byly často okolo MSC nalezeny vrůstající kapiláry. Množství přeživších MSC se mezi aplikovanými gely významně lišilo. Nejvíce přeživších MSC-GFP buněk bylo nalezeno v pHEMA-MOETACI hydrogelu. Signifikantně méně MSC-GFP buněk bylo nalezeno v pHPMA-SP /SP-RGD hydrogelech. Nejnižší přežívání MSC-GFP buněk bylo pozorováno v pHPMA-HS-RGD materiálu. (Obr. 32).

**Obrázek 32. Vliv modifikace hydrogelu na přežívání MSC *in vivo***

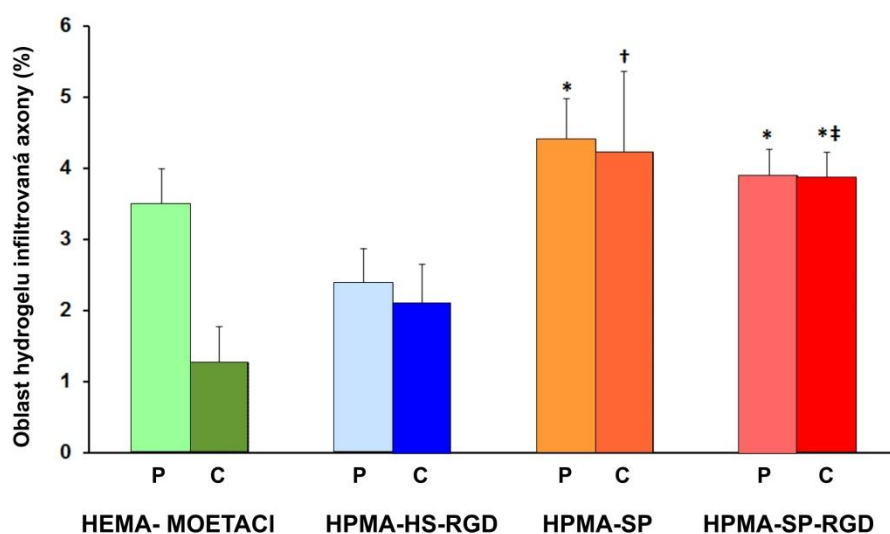


Obrázek 32. Vliv typu pórů a povrchové modifikace na přežívání MSC měsíc po implantaci do modelu hemisekce míchy. Signifikance vs. HPMA-HS RGD \*  $p < 0.05$ , Signifikance vs. HPMA-SP†  $p < 0.05$ , Signifikance vs. HPMA-SP-RGD ^  $p < 0.05$

### **Hydrogely připravené v přítomnosti pevného porogenu zvyšují vrůstání axonů**

Axonů v oblasti léze infiltrovaly periferní části všech 4 typů materiálů. V žádném z materiálů tato míra vrůstání axonů nepřesáhla 10% plochy materiálu. Největší procentuální podíl axonů v hydrogelovém implantátu byl nalezen u obou pHPMA-SP materiálů; pHPMA-SP(4.40±0.57%), pHPMA-SP-RGD (3.90±0.37%). V případě pHEMA-MOETACI byla tato hodnota signifikantně nižší (především v centrální část materiálu) (3.50±0.49%). Nejnižší podíl axonů byl nalezen u pHPMA-HS-RGD hydrogelu (2.38±0.49%) (Obr. 33, 35).

**Obrázek 33. Vliv tvaru pórů na infiltraci materiálu axony *n vivo***



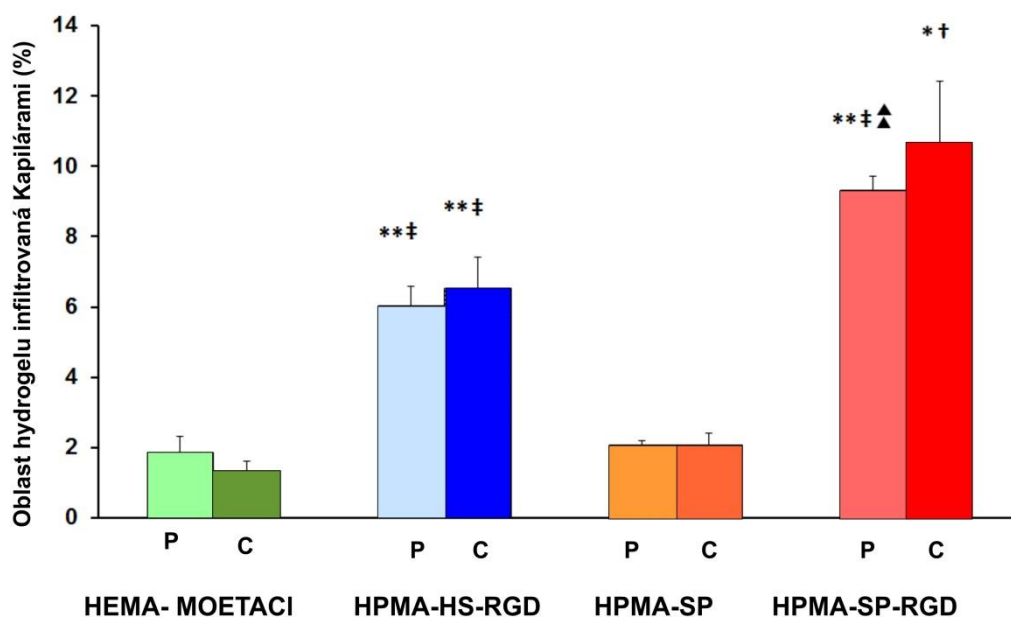
Obrázek 33. Vliv typu pórů a povrchové modifikace na infiltraci periferních (P) a centrálních (C) oblastí materiálu endogenními axony měsíc po implantaci do modelu hemisekce míchy. Signifikance vs. HPMA-HS RGD \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ ., Signifikance vs HEMA-MOETACI †  $p < 0.05$  ‡  $p < 0.01$ .

#### **Modifikace povrchu hydrogelu RGD sekvencí zvyšuje množství vrůstajících kapilár.**

Infiltrace implantovaného hydrogelu cévními kapilárami je zásadní krok pro efektivní přežití implantovaných a endogenních buněk uvnitř implantátu. Kapiláry v oblasti léze infiltrovaly periferní části všech 4 typů hydrogelů. Největší zastoupení kapilár v ploše implantovaného hydrogelu bylo nalezeno u HPMA-SP-RGD ( $9.04 \pm 0.43\%$ ) a dále pak v HPMA-HS-RGD ( $6.04 \pm 0.56\%$ ). Tento nález poukazuje na možný vliv RGD modifikace na vytvoření kapilární sítě uvnitř biomateriálu. HPMA-SP ( $2.07 \pm 0.12\%$ ) a HEMA-MOETACI ( $1.85 \pm 0.46\%$ ) sice byly infiltrovány cévními kapilárami, avšak statisticky signifikantně méně. V porovnání s V centrální části implantovaných materiálů byla situace obdobná: HPMA-SP-RGD ( $10.66 \pm 1.78\%$ ) a HPMA-HS-RGD ( $6.54 \pm 0.90\%$ ) podporovaly růst kapilár, kdežto materiály bez

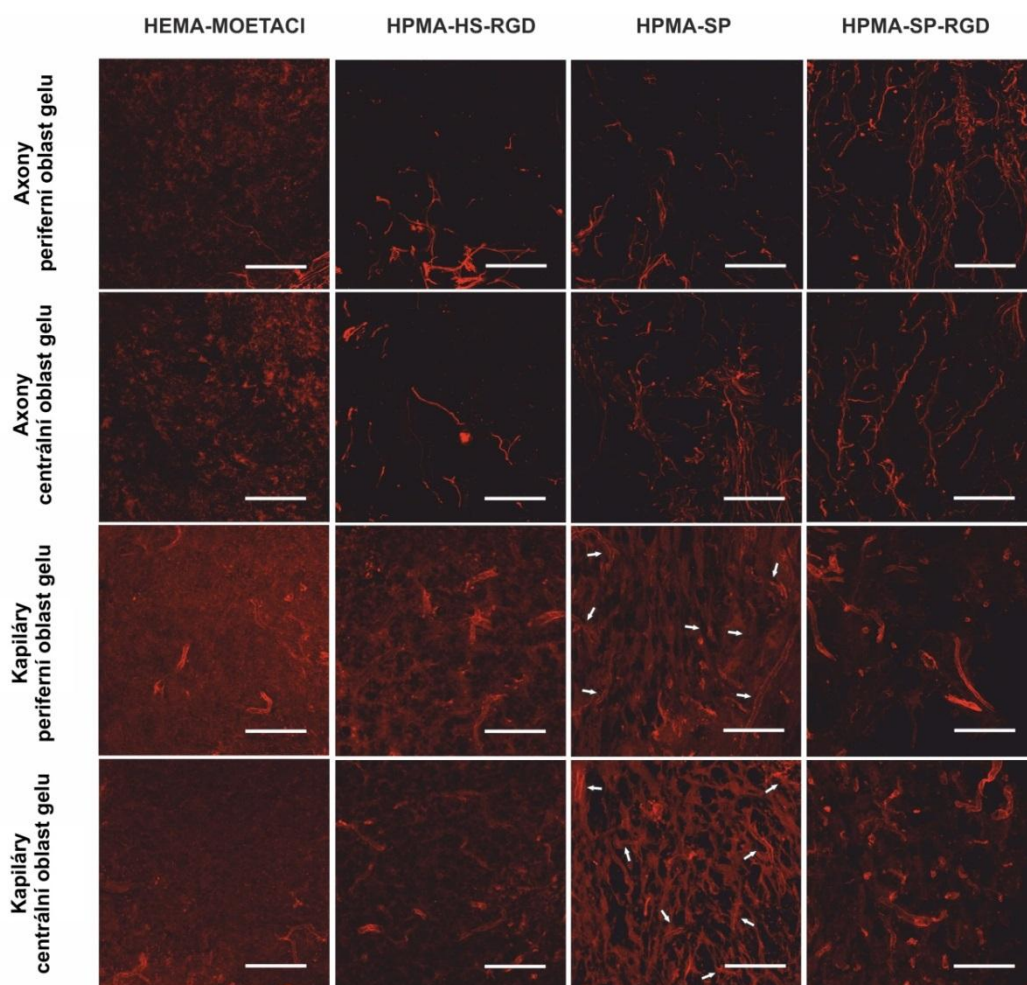
RGD modifikace jako HPMA-SP ( $2.06 \pm 0.35\%$ ) a HEMA-MOETACI ( $1.33 \pm 0.29$ ) vykazovaly podporu spíše slabou. Zároveň byl pozorován mírný synergistický efekt RGD modifikace s porozitou typu SP. (Obr. 34,35).

**Obrázek 34. Vliv modifikace hydrogelu RGD sekvencí na infiltraci materiálu kapilárami *in vivo***



Obrázek 34. Vliv typu pórů a povrchové modifikace na infiltraci periferních (P) a centrálních (C) oblastí materiálu kapilárami měsíc po implantaci do modelu hemisekce míchy. Signifikance vs. *pHPMA-SP* \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ ., Signifikance vs. *pHEMA-MOETACI* †  $p < 0.05$  ‡  $p < 0.01$ , Signifikance vs. *pHPMA-HS-RGD* ^  $p < 0.01$ .

**Obrázek 35. Vrůstání axonů a kapilár do různých typů hydrogelů měsíc po implantaci do hemisekce potkana.**



*Obrázek 35. Histologické snímky periferní a centrální části implantovaných hydrogelů ukazující míru infiltrace axonů a kapilár v závislosti na typu použitých materiálů. Měřítko 100 $\mu$ m*

**PHEMA hydrogel s navázaným serotoninem vede k zvýšené diferenciaci spinálních fetálních prekurzorů, avšak ne k funkčnímu zlepšení v experimentálním modelu hemisekce míchy.**

**(J. Ruzicka, N. Romanyuk, A. Hejcl, M. Vetrik, M. Hruby, G. Cocks, J. Cihlar, M. Pradny, J. Price, E. Sykova and P. Jendelova (2013) Treating spinal cord injury in rats with a combination of human fetal neural stem cells and hydrogels modified with serotonin. Acta Neurobiol Exp (Wars);73(1):102-115.)**

MP zahrnuje velmi komplexní kaskády sekundárních procesů, které blokují přirozený proces regenerace. Aplikace samotných kmenových buněk do oblasti poškozené míchy, jejíž cytotoxické prostředí snižuje šanci na přežívání, a diferenciaci aplikovaných buněk, nemusí stačit na dostatečně dlouhou podporu regenerace. Hydrogely v mnoha případech mají vhodné vlastnosti na přemostění kavity a podporu přirozených procesů regenerace. Specifické modifikace podporující adhezi, proliferaci a diferenciaci neurálních prekurzorů a růst endogenních tkáňových elementů (kapiláry, axony) mohou mít synergický efekt v kombinaci s vhodnými kmenovými buňkami. V naší studii jsme zkoumali využití podmíněčně imortalizované linie lidských neurálních prekurzorů (SPC-01) derivovaných z fetální míšní tkáně s pHEMA hydrogelem s kovalentně navázanými molekulami serotoninu (pHEMA-5HT) v kombinované léčbě MP. Porovnávali jsme efekt samotného pHEMA-5HT či v kombinaci s SPC-01 na funkční zlepšení a morfologické změny v modelu laterální hemisekce míchy u potkana.

#### ***PHEMA-5HT hydrogel podporuje proliferaci a diferenciaci SPC-01 buněk in vitro***

Před implantací hydrogelu do místa poranění jsme hodnotili schopnost SPC-01-GFP buněk růst, proliferovat a diferencovat *in vitro* v daném hydrogelu. Po 28 dnech kultivace, jak SPC-01 tak SPC-01-GFP buňky porůstaly prakticky skoro celý povrch pHEMA-5HT materiálu. Přes přítomnost 4OHT v kultivačním mediu, oba typy neurálních linií diferencovaly do neurálního fenotypu. Buňky byly pozitivní na neurální znaky, jako jsou NF70 (Obr. 36. A, detail B), NCAM (Obr. 36. C), nestin (Obr. 36. D), synaptophysin (Obr. 36. E) a  $\beta$ III-tubulin



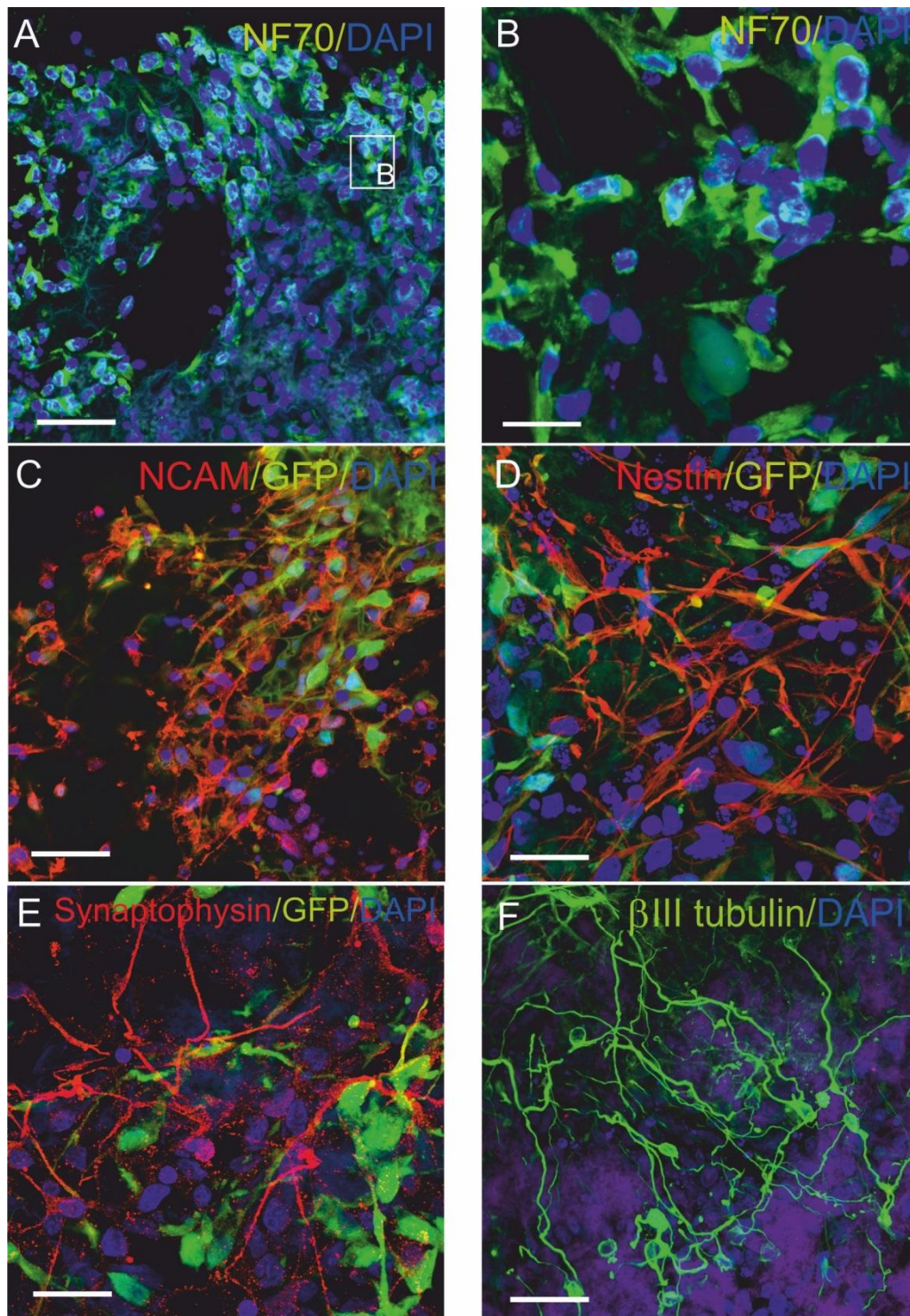
(Obr. 36. F). Tyto výsledky ukazují, že pHEMA-5HT materiál podporuje růst a diferenciaci spinálních progenitorů in vitro v 3D prostředí. Molekuly serotoninu mohou facilitovat neurální diferenciaci SPC-01 buněk i přes přítomnost 4OHT v mediu, jenž je ko-aktivátorem CmycER<sup>TAM</sup> konstruktů a za standardních kultivačních podmínek udržuje buňky SPC-01 v proliferujícím nezralém stavu.

***SPC-01 buňky diferencují v pHEMA-5HT hydrogelu in vivo, ale vycestovávají z hydrogelu směrem do míchy***

Měsíc po implantaci polymeru osetého buňkami do míšní hemisekce SPC-01-GFP buňky velmi dobře přežívaly v místě poranění. Převážná většina z nich se vyskytovala v periferních oblastech pHEMA-5HT hydrogelu, avšak malá část SPC-01 buněk migrovala kraniálně do nepoškozené míšní tkáně. Implantované buňky byly sice stále nestin pozitivní (Obr. 37. A), zároveň však postupně dozrávaly a byly pozitivní na  $\beta$ III-tubulin (Obr. 37. B), GFAP (Obr. 37. C), ChAT (Obr. 37. D) a Tau (Obr. 37. E). Část z implantovaných buněk připomínala astrocyty (Obr. 37. F).

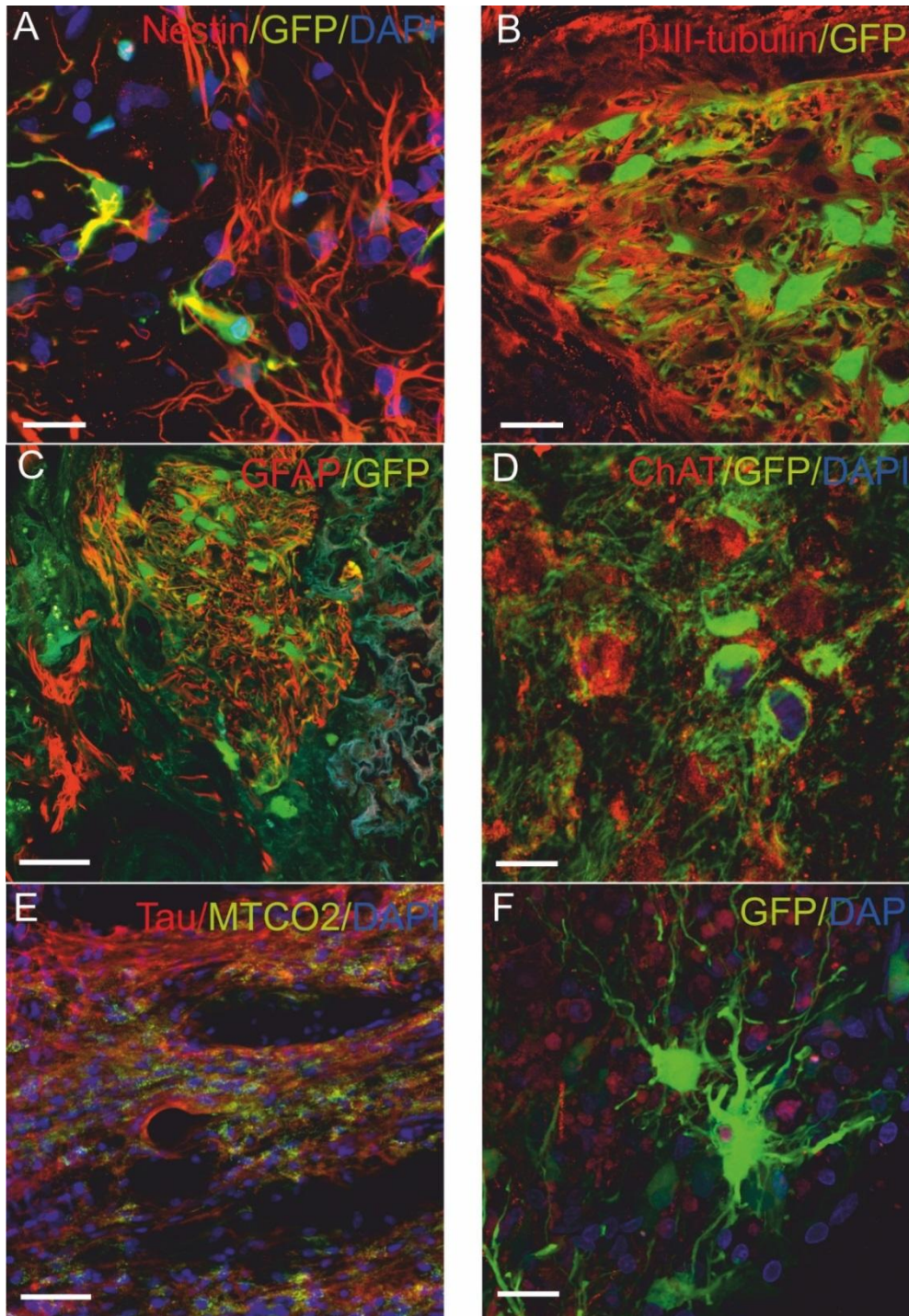
Tři měsíce po implantaci SPC-01 buňky stále dobře přežívaly v oblasti poškození (Obr. 38. A), avšak většina buněk migrovala z implantovaného materiálu do okolní míšní tkáně, z nichž některé až do vzdálenosti 4 mm od místa poranění (Obr. 38. B). Zbylá část SPC-01 buněk se vyskytovala především v periferní části hydrogelového materiálu na přechodu hydrogelu a míchy (Obr. 38. C). V centru materiálu se SPC-01 buňky vyskytovaly pouze ojediněle.

Obrázek 36. Stav SPC-01 buněk v pHEMA-5HT hydrogelu před implantací



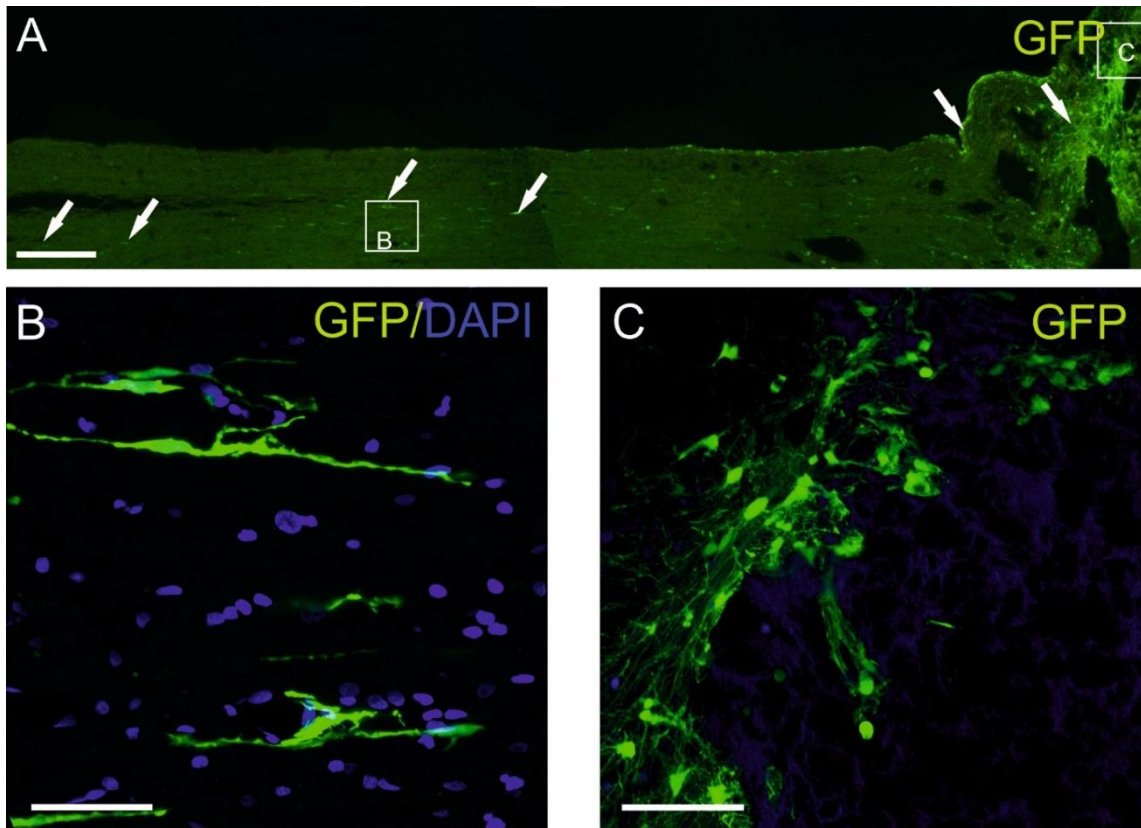
Obrázek 36. SPC-01 buňky po měsíci kultivace v pHEMA-5HT materiálu byly pozitivní na markery neurální diferenciace; NF70(A, detail B), NCAM (C), Nestin (D), Synaptophysin (E) a  $\beta$ III-tubulin (F). Měřítka  $40\mu\text{m}$  (A, C-F),  $20\mu\text{m}$  (B)

Obrázek 37. SPC-01 buňky v pHEMA-5HT hydrogelu měsíc po implantaci



Obrázek 37. SPC-01 –GFP buňky měsíc po implantaci v pHEMA-5HT materiálu do míšní hemisekce byly pozitivní na Nestin (A),  $\beta$ III-tubulin (B), GFAP (C), ChAT (D), a Tau (E). Část buněk morfoloži připomínala astrocyty typ (F). Měřítka 50 $\mu$ m (C, E), 20 $\mu$ m (A, B) 10 $\mu$ m (D, F).

**Obrázek 38. Přežívání a migrace buněk 3 měsíce po implantaci**



*Obrázek 38. SPC-01-GFP buňky přežívaly 3 měsíce po implantaci v pHEMA-5HT hydrogelu a v okolní míšní tkáni (A) Buňky migrovaly až do vzdálenosti 4 mm od místa poranění (B).*

*V pHEMA-5HT hydrogelu se vyskytovaly spíše na jeho rozhraní s míšní tkání (C). Šipky ukazují migraci SPC-01- GFP buněk kraniálním směrem od místa poranění. Měřítka 300  $\mu\text{m}$  (A) 50  $\mu\text{m}$  (B) a 100  $\mu\text{m}$  (C)*

### ***SPC-01 buňky zpomalují atrofii míšní tkáně, pHEMA-5HT hydrogel zmenšuje gliovou jizvu v místě poranění***

Pro zhodnocení efektu léčby na snížení atrofie míšní tkáně byla spočítána plocha zbylé tkáně na longitudinálních řezech vždy na obou koncích hydrogelu (25x zvětšení, HE barvení). Měsíc po poranění byl naměřen signifikantní rozdíl v celkovém zachování míšní tkáně a to jak mezi SPC-01-pHEMA-5HT skupinou a neléčenou kontrolou, tak mezi osetým a neosetým

hydrogelem. Žádný statisticky signifikantní rozdíl nebyl nalezen 3 měsíce po poranění (Obr. 39. A).

Měsíc po poranění bylo detekováno statisticky významně menší zastoupení GFAP pozitivní tkáně u obou skupin s implantovaným hydrogelem vůči neléčené kontrole. Mezi SPC-01 osetým a neosetým hydrogelem nebyl detekován signifikantní rozdíl. Tři měsíce po poranění nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl (Obr. 39. B).

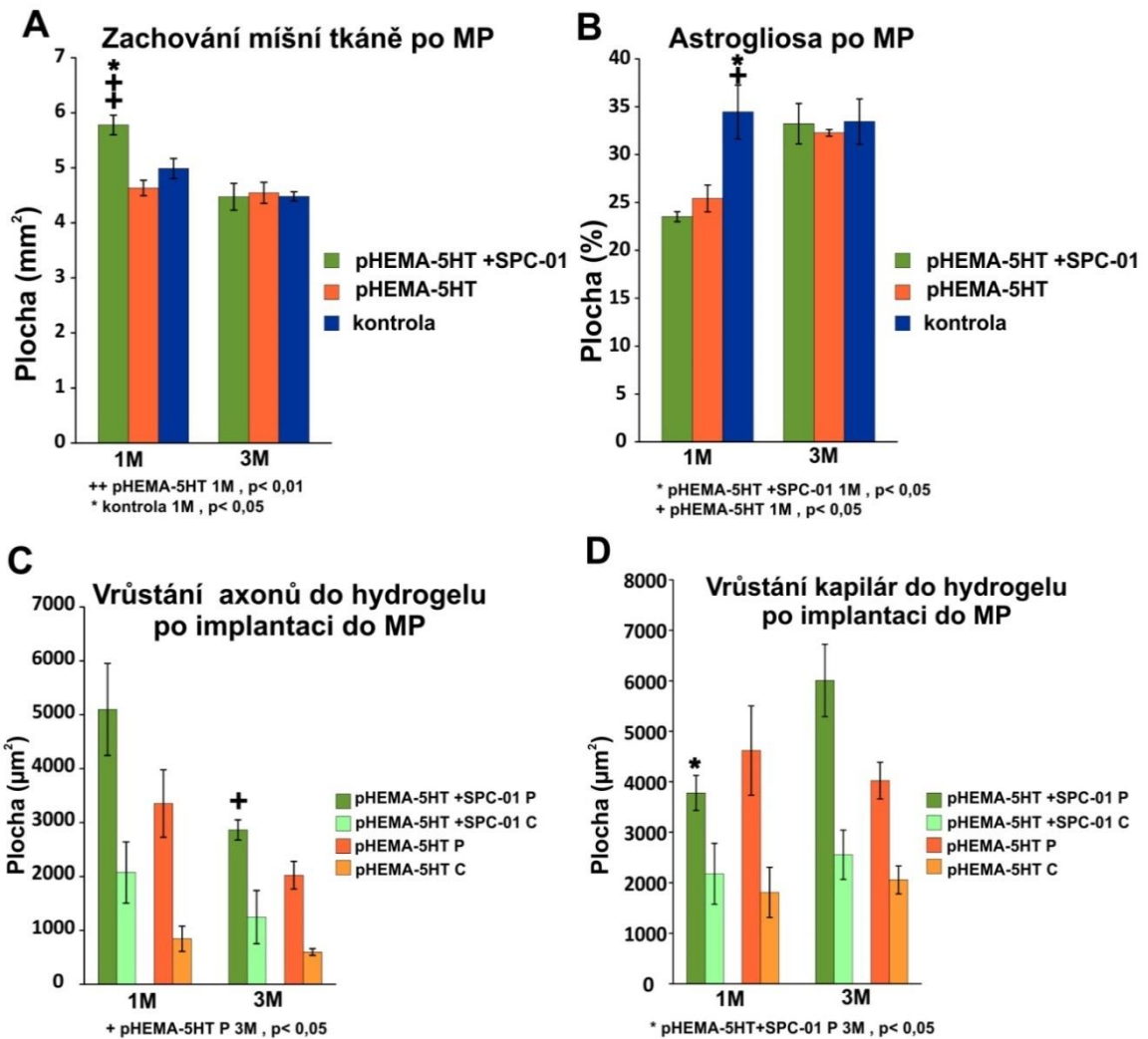
#### ***SPC-01 buňky zpomalují proces retrakce vrůstajících axonů***

V gelech osetých SPC-01 buňkami byl zaznamenán mírný vliv implantovaných buněk na vrůstání axonů především do periferních částí hydrogelu, tento efekt se projevil signifikantně 3 měsíce po implantaci. Během doby studie však v těchto gelech došlo k výraznější retrakci axonů, než ve skupině se samotným hydrogelem, pravděpodobně z důvodu migrace SPC-01 buněk vně implantovaného materiálu (Obr. 39. C).

#### ***SPC-01 buňky napomáhají stabilizovat vrůstání kapilár do HEMA-5HT hydrogelu***

Při hodnocení vlivu SPC-01 buněk na vrůstání kapilár do pHEMA-5HT hydrogelu nebyl pozorován signifikantní rozdíl oproti samotnému materiálu, avšak v SPC-01 buňkami osetém materiálu došlo v čase k signifikantnímu zvětšení plochy kapilárního řečiště v periferní oblasti hydrogelu (Obr.39. D).

**Obrázek 39. Efekt kombinované terapie na zachování míšní tkáně a mikrostrukturální změny po MP**



*Obrázek 39. Kvantifikace vlivu osetých a neosetých hydrogelů na atrofii (A), gliovou jizvu (B) a infiltraci léze axony (C) a kapilárami (D). Měření probíhalo 1 a 3 měsíce po implantaci. Periferní (P) a centrální (C) část materiálu byla hodnocena zvlášť.*

## Diskuze

Míšní poranění patří k jedné z nejčastějších příčin, jež dlouhodobě paralyzují pacienty jak po fyzické tak po duševní stránce. Výzkum posledních let ukazuje, že tak složitý systém, jako je CNS, zahrnující celou řadu mechanismů udržujících poměr plasticity a rigidity po poškození, má řadu zábran spontánní regenerace na několika úrovních a tudíž i samotná léčba by měla zahrnovat jednotlivé složky, které by na tyto úrovně zacílily. Kombinované terapie využívající synergického efektu jednotlivých složek by měly být připraveny na míru pacientům a zaměřeny na cílenou regeneraci poškozené míšní tkáně. Imuno-modulační faktory, kmenové buňky a biokompatibilní hydrogelové biomateriály pro přemostění léze mohou představovat jednotlivé složky takovéto terapie. Cílem této práce bylo představit možnosti kombinované terapie zahrnující výše jmenované složky, definovat jejich vliv na navrácení lokomoční funkce po MP a najít rozdíly v mechanismech jejich působení v klinicky relevantních modelech míšního poranění.

Stimulace endogenní regenerace aplikací růstových faktorů a biomolekul má podporu mnoha výzkumných týmů po celém světě. Pozitivní role G-CSF v mobilizaci MSC a následném morfologickém a funkčním zlepšení v experimentálních modelech míšního poranění bylo zdokumentováno v několika předchozích pracích (Divani, Hussain, Magal, Heary, & Qureshi, 2007; W. F. Chen *et al.*, 2008; Koda *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2008; L. Urdzikova *et al.*, 2006). U GM-CSF byly popsány inhibice apoptózy neurálních buněk regulací exprese proteinů spojených s procesem apoptózy (X. Huang *et al.*, 2007), a vliv jeho aplikace na snížení tvorby gliální jizvy (X. Huang *et al.*, 2009). Zároveň byl GM-CSF použitý v experimentální léčbě nejen u zvířat, ale i u pacientů v klinických studiích (X. Huang *et al.*, 2009; H. C. Park *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2007). Aplikace Flt3 ligandu byla rovněž použita v klinických studiích pro mobilizaci raných hematopoetických prekurzorů a ke zvýšení počtu dendritických buněk (Brasel *et al.*, 1996), což v důsledku vedlo k zvýšené produkci růstových faktorů včetně NT3, který podporuje neurogenezi (Mikami *et al.*, 2004).

Vliv samotných faktorů má ovšem omezenou dobu trvání a tudíž může zmírnit průběh řady sekundárních procesů, ale většinou již nestačí na nastartování dlouhodobých reparativních mechanismů vedoucích k výraznému funkčnímu zlepšení. Jedním ze stabilních zdrojů faktorů podporujících regeneraci jsou kmenové buňky. Využití kmenových buněk mesenchymálního či neurálního původu má v léčbě experimentálních modelů míšního poranění velkou perspektivu a různé typy jsou již v klinických studiích fáze 1 a 2. Osud implantovaných buněk v míšním poranění, jejich přežívání, proliferace a diferenciace jsou hlavními faktory účinnosti terapie. Ty se pak promítají v odpovědi tkáně na úrovni imunomodulace, exprese endogenních růstových a anti-apoptotických molekul. V agresivním prostředí míšní léze je míra přežívání aplikovaných buněk důležitým aspektem jejich účinnosti, který se dá ovlivnit jak typem buněk, tak počtem aplikovaných buněk. Aplikace biokompatibilních hydrogelů může být řešením pro cílené uvolňování růstových faktorů, nebo mohou biomateriály sloužit jako nosiče pro zvýšené přežívání aplikovaných buněk či pro manipulaci jejich diferenciace. Navíc řada hydrogelů bývá vybavena povrchovými modifikacemi a porézni strukturou vedoucí k infiltraci specifických podtypů míšní tkáně.

### **Osud kmenových buněk po implantaci- vliv prostředí na přežívání buněk, proliferaci a diferenciaci**

Míra a délka přežití implantovaných kmenových buněk je zásadní faktor v dané léčbě. Počty buněk použitých v našich experimentech ( $5 \times 10^5$ ) se ve srovnání s ostatními pracemi pohybují v případě NP okolo průměrné hodnoty (Cheng *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2012; Sareen, Gowing *et al.*, 2014), kdežto v případě použití MSC se pohybují spíše na nižší hranici (Paterniti *et al.*, 2014). Námí použitý počet se více využívá v opakovaných aplikacích (Cizkova *et al.*, 2011). V případě intratékálního podání hMSC 7 dní po indukci léze bylo pozorováno jen krátkodobé přežívání těchto buněk, buňky byly nalezeny pouze do 14 dnů od jejich podání. Navzdory jejich možné absenci byly pozorovány statisticky významné změny v několika sledovaných parametrech, což je v souladu s dnešním vědeckým stanoviskem týkajícím se parakrinního efektu kmenových buněk (Teixeira *et al.*, 2013). Vliv kmenových buněk je úzce



spojený i se způsobem podání, který se může projevit jak lokálními, tak systémovými změnami. To v důsledku může vést v některých případech i k rozdílům lokomočních odpovědí na danou léčbu (Cheng *et al.*, 2012; Paul, Samdani, Betz, Fischer, & Neuhuber, 2009; P. A. Walker *et al.*, 2011). Na druhou stranu meta-analýzy znázorněné v Olivieriho publikaci (Oliveri, Bello, & Biering-Sorensen, 2014) neukazují v behaviorální odpovědi u MSC léčených potkanů s MP statisticky významné rozdíly mezi zvířaty implantovanými intraparenchymálně, intravenózně či intratékálně. Jelikož neurální diferenciaci *in vivo* je v případě MSC velmi nepravděpodobná a navíc právě intratékální podání MSC se ukazuje jako méně invazivní a bývá často použito v běžících klinických studiích (Callera & do Nascimento, 2006; Kishk *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2012), rozhodli jsme se tento typ použít i pro naše srovnání. Intratékální podání je navíc vhodné i pro opakované implantace. Implantace MSC bývá často spojena v kombinované terapii s hydrogely s cílem zvýšit přežití aplikovaných buněk a růst endogenní tkáně do implantátu (Hejcl *et al.*, 2010; Lesny *et al.*, 2006; Sarnowska *et al.*, 2013). V naší práci rMSC naseté na HEMA-MOETACI či HPMA-SP-RGD přeživaly minimálně po dobu jednoho měsíce uvnitř i v okolí materiálu. V tomto časovém rozmezí jsme již pozorovali komunikaci aplikovaných MSC s cévami uvnitř hydrogelu i mimo něj. Ve většině případů se však aplikované MSC nacházejí spíše na okrajových částech hydrogelů, pravděpodobně z důvodu pomalé vaskularizace materiálu.

V případě NP hraje délka přežívání roli nejen ve tvorbě stabilního zdroje „sekretomu“ transplantovaných buněk, ale i v možnosti diferenciaci buněk a jejich integrace do poškozené míšní tkáně. V případě aplikace NP přímo do místa poranění jsme pozorovali dlouhodobé a robustní přežívání jak NP-iPS, tak SPC-01 minimálně po dobu 2 měsíců. V našich studiích byly tyto buňky detekovány ve velké míře i 4 měsíce po implantaci (Amemori *et al.*, 2013), kdy až v této době docházelo k diferenciaci buněk do tkáňově specifických neuronů. Dva měsíce po implantaci byly oba typy NP spíše raného neurálního fenotypu, který byl u NP-iPS nasměrován více do neuronálního fenotypu. Tento rozdíl odpovídá nálezům naší skupiny v předešlých pracích. Urychlení tohoto procesu může mít pozitivní vliv při zapojování implantovaných buněk

do okruhů poškozené míchy. Implantace SPC-01 buněk v HEMA-5HT hydrogelu vedla k pozitivnímu efektu a urychlené diferenciaci buněk, avšak tento efekt byl pouze přechodný a trval jen během prvního měsíce léčby. Vymizení tohoto efektu 3 měsíce po implantaci je spojeno s vycestováním SPC-01 buněk z materiálu, kde selektivní kovalentní modifikace -5HT sice urychlovala diferenciaci NP, ale samotný materiál dostatečně nesloužil k přemostění léze a nepodpořil růst endogenních buněk.

### **Vliv léčby na zachování bílé a šedé hmoty míšni**

Jako jedním z nejčastěji popisovaných a žádoucích cílů léčby je zmírnění průběhu sekundárních procesů míšního poranění, které vedou ke ztrátě neuronů a glií a celkové atrofii míšni tkáně. Míra zachování míšni tkáně velmi dobře koreluje se zachováním lokomoční funkce. Tento efekt je často pozorován právě u kmenových buněk (Menezes *et al.*, 2014; Ritfeld *et al.*, 2012; Wilcox *et al.*, 2014) V našem experimentu vedlo použití kombinace faktorů Flt3 ligandu a G-CSF k výraznějšímu zachování bílé i šedé hmoty míšni především ve vzdálenějších oblastech od místa poranění než při použití stejné dávky jedné či druhé látky samostatně. Synergický účinek léčby byl dokonce výraznější než ve studii Luo *et al.* (Luo, Zhang, Jiang, Xue, & Ke, 2009) užívající samotné G-CSF v kombinaci s transplantací MSC. U Flt3 ligandu tento efekt nebyl předtím zaznamenán. Na druhou stranu G-CSF vykazuje dle několika prací neuroprotektivní účinky v léčbě poškozené CNS (Fathali, Lekic, Zhang, & Tang, 2010; Yata *et al.*, 2007). V naší srovnávací buněčné studii jsme nejvýraznější a statisticky významný vliv na zachování bílé a šedé hmoty pozorovali u zvířat s aplikovanými NP-iPS buňkami. Podání hMSC a SPC-01 buněk vedlo pouze k nesignifikantnímu trendu. U MSC je často popisován pozitivní vliv implantace na zachování hmoty míšni (Ritfeld *et al.*, 2012), který bývá výrazný především u opakovaných implantací (Cizkova *et al.*, 2011). U aplikace NP je tento výraznější efekt pravděpodobně spojen s jejich dlouhodobým přežíváním v místě léze (dva měsíce po aplikaci buněk bylo v místě léze nalezeno 17% implantovaných SPC-01 buněk a 10% implantovaných NP-iPS). Výraznější efekt NP-iPS může být spojený s jejich větší komunikací s okolním prostředím. NP-iPS zároveň více ovlivnily produkci prozánětlivých molekul a

růstových faktorů endogenní tkáně. Transplantované NP produkují celou řadu antiapoptotických molekul (Tuszynski, Wang, Graham, Gao *et al.*, 2014; Tuszynski, Wang, Graham, McHale *et al.*, 2014), ale jelikož se v případě NP-iPS nepodařilo odlišit v morfometrických studiích aplikované buňky od příjemce, je v zachované míšní tkáni započítán i vlastní graft. V řadě různých experimentálních modelů se ke zmírnění atrofie často používají i kombinované terapie s hydrogelem (G. Chen *et al.*, 2010; B. G. Kim *et al.*, 2010; Pritchard *et al.*, 2010; Teng *et al.*, 2002). Aplikace hydrogelů často vede k zachování, či rekonstrukci míšní tkáně (Estrada *et al.*, 2014; Hejcl *et al.*, 2013; Lesny *et al.*, 2002; Novikova *et al.*, 2006; Woerly, Doan, Evans-Martin *et al.*, 2001; Woerly *et al.*, 2004) primárně vytvořením permissivního prostředí přemostujícího kavitu léze (Aizawa *et al.*, 2008; Hejcl *et al.*, 2013; Kubinova *et al.*, 2013; Kubinova *et al.*, 2010; Lesny *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009). Složitější systémy na bázi iontoměničů či pump uvolňujících bioaktivní molekuly mohou výrazně ovlivňovat zachování a rekonstrukci tkáně a vést tak k funkčnímu zlepšení po MP (Hyatt *et al.*, 2010; H. Lee *et al.*, 2010; Y. B. Lee *et al.*, 2010). Vhodná kombinace biomateriálu a kmenových buněk může vést ke stejnému synergickému efektu (Hejcl *et al.*, 2010; Kubinova *et al.*, 2010; Mothe *et al.*, 2013; T. T. Yu & Shoichet, 2005). V léčbě experimentální hemisekce míchy HEMA-5HT hydrogelem osetým SPC-01 buňkami nebyl sice pozorován efekt samotného materiálu, avšak hydrogel kombinovaný s SPC-01 buňkami statisticky významně ovlivnil zachování míšní hmoty měsíc po poranění. Po 3 měsících od poranění tento efekt již nebyl pozorován, což může souviset s postupnou migrací buněk z centra hydrogelu na periferii i vně materiálu a následným rozptýlením buněk v míšní tkáni.

### **Modulace gliové jizvy a axonální sprouting**

Gliová jizva je složitým systémem, který se vytváří v rámci sekundárních procesů poranění. Zpočátku slouží jako ochranná bariera pro nepoškozenou tkáň, avšak postupně stále více brání regeneraci a růstu axonů v lézi. Na utváření gliové jizvy se mimo jiné podílejí GFAP pozitivní astrocyty (Barnabe-Heider *et al.*, 2010). GFAP pozitivní signál v těsné blízkosti centrální léze tedy může ukázat míru ovlivnění tvorby gliové jizvy. Ve studii využívající

kombinované terapie Flt3 ligandu a G-CSF v léčbě míšního poranění bylo dosaženo signifikantního zmenšení gliové jizvy jak u obou jednotlivých terapií, tak u jejich vzájemné kombinace. Nejvýraznější efekt byl pozorován u Flt3 ligandu samotného, kdežto u kombinace byl tento efekt snížen vlivem G-CSF. Z podobných látek inhibuje tvorbu gliové jizvy ještě GM-CSF (Fortun *et al.*, 2009; X. Huang *et al.*, 2009; Miltiadous, Stamatakis, & Stylianopoulou, 2010). Flt3 ligand může snižovat tvorbu gliové jizvy redukcí počtu CD11b+ buněk v místě léze, protože aktivace mikroglie indukovaná traumatem předchází astroglíze (Tian *et al.*, 2007). Jedním z efektorů v rekonstrukci GFAP pozitivní tkáně mohou být i hydrogely. Astrocyty obecně velmi málo vrůstají do hydrogelů aplikovaných v MP a v některých případech dochází i k přímé supresi okolní gliové jizvy (Tysseling-Mattiace *et al.*, 2008). Jedním z takových biomateriálů je Neurogel neboli gel na bázi HPMA (Woerly, Doan, Evans-Martin *et al.*, 2001; Woerly *et al.*, 2004). V naší práci použitý pHEMA-5HT hydrogel, ať už samotný či dohromady s SPC-01 buňkami, signifikantně snižoval tvorbu gliové jizvy měsíc po implantaci. Tento rozdíl však během následujících 2 měsíců vymizel. Je tedy pravděpodobné, že hydrogel gliovou jizvu neredukoval, ale spíše zpomaloval proces tvorby. Jistou nevýhodou kombinace hydrogelu s SPC-01 buňkami může být převažující diferenciaci do GFAP fenotypu. V případě aplikace SPC-01 buněk do balonkové léze, kdy velmi zřetelný implantát buněk nebyl započítáván do hodnocení gliové jizvy, byl jejich účinek spíše redukující. Nejmenší astroglíza byla pozorována u NP-iPS buněk. Tento efekt může být spojený s jejich výraznou proneuronální diferenciací oproti NP z SPC-01 linie. Lidské MSC spíše ovlivnily tloušťku a denzitu gliové jizvy, ale celkově snížily její tvorbu nejméně ze všech použitých buněk tohoto experimentu.

Axonální sprouting je důležitým parametrem odrážejícím plasticitu systému a přítomnost růstových faktorů. V naší studii byl popsán pozitivní vliv aplikace G-CSF na zvýšený axonální sprouting po MP, který byl ještě umocněn v kombinaci s Flt3 ligandem. Samotný Flt3 ligand takový účinek nevykazoval a blížil se spíše hodnotám neléčené kontroly. Efekt aplikace G-CSF na podporu axonálního sproutingu je v korelaci s jeho neuro-protektivními vlastnostmi popsanými v několika současných publikacích (Fathali *et al.*, 2010; Yata *et al.*, 2007). Přestože

Flt3 ligand sám tento účinek v naší studii neukázal, jeho účinek může být spojený například se schopností mobilizovat hematopoetické progenitorové buňky a dendritické buňky, které mimo jiné aktivují endogenní neurální prekursorů, produkující neurotrofické faktory jako je NT3, BDNF, NT3 atd. (Brasel *et al.*, 1996; Mikami *et al.*, 2004). Stejně tak implantace exogenních NP do míšního poranění může zvyšovat axonální sprouting, a to vlivem přímé produkce neurotrofických faktorů (Hawryluk *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2014) a/nebo stimulací endogenních buněk k produkci těchto faktorů. V naší srovnávací studii oba typy transplantovaných NP signifikantně zvýšily počet nových axonálních vláken jak vůči neléčené kontrole, tak vůči potkanům léčeným hMSC. Tento rozdíl může být spojen s dlouhodobým přežíváním NP, kdy nižší, avšak dlouhodobá stimulace může vést k přetrvávajícím mikrostrukturálním změnám a zároveň integraci implantovaných buněk do poškozené CNS (Delfino-Machin *et al.*, 2007; Polentes *et al.*, 2012; Saadai *et al.*, 2013; Sareen, Gowing *et al.*, 2014). Dle předchozích prací oba typy NP dlouhodobě přežívaly v místě poranění (Amemori *et al.*, 2013; Romanyuk *et al.*, 2014). Zároveň oba typy NP dlouhodobě stimulovaly míšní tkáň k produkci neurotrofických faktorů a společně s vlastní produkcí tak vytvářely gradient růstových faktorů, nezbytný pro tvorbu nových axonálních vláken.

### **Původ kmenových buněk má vliv na imunitní odpověď tkáně**

Odpověď endogenní míšní tkáně na implantaci buněk se odehrává na několika úrovních. Jedním z významných faktorů, ovlivňujících účinnost buněčné terapie, je odpověď prozánětlivých cytokinů na implantát. V naší studii byly nejvýraznější změny v imunitní odpovědi na implantované buňky pozorovány v MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, IL-1  $\beta$ , IL-4, IL6 and IL12.

Redukce MIP-1 $\alpha$  byla nejvýraznější u skupiny SPC-01 a NP-iPS a to v porovnání jak s kontrolní, tak MSC skupinou. MIP-1 $\alpha$  ovlivňuje fagocytózu myelinu po MP a je spolehlivým markerem zánětu. Inhibice MIP-1 $\alpha$  vede ke snížení procesu demyelinizace, což vytváří vhodnější prostředí pro regeneraci míšní tkáně (Ousman & David, 2001). Toto snížení hladin

MIP-1 $\alpha$  může ovlivnit vysoký axonální sprouting pozorovaný u obou NP a míru zachování míšní tkáně.

TNF- $\alpha$  je dlouhodobě používán jako cíl protizánětlivých terapií. V MP TNF- $\alpha$  spouští apoptotické procesy jednak přes NF- $\kappa$ B závislý mechanismus a jednak přes mitochondriálními dráhami regulované proteiny z rodiny Bcl-2 (Guadagno, Xu, Karajgikar, Brown, & Cregan, 2013). Navíc v potkaním modelu míšního poranění léčeném Etanerceptem (TNF- $\alpha$  inhibitorem) a neurálními kmenovými buňkami bylo pozorováno funkční zlepšení, které naznačuje, že potlačení TNF- $\alpha$  snižuje neurální deficit po MP (L. Wang *et al.*, 2014). V korelaci s našimi výsledky snížení hladiny TNF- $\alpha$  může souviset s výrazně lepšími výsledky u NP-iPS léčených potkanů, jelikož NP-iPS buňky nejvýrazněji a nejstabilněji potlačily hladiny TNF- $\alpha$  hladiny po všechna měření. Stejně tak hladiny RANTES byly sníženy aplikací buněk po MP. Inhibice tohoto cytokinu má protizánětlivý efekt. Navíc redukce hladin RANTES aplikací protizánětlivé látky kurkuminu, vedla ke zvýšené viabilitě neuronů a snížení buněčné smrti (Zhou *et al.*, 2009). Oba typy neurálních prekurzorů se liší hladinami IL-1  $\beta$ . U SPC-01 buněk byla hladina IL-1  $\beta$  14 dní po míšní lézi signifikantně vyšší ve srovnání s neléčenou kontrolou. Naopak, po dobu celého experimentu zůstala hladina IL-1  $\beta$  ve skupině léčené NP-iPS nezměněná nebo snižena. Hladiny IL-1  $\beta$  ve skupině MSC zůstaly stabilní po celou dobu experimentu. IL-1  $\beta$  je znám jako prozánětlivý cytokin, jehož inhibice může mít pozitivní přínos pro poškozenou míšní tkáň. V myším modelu míšního poškození, myši injektované rekombinantním IL-1  $\beta$  (rIL-1  $\beta$ ) vykazovaly horší lokomoci a sníženou schopnost regenerace axonů. Námi pozorovaná snížená hladina IL-1  $\beta$  mohla přispět k lokomočnímu zlepšení ve shodě se studií zabývající se modelem IL-1  $\beta$ KO myši, které po prodělání míšní léze oproti WT myším vykazovaly lokomoční zlepšení, menší lézi a potlačenou gliovou jizvu (Boato *et al.*, 2013).

IL-4 je brán jako protizánětlivý cytokin. Z tohoto důvodu stabilně se zvyšující hladiny IL-4 u obou NP 14 den po MP mohou pozitivně ovlivnit regeneraci tkáně a vést k zlepšení po MP. U zvířat léčených pomocí MSC byla hladina IL-4 zpočátku naopak snižena a až 28. den se dostala na úroveň ostatních léčených skupin. S IL-4 se pojí enzym arginasa, která může snížit

zánět a tak zlepšit regeneraci po MP (Fenn, Hall, Gensel, Popovich, & Godbout, 2014). IL-4 negativní myší mutanti měli sníženou schopnost regenerace ve srovnání s WT.

Největší rozdíly v imunitní odpovědi mezi aplikovanými buňkami byly v hladinách IL-6 a aktivované formě IL12 (IL12p70). IL-6 zvyšuje zánět po MP. Navíc bylo popsáno, že IL-6 může ovlivnit diferenciaci NP směrem k astrocytům, čímž může přispívat k zvětšení gliové jizvy (Mukaino *et al.*, 2008). Na druhou stranu bylo ukázáno, že jeho vyšší hladiny blokuji sodné napěťově závislé kanály, což může snižovat excitotoxicitu po MP (Lieb *et al.*, 2005). Vysoké hladiny IL-6 byly pozorovány především u potkanů léčených SPC-01 a NP-iPS buňkami. iPS-NP nevykazovaly zvýšenou diferenciaci do astrocytárního fenotypu a tak je možné, že IL-6 má v rámci míšního poranění duální roli a jeho vysoké hladiny nemusí mít jednoznačně negativní účinek. Naopak zvýšená hladina IL-12p70 může hrát i protizánětlivou roli, neboť jeho hladina se po MP přirozeně snižuje (Stammers *et al.*, 2012). Zároveň bylo ukázáno že IL12 se podílí na indukci remyelinizace a de novo neurogenezi (Yaguchi *et al.*, 2008). IL12p70 rovněž snižoval demyelinizaci zprostředkovanou T buňkami v myším modelu roztroušené sklerózy (Zandian *et al.*, 2011). Vysoké hladiny některých cytokinů pozorované po intraspinální aplikaci lidských NP můžou souviset i se skutečností, že se jedná o xenotransplantát.

### **Tvar pórů a modifikace povrchu hydrogelů má zásadní vliv na infiltraci specifických elementů míšní tkáň**

Modifikace povrchu hydrogelu má zásadní vliv na jeho úspěšné osídlení nejen aplikovanými buňkami *in vitro*, ale především specifickými tkáňovými elementy *in vivo*. MP vede mimo jiné i k poškození cévního zásobení, které je zásadní pro distribuci živin a odvod metabolitů (Richardson, Peters, Ennett, & Mooney, 2001). Revaskularizace je komplexní proces zahrnující receptorové proteiny- integriny, které rozpoznávají mimo jiné i prvky extracelulární matrix. Většina integrinů rozeznává RGD peptid podporující buněčnou adhezi. Jeho imobilizace na povrchu materiálů zlepšuje jejich bioadhezivní schopnosti (Vladkova, 2010). Z výsledků naší studie vyplývá, že RGD sekvence je jedním z klíčových faktorů v intenzitě a rychlosti vrůstání

kapilár do prostředí biomateriálu. Oba materiály modifikované RGD sekvencí vykazovaly nejlepší revaskularizaci materiálu bez ohledu na typ pórů. Revaskularizace je zásadní i z hlediska růstu axonů do pórů hydrogelu a zabránění jejich případné retrakci (Iida, Nakagawa, Asano, Fukushima, & Tachi, 2006). Ukazuje se, že vyšší hustota cévních kapilár v místě poranění vede k signifikantnímu lokomočnímu zlepšení po MP (Glaser, Gonzalez, Sadr, & Keirstead, 2006).

Druhou důležitou složkou biokompatibility hydrogelu je velikost a typ pórů. V naší studii porovnávací 4 hydrogely probíhala syntéza materiálů buďto v přítomnosti pevného porogenu, čímž vznikla struktura materiálu podobná labyrintu pavoučích sítí (Fig. 19). pHPMA materiál připravený heterofázovou separací se skládal z globulárních mikro-partikulí, které během polymerace vytvářely mezi partikulární prostor, jenž tvořil základ póru. Oba typy struktur byly hodnoceny v předchozích studiích (Hejcl *et al.*, 2010; Woerly, Doan, Evans-Martin *et al.*, 2001; Woerly, Doan, Sosa, de Vellis, & Espinosa, 2001; Woerly *et al.*, 1999). Z výsledků našeho srovnání vyplývá, že oba typy pHPMA-SP hydrogelu vykazovaly vyšší procento vrůstání axonů do periferních i centrálních částí biomateriálu. pHEMA- MOETACl hydrogel, přestože je rovněž syntetizován v přítomnosti pevného porogenu, nepodporoval růst axonů a výsledky byly srovnatelné s pHPMA-HS-RGD hydrogelem. Oba typy pHPMA-SP hydrogelů byly méně vyplněné pojivovou tkání v porovnání s pHEMA-MOETACl a pHPMA-HS-RGD. Infiltrace míšní tkáně pojivovou tkání a molekulami extracelulární matrix může mít negativní vliv na růst axonů například zaplněním adhezivních míst, snižováním celkového objemu pórů, či v některých případech bránit růstu pomocí inhibičních molekul (Condic & Lemons, 2002; Hellal *et al.*, 2011; Hermanns, Klapka, Gasis, & Muller, 2006).

### **Vliv buněčné terapie na navrácení lokomoční funkce po MP.**

Zachování nebo zlepšení sensorimotorických funkcí jsou hlavním cílem všech experimentálních i klinických terapií míšního poranění. Doposud však žádná z klinických či experimentálních léčeb nedosáhla plného navrácení lokomočních a sensorických funkcí. Základním předpokladem navrácení funkce je alespoň částečné zachování nepoškozené tkáně.



Již 10% zachované tkáně může významně zlepšit neurologický deficit. A proto se většina terapií zprvu zaměřuje na takzvaný „rescue“ efekt, tedy na snížení rozvoje léze, které v důsledku vede k lepšímu zachování míšní tkáně. Aplikace růstových a anti-apoptotických faktorů jednorázově nebo opakovaně může zmírnit průběh poranění a v některých případech nastartovat procesy regenerace. Tento efekt však může být pouze přechodný. Použití faktorů, jako jsou FLT3 ligand a G-CSF vedlo k rychlému nástupu lokomočních schopností během prvních dvou týdnů po podání, který byl spojený zároveň s odezněním otoku a přirozenými regeneračními schopnostmi potkana. Takovýto počáteční impuls je velmi důležitý pro překonání prvních bariér sekundárních procesů poranění, avšak není dostatečný pro dlouhodobou regeneraci, kdy se již nastartované mechanismy snaží nahradit, či obejít poškozená spojení a odumřelé buňky. Možnosti zvýšení plasticity systému v podobě samostatné terapie, nebo jako součást kombinované terapie tomu mohou výrazně napomoci. Takovými složkami mohou být například chondroitináza ABC (Barritt *et al.*, 2006; Hyatt *et al.*, 2010), či protilátky proti inhibičním molekulám, jako je NogoA a jeho receptor (Schnell *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010; P. Yu *et al.*, 2008) a jejich vzájemná kombinace (Zhao *et al.*, 2013). Jinou možností zvýšení plasticity systému je dlouhodobý zdroj růstových a anti apoptotických molekul a změna imunitní odpovědi. Takovýmto zdrojem mohou být kmenové buňky. Jednorázová intratékální aplikace hMSC v našem experimentu vedla k podobnému výsledku jako aplikace hematopoetických faktorů i když snížení neurologického deficitu bylo významnější a dlouhodobější. Pro zvýraznění tohoto efektu by bylo zapotřebí opakované implantace MSC, která by mohla vést i k významnějším morfometrickým změnám, jež jsou základem zachování funkce. V případě intraspinalní aplikace NP, které zde dlouhodobě přežívaly, proliferovaly a diferenciovaly, se už efekt výrazně lišil. Oba typy NP vyvolávaly dlouhodobou odpověď tkáně a to jak na úrovni imunitního systému, tak expresí endogenních růstových faktorů. Lepších výsledků bylo dosaženo po aplikaci NP-iPS. Potkani léčení NP-iPS dosahovali nejlepších výsledků v základních tak v pokročilých lokomočních testech. Efektivita NP-iPS je velmi závislá na jejich původu, avšak jejich silný regenerační potenciál je ve shodě s několika pracemi (Kobayashi *et al.*, 2012; Romanyuk *et al.*, 2014; Sareen, Gowing *et al.*, 2014). Horší výsledky SPC-01 buněk,

jejichž aplikace vedla po MP jen k mírnému pozvolnému zlepšení v základním lokomočním testu, jsou pravděpodobně způsobeny nedostatečnou integrací, neboť tyto buňky vytvářely husté a těsné shluky, které jen velmi omezeně komunikovaly s tkání příjemce. SPC-01 buňky však nejsou ojedinělým případem kmenových buněk, které po aplikaci vedou k morfologickým, nikoliv však funkčním změnám po MP (Nutt *et al.*, 2013) Nedostatečná efektivita použití samotných kmenových buněk je zřejmá především u chronických míšních lézí. V takových případech je zapotřebí narušit gliovou jizvu a zvýšit plasticitu systému, V práci Dr. Karimi-Abdolrezaee *et al.* byla před samotnou implantací buněk použita dlouhodobá aplikace chondroitinázy ABC po dobu jednoho týdne. Tento první krok léčby potlačil tvorbu gliové jizvy a připravil permissivní prostředí pro přežívání, diferenciaci a integraci NP v chronicky poškozené míše. Současně s aplikovanými NP byly jednorázově podány stimulační faktory (EGF, bFGF a PDGF), které zvyšovaly potenciál přežití aplikovaných buněk. Aplikované buňky nejen že přežily v MP, ale zároveň migrovaly a zapojovaly se do poškozené míchy a jejich aplikace vedla k lokomočnímu zlepšení v chronické fázi poranění míchy (Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2010) V naší práci zabývající se kombinovanou terapií míšního poranění jsme použili SPC-01 buňky spolu s pHEMA-5HT hydrogelem. Tato kombinovaná léčba přes svůj počáteční pozitivní vliv na míšní tkáň nevykazovala významnější efekt na lokomoční zlepšení po MP. V naší práci testující pHEMA-5HT materiál v kombinaci s SPC-01 buňkami však nebyly použity testy pokročilé lokomoce, jaké byly následně použity u buněčné srovnávací studie, a tudíž ne všechny efekty léčby mohly být detekovány. Ne vždy však kombinovaná terapie přinese synergické výsledky. Experimentální terapie využívající kombinaci MSC a NP pro léčbu míšního poranění v podobě akutně intravenózně implantovaných MSC a subakutně intraspinálně (7 dní po lézi) implantovaných NP, nevykazovala synergistický účinek a její efekt na lokomoční zlepšení se statisticky nelišil od podání samotných NP. Samotné intravenózní podání MSC se signifikantně nelišilo od neléčených potkanů (D. Y. Park *et al.*, 2013). Vyladění jednotlivých prvků kombinované terapie a jejich vzájemná synergie proto i nadále zůstává důležitým cílem ve výzkumu léčby míšního, zvláště pak chronického, poranění.

## Závěry

**1.** Podání kombinace hematopoetických faktorů může stimulovat procesy regenerace v léčbě experimentálního modelu míšního poranění. Kombinace Flt3 ligandu a G-CSF potencuje zachování bílé a šedé hmoty míšní a axonální sprouting, snižuje velikost gliové jizvy, stimuluje migraci buněk krevní řady, které mohou zpomalit rozvoj míšní léze.

**2.** Na preklinickém modelu balonkové kompresní léze jsme ukázali zásadní rozdíly v efektu léčby míšního poranění jednotlivými typy kmenových buněk. Nejvýraznějšího zlepšení lokomočních funkcí jak v základních tak v pokročilých lokomočních testech dosahovala skupina léčená NP-iPS a to nejen vůči kontrole ale i vůči ostatním léčeným skupinám. NP-iPS buňky nejvíce ovlivnily zachování míšní tkáně, tvorbu gliové jizvy a axonální sprouting. Na rozdíl od krátkodobě přežívajících MSC, oba typy neurálních prekursorů dlouhodobě přežívaly a diferenciovaly v místě léze. Největší rozdíl mezi aplikovanými buňkami byl v imunitní odpovědi míšní tkáně po jejich aplikaci. MSC převážně tlumily prozánětlivou slopžku imunitní odpovědi, kdežto oba NP hladiny většiny cytokinů snižovaly, avšak výrazně zvyšovaly hladiny IL6 a IL12p70.

**3.** Ukázali jsme, jak modifikace hydrogelů může významně ovlivnit adhezi, proliferaci a přežití MSC in vitro a in vivo, a tudíž i funkci hydrogelů, jako nosičů kmenových buněk do místa poranění. PHPMA-SP-RGD hydrogel se jevil jako nejvhodnější nosič pro in vivo MSC implantaci do míšní hemisekce, RGD skupina na HEMA materiálu významně ovlivnila vrůstání kapilár do pórů materiálu a polymerace v přítomnosti pevného porogenu, na rozdíl od heterofázové separace, výrazně zvyšovala vrůstání axonů do periferie i centra hydrogelu.

**4.** Kombinace pHEMA-5HT hydrogelu a SPC-01 neurálních prekursorů, nevykazovala plně synergický účinek v léčbě experimentálního modelu hemisekce míchy. SPC-01 buňky přispívaly k zachování míšní tkáně a pHEMA-5HT snižoval tvorbu gliové jizvy. Modifikace povrchu materiálu molekulami serotoninu nevedla ke zvýšenému přežívání a adhezi buněk uvnitř materiálu. Na druhou stranu molekuly serotoninu na povrchu hydrogelu stimulovaly SPC-01 buňky ke zrychlené diferenciaci po dobu jejich přítomnosti v biomateriálu.

## Souhrn

Pokrok v experimentálních terapiích využívajících růstových faktorů, kmenových buněk a biomateriálů v léčbě poškozené míchy, významně přispívá k poznání problematiky míšního poranění a k tvorbě možné budoucí kombinované terapie. Mobilizace kostní dřeně pomocí kombinace Flt3 ligandu a G-CSF snižuje astrogliózu a zvyšuje axonální sprouting, což vede k výraznějšímu zachování míšní tkáně a zlepšení neurologického deficitu ve srovnání s jednotlivými terapiemi. Všechny testované typy kmenových buněk izolovaných z různých zdrojů významně snižují lokomoční deficit způsobený míšním poraněním. Nejvýraznější vliv na navrácení lokomočních schopností byl pozorován u NP-iPS buněk a to především díky jejich dlouhodobému přežívání, interakci s tkání příjemce, snižováním gliové jizvy a modulací imunitní odpovědi. MSC, přes jejich krátkou dobu přežití, snižují hladiny prozánětlivých cytokinů a modulují gliovou jizvu. Nejmenší vliv na motoriku po míšním poranění vykazaly fetální spinální progenitory, které se i přes dlouhodobé přežití a diferenciaci nebyly schopné dostatečně integrovat do tkáně příjemce.

Způsob přípravy hydrogelů na bázi metakrylátu významně ovlivňuje adhezi, růst a přežití MSC *in vitro* a *in vivo*. Na hydrogelech připravených vymýváním pevného porogenu s povrchovou modifikací kladným nábojem (MOETACI) či integriny rozeznávanou RGD sekvencí *in vitro* přežívají MSC ve vysokém počtu. V *in vivo* modelu hemisekce lépe přežívají MSC na HEMA hydrogelu, který je lepším buněčným nosičem. V *in vivo* experimentech byl největší počet axonů a kapilár nalezen v HPMA –SP-RGD hydrogelu a tak pHPMA-SP-RGD materiál spolu MSC může pravděpodobně vést k synergickému efektu v terapii míšního poranění. Kombinace SPC-01 buněk a pHEMA hydrogelu s kovalentně vázanými molekulami serotoninu vedla k přechodným změnám v poraněné míše, ale neprokázala dlouhodobý vliv, který by trvale pozitivně ovlivnil regeneraci míšní tkáně. Kovalentně vázaný serotonin však urychlil diferenciaci NP v hydrogelu.

## Summary

Progress in experimental treatments of spinal cord injury (SCI) utilizing growth factors, stem cells and biomaterials has revealed the pathological mechanisms of the secondary processes and demonstrated the potential of combined therapy for future clinical treatment. The mobilization of bone marrow by the combined application of Flt3 ligand and G-CSF diminishes astrogliosis and increases axonal sprouting and thus leads to more pronounced spinal tissue sparing and neurological improvement when compared with single treatments. All types of stem cells used in this study significantly decreased the locomotor deficit after SCI. The most noticeable impact was observed in the NP-iPS treated group, especially due to their long term survival, interaction with host tissue, their impact on glial scarring and modulation of the immune response. MSCs, despite their short lifetime, decrease the immune response after SCI and modulate glial scar formation. The lowest effectivity on locomotor recovery after SCI was demonstrated by fetal spinal progenitors, which were not capable of sufficient integration into the host tissue, even though they showed long-term survival and differentiation.

The methods used to prepare methacrylate based hydrogels have a significant impact on the adhesion, growth and survival of MSC both, *in vitro* and *in vivo*. The survival of MSCs *in vitro* was noticeably higher in hydrogels prepared by polymerization using the solid porogen washout technique, modified with either a positive charge (MOETACI) or an RGD sequence on their surface, which is recognised by integrins. In *in vivo* models of lateral hemisection, MSC survival improved in the HEMA hydrogel grafted animals, which proves that HEMA-MOETACI gel is a better cell carrier. On the other hand, the highest number of axons and greatest capillary permissive environment *in vivo* was observed in the HPMA-SP-RGD hydrogel. Consequently, HPMA-SP-RGD together with MSCs could potentially lead to a synergistic effect in SCI therapy. A combination of SPC-01 cells and the HEMA hydrogel covalently modified with serotonin molecules led to transient changes in injured spinal cords, but have not shown any long term impact, which would have a permanent effect on spinal tissue

regeneration. Covalently bound serotonin has accelerated the differentiation of NPs within the HEMA hydrogel.

## Reference

- Ahmad, F. U., Wang, M. Y., & Levi, A. D. (2014). Hypothermia for acute spinal cord injury--a review. *World Neurosurg*, *82*(1-2), 207-214.
- Aizawa, Y., Leipzig, N., Zahir, T., & Shoichet, M. (2008). The effect of immobilized platelet derived growth factor AA on neural stem/progenitor cell differentiation on cell-adhesive hydrogels. *Biomaterials*, *29*(35), 4676-4683.
- Alluin, O., Delivet-Mongrain, H., Gauthier, M. K., Fehlings, M. G., Rossignol, S., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2014). Examination of the combined effects of chondroitinase ABC, growth factors and locomotor training following compressive spinal cord injury on neuroanatomical plasticity and kinematics. *PLoS One*, *9*(10), e111072.
- Amemori, T., Romanyuk, N., Jendelova, P., Herynek, V., Turnovcova, K., Prochazka, P., Kapcalova, M., Cocks, G., Price, J., & Sykova, E. (2013). Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. *Stem Cell Res Ther*, *4*(3), 68.
- Arboleda, D., Forostyak, S., Jendelova, P., Marekova, D., Amemori, T., Pivonkova, H., Masinova, K., & Sykova, E. (2011). Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol*, *31*(7), 1113-1122.
- Arima, H., Hanada, M., Hayasaka, T., Masaki, N., Omura, T., Xu, D., Hasegawa, T., Togawa, D., Yamato, Y., Kobayashi, S., Yasuda, T., Matsuyama, Y., & Setou, M. (2014). Blockade of IL-6 signaling by MR16-1 inhibits reduction of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in a mouse model of spinal cord injury. *Neuroscience*, *269*, 1-10.
- Azari, M. F., Profyris, C., Karnezis, T., Bernard, C. C., Small, D. H., Cheema, S. S., Ozturk, E., Hatzinisiriou, I., & Petratos, S. (2006). Leukemia inhibitory factor arrests oligodendrocyte death and demyelination in spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, *65*(9), 914-929.
- Bae, J. S., Jin, H. K., Lee, J. K., Richardson, J. C., & Carter, J. E. (2013). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to the reduction of amyloid-beta deposits and the improvement of synaptic transmission in a mouse model of pre-dementia Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, *10*(5), 524-531.
- Baker, D. E., Harrison, N. J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H. D., Shaw, P. J., Heath, P. R., Holden, H., & Andrews, P. W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol*, *25*(2), 207-215.
- Barnabe-Heider, F., Goritz, C., Sabelstrom, H., Takebayashi, H., Pfrieder, F. W., Meletis, K., & Frisen, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*, *7*(4), 470-482.
- Barritt, A. W., Davies, M., Marchand, F., Hartley, R., Grist, J., Yip, P., McMahon, S. B., & Bradbury, E. J. (2006). Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci*, *26*(42), 10856-10867.
- Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, *12*(1), 1-21.
- Benes, V. (1987). Poranění Míchy. *Avicenum/zdravotnické nakladatelství*.
- Bergethon, P. R., Trinkaus-Randall, V., & Franzblau, C. (1989). Modified hydroxyethylmethacrylate hydrogels as a modelling tool for the study of cell-substratum interactions. *J Cell Sci*, *92* ( Pt 1), 111-121.

- Bethea, J. R., Nagashima, H., Acosta, M. C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A. E., Loor, K., Green, J., & Dietrich, W. D. (1999). Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, *16*(10), 851-863.
- Blesch, A., & Tuszynski, M. H. (2003). Cellular GDNF delivery promotes growth of motor and dorsal column sensory axons after partial and complete spinal cord transections and induces remyelination. *J Comp Neurol*, *467*(3), 403-417.
- Boato, F., Rosenberger, K., Nelissen, S., Geboes, L., Peters, E. M., Nitsch, R., & Hendrix, S. (2013). Absence of IL-1beta positively affects neurological outcome, lesion development and axonal plasticity after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*, *10*, 6.
- Bottai, D., Cigognini, D., Madaschi, L., Adami, R., Nicora, E., Menarini, M., Di Giulio, A. M., & Gorio, A. (2010). Embryonic stem cells promote motor recovery and affect inflammatory cell infiltration in spinal cord injured mice. *Exp Neurol*, *223*(2), 452-463.
- Bracken, M. B. (2012). Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*, *1*, CD001046.
- Brasel, K., McKenna, H. J., Morrissey, P. J., Charrier, K., Morris, A. E., Lee, C. C., Williams, D. E., & Lyman, S. D. (1996). Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood*, *88*(6), 2004-2012.
- Braun, S., Croizat, B., Lagrange, M. C., Warter, J. M., & Poindron, P. (1996). Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures. *J Neurol Sci*, *136*(1-2), 17-23.
- Breslin, K., & Agrawal, D. (2012). The use of methylprednisolone in acute spinal cord injury: a review of the evidence, controversies, and recommendations. *Pediatr Emerg Care*, *28*(11), 1238-1245; quiz 1246-1238.
- Buj-Bello, A., Buchman, V. L., Horton, A., Rosenthal, A., & Davies, A. M. (1995). GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron*, *15*(4), 821-828.
- Buss, A., Pech, K., Kakulas, B. A., Martin, D., Schoenen, J., Noth, J., & Brook, G. A. (2009). NG2 and phosphacan are present in the astroglial scar after human traumatic spinal cord injury. *BMC Neurol*, *9*, 32.
- Cahan, P., & Daley, G. Q. (2013). Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(6), 357-368.
- Caiazzo, M., Giannelli, S., Valente, P., Lignani, G., Carissimo, A., Sessa, A., Colasante, G., Bartolomeo, R., Massimino, L., Ferroni, S., Settembre, C., Benfenati, F., & Broccoli, V. (2015). Direct Conversion of Fibroblasts into Functional Astrocytes by Defined Transcription Factors. *Stem Cell Reports*.
- Callera, F., & do Nascimento, R. X. (2006). Delivery of autologous bone marrow precursor cells into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with spinal cord injury: a preliminary safety study. *Exp Hematol*, *34*(2), 130-131.
- Camand, E., Morel, M. P., Faissner, A., Sotelo, C., & Dusart, I. (2004). Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Eur J Neurosci*, *20*(5), 1161-1176.
- Cao, Q., He, Q., Wang, Y., Cheng, X., Howard, R. M., Zhang, Y., DeVries, W. H., Shields, C. B., Magnuson, D. S., Xu, X. M., Kim, D. H., & Whittemore, S. R. (2010). Transplantation of ciliary neurotrophic factor-expressing adult oligodendrocyte precursor cells promotes remyelination and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci*, *30*(8), 2989-3001.
- Cawsey, T., Dufloy, J., Shannon-Weikert, C., & Gorrie, C. A. (2015). Nestin positive ependymal cells are increased in the human spinal cord after traumatic CNS injury. *J Neurotrauma*.
- Cizkova, D., Novotna, I., Slovinska, L., Vanicky, I., Jergova, S., Rosocha, J., & Radonak, J. (2011). Repetitive intrathecal catheter delivery of bone marrow mesenchymal stromal cells improves functional recovery in a rat model of contusive spinal cord injury. *J Neurotrauma*, *28*(9), 1951-1961.

- Cocks, G., Romanyuk, N., Amemori, T., Jendelova, P., Forostyak, O., Jeffries, A. R., Perfect, L., Thuret, S., Dayanithi, G., Sykova, E., & Price, J. (2013). Conditionally immortalized stem cell lines from human spinal cord retain regional identity and generate functional V2a interneurons and motoneurons. *Stem Cell Res Ther*, 4(3), 69.
- Colak, A., Kelten, B., Sagmanligil, A., Akdemir, O., Karaoglan, A., Sahan, E., Celik, O., & Barut, S. (2008). Tauroursodeoxycholic acid and secondary damage after spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci*, 15(6), 665-671.
- Condic, M. L., & Lemons, M. L. (2002). Extracellular matrix in spinal cord regeneration: getting beyond attraction and inhibition. *Neuroreport*, 13(3), A37-48.
- Costantini, A., Luciani, G., Silvestri, B., Tescione, F., & Branda, F. (2008). Bioactive poly(2-hydroxyethylmethacrylate)/silica gel hybrid nanocomposites prepared by sol-gel process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 86(1), 98-104.
- Cowan, W. M. (2001). Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci*, 24, 551-600.
- Cui, B., Li, E., Yang, B., & Wang, B. (2014). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. *Exp Ther Med*, 7(5), 1233-1236.
- Dai, G., Liu, X., Zhang, Z., Yang, Z., Dai, Y., & Xu, R. (2013). Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. *Brain Res*, 1533, 73-79.
- David, S. (2002). Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury. *Prog Brain Res*, 137, 407-414.
- David, S., & Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*, 12(7), 388-399.
- Delfino-Machin, M., Chipperfield, T. R., Rodrigues, F. S., & Kelsh, R. N. (2007). The proliferating field of neural crest stem cells. *Dev Dyn*, 236(12), 3242-3254.
- Denker, H. W. (2006). Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. *J Med Ethics*, 32(11), 665-671.
- Divani, A. A., Hussain, M. S., Magal, E., Heary, R. F., & Qureshi, A. I. (2007). The use of stem cells' hematopoietic stimulating factors therapy following spinal cord injury. *Ann Biomed Eng*, 35(10), 1647-1656.
- Donovan, W. H. (2007). Donald Munro Lecture. Spinal cord injury--past, present, and future. *J Spinal Cord Med*, 30(2), 85-100.
- Draper, J. S., Moore, H. D., Ruban, L. N., Gokhale, P. J., & Andrews, P. W. (2004). Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 13(4), 325-336.
- Emgard, M., Holmberg, L., Samuelsson, E. B., Bahr, B. A., Falci, S., Seiger, A., & Sundstrom, E. (2009). Human neural precursor cells continue to proliferate and exhibit low cell death after transplantation to the injured rat spinal cord. *Brain Res*, 1278, 15-26.
- Erickson, J. T., Conover, J. C., Borday, V., Champagnat, J., Barbacid, M., Yancopoulos, G., & Katz, D. M. (1996). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci*, 16(17), 5361-5371.
- Estrada, V., Brazda, N., Schmitz, C., Heller, S., Blazyca, H., Martini, R., & Muller, H. W. (2014). Long-lasting significant functional improvement in chronic severe spinal cord injury following scar resection and polyethylene glycol implantation. *Neurobiol Dis*, 67, 165-179.
- Eva, R., & Fawcett, J. (2014). Integrin signalling and traffic during axon growth and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 27, 179-185.
- Fathali, N., Lekic, T., Zhang, J. H., & Tang, J. (2010). Long-term evaluation of granulocyte-colony stimulating factor on hypoxic-ischemic brain damage in infant rats. *Intensive Care Med*, 36(9), 1602-1608.



- Fawcett, J. W., & Asher, R. A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, 49(6), 377-391.
- Fehlings, M. G., Rabin, D., Sears, W., Cadotte, D. W., & Aarabi, B. (2010). Current practice in the timing of surgical intervention in spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, 35(21 Suppl), S166-173.
- Feldman, E. L., Boulis, N. M., Hur, J., Johe, K., Rutkove, S. B., Federici, T., Polak, M., Bordeau, J., Sakowski, S. A., & Glass, J. D. (2014). Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: phase 1 trial outcomes. *Ann Neurol*, 75(3), 363-373.
- Fenn, A. M., Hall, J. C., Gensel, J. C., Popovich, P. G., & Godbout, J. P. (2014). IL-4 signaling drives a unique arginase+/IL-1beta+ microglia phenotype and recruits macrophages to the inflammatory CNS: consequences of age-related deficits in IL-4Ralpha after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 34(26), 8904-8917.
- Forostyak, S., Homola, A., Turnovcova, K., Svitil, P., Jendelova, P., & Sykova, E. (2014). Intrathecal Delivery of Mesenchymal Stromal Cells Protects the Structure of Altered Perineuronal Nets in SOD1 Rats and Amends the Course of ALS. *Stem Cells*, 32(12), 3163-3172.
- Fortun, J., Puzis, R., Pearse, D. D., Gage, F. H., & Bunge, M. B. (2009). Muscle injection of AAV-NT3 promotes anatomical reorganization of CST axons and improves behavioral outcome following SCI. *J Neurotrauma*, 26(7), 941-953.
- Friedman, J. A., Windebank, A. J., Moore, M. J., Spinner, R. J., Currier, B. L., & Yaszemski, M. J. (2002). Biodegradable polymer grafts for surgical repair of the injured spinal cord. *Neurosurgery*, 51(3), 742-751; discussion 751-742.
- Gal, P., Kravcukova, P., Mokry, M., & Kluchova, D. (2009). Chemokines as possible targets in modulation of the secondary damage after acute spinal cord injury: a review. *Cell Mol Neurobiol*, 29(6-7), 1025-1035.
- Gao, S., Mao, F., Zhang, B., Zhang, L., Zhang, X., Wang, M., Yan, Y., Yang, T., Zhang, J., Zhu, W., Qian, H., & Xu, W. (2014). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor-kappaB and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Exp Biol Med (Maywood)*, 239(3), 366-375.
- Garcia-Alias, G., Petrosyan, H. A., Schnell, L., Horner, P. J., Bowers, W. J., Mendell, L. M., Fawcett, J. W., & Arvanian, V. L. (2011). Chondroitinase ABC combined with neurotrophin NT-3 secretion and NR2D expression promotes axonal plasticity and functional recovery in rats with lateral hemisection of the spinal cord. *J Neurosci*, 31(49), 17788-17799.
- Glaser, J., Gonzalez, R., Sadr, E., & Keirstead, H. S. (2006). Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces apoptosis and increases axon sprouting after spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 84(4), 724-734.
- Goldstein, L. B. (1997). Effects of bilateral and unilateral locus coeruleus lesions on beam-walking recovery after subsequent unilateral sensorimotor cortex suction-ablation in the rat. *Restor Neurol Neurosci*, 11(1), 55-63.
- Gorio, A., Gokmen, N., Erbayraktar, S., Yilmaz, O., Madaschi, L., Cichetti, C., Di Giulio, A. M., Vardar, E., Cerami, A., & Brines, M. (2002). Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14), 9450-9455.
- Guadagno, J., Xu, X., Karajgikar, M., Brown, A., & Cregan, S. P. (2013). Microglia-derived TNFalpha induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma. *Cell Death Dis*, 4, e538.
- Guan, J., Hong, Y., Ma, Z., & Wagner, W. R. (2008). Protein-reactive, thermoresponsive copolymers with high flexibility and biodegradability. *Biomacromolecules*, 9(4), 1283-1292.

- Guvendiren, M., & Burdick, J. A. (2010). The control of stem cell morphology and differentiation by hydrogel surface wrinkles. *Biomaterials*, 31(25), 6511-6518.
- Hammer, J., Han, L. H., Tong, X., & Yang, F. (2014). A facile method to fabricate hydrogels with microchannel-like porosity for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*, 20(2), 169-176.
- Hansebout, R. R., & Hansebout, C. R. (2014). Local cooling for traumatic spinal cord injury: outcomes in 20 patients and review of the literature. *J Neurosurg Spine*, 20(5), 550-561.
- Hawryluk, G. W., Mothe, A. J., Chamankhah, M., Wang, J., Tator, C., & Fehlings, M. G. (2012). In vitro characterization of trophic factor expression in neural precursor cells. *Stem Cells Dev*, 21(3), 432-447.
- Hawryluk, G. W., Spano, S., Chew, D., Wang, S., Erwin, M., Chamankhah, M., Forgiione, N., & Fehlings, M. G. (2014). An examination of the mechanisms by which neural precursors augment recovery following spinal cord injury: a key role for remyelination. *Cell Transplant*, 23(3), 365-380.
- Hejcl, A., Lesny, P., Pradny, M., Sedy, J., Zamecnik, J., Jendelova, P., Michalek, J., & Sykova, E. (2009). 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*, 20(7), 1571-1577.
- Hejcl, A., Ruzicka, J., Kapcalova, M., Turnovcova, K., Krumbholcova, E., Pradny, M., Michalek, J., Cihlar, J., Jendelova, P., & Sykova, E. (2013). Adjusting the chemical and physical properties of hydrogels leads to improved stem cell survival and tissue ingrowth in spinal cord injury reconstruction: a comparative study of four methacrylate hydrogels. *Stem Cells Dev*, 22(20), 2794-2805.
- Hejcl, A., Sedy, J., Kapcalova, M., Toro, D. A., Amemori, T., Lesny, P., Likavcanova-Masinova, K., Krumbholcova, E., Pradny, M., Michalek, J., Burian, M., Hajek, M., Jendelova, P., & Sykova, E. (2010). HPMa-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *Stem Cells Dev*, 19(10), 1535-1546.
- Hejcl, A., Urdzikova, L., Sedy, J., Lesny, P., Pradny, M., Michalek, J., Burian, M., Hajek, M., Zamecnik, J., Jendelova, P., & Sykova, E. (2008). Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine*, 8(1), 67-73.
- Hellal, F., Hurtado, A., Ruschel, J., Flynn, K. C., Laskowski, C. J., Umlauf, M., Kapitein, L. C., Strikis, D., Lemmon, V., Bixby, J., Hoogenraad, C. C., & Bradke, F. (2011). Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury. *Science*, 331(6019), 928-931.
- Hermanns, S., Klapka, N., Gasis, M., & Muller, H. W. (2006). The collagenous wound healing scar in the injured central nervous system inhibits axonal regeneration. *Adv Exp Med Biol*, 557, 177-190.
- Heumann, R., Lindholm, D., Bandtlow, C., Meyer, M., Radeke, M. J., Misko, T. P., Shooter, E., & Thoenen, H. (1987). Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(23), 8735-8739.
- Hiebert, G. W., Khodarahmi, K., McGraw, J., Steeves, J. D., & Tetzlaff, W. (2002). Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant. *J Neurosci Res*, 69(2), 160-168.
- Hoffman, A. S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 54(1), 3-12.
- Holubcova, Z., Matula, P., Sedlackova, M., Vinarsky, V., Dolezalova, D., Barta, T., Dvorak, P., & Hampl, A. (2011). Human embryonic stem cells suffer from centrosomal amplification. *Stem Cells*, 29(1), 46-56.

- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, *24*, 677-736.
- Huang, W. L., George, K. J., Ibba, V., Liu, M. C., Averill, S., Quartu, M., Hamlyn, P. J., & Priestley, J. V. (2007). The characteristics of neuronal injury in a static compression model of spinal cord injury in adult rats. *Eur J Neurosci*, *25*(2), 362-372.
- Huang, X., Choi, J. K., Park, S. R., Ha, Y., Park, H., Yoon, S. H., Park, H. C., Park, J. O., & Choi, B. H. (2007). GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins. *Neurosci Res*, *58*(1), 50-57.
- Huang, X., Kim, J. M., Kong, T. H., Park, S. R., Ha, Y., Kim, M. H., Park, H., Yoon, S. H., Park, H. C., Park, J. O., Min, B. H., & Choi, B. H. (2009). GM-CSF inhibits glial scar formation and shows long-term protective effect after spinal cord injury. *J Neurol Sci*, *277*(1-2), 87-97.
- Hyatt, A. J., Wang, D., Kwok, J. C., Fawcett, J. W., & Martin, K. R. (2010). Controlled release of chondroitinase ABC from fibrin gel reduces the level of inhibitory glycosaminoglycan chains in lesioned spinal cord. *J Control Release*, *147*(1), 24-29.
- Chang, D. J., Lee, N., Park, I. H., Choi, C., Jeon, I., Kwon, J., Oh, S. H., Shin, D. A., Do, J. T., Lee, D. R., Lee, H., Moon, H., Hong, K. S., Daley, G. Q., & Song, J. (2013). Therapeutic potential of human induced pluripotent stem cells in experimental stroke. *Cell Transplant*, *22*(8), 1427-1440.
- Chen, G., Hu, Y. R., Wan, H., Xia, L., Li, J. H., Yang, F., Qu, X., Wang, S. G., & Wang, Z. C. (2010). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells and Schwann cells. *Chin Med J (Engl)*, *123*(17), 2424-2431.
- Chen, W. F., Jean, Y. H., Sung, C. S., Wu, G. J., Huang, S. Y., Ho, J. T., Su, T. M., & Wen, Z. H. (2008). Intrathecally injected granulocyte colony-stimulating factor produced neuroprotective effects in spinal cord ischemia via the mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *Neuroscience*, *153*(1), 31-43.
- Cheng, I., Mayle, R. E., Cox, C. A., Park, D. Y., Smith, R. L., Corcoran-Schwartz, I., Ponnusamy, K. E., Oshory, R., Smuck, M. W., Mitra, R., Kharazi, A. I., & Carragee, E. J. (2012). Functional assessment of the acute local and distal transplantation of human neural stem cells after spinal cord injury. *Spine J*, *12*(11), 1040-1044.
- Chernykh, E. R., Stupak, V. V., Muradov, G. M., Sizikov, M. Y., Shevela, E. Y., Leplina, O. Y., Tikhonova, M. A., Kulagin, A. D., Lisukov, I. A., Ostanin, A. A., & Kozlov, V. A. (2007). Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. *Bull Exp Biol Med*, *143*(4), 543-547.
- Cho, Y., & Cavalli, V. (2012). HDAC5 is a novel injury-regulated tubulin deacetylase controlling axon regeneration. *EMBO J*, *31*(14), 3063-3078.
- Christensen, M. D., & Hulsebosch, C. E. (1997). Chronic central pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, *14*(8), 517-537.
- Iida, T., Nakagawa, M., Asano, T., Fukushima, C., & Tachi, K. (2006). Free vascularized lateral femoral cutaneous nerve graft with anterolateral thigh flap for reconstruction of facial nerve defects. *J Reconstr Microsurg*, *22*(5), 343-348.
- Iwasaki, M., Wilcox, J. T., Nishimura, Y., Zweckberger, K., Suzuki, H., Wang, J., Liu, Y., Karadimas, S. K., & Fehlings, M. G. (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), 2617-2629.
- Iwashita, Y., Kawaguchi, S., & Murata, M. (1994). Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature*, *367*(6459), 167-170.
- Jendelova, P., Herynek, V., Urdzikova, L., Glogarova, K., Kroupova, J., Andersson, B., Bryja, V., Burian, M., Hajek, M., & Sykova, E. (2004). Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res*, *76*(2), 232-243.

- Jia, X., & Kiick, K. L. (2009). Hybrid multicomponent hydrogels for tissue engineering. *Macromol Biosci*, *9*(2), 140-156.
- Jung, J. P., Nagaraj, A. K., Fox, E. K., Rudra, J. S., Devgun, J. M., & Collier, J. H. (2009). Co-assembling peptides as defined matrices for endothelial cells. *Biomaterials*, *30*(12), 2400-2410.
- Karamouzian, S., Nematollahi-Mahani, S. N., Nakhaee, N., & Eskandary, H. (2012). Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. *Clin Neurol Neurosurg*, *114*(7), 935-939.
- Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Wang, J., Morshead, C. M., & Fehlings, M. G. (2006). Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci*, *26*(13), 3377-3389.
- Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Wang, J., Schut, D., & Fehlings, M. G. (2010). Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *J Neurosci*, *30*(5), 1657-1676.
- Kataoka, K., Suzuki, Y., Kitada, M., Ohnishi, K., Suzuki, K., Tanihara, M., Ide, C., Endo, K., & Nishimura, Y. (2001). Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats. *J Biomed Mater Res*, *54*(3), 373-384.
- Kerr, C. L., Letzen, B. S., Hill, C. M., Agrawal, G., Thakor, N. V., Sternecker, J. L., Gearhart, J. D., & All, A. H. (2010). Efficient differentiation of human embryonic stem cells into oligodendrocyte progenitors for application in a rat contusion model of spinal cord injury. *Int J Neurosci*, *120*(4), 305-313.
- Khetan, S., & Burdick, J. (2009). Cellular encapsulation in 3D hydrogels for tissue engineering. *J Vis Exp*(32).
- Kim, B. G., Kang, Y. M., Phi, J. H., Kim, Y. H., Hwang, D. H., Choi, J. Y., Ryu, S., Elstner, A. E., Paek, S. H., Wang, K. C., Lee, S. H., Kim, S. U., & Yoon, B. W. (2010). Implantation of polymer scaffolds seeded with neural stem cells in a canine spinal cord injury model. *Cytotherapy*, *12*(6), 841-845.
- Kim, H. M., Hwang, D. H., Lee, J. E., Kim, S. U., & Kim, B. G. (2009). Ex vivo VEGF delivery by neural stem cells enhances proliferation of glial progenitors, angiogenesis, and tissue sparing after spinal cord injury. *PLoS One*, *4*(3), e4987.
- Kishk, N. A., Gabr, H., Hamdy, S., Afifi, L., Abokresha, N., Mahmoud, H., Wafaie, A., & Bilal, D. (2010). Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*, *24*(8), 702-708.
- Klussmann, S., & Martin-Villalba, A. (2005). Molecular targets in spinal cord injury. *J Mol Med (Berl)*, *83*(9), 657-671.
- Kobayashi, Y., Okada, Y., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Yasuda, A., Nori, S., Hikishima, K., Konomi, T., Fujiyoshi, K., Tsuji, O., Toyama, Y., Yamanaka, S., Nakamura, M., & Okano, H. (2012). Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One*, *7*(12), e52787.
- Koda, M., Nishio, Y., Kamada, T., Someya, Y., Okawa, A., Mori, C., Yoshinaga, K., Okada, S., Moriya, H., & Yamazaki, M. (2007). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res*, *1149*, 223-231.
- Kolar, M. K., Kingham, P. J., Novikova, L. N., Wiberg, M., & Novikov, L. N. (2014). The therapeutic effects of human adipose-derived stem cells in a rat cervical spinal cord injury model. *Stem Cells Dev*, *23*(14), 1659-1674.
- Kozubenko, N., Turnovcova, K., Kapcalova, M., Butenko, O., Anderova, M., Rusnakova, V., Kubista, M., Hampl, A., Jendelova, P., & Sykova, E. (2010). Analysis of in vitro and in

- vivo characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Transplant*, 19(4), 471-486.
- Kroner, A., Greenhalgh, A. D., Zarruk, J. G., Passos Dos Santos, R., Gaestel, M., & David, S. (2014). TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron*, 83(5), 1098-1116.
- Krsko, P., McCann, T. E., Thach, T. T., Laabs, T. L., Geller, H. M., & Libera, M. R. (2009). Length-scale mediated adhesion and directed growth of neural cells by surface-patterned poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomaterials*, 30(5), 721-729.
- Kruta, M., Seneklova, M., Raska, J., Salykin, A., Zerkankova, L., Pesl, M., Bartova, E., Franek, M., Baumeisterova, A., Koskova, S., Neelsen, K. J., Hampl, A., Dvorak, P., & Rotrekl, V. (2014). Mutation frequency dynamics in HPRT locus in culture-adapted human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells correspond to their differentiated counterparts. *Stem Cells Dev*, 23(20), 2443-2454.
- Kubinova, S., Horak, D., Hejcl, A., Plichta, Z., Kotek, J., Proks, V., Forostyak, S., & Sykova, E. (2013). SIKVAV-modified highly superporous PHEMA scaffolds with oriented pores for spinal cord injury repair. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Kubinova, S., Horak, D., Kozubenko, N., Vanecek, V., Proks, V., Price, J., Cocks, G., & Sykova, E. (2010). The use of superporous Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified PHEMA scaffolds to promote cell adhesion and the differentiation of human fetal neural precursors. *Biomaterials*, 31(23), 5966-5975.
- Kubinova, S., Horak, D., & Sykova, E. (2009). Cholesterol-modified superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 30(27), 4601-4609.
- Kubinova, S., Horak, D., Vanecek, V., Plichta, Z., Proks, V., & Sykova, E. (2014). The use of new surface-modified poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels in tissue engineering: treatment of the surface with fibronectin subunits versus Ac-CGGASIKVAVS-OH, cysteine, and 2-mercaptoethanol modification. *J Biomed Mater Res A*, 102(7), 2315-2323.
- Kumagai, G., Okada, Y., Yamane, J., Nagoshi, N., Kitamura, K., Mukaino, M., Tsuji, O., Fujiyoshi, K., Katoh, H., Okada, S., Shibata, S., Matsuzaki, Y., Toh, S., Toyama, Y., Nakamura, M., & Okano, H. (2009). Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One*, 4(11), e7706.
- Kuo, H. S., Tsai, M. J., Huang, M. C., Chiu, C. W., Tsai, C. Y., Lee, M. J., Huang, W. C., Lin, Y. L., Kuo, W. C., & Cheng, H. (2011). Acid fibroblast growth factor and peripheral nerve grafts regulate Th2 cytokine expression, macrophage activation, polyamine synthesis, and neurotrophin expression in transected rat spinal cords. *J Neurosci*, 31(11), 4137-4147.
- Kwok, J. C., Afshari, F., Garcia-Alias, G., & Fawcett, J. W. (2008). Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor Neurol Neurosci*, 26(2-3), 131-145.
- Kwon, B. K., Tetzlaff, W., Grauer, J. N., Beiner, J., & Vaccaro, A. R. (2004). Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J*, 4(4), 451-464.
- LaPlaca, M. C., Simon, C. M., Prado, G. R., & Cullen, D. K. (2007). CNS injury biomechanics and experimental models. *Prog Brain Res*, 161, 13-26.
- Lau, S., Rylander Ottosson, D., Jakobsson, J., & Parmar, M. (2014). Direct neural conversion from human fibroblasts using self-regulating and nonintegrating viral vectors. *Cell Rep*, 9(5), 1673-1680.
- Lee, H., McKeon, R. J., & Bellamkonda, R. V. (2010). Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(8), 3340-3345.
- Lee, H. J., Kim, K. S., Kim, E. J., Choi, H. B., Lee, K. H., Park, I. H., Ko, Y., Jeong, S. W., & Kim, S. U. (2007). Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes

- functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. *Stem Cells*, 25(5), 1204-1212.
- Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M., & McKay, R. D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 18(6), 675-679.
- Lee, Y., Lee, S., Lee, S. R., Park, K., Hong, Y., Lee, M., Park, S., Jin, Y., & Chang, K. T. (2014). Beneficial effects of melatonin combined with exercise on endogenous neural stem/progenitor cells proliferation after spinal cord injury. *Int J Mol Sci*, 15(2), 2207-2222.
- Lee, Y. B., Polio, S., Lee, W., Dai, G., Menon, L., Carroll, R. S., & Yoo, S. S. (2010). Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture. *Exp Neurol*, 223(2), 645-652.
- Lesny, P., De Croos, J., Pradny, M., Vacik, J., Michalek, J., Woerly, S., & Sykova, E. (2002). Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. *J Chem Neuroanat*, 23(4), 243-247.
- Lesny, P., Pradny, M., Jendelova, P., Michalek, J., Vacik, J., & Sykova, E. (2006). Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 4: growth of rat bone marrow stromal cells in three-dimensional hydrogels with positive and negative surface charges and in polyelectrolyte complexes. *J Mater Sci Mater Med*, 17(9), 829-833.
- Liang, P., Liu, J., Xiong, J., Liu, Q., Zhao, J., Liang, H., Zhao, L., & Tang, H. (2014). Neural stem cell-conditioned medium protects neurons and promotes propriospinal neurons relay neural circuit reconnection after spinal cord injury. *Cell Transplant*, 23 Suppl 1, S45-56.
- Lieb, E., Hacker, M., Tessmar, J., Kunz-Schughart, L. A., Fiedler, J., Dahmen, C., Hersel, U., Kessler, H., Schulz, M. B., & Gopferich, A. (2005). Mediating specific cell adhesion to low-adhesive diblock copolymers by instant modification with cyclic RGD peptides. *Biomaterials*, 26(15), 2333-2341.
- Liebl, D. J., Huang, W., Young, W., & Parada, L. F. (2001). Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord. *Exp Neurol*, 167(1), 15-26.
- Liu, C. N., & Chambers, W. W. (1958). Intrasprouting of dorsal root axons; development of new collaterals and preterminals following partial denervation of the spinal cord in the cat. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 79(1), 46-61.
- Liu, J. F., Chen, Y. M., Yang, J. J., Kurokawa, T., Kakugo, A., Yamamoto, K., & Gong, J. P. (2011). Dynamic behavior and spontaneous differentiation of mouse embryoid bodies on hydrogel substrates of different surface charge and chemical structures. *Tissue Eng Part A*, 17(17-18), 2343-2357.
- Liu, K., Tedeschi, A., Park, K. K., & He, Z. (2011). Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. *Annu Rev Neurosci*, 34, 131-152.
- Liu, X. Z., Xu, X. M., Hu, R., Du, C., Zhang, S. X., McDonald, J. W., Dong, H. X., Wu, Y. J., Fan, G. S., Jacquin, M. F., Hsu, C. Y., & Choi, D. W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 17(14), 5395-5406.
- Londono, R., & Badyrak, S. F. (2015). Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. *Ann Biomed Eng*.
- Lu, P., Blesch, A., & Tuszynski, M. H. (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res*, 77(2), 174-191.
- Luan, Z., Qu, S., Du, K., Liu, W., Yang, Y., Wang, Z., Cui, Y., & Du, Q. (2013). Neural stem/progenitor cell transplantation for cortical visual impairment in neonatal brain injured patients. *Cell Transplant*, 22 Suppl 1, S101-112.
- Luo, J., Zhang, H. T., Jiang, X. D., Xue, S., & Ke, Y. Q. (2009). Combination of bone marrow stromal cell transplantation with mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes functional recovery after spinal cord transection. *Acta Neurochir (Wien)*, 151(11), 1483-1492.

- Lv, J., Xu, R. X., Jiang, X. D., Lu, X., Ke, Y. Q., Cai, Y. Q., Du, M. X., Hu, C., Zou, Y. X., Qin, L. S., & Zeng, Y. J. (2010). Passive immunization with LINGO-1 polyclonal antiserum afforded neuroprotection and promoted functional recovery in a rat model of spinal cord injury. *Neuroimmunomodulation*, *17*(4), 270-278.
- Mahdi, S.-A., & Vafa, R.-M. (2014). *Animal Models in Traumatic Spinal Cord Injury*.
- Mann, C. M., Lee, J. H., Hillyer, J., Stammers, A. M., Tetzlaff, W., & Kwon, B. K. (2010). Lack of robust neurologic benefits with simvastatin or atorvastatin treatment after acute thoracic spinal cord contusion injury. *Exp Neurol*, *221*(2), 285-295.
- Matheson, C. R., Carnahan, J., Urich, J. L., Bocangel, D., Zhang, T. J., & Yan, Q. (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. *J Neurobiol*, *32*(1), 22-32.
- McDonald, J. W., & Belegu, V. (2006). Demyelination and remyelination after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, *23*(3-4), 345-359.
- Meletis, K., Barnabe-Heider, F., Carlen, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., & Frisen, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol*, *6*(7), e182.
- Mendell, L. M., & Arvanian, V. L. (2002). Diversity of neurotrophin action in the postnatal spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev*, *40*(1-3), 230-239.
- Menezes, K., Nascimento, M. A., Goncalves, J. P., Cruz, A. S., Lopes, D. V., Curzio, B., Bonamino, M., de Menezes, J. R., Borojevic, R., Rossi, M. I., & Coelho-Sampaio, T. (2014). Human mesenchymal cells from adipose tissue deposit laminin and promote regeneration of injured spinal cord in rats. *PLoS One*, *9*(5), e96020.
- Mikami, Y., Okano, H., Sakaguchi, M., Nakamura, M., Shimazaki, T., Okano, H. J., Kawakami, Y., Toyama, Y., & Toda, M. (2004). Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *J Neurosci Res*, *76*(4), 453-465.
- Miltiadous, P., Stamatakis, A., & Stylianopoulou, F. (2010). Neuroprotective effects of IGF-I following kainic acid-induced hippocampal degeneration in the rat. *Cell Mol Neurobiol*, *30*(3), 347-360.
- Mirella, M., Andrea, F., & Yvan, T. (2011). *Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases*.
- Mokos, Z. B., & Mosler, E. L. (2014). Advances in a rapidly emerging field of hair follicle stem cell research. *Coll Antropol*, *38*(1), 373-378.
- Mothe, A. J., Tam, R. Y., Zahir, T., Tator, C. H., & Shoichet, M. S. (2013). Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials*, *34*(15), 3775-3783.
- Mukaino, M., Nakamura, M., Okada, S., Toyama, Y., Liu, M., & Okano, H. (2008). [Role of IL-6 in regulation of inflammation and stem cell differentiation in CNS trauma]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, *31*(2), 93-98.
- Namiki, J., Kojima, A., & Tator, C. H. (2000). Effect of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 on functional recovery and regeneration after spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma*, *17*(12), 1219-1231.
- Nandy, S. B., Mohanty, S., Singh, M., Behari, M., & Airan, B. (2014). Fibroblast Growth Factor-2 alone as an efficient inducer for differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into dopaminergic neurons. *J Biomed Sci*, *21*, 83.
- Ning, G., Tang, L., Wu, Q., Li, Y., Zhang, C., & Feng, S. (2013). Human umbilical cord blood stem cells for spinal cord injury: early transplantation results in better local angiogenesis. *Regen Med*, *8*(3), 271-281.
- Novikova, L. N., Mosahebi, A., Wiberg, M., Terenghi, G., Kellerth, J. O., & Novikov, L. N. (2006). Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A*, *77*(2), 242-252.

- Novikova, L. N., Novikov, L. N., & Kellerth, J. O. (2003). Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. *Curr Opin Neurol*, *16*(6), 711-715.
- Nutt, S. E., Chang, E. A., Suhr, S. T., Schlosser, L. O., Mondello, S. E., Moritz, C. T., Cibelli, J. B., & Horner, P. J. (2013). Caudalized human iPSC-derived neural progenitor cells produce neurons and glia but fail to restore function in an early chronic spinal cord injury model. *Exp Neurol*, *248*, 491-503.
- Ogun-Muyiwa, P., Helliwell, R., McIntyre, P., & Winter, J. (1999). Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) regulates VR1 and substance P in cultured sensory neurons. *Neuroreport*, *10*(10), 2107-2111.
- Okano, H., & Sawamoto, K. (2008). Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *363*(1500), 2111-2122.
- Okano, H., & Yamanaka, S. (2014). iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain*, *7*, 22.
- Oliveri, R. S., Bello, S., & Biering-Sorensen, F. (2014). Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiol Dis*, *62*, 338-353.
- Oro, J. J., Gibbs, S. R., & Haghghi, S. S. (1999). Balloon device for experimental graded spinal cord compression in the rat. *J Spinal Disord*, *12*(3), 257-261.
- Ortega-Perez, I., Murray, K., & Lledo, P. M. (2007). The how and why of adult neurogenesis. *J Mol Histol*, *38*(6), 555-562.
- Oudega, M., & Hagg, T. (1999). Neurotrophins promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Brain Res*, *818*(2), 431-438.
- Oudega, M., & Perez, M. A. (2012). Corticospinal reorganization after spinal cord injury. *J Physiol*, *590*(Pt 16), 3647-3663.
- Ousman, S. S., & David, S. (2001). MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, GM-CSF, and TNF- $\alpha$  control the immune cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. *J Neurosci*, *21*(13), 4649-4656.
- Pan, H. C., Cheng, F. C., Lai, S. Z., Yang, D. Y., Wang, Y. C., & Lee, M. S. (2008). Enhanced regeneration in spinal cord injury by concomitant treatment with granulocyte colony-stimulating factor and neuronal stem cells. *J Clin Neurosci*, *15*(6), 656-664.
- Parekkadan, B., & Milwid, J. M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng*, *12*, 87-117.
- Parekkadan, B., & Milwid, J. M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng*, *12*, 87-117.
- Park, D. Y., Mayle, R. E., Smith, R. L., Corcoran-Schwartz, I., Kharazi, A. I., & Cheng, I. (2013). Combined Transplantation of Human Neuronal and Mesenchymal Stem Cells following Spinal Cord Injury. *Global Spine J*, *3*(1), 1-6.
- Park, H. C., Shim, Y. S., Ha, Y., Yoon, S. H., Park, S. R., Choi, B. H., & Park, H. S. (2005). Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Eng*, *11*(5-6), 913-922.
- Parloff, M. B. (1986). Placebo controls in psychotherapy research: a sine qua non or a placebo for research problems? *J Consult Clin Psychol*, *54*(1), 79-87.
- Paterniti, I., Impellizzeri, D., Di Paola, R., Esposito, E., Gladman, S., Yip, P., Priestley, J. V., Michael-Titus, A. T., & Cuzzocrea, S. (2014). Docosahexaenoic acid attenuates the early inflammatory response following spinal cord injury in mice: in-vivo and in-vitro studies. *J Neuroinflammation*, *11*, 6.
- Paul, C., Samdani, A. F., Betz, R. R., Fischer, I., & Neuhuber, B. (2009). Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine (Phila Pa 1976)*, *34*(4), 328-334.



- Peitz, M., Jungverdorben, J., & Brustle, O. (2013). Disease-specific iPSC cell models in neuroscience. *Curr Mol Med*, *13*(5), 832-841.
- Pertici, V., Trimaille, T., Laurin, J., Felix, M. S., Marqueste, T., Pettmann, B., Chauvin, J. P., Gignes, D., & Decherchi, P. (2014). Repair of the injured spinal cord by implantation of a synthetic degradable block copolymer in rat. *Biomaterials*, *35*(24), 6248-6258.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), 143-147.
- Polentes, J., Jendelova, P., Cailleret, M., Braun, H., Romanyuk, N., Tropel, P., Brenot, M., Itier, V., Seminatore, C., Baldauf, K., Turnovcova, K., Jirak, D., Teletin, M., Come, J., Tournois, J., Reymann, K., Sykova, E., Viville, S., & Onteniente, B. (2012). Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. *Cell Transplant*, *21*(12), 2587-2602.
- Pollock, K., Stroemer, P., Patel, S., Stevanato, L., Hope, A., Miljan, E., Dong, Z., Hodges, H., Price, J., & Sinden, J. D. (2006). A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol*, *199*(1), 143-155.
- Priestley, J. V., Ramer, M. S., King, V. R., McMahon, S. B., & Brown, R. A. (2002). Stimulating regeneration in the damaged spinal cord. *J Physiol Paris*, *96*(1-2), 123-133.
- Pritchard, C. D., Slotkin, J. R., Yu, D., Dai, H., Lawrence, M. S., Bronson, R. T., Reynolds, F. M., Teng, Y. D., Woodard, E. J., & Langer, R. S. (2010). Establishing a model spinal cord injury in the African green monkey for the preclinical evaluation of biodegradable polymer scaffolds seeded with human neural stem cells. *J Neurosci Methods*, *188*(2), 258-269.
- Qiu, Z., Farnsworth, S. L., Mishra, A., & Hornsby, P. J. (2013). Patient-specific induced pluripotent stem cells in neurological disease modeling: the importance of nonhuman primate models. *Stem Cells Cloning*, *6*, 19-29.
- Raisman, G. (1978). What hope for repair of the brain? *Ann Neurol*, *3*(2), 101-106.
- Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B., & Mooney, D. J. (2001). Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, *19*(11), 1029-1034.
- Riquelme, P. A., Drapeau, E., & Doetsch, F. (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *363*(1489), 123-137.
- Ritfeld, G. J., Nandoe Tewarie, R. D., Vajn, K., Rahiem, S. T., Hurtado, A., Wendell, D. F., Roos, R. A., & Oudega, M. (2012). Bone marrow stromal cell-mediated tissue sparing enhances functional repair after spinal cord contusion in adult rats. *Cell Transplant*, *21*(7), 1561-1575.
- Rivlin, A. S., & Tator, C. H. (1978). Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol*, *10*(1), 38-43.
- Roman, J. A., Niedzielko, T. L., Haddon, R. C., Parpura, V., & Floyd, C. L. (2011). Single-walled carbon nanotubes chemically functionalized with polyethylene glycol promote tissue repair in a rat model of spinal cord injury. *J Neurotrauma*, *28*(11), 2349-2362.
- Romanyuk, N., Amemori, T., Turnovcova, K., Prochazka, P., Onteniente, B., Sykova, E., & Jendelova, P. (2014). Beneficial effect of human induced pluripotent stem cell-derived neural precursors in spinal cord injury repair. *Cell Transplant*.
- Ronsyn, M. W., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V. F., Jorens, P. G., & Ponsaerts, P. (2008). Can cell therapy heal a spinal cord injury? *Spinal Cord*, *46*(8), 532-539.
- Rowland, J. W., Hawryluk, G. W., Kwon, B., & Fehlings, M. G. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*, *25*(5), E2.
- Ruzicka, J., Romanyuk, N., Hejcl, A., Vetric, M., Hruby, M., Cocks, G., Cihlar, J., Pradny, M., Price, J., Sykova, E., & Jendelova, P. (2013). Treating spinal cord injury in rats with a

- combination of human fetal neural stem cells and hydrogels modified with serotonin. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 73(1), 102-115.
- Saadai, P., Wang, A., Nout, Y. S., Downing, T. L., Lofberg, K., Beattie, M. S., Bresnahan, J. C., Li, S., & Farmer, D. L. (2013). Human induced pluripotent stem cell-derived neural crest stem cells integrate into the injured spinal cord in the fetal lamb model of myelomeningocele. *J Pediatr Surg*, 48(1), 158-163.
- Sabelstrom, H., Stenudd, M., & Frisen, J. (2014). Neural stem cells in the adult spinal cord. *Exp Neurol*, 260, 44-49.
- Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Murao, Y., Suzuki, Y., Fukushima, M., & Ide, C. (2012). Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor Neurol Neurosci*, 30(2), 127-136.
- Sakai, A., Asada, M., Seno, N., & Suzuki, H. (2008). Involvement of neural cell adhesion molecule signaling in glial cell line-derived neurotrophic factor-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 137(2), 378-388.
- Salazar, D. L., Uchida, N., Hamers, F. P., Cummings, B. J., & Anderson, A. J. (2010). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in an early chronic spinal cord injury NOD-scid mouse model. *PLoS One*, 5(8), e12272.
- Salewski, R. P., Mitchell, R. A., Shen, C., & Fehlings, M. G. (2015). Transplantation of neural stem cells clonally derived from embryonic stem cells promotes recovery after murine spinal cord injury. *Stem Cells Dev*, 24(1), 36-50.
- Sancho-Martinez, I., Ocampo, A., & Izpisua Belmonte, J. C. (2014). Reprogramming by lineage specifiers: blurring the lines between pluripotency and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, 28C, 57-63.
- Sareen, D., Gowing, G., Sahabian, A., Staggenborg, K., Paradis, R., Avalos, P., Latter, J., Ornelas, L., Garcia, L., & Svendsen, C. N. (2014). Human induced pluripotent stem cells are a novel source of neural progenitor cells (iNPCs) that migrate and integrate in the rodent spinal cord. *J Comp Neurol*, 522(12), 2707-2728.
- Sareen, D., Saghizadeh, M., Ornelas, L., Winkler, M. A., Narwani, K., Sahabian, A., Funari, V. A., Tang, J., Spurka, L., Punj, V., Maguen, E., Rabinowitz, Y. S., Svendsen, C. N., & Ljubimov, A. V. (2014). Differentiation of human limb-derived induced pluripotent stem cells into limb-like epithelium. *Stem Cells Transl Med*, 3(9), 1002-1012.
- Sarnowska, A., Jablonska, A., Jurga, M., Dainiak, M., Strojek, L., Drela, K., Wright, K., Tripathi, A., Kumar, A., Jungvid, H., Lukomska, B., Forraz, N., McGuckin, C., & Domanska-Janik, K. (2013). Encapsulation of mesenchymal stem cells by bioscaffolds protects cell survival and attenuates neuroinflammatory reaction in injured brain tissue after transplantation. *Cell Transplant*, 22 Suppl 1, S67-82.
- Sekino, Y., Sato, K., Kanda, Y., & Ishida, S. (2013). [Developing and standardizing experimental protocols using human iPS-derived cells to predict adverse drug reactions in pre-clinical safety studies]. *Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*(131), 25-34.
- Sezer, N., Akkus, S., & Ugurlu, F. G. (2015). Chronic complications of spinal cord injury. *World J Orthop*, 6(1), 24-33.
- Shimada, H., Okada, Y., Ibata, K., Ebise, H., Ota, S., Tomioka, I., Nomura, T., Maeda, T., Kohda, K., Yuzaki, M., Sasaki, E., Nakamura, M., & Okano, H. (2012). Efficient derivation of multipotent neural stem/progenitor cells from non-human primate embryonic stem cells. *PLoS One*, 7(11), e49469.
- Schnell, L., Hunanyan, A. S., Bowers, W. J., Horner, P. J., Federoff, H. J., Gullo, M., Schwab, M. E., Mendell, L. M., & Arvanian, V. L. (2011). Combined delivery of Nogo-A antibody, neurotrophin-3 and the NMDA-NR2d subunit establishes a functional 'detour' in the hemisectioned spinal cord. *Eur J Neurosci*, 34(8), 1256-1267.

- Sieber-Blum, M., & Hu, Y. (2008). Epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSC) and pluripotency. *Stem Cell Rev*, 4(4), 256-260.
- Siegel, S. G., Patton, B., & English, A. W. (2000). Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. *Exp Neurol*, 166(2), 205-212.
- Skoff, A. M., Resta, C., Swamydas, M., & Adler, J. E. (2003). Nerve growth factor (NGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) regulate substance P release in adult spinal sensory neurons. *Neurochem Res*, 28(6), 847-854.
- Somo, S. I., Akar, B., Bayrak, E. S., Larson, J. C., Appel, A. A., Mehdizadeh, H., Cinar, A., & Brey, E. M. (2015). Pore Interconnectivity Influences Growth Factor Mediated Vascularization in Sphere Templated Hydrogels. *Tissue Eng Part C Methods*.
- Stammers, A. T., Liu, J., & Kwon, B. K. (2012). Expression of inflammatory cytokines following acute spinal cord injury in a rodent model. *J Neurosci Res*, 90(4), 782-790.
- Stenudd, M., Sabelstrom, H., & Frisen, J. (2015). Role of Endogenous Neural Stem Cells in Spinal Cord Injury and Repair. *JAMA Neurol*.
- Streijger, F., Beernink, T. M., Lee, J. H., Bhatnagar, T., Park, S., Kwon, B. K., & Tetzlaff, W. (2013). Characterization of a cervical spinal cord hemicontusion injury in mice using the infinite horizon impactor. *J Neurotrauma*, 30(10), 869-883.
- Strittmatter, S. (2010). Spinal Cord Regeneration. *Eukaryon* 6, 55-60.
- Su, C., Wang, P., Jiang, C., Ballerini, P., Caciagli, F., Rathbone, M. P., & Jiang, S. (2013). Guanosine promotes proliferation of neural stem cells through cAMP-CREB pathway. *J Biol Regul Homeost Agents*, 27(3), 673-680.
- Su, H., Zhang, W., Yang, X., Qin, D., Sang, Y., Wu, C., Wong, W. M., Yuan, Q., So, K. F., & Wu, W. (2012). Neural progenitor cells generate motoneuron-like cells to form functional connections with target muscles after transplantation into the musculocutaneous nerve. *Cell Transplant*, 21(12), 2651-2663.
- Suzuki, Y., Kitaura, M., Wu, S., Kataoka, K., Suzuki, K., Endo, K., Nishimura, Y., & Ide, C. (2002). Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 318(3), 121-124.
- Sykova, E., Homola, A., Mazanec, R., Lachmann, H., Konradova, S. L., Kobylka, P., Padr, R., Neuwirth, J., Komrska, V., Vavra, V., Stulik, J., & Bojar, M. (2006). Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant*, 15(8-9), 675-687.
- Sykova, E., Jendelova, P., Urdzikova, L., Lesny, P., & Hejcl, A. (2006). Bone marrow stem cells and polymer hydrogels--two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol*, 26(7-8), 1113-1129.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
- Tan, A. M., Zhang, W., & Levine, J. M. (2005). NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J Anat*, 207(6), 717-725.
- Tantrawatpan, C., Manochantr, S., Kheolamai, P., Y, U. P., Supokawej, A., & Issaragrisil, S. (2013). Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells. *J Med Assoc Thai*, 96(9), 1208-1217.
- Tator, C. H., & Fehlings, M. G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, 75(1), 15-26.
- Taylor, D. A. (2009). From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs. *Curr Opin Biotechnol*, 20(5), 598-605.
- Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Sousa, N., & Salgado, A. J. (2013). Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell Mol Life Sci*, 70(20), 3871-3882.

- Teng, Y. D., Lavik, E. B., Qu, X., Park, K. I., Ourednik, J., Zurakowski, D., Langer, R., & Snyder, E. Y. (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(5), 3024-3029.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145-1147.
- Tian, D. S., Dong, Q., Pan, D. J., He, Y., Yu, Z. Y., Xie, M. J., & Wang, W. (2007). Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model. *Brain Res*, *1154*, 206-214.
- Tsai, M. C., Shen, L. F., Kuo, H. S., Cheng, H., & Chak, K. F. (2008). Involvement of acidic fibroblast growth factor in spinal cord injury repair processes revealed by a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*, *7*(9), 1668-1687.
- Tuszynski, M. H., Gabriel, K., Gage, F. H., Suhr, S., Meyer, S., & Rosetti, A. (1996). Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury. *Exp Neurol*, *137*(1), 157-173.
- Tuszynski, M. H., Wang, Y., Graham, L., Gao, M., Wu, D., Brock, J., Blesch, A., Rosenzweig, E. S., Havton, L. A., Zheng, B., Conner, J. M., Marsala, M., & Lu, P. (2014). Neural stem cell dissemination after grafting to CNS injury sites. *Cell*, *156*(3), 388-389.
- Tuszynski, M. H., Wang, Y., Graham, L., McHale, K., Gao, M., Wu, D., Brock, J., Blesch, A., Rosenzweig, E. S., Havton, L. A., Zheng, B., Conner, J. M., Marsala, M., & Lu, P. (2014). Neural stem cells in models of spinal cord injury. *Exp Neurol*, *261C*, 494-500.
- Tyseling-Mattiace, V. M., Sahni, V., Niece, K. L., Birch, D., Czeisler, C., Fehlings, M. G., Stupp, S. I., & Kessler, J. A. (2008). Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury. *J Neurosci*, *28*(14), 3814-3823.
- Urban, N., & Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*, *8*, 396.
- Urdzikova, L., Jendelova, P., Glogarova, K., Burian, M., Hajek, M., & Sykova, E. (2006). 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*, *23*(9), 1379-1391.
- Urdzikova, L. M., Ruzicka, J., LaBagnara, M., Karova, K., Kubinova, S., Jirakova, K., Murali, R., Sykova, E., Jhanwar-Uniyal, M., & Jendelova, P. (2014). Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *Int J Mol Sci*, *15*(7), 11275-11293.
- van den Berg, M. E., Castellote, J. M., de Pedro-Cuesta, J., & Mahillo-Fernandez, I. (2010). Survival after spinal cord injury: a systematic review. *J Neurotrauma*, *27*(8), 1517-1528.
- van den Berg, M. E., Castellote, J. M., Mahillo-Fernandez, I., & de Pedro-Cuesta, J. (2010). Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Neuroepidemiology*, *34*(3), 184-192; discussion 192.
- Vanicky, I., Urdzikova, L., Saganova, K., Cizkova, D., & Galik, J. (2001). A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma*, *18*(12), 1399-1407.
- Velasco, I., Salazar, P., Giorgetti, A., Ramos-Mejia, V., Castano, J., Romero-Moya, D., & Menendez, P. (2014). Concise review: Generation of neurons from somatic cells of healthy individuals and neurological patients through induced pluripotency or direct conversion. *Stem Cells*, *32*(11), 2811-2817.
- Vladkova, T. G. (2010). Surface engineered polymeric biomaterials with improved biocontact properties. *International Journal of Polymer Science*, *2010*, 22.
- Walker, M. J., Walker, C. L., Zhang, Y. P., Shields, L. B., Shields, C. B., & Xu, X. M. (2015). A novel vertebral stabilization method for producing contusive spinal cord injury. *J Vis Exp*(95), e50149.

- Walker, P. A., Letourneau, P. A., Bedi, S., Shah, S. K., Jimenez, F., & Jr, C. S. (2011). Progenitor cells as remote "bioreactors": neuroprotection via modulation of the systemic inflammatory response. *World J Stem Cells*, 3(2), 9-18.
- Wang, J., Sun, J., Tang, Y., Guo, G., Zhou, X., Chen, Y., & Shen, M. (2013). Basic fibroblast growth factor attenuates the degeneration of injured spinal cord motor endplates. *Neural Regen Res*, 8(24), 2213-2224.
- Wang, L., Wei, F. X., Cen, J. S., Ping, S. N., Li, Z. Q., Chen, N. N., Cui, S. B., Wan, Y., & Liu, S. Y. (2014). Early administration of tumor necrosis factor-alpha antagonist promotes survival of transplanted neural stem cells and axon myelination after spinal cord injury in rats. *Brain Res*, 1575, 87-100.
- Wang, W., Yang, T., Liu, L., & Pei, F. (2014). [Proteomics study on effect of basic fibroblast growth factor long circulation liposome on spinal cord traction injury in rats]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 28(11), 1397-1405.
- Wang, X. M., Terman, J. R., & Martin, G. F. (1996). Evidence for growth of supraspinal axons through the lesion after transection of the thoracic spinal cord in the developing opossum *Didelphis virginiana*. *J Comp Neurol*, 371(1), 104-115.
- Watabe, K., Sakamoto, T., Ohashi, T., Kawazoe, Y., Oyanagi, K., Takeshima, T., Inoue, K., Eto, Y., & Kim, S. U. (2001). Adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor to injured adult motoneurons. *Hum Cell*, 14(1), 7-15.
- Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Watanabe, Y., Mizuseki, K., & Sasai, Y. (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci*, 8(3), 288-296.
- Wei, Y. T., He, Y., Xu, C. L., Wang, Y., Liu, B. F., Wang, X. M., Sun, X. D., Cui, F. Z., & Xu, Q. Y. (2010). Hyaluronic acid hydrogel modified with nogo-66 receptor antibody and poly-L-lysine to promote axon regrowth after spinal cord injury. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 95(1), 110-117.
- Wei, Y. T., Tian, W. M., Yu, X., Cui, F. Z., Hou, S. P., Xu, Q. Y., & Lee, I. S. (2007). Hyaluronic acid hydrogels with IKVAV peptides for tissue repair and axonal regeneration in an injured rat brain. *Biomed Mater*, 2(3), S142-146.
- Weishaupt, N., Blesch, A., & Fouad, K. (2012). BDNF: the career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury. *Exp Neurol*, 238(2), 254-264.
- Weishaupt, N., Hurd, C., Wei, D. Z., & Fouad, K. (2013). Reticulospinal plasticity after cervical spinal cord injury in the rat involves withdrawal of projections below the injury. *Exp Neurol*, 247, 241-249.
- Wilcox, J. T., Satkunendrarajah, K., Zuccato, J. A., Nassiri, F., & Fehlings, M. G. (2014). Neural precursor cell transplantation enhances functional recovery and reduces astrogliosis in bilateral compressive/contusive cervical spinal cord injury. *Stem Cells Transl Med*, 3(10), 1148-1159.
- Willerth, S. M., Fixel, T. E., Gottlieb, D. I., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2007). The effects of soluble growth factors on embryonic stem cell differentiation inside of fibrin scaffolds. *Stem Cells*, 25(9), 2235-2244.
- Woerly, S., Doan, V. D., Evans-Martin, F., Paramore, C. G., & Peduzzi, J. D. (2001). Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury. *J Neurosci Res*, 66(6), 1187-1197.
- Woerly, S., Doan, V. D., Sosa, N., de Vellis, J., & Espinosa-Jeffrey, A. (2004). Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *J Neurosci Res*, 75(2), 262-272.
- Woerly, S., Doan, V. D., Sosa, N., de Vellis, J., & Espinosa, A. (2001). Reconstruction of the transected cat spinal cord following NeuroGel implantation: axonal tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies. *Int J Dev Neurosci*, 19(1), 63-83.

- Woerly, S., Petrov, P., Sykova, E., Roitbak, T., Simonova, Z., & Harvey, A. R. (1999). Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies. *Tissue Eng*, 5(5), 467-488.
- Wu, J. C., Huang, W. C., Chen, Y. C., Tu, T. H., Tsai, Y. A., Huang, S. F., Huang, H. C., & Cheng, H. (2011). Acidic fibroblast growth factor for repair of human spinal cord injury: a clinical trial. *J Neurosurg Spine*, 15(3), 216-227.
- Wu, J. C., Huang, W. C., Tsai, Y. A., Chen, Y. C., & Cheng, H. (2008). Nerve repair using acidic fibroblast growth factor in human cervical spinal cord injury: a preliminary Phase I clinical study. *J Neurosurg Spine*, 8(3), 208-214.
- Xiao, L., & Nasu, M. (2014). From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning*, 7, 89-99.
- Yaguchi, M., Ohta, S., Toyama, Y., Kawakami, Y., & Toda, M. (2008). Functional recovery after spinal cord injury in mice through activation of microglia and dendritic cells after IL-12 administration. *J Neurosci Res*, 86(9), 1972-1980.
- Yang, C. C., Shih, Y. H., Ko, M. H., Hsu, S. Y., Cheng, H., & Fu, Y. S. (2008). Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One*, 3(10), e3336.
- Yata, K., Matchett, G. A., Tsubokawa, T., Tang, J., Kanamaru, K., & Zhang, J. H. (2007). Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res*, 1145, 227-238.
- Ye, J., Cao, L., Cui, R., Huang, A., Yan, Z., Lu, C., & He, C. (2004). The effects of ciliary neurotrophic factor on neurological function and glial activity following contusive spinal cord injury in the rats. *Brain Res*, 997(1), 30-39.
- Yoon, S. H., Shim, Y. S., Park, Y. H., Chung, J. K., Nam, J. H., Kim, M. O., Park, H. C., Park, S. R., Min, B. H., Kim, E. Y., Choi, B. H., Park, H., & Ha, Y. (2007). Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells*, 25(8), 2066-2073.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I., & Thomson, J. A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324(5928), 797-801.
- Yu, P., Huang, L., Zou, J., Yu, Z., Wang, Y., Wang, X., Xu, L., Liu, X., Xu, X. M., & Lu, P. H. (2008). Immunization with recombinant Nogo-66 receptor (NgR) promotes axonal regeneration and recovery of function after spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis*, 32(3), 535-542.
- Yu, T. T., & Shoichet, M. S. (2005). Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26(13), 1507-1514.
- Yu, Y. L., Xie, R., Zhang, M. J., Li, P. F., Yang, L., Ju, X. J., & Chu, L. Y. (2010). Monodisperse microspheres with poly(N-isopropylacrylamide) core and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) shell. *J Colloid Interface Sci*, 346(2), 361-369.
- Zandian, M., Mott, K. R., Allen, S. J., Chen, S., Arditi, M., & Ghiasi, H. (2011). IL-2 suppression of IL-12p70 by a recombinant HSV-1 expressing IL-2 induces T-cell auto-reactivity and CNS demyelination. *PLoS One*, 6(2), e16820.
- Zanier, E. R., Pischiutta, F., Riganti, L., Marchesi, F., Turola, E., Fumagalli, S., Perego, C., Parotto, E., Vinci, P., Veglianese, P., D'Amico, G., Verderio, C., & De Simoni, M. G. (2014). Bone marrow mesenchymal stromal cells drive protective M2 microglia polarization after brain trauma. *Neurotherapeutics*, 11(3), 679-695.
- Zhang, Y. K., Liu, J. T., Peng, Z. W., Fan, H., Yao, A. H., Cheng, P., Liu, L., Ju, G., & Kuang, F. (2013). Different TLR4 expression and microglia/macrophage activation induced by hemorrhage in the rat spinal cord after compressive injury. *J Neuroinflammation*, 10, 112.

- Zhao, R. R., Andrews, M. R., Wang, D., Warren, P., Gullo, M., Schnell, L., Schwab, M. E., & Fawcett, J. W. (2013). Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury. *Eur J Neurosci*, *38*(6), 2946-2961.
- Zhou, M., Smith, A. M., Das, A. K., Hodson, N. W., Collins, R. F., Ulijn, R. V., & Gough, J. E. (2009). Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. *Biomaterials*, *30*(13), 2523-2530.
- Zhu, J., Tang, C., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (2009). Design and synthesis of biomimetic hydrogel scaffolds with controlled organization of cyclic RGD peptides. *Bioconjug Chem*, *20*(2), 333-339.