DIFÚZNÍ PARAMETRY CNS U VYBRANÝCH PATOLOGICKÝCH STAVŮ A BUNĚČNÁ TERAPIE MÍŠNÍHO PORANĚNÍ

DIZERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Aleš Homola

UK, 2. lékařská fakulta

Ústav experimentální medicíny AV ČR

Školitelé: Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.

Doc. MUDr. Jan Štulík, CSc.

2008

Chtěl bych poděkovat svým školitelům, Prof. MUDr. Evě Sykové, Dr.Sc., vedoucí Ústavu neurověd 2. lékařské fakulty UK a ředitelce Ústavu experimentální medicíny AV ČR, a Doc. MUDr. Janu Štulíkovi, CSc., primáři Spondylochirurgického oddělení FN Motol, za odborné vedení, pomoc při experimentální i klinické práci a cenné připomínky při přípravě mojí dizertační práce. Můj dík patří rovněž všem pracovníkům Ústavu neurověd, kteří se spolupodíleli na experimentální části této práce a všem, kteří mi pomáhali při korekturách textu. Také bych chtěl poděkovat Doc. MUDr. Martinu Bojarovi, přednostovi Neurologické kliniky FN Motol, za odborné vedení při provádění klinické studie.

OBSAH

1. TABULKA ZKRATEK....5
2. DIFÚZNÍ PARAMETRY CNS U VYBRANÝCH PATOLOGICKÝCH STAVŮ....7
2.1. ÚVOD....7
2.1.1. EXTRACELULÁRNÍ PROSTOR CNS....7
2.1.1.1. DIFÚZE LÁTEK V ECP....8
2.1.1.2. HETEROGENITA A ANIZOTROPIE ECP....9
2.1.1.3. ZMĚNY DIFÚZNÍCH PARAMETRŮ ECP BĚHEM FYZIOLOGICKÝCH A PATOLOGICKÝCH STAVŮ....10
2.1.2. ENERGETICKÝ METABOLISMUS MOZKOVÉ TKÁNĚ....13
2.1.3. GLIOVÉ NÁDORY CNS....16
2.1.4. EXTRACELULÁRNÍ MATRIX....22
2.1.4.1. SLOŽENÍ ECM V CENTRÁLNÍM NERVOVÉM SYSTÉMU....22
2.1.4.2. VLIV MOLEKUL ECM NA FUNKCI GLIOMOVÝCH BUNĚK....26
2.2. OTÁZKY A CÍLE PRÁCE....27
2.3. METODIKA....28
2.3.1. EXPERIMENTÁLNÍ MODELY....28
2.3.2. IONTOVĚ SELEKTIVNÍ MIKROELEKTRODY....28
2.3.3. MĚŘENÍ DIFÚZNÍCH PARAMETRŮ ECP....33
2.3.4. MIKRODIALÝZA....37
2.3.5. PŘÍPRAVA TKÁŇOVÝCH ŘEZŮ A JEJICH HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ....44
2.3.6. IMUNOHISTOCHEMIE....46
2.3.7. STATISTICKÉ HODNOCENÍ....52
2.4. VÝSLEDKY....53
2.4.1. DIFÚZNÍ PARAMETRY ECP BĚHEM TRANZIENTNÍ HYPOXIE/ISCHÉMIE....53
2.4.2. ENERGETICKÝ METABOLISMUS A GLUTAMÁT BĚHEM TRANZIENTNÍ HYPOXIE/ISCHÉMIE....56
2.4.3. DIFÚZNÍ PARAMETRY ECP BĚHEM TRANZIENTNÍ HYPOXIE....59
2.4.4. ENERGETICKÝ METABOLISMUS A GLUTAMÁT BĚHEM TRANZIENTNÍ HYPOXIE..61
2.4.5. DIFÚZNÍ PARAMETRY ECP V GLIOVÝCH NÁDORECH....64
2.4.6. ECM A DIFÚZNÍ BARIÉRY EXTRACELULÁRNÍHO PROSTORU ASTROCYTOMŮ....74
2.5. DISKUZE....84
2.5.1. DIFÚZNÍ PARAMETRY ECP A ENERGETICKÝ METABOLISMUS BĚHEM TRANZIENTNÍ HYPOXIE A HYPOXIE/ISCHÉMIE....84
2.5.2. DIFÚZNÍ PARAMETRY ECP V GLIOVÝCH NÁDORECH....88
2.5.3. EXPRESE MOLEKUL ECM V GLIOVÝCH NÁDORECH....93

2.6. ZÁVĚRY....97

3. KLINICKÁ STUDIE - TRANSPLANTACE AUTOLOGNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ U PACIENTŮ S PORANĚNÍM MÍCHY....99

3.1. ÚVOD....99

3.2. CÍLE STUDIE....106

3.3. METODIKA....107

3.3.1. ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ KOSTNÍ DŘENĚ....107

3.3.2. NEUROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ....109

3.3.3. ELEKTROFYZIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ....111

3.3.4. RADIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ....113

3.4. VÝSLEDKY....114

3.4.1 NEUROLOGICKÉ HODNOCENÍ....115

3.4.2 ELEKTROFYZIOLOGICKÉ HODNOCENÍ....127

3.4.3 RADIOLOGICKÉ HODNOCENÍ....129

3.5. DISKUZE....131

3.6. ZÁVĚRY....136

4. SOUHRN....137

4.1. DIFÚZNÍ PARAMETRY ECP A ENERGETICKÝ METABOLISMUS BĚHEM TRANZIENTNÍ HYPOXIE A HYPOXIE/ISCHÉMIE....137

4.2. DIFÚZNÍ PARAMETRY ECP A EXTRACELULÁRNÍ MATRIX GLIOVÝCH NÁDORŮ MOZKU....138

4.3. AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ U PACIENTŮ S PORANĚNÍM MÍCHY....139

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY....141

6. PUBLIKACE AUTORA....160

1. Tabulka zkratek

ADCw	aparentní difúzní koeficient vody ve tkáni
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule adhezivní molekula aktivovaných leukocytů
ASIA	American Spinal Injury Association
BDNF	brain-derived neurotrophic factor z mozku izolovaný neurotrofický faktor
BMC	bone marrow cells, buňky kostní dřeně
BMCT	bone marrow cells transplantation, transplantace buněk kostní dřeně
CD	cluster of differentiation, povrchové molekuly leukocytů
CNS	centrální nervový systém
D	difúzní koeficient
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermal growth factor, epidermální růstový faktor
FBS	fetal bovine serum, telecí sérum
FGF	fibroblast growth factor, fibroblastový růstový faktor
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor granulocytární kolonie stimulující faktor
GFAP	gliální fibrilární acidický protein
HEMA	2-hydroxyethyl methacrylate
HGF	hepatocyte growth factor, hepatocytární růstový faktor
HPMA	2-hydroxypropyl methacrylamide
ICAM	intercellular cell adhesion molecule, intercelulární adhezivní molekula
IFN	interferon
IL	interleukin
ISM	iontově selektivní mikroelektroda
KB	kmenové buňky
LFA	leukocyte function-associated adhesion molecule leukocytární adhezivní molekula
LIF	leukemia inhibitory factor, leukemii inhibující faktor
LTS	light touch score, taktilní skóre

MEP	motorické evokované potenciály
MIB-1	nejčastěji používaný klon protilátky proti antigenu Ki-67
MNC	mononuclear cells, jednojaderné buňky
MS	motor score, motorické skóre
MRI	magnetic resonance imaging, magnetická rezonance
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor makrofágové kolonie stimulující faktor
MSC	mesenchymal stem cell, mesenchymální kmenové buňky
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study
NC	nuclear cells, jaderné buňky
NGF	nerve growth factor, nervový růstový faktor
NMDA	N-metyl D-aspartát
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PDGF	platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor
PPS	pin prick score, algické skóre
SCF	stem cell factor, faktor kmenových buněk
SDF	stromal cell derived factor, faktor stromálních buněk
SEP	somatosenzorické evokované potenciály
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor
TMA	tetrametylamonium
topo-IIα	fosfo-topoizomeráza II-α
VCAM	vascular cell adhesion molecule, vaskulární adhezivní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor, endoteliální růstový faktor

2. DIFÚZNÍ PARAMETRY CNS U VYBRANÝCH PATOLOGICKÝCH STAVŮ

2.1. ÚVOD

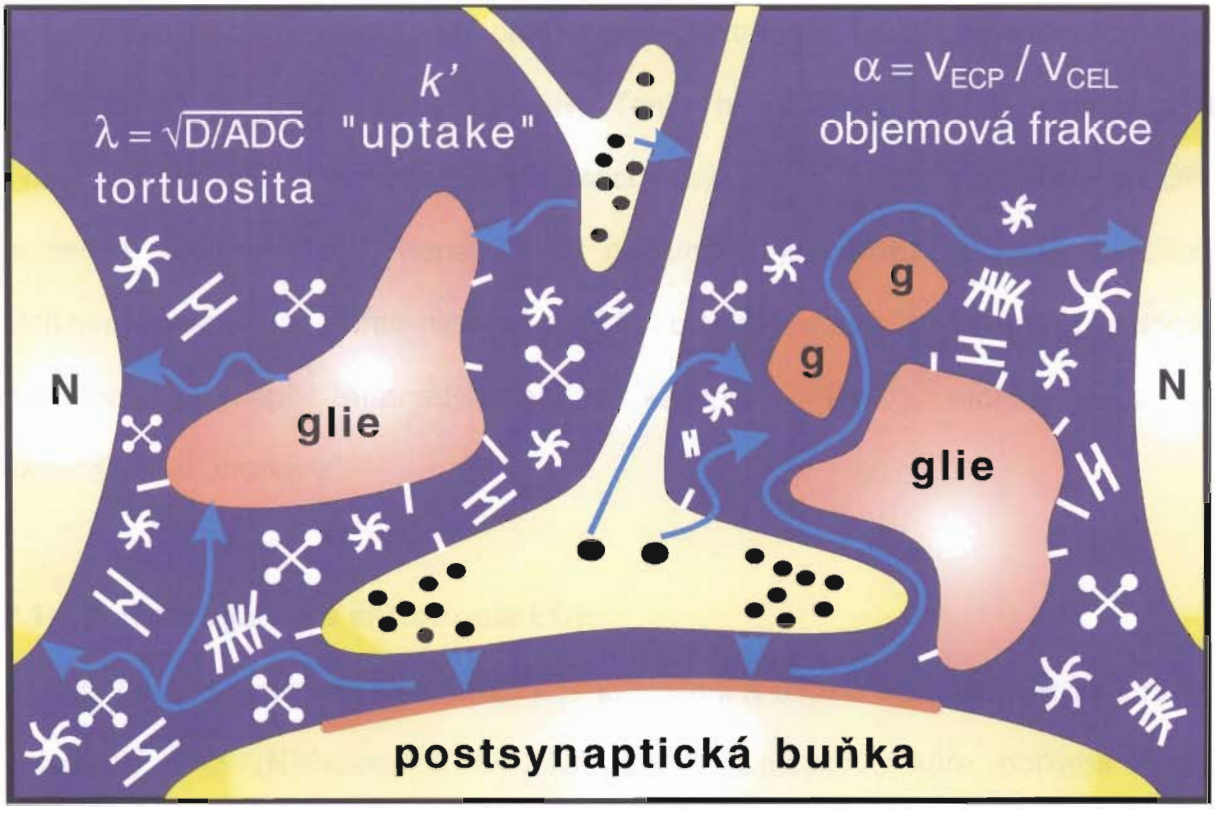
2.1.1. Extracelulární prostor CNS

Extracelulární prostor (ECP) v CNS představuje mikroprostředí, které změnami svého složení (iontů, metabolitů, neuropřenašečů, neuropeptidů, neurohormonů a extracelulární matrix) a své struktury přímo nebo nepřímo ovlivňuje funkce neuronů i gliových buněk. Průměrný obsah nejdůležitějších iontů ECP je podobný jako v mozkomíšním moku: extracelulární tekutina obsahuje asi 141 mM Na^+, 124 mM Cl^-, 3 mM K^+, 121 mM HCO_3^-, 1,2 mM Ca^{2+}, a 2,5 mM Mg^{2+}. Měření in vivo pomocí iontově selektivních mikroelektrod však prokázala, že při fyziologické neuronální aktivitě dochází v iontovém složení ECP k významným lokálním iontovým změnám (Syková, 1992a). ECP je také důležitým komunikačním kanálem mezi nervovými a gliovými buňkami. Gliové buňky nevytvářejí synapse a mohou tudíž s neurony nebo mezi sebou komunikovat pouze difúzí iontů a neuroaktivních látek v ECP. Mnohé současné studie rovněž naznačují existenci komunikace mezi synapsemi (tzv. „synaptic crosstalk"), jehož podkladem je únik („spillover") glutamátu ze synapse a jeho difúze extracelulárním prostorem (Barbour a Hausser, 1997; Kullman a Asztely, 1998). Neuropřenašeče uvolněné na jedné synapsi mohou vést k aktivaci receptorů na jiných synapsích, ale mohou se také vázat na receptory s vysokou afinitou, které jsou umístěny extrasynapticky na membránách neuronů a gliových buněk (Berger a spol., 1995). Extrasynaptický, neboli „objemový" přenos (Agnati a spol., 1995; Jansson a spol., 2000) hraje významnou roli při vytváření nových synapsí (například v procesu učení) a rovněž u komplexních funkcí, jako je spánek, bdělost, hlad, strach a chronická bolest.

2.1.1.1. Difúze látek v ECP

Pohyb molekul mezibuněčným prostorem je uskutečňován difúzí. Molekuly uvolněné do ECP difundují ve formě krátkých pohybů náhodným směrem (tzv. Brownův pohyb), které přesně kopírují strukturu tohoto prostoru. Sledováním pohybu molekul můžeme proto popsat a kvantifikovat velikost a geometrii mezibuněčného prostoru, do kterého byly molekuly vpraveny (Nicholson a Syková, 1998).

Rychlost difúze látek v ECP závisí jak na vlastnostech difundující molekuly, t.j. její velikosti, tvaru, případně neseném elektrickém náboji, tak na vlastnostech ECP. Difúzní vlastnosti ECP charakterizují tři difúzní parametry (obr. 1):



Obr. 1. Schematické znázornění architektury CNS a difúzních parametrů ECP. Tkáň CNS obsahuje neurony, gliové buňky, buněčné výběžky a extracelulární matrix. Velikost pórů mezi buňkami, množství překážek a propustnost buněčných membrán určuje difúzní vlastnosti ECP, které popisují tři difúzní parametry: objemová frakce ECP α, tortuozita λ a nespecifický buněčný příjem („uptake") k'. (Upraveno podle Sykové, 1997.)

1. Velikost ECP, neboli extracelulární objemová frakce α - představuje prostor, ve kterém látky difundují a vyjadřuje poměr mezi objemem extracelulárního prostoru a celkovým objemem tkáně CNS.

2. Geometrický faktor tortuozita λ, česky „zakřivenost" - odráží geometrické uspořádání ECP a množství překážek, které musí difundující molekula „obcházet" a které zpomalují její difúzi mezi dvěma body. Tyto překážky představují například tenké výběžky glie nebo makromolekuly extracelulární matrix. Pro difúzi malých iontů mohou být další překážkou elektricky nabité částice, naopak pro velké makromolekuly představuje limitující faktor velikost mezibuněčných pórů (Nicholson a Tao, 1993; Tao a Nicholson, 1996).

3. Difundující molekuly se dále mohou „ztrácet" z ECP, jestliže procházejí membránami do buněk nebo do cév. Tento nespecifický úbytek molekul z ECP vyjadřuje třetí difúzní parametr tzv. nespecifický zpětný příjem („uptake") k'. Difúze některých molekul (např. dopaminu a glutamátu) je rovněž ovlivněna specifickým aktivním transportem těchto molekul z ECP do buněk. Látky, pro které je hodnota k' zanedbatelná (např. tetrametylamoniové kationty - TMA^+), mohou sloužit jako extracelulární „markery".

2.1.1.2. Heterogenita a anizotropie ECP

ECP má heterogenní strukturu, t.j. jeho složení a difúzní vlastnosti se liší v různých oblastech CNS (Nicholson a Syková, 1998). V mozkové kůře potkana hodnota objemové frakce ECP stoupá z 0,19 v II. korové vrstvě na 0,23 v VI. korové vrstvě a tortuozita se pohybuje mezi 1,51-1,65 (Lehmenkühler a spol., 1993). Ještě vyšší heterogenita difúzních parametrů byla nalezena v mozečku želvy, kde hodnota objemové frakce v molekulární vrstvě byla 0,31, zatímco v granulární vrstvě 0,22 (Rice

a spol., 1993). Překážky v ECP mohou být uspořádány tak, že difúze je usnadněna v jednom směru, například ve směru myelinizovaných vláken (Rice a spol., 1993; Voříšek a Syková, 1997a). Tento stav se nazývá anizotropie. Anizotropní difúze není jen doménou bílé hmoty, ale vyskytuje se také ve hmotě šedé, např. v hippokampu (Mazel a spol., 1998). Anizotropie může mít význam při procesu učení, kdy usnadněná difúze v jednom směru usměrňuje neuroaktivní molekuly na „správné" místo a např. přispívá k mechanizmu dlouhodobé potenciace („long-term potentiation" - LTP), která umožňuje ukládání paměťových stop (Syková a spol., 2000a; Jansson a spol., 2000).

2.1.1.3. Změny difúzních parametrů ECP během fyziologických a patologických stavů

Změny buněčného objemu během neuronální aktivity a následných regulačních procesů jsou kompenzovány zmenšením nebo zvětšením ECP (Syková,1987; Svoboda a Syková, 1991). Kromě těchto krátkodobých oscilací dochází k výrazným změnám ve velikosti ECP i během ontogeneze. Několik studií ukázalo, že poměr ECP k celkovému objemu tkáně CNS je nejvyšší u novorozených zvířat a během postnatálního vývoje postupně klesá (Vernadakis a Woodbury, 1965; Lehmenkühler a spol., 1993). Pokles velikosti ECP v šedé hmotě mozku potkana během prvních 14 dnů postnatálního vývoje časově odpovídá ukončení intenzivní gliogeneze, zatímco v bílé hmotě jsou největší změny v objemu ECP pozorovány v souvislosti s ukončením období myelinizace (Lehmenkühler a spol., 1993). Změny velikosti a geometrie ECP byly prokázány také během stárnutí (Syková a spol., 1998).

Mnohem větší změny velikosti ECP a jeho difúzních parametrů však vyvolávají patologické podněty.

Difúzní parametry ECP během anoxie

Bezpochyby nejzávažnějším akutním patologickým inzultem pro nervovou tkáň, vedoucím během několika minut k rozvratu buněčného metabolizmu a smrti buněk, je úplné přerušení přívodu kyslíku, t.j. anoxie. V praxi je globální anoxie nejčastěji důsledkem zástavy krevního oběhu, během které nervová tkáň trpí kromě nedostatku kyslíku také zastavením přísunu živin a nedostatečným odstraňováním zplodin látkového metabolizmu. Tvorba energeticky bohatých molekul ATP v mitochondriích neuronů je plně závislá na oxidativní degradaci glukózy, případně pyruvátu. Snížení tvorby ATP během hypoxie má za následek inhibici Na^+-K^+ pumpy vytvářející elektrochemický gradient na membráně a výlev K^+ do ECP.

Přesuny iontů během ischémie/anoxie doprovází pohyb odpovídajícího množství molekul vody v zájmu zachování stejné osmolality vně a uvnitř buněk a zvětšení buněčného objemu (Kimelberg a Ransom, 1986). Protože však v akutních stavech in vivo platí, že celkový objem nervové tkáně zůstává stálý, musí se zvětšení objemu odrazit na velikosti a geometrii ECP. Zmenšení velikosti ECP během ischémie/anoxie popisuje řada prací (Lunbaek a Hansen, 1992, Syková a spol., 1994, Voříšek a Syková, 1997b). Toto snížení ECP vede ke zvýšenému nahromadění neuroaktivních látek a metabolitů, které mohou dosahovat toxických koncentrací a vést k dalšímu poškození buněk. Navíc zhoršená nesynaptická komunikace mezi buňkami prohlubuje funkční deficit nervové tkáně, který může ovlivnit také reparační pochody.

Difúzní parametry ECP po poranění CNS

Experimenty založené na difúzních měřeních glioticky změněné tkáně po poranění mozku potkana (Roitbak a Syková, 1999) prokázaly, že objem ECP v blízkosti poranění nejdříve vzroste (asi o 20%) a následně se vrací do normálních hodnot, zatímco vzniklá

astroglióza a zmnožení molekul extracelulární matrix v oblast gliotického jizvení vedou k dlouhodobému zvýšení tortuozity ECP. Takto zmnožené difúzní bariéry v ECP pak zhoršují difúzi neuroaktivních látek do této oblasti.

Difúzní parametry ECP nervové tkáně po RTG ozáření

Během normálního vývoje tvoří objem ECP v kůře novorozeného potkana 35 - 40% z celkového objemu tkáně, ale během dalšího vývoje se tento poměr zmenšuje (Lehmenkühler a spol., 1993). Jednorázové RTG ozáření dávkou 20 i 40 Gy zablokovalo tento fyziologický pokles objemu ECP a hodnoty a zůstávaly nadále vysoké (Syková a spol., 1996). Hodnoty tortuozity akutně po ozáření poklesly a následně se postupně signifikantně zvýšily. Takové změny v nervové tkáni poškozují proces signální transmise a vedou k poruše vývoje CNS.

Difúzní parametry ECP během demyelinizačních onemocnění

V pokusech s modelem demyelinizační leukoencefalitidy a roztroušené sklerózy mozkomíšní (experimentální autoimunitní encefalomyelitida, EAE) bylo prokázáno, že rozvoj EAE doprovází zvětšení objemu ECP v různých oddílech míchy společně s poklesem tortuozity ECP (Šimonová a spol., 1996).

2.1.2. Energetický metabolismus mozkové tkáně

V klasickém pohledu neuroenergetiky je glukóza považována za téměř výlučný zdroj energie pro mozkovou tkáň. Glukóza, přítomná v krevní plazmě, vstupuje po přechodu přes hematoencefalickou bariéru do neuronů a gliových buněk pomocí specifických přenašečů (Maher a spol., 1994). V buňkách je okamžitě fosforylována hexokinazou a vstupuje do glykolytického řetězce. Konečný produkt glykolýzy, pyruvát, difunduje přes dvojitou membránu do mitochondriální matrix kde je přeměněn komplexem pyruvát-dehydrogenázy na acetyl CoA. Ten je dále metabolizován v citrátovém cyklu za vzniku vysokoenergetických fosfátů, redukovaných koenzymů (NADH, $FADH_2$) a CO_2. Většina energie z glukosy je však získávána procesem oxidativní fosforylace v dýchacím řetězci, při kterém se transformuje potenciální energie obsažená v redukovaných koenzymech na ATP.

O změnu této konvenční představy se v roce pokusil Pellerin a Magistretti (1994) navržením tzv. „astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis (ANLSH)", která je v posledních letech stále častěji diskutována. Podle této představy (Pellerin a Magistretti 1994, 2003; Bouzier-Sore a spol., 2003) je glutamát uvolněný z neuronů primárně přijímán astrocyty pomocí membránového přenašeče, který spolu s jednou molekulou glutamátu transportuje tři ionty Na^+ a jeden H^+ dovnitř buňky, zatímco jeden iont K^+ je přenášen ven (Attwell, 2000). Tento přenos vede k aktivaci Na^+-K^+-ATPázy a syntézy glutaminu. Současně větší energetická spotřeba vede k poklesu koncentrace ATP a zvýšení koncentrací AMP, ADP a P_i, což vede ke stimulaci glykolýzy s následnou produkcí laktátu. Zvýšená koncetrace laktátu vede k jeho pohybu ve směru koncentračního gradientu - ven z buněk - přes monokarboxylový přenašeč MCT1 v membráně astrocytů. Zvýšená extracelulární hladina laktátu „nutí" jeho molekuly ke vstupu do okolních neuronů přes jejich membránový přenašeč MCT2. Uvnitř neuronů

pak laktát, spolu s glukózou, slouží jako zdroj oxidativního energetického metabolismu, který je aktivován zvýšenou činností Na^+-K^+-ATPázy a resyntézou glutamátu z glutaminu.

Tato hypotéza v souhrnu tedy předpokládá, že v astrocytech převažuje glykolytický metabolismus, zatímco v neuronech je většina energie získávána oxidativní přeměnou laktátu.

Metabolismus a neurotoxicita glutamátu

Glutamát je nejrozšířenějším excitačním neuropřenašečem v centrálním nervovém systému savců. Glutamátové synapse tvoří nezbytnou součást nervových drah, které zajišťují např. plánování a vykonávání volních pohybů (Vezina a spol., 1999; Walvyn a spol., 1999), vedou senzorické informace (Bradley a Grabauskas, 1998; Thoreson a Witkowsky, 1999), modulují bolest (Urban a Gebhart, 1998) a v neposlední řadě se pomocí mechanizmu LTP účastní vytváření paměťových stop (Kaczmarek a spol., 1997; Raymond a spol., 2000). Okamžitý účinek glutamátu na postsynaptické membráně je zprostředkován AMPA/kainátovým a NMDA subtypem glutamátových ionotropních receptorů (Mayer a Westbrook, 1987). Za pomalý a dlouhotrvající účinek glutamátu odpovídají metabotropní receptory spřažené s adenylátcyklázou (Pin a Duvoisin, 1995).

Většina neuronů a gliových buněk obsahuje vysoké množství glutamátu - kolem 10 mM (Lipton a Rosenberg, 1994) a jeho nadměrné uvolnění nebo protrahované působení může vést k poškození buněk. Poprvé byl tento jev popsán na gangliových buňkách vnitřní vrstvy retiny (Lucas a Newhouse, 1957) a o desetiletí později byl nazván excitotoxicitou (Olney, 1969). V současnosti se předpokládá, že excitotoxický účinek glutamátu hraje důležitou roli při poškození neuronů v řadě akutních i

chronických neurologických stavů (trauma CNS, mozkové ischémie, Alzheimerova a Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, roztroušená skleróza nebo HIV encefalopatie). Jako společný patofyziologický mechanismus se označuje nadměrná aktivace NMDA receptorů, která způsobí vtok Ca^{++} iontů do buněk a následnou aktivaci řady dějů (aktivace lytických enzymů, cytochromu C a kaspáz, zvýšená tvorba oxidu dusného a kyslíkových radikálů). Důsledkem je pak buněčná smrt formou nekrózy nebo apoptózy (Bonfoco a spol., 1995).

2.1.3. Gliové nádory CNS

Gliové nádory (gliomy) patří podle histogeneze do skupiny neuroepiteliálních nádorů a představují asi 70% všech primárních intrakraniálních malignit. Mohou vznikat z astrocytů (astrocytomy), oligodendroglie (oligodendogliomy), ependymu (ependymomy) nebo mohou být vzácně smíšené, např. oligoastrocytom.

Gliové nádory CNS mají vysoký maligní potenciál, ačkoli rostou většinou jen lokálně, neboť destruují okolní mozkovou tkáň svým invazivním růstem. Prakticky nikdy nemetastazují mimo CNS. Buňky mozkových nádorů většinou nemají schopnost proniknout stěnou cév, zejména jejich bazální membránou. Schopnost invazivního šíření je tedy nejvýraznější vlastností gliomových buněk. Invazivní růst je umožněn komplexními změnami jak ve funkčním vybavení nádorových buněk (schopnost proliferace a migrace), tak ve schopnosti interakce těchto buněk se strukturami okolního extracelulárního prostoru, zejména s extracelulární matrix (ECM), která vede k adhezi a následné penetraci a destrukci okolních struktur.

Invaze mozkových nádorů probíhá přednostně podél určitých struktur, jakými mohou být jednak preformované cévy a nervová vlákna, jednak komponenty ECM, ať už původně přítomné nebo nádorem novotvořené.

Difúzní infiltrující astrocytomy

Největší skupinu v rámci astrocytárních nádorů tvoří skupina tzv. difúzních infiltrujících astrocytomů. Tvoří asi 60% všech primárních intrakraniálních maligních nádorů. Jedná se o nádory stejné histogeneze s rozdílným stupněm malignity, jejichž společným znakem je pozitivita při barvení na gliální fibrilární acidický protein (GFAP). Podle WHO klasifikace (Kleihues a Cavenee, 2000) se rozeznávají 3 stupně malignity (v praxi označované jako tzv. grade) difúzních infiltrujících astrocytomů:

- difúzní astrocytom (WHO grade II)
- anaplastický astrocytom (WHO grade III)
- glioblastom (WHO grade IV)

Difúzní astrocytom (grade II)

Difúzní astrocytom tvoří 10 - 15% všech astrocytárních nádorů s vrcholem výskytu mezi 30 - 40 rokem života a incidencí 1,4/1 milion obyvatel ročně (Davis a Preston-Martin, 1998). Difúzní astrocytomy mohou vzniknout kdekoli v CNS, nejčastěji jsou lokalizovány supratentoriálně, v mozkovém kmeni nebo míše, spíše neobvyklé jsou v mozečku.

Histologicky jsou tyto nádory tvořeny z dobře diferencovaných fibrilárních nebo gemistocytárních nádorových astrocytů na jemném fibrilárním, často mikrocystickém pozadí. Buněčnost nádoru je v porovnání s normální mozkovou tkání jen mírně zvýšená a nádorové buňky vykazují velmi mírné buněčné a jaderné atypie. Mitotická aktivita většinou chybí, ojedinělé mitózy však ještě nedovolují diagnózu anaplastického astrocytomu.

Udávaná střední doba přežití po chirurgické intervenci je 6 - 8 let. Celková dynamika neléčeného nemocnění je však výrazně ovlivněna tendencí astrocytomů k postupné maligní transformaci směrem ke glioblastomu, který se většinou rozvine během 4-5 let (Roelcke a spol., 1999; Watanabe a spol., 1997).

Anaplastický astrocytom (grade III)

Anaplastické astrocytomy vznikají na podkladě difúzních astrocytomů v obdobných lokalizacích s maximálním výskytem kolem 40. roku života. Základní odlišností od difúzních astrocytomů je zvýšená buněčnost, zřetelné jaderné atypie a přítomnost

zvýšené mitotické aktivity. Anaplastické astrocytomy mají také výraznou tendenci k progresi do glioblastomu, většinou během 2 let (Watanabe a spol., 1997), a celková průměrná délka onemocnění je 3 roky (Donahue a spol., 1997).

Glioblastom (grade IV)

Glioblastomy jsou nejmalignější astrocytární nádory, představují 12 - 15% všech intrakraniálních malignit (Zulch, 1986) a až 60% astrocytomů. Vyskytují se v jakémkoli věku, maximum výskytu je ale mezi 45. - 70. rokem života. Glioblastom se může rozvinout na podkladě difúzního nebo anaplastického astrocytomu (tzv. sekundární glioblastom), častěji však vzniká *de novo* bez zřetelné prekurozorové léze (tzv. primární glioblastom). Primární a sekundární glioblastom se liší nejen molekulárně biologickým podkladem rozvoje nádorové proliferace, ale také klinickými rysy (Kleihues a Ohgaki, 1999). Od astrocytomů II. a III. stupně malignity se glioblastomy odlišují ještě výraznější buněčností, atypiemi, mitózami a zejména přítomností vaskulárních proliferací a typických nekróz, často s pseudopalisádovitým uspořádáním nádorových buněk na jejich periferii. Prognóza glioblastomů zůstává velmi nepříznivá – uvádí se, že 5-ti letého přežití nedosahuje 2% případů (Scott a spol., 1998).

Pilocytární astrocytomy (grade I)

Od skupiny difúzních infiltrujících astrocytomů (grade II-IV) se klinicko-patologicky výrazně liší pilocytární astrocytomy (WHO grade I), nejčastější gliomy dětského věku s maximem výskytu v prvních dvou dekádách života. Jsou to většinou pomalu rostoucí, ohraničené a často cystické tumory, lokalizované nejčastěji v optickém nervu (Hoyt a Baghdassarian, 1969), v oblasti hypothalamu, thalamu, bazálních ganglií (Rodriguez a spol., 1990) a v mozečku (Hayostek a spol., 1993).

Histopatologicky se jedná o hypocelulární nádory často s bifázickou stavbou: v různých proporcích se střídají oblasti kompaktně uložených bipolárních nádorových astrocytů někdy s eozinofilními Rosenthalovými vlákny v intersticiu a hypocelulární oblasti s mikrocystickou stavbou a spíše multipolárními nádorovými buňkami. Ojedinělé mitózy, přítomnost drobných nekróz nebo dokonce infiltrace měkké pleny jsou ještě kompatibilní s diagnózou pillocytárního astrocytomu.

Jedná se o nádor relativně benigní bez tendence k progresi a není přesvědčivě prokázán přechod k difúzně infiltrujícím astrocytomům. Prognóza pacienta a pravděpodobnost recidivy nádoru závisí spíše na možnosti chirurgické exstirpace než na jeho biologické agresivitě. Je známa stabilita těchto nádorů i bez léčby po řadu let až desetiletí (Pagni a spol., 1991).

Oligodendrogliomy

Oligodendrogliomy jsou nepoměrně méně časté než astrocytomy a čítají zhruba 4,2% všech primárních intrakraniálních nádorů (Mork a spol., 1985). Jsou to infiltrativně rostoucí nádory lokalizované typicky v mozkových hemisférách dospělých jedinců s maximem výskytu v 5.-6. dekádě života (Shaw a spol., 1992). Jsou středně buněčné a bývají tvořeny ze solidně uspořádaných buněk s monotónními kulatými jádry s charakteristickým perinuklárním haló a bledou cytoplazmou. V nádoru jsou typicky přítomny početné větvené kapiláry a často také mikrokalcifikace. WHO klasifikace rozeznává 2 stupně malignity: grade II a grade III (anaplastický oligodendrogliom), který se od svého méně agresivního protějšku liší přítomností zvýšené mitotické aktivity, mikrovaskulárními proliferacemi a nekrózami. Korelace mezi takto stanovenými stupni malignity a klinickým průběhem je velmi dobrá (Shaw a spol., 1992). Střední doba

přežití pro oligodendrogliom grade II je 3,5 - 4 roky s průměrným 5-ti letým přežitím kolísajícím v různých studiích mezi 38 – 47% (Wharton a spol., 1998).

Ependymomy

Tato skupina nádorů vychází z ependymální výstelky mozkových komor, případně ze zbytků centrálního míšního kanálu. WHO klasifikace rozeznává několik podskupin zcela odlišných ependymálních nádorů. Myxopapilární ependymom (grade I) se vyskytuje téměř výlučně v oblasti filum terminale míchy. Subependymom (grade I) je benigní pomalu rostoucí nádor s intraventrikulární lokalizací, často diagnostikovaný pouze náhodně. Jak myxopapilární ependymom, tak subependymom mají výlučně dobrou prognózu (Sonneland a spol., 1985) a výrazně se tak liší od skupiny ependymomu a anaplastického ependymomu (grade II a III).

Ependymomy jsou v porovnání s astrocytomy pomaleji rostoucí nádory. Představují jen 3 – 9% všech neuroepiteliálních nádorů, tvoří však až 12% všech intrakraniálních nádorů dětského věku. Ependymomy se mohou vyskytnout v jakémkoli věku, maximum výskytu je však v první dekádě života. Tyto nádory se vyskytují kdekoli v oblasti komorového systému a míšního kanálu. V míše jsou ependymomy nejčastější nádory a tvoří až 60% míšních gliomů. Intrakraniálně se vyskytují zejména v oblasti zadní jámy lební a v oblasti postranních komor (Duncan a Hoffman, 1995).

Klasický ependymom je středně buněčný nádor, ve kterém je klíčovým histologickým znakem tvorba tzv. perivaskulárních pseudoroset nebo ependymálních roset a kanálků. WHO klasifikace rozeznává dva stupně malignity ependymomů (grade II a III), avšak i v této klasifikaci jsou kriteria histologického rozlišení mezi ependymomem a anaplastickým ependymomem uváděna jako kontroverzní. Navrhované histologické znaky malignity ependymomů (zvýšená buněčnost, mitotická

aktivita, vaskulární proliferace a přítomnost nekróz) byla opakovaně zpochybněna a korelace mezi histologickým stupněm malignity a skutečných biologickým chováním nádoru zůstává špatná (Bouffet a spol., 1998; Ross a Rubinstein, 1989). Přitom možnost určit stupeň agresivního chování těchto v dětském věku realtivně častých mozkových nádorů má obrovský prognostický a zejména terapeutický význam.

Ačkoli se jedná o nádory relativně pomalu rostoucí, 5-ti leté přežití kolísá v jednotlivých studiích mezi 40 – 50% (Bouffet a spol., 1998).

2.1.4. Extracelulární matrix

Extracelulární matrix (ECM) je přirozenou součástí mezibuněčného prostoru všech tkání, sloužící jako substrát pro migraci, proliferaci a diferenciaci buněk. V neposlední řadě slouží tato matrix jako biologický "tmel", který umožňuje udržovat normální cytoarchitektoniku tkání s daným prostorovým uspořádáním různých buněčných typů.

2.1.4.1. Složení ECM v centrálním nervovém systému

Ačkoli má ECM mozku mnoho komponent společných s ECM ostatních tkání lidského organismu, existují výrazné rozdíly v jejím složení a určité unikátní složky, které jsou přítomny pouze v CNS. Hlavním rozdílem je skutečnost, že ECM zdravého mozkového parenchymu obsahuje jen velmi malé množství fibrilárních proteinů jako je kolagen nebo fibronektin, naopak ve velkém množství jsou přítomny polymerizované polysacharidy, glykosaminoglykany, ať ve formě vázané na proteinové jádro (proteoglykany) nebo volně uložené (Novak a Kaye, 2000).

Základní komponenty ECM v CNS můžeme rozdělit na skupinu glykosaminoglykanů, proteoglykanů a glykoproteinů, které byly v centru zájmu našich studií.

Glykosaminoglykany a proteoglykany

Glykosaminoglykany (GAG) jsou v CNS ubikvitní a tvoří mukoidní základní hmotu nervové tkáně. Jsou to vysoce polymerizované nevětvené řetězce polysacharidů složené z opakujících se disacharidových jednotek. Odlišné složení, typ sulfonace a způsob navázání sacharidů určuje jejich klasifikaci do několika skupin - hyaluronát, chondroitin sulfát, dermatan sulfát, heparan sulfát a keratan sulfát. GAG jsou vysoce hydrofilní a nesou negativní náboj (Sugahara a Kitagawa, 2000). Hyaluronát je jediným GAG, který se vyskytuje ve tkáních volně, bez vazby na protein, zatímco ostatní GAG se váží na proteinová jádra a vytvářejí tak proteoglykany. Ty jsou podle

typu proteinového jádra a polysacharidové složky řazeny do mnoha podskupin (Bosman a Stamenkovic, 2003) a dlouhý seznam známých proteoglykanů extrahovaných z mozkové tkáně stále narůstá.

Glykoproteiny ECM

Glykoproteiny ECM jsou relativně veliké a většinou fibrilární makromolekuly (molekulární hmotnost > 100 kD). Dělí se na skupinu kolagenů a nekolagenních fibrilárních glykoproteinů, kam patří zejména tenascin, fibronektin, laminin, vitronektin a několik dalších glykoproteinů jako je entaktin.

Kolageny

Kolageny jsou glykoproteiny zodpovědné za zachování strukturální integrity obratlovců a mnoha jiných organismů (Myllyharju a Kivirikko, 2001) a tvoří až 25% celkového obsahu proteinů v lidských tkáních (Novak a Kaye, 2000). Je známo více než 20 geneticky rozdílných typů kolagenů (Brown a Timpl, 1995). Většina kolagenů je tvořena ze tří helikálně stočených polypeptidových řetězců. Polymerizací těchto trojitých helixů pak vznikají v případě kolagenu typu I, II, III, V, VI a XI kolagenní fibrily a vlákna, známá ze struktury veškerých podpůrných tkání organismu od vaziva, chrupavku až po kost. Jiné typy kolagenů (zejména kolagen IV, VIII a X) vytvářejí polymerizací základní trojitých helixů spíše než lineární vlákna síťovité struktury.

Ačkoli jsou kolagenní vlákna v lidském těle základní součástí podpůrné kostry většiny tkání a orgánů, jejich výskyt ve zdravém CNS je velmi omezený.

V lidském organismu jsou nejvýznamněji zastoupeny kolageny typů I - IV. Kolagen typu I se vyskytuje prakticky ve všech tkáních mimo hyalinní chrupavku, v CNS však je jeho výskyt omezen na mozkomíšní pleny a fibromuskulární struktury stěny velkých cév (Bosman a Stamenkovic, 2003). Kolagen II je součástí hyalinní chrupavky a některých mezenchymálních komponent oka (Eyre, 2002). Jeho přítomnost v CNS zatím nebyla popsána. Kolagen typu III se nachází ve stěně velkých krevních cév a

trávicích orgánů, kopolymerizuje s kolagenem I, s čímž souvisí i výskyt kolagenu III v CNS ve stejné lokalizaci jako kolagen I. Kolagen typu IV je pravidelnou součástí bazálních membrán savčích organismů a je přítomen také v bazálních membránách mozkových cév. Přesvědčivé zprávy o distribuci ostatních typů kolagenu ve zdravé mozkové tkáni chybí (Bosman a Stamenkovic, 2003; Myllyharju a Kivirikko, 2001).

Tenascin

Rodina genů pro tenascin zahrnuje nejméně 5 genů, které kódují tenascin-C, tenascin-X, tenascin-R, tenascin-W a tenascin-Y. Tenasciny jsou veliké molekuly heterohexamerických nebo homohexamerických glykoproteinů, ve kterých jsou jednotlivé podjednotky vázány disulfidickou vazbou. Tenasciny mají čtyři funkční domény, přičemž doména TA ("tenascin assembly") je společná pro všechny z nich (Jones a Jones, 2000).

Různé typy tenascinů jsou exprimovány během vývoje organismu včetně neurogeneze (Mitrovic a spol., 1994) a byl prokázán významný vliv těchto molekul na buněčnou diferenciaci (Crossin, 1996). Výzkumy nepotvrdily přítomnost tenascinu ve zdravých tkáních dospělých organismů (Bosman a Stamenkovic, 2003), opakovaně však byl prokázán jejich výskyt a funkce v patologických situacích, jako je hojení ran, neovaskularizace a nádorový růst (Joester a Faissner, 2001; Jones a Jones, 2000).

Fibronektin

Fibronektin je velký dimerní glykoprotein, jehož řetězce sestávají z přibližně 2500 aminokyselin (Kornblihtt a spol., 1985). Funkce jednotlivých domén tohoto proteinu byly detailně charakterizovány (Vogel a spol., 1993) a spočívají především ve zprostředkovávání interakce mezi buněčnými receptory a kolagenem. Význam exprese fibronektinu v dospělém zdravém mozku není jasný, jednoznačně však byla prokázána jeho funkce během fetální neurogeneze (George a spol., 1993).

Laminin

Lamininy jsou velkou skupinou adhezních glykoproteinů značné velikosti s molekulovou hmotností až 400 kD (Beck a spol., 1990). Jsou to flexibilní proteiny skládající se ze tří dlouhých polypeptidových řetězců spojených disulfidickou vazbou. Ačkoli bylo doposud izolováno 12 izoforem lamininu lišících se v zastoupení jednotlivých α, β a γ řetězců (Colognato a Yurchenco, 2000), všechny mají společné strukturální součásti, zejména malou globulární doménu sloužící k polymerizaci jednotlivých řetězců. Laminin, podobně jako fibronektin, obsahuje několik funkčních domén, které umožňují interakci s kolagenem typu IV, heparan sulfátem, entaktinem a lamininovými receptory z rodiny integrinů (Ryan a spol., 1996). Lamininy jsou součástí většiny bazálních membrán lidského organismu, ty však ve zdravé mozkové tkáni však nejsou významně přítomné (Novak a Kaye, 2000). Tyto glykoproteiny jsou multifunkční a podobně jako u ostatních proteinů ECM byla i u nich prokázána role v embryogenezi, buněčné migraci a diferenciaci, a při interakci s dalšími proteiny na buněčných površích (Ryan a spol., 1996). Mutace nebo delece genů pro součásti lamininu vedou k různým lidským onemocněním jako je kongenitální svalová dystrofie nebo epidermolysis bullosa (Pulkkinen a spol., 1995; Zhang a spol., 1996).

Vitronektin

Za fyziologických okolností je vitronektin produkován v játrech a cirkuluje v plazmě, kde je zapojen do regulace hemokoagulace a fibrinolýzy (Gladson a spol., 1995). Jako součást ECM byl detekován zejména v kůži, kde byla také ukázána jeho role při hojení ran (Grinnell a spol., 1992). Je exprimován v centrálním nervovém systému v průběhu vývoje (Seiffert a spol., 1991), jeho přítomnost ve vyvinutém CNS však zatím prokázána nebyla (Uhm a spol., 1999). Fyziologickou funkcí vitronektinu jako součásti ECM je zprostředkování adheze buněk přes jejich integrinové receptory (Gladson, 1999).

2.1.4.2. Vliv molekul ECM na funkci gliomových buněk

Potenciální funkce molekul ECM v biologii buněk mozkových nádorů, zejména dynamika interakce mezi ECM a gliomovými buňkami, byly intenzivně studovány v experimentu. Ačkoli mají experimenty zkoumající expresi ECM nádorovými buňkami *in vitro* různá omezení (Mahesparan a spol., 1999; Paulus a spol., 1994), jsou výsledky těchto prací zásadní pro pochopení interakce mezi nádorovými buňkami a jejich extracelulárním prostorem. Výsledky mnoha prací lze shrnout do několika bodů:

1. Adheze nádorových buněk na okolní ECM je prvním krokem při jejich migraci a invazivním šíření. Interakce mezi glykoproteiny ECM a nádorovými buňkami vedoucí k adhezi a následné migraci je výrazně regulována, jednak přítomností dalších komponent ECM jako jsou proteoglykany, jednak dalšími proteiny asociovanými s integriny (Katagiri a spol., 1999). Důležitým faktorem ovlivňujícím mechanismus adheze je i vzájemné ovlivňování funkce jednotlivých integrinových receptorů, tzv. "integrin cross talk" (Pijuan-Thompson a Gladson, 1997).
2. ECM podporuje mitogenezu nádorových buněk (Chung a spol., 1996)
3. ECM prodlužuje životnost buněk inhibicí apoptózy (Liang a spol., 1997; Uhm a spol., 1999)
4. Vazba na molekuly ECM vede ke změně intracelulární signalizace v nádorové buňce s prokázanou aktivací různých typů fosfokináz (Liang a spol., 1997; Rutka a spol., 1999)

2.2. OTÁZKY A CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo studium změn difúzních parametrů ECP a energetického metabolismu během přechodné hypoxie a hypoxie/ischémie a studium vlastností ECP u gliových nádorů mozku.

Položili jsme si tyto otázky:

1. Jak se mění difúzní parametry ECP během tranzientní hypoxie a hypoxie/ischémie v mozku potkana? Liší se od difúzních parametrů zjištěných během mozkové anoxie?

2. Jaké jsou změny v extracelulární koncentraci energetických metabolitů a glutamátu během tranzientní hypoxie a hypoxie/ischémie v mozku potkana? Korelují tyto změny se změnami v difúzních parametrech?

3. Liší se difúzní parametry zdravé mozkové tkáně od difúzních parametrů tkání mozkových nádorů?

4. Jak se mění velikost a geometrie extracelulárního prostoru nádorové tkáně při maligní progresi nádoru?

5. Jak se na změnách difúzních parametrů podílejí strukturální změny v nádorové tkáni jako hustota nádorových buněk, hustota jejich výběžků a proliferace nádorových cév?

6. Liší se složení extracelulární matrix v nádorové tkáni od nálezů ve zdravé tkáni a souvisejí změny ve složení ECM se stupněm malignity gliomů?

2.3. METODIKA

2.3.1. Experimentální modely

Tranzientní hypoxie a hypoxie/ischémie

Všechny pokusy jsme prováděli na dospělích samcích potkana kmene Wistar (300 – 350 g). Zvířata jsme uvedli do celkové anestézie intraperitoneální injekcí uretanu (1,5 g/kg; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo). Po zaintubování byla připojena k ventilátoru (CIV 101, Columbus Instruments, USA), relaxována pankuroniumbromidem (0,6 mg/kg, Pavulon, Organon, Nizozemí) a ventilována vzduchem. Jejich tělesnou teplotu jsme během celého pokusu udržovali na 36 - 37 °C pomocí vyhřívací podložky. Otvor pro elektrody s poloměrem 2-3 mm jsme vytvořili trepanací parietální kosti nad somatosenzorickým neokortexem a odstraněním tvrdé pleny. Odkrytý povrch mozku byl během celého pokusu omýván fyziologickým roztokem (37°C). Tranzientní hypoxii jsme navodili ventilací plynnou směsí se sníženým obsahem kyslíku (6% O_2 v 95% N_2) po dobu 30 minut. V případě tranzientní hypoxie/ ischémie byla zvířata po dobu 30 minut ventilována hypoxickou plynnou směsí (10% O_2 v 90% N_2) a zároveň jsme provedli podvaz jedné arteria carotis communis. Následně byla zvířata opět ventilována vzduchem a uvolněna ligace a. carotis po zbytek pokusu (90 minut).

2.3.2. Iontově-selektivní mikroelektrody

Iontově-selektivní mikroelektrody (ISM) jsou významným nástrojem pro dynamické měření aktivity specifických iontů ve tkáních. Jejich používání vedlo k novému rozvoji poznatků nejen v neurofyziologii, ale také ve fyziologii smyslů, svalů a pochodů v ledvinném parenchymu.

ISM jsou v podstatě miniaturní potenciometrické senzory, jejichž hlavní složkou je elektrochemická membrána, která je v ideálním případě selektivně propustná jen pro určitý iont. Jestliže tato membrána odděluje dva roztoky s různou koncentrací daného iontu, pohybují se ionty z oblasti s vysokou koncentrací do oblasti s nízkou koncentrací a nesou s sebou elektrický náboj. Vyrovnání rozdílu potenciálů na obou stranách membrány zastaví další tok iontů a vzniká rovnovážný stav. Velikost potenciálu (E), vytvořeného na ISM, popisuje Nernstova rovnice:

$$E = E_o + s \log a_i \qquad [1],$$

kde E_o je referenční potenciál v milivoltech, s je Nernstova odezva ("slope") a a_i je aktivita sledovaného iontu. Nernstova odezva je při 25 °C definována jako:

$$s = 2{,}303\ RT / z_i F = 59{,}16/z_i \qquad [2],$$

kde R je plynová konstanta (8,314 $JK^{-1}mol^{-1}$), T absolutní teplota (K), F Faradayův elektrochemický ekvivalent (9,6487 x 10^4 $Cmol^{-1}$) a z_i je náboj iontu.

V praxi však musíme rovněž počítat s interferencí ISM k jiným iontům a proto potenciál ISM lépe vystihuje Nikolského rovnice:

$$E = E_o + s \log [a_i + \Sigma_{ki}j^{pot}(a_j)^{zi/zj}] \qquad [3],$$

kde a_j je aktivita interferujícího iontu, z_j náboj jím nesený a $\Sigma_{ki}j^{pot}$ je koeficient potenciometrické selektivity. V praxi se obyčejně používá místo aktivity koncentrace. Pro potenciál ISM v roztoku dvou interferujících iontů potom platí zjednodušený tvar Nikolského rovnice:

$$E_1 - E_2 = s \log(C_1 + k)/(C_2 + k) \qquad [4],$$

kde E_1 a E_2 jsou potenciály elektrody při různých koncentracích (C_1 a C_2) měřeného iontu a k je interference. V praxi se otázka interference řeší přidáním interferujících iontů do kalibračních roztoků.

Moderní ISM, používané v neurofyziologii, jsou dvoukanálové skleněné elektrody, kde jeden kanál slouží jako referenční a druhý jako skutečná iontově-selektivní elektroda (Syková, 1992b; Nicholson, 1993) (obr. 2). Toto uspořádání je nutné především pro měření v nervové a svalové tkáni, protože ISM registruje i jiné biopotenciály (akční, synaptické potenciály a potenciály pole), které mohou zkreslovat signál tvořený změnami příslušné iontové aktivity (Syková, 1992b). Referenční kanál takovéto elektrody obsahuje roztok NaCl, nebo jiný indiferentní roztok; iontově-selektivní kanál má ve hrotu krátký sloupec iontově-selektivní tekuté membrány, neboli iontoměniče, a je zezadu plněn roztokem obsahujícím příslušný iont v nadbytku. Tekutá membrána obsahuje obecně:

- neutrální přenašeč daného iontu
- membránové rozpouštědlo, např. nitrobenzén
- membránovou matrix, např. PVC
- jiná aditiva

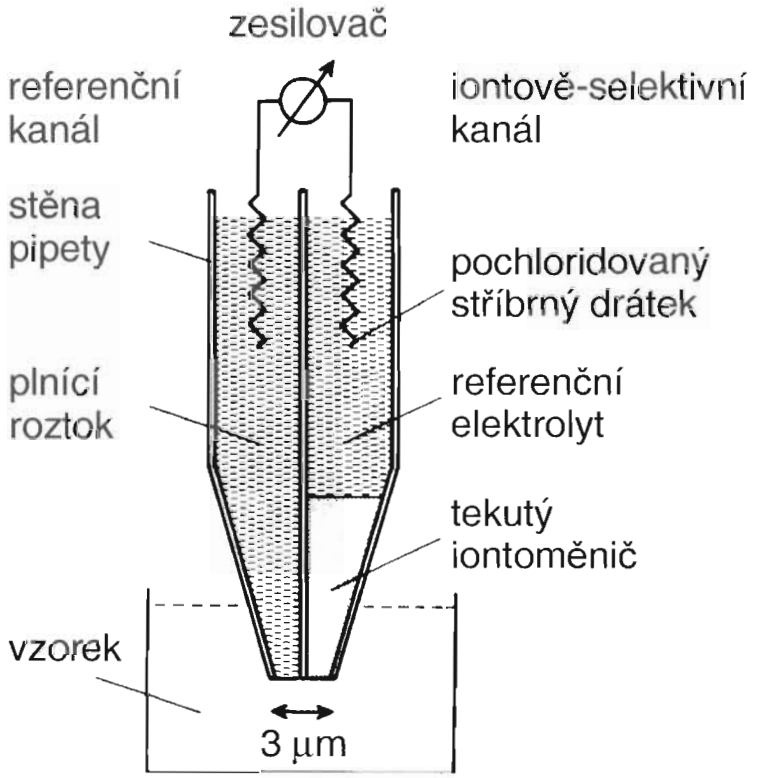
Tekuté membrány jsou komerčně dostupné (Fluka Chem. Corp.) pro mnoho iontů (např. Ca^{2+}, K^+, H^+, Na^+) ve formě hotových koktejlů.

Kromě tekutých membrán na bázi neutrálních nosičů existují rovněž tekuté membrány, obsahující nosiče s nábojem, používané především pro měření K^+ a Cl^-. Pro měření koncentrace TMA^+ iontů se používá buď původní K^+ iontoměnič Corning 477317 (Rochester, NY), obsahující 3 váhová % tetrakis(p-chlorofenyl)borátu draselného rozpuštěného v 2,3-dimetylnitrobenzénu nebo obdobný K^+ iontoměnič Potassium Ionophore I – Coctail A (Fluka, katalogové číslo 60031).

Výroba iontově-selektivních mikroelektrod

V naší laboratoři jsme pro výrobu ISM použili borosillikátové sklo (Rückl a synové, Otvovice), které se taví již při relativně nízkých teplotách. Dvě skleněné trubičky o různé

délce jsme spojili poletylénovou gumičkou. Po ohřátí nad Bunsenovým kahanem jsme spojené trubičky stočili o 360° a mírně povytáhli. Ze stočených trubiček upevněných do vertikálního tahače mikroelektrod (Narishige, Japonsko) byly vytaženy dvě mikroelektrody. Síla tahu magnetu a intenzita žhavení platinové spirály určila tvar a délku hrotu elektrod. Výhodou stočených trubiček oproti tzv. theta trubičkám se skleněným septem (název podle průřezu, připomínající řecké písmeno theta), rovněž používaných pro výrobu dvoukanálových mikroelektrod, je širší septum ve hrotě, které nepraská a rozdílná délka kanálů, zabraňující styku elektrolytů, tzv. solnému můstku.



Obr. 2. Schéma dvoukanálové iontově-selektivní mikroelektrody. Otvor ve hrotu elektrody pro extracelulární měření činí 2-4 µm. Referenční kanál je naplněn referenčním elektrolytem, nejčastěji NaCl. Iontově selektivní kanál má ve hrotu tekutý iontoměnič, nad kterým je roztok obsahující nadbytek sledovaného iontu. Oba kanály jsou spojeny se zesilovačem pochloridovanými stříbrnými drátky. (Upraveno podle Sykové, 1992b.)

Silanizace elektrod

Skleněný povrch je do značné míry hydrofilní a proto odpuzuje organické tekutiny, jako jsou iontoměniče. Nanesením tenké vrstvičky silanu do hrotu iontově-selektivního kanálu se vnitřní povrch stane hydrofobní a lépe "drží" iontoměnič. Obecně rozeznáváme dvě metody silanizace:

1. ponoření hrotu ISM do roztoku obsahující reaktivní silikonovou sloučeninu (např. chlorosilan, aminosilan, siloxan), rozpuštěnou v organickém rozpouštědle (např. v karbontetrachloridu nebo xylénu).
2. silanizace parami, při které je elektroda vystavená parám silikonové sloučeniny (např. dimetylaminotrimetylsilanu) v uzavřené komůrce při vysoké teplotě (Syková, 1992b). Tento způsob se používá zvláště pro silanizaci elektrod, určených pro intracelulární měření.

ISM užívané v této práci pro extracelulární měření koncentrací TMA^+ byly silanovány první metodou. Aby elektroda nenasála silan do obou kanálů, byl hrot referenčního kanálu před silanizací naplněn redestilovanou vodou. Po ponoření ISM do silanu, vzlínal tento do hrotu iontově-selektivního kanálu a vytvořil sloupec asi 200-500 μm. Elektrody byly poté vypáleny v peci při 150-200 °C po dobu jedné hodiny. Po odpaření vody a přebytečného silanizačního roztoku byly elektrody připraveny k plnění.

Plnění elektrod

Pro výrobu ISM v této práci jsme použili metodu předního plnění (Syková, 1992b). Nejprve byl pod mikroskopem přilomen hrot elektrody na 2-3 μm. Referenční kanál byl zezadu naplněn roztokem 150 mM NaCl. Poté byl hrot ISM byl ponořen do iontoměniče na 10-60 s, pokud sloupec iontoměniče nedosáhl výšku 100-500 μm. Iontově-selektivní kanál byl doplněn roztokem obsahujícím sledovaný iont. Přítomné bubliny byly

odstraněny pomocí jemného hmatového vousu kočky nebo psa, či pomocí mikrokauteru.

Elektrické zapojení ISM

Oba kanály ISM byly spojeny pomocí pochloridovaných stříbrných (Ag/AgCl) drátků se vstupem diferenciálního zesilovače se vstupním odporem $10^{14}\ \Omega$ a s možností kompenzace kapacity negativní zpětnou vazbou.

2.3.3. Měření difúzních parametrů ECP

Strukturu nervové tkáně můžeme připodobnit pěně, kde plynnou fázi představují buňky a ECP tvoří kapalnou fázi. V této kapalné fázi se nacházejí látky, které se pohybují z místa na místo difúzí. Difúzní pohyb molekul ve volném vodním médiu popisují Fickovy zákony, které odrážejí na makroskopické úrovni Brownův pohyb molekul. Tento pohyb je výsledkem krátkých přímých pohybů difundujících molekul náhodným směrem a jejich srážek s molekulami rozpouštědla. Jestliže v soustavě rozpouštěná látka – rozpouštědlo existuje koncentrační gradient ∇C, pak mikroskopický tok difundujících molekul J ve směru koncentračního gradientu, představuje vektor, pro který platí:

$$J = -D\ \nabla C \qquad [5]$$

Tato rovnice je první Fickův zákon, kde D znamená difúzní koeficient difundující látky ve vodě, C její koncentraci a ∇ gradientový operátor. ECP však představuje komplexní médium a jeho geometrická struktura společně s velikostí mezibuněčných pórů tvoří nevyhnutelné překážky pro volnou difúzi. Navíc mohou difúzi omezovat i možné interakce s makromolekulami v buněčných membránách, které na svém povrchu nesou elektrický náboj, případně vychytávání difundující látky do buněk, či kapilár. Difúzi v mozku je proto možné popsat po zavedení parametrů extracelulární objemové frakce

α a tortuozity λ do difúzních rovnic popisujících difúzi látek v porézním médiu. Extracelulární objemová frakce α je definována jako:

$$\alpha = V_{ECP}/V_{TOT} \qquad [6],$$

kde V_{TOT} představuje celkový objem definovaného vzorku tkáně a V_{ECP} je objem extracelulárního prostoru. V případech, kdy se objem ECP mění společně s koncentrací difundující látky, jsou parametry α a V_{ECP} funkcí prostoru a času, zatímco V_{TOT} zůstává stálý.

Přítomnost různých překážek způsobuje, že difúzní cesta molekuly v komplexním médiu je delší než ve volném médiu (vodě, nebo zředěném agaru). Proto je tzv. aparentní difúzní koeficient *ADC* pro danou látku v komplexním médiu nižší než difúzní koeficient *D* ve volném médiu. Toto prodloužení difúzní cesty vyjadřuje tortuozita λ, která je definována jako:

$$\lambda = (D/ADC)^{1/2} \qquad [7]$$

Pro homogenní izotropní porézní médium potom můžeme rovnici [5] modifikovat (blíže viz Nicholson a Phillips, 1981) na tvar:

$$J = - \alpha ADC \nabla C \qquad [8],$$

přičemž *C* je koncentrace dané látky v ECP měřená iontově-selektivní mikroelektrodou. *J* a *C* představují průměrné hodnoty v celém vzorku tkáně.

Další úpravou, a zavedením třetího difúzního parametru, který představuje nespecifický buněčný zpětný příjem *k´*, a který vyjadřuje ztrátu difundujících molekul z ECP do buněk nebo kapilár, dostaneme modifikovaný tvar druhého Fickova zákona (Nicholson a Phillips, 1981):

$$\partial C / \partial t = (D / \lambda^2) \nabla^2 C + (Q / \alpha) - k´C \qquad [9],$$

kde *t* je čas a *Q* je tok difundující látky od zdroje.

Jestliže je difundující molekula aplikována do tkáně iontoforetickým pravoúhlým pulsem s dobou trvání S, změny její koncentrace v čase představují difúzní křivku se vzestupnou a sestupnou fází, přičemž pro vzestupnou část platí:

$$C = G(t) \quad t<S$$

a pro sestupnou část:

$$C = G(t) - G(t - S) \quad t>S,$$

kde C je koncentrace difundujícího iontu v ECP v čase t ve vzdálenosti r od bodového zdroje.

Matematickými úpravami prvního a druhého Fickova získáme rovnici funkce difúzní křivky $G(u)$, kde $u = t$ nebo $t - S$ pro vzestupnou, respektive sestupnou část křivky:

$$G(u) = (Q\lambda^2 / 8\pi D\alpha r) \{\exp [r\lambda(k' / D)^{1/2}] \operatorname{erfc} [r\lambda / 2(Du)^{1/2} + (k'u)^{1/2}]$$

$$+ \exp [- r\lambda(k' / D)^{1/2}] \operatorname{erfc} [r\lambda / 2(Du)^{1/2} - (k'u)^{1/2}]\} \qquad [10]$$

Množství iontu, dodaného iontoforeticky do tkáně za 1 s, je označeno jako Q. Platí, že $Q = In / zF$, kde I je zvýšení proudu aplikovaného do iontoforetické mikropipety během pulsu, n je transportní číslo elektrody, z je náboj nesený iontem a F je Faradayův elektrochemický ekvivalent . Funkce „erfc“ je komplementární chybová funkce. Podle rovnic [6] a [7] pro difúzi ve volném médiu (vodě nebo zředěném agaru) platí: $\alpha = 1$, $\lambda = 1$ a $k' = 0$. Použitím nelineárního algoritmu pro fitování křivek lze z rovnice [10] vypočítat hodnoty n a D. Po dosazení hodnot n a D do rovnice [10] můžeme určit parametry α, λ a k' ve tkáni.

TMA^+ - iontoforetická metoda v reálném čase

Metodu měření difúzních parametrů vyvinuli původně Nicholson a Phillips (1981). Je založená na tlakové nebo iontoforetické aplikaci iontů do tkáně a měření jejich koncentrace pomocí iontově-selektivní mikroelektrody. Aplikovaný iont přitom musí splňovat následující podmínky:

- musí zůstávat v ECP, t.j. buněčné membrány musí být pro něj relativně nepropustné
- musí být poměrně malý, aby mohl volně prostupovat mezibuněčnými prostory
- musí pro něj existovat iontově-selektivní mikroelektroda

Tyto podmínky splňují např. tetrametylamoniové (TMA^+) a tetraetylamoniové (TEA^+) kationty. Nespecifický zpětný příjem TMA^+ do buněk se za normálních okolností pohybuje řádově kolem 10^{-4} až 10^{-3} za sekundu (Nicholson a Phillips, 1981), jeho relativní molekulová hmotnost *Mr* = 74 a iontoměnič Corning 477317, používaný pro výrobu draslíkových ISM, je vysoce citlivý na TMA^+. Iontově-selektivní kanál je plněn 100 mM TMACl. TMA^+-ISM je nutné před pokusem kalibrovat v roztocích obsahujících definované množství TMA^+. V našich pokusech jsme použili roztoky s obsahem 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 a 10 mM TMA^+ na pozadí buďto 3 mM KCl a 150 mM NaCl nebo 50 mM KCl a 103 mM NaCl. Výsledky kalibrace po dosazení do Nikolského rovnice [4] umožnily určit Nernstovu odezvu elektrody a interferenci s jinými ionty, především s K^+. Nernstova odezva stejné elektrody na pozadí 3 nebo 50 mM KCl se nelišila.

Iontoforetické mikropipety byly vyrobeny ze skleněných theta trubiček vytažením na tahači mikroelektrod a přilomením hrotu na 2-3 μm. Před naplněním 100 mM TMACl byla mikropipeta několik milimetrů od hrotu mírně ohnuta tak, aby hroty TMA^+-ISM a iontoforetické mikropipety byly rovnoběžné. Po upravení jejich vzdálenosti pod mikroskopem na 80-200 μm, jsme elektrody slepili zubním cementem. Typické

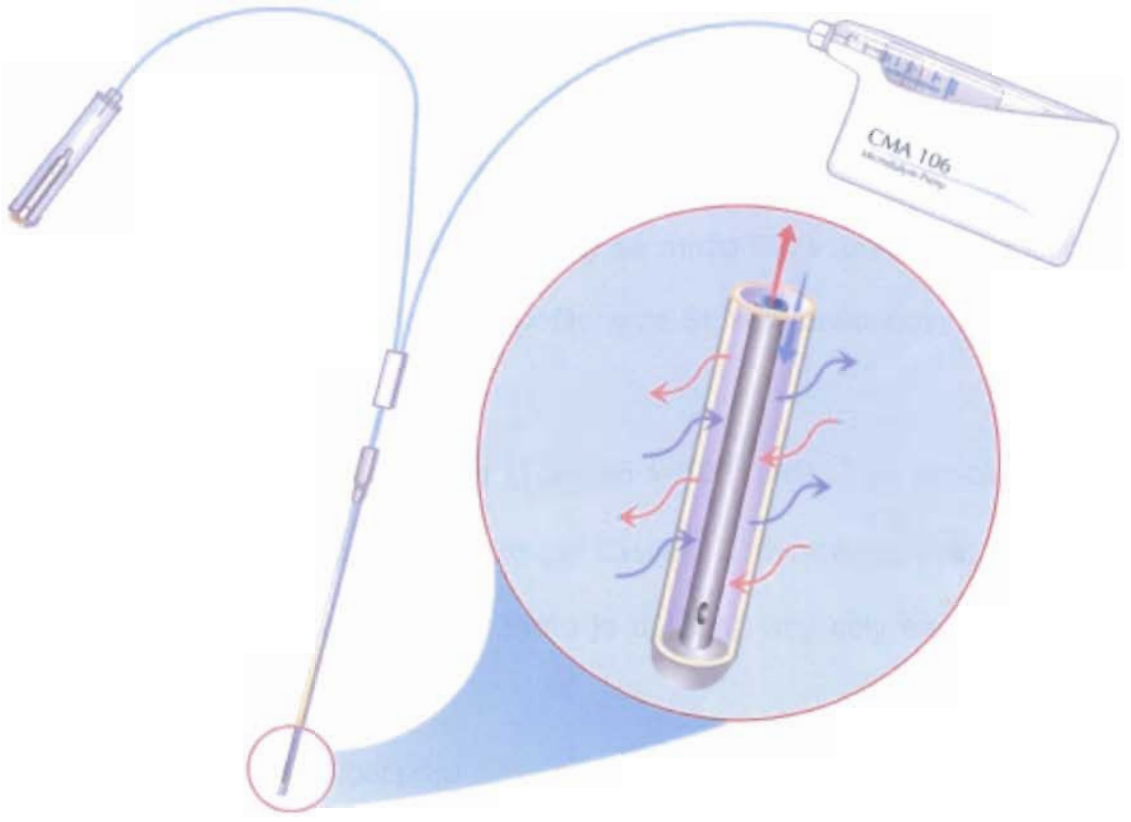
iontoforetické hodnoty, použité v našich pokusech, byly: +20 nA tzv. bias proud (aplikován po celou dobu měření, který udržoval stálou klidovou hladinu TMA^+ a konstantní transportní číslo *n*) a 60 s trvající pravoúhlý puls s amplitudou +100 nebo +200 nA, pro vytvoření difúzní křivky v agaru nebo ve tkáni.

Soustava mikroelektrod byla nejprve zavedena do 0,3 % agarózového gelu (Difco, Detroit, MI, Special Noble Agar), připraveného z roztoku obsahujícího 150 mM NaCl, 3 mM KCl a 1 mM TMACl. Po určení hodnot transportního čísla *n* a difúzního koeficientu *D* analýzou difúzních křivek, získaných měřením v agaru, jsme opakovali měření ve tkáni a určili hodnoty třech difúzních parametrů: α, λ a k'.

2.3.4. Mikrodialýza

Mikrodialýza je metoda umožňující monitorovat lokální koncentrace léků a metabolitů v mezibuněčném prostoru různých tkání. Mikrodialyzační zařízení se skládá z perfuzní pumpy a mikrodialyzační sondy. Sonda, která se během pokusů zavádí do vybraných tkání nebo tekutin, je navržena jako tenká dutá trubička s vnitřním průměrem obvykle v rozmezí 0.15-0.3 mm a v oblasti hrotu obsahuje polopropustnou membránu. Sonda je neustále promývána perfuzním roztokem. Perfuzní roztok vstupuje do sondy konstantní rychlostí (většinou 0,5-5 µl/min). Jeho složení iontů se musí co nejvíce blížit iontovému složení mezibuněčné tekutiny v okolí sondy, aby se zabránilo nadměrnému přesunu molekul na podkladě koncentračního spádu přes membránu sondy. Difundující molekuly, do určité velikosti (závisí na velikosti pórů v membráně), prochází přes membránu sondy do perfuzního roztoku. Ten je pak po průchodu sondou odváděn jako dialyzát do zkumavky umístěné ve sběrači (viz obr. 3). Protože, během odebírání vzorků dialyzátu téměř nikdy nedojde k vyrovnání koncentrací sledované látky uvnitř a vně sondy, změřená koncentrace ve vzorku představuje pouze určitý podíl její aktuální koncentrace v extracelulární tekutině. Poměr mezi těmito koncentracemi se označuje

jako extrakční účinnost nebo častěji jako relativní výtěžnost, která je závislá na mnoha faktorech a proto je nutné každou sondu kalibrovat pro každou ze sledovaných látek.



Obrázek 3. Schématické znázornění napojení mikrodialyzační sondy k perfúzní pumpě a vzorkovnici. Perfúzní pumpa zajišťuje cirkulaci perfúzního roztoku mikrodialyzační sondou, jejíž hrot je opatřen semipermeabilní membránou umožňující prostup látek ve směru koncentračního gradientu. Permeabilita je omezena velikostí pórů v membráně. Roztok obohacený o látky přítomné ve tkáních je shromažďován jako dialyzát ve vzorkovnicích pro následnou analýzu koncentrací sledovaných látek.

Relativní výtěžnost (recovery)

Termín relativní výtěžnost popisuje poměr mezi koncentrací látky v dialyzátu ku koncentraci v extracelulární tekutině. Pokud dojde k vyrovnání obou těchto koncentrací, hovoříme o 100% relativní výtěžnosti. Ta je závislá především na:

rychlosti difúze látky přes membránu sondy (ta je ovlivněna teplotou, velikostí pórů a plochy membrány, koncentračním gradientem)

složení perfuzního roztoku

rychlosti průtoku perfuzního roztoku sondou

tortuositě extracelulárního prostoru

Rychlost difúze přes membránu- vliv teploty

Relativní výtěžnost pro různé molekuly se může lišit v závislosti na jejich difúzních koeficientech (D), které mohou být vypočteny ze Stokes-Einsteinovy rovnice:

$D = k_b T / 6\pi\eta\delta$

kde k_b je Boltzmannova konstanta (1,38066 x 10^{-23} J/K), T je absolutní teplota, η je viskozita tekutiny, δ je poloměr difundující částice. Z rovnice vyplývá, že rychlost difúze je přímo úměrná teplotě prostředí. Proto je důležité, aby celý experiment probíhal při konstantní teplotě.

Plocha membrány a velikost pórů

V závislosti na velikosti pórů membrány mohou přes membránu přecházet jen látky o určité molekulární hmotnosti. Propustnost membrány je dána tzv. hmotnostním prahem (cut-off) membrány a vyjadřuje se v Daltonech. K dosažení přijatelné relativní výtěžnosti je vhodné použít membránu přibližně se 4-násobným hmotnostním prahem než je molekulární hmotnost měřené látky. Kromě velikosti pórů membrány má na relativní výtěžnost vliv také velikost plochy. Podle Fickova zákona je rychlost difuze přes

membránu úměrná k velikosti její plochy. Proto prodloužení membrány sondy a tudíž zvětšení velikosti plochy pro difuzi povede ke zvýšení relativní výtěžnosti.

Složení perfuzního roztoku

Složení perfuzních roztoků užívaných při mikrodialyzačních experimentech by se v ideálním případě mělo iontovým složením, osmolaritou a pH blížit co nejvíce extracelulární tekutině, ve které jsou prováděny experimenty. Odchylky v iontovém složení perfuzního roztoku vedly ke změněné koncentraci neurotransmiterů a léků v dialyzátu.

Rychlost průtoku

Obecně platí, že čím je větší rychlost průtoku, tím je menší relativní výtěžnost. Tento vztah je vyjádřen v následující rovnici:

$$RR = (1 - e^{-rA/F}) \times 100$$

kde RR je relativní výtěžnost, r hmotnostní transportní koeficient, A plocha membrány a F je rychlost průtoku.

Nízká rychlost perfuze je však často limitována malým množstvím získaného vzorku a nesplněním kvantifikačního limitu příslušné analytické metody. Na druhou stranu, vysoký průtok (nad 10 μl/min) může zvyšovat tlak v mikrodialyzačním systému a vést tak k procesu ultrafiltrace směrem ven ze sondy. V praxi se proto rychlost perfúze volí nejčastěji v rozmezí 0.1-5 μl/min.

Tortuozita extracelulárního prostoru

V porovnání s in vitro experimenty může být relativní výtěžnost sondy in vivo redukována faktorem tortuozity v experimentální tkáni. Díky tomuto faktoru, s ohledem na nemožnost simulovat exaktně podmínky in vivo, se obvykle liší vypočítaná relativní výtěžnost sondy in vitro od skutečné, v in vivo experimentech.

Kalibrace

Protože relativní výtěžnost nikdy nedosáhne 100% (kromě situace nulového toku- viz dále), mikrodialyzační sonda musí být pro správný výpočet koncentrací kalibrována. Pro výpočet relativní výtěžnosti byly navrženy různé metody kalibrace, které se liší různou časovou náročností a přesností výsledků.

Metoda variace rychlosti průtoku

Kalibrace se u této metody provádí při různých rychlostech průtoku sondou, při kterých dostaneme odlišné koncentrace sledované látky v dialyzátu. Výsledky se vynášejí do grafu a extrapolací křivky k nulovému průtoku (při kterém je dosaženo rovnovážných podmínek a koncentrace v dialyzátu dosahuje aktuální koncentrace ve sledovaném prostředí) lze odhadnout relativní výtěžnost sondy. Tento proces byl aplikován na různé sloučeniny a popsán následující rovnicí (Jacobson a spol., 1985)

$$C_{dial} = C_0(1 - e^{-rA/F}),$$

kde C_{dial} je koncentrace sloučeniny v dialyzátu, C_0 koncentrace v okolí sondy, r hmotnostní transportní koeficient, A plocha membrány sondy a F je rychlost průtoku. Nevýhodou této metody je časová náročnost a navíc, pouhou extrapolací křivky do bodu nulového průtoku na základě předpokládané exponenciální funkce, získáme pouze odhad relativní výtěžnosti, který nemusí odpovídat skutečné hodnotě.

Metoda nulového toku (no-net-flux)

Tato metoda byla vyvinuta pro in vivo kalibraci a využívá rozdílných koncentrací sloučenin v perfuzním roztoku (Lonnroth et al., 1987). Pokud koncentrace dané sloučeniny v perfuzním roztoku (C_{perf}) je menší než její koncentrace v okolí sondy (C_{pf}), pak bude docházet k difuzi této sloučeniny přes membránu sond do perfuzního roztoku a výsledná koncentrace v dialyzátu (C_{dial}) bude tedy vyšší než původní v perfuzním roztoku. Naopak, při vyšší koncentraci látky v perfuzním roztoku, bude koncentrace

v dialyzátu menší. Pokud C_{perf} bude stejná jako C_{dial}, znamená to, že i C_{pf} je rovno C_{perf} a tudíž v důsledku nulového koncentračního gradientu nedochází k difuzi sledované sloučeniny přes membránu sondy.

Ke každé koncentraci v perfuzním roztoku jsou následně vynášeny do grafu úbytky, resp. přírůstky koncentrace v dialyzátu dle vztahu ($C_{dial} - C_{perf}$). Průsečík získaných křivek pak odpovídá C_{pf}. Ze strmosti regresní křivky pak lze vypočítat relativní výtěžnost sondy in vivo.

Metoda proměnného nulového toku (dynamic no-net-flux)

Tato metoda pro kalibraci in vivo za proměnných podmínek byla vyvinuta nedávno (Olson a Justice, 1993) s možností jejího využití na monitorování odpovědi extracelulárních sloučenin na aplikaci určitých léků. Hlavní rozdíl oproti metodě nulového gradientu spočívá v tom, že se využívá perfuzního roztoku pouze s jednou koncentrací látky, ale kalibrace se provádí na několika různých jedincích.

Retrodialýza

Tato metoda, na rozdíl od předchozích, je časově nenáročná a nevyžaduje kalibraci na rozdílných jedincích. Proto je vhodná i pro klinické studie. Při kalibraci touto metodou je perfuzní roztok obohacen sledovanou látkou, která přechází přes membránu sondy do extracelulární tekutiny. Ze ztráty dané látky zjištěné v dialyzátu se pak vypočítá relativní výtěžnost pomocí této rovnice:

$$\text{výtěžnost (\%)} = 100 - (C_{dial} / C_{perf} \times 100)$$

Nezbytná podmínka pro získání správného výsledku je nepřítomnost měřené látky v extracelulární tekutině před zahájením kalibrace.

Endogenní referenční sloučenina

Původní snahou bylo nalézt časově nenáročnou kalibrační metodu, která nevyžaduje rovnovážné podmínky. Z volně difundujících molekul byla nakonec

navržena jako nejvhodnější urea (Deguchi a spol., 1991). Na základě původních prací bylo zkoumáno použití urey k výpočtu relativní výtěžnosti za in vivo podmínek. Výsledky však nejsou dosud jednoznačné (Strindberga a Lonnroth, 2000).

Analýza vzorků dialyzátu

V současné době je možné využít přímou analýzu vzorků k získání dat téměř v reálném čase. Většina aplikací však vyžaduje předchozí oddělení sledované látky z endogenních sloučenin. Zásadní rozdíl spočívá v tom, že při použití některé separační metody máme možnost z jednoho vzorku stanovit koncetrace několika látek. V následující tabulce jsou uvedeny současně používané metody ke zpracování vzorků a následné detekci koncetrací sledovaných látek.

Analýza	**Detekce**
Metody založené na separaci látek	
kapalná chromatografie	*imunochemické techniky*
mikrobórová kapalná chromatografie	*UV absorbance*
kapilární kapalná chromatografie	*fluorescence*
kapilární elektroforéza	*LIF, elektrochemické techniky*
	hmotnostní spektrometrie
Ostatní metody	
biosensory	
imunochemické techniky	
hmotnostní spektrometrie	

Tabulka č. 1. Možnosti analýzy vzorků dialyzátu (upraveno podle Davies a spol., 2000). LIF-laserem indukovaná fluorescence

2.3.5. Příprava tkáňových řezů a jejich histologické zpracování

Měření difúzních parametrů jsme prováděli v čerstvě resekované tkáni gliových nádorů mozku. Jako kontrolní tkáň jsme použili mozkovou kůru temporálního laloku, odstraněnou v rámci chirurgické léčby farmakorezistentní epilepsie. Histologickým vyšetřením jsme v této tkáni nenalezli žádné změny. Ihned po chirurgickém vynětí jsme vzorek uložili do ledem chlazeného transportního roztoku následujícího složení: 134 mM NaCl, 1,25 mM K_2HPO_4, 26 mM $NaHCO_3$, 3,3 mM $MgCl_2$ a 20 mM glukózy. Ihned po přenesení z chirurgického sálu byla tkáň upevněna do vibrokatu (725M, Camden Instruments, U.K.), ve kterém jsme zhotovili 400 μm silné řezy. Po nakrájení jsme řezy uložili na nylonové síťce do roztoku se složením 134 mM NaCl, 1,25 mM K_2HPO_4, 26 mM $NaHCO_3$, 2 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgCl_2$ a 20 mM glukózy. Řezy byly v roztoku postupně oteplovány za současného sycení 95% O_2 a 5% CO_2 na pokojovou teplotu (22-24 °C). Na začátku měření jsme jednotlivé řezy přenesli do měřící komůrky kde byly řezy přidržovány pomocí platinového drátku ve tvaru U se sítí nylonových vláken. Řezy byly po celou dobu pokusu omývány výše uvedeným roztokem (10ml/min). Měření probíhala v různých oblastech tkáňového řezu v hloubce 200 μm. Měření jsme prováděli ve dvou až šesti řezech z každého vzorku tkáně, ve dvou až čtyřech různých lokalizacích a získané hodnoty jsme zprůměrnili.

Histopatologie

Tkáně, ve kterých probíhalo difúzní měření, jsme ihned po dokončení experimentu fixovali, podobně jako předtím nepoužité části resekovaných nádorů, 10% pufrovaným formolem a připravili jsme standardní parafínové bločky. Z parafínových bločků byly krájeny na rotačním mikrotomu Leica (RM 2135) 3 – 4 μm silné řezy, jak pro přehledná histologická barvení, tak pro potřeby imunohistochemických vyšetření. Řezy byly na

vodní hladině nataženy na podložní skla, které byly předem potažené silanem. Na takto připravených řezech probíhala potom další barvení a imunohistochemické reakce.

Hodnocení histologických parametrů nádorové tkáně

Všechny vzorky nádorové tkáně jsme histologicky vyšetřili a zařadili podle kriterií WHO klasifikace mozkových nádorů (Kleihues a Cavenee, 2000).

Dále jsme cíleně posuzovali histopatologickou stavbu míst v řezech z nádorové tkáně, ve kterých byla provedena difúzní měření a tu jsme korelovali s difúzními parametry ECP. Výsledky difúzních měření prováděných v oblastech prokrvácení, z blízkosti okraje nádoru v nepostižené peritumorózní tkáni nebo z blízkosti velkých cév byly z dalších analýz vyloučeny. Výsledky difúzních měření z oblasti nekróz v glioblastomech jsme posuzovali zvlášť a do celkové analýzy jsme začlenili pouze výsledky z vitálních oblastí nádorů.

Ve studii difúzních bariér v astrocytomech jsme kvantifikovali následující jednotlivá histologická kriteria nádorové tkáně.

a) Mitotickou aktivitu (mitotický index, MI) studovaného nádoru jsme stanovili jako počet typických i atypických mitóz v 10 náhodně vybraných zorných polích při velkém zvětšení v mikroskopu Olympus Bx51 (high-power field, HPF; 400x, 1 zorné pole = 0,017 mm^2).

b) Hustota nádorových buněk: Ve sledovaných řezech byla provedena přesná kvantifikace hustoty nádorových buněk - stanovili jsme ji spočítáním všech nádorových buněk v tkáňových řezech v nejméně 10 zorných polích (HPF) a hustotu jsme vyjádřili jako průměrný počet nádorových buněk v jednom zorném poli.

c) Vaskulární proliferace jsme v nádoru definovali jako přítomnost zvýšeného množství kapilár s hyperplázií endoteliální výstelky tvořící vícevrstevnou strukturu nebo glomerulární formace. Přítomnost hyperplastických cév jsme klasifikovali

semikvantitativně jako velmi výraznou (+++), středně výraznou (++), mírnou (+) nebo chybějící (-).

d) Přítomnost nekrózy jsme v nádoru uznali pouze tehdy, pokud jsme nalezli alespoň malé ložisko koagulační nekrózy. Jednotlivé nekrotické buňky nebyly považovány za nekrózu v nádoru.

e) Mimoto jsme v přehledných barveních hledali přítomnost dalších histologických znaků nádorové tkáně - buněčné a jaderné pleomorfie, solitární hypercelulární uzly, trombózy v drobných cévách, lymfocytární celulizaci, kalcifikace a produkci kolagenu s případnou chrupavčitou nebo kostní metaplázií.

2.3.6. Imunohistochemie

Imunohistochemie využívá k detekci antigenů ve tkáňových řezech kovalentní vazby mezi specifickou protilátkou aplikovanou na tkáň (primární protilátkou) a antigenním epitopem ve tkáni. Před aplikací protilátky je nutné epitop ve tkáňovém řezu zpřístupnit pro působení protilátky. Děje se tak různým způsobem – tepelnou indukcí („heat induced antigen retrieval"), natrávením tkáně enzymem (nejčastěji pepsinem nebo trypsinem), působením roztoků s různým pH nebo působením mikrovlného záření. Pokud využívá metoda enzymatickou detekci navázané protilátky (např. peroxidázová metoda), je nutné před vlastní reakcí zablokovat endogenní aktivitu tohoto enzymu. Pomocí různých detekčních systémů lišících se barevnou koncovkou i citlivostí je navázaná protilátka vizualizována vznikem barevného precipitátu ve tkáni v místě hledaného epitopu. Nejčastějším systémem detekce je použití polyklonálních protilátek značených biotinem vážících se na primární protilátku na základě mezidruhové specifity. Po aplikaci komplexu avidin-enzym dojde k vazbě avidinů na molekulu biotinu (v laboratorní praxi se používá avidin z bakterie Streptomyces avidini, označovaný jako streptavidin). Molekula enzymu navázaná na streptavidin přemění svojí aktivitou

bezbarvý roztok na barevný precipitát. Po dobarvení jader hematoxylinem, které je důležité pro orientaci v morfologii tkáně a pro přesnou lokalizaci precipitátu, je preparát odvodněn a zamontován pod krycí sklíčko; výsledky se potom hodnotí ve světelném mikroskopu.

Postup imunohistochemického barvení

Pro každou primární protilátku jsme nejdříve prováděli zkušební reakce na paletě různých tkání sloužících jako pozitivní a negativní kontroly s cílem stanovit pro danou reakci nejvýhodnější postup. Takto jsme pro každou reakci vybrali sérií pokusů optimální ředění, typ revitalizace antigenů před aplikací protilátky a optimální detekční systém, s cílem připravit reakci s co nejvýraznějším specifickým imunoprecipitátem při minimalizaci (nejlépe zamezení) nespecifických reakcí v pozadí. V tabulce č. 2 jsou uvedeny tkáně, které jsme používali při testovacích reakcích jako pozitivní kontroly pro daný typ protilátky. Jako negativní kontrolu jsme používali reakce, při kterých jsme během barvení neaplikovali primární protilátku.

Tabulka č. 2.

Tkáně používané jako pozitivní kontroly při reakcích na průkaz uvedených antigenů.

antigen	pozitivní kontrola
proliferační markery	
Ki67, topoizomeráza-IIα	karcinom tlustého střeva
cyclin D1	maligní lymfom z plášťových buněk
strukturální proteiny	
cytokeratiny, EMA	karcinom tlustého střeva
GFAP	astrocytom
onkoproteiny	
p53	karcinom mléčné žlázy
bcl-2, kaspáza 3	zdravá lymfatická uzlina
glykoproteiny ECM	kůže s jizvící se granulační tkání a ledvina

EMA, epitelový membránový antigen; GFAP, gliální fibrilární acidický protein; ECM, extracelulární matrix

Prokazované antigeny, primární protilátky a postupy detekce

A. Proliferační markery

Jako imunohistochemické proliferační markery slouží průkaz antigenů přítomných v buňkách jen v určitých fázích buněčného cyklu.

Antigen Ki-67 (MIB-1)

Ki-67 je jaderný nehistonový protein, který je imunohistochemicky detekovatelný protilátkou MIB-1 ve všech fázích buněčného cyklu mimo G0-fáze (Gerdes a spol., 1991). Souvislost mezi stupněm exprese MIB-1, proliferační aktivitou a klinickým průběhem byla ukázána u mnoha lidských malignit, včetně některých mozkových nádorů (Brown a Gatter, 1990). V naší studii jsme používali klon MIB-1 monoklonální myší protilátky (DakoCytomation) v ředění 1:100 s revitalizací antigenu pomocí mikrovlnného záření. Pro detekci komplexů antigen-protilátky jsme používali kit LSAB2 System HRP s chromogenem DAB.

Fosfo-topoizomeráza II-α (topo-IIα)

Topoizomeráza II-α je enzym, který se účastní segregace a kondenzace chromozomů v průběhu buněčného dělení (Holm a spol., 1989) a jehož průkazem lze ve tkáni identifikovat buňky nacházející se v S, G2 a M fázi buněčného cyklu (Lynch a spol., 1997). V naší studii jsme používali klon PT/3D4 monoklonální myší protilátky od firmy Immunotech v ředění 1:100. Reakce jsme s uspokojivými výsledky prováděli bez zvláštní revitalizace antigenů. Průkaz vzniklých imunokomplexů jsme prováděli obdobně jako u Ki-67.

Hodnocení reakcí na průkaz proliferačních markerů:

Preparáty jsme studovali pod velkým zvětšením v mikroskopu Olympus BX51 (high power field, HPF; 400x, 1 zorné pole = 0,017 mm^2). Pro každý studovaný marker jsme po digitalizaci obrazu spočítali alespoň 1000 buněk v nejméně pěti zorných polích. Krevní buňky a buňky cév v nádoru jsme vyloučili z kvantitativní analýzy a počítání buněk jsme prováděli pouze v těch zorných polích, kde byl vitální nádor. Pro analýzu jsme vybírali ty oblasti tkáňových řezů, ve kterých byla při přehledném zvětšení největší intenzita prováděné imunohistochemické reakce.

Výsledky reakcí proti antigenům odrážejícím proliferační aktivitu nádoru jsme vyjadřovali procentem imunoreaktivních jader ve tkáni - proliferačním indexem (PI).

B. Imunohistochemická detekce gliální a epiteliální diferenciace nádorových buněk

a. Gliální fibrilární acidický protein (GFAP)

Gliální fibrilární acidický protein je intermediálním filamentem neuroglie o velikosti 50 kDa a je to dobře známý imunohistochemický marker astrogliálních buněk jak normálních tak nádorových (Kleihues a spol., 1987). V našich studiích jsme pracovali s protilátkou firmy DakoCytomation, klon 6F2, v ředění 1:1000 s revitalizací antigenů aplikací mikrovlnného záření a detekčním kitem LSAB2 System HRP.

Hodnocení: Imunohistochemická reakce dobře znázorňovala nenádorové i nádorové astrocyty, čehož jsme využívali k potvrzení diagnózy astrocytární histogeneze nádorů. Ve studii zabývající se difúzními bariérami v astrocytomech jsme také hodnotili semikvantitativně hustotu sítě GFAP-pozitivních výběžků nádorových buněk, nezávisle třemi pozorovateli na škále: řídká (+), středně hustá (++) nebo velmi hustá (+++) síť GFAP-pozitivních výběžků; definitivní výsledek byl potom stanoven

konsensuálně. V ependymomech jsme touto reakcí prokazovali stupeň gliální diferenciace - reakce proti GFAP ozřejmila v pozitivních případech výběžky ependymomových buněk v perivaskulárních pseudorosetách.

b. Glykoproteiny extracelulární matrix

Pro průkaz přítomnosti a distribuce glykoproteinů ECM *in situ* v nádorové tkáni jsme vybrali všechny dostupné imunohistochemické protilátky reagující s parafínovým materiálem a s vysokou senzitivitou i specificitou k lidským epitopům.

Ve studiích zkoumající složení ECM v lidských gliomech jsme glykoproteiny ECM prokazovali protilátkami v daném ředění a s příslušným detekčním systémem, jak je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3.
Primární protilátky proti glykoproteinům ECM používané v našich studiích.

Antigen (klon protilátky)	Firma	Ředění	Demaskování antigenu, detekční systém
Tenascin (klon BC-24)	Sigma Aldrich	1:500	mikrovlnné záření*
Laminin (klon LAM-89)	Sigma Aldrich	1:500	40 min. natrávení trypsinem*
Vitronectin (klon BV2)	Chemicon	1:100	mikrovlnné záření**
Fibronectin (klon IST-4)	Sigma Aldrich	1:50	30 min. natrávení trypsinem, mikrovlnné záření**
Kolagen typu I (kat.č. 2150-0020)	Biotrend	1:10	40 min. natrávení trypsinem*
Kolagen typu II (kat.č. NCL-COLL-IIp)	Novocastra	1:20	30 min. natrávení trypsinem*
Kolagen typu III (kat.č. AM167-5M)	Biogenex	1:100	30 min. natrávení trypsinem*
Kolagen typu IV (klon CIV 22)	Dako	1:50	mikrovlnné záření*
Kolagen typu V (klon V-3C9)	Chemicon	1:150	mikrovlnné záření*
Kolagen typu VI (klon VI-26)	Chemicon	1:150	mikrovlnné záření*

(LSAB detection system, ** ChemMate detection system; DakoCytomation)*

Hodnocení reakcí:

Distribuci sledovaných glykoproteinů ECM jsme po imunohistochemickém znázornění sledovali odděleně ve třech tkáňových kompartmentech: 1. v souvislosti s cévami, 2. v mezibuněčném prostoru obklopujícím vlastní nádorové buňky, 3. v tzv. infiltrativní zóně, tj. v konfrontační oblasti mezi nádorovou a okolní nepostiženou tkání, pokud byla tato oblast v resekovaném materiálu zastižena. Vzhledem k extracelulární lokalizaci a často diskrétním imunoreakcím proti glykoproteinům ECM v ECP jsme se snažili zvýšit citlivost našeho hodnocení provedených reakcí - každý tkáňový řez jsme odečítali dvakrát - nejdřív bez dobarvení hematoxylinem (zejména pro stanovení přibližné hustoty daného glykoproteinu ve tkáni), poté byla lokalizace a distribuce proteinu morfologicky upřesněna po dobarvení řezů Harrisovým hematoxylinem. Přítomnost glykoproteinů v mezibuněčném prostoru obklopujícím nádorové buňky jsme hodnotili jako silnou (++), slabou (+) nebo nepřítomnou (-) fibrilární nebo tečkovitou imunopozitivitu. Zaznamenávali jsme rovněž fokální nebo difúzní charakter distribuce daného glykoproteinu ve tkáni. Pro každý glykoprotein vyskytující se ve stěně nádorových cév jsme spočítali přesné procento pozitivních cév v řezech a výsledek jsme vyjádřili semikvanititativně: glykoprotein v cévní stěně není přítomen (-), je přítomen v méně než 50% zastižených cév (+), je přítomen ve více než 50% cév (++) a je přítomen ve stěně všech zastižených cév (+++). Vždy jsme také sledovali distribuci studovaného glykoproteinu ve stěně cévy ve vztahu např. k bazální membráně nebo adventicii.

Stupňovitou kvantifikaci množství glykoproteinů ECM jsme použili v korelačních analýzách se změnami geometrie ECP v astrocytomech.

2.3.7. Statistické hodnocení

Závislost mezi kategorickými proměnnými jsme testovali pomocí Pearsonova chi-kvadrát (χ^2) testu, vztah mezi numerickými veličinami pomocí Spearmanovy korelační analýzy (s korelačním koeficientem, r) a závislost mezi kategorickými a numerickými veličinami pomocí Mann-Whitneyho testu. Stupeň závislosti mezi nominálními veličinami jsme stanovovali výpočtem kontingenčního koeficientu (C).

Veškeré statistické výpočty jsme prováděli pomocí počítačového programu SPSS (verze 10, SPSS Inc.). Hodnoty významnosti (p) < 0,05 jsme považovali za signifikantní, p < 0,01 za vysoce signifikantní. Používali jsme interval spolehlivosti 95%.

2.4. VÝSLEDKY

2.4.1. Difúzní parametry ECP během tranzientní hypoxie/ischémie

Energetická deplece a dysfunkce transportních systémů během ischémie/anoxie vede k transmembránovému přesunu iontů, který je doprovázen pohybem odpovídajícího množství molekul vody v zájmu zachování stejné osmolality vně a uvnitř buněk a zvětšení buněčného objemu (pro přehled viz Syková, 1983; Kimelberg a Ransom, 1986; Syková, 1992a). Změny difúzních parametrů vyvolané zvětšením objemu buněk během anoxie má dva závažné důsledky:

1. neuroaktivní látky a metabolity jsou nahromaděny ve zmenšeném prostoru, nemohou volně difundovat a tudíž jejich koncentrace může snadno dosáhnout toxických hodnot a vést k dalšímu poškození buněk,

2. nesynaptická komunikace mezi buňkami je ztížena až znemožněna a výsledkem je funkční deficit nervové tkáně, který může ovlivnit reparační pochody v tzv. penumbře, t.j. zóně, která má částečné krevní zásobení z okolních oblastí a kde jsou buňky poškozeny jen mírně.

Uvolnění glutamátu z neuronů za fyziologických nebo patologických podmínek je spojeno se zvýšením extracelulární koncentrace K^+, alkalicko-kyselou změnou extracelulárního pH a zvýšením metabolizmu Ca^{2+} (Chesler a Kaila, 1992). Glutamát, uvolněný do ECP, je z něj rychle odstraněn a pomocí vysokoafinitních a vysokokapacitních nosičů přenesen do syncytia astrocytů (Attwell, 2000). Tento přenos však selhává za patologických podmínek, jako je ischémie nebo anoxie. Opakované uvolňování glutamátu potom vede k vzestupu jeho koncentrace v ECP až na neurotoxické hladiny (Benveniste a spol., 1988). Přesuny iontů přes buněčnou membránu, ke kterým dochází po uvolnění glutamátu, doprovází pohyb vody z extra- do intracelulárního prostředí. Řada prací provedených na tkáňových kulturách popisuje

rychlé zvětšení objemu buněk, následující po aktivaci ionotropních i metabotropních glutamátových receptorů (Kimelberg, 1987; Hansson a spol., 1994). Zvěšení objemu astrocytů je způsobeno aktivací Na^+-K^+-$2Cl^-$ kotransportu glutamátem a vstupem Na^+, Cl^- a vody do buněk (Kempski a spol., 1991). Kromě toho působí glutamát zvětšení objemu astrocytů rovněž stimulací vstupu K^+ do buněk, které je závislé na extracelulární koncentraci Ca^{2+} (Bender a Norenberg, 1994). Zvětšení objemu astrocytů během acidózy tkáně při ischémii nebo traumatu je rovněž závislé na koncentraci extracelulárního Ca^{2+}, zatímco změny $[Ca^{2+}]_i$, jak se zdá, nehrají roli (Plesnila a spol., 1998). Zvětšení buněčného objemu však může *in vivo* způsobit změny difúzních parametrů ECP (Voříšek a Syková, 1997b; Syková a spol., 1999; Syková a spol., 2000b), zpomalit difúzi glutamátu v ECP a tím zvýšit jeho neurotoxicitu a následné poškození neuronů.

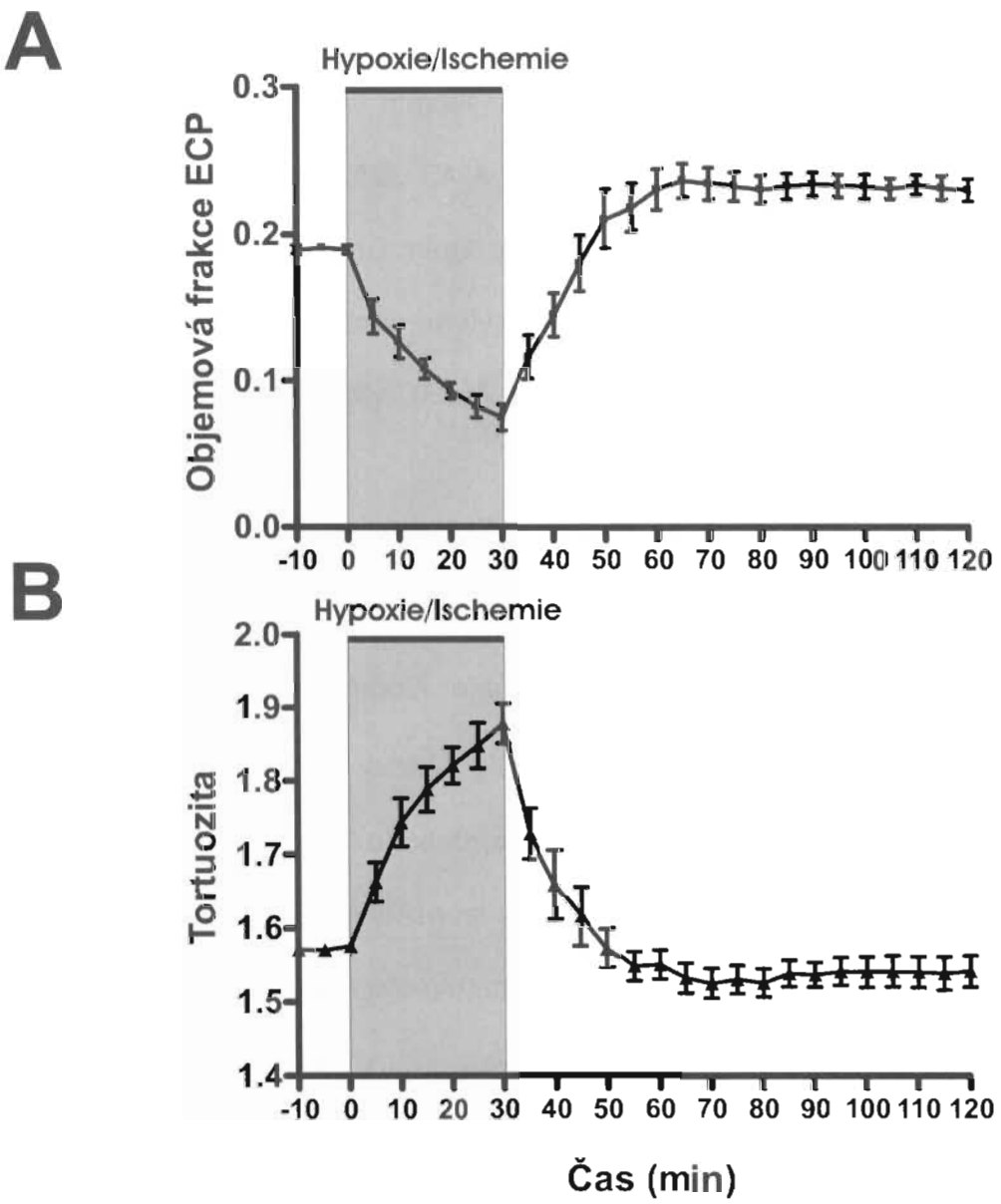
Dosud provedené experimenty studující změny difúzních parametrů v mozkové tkáni *in vivo* během hypoxie/ischémie byly provedeny na modelu terminální anoxie (Lundbaek a Hansen, 1992; Syková a spol., 1994; Voříšek a Syková, 1997b).

V naší studii (Homola a spol, 2006) byla tranzientní ischémie/hypoxie vyvolaná snížením obsahu kyslíku ve vdechované směsi (10% O_2 + 90% N_2) a současným podvazem arteria carotis communis na jedné straně na dobu 30 minut.

Difúzní parametry ECP v průběhu experimentu jsme sledovali v somatosenzorické kůře ipsilaterálně k podvázané a. carotis v hloubce 1200 – 1500 μm (korová vrstva V) v 5-ti minutových intervalech.

Kontrolní hodnoty difúzních parametrů ECP (počáteční hodnoty za normoxických podmínek) v šedé hmotě V. korové vrstvy byly $\alpha = 0.19 \pm 0.03$ a $\lambda = 1.57 \pm 0.01$, ($n = 12$, průměrná hodnota ± střední chyba průměru, S.E.M.). Během hypoxie/ischémie se hodnoty α postupně snižovaly až na 0.07 ± 0.01 (Obr. 4A). Tortuozita se současně

postupně zvyšovala až na 1.88 ± 0.03 (Obr. 4B). Po uvolnění podvázané a. carotis a normoxické ventilaci, oba sledované parametry se začaly navracet zpět k počátečním hodnotám, kterých dosáhly po 20 minutách normoxie. Během následujících 20 minut α nadále zvolna vzrůstala až na 0.23 ± 0.01, zatímco λ poklesla na 1.53 ± 0.06. Ve zbývajícím čase 90 minutové reperfúze zůstaly oba sledované parametry na těchto hodnotách (Obr. 4A, 4B).



Obrázek 4. Časový průběh změn v objemové frakci (A) a tortuozitě (B) extracelulárního prostoru mozkové kůry potkana během tranzientní hypoxie/ischémie a následné reperfúze.

2.4.2. Energetický metabolismus a glutamát během tranzientní hypoxie/ischémie

V této studii jsme pro stanovení koncentrací energetických metabolitů a glutamátu v extracelulární tekutině použili mikrodialýzu (Homola a spol., 2006). Mikrodialyzační sonda byla zavedena do somatosenzorické kůry na stejnou stranu jako byl podvaz a. carotis. K odběru jsme použili sondy s dvojitým lumen, zevního průměru 0,5 mm, délkou membrány 2mm a propustností do 20 kDa (CMA 12, 2mm, CMA Microdialysis, Švédsko). Zavedená mikrodialyzační sonda byla připojena k perfuzní pumpě (CMA 102, CMA Microdialysis, Švédsko) a kontinuálně promývána rychlostí 2μl/min perfuzním roztokem s obsahem 147 mmol/l NaCl; 2,7 mmol/l KCl; 1,2 mmol/l $CaCl_2$ a 0,85 mmol/l $MgCl_2$ (Perfusion fluid CNS, CMA Microdialysis, Švédsko). Mikrodialyzační vzorky byly odebírány v intervalech 10 minut a ihned zamraženy při teplotě -40 °C. Při této teplotě byly skladovány až do doby analýzy. Po rozmražení a odstředění dialyzátu byly vzorky analyzovány enzymaticky (CMA 600 Microdialysis Analyser, CMA Microdialysis, Švédsko).

Na začátku a konci každého experimentu byla zjištěna výtěžnost používané sondy pomocí kalibračního roztoku se známou koncentrací různých sloučenin. Kalibrační roztok obsahoval 2,5 mmol/l laktátu; 250 μmol/l pyruvátu; 5,55 mmol/l glukózy; 250 mmol/l glycerolu a 25 μmol/l glutamátu (Calibrator, CMA Microdialysis, Švédsko). Porovnáním zjištěných koncentrací v dialyzátu ke koncentracím v kalibračním roztoku jsme vypočítali relativní výtěžnost sondy, která byla 24,3 ± 1,6% pro laktát, 23,1 ± 0,6% pro pyruvát; 13,7 ± 0,8% pro glutamát a 14,1 ± 0,8% pro glukózu.

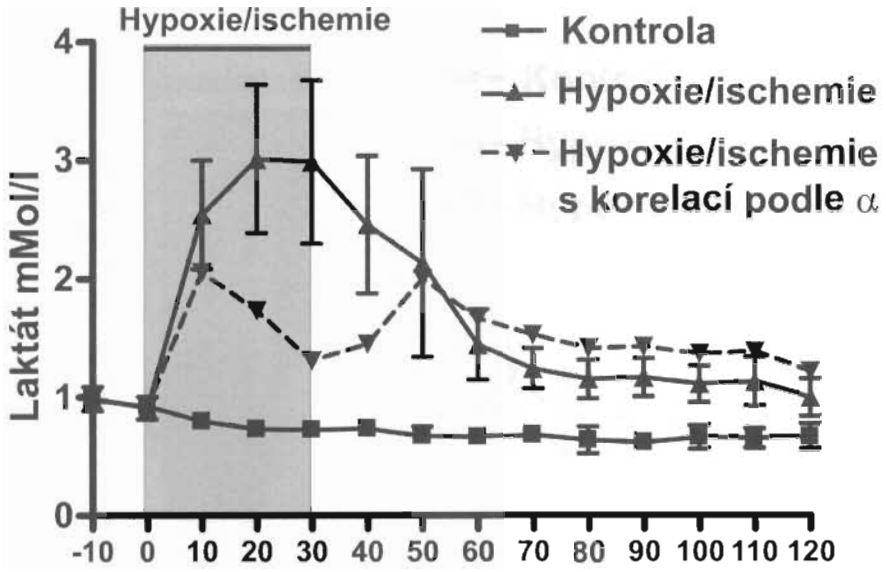
Kontrolní skupinu tvořila zvířata, kterým byla vypreparována a. carotis, ale neprovedli jsme její podvaz, a po celou dobu experimentu byla ventilována vzduchem (n = 5). Abychom ukázali do jaké míry jsou zjištěné koncentrace metabolitů ovlivněny

změnami ve velikosti ECP, do výsledných grafů jsme uvedli i koncentrace upravené podle změn v objemové frakci ECP.

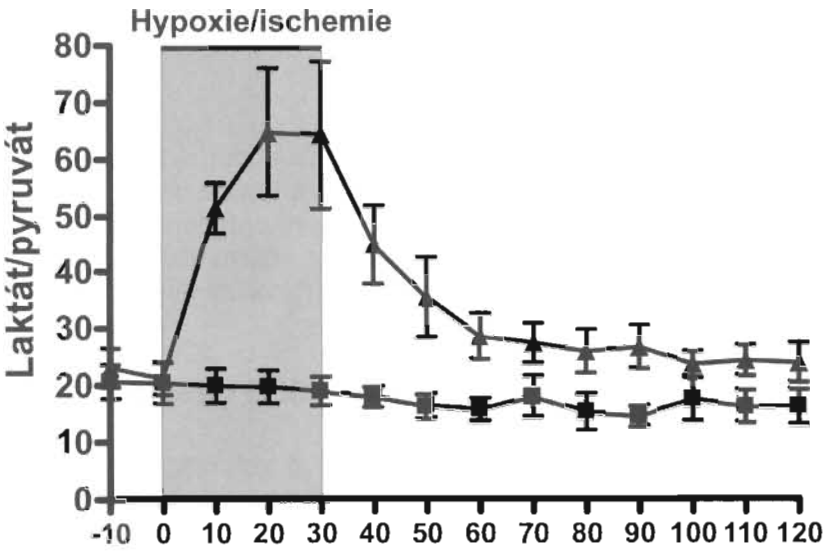
Po 60-ti minutové stabilizaci následující po zavedení mikrodialyzační sondy do mozkové kůry byly počáteční hodnoty laktátu 0.99 ± 0.06 mmol/l a poměr laktát/pyruvát 23.44 ± 1.85, (n=9). Hypoxie/ischémie vedla k okamžitému vzestupu laktátu a po 20 minutách se extracelulární koncentrace ustálila na hodnotě 3.01 ± 0.62 mmol/l (obr. 5A). Podobný časový průběh jsme zaznamenali i u poměru laktát/pyruvát, jehož hodnota ve 20 minutách vzrostla na 64.79 ± 11.24 (obr. 5B). Během reperfúze hodnoty laktátu i poměr laktát/pyruvát postupně klesaly a po 30 minutách se přiblížily na úroveň kontrolních hodnot.

Počáteční koncentrace glutamátu byla 6.85 ± 0.97 μmol/l a po celou dobu hypoxie/ischémie vzrůstala až na 59.30 ± 15.90 μmol/l. Po obnovení normoxie došlo zpočátku ke strmějšímu poklesu koncentrace během prvních 20 minut, který byl ve zbývající části reperfúze následován dalším, velmi pozvolným poklesem k původním hodnotám. Koncentrace glukózy rychle poklesla z původních 2.94 ± 0.18 mmol/l již v prvních 10 minutách, minimální koncentraci jsme pak zaznamenali ve 20 minutě (1.45 ± 0.23 mmol/l).

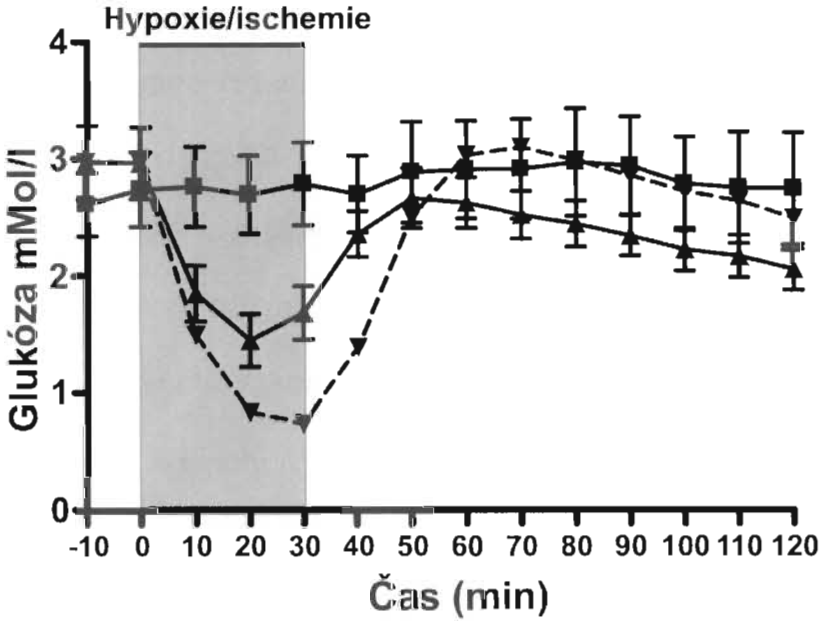
A

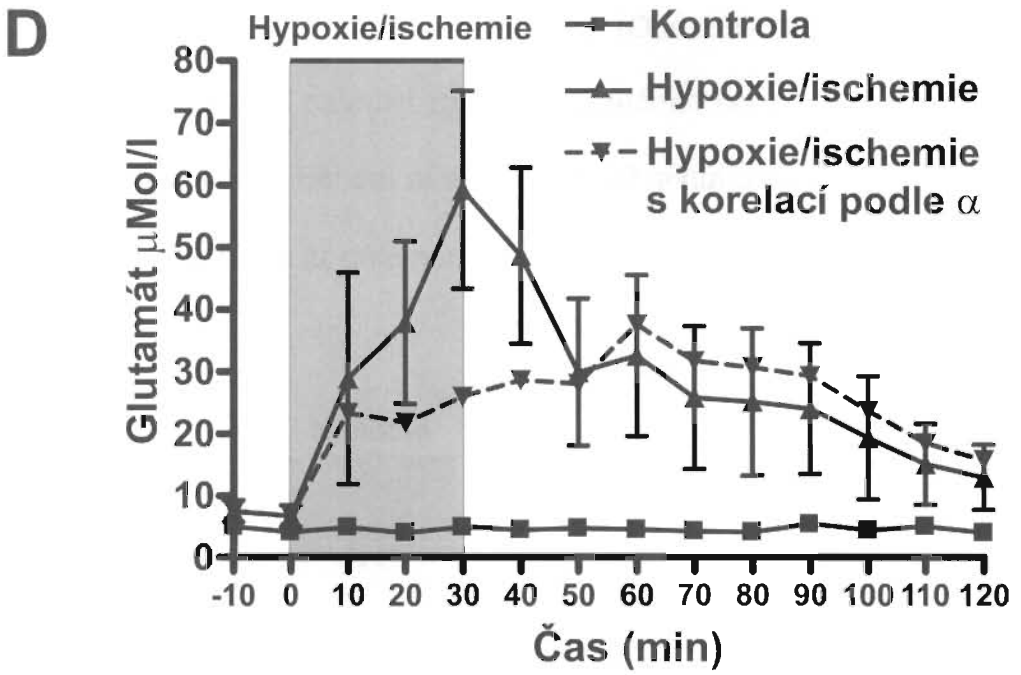

Hypoxie/ischemie
Kontrola
Hypoxie/ischemie
Hypoxie/ischemie
s korelací podle α
Laktát mMol/l
0
1
2
3
4
-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

B


Hypoxie/ischemie
Laktát/pyruvát
0
10
20
30
40
50
60
70
80
-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

C


Hypoxie/ischemie
Glukóza mMol/l
0
1
2
3
4
-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Čas (min)



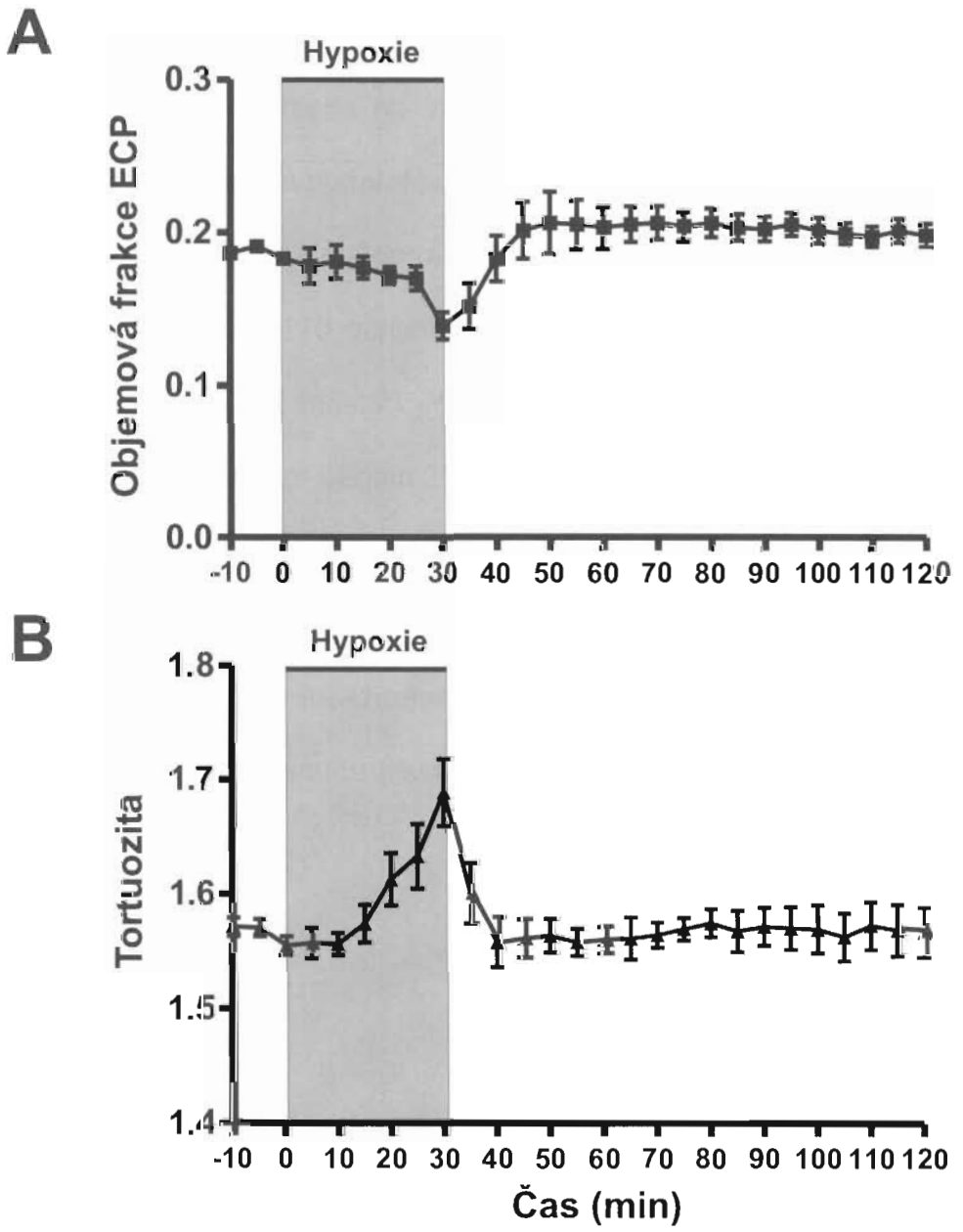
Obrázek 5. Časový průběh změn v koncentraci extracelulárního laktátu (A), poměru laktát/pyruvát (B), koncentraci extracelulární glukózy (C) a glutamátu (D) během tranzientní hypoxie/ischémie a následné reperfúze. Přerušovanou čarou jsou znázorněny koncentrace metabolitů korigované o změny ve velikosti ECP – ukazují teoretické koncentrace metabolitů neovlivněné změnami ve velikosti objemové frakce ECP.

2.4.3. Difúzní parametry ECP během tranzientní hypoxie

V této studii (Zoremba a spol., 2007) jsme sledovali změny difúzních parametrů ECP v průběhu přechodné hypoxie. Tranzientní hypoxie byla vyvolaná snížením obsahu kyslíku ve vdechované směsi (6% O_2 + 94% N_2) po dobu 30 minut. Následně byla zvířata ventilována vzduchem po dobu 90 minut. Difúzní parametry ECP v průběhu experimentu jsme sledovali v somatosenzorické kůře v hloubce 1200 – 1500 μm (korová vrstva V) v 5-ti minutových intervalech.

Kontrolní hodnoty difúzních parametrů ECP (počáteční hodnoty za normoxických podmínek) v šedé hmotě V. korové vrstvy byly $\alpha = 0.18 \pm 0.01$ a $\lambda = 1.54 \pm 0.01$, ($n = 7$). Během hypoxie se hodnoty α prvních 25 minut významně nezměnily, k poklesu došlo teprve na konci hypoxické periody, kdy průměrná hodnota objemové frakce ECP byla

0.14±0.01 (Obr. 6A). Tortuosita se významně neměnila prvních 15 minut, pak se postupně zvyšovala až na 1.68 ± 0.03 (Obr. 6B). Po reoxygenaci, oba sledované parametry se rychle navrátili zpět k počátečním hodnotám, kterých dosáhli po 10 - 20 minutách normoxie. Během následujících 20 minut α nadále zvolna vzrůstala až na 0.21 ± 0.01, zatímco λ se již dále neměnila.



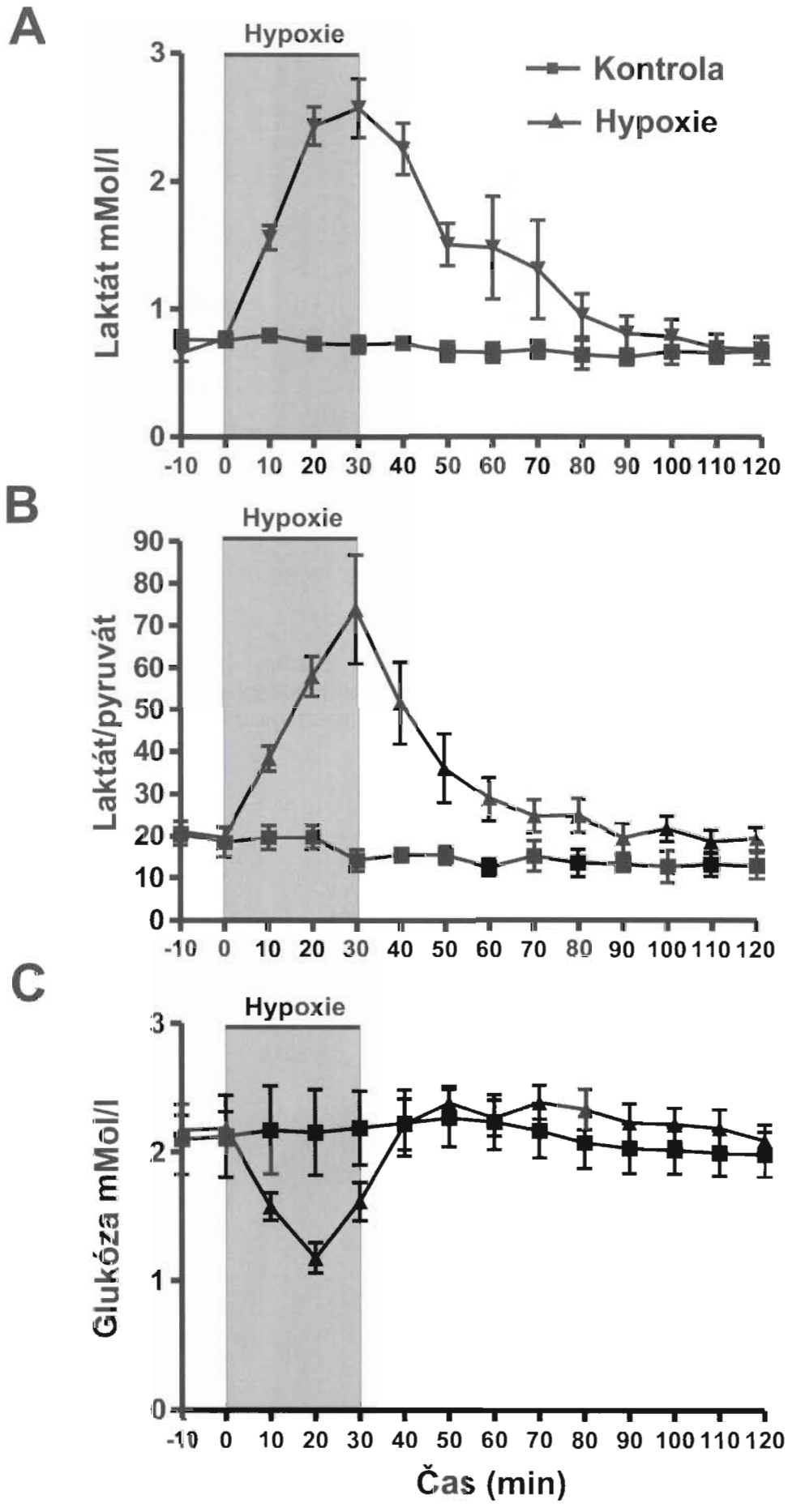
Obrázek 6. Časový průběh změn ve velikosti objemové frakce ECP a tortuozity během tranzientní hypoxie a následné reoxygenace.

2.4.4. Energetický metabolismus a glutamát během tranzientní hypoxie

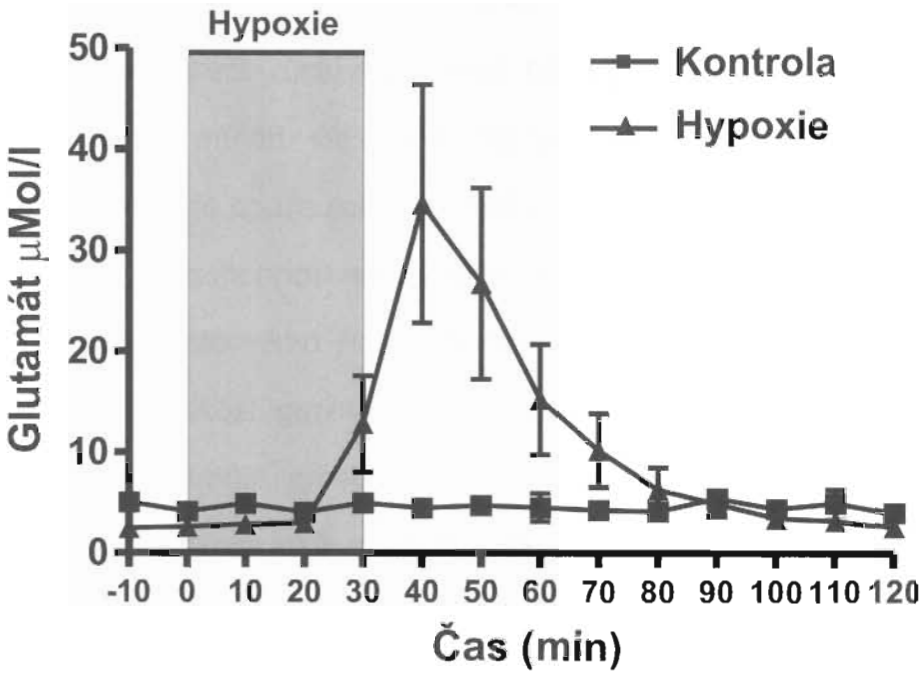
Po 60-ti minutové stabilizaci následující po zavedení mikrodialyzační sondy do mozkové kůry byly počáteční hodnoty laktátu 0.77 ± 0.03 mmol/l a poměr laktát/pyruvát 20.89 ± 2.65, (n = 12). Redukce množství vdechovaného kyslíku vedla k okamžitému vzestupu laktátu, který pokračoval po celou dobu hypoxické periody s dosažením maximální extracelulární koncentrace 2.57 ± 0.62 mmol/l na jejím konci (obr. 7A).

Podobný časový průběh jsme zaznamenali i u poměru laktát/pyruvát, jehož hodnota ve 30 minutách vzrostla na 73.84 ± 12.05 (obr. 7B). Během reoxygenace hodnoty laktátu i poměr laktát/pyruvát postupně klesaly a po 60 minutách se přiblížily na úroveň kontrolních hodnot. Koncentrace glukózy rychle poklesla z původních 2.18 ± 0.12 mmol/l již v prvních 10 minutách, minimální koncentraci jsme pak zaznamenali ve 20 minutě (1.18 ± 0.12 mmol/l). Po obnovení normoxie se koncentrace glukózy navrátila k výchozím hodnotám během 20 minut.

Počáteční koncentrace glutamátu byla 3.22 ± 0.31 µmol/l a v prvních 20 minutách hypoxie se významně neměnila. K nárůstu koncentrace glutamátu došlo až na konci hypoxické periody s dosažením maxima 34.62 ± 11.78 µmol/l za dalších 10 minut. Poté již koncentrace glutamátu klesala k původním hodnotám, kterých dosáhla 60 minut po reoxygenaci.


A
Hypoxie
Kontrola
Hypoxie
Laktát mMol/l
3
2
1
0
-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
B
Hypoxie
Laktát/pyruvát
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
C
Hypoxie
Glukóza mMol/l
3
2
1
0
-10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Čas (min)

D



Obrázek 7. Časový průběh změn v koncentraci extracelulárního laktátu (A), poměru laktát/pyruvát (B), koncentraci extracelulární glukózy (C) a glutamátu (D) během tranzientní hypoxie a následné reoxygenace.

2.4.5. Difúzní parametry ECP v gliových nádorech

Přes intenzivní výzkum zůstávají mnohé faktory ovlivňující biologické vlastnosti primárních mozkových nádorů stále neobjasněné. Je zřejmé, že biologické chování těchto nádorů neovlivňuje pouze schopnost nádorových buněk neregulovaně se dělit a proliferovat, ale rovněž schopnost aktivní migrace a invazivního šíření. To jsou faktory, které jsou kriticky závislé mimo jiné také na vlastnostech okolního mezibuněčného prostoru jako je jeho velikost, geometrie a složení.

Zvětšení extracelulárního prostoru v lidských gliomech bylo pozorováno už ve starších elektron-mikroskopických studiích (Bakay, 1970a) i při studiu mezibuněčných prostorů pomocí radioaktivně značené sacharózy (Bakay, 1970b). Nicholson a Syková (1998) ukázali, že velikost a geometrii ECP v nervové tkáni nejpřesněji odráží difúze látek (extracelulárních markerů) v ECP. TMA^+-iontoforetická metoda v reálném čase je jedinou metodou, která umožňuje zjistit absolutní hodnoty těchto parametrů, zatímco ostatní metody studují pouze jeden z těchto parametrů nebo měří jen jejich relativní změny (Nicholson a Syková, 1998).

V naší studii (Vargová a spol., 2003) jsme pomocí TMA^+-iontoforetické metody v reálném čase studovali všechny tři difúzní parametry ECP, a to jak ve zdravé mozkové kůře, tak zejména ve tkáňových řezech nejčastěji se vyskytujících primárních mozkových nádorů. Jmenovitě pilocytárních astrocytomů, ependymomů a meduloblastomů u dětských pacientů a difúzních infiltrujících astrocytomů a oligodendrogliomů u dospělých (Davis a Preston-Martin, 1998). Abychom mohli stanovit vztah mezi změnami difúzních parametrů a biologickými vlastnostmi studovaných nádorů, srovnávali jsme získané parametry ECP s proliferační aktivitou nádorů vyjádřenou mitotickou aktivitou a imunohistochemickým průkazem proliferačních markerů Ki-67 (MIB-1) a topoizomerázy II-α.

Tkáně pro měření difúzních parametrů jsme získali během neurochirurgických operací 34 pacientů. V 31 případech se jednalo o tkáně nově diagnostikových

primárních mozkových nádorů různého stupně malignity (26 gliomů a 5 meduloblastomů), ve 4 případech o morfologicky nezměněnou kůru temporálního laloku resekovanou v rámci chirurgické léčby epilepsie temporálního laloku při mesiotemporální skleróze.

Difúzní parametry v lidském temporálním neokortexu

Měření difúzních parametrů ECP jsme prováděli na úrovni III. a IV. korové vrstvy temporálního neokortexu. Pro statistickou analýzu jsme použili pouze měření v těch řezech, kde byla histologicky vyloučená jiná než normální struktura (respektive bez přítomnosti porušeného vývoje kůry v rámci kortikálních dysplazií nebo astrogliózy různé etiologie). Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4 (případy č. 1 - 4).

Průměrné hodnoty v kontrolní tkáni činily 0,24 ± 0,01 pro α, 1,55 ± 0,03 pro λ a 3,66 ± 0,96 (x $10^{-3}s^{-1}$) pro nespecifický uptake k' (průměr ± S.E.M (střední chyba průměru); n = 9, n udává počet řezů).

Pilocytární astrocytomy

Všechny zkoumané pilocytární astrocytomy (WHO grade I, případy 5 - 9 v tabulce č. 4) měly architektonicky i cytologicky bifazickou strukturu s různě výrazným zastoupením kompaktně uložených bipolárních buněk s Rosenthalovými fibrilami a oblastí z řídce uložených multipolárních buněk na mikrocystickém pozadí (obr. 8 - A). V pilocytárních astrocytomech byly průměrné hodnoty objemové frakce ECP α 0,37 ± 0,02 a tortuozity λ 1,50 ± 0,03; průměrná hodnota k' činila 5,11 ± 0,75 x $10^{-3}s^{-1}$ (n = 12).

V porovnání s kontrolní tkání z temporální kůry byla α v pilocytárních astrocytomech signifikantně zvýšená, zatímco λ a k' se od kontroly statisticky významně nelišily (tabulka č. 4, signifikantní odlišnost označena *). Nízkou proliferační aktivitu pilocytárních astrocytomů charakterizoval počet mitóz v průměru nepřesahující 1 na 10 zorných polí, proliferační indexy kolísaly mezi 0,4 - 2,6 % (MIB-1) a 0,1 - 3,2 % (topo-IIα).

Difúzní fibrilární astrocytomy

Difúzní fibrilární astrocytomy (WHO grade II) se vyznačovaly mírným zvýšením buněčnosti nepravidelně rozložených nádorových astrocytů s jemnými fibrilárními výběžky. Nádorové buňky jevily známky jen velmi mírných atypií a mitotická aktivita byla buď velmi nízká nebo nulová (obr. 8 - B). Difúzní parametry ECP jsme v difúzních astrocytomech měřili u pěti případů (tabulka č. 4, případy 10 - 14). Průměrné hodnoty objemové frakce ECP α (0,29 ± 0,01; n = 14) byly signifikantně vyšší než v kontrolní tkáni, avšak nižší než u pilocytárních astrocytomů. Tortuozita byla podobná normálnímu kortexu, s průměrnými hodnotami 1,57 ± 0,04. Extrémně vysokou tortuozitu (> 2,00) jsme naměřili v případě č. 10, kde byl nádor histologicky charakterizován hustě fascikulárním uspořádáním nádorových buněk a jejich výběžků. Nespecifický zpětný příjem k' se nelišil signifikantně od kontrol (4,75 ± 0,89 $x10^{-3}s^{-1}$). Mitotický index (0 - 3 / 10 HPF) a proliferační indexy MIB-1 (1,7 - 7,2 %) a topo-IIα (1,0 - 7,6%) odrážely mírně zvýšenou proliferační aktivitu difúzních astrocytomů v porovnáním s pilocytárními astrocytomy, ta však byla výrazně nižší než u astrocytomů s vysokým stupněm malignity.

Tabulka č. 4.

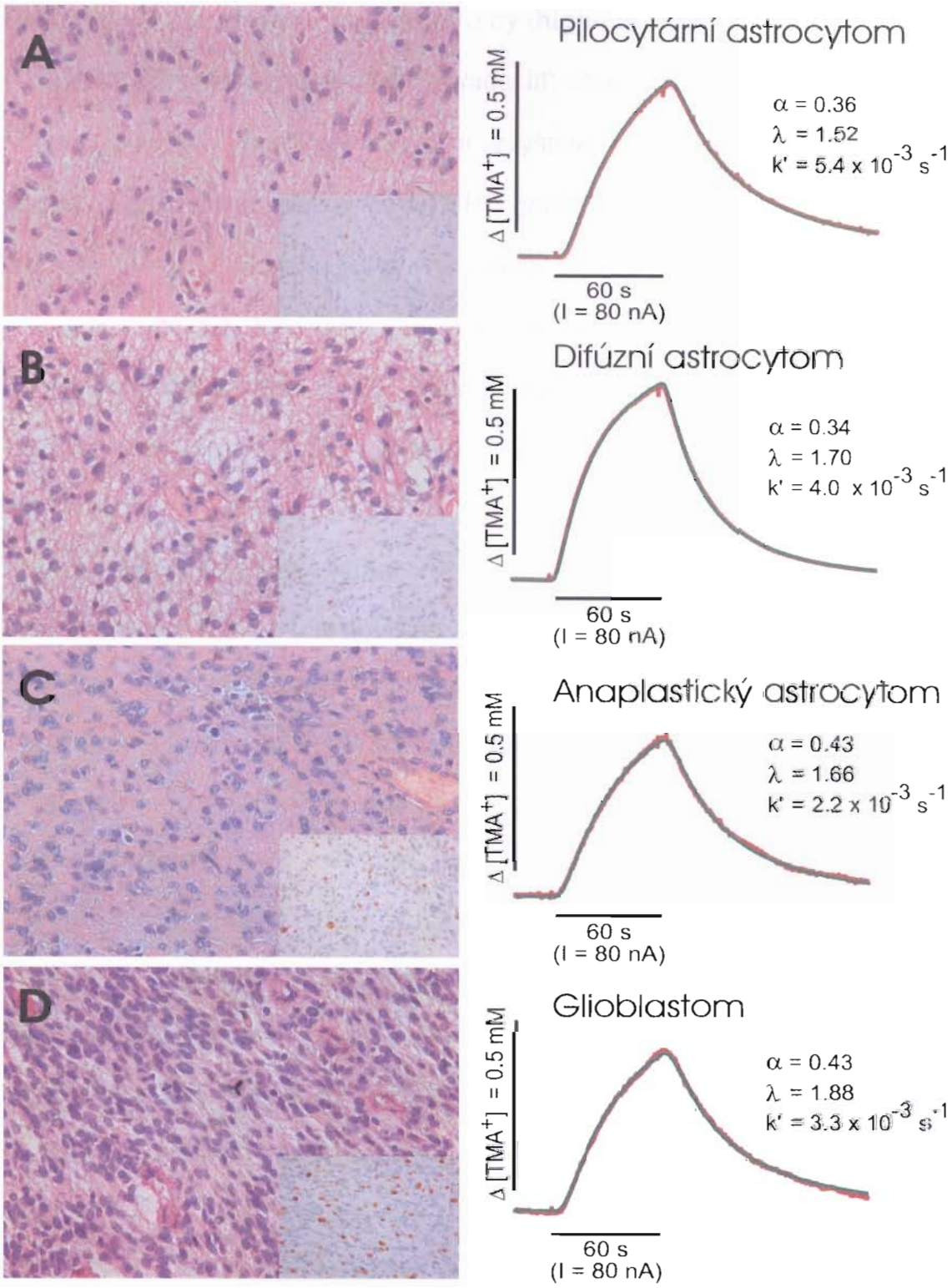
Průměrné hodnoty difúzních parametrů ECP ± S.E.M.; objemová frakce α, tortuozita λ a nespecifický zpětný příjem k', mitotický index (MI) a proliferační indexy MIB-1 PI a topo-II α PI v temporální kůře a ve spektru primárních mozkových nádorů.

č.	Věk, pohl.	α	λ	k' ($x10^3 s^{-1}$)	MI	MIB-1 PI	topo II-α PI	morfologie	lok.
Kontrolní kortex									
1	10, ž	0,24±0,01	1,61±0,01 *n=2, N=7*	2,57±0,47				temporální neokortex	
2	10, ž	0,23±0,01	1,65±0,01 *n=2, N=6*	1,41±0,05				temporální neokortex	
3	17, ž	0,24±0,01	1,50±0,02 *n=3, N=8*	1,87±0,16				temporální neokortex	
4	26, m	0,24±0,01	1,48±0,02 *n=2, N=6*	8,57±0,32				temporální neokortex	
Pilocytární astrocytom (grade I)									
5	2,5, ž	0,35±0,01*	1,61±0,01 *n=2, N=5*	3,31±0,23	0	0,6	0,2	alternující bifazická struktura (kompaktní / mikrocystická)	ChO sin.
6	4, ž	0,37±0,02*	1,52±0,03 *n=3, N=9*	2,59±0,78	0	0,4	0,1	převážně mikrocystická struktura	ChO sin.
7	7, m	0,38±0,02*	1,52±0,05 *n=3, N=8*	6,90±0,82	1	1,2	0,4	alternující bifazická struktura	Crbl
8	17, m	0,38±0,01*	1,37±0,01 *n=2, N=6*	7,80±0,75*	0	1,6	2,2	převážně mikrocystická struktura	Crbl
9	10, m	0,41±0,02*	1,49±0,01 *n=2, N=6*	4,96±0,26	1	2,6	3,2	převážně mikrocystická struktura, mírný perivaskulární edém	Crbl
Astrocytom (grade II)									
10	12, m	0,27±0,01	2,12±0,07* *n=5, N=15*	7,13±1,03	0	3,8	4,4	střední buněčnost, fibrilární pozadí s fascik. uspořádáním	Thal dex.
11	28,m	0,28±0,01*	1,52±0,01 *n=4, N=12*	7,00±0,27*	3	3,2	3	nízká buněčnost, fibrilární pozadí	TP dex.
12	26, m	0,29±0,01*	1,57±0,02 *n=4, N=12*	3,13±0,62	3	7,2	7,6	nízká buněčnost, fibrilární pozadí, ložiskově gemistocyty	F sin.
13	24, f	0,30±0,01*	1,45±0,01 *n=5, N=15*	7,82±0,72*	2	1,7	1	nízká buněčnost, fibrilární pozadí	O sin.
14	9, m	0,31±0,02*	1,69±0,02* *n=5, N=17*	3,70±0,50	1	6,6	7,2	střední buněčnost, fibrilární pozadí	TP sin.
Anaplastický astrocytom (grade III)									
15	47, ž	0,41±0,01*	1,67±0,03* *n=4, N=11*	5,12±0,43	11	19,4	16,2	nízká buněčnost, gemistocyty, perivaskulární edém	FT sin.
16	8, ž	0,52±0,02*	1,67±0,03* *n=3, N=9*	5,49±0,78	24	31,2	32,0	vyšší buněčnost s výraznými atypiemi	T dex.
17	24, ž	0,53±0,01*	1,87±0,03* *n=2, N=6*	9,93±1,13*	26	33,4	35,4	hypercelularita	TP sin.

Tabulka č. 4 - pokračování

č.	Věk, pohl.	α	λ	k´ ($x10^3 s^{-1}$)	MI	MIB-1 PI	topo II-α PI	morfologie nádoru	lok
Glioblastom (grade IV)									
18	68, ž	0,40±0,01*	1,72±0,03* *n=2, N=6*	9,93±0,76*	15	22,8	19,9	hypercelularita, výrazné pleomorfie, nekrózy	TP dex.
19	54, m	0,40±0,01*	1,85±0,03* *n=5, N=14*	4,40±0,52	14	24,4	21,4	hustě nakupené drobné buňky, vaskulární proliferace, nekrózy	T sin.
20	43, m	0,42±0,01*	1,86±0,03* *n=5, N=13*	7,87±0,98*	21	23,0	19,4	hypercelularita, výrazné pleomorfie, nekrózy	T dex
21	66, m	0,46±0,01*	1,44±0,01 *n=4, N=7*	9,28±1,15*	12	14,5	12,0	hypercelulární nádor z pleomorfních buněk, nekrózy	PO sin.
22	63, m	0,46±0,01*	1,74±0,01* *n=3, N=6*	7,27±0,45*	36	32,1	27,0	hustě nakupené drobné buňky, vaskulární proliferace, nekrózy	P sin.
23	75 ,m	0,48±0,02*	1,67±0,01* *n=4, N=8*	6,51±0,96	27	29,5	28,0	hypercelulární nádor z pleomorfních buněk, vaskulární proliferace	TP dex.
24	62, m	0,56±0,01*	1,35±0,04 *n=2, N=6*	2,64±0,05	23	29,6	30,4	hypercelularita, výrazné pleomorfie, rozsáhlé nekrózy	PO dex.
25	62, ž	0,58±0,02*	1,69±0,03* *n=3, N=7*	5,19±0,32	32	52,2	45,4	hypercelularita, protáhlé buňky, rozsáhlé nekrózy	P dex.
Oligodendrogliom									
26	50, m	0,22±0,01	1,47±0,01 *n=4, N=13*	3,69±0,26	0	2,0	2,3	solidně uspořádané polygonální buňky, jemná kapilární síť	TP sin.
27	46, ž	0,24±0,01	1,49±0,04 *n=3, N=8*	9,16±0,42*	0	2,2	3,2	solidně uspořádané buňky, jemná kapilární síť, kalcifikace	F sin.
Ependymom									
28	3, m	0,38±0,01*	1,55±0,03 *n=6, N=16*	5,61±0,87	2	5,8	7,8	klasický ependymom	III. K.
29	39, ž	0,42±0,05*	1,58±0,02 *n=2, N=6*	7,66±0,54*	4	14,8	13,6	klasický ependymom	LK. sin.
Meduloblastom									
30	12, m	0,32±0,01*	1,57±0,01 *n=4, N=13*	6,52±0,57*	18	24,2	24,6	hustě nakupené drobné oválné buňky, mírný perivaskulární edém	Crbl
31	2, ž	0,35±0,01*	1,49±0,03 *n=5, N=18*	4,60±0,69	13	20,8	22,6	hustě nakupené drobné oválné buňky	Crbl
32	11, ž	0,58±0,03*	1,76±0,08* *n=2, N=6*	6,84±0,76*	19	33,2	41,2	hustě nakupené drobné oválné buňky	Crbl
33	17, m	0,22±0,01	1,80±0,02* *n=4, N=12*	3,89±0,52	4	18,4	16,6	desmoplastický meduloblastom	Crbl
34	14, m	0,22±0,01	1,90±0,03* *n=3, N=8*	4,03±0,26	7	18,2	17,0	desmoplastický meduloblastom	Crbl

*m - muž; ž - žena; n - počet řezů; N - počet měření; lok. - lokalizace: F - frontálně, P-parietálně, O-okcipitálně, ChO - chiasma opticum, Crbl - mozeček, III.K. - III. komora, LK - laterální komora, Thal - thalamus, sin. - vlevo, dex. - vpravo; * hodnoty signifikantně zvýšené oproti kontrolním hodnotám (χ^2)*



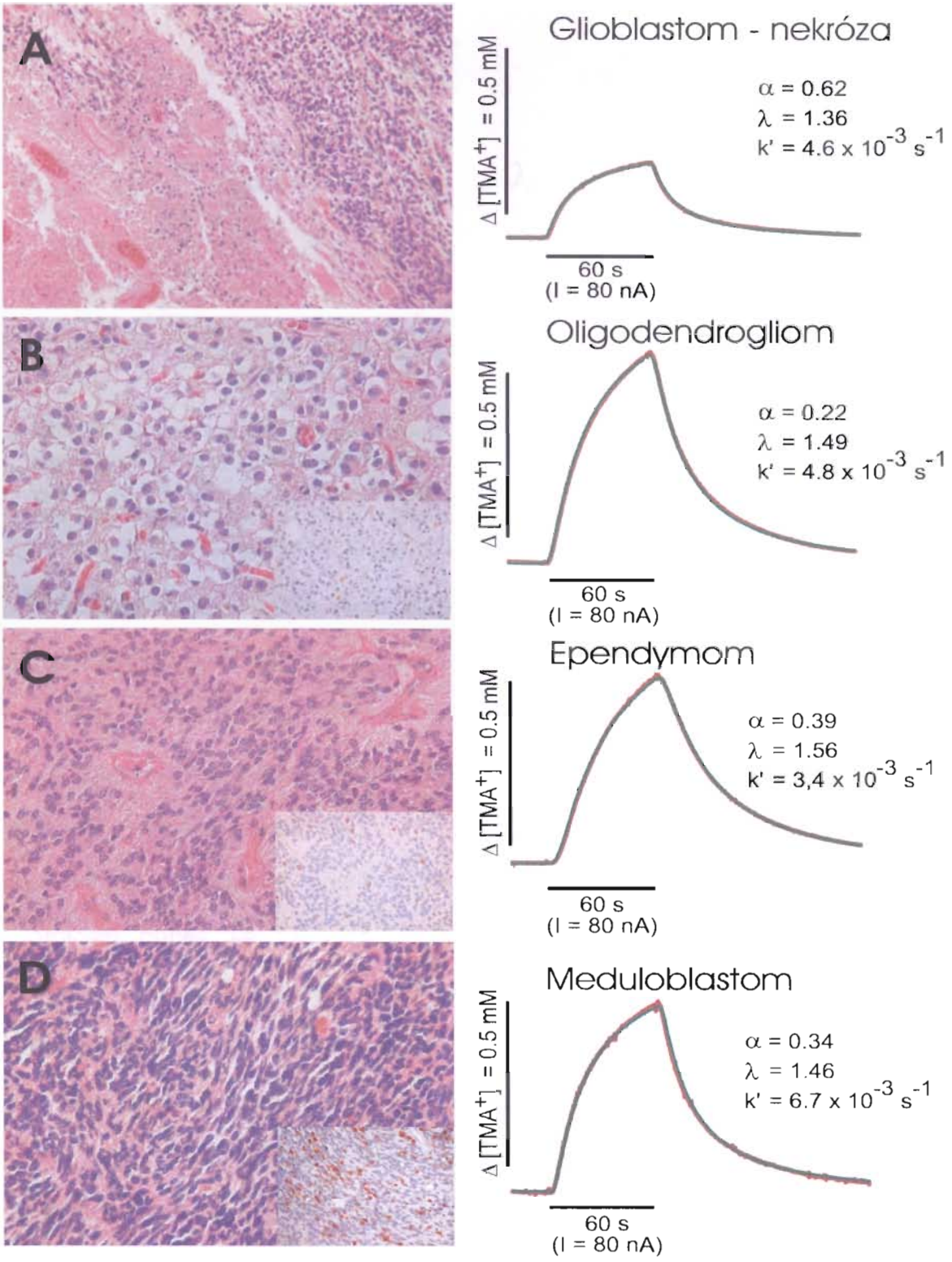
Obr. 8. Studované oblasti v mozkových nádorech (H&E, originální zvětšení 400x) s příslušnou imunodetekcí proliferace prukazem antigenu Ki-67 (MIB-1) ve výřezu *(vlevo)* a odpovídající difúzní křivka TMA^+ s naměřenými hodnotami difúzních parametrů ECP - objemové frakce α, tortuozity λ a nespecifického zpětného příjmu *k´ (vpravo)*. Červené křivky jsou difúzní křivky naměřené v nádorové tkáni, zelené křivky jsou teoretické difúzní křivky generované nelineárním algoritmem pro fitování křivek. **A:** pilocytární astrocytom, grade I (případ č. 9 v tab. 4). **B**: difúzní astrocytom, grade II (případ č.14). **C**: anaplastický astrocytom, grade III (případ č. 15). **D**: glioblastom, grade IV - vitální oblast (případ č. 18).

***Anaplastické astrocytomy a glioblastomy* (high-grade astrocytomy)**

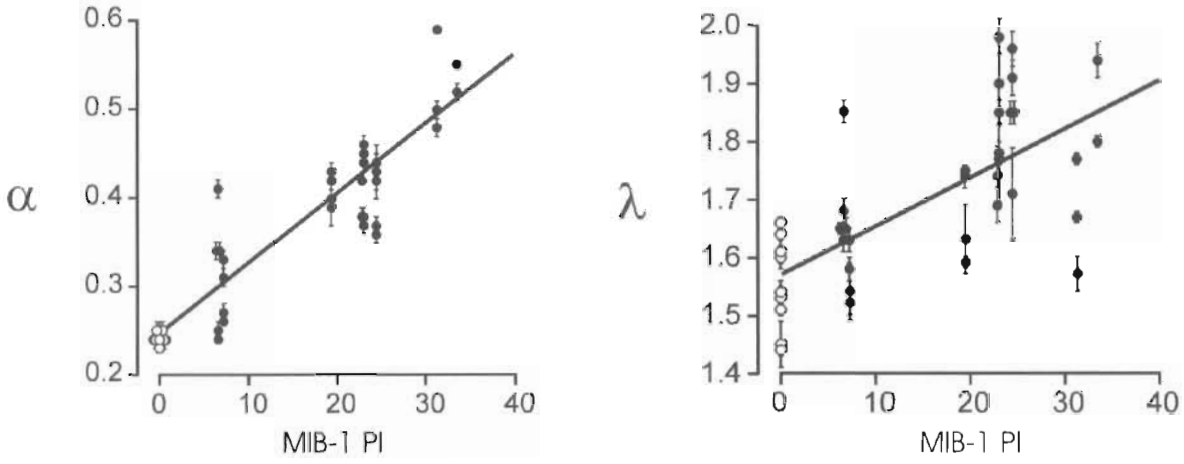
Anaplastické astrocytomy (WHO grade III) charakterizovala zvýšená buněčnost, výrazné jaderné i buněčné atypie a zvýšená mitotická aktivita (obr. 8 - C). Histopatologický obraz glioblastomů (WHO grade IV) byl variabilní. Od anaplastických astrocytomů je odlišovala ještě výraznější buněčnost, přítomnost vaskulárních proliferací a nekróz, které byly často obklopeny pseudopalisádovitě uspořádanými nádorovými buňkami (obr. 8 - D). Měření v oblastech nekróz byla dále analyzována odděleně, a do celkové analýzy jsme vložili pouze data získaná ve vitálních oblastech glioblastomů.

V porovnání s kontrolní kůrou a s astrocytomy s nízkým stupněm malignity byla objemová frakce ECP α u high-grade astrocytomů dramaticky zvýšená (tabulka č. 4, případy 15 - 25), s průměrnými hodnotami 0,48 ± 0,01 (n = 21). Hodnoty tortuozity λ a k' byly také signifikantně vyšší než u kontrolních měření (1,69 ± 0,03 a 6,69 ± 0,62 x $10^{-3}s^{-1}$ v daném pořadí). Vysokou proliferační aktivitu a tedy zvýšenou agresivitu nádorů odrážela vysoká mitotická aktivita nádorů (11 - 36 / 10 HPF) a vysoké proliferační indexy MIB-1 (14,5 - 52,2%) a topo-IIα (12,0 - 45,4%).

Měření v oblastech nekróz ve dvou glioblastomech (případy 19 a 20, obr. 9 - A) ukázaly enormně zvýšenou objemovou frakci ECP α (0,58 ± 0,01; n = 5), zatímco hodnoty tortuozity λ výrazně kolísaly (1,35 - 1,83). Nespecifický zpětný příjem k' v nekróze u glioblastomů (4,15 ± 0,62 x $10^{-3}s^{-1}$) byl nižší než ve vitálních oblastech, signifikantně se však nelišil od průměrných kontrolních hodnot. V některých nekrotických oblastech nedošlo k poklesu tortuozity, jak jsme očekávali, pravděpodobně kvůli přítomnosti tkáňového detritu z rozpadlých nádorových buněk, který bránil volné difúzi TMA^+ iontů.



Obr. 9. Studované oblasti v mozkových nádorech (H&E, originální zvětšení 100x (A) a 400x (B-D)) s příslušnou imunodetekcí proliferace průkazem antigenu Ki-67 (MIB-1) ve výřezu (*vlevo*) a odpovídající difúzní křivka TMA^+ s naměřenými hodnotami difúzních parametrů ECP - objemové frakce α, tortuozity λ a nespecifického zpětného příjmu k' (*vpravo*). Červené křivky jsou difúzní křivky naměřené v nádorové tkáni, zelené křivky jsou teoretické difúzní křivky generované nelineárním algoritmem pro fitování křivek. **A**: glioblastom, grade IV - nekróza (případ č. 24 v tab. 4). **B**: oligodendrogliom, grade II (případ č. 26). **C**: ependymom, grade II (případ č. 28). **D**: meduloblastom (případ č. 31).



Obr. 10. Vztah mezi objemovou frakcí ECP α, tortuozitou λ a proliferačním indexem MIB-1 ve studovaných difúzních infiltrujících astrocytomech (grade II - IV, •). Kontrolní data (o) jsou vynesena oproti hodnotě MIB-1 PI 0. Každý bod odpovídá průměrné hodnotě α a λ ± S.E.M. vypočítané ze 2 - 3 měření v různých řezech. Řezy ze stejného nádoru mají stejnou hodnotu MIB-1 PI. Regresní křivky pro α a λ mají korelační koeficienty postupně 0,84 a 0,46.

Abychom stanovili vztah mezi difúzními parametry ECP a proliferační aktivitou difúzních astrocytomů různého stupně malignity (WHO grade II - IV), vynesli jsme do grafu hodnoty jednotlivých difúzních parametrů oproti proliferačním aktivitě daného nádoru stanovené průkazem MIB-1 (Ki-67). Data z měření v nekrotických oblastech, stejně jako z měření u případu č. 10, nebyla do této analýzy zahrnuta. Extrémní tortuozita při přítomnosti hustě nakupených fascikulárně uspořádaných výběžků nádorových buněk ve vzorcích nádoru pacienta č. 10 totiž může svědčit pro skutečnost, že difúze v takové tkáni nebyla izotropní. V takových případech nelze správné hodnoty difúzních parametrů získat měřením pouze v jednom směru (Mazel a spol., 1998; Rice a spol., 1993). V obrázku č. 10 je zřetelná závislost mezi nárůstem objemu ECP nádorů, zvýšením tortuozity a rostoucí proliferační aktivitou (vyjádřenou proliferačním indexem MIB-1) difúzních astrocytomů. Korelační koeficient regresní křivky pro α činil 0,92 ($p < 0,0001$) a pro λ 0,68 ($p < 0,0001$). Podobný vztah jsme také prokázali pro závislost mezi difúzními parametry a proliferační aktivitou stanovenou průkazem topo-IIα (pro α: $r = 0,91$, $p < 0,0001$; pro λ: $r = 0,63$, $p < 0,0001$) a počtem mitóz (pro α: $r = 0,86$, $p < 0,0001$; pro λ: $r = 0,65$, $p < 0,0001$).

Oligodendrogliomy

Všechny zkoumané oligodendrogliomy byly středně buněčnými nádory ze solidně uspořádaných poměrně uniformních polygonálních buněk s okrouhlými jádry obklopenými opticky prázdnými haló a s hustou sítí kapilár ve stromatu. Vyšetřovali jsme dva oligodendrogliomy (WHO grade II; tabulka č. 4, případy 26 a 27; obr. 9 - B). Získané hodnoty difúzních parametrů ECP (α = 0,23 ± 0,01, λ = 1,50 ± 0,02 a k' = 5,27 ± 1,02 x $10^{-3}s^{-1}$) se signifikantně nelišily od parametrů v kontrolních tkáních.

Proliferační aktivita oligodendrogliomů byla spíše nízká, srovnatelná s astrocytomy nízkého stupně malignity.

Ependymomy

Vyšetřené ependymomy charakterizovala střední buněčnost. Základním histologickým znakem byla přítomnost typických perivaskulárních pseudoroset, kde haló kolem cév tvořily výběžky nádorových buněk (obr. 9 - C). V naší studii jsme měli možnost měřit difúzní parametry ve dvou ependymomech (tabulka č. 4, případy 28 a 29). Nalezli jsme signifikantně zvýšené hodnoty objemové frakce ECP α (0,39 ± 0,01, n = 7); hodnoty tortuozity λ (1,55 ± 0,04) a nespecifického zpětného příjmu k' (5,30 ± 1,06 x $10^{-3}s^{-1}$) se však signifikantně nelišily od kontrolních hodnot. Proliferační aktivita byla ve vyšetřených nádorech jen mírně zvýšená (tabulka č. 4). Ependymom se zvýšenou proliferační aktivitou měl v porovnání s druhým ependymomem větší objem ECP.

Meduloblastomy

Klasické meduloblastomy (tabulka č. 4, případy 30 - 32) ze skupiny embryonálních nádorů CNS byly tvořeny z hustě nakupených malých nediferencovaně vyhlížejících buněk s okrouhlými nebo oválnými jádry (obr. 9 - D). Naměřené hodnoty ve třech vyšetřovaných vzorcích klasického meduloblastomu významně kolísaly. V porovnání s kontrolními měřeními byly hodnoty objemové frakce ECP α signifikantně

zvýšené (0,38 ± 0,03; n = 11), průměrné hodnoty λ (1,57 ± 0,04) a k' (5,82 ± 0,62) se však od kontrol významně nelišily.

Vzorky od pacientů č. 33 a 34 tvořila tkáň vzácnější varianty meduloblastomu, desmoplastického meduloblastomu. Tyto nádory vykazovaly nižší proliferační aktivitu než klasické meduloblastomy (tabulka č. 4), a naměřené hodnoty α (0,22 ± 0,01; n = 7) byly nízké podobně jako ve zdravé tkáni. Tortuozita však byla enormně zvýšená (1,85 ± 03). Nespecifický zpětný příjem (4,00 ± 0,41 x $10^{-3}s^{-1}$) se statisticky významně nelišil od kontrolních hodnot.

2.4.6. ECM a difúzní bariéry extracelulárního prostoru astrocytomů

V této studii (Zámečník a spol., 2004) jsme navázali na výsledky předchozích experimentů stanovujících difúzní parametry nádorové tkáně TMA^+ iontoforetickou metodou s cílem objasnit, co bylo ve tkáni nejčastějších lidských gliomů, astrocytomů, příčinou zvýšené tortuozity, zda se charakter difúzních bariér liší mezi astrocytomy různého stupně malignity a zda by se tedy jejich průkaz dal využít v neuroonkologické bioptické diagnostice. Difúzní bariéry v nervové tkáni mohou vytvářet např. buněčné výběžky, přítomnost velkého množství hyperplastických cév, nebo také makromolekuly ECM. Vzhledem k prokázané schopnosti astrocytomů produkovat patologickou extracelulární matrix (Gladson, 1999), jsme průkazu ECM a hledání jejího vztahu ke změněným difúzním parametrům nádorového ECP věnovali velkou pozornost.

Ve vzorcích 21 astrocytárních nádorů různého stupně malignity jsme srovnávali výsledky difúzních měření se strukturálními parametry tkáně (s hustotou nádorových buněk, s přítomností hyperplastických cév a hustotou sítě tvořené výběžky nádorových buněk) a se změnami ve složení nádorové ECM. Přítomnost a distribuci velkých fibrilárních makromolekul ECM - tenascinu, vitronektinu, lamininu, fibronektinu a kolagenů typu I - VI, jsme prokazovali imunohistochemickými metodami. Výsledky

jsme porovnali mezi jednotlivými podskupinami astrocytomů a se čtyřmi vzorky kontrolní tkáně z temporální mozkové kůry.

Kontrolní temporální neokortex

Při imunohistochemickém vyšetření kontrolního temporálního neokortexu (tabulka č. 5, případy 1 - 4) jsme při průkazu GFAP ozřejmili jen ojedinělé GFAP-pozitivní astrocyty, většinou v subpiální a perivaskulární lokalizaci. V zevní části I. korové vrstvy a v oblasti glia limitans externa jsme detekovali přítomnost jemných fibril tenascinu v neuropilu. Mírnou pozitivitu tenascinu jsme pozorovali i v ECP nepostižené přilehlé bílé hmoty (obr. 11). V hlubších kortikálních vrstvách, kde probíhalo měření difúzních parametrů jsme však přítomnost tenascinu nezaznamenali. Bazální membrány všech malých cév a kapilár byly pozitivní při průkazu kolagenu typu IV, lamininu a fibronektinu. Kolageny typu II, v a VI jsme ozřejmili v adventicii větších cév mozkových plen, zatímco vlákna kolagenu I a III byla přítomna v jejich fibromuskulární stěně. Přítomnost kolagenů typu I - III, v a VI jsme rovněž zaznamenali ve vazivu měkkých plen mozkových. Přítomnost vyšetřovaných kolagenů s výjimkou kolagenu IV jsme nenalezli v hlubších korových vrstvách, které byly místem difúzních měření.

Pilocytární astrocytomy (WHO grade I)

Ze zkoumaných parametrů nádorové tkáně jsme u pilocytárních astrocytomů (tabulka č. 5, případy 5 - 9) zaznamenali společně s nízkou mitotickou aktivitou a nízkým proliferačním indexem MIB-1 také nízkou hustotu nádorových buněk. Všechny nádorové buňky byly GFAP-pozitivní, avšak hustota sítě z GFAP-pozitivních výběžků byla malá v oblastech mikrocystické stavby nádorové tkáně a jen mírně vyšší v kompaktních oblastech. Přítomnost žádného ze zkoumaných glykoproteinů ECM jsme v mezibuněčném prostoru těchto nádorů nezjistili, jen bazální membrány krevních cév zásobujících nádor byly pravidelně pozitivní při průkazu kolagenu typu IV, lamininu a fibronektinu.

Obr. 11. Imunopozitivita tenascinu v zevní oblasti 1. korové vrstvy a v glia limitans externa (dobarveno lehce hematoxylinem, zvětšeno 200x).

Difúzní fibrilární astrocytomy (WHO grade II)

V astrocytomech s nízkým stupněm malignity (případy 10 - 14 v tabulce č. 5) byla v porovnání s pilocytárními astrocytomy mírně zvýšená hustota nádorových buněk. Průkazem GFAP jsme ozřejmili ve všech případech přítomnost husté fibrilární sítě z jemných dlouhých a často větvených výběžků nepravidelně uložených nádorových astrocytů. Proliferační aktivita byla velmi malá a ve tkáni nebyly přítomny proliferující hyperplastické cévy. Exprese a distribuce studovaných glykoproteinů ECM byly obdobné jako u pilocytárních astrocytomů (obr. 12).

Anaplastické astrocytomy a glioblastomy (WHO grade III a IV)

Tuto skupinu agresivních astrocytomů charakterizovala enormně zvýšená hustota nádorových buněk, doprovázená jadernými i buněčnými nepravidelnostmi výrazně proliferujících nádorových buněk.

Tabulka č. 5.

Výsledky imunohistochemické detekce glykoproteinů ECM v extracelulárním prostoru (ECM-ECP) a v souvislosti s cévami (ECM - cévy), hustota GFAP pozitivních výběžků nádorových buněk, hustota nádorových buněk (HNB) a proliferace v porovnání s difúzními parametry ve spektru astrocytomů a v kontrolní temporální kůře.

č.	Věk Pohl.	Proliferace	HNB	GFAP	ECM - ECP		Difúzní parametry		HC	ECM - cévy						
					TN	VT	α	λ		TN	FB	LM	C-IV	C-II	C-V	C-VI
A. Kontrolní kůra																
1	26, m	0	-	-	-	-	0,24	1,48	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
2	17, ž	0	-	-	-	-	0,24	1,50	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
3	10, ž	0	-	-	-	-	0,24	1,61	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
4	10, ž	0	-	-	-	-	0,23	1,65	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
B. Pilocytární astrocytomy (grade I)																
5	17, m	1,6 - 2,2 - 0	79,0	+	-	-	0,38	1,37	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
6	10, m	2,6 - 3,2 - 1	112,6	++	-	-	0,41	1,49	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
7	4, ž	0,4 - 1,3 - 0	118,5	++	-	-	0,37	1,52	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
8	7, m	1,6 - 2,1 - 0	99,9	++	-	-	0,38	1,52	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
9	3, ž	0,6 - 0,2 - 0	123,2	+++	-	-	0,35	1,61	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
C. Astrocytomy (grade II)																
10	24, ž	2,1 - 1,7 - 1	98,1	++	-	-	0,30	1,45	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
11	28, m	3,9 - 3,2 - 3	87,7	++	-	-	0,28	1,52	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
12	26, m	7,2 - 7,6 - 3	100,2	+++	-	-	0,29	1,57	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
13	9, m	6,6 - 7,2 - 1	112,7	+++	-	-	0,31	1,69	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
14	12, m	3,8 - 4,4 - 0	84,6	+++	-	-	0,27	2,12	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
D. Anaplastické astrocytomy (grade III)																
15	47, ž	19,4 - 16,2 - 11	223,2	++	F+	-	0,41	1,67	-	+	++	+++	+++	-	-	-
16	8, ž	31,2 - 32,0 - 24	268,6	++	F+	-	0,52	1,67	-	++	+	+++	+++	-	-	-
17	24, ž	33,4 - 35,4 - 26	196,2	++	D++	F+	0,53	1,87	-	++	+	+++	+++	-	-	-

Tabulka č. 5 - pokračování.

č.	Věk Pohl.	Proliferace	HNB	GFAP	ECM - ECP		Difúzní parametry		HC	ECM - cévy						
					TN	VT	α	λ		TN	FB	LM	C-IV	C-II	C-V	C-VI
E. Glioblastomy (grade IV)																
18	62, m	29,6 - 30,4 - 23	215,3	+	-	-	**0,56**	**1,35**	+	-	+	+++	+++	+	+	+
19	66, m	12,3 - 14,5 - 12	296.7	+	-	-	**0,46**	**1,44**	+	-	++	+++	+++	+	+	+
20	75, m	27,3 - 29,5 - 28	311,4	+	D+	-	**0,48**	**1,67**	++	+++	+	+++	+++	++	++	++
21	62, ž	52,2 - 45,4 - 32	298,3	+	D++	-	**0,58**	**1,69**	++	+++	-	+++	+++	++	+	+
22	68, ž	22,8 - 18,6 - 15	329,1	+	D+	F+	**0,40**	**1,72**	++	+++	+	+++	+++	+	+	+
23	63, m	36,8 - 32,1 - 27	220,9	++	D++	-	**0,46**	**1,74**	+	+++	++	+++	+++	++	++	++
24	54, m	24,4 - 21,4 - 14	280,2	+	D++	F+	**0,40**	**1,85**	+++	+++	-	+++	+++	++	+	+
25	43, m	23,0 - 24,4 - 21	232,1	+	D++	F+	**0,42**	**1,86**	++	++	+	+++	+++	++	+	+

m, muž; ž, žena; α, objemová frakce ECP; λ, tortuozita ECP

***Proliferace**: proliferační indexy: MIB-1 PI - topo IIα PI - počet mitóz na 10 HPF*

***HNB** - průměrná hustota nádorových buněk v 1 HPF*

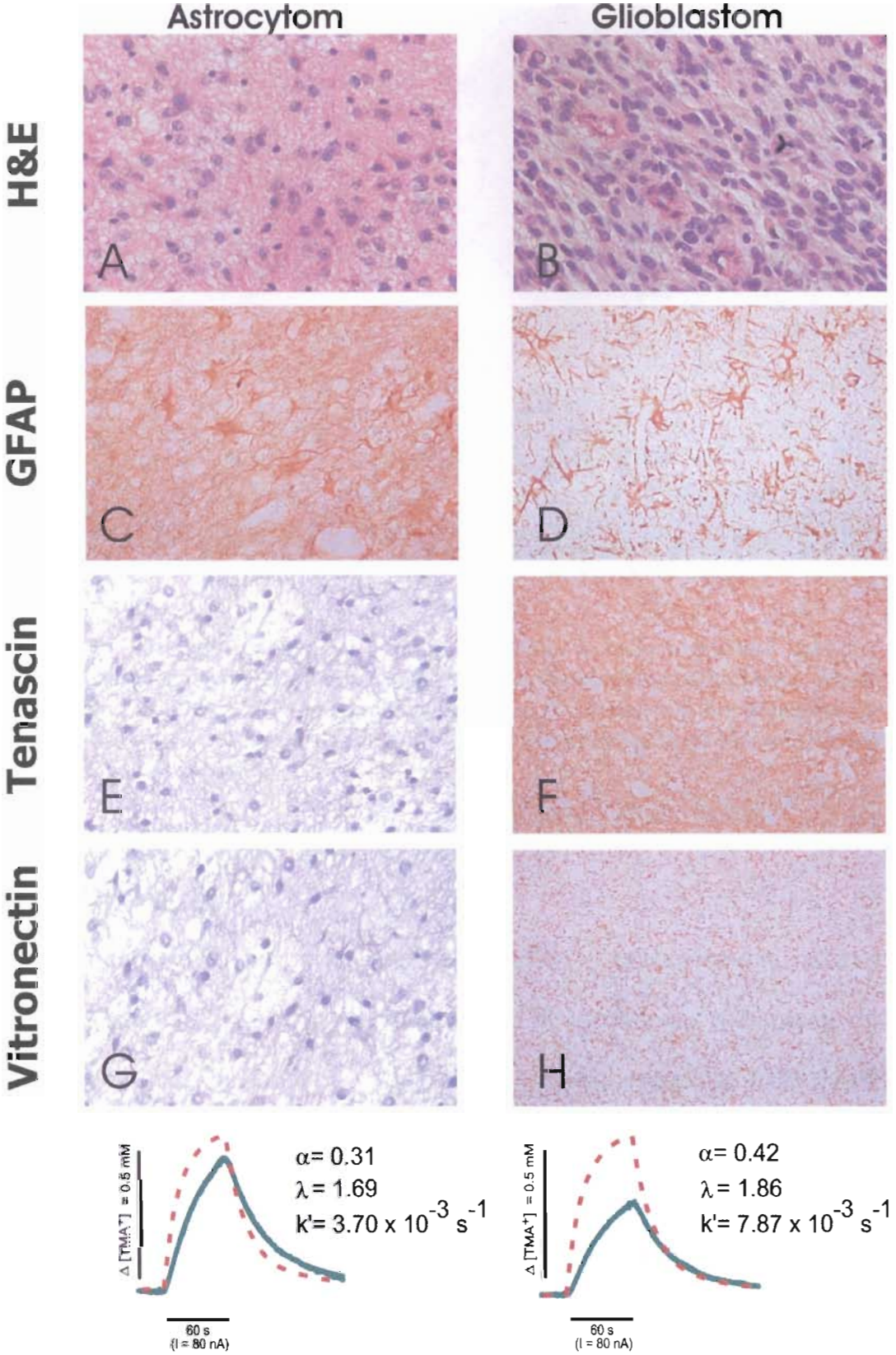
***GFAP** - hustota sítě z GFAP pozitivních výběžků nádorových buněk: (+) řídká, (++) středně hustá, (+++) velmi hustá síť výběžků.*

***ECM-ECP**: glykoproteiny ECM přítomny v extracelulárním prostoru obklopujícím nádorové buňky: nepřítomen (-), slabá (+), silná (++) imunopozitivita. F, fokální přítomnost; D difúzní přítomnost; TN, tenascin; VT, vitronektin*

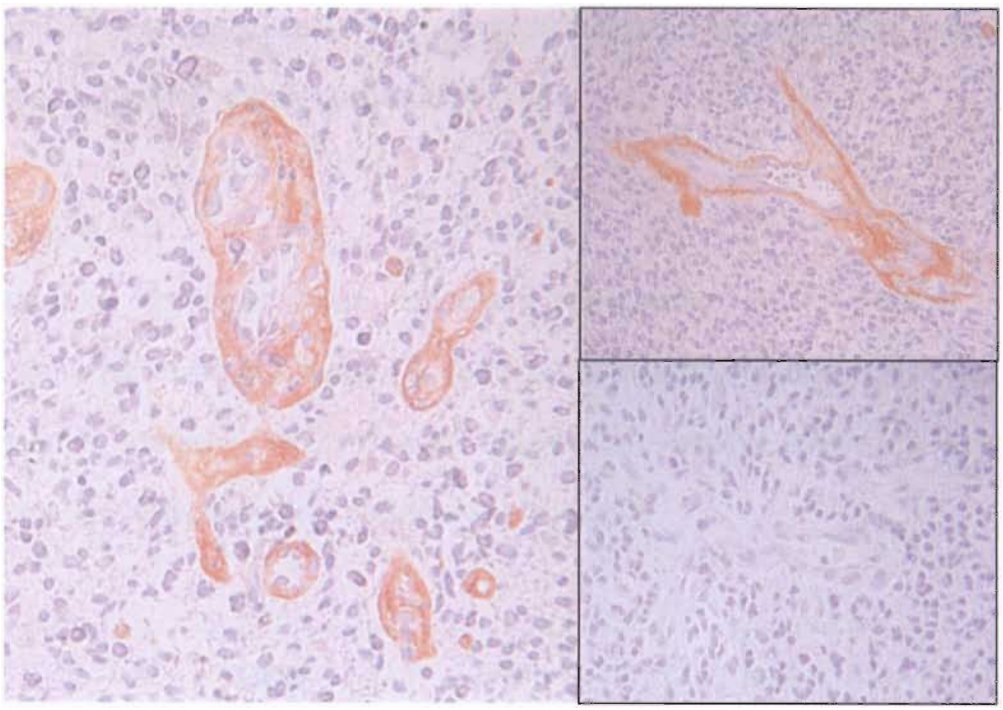
***HC** - hyperplazie nádorových cév: excesivní (+++), středně výrazná (++), mírná (+), nepřítomná (-)*

***ECM-cévy**: glykoproteiny ECM přítomny ve spojitosti s cévami v nádorové tkáni: TN, tenascin; FB, fibronektin; LM, laminin; C-II, kolagen typu II; C-IV, kolagen typu IV; C-V, kolagen typu V; C-VI, kolagen typu VI: (-) chybí, (+) přítomen < 50% nádorových cév, (++) přítomen v >50% nádorových cév, (+++) přítomen ve všech cévách.*

Imunohistochemickými reakcemi na průkaz GFAP jsme zjistili, že všechny nádorové buňky byly GFAP pozitivní, jejich výběžky však byly často výrazně kratší a méně větvené než u astrocytomů grade II (obr. 12). V devíti z jedenácti astrocytomů s vysokým stupněm malignity (81,8%) jsme prokázali přítomnost extracelulárně produkovaného tenascinu, a to jak v dilatovaných prostorech mezi nádorovými astrocyty, tak ve stěně nádorových cév. V anaplastických astrocytomech byla distribuce tenascinu v ECP spíše ložisková, zatímco v glioblastomech jsme pozorovali převážně difúzně extracelulárně uložená depozita tohoto glykoproteinu. Ve 4 případech jsme v této skupině nádorů zaznamenali ložiskovou akumulaci vitronektinu v ECP. V souvislosti s cévami jsme v agresivních astrocytomech nalezli celé spektrum glykoproteinů, jejich výskyt už ale nebyl zcela pravidelný jako u astrocytomů s nízkým stupněm malignity. Zaznamenali jsme výrazný pokles intenzity reakcí a procenta cév pozitivních při průkazu fibronektinu, ve dvou glioblastomech nebyla dokonce přítomnost fibronektinu ve stěnách nádorových cév detekována vůbec (obr. 13). Ve stěně nádorových cév jsme dále prokázali přítomnost tenascinu, jak je uvedeno výše. Kolagen IV a laminin byly přítomny v bazálních membránách cév agresivních astrocytomů. V adventicii hyperplastických cév jsme ve všech případech pozorovali přítomnost kolagenů II, v a VI. Kolagen typu I a III jsme ve studovaných astrocytomech s vysokým stupněm malignity neprokázali.



Obr. 12. Porovnání struktury astrocytomu (grade II) a glioblastomu (grade IV) (A, B; barvení H&E), hustoty GFAP-pozitivních výběžků buněk (C, D; imunoperoxidázová metoda), intersticiální akumulace tenascinu (E,F; imunoperoxidázová metoda, E lehce dobarveno hematoxylinem) a vitronektinu (G, H; imunoperoxidázová metoda, G lehce dobarveno hematoxylinem) s difúzními parametry získanými z difúzních křivek naměřených v dané lokalizaci (α, objemová frakce ECP; λ, tortuozita; *k´*, nespecifický uptake). Originální zvětšení 600x.



Obr. 13. Imunoperoxidázový průkaz lamininu v subendoteliální bazální membráně hyperplastických cév glioblastomu (případ č. 21; dobarveno hematoxylinem). *Horní výřez*: Stejný případ, imunoperoxidázový průkaz kolagenu typu IV (dobarveno hematoxylinem). *Dolní výřez*: Negativní imunoperoxidázový průkaz fibronektinu ve stejném případě (dobarveno hematoxylinem). Originální zvětšení 400x.

Korelační analýzy

Exprese studovaných glykoproteinů ECM v astrocytárních nádorech různého stupně malignity jsou shrnuty v tabulce č. 5, společně s hodnotami markerů jejich proliferační aktivity, hustoty nádorových buněk, hustotou sítě GFAP-pozitivních výběžků nádorových buněk a naměřeným difúzními parametry jejich ECP.

Statisticky jsme zkoumali závislost mezi všemi kombinacemi párů veličin popisujících hustotu nádorových buněk, proliferační aktivitu a difúzních parametrů ECP (objemová frakce α, tortuozita λ) ve skupině difúzních infiltrujících astrocytomů (WHO grade II - IV). Výsledky této analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 6. Prokázali jsme významnou závislost mezi rostoucí objemovou frakcí ECP α, rostoucí buněčností a proliferační aktivitou nádoru. Podobnou závislost jsme prokázali také pro vztah mezi rostoucí

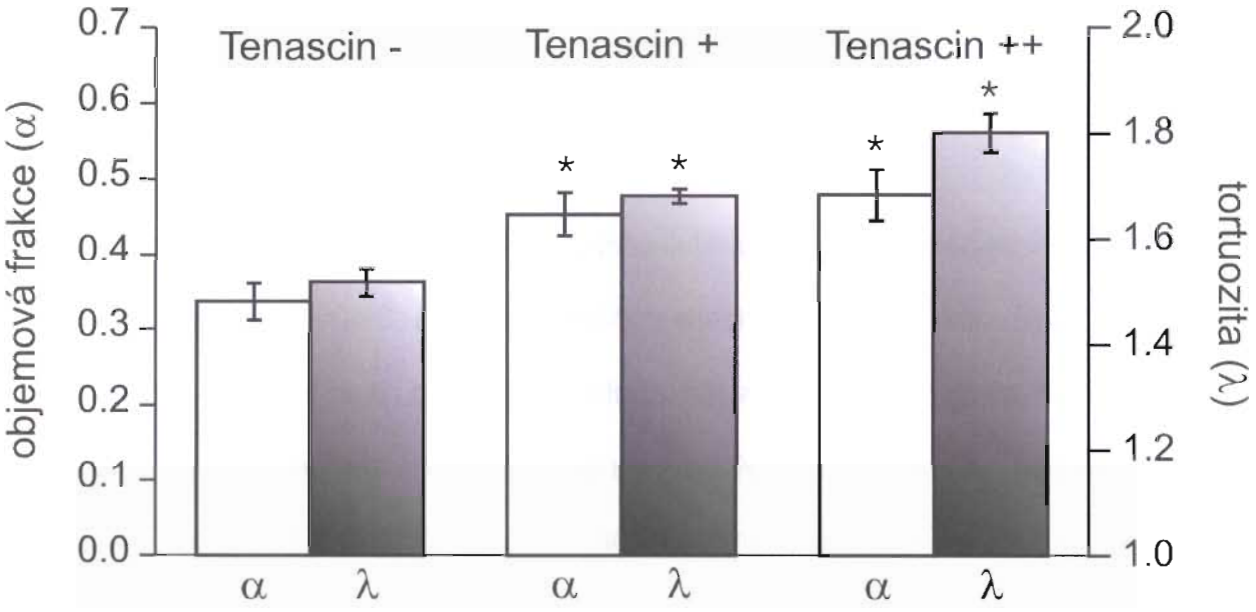
tortuozitou λ a rostoucí proliferační aktivitou nádorů, tortuozita však byla překvapivě nezávislá na hustotě nádorových buněk.

Tabulka č. 6.

Statistická závislost mezi difúzními parametry ECP difúzně infiltrujících astrocytomů (α, objemová frakce; λ, tortuozita), hustotou nádorových buněk (HNB) a proliferačními markery (MA, mitotická aktivita, proliferační index MIB-1; proliferační index topo-IIα). Spearmanův korelační koeficient (r).

	HNB	**MA**	**MIB-1**	**topo-IIα**
MA	r = 0,68 p < 0,001	-	-	-
MIB-1	r = 0,66 p < 0,001	r = 0,94 p < 0,0005	-	-
topo-IIα	r = 0,65 p < 0,001	r = 0,97 p < 0,0005	r = 0,98 p < 0,0005	-
α	r = 0,69 p < 0,001	r = 0,91 p < 0,0005	r = 0,88 p < 0,0005	r = 0,93 p < 0,0005
λ	r = 0,26 NS	r = 0,36 NS	r = 0,41 p < 0,05	r = 0,40 p < 0,05

NS, nesignifikantní



Obr. 14. V grafu je znázorněno zvětšení objemové frakce ECP α a tortuozity λ v astrocytomech produkujících malé (tenascin +) i velké (tenascin ++) množství tenascinu, v porovnání s tenascin negativními (tenascin -) nádory. Hvězdička označuje signifikantní rozdíl v obou difúzních parametrech mezi tenascin pozitivními a tenascin negativními nádory.

Vztah mezi přítomností tenascinu v ECP nádorové tkáně a difúzními parametry ECP u difúzních infiltrujících astrocytomů (WHO grade II-IV) je znázorněn na obrázku č. 14. Jak objemová frakce ECP, tak tortuozita byly výrazně zvýšené u nádorů produkujících tenascin (případy, 15 - 17, 20 - 25; $\alpha = 0,47 \pm 0,02$, $\lambda = 1,75 \pm 0,03$) při porovnání s hodnotami naměřenými v tenascin negativních astrocytomech ($\alpha = 0,37 \pm 0,01$; $\lambda = 1,50 \pm 0,04$).

2.5. DISKUZE

2.5.1. Difúzní parametry ECP a energetický metabolismus během tranzientní hypoxie a hypoxie/ischémie

Velikost a geometrické uspořádání extracelulárního prostoru zásadně ovlivňují difúzi neuroaktivních látek v CNS, která je důležitým mechanismem při komunikaci nervových a gliových buněk. V naší práci jsme sledovali změny těchto parametrů spolu se změnami extracelulárních koncentrací energetických metabolitů a glutamátu během tranzientní hypoxie a hypoxie/ischémie a následné reperfúze/reoxygenace.

V předchozích studiích na modelu terminální anoxie byl popsán rychlý pokles objemové frakce a tortuozity ECP v průběhu několika minut po srdeční zástavě (van der Toorn a spol., 1996; Voříšek a Syková, 1997b). Maximální změny difúzních parametrů byly spojeny s výrazným vzestupem $[K^+]_e$ a snížením pH_e. Časový průběh těchto změn dobře koreloval s poklesem aparentního difúzního koeficientu vody (ADC_w).

V současné práci jsme během tranzientní hypoxie/ischémie zjistili kontinuální pokles objemové frakce doprovázený vzestupem tortuozity, s maximálními hodnotami podobnými těm, které byly popsány při terminální anoxii. Rovněž jsme pozorovali, že změny difúzních parametrů byly akcelerovány ischemickou depolarizací, ke které docházelo obvykle 5 – 10 minut po začátku hypoxie/ischémie. To znamená, že stejně jako u terminální anoxie jsou iniciální výraznější změny v difúzních parametrech spojeny s buněčným edémem, jehož podkladem jsou transmembránové přesuny iontů a vody při depolarizaci membrány. Podobný časový průběh změn velikosti ECP byl zaznamenán během tranzientní hypoxie/ischémie v mozkové kůře 4- týdenních potkanů (Qiao a spol., 2004). Výsledky však byly získané technikou elektrického odporu, která neumožňuje získání absolutních hodnot.

Během reperfúze se tortuozita navrátila k výchozím hodnotám, zatímco objemová frakce se zvýšila asi o 20% nad původní normoxické hodnoty. Toto zvýšení dobře koresponduje s nálezem zvýšeného signálu v T1 vážených obrazech a zvýšeným obsahem vody v mozkové kůře potkanů po proběhlé hypoxii/ischémii (Qiao a spol., 2002, 2004). Zvýšenému obsahu vody v mozkové kůře v časné fázi reperfúze odpovídá i nález přechodně zvýšeného ADC_w (Dijkhuizen a spol., 1998).

Zcela odlišný průběh měly změny difúzních parametrů během tranzientní hypoxie, kde jsme prvních 20 minut nezaznamenali signifikantní změny ani u jednoho ze sledovaných parametrů. K poklesu objemové frakce a vzestupu tortuozity došlo až v posledních minutách hypoxické periody. Výsledné změny byly však, ve srovnání se změnami během tranzientní hypoxie/ischémie, mnohem menší. Také jsme ani u jednoho z pokusných zvířat nepozorovali ischemickou depolarizaci. Během reoxygenace se oba parametry navrátily k výchozím hodnotám.

K monitoraci změn v energetickém metabolismu mozkové tkáně jsme použili mikrodialýzu, která je považována za vysoce senzitivní techniku k určování lokálních koncentrací metabolitů v různých tkáních (Ungerstedt, 1991), ale má však i svá metodologická omezení. Změny ve velikosti ECP během různých patologických stavů ovlivňují účinnost mikrodialyzační sondy a koncentraci metabolitů v dialyzátu (Chen a spol., 2002). Dále může být výtěžnost sondy ovlivněna změnami v tortuozitě ECP nebo změnami v uvolňování, vychytávání nebo odbourávání v průběhu času (Benveniste a Huttemeier, 1990). V důsledku těchto faktorů mohou být zjištěné koncentrace metabolitů do jisté míry podhodnocené. Nicméně prioritou naší práce bylo ukázat spíše dynamiku změn v koncentraci sledovaných metabolitů, než jejich přesné absolutní hodnoty.

Laktát byl po mnoho desetiletí považován za koncový produkt anaerobní glykolýzy, jehož zvýšená koncetrace během tkáňové hypoxie přispívá k poklesu pH a tkáňovému poškození. Nedávné práce však ukázali, že laktát může být za aerobních podmínek využíván v neuronech jako zdroj energie (Bouzier-Sore a spol., 2003) nebo dokonce zlepšuje přežití neuronů a jejich funkce během deprivace glukózy v hipokampálních řezech (Cater a spol., 2001). Obdobný benefiční efekt laktátu byl popsán během iniciální fáze reoxygenace na modelu tkáňové hypoxie (Cater a spol., 2003). Tento výsledek tak navazuje na předchozí práce, které označili laktát jako přednostní zdroj energie po proběhlé hypoxii (Schurr a spol., 1997a,b,c). Logickým zdůvodněním je fakt, že na tvorbu pyruvátu cestou aerobní glykolýzy je pro iniciální fosforylaci glukózy nutná zásoba ATP, která je však po delších hypoxiích vyčerpaná. Naopak, toto počáteční dodání energie není nutné při konverzi laktátu na pyruvát, který pak vstupuje do Krebsova cyklu a energetický výtěžek tak může být 17 molů ATP na jeden mol laktátu (Bliss a Sapolsky, 2001). V našich experimentech jsme zaznamenali rychlý vzestup koncentrace laktátu ihned po začátku hypoxie a hypoxie/ischémie. Časový průběh a maximální dosažená koncentrace se mezi oběma typy insultů významně nelišili. Po reoxygenaci se koncentrace laktátu navrátila k původním hodnotám během 60 minut. Tato normalizace hladiny extracelulárního laktátu je patrně způsobena vychytáváním a utilizací laktátu neurony, protože nebyl zaznamenán významný přestup laktátu přes hematoencefalickou bariéru (Harada a spol., 1992).

Dalším indikátorem tkáňové hypoxie je poměr laktát/pyruvát (L/P), který velmi dobře koreluje s redoxním potenciálem buněk (Cabrera a spol., 1999; Magnoni a spol., 2003). Navíc jeho výhodou je fakt, že jeho hodnoty nejsou ovlivněny změnami ve výtěžnosti mikrodialyzační sondy (Persson a Hillered, 1992). Změny v poměru L/P

v průběhu hypoxie i hypoxie/ischémie a ve fázi reperfúze/reoxygenace byly prakticky identické se změnami v koncentraci extracelulárního laktátu.

Koncentrace glukózy v extracelulární tekutině je výsledkem rozdílu mezi přísunem z krevního séra a utilizací buňkami. Rychlý pokles během hypoxémie nejspíše souvisí se zvýšenou úrovní anaerobní glykolýzy (Fray a spol., 1997) a potvrzuje obdobné výsledky získáné pomocí implantovaného senzoru glukózy (Silver a Erecinska, 1994). Během reoxygenace dochází k rychlému návratu koncentrace glukózy na normoxické hodnoty, ale v dalším průběhu jsme pozorovali pozvolný mírný pokles, který byl více vyjádřen u modelu tranzientní hypoxie/ischémie. Tyto změny v koncentraci glukózy během reperfúze/reoxygenace opět podporují teorii iniciální tvorby ATP pomocí oxidativní utilizace laktátu, která je následně doplněna aerobní glykolýzou.

Zatímco změny v koncentraci energetických metabolitů u modelů tranzientní hypoxie a hypoxie/ischémie byly srovnatelné, tak změny v koncentraci extracelulárního glutamátu byly u těchto dvou modelů významně odlišné. Během hypoxie/ischémie koncentrace glutamátu do počátku inzultu rychle vzrostla a po 30 minutách dosáhla přibližně 10x vyšších hodnot než při normoxii. Naproti tomu, v průběhu tranzientní hypoxie ke zvýšení koncentrace glutamátu došlo až po 20 minutách trvání hypoxie a maximální koncentraci, která byla 2x menší než u předchozího modelu, jsme zaznamenali 10 minut po reoxygenaci. Časový průběh změn v koncentraci extracelulárního glutamátu velmi dobře koreloval se změnami ve velikosti extracelulárního prostoru, kdy klesající hodnota objemové frakce byla doprovázená nárůstem koncentrace glutamátu. Je logické, že když poklesne objem ECP, vzrůstá koncentrace látek v něm obsažených. Proto jsme v případě modelu tranzientní hypoxie/ischémie upravili koncentraci glutamátu o změny ve velikosti ECP. Tím jsme získali hodnoty koncentrace velmi podobné jako u tranzientní hypoxie – celkové

množství glutamátu uvolněného do ECP bylo tedy u obou modelů srovnatelné, ale redukce objemu ECP způsobená cytotoxickým edémem byla příčinou výrazného zvýšení hodnot aktuálních koncentrací. Přestože jsme nalezli pozitivní korelaci mezi změnami difúzních parametrů ECP a koncentrací glutamátu, nejedná se patrně o přímý důsledek působení glutamátu. K vyvolání buněčného edému v experimentu na míšních řezech bylo totiž nutné použít poměrně vysokých koncentrací – řádově 10^{-2} M (Vargová a spol, 2001). Glutamátem vyvolaný edém gliových buněk je tak zřejmě způsoben nepřímo, např. zvýšením extracelulární koncentrace draslíku po depolarizaci nervových buněk (Kimelberg, 2005).

Závěrem lze shrnout, že tranzientní hypoxie/ischémie vede k podobným změnám difúzních parametrů jako terminální anoxie. Časový průběh těchto změn dobře koreloval se změnami v koncentraci extracelulárního glutamátu. Na tomto modelu jsme rovněž ukázali vliv snížení velikosti objemové frakce ECP na výslednou koncentraci látek v něm obsažených. Druhotně zvýšená koncentrace neurotoxických látek, spolu se zhoršenou difúzí látek v ECP při cytotoxickém edému, tak prohlubuje funkční poruchu a následně i strukturální poškození CNS.

2.5.2. Difúzní parametry ECP v gliových nádorech

Difúzní parametry ECP významně ovlivňují difúzi látek v mezibuněčném prostoru a tím i synaptický i extrasynaptický přenos signálů v nervovém systému. Naše měření poprvé zdokumentovaly změny těchto parametrů v lidské mozkové tkáni a v lidských primárních mozkových nádorech.

Vzhledem k tomu, že už bylo opakovaně prokázáno, že difúzní parametry ECP *in vitro* ve tkáňových řezech získaných z experimentálních zvířat se neliší od hodnot získaných v experimentu *in vivo* (Lehmenkühler a spol., 1993; Prokopová a spol., 1997), můžeme předpokládat, že hodnoty naměřené ve řezech lidské tkáně odrážejí

situaci v lidském mozku *in vivo*. V kontrolní tkáni z temporálního neokortexu jedinců ve věku 10 až 27 let jsme naměřili podobné difúzní parametry jako při experimentech na dospělých myších (Anděrová a spol., 2001), potkanech (Lehmenkühler a spol., 1993; Prokopová a spol., 1997), nebo žábách (Prokopová-Kubinová a Syková, 2000). Je tedy zřejmé, že difúzní parametry lidské nervové tkáně se výrazně neliší od hodnot získaných v mozku experimentálních zvířat. Z pokusů na hlodavcích je známo, že se difúzní parametry ECP dramaticky mění během ontogenetického vývoje centrálního nervstva, zejména díky vyzrávání tkání během 3. postnatálního týdne (Lehmenkühler a spol., 1993; Prokopová a spol., 1997), stejně tak jako postupem stárnutí (Syková a spol., 1998; Syková, 2001). Studie využívající MRI prokázaly postupné změny v T1 a T2 váženém zobrazení lidského CNS během prvních 12 měsíců postnatálního vývoje od obrazu infantilního až po dospělý. Tyto změny pravděpodobně odpovídají snižování podílu vody v bílé i šedé hmotě během vývoje a změnám v období dokončení procesu myelinizace (Paus a spol., 2001). Předpokládáme proto, že se hodnoty difúzních parametrů také stabilizují ke konci prvního roku lidského života a že u jedinců starších jednoho roku se tyto hodnoty už signifikantně neliší od hodnot v dospělosti.

Naše výsledky ukázaly, že objemová frakce ECP byla u všech studovaných nádorů s výjimkou oligodendrogliomů signifikantně zvýšená. Prokázali jsme navíc závislost mezi nárůstem objemu ECP a rostoucí proliferační aktivitou nádorů, což je zejména u astrocytárních tumorů jedno z definujících hledisek malignity (Kleihues a Cavenee, 2000). Strukturální změny nádorové tkáně, jejíž důsledkem je zvětšení objemu ECP mohou vznikat například v důsledku změněné exprese molekul extracelulární matrix. Ke změnám ve velikosti ECP dále může přispívat ztráta mezibuněčných spojů (gap junctions) mezi nádorovými buňkami, která vede k poruše mezibuněčné komunikace (Trosko a Ruch, 1998; Soroceanu a spol., 2001) vyúsťující v neschopnost regulovat objem takto postižených buněk (Quist a spol., 2000). K dalšímu zvýšení objemu ECP zejména na periferii nádorové masy sousedící

s nepostiženým parenchymem CNS může přispívat i další faktor - odumírání neuronů v okolí díky excitotoxicitě glutamátu. Ten v gliomech dosahuje mimořádně vysokých koncentrací, zejména díky porušené schopnosti jeho zpětného vychytávání do nádorových buněk (Ye a spol., 1999; Ye a Sontheimer, 1999). Naopak, námi zjištěný fakt, že objemová frakce ECP α v oligodendrogliomech není zvýšená, může být alespoň zčásti vysvětlen tím, že v oligodendroglii není přítomna glutamin-syntetáza (enzym nutný k produkci glutamátu) (Ye a spol., 1999). Oligodendrogliomové buňky tak pravděpodobně nejsou na rozdíl od astrocytomů schopny uvolňovat toxické koncentrace tohoto neuropřenašeče, což neumožní zvyšování objemu ECP nádorové tkáně mechanismem glutamátové excitotoxicity. Na druhou stranu, výrazné zvětšení objemu ECP u pilocytárních astrocytomů i při jejich nízkém potenciálu malignity je spíše odrazem schopnosti těchto nádorů vytvářet početné drobné mikrocysty vyplněné pravděpodobně jen řídkým gelem či tekutinou, neboť ke zvýšení tortuozity v našich případech pilocytárních astrocytomů nedocházelo. Tím je také potvrzen názor, že mikrocysty jsou skutečnou strukturální součástí nádorové tkáně pilocytárních astrocytomů, a že k jejich vzniku nedochází jen vlivem artefaktů při histologickém zpracování.

Několik MRI studií hledalo vztah mezi aparentním difúzním koeficientem vody (ADC_w), histologickým stupněm malignity gliomů a stupněm jejich buněčnosti. Ukázaly, že hodnoty ADC_w jsou nepřímo úměrné malignitě nádorů (Tien a spol., 1994; Sugahara a spol., 1999; Castillo a spol., 2001; Kono a spol., 2001). Tito autoři předpokládali, že snížený ADC_w je odrazem zmenšeného objemu ECP v hypercelulárních nádorech. Naopak studie stanovující objem ECP pomocí extracelulárních markerů jako sacharóza, inulin a nyní i naše práce prokazují zvětšení objemu ECP v lidských nebo zvířecích nádorech oproti zdravé tkáni (Ausman a spol., 1977; Bakay, 1970b; Matthews a Molinaro, 1963). Tento rozpor můžeme vysvětlit na základě našich zjištění. Mimo zvětšení objemu ECP jsme v nádorové tkáni

zaznamenali výrazný nárůst tortuozity ECP. Na zvířecím modelu poranění CNS ukázal Voříšek a spol. (2002), že zvýšení tortuozity ECP díky reaktivnímu zvýšení obsahu některých složek extracelulární matrix snižuje ADC_w bez jakýchkoli změn ve velikosti ECP. Tortuozita je podle definice nepřímo úměrná aparentnímu difúznímu koeficientu (ADC). Nižší ADC tedy odráží zvýšení tortuozity s pomalejší difúzí iontů a molekul díky difúzním bariérám v mikroprostředí nádorové tkáně, nikoli však změnu objemu ECP. Zvětšení objemu ECP v nádorové tkáni nebylo překvapivě doprovázeno očekávaným snížením tortuozity ECP ale naopak nárůstem překážek, které brání difúzi látek v mezibuněčných prostorech nádorů. V některých případech je tato skutečnost poměrně dobře vysvětlitelná už z našich histologických nálezů. Nezvykle vysokou tortuozitu jsme zaznamenali u desmoplastických meduloblastomů (případy č. 33 a 34) a v jednom případě difúzního fibrilárního astrocytomu grade II (případ č. 10). Desmoplastické meduloblastomy jsou charakterizovány hojným výskytem retikulinových fibril v intersticiu a vysoké hodnoty tortuozity pravděpodobně odrážejí difúzní bariéry tvořené právě touto hustou retikulinovou spletí. Husté fascikulární uspořádání nádorových buněk a jejich výběžků v případě č. 10 pravděpodobně vedlo k nerovnoměrné difúzi v jednotlivých směrech, k tzv. difúzní anizotropii (Rice a spol., 1993; Mazel a spol., 1998), s nezvykle vysokými hodnotami λ ve směrech, ve kterých je difúze látek omezená.

Biologické vlastnosti gliových nádorů mozku nejsou na rozdíl od nádorů jiných tkáních lidského organismu, kde hraje klinicky nejdůležitější roli schopnost metastatického rozsevu, kriticky závislé jen na vlastnostech nádorových buněk jako takových, ale také na vlastnostech svého mezibuněčného prostoru. Velikost a geometrie extracelulárního prostoru a jeho složení tedy jistě hrají důležitou roli v ovlivňování jejich biologického chování.

Naše měření TMA^+-iontoforetickou metodou v reálném čase ukázaly, že objemová frakce ECP α byla u všech studovaných gliomů s výjimkou oligodendrogliálních

tumorů signifikantně zvýšená, a že toto zvýšení je úměrné rostoucí proliferační aktivitě nádorů, což je zejména u astrocytárních tumorů jedno z definujících hledisek jejich malignity (Kleihues a Cavenee, 2000). Vedle nutné schopnosti nádorových buněk adherovat a migrovat do okolní nepostižené tkáně (Bolteus a spol., 2001) je tedy schopnost vytvářet prostor pro invadující buňky další doménou agresivních mozkových nádorů. Mimo rostoucí proliferační aktivity jsme však paradoxně prokázali i zvětšující se objem ECP při rostoucí buněčnosti malignějších nádorů. Hustota nádorových buněk je sice větší, tyto buňky mají však porušenou schopnost regulovat svůj intracelulární objem (Quist a spol., 2000; Soroceanu a spol., 2001). Nádorové buňky tedy mají pravděpodobně jiný objem než jejich nenádorové protějšky. Ke zmenšení jejich buněčného objemu a naopak zvětšení ECP mohou přispívat i komplexní změny na povrchu buněčného těla a v síle a délce buněčných výběžků, což bylo pozorováno v ultrastrukturálních studiích (Scheithauer a Bruner, 1987).

Dále jsme ukázali, že zvětšení objemu ECP v nádorové tkání doprovází výrazný nárůst tortuozity, respektive překážek v difúzi látek mezibuněčným prostorem. Překážky v difúzi látek mezibuněčným prostorem astrocytomů s nízkým stupněm malignity vytváří zejména hustá síť z GFAP-pozitivních nádorových výběžků. Na druhou stranu, zkrácené a méně bohaté výběžky nádorových buněk u agresivnějších forem astrocytomů hrají pravděpodobně menší roli, a hlavním důvodem ke zvýšení tortuozity jejich ECP je nadměrná produkce glykoproteinů ECM, zejména tenascinu. Mohlo by se zdát paradoxní, jak může zvýšené množství překážek v ECP (ač ve zvětšeném objemu ECP) přispívat k větší invazivitě nádorových buněk. Je třeba si uvědomit, že difúze iontů (např. TMA^+) a migrace buněk má zcela odlišný mechanismus. Zatímco zvýšená objemová frakce ECP umožňuje pohyb malých molekul i buněk, zvýšená tortuozita díky nadprodukci některých komponent extracelulární matrix brání difúzi molekul, avšak pro nádorové buňky je substrátem pro adhezi a následnou migraci.

Shrňme tedy naše nálezy ohledně dynamiky změn extracelulárního prostoru v gliomech během nádorové progrese. U benignějších gliomů vytvářejí nádorové buňky v nepříliš zvětšeném mezibuněčném prostoru síť ze svých dlouhých bohatě větvených výběžků. S progresí ke zvýšené malignitě buňky pravděpodobně postupně ztrácejí schopnost regulovat svůj objem, ten se mění společně s úbytem výběžků nádorových buněk, a narůstá podíl mezibuněčného prostoru ve tkáni. Do něho pak začínají nádorové buňky produkovat některé glykoproteiny (zejména tenascin a vitronektin), které jsou substrátem pro následnou adhezi a migraci nádorových buněk dostatečně velikým mezibuněčným prostorem.

V současnosti se do klinické praxe uvádějí s velkými nadějemi nové terapeutické postupy s lokálním podáváním onkologických léčiv do postresekční dutiny v mozku (Read a spol., 2002; Reardon a spol., 2002). Námi zjištěné změny v geometrii mezibuněčného prostoru nádorové tkáně (zejména vysoká tortuozita) významně ovlivňují difúzi léčiv v ECP nádorové tkáně a mohou být vysvětlením pro popisovanou sníženou efektivitu těchto postupů v některých případech (Read a spol., 2002). Tento fakt by se měl také v budoucnu zohlednit v terapeutickém algoritmu, kdy před lokální aplikací vlastního chemoterapeutika by měla být nejdříve snížena tortuozita nádorového ECP např. aplikací určitých enzymů.

2.5.3. Exprese molekul ECM v gliových nádorech

Ukázali jsme, že zvětšení objemu ECP v nádorové tkání není doprovázeno poklesem tortuozity, ale naopak nárůstem překážek v difúzi látek mezibuněčným prostorem. V naší studii jsme zkoumali, jak se na zvýšení tortuozity v nádorech podílí faktory, jako je hustota nádorových buněk, síť z výběžků nádorových buněk, přítomnost proliferujících hyperplastických cév a zejména kvalitativní a kvantitativní změny ve složení nádorové extracelulární matrix (ECM). Překvapivě jsme nalezli závislost mezi narůstající buněčností nádorů a zvětšujícím se podílem objemu ECP na

celkovém objemu tkáně, na druhou stranu jsme neprokázali žádný vztah mezi nárůstem hustoty nádorových buněk a tortuozitou. Tortuozita ECP v astrocytomech se navíc zdá být jen málo ovlivněná přítomností konglomerátů hyperplastických nádorových cév. Výsledky naší studie ukázaly, že překážky v difúzi látek mezibuněčným prostorem astrocytomů s nízkým stupněm malignity vytváří zejména hustá síť z GFAP-pozitivních nádorových výběžků. Obdobný nárůst tortuozity byl pozorován v mozku potkanů s posttraumatickou astrogliózou (Roitbak a Syková, 1999). Na druhou stranu, méně bohaté a zkrácené výběžky nádorových buněk u agresivnějších forem astrocytomů hrají podle našich výsledků menší roli a hlavním důvodem zvýšení tortuozity jejich ECP je přítomnost nadměrně produkovaných glykoproteinů ECM, zejména tenascinu.

Ačkoli byla opakovaně prokázána schopnost kultivovaných gliomových buněk produkovat do svého mezibuněčného prostoru laminin, fibronektin a kolageny typu I a III - VI (Bellon a spol., 1985; Chintala a spol., 1996; Tysnes a spol., 1999), v naší sestavě jsme *in situ* nenalezli v mezibuněčných prostorech přítomnost žádného z těchto glykoproteinů. V případě kolagenu I a III nebyla jejich přítomnost v nádorové tkáni nalezena dokonce vůbec. Kolageny IV až VI byly vždy prokázány pouze ve stěně nádorových cév, nezávisle na stupni malignity nádorů, což je ve shodě s některými předešlými pozorováními *in situ* (Bellon a spol., 1985; Paulus a spol., 1988). Exprese kolagenu typu II v mozkové tkáni i v nádorech CNS je zcela novým poznatkem. Slabou pozitivitu při průkazu tohoto typu kolagenu, který je jinak strukturální součástí hyalinní chrupavky (Eyre, 2002), jsme detekovali v adventicii normálních i nádorových hyperplastických cév a prokázali jsme také jeho přítomnost ve vazivu měkkých plen mozkových. Fibronektin a laminin jsou známými komponentami bazálních membrán normálních i nádorových cév (Higuchi a spol., 1993; Chintala a spol., 1996) a přítomnost těchto dvou glykoproteinů jsme tam prokázali i v naší studii. Podobně jako Higuchi a spol. (1993) jsme však zaznamenali signifikantní úbytek fibronektinu

v bazálních membránách cév s rostoucím stupněm malignity nádorů. Obdobný fenomén jsme naopak nepozorovali při průkazu lamininu, jehož úbytek v bazálních membránách cév u astrocytomů s vysokou malignitou popsali v jedné práci Oz a spol. (2000).

Ze všech vyšetřovaných glykoproteinů ECM jsme přítomnost v mezibuněčných prostorech prokázali pouze v případě tenascinu a vitronektinu. Podobně jako Gladson a Cheresh (1991) jsme nalezli depozita vitronektinu v intersticiu nejagresivnějších astrocytomů. Jeho množství však bylo velmi malé a nepodařilo se nám prokázat významný vliv na změny v tortuozitě ECP astrocytomů. Naopak, velká množství tenascinu jsme ukázali v ECP značné části astrocytomů s vysokým stupněm malignity. To je v souladu s některými pozorováními jak ve studiích na tkáňových kulturách, tak *in situ* (Higuchi a spol., 1993; Zagzag a spol., 1995; Kim a spol., 2000). Ačkoli se někteří autoři dříve domnívali, že tenascin není ve zralé nervové tkáni přítomen (Crossin, 1996; Joester a Faissner, 2001), naše studie ukázala v několika případech přítomnost tenascinu v oblasti glia limitans externa a také, i když v omezené míře, v mezibuněčném prostoru bílé hmoty. Navíc jsme prokázali, že akumulace tohoto glykoproteinu v mezibuněčném prostoru nádorů je jedním z nejdůležitějších faktorů, které vedou k dramatickému vzestupu tortuozity nádorového ECP, a že pravděpodobně může přispívat i ke zvětšení objemu ECP nádorové tkáně. Podporu posledně uvedené hypotézy přineslo i nedávné zjištění výrazného zmenšení objemu ECP i tortuozity u tenascin-deficientních myší (Voříšek a spol., 2003). Závislost mezi produkcí tenascinu a zvýšenou malignitou nebo angiogenezí v nádorech byla dokumentována v několika pracích (Kim a spol., 2000; Oz a spol., 2000; Rascher a spol., 2002) a je nyní podpořena také výsledky naší imunohistochemické analýzy. Tenascin je tedy využitelný i diagnosticky jako prognostický marker a ukazatel větší biologické agresivity astrocytomů.

Zprávy podložené kvantitativními analýzami tkáňových homogenizátů tvrdí, že i ostatní komponenty ECM jako glykosaminoglykany a proteoglykany (zejména hyaluronát a chondroitin sulfát) jsou v gliomech přítomny ve zvýšeném množství (Delpech a spol., 1993; Knudson a spol., 1989). Ačkoliv jsme tyto komponenty v naší studii neprokazovali, můžeme spekulovat, že toto zvětšené množství proteoglykanů v nádorové tkáni nemusí nutně potvrzovat schopnost gliomových buněk nadměrně produkovat tyto látky. Může být jen nepřímým odrazem zvětšení objemu ECP v nádorové tkáni, který je pak vyplněn těmito mukoidními látkami, které jsou jak známo všudypřítomnou základní složkou ECM mozku produkovanou gliovými buňkami i ve zdravé nervové tkáni (Chintala a Rao, 1996; Margolis a Margolis, 1993).

2.6. ZÁVĚRY

1. Ve srovnání s terminální anoxií byly hodnoty difúzních parametrů ECP dosažené na konci hypoxie/ischémie obdobné. Naproti tomu, signifikantní změny v hodnotách difúzních parametrů ECP během hypoxie byly zaznamenány až na konci hypoxie a byly ve srovnání s terminální anoxií a hypoxií/ischémií výrazně menší.

2. Během hypoxie a hypoxie/ischémie došlo k výraznému zvýšení koncentrace extracelulárního glutamátu. Extracelulární koncentrace glutamátu na konci hypoxie/ischémie byla dvakrát vyšší než než na konci hypoxie.

3. Časových průběh změn extracelulární koncentrace glutamátu během tranzientní hypoxie a hypoxie/ischémie dobře koreloval se změnami ve velikosti objemové frakce ECP.

4. Difúzní parametry ECP naměřené ve zdravé lidské temporální kůře se signifikantně neliší od hodnot získaných v mozkové kůře experimentálních zvířat *in vitro* i *in vivo*.

5. Objemová frakce ECP byla ve všech studovaných mozkových nádorech s výjimkou oligodendroglimů signifikantně zvýšená. Nárůst objemu ECP v nádorové tkáni byl úměrný rostoucí proliferační aktivitě gliomů i rostoucí hustotě nádorových buněk.

6. Nárůst objemu ECP nádorové tkáně nebyl doprovázen očekávaným snížením tortuozity ECP, naopak, zejména v nádorech s nejvyšším stupněm malignity docházelo k výraznému nárůstu difúzních překážek v ECP, který byl však nezávislý na hustotě nádorové populace buněk.

7. Překážky v difúzi látek mezibuněčným prostorem astrocytomů s nízkým stupněm malignity vytváří zejména hustá síť z GFAP-pozitivních nádorových výběžků. Méně bohaté a zkrácené výběžky nádorových buněk u agresivnějších forem astrocytomů hrají menší roli a hlavním důvodem zvýšení tortuozity jejich ECP je přítomnost nadměrně produkovaných glykoproteinů ECM, zejména tenascinu.

8. Složení extracelulární matrix nádorů *in situ* se v astrocytomech i ependymomech výrazně liší od výsledků získaných ve studiích *in vitro* na tkáňových kulturách. Většina studovaných glykoproteinů ECM (laminin, fibronektin, kolagen I, III, IV - VI) byla přítomna pouze v souvislosti s cévami zásobujícími nádorovou tkáň.

9. V ECP nádorové tkáně jsme prokázali přítomnost pouze tenascinu a vitronektinu. Jak v astrocytomech, tak v ependymomech je produkce těchto dvou glykoproteinů ECM spojena s vysokým maligním potenciálem nádorů.

3. KLINICKÁ STUDIE – TRANSPLANTACE AUTOLOGNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ U PACIENTŮ S PORANĚNÍM MÍCHY

3.1. Úvod

Poranění míchy často vede k významné neurologické dysfunkci s dlouhodobou nebo trvalou invaliditou. Podle publikovaných dat se odhaduje incidence míšních poranění ve světě na 10 až 83 na milion obyvatel za rok, s prevalencí okolo 220 až 750 na milion obyvatel. Asi u jedné třetiny z těchto nemocných je popisována kvadruplegie a u poloviny pacientů se jedná o kompletní míšní lézi. Střední věk pacientů je 33 let a poměr mužů a žen je 3.8/1 (Wyndaele a Wyndaele, 2006). Fyzické i psychologické důsledky tohoto poranění dopadají nejen na postižené jedince, ale i na jejich rodiny a společnost. Časná rehabilitace a multidisciplinární přístup v péči o poranění míchy se ukázal pro pacienty přínosný, zejména s ohledem na nižší mortalitu, nižší výskyt komplikací, lehce vyšší šanci na regeneraci léze a kratší dobu hospitalizace (Devivo a spol., 1990). Nicméně přetrvávající funkční deficit přináší různě velkou závislost na poskytované zdravotní a sociální péči. Vzhledem ke zlepšující se zdravotní péči a zvyšující se prevalenci míšního poranění, tak dochází k extrémnímu nárůstu celkových výdajů za péči o tyto nemocné.

Nejstarší dochovanou písemnou zprávou popisující poranění míchy je Papyrus Edwina Smithe, jehož autorství je připisováno Imhotepovi (lékař a ministr egyptského faraóna Džosera, 2650 - 2600 př. n. l.). V této písemnosti je popsáno 48 chirurgických stavů, přičemž dva z nich se týkají poranění krční míchy a autor se o nich vyjadřuje jako o nemoci, která nemůže být vyléčena. Další zmínky o poranění míchy pocházejí od řeckých lékařů – Hippokrata (460 – 370 př. n. l.) a Galena (131 – 201). Galen byl podle zpráv první, kdo rozeznával příznaky poranění míchy podle výšky a kdo v experimentu přetínal míchu. Konzervativní přístup k léčbě poranění míchy však zůstával nezměněn a

nemocní zmírali na komplikace sdružené s poraněním. Teprve s rozvojem chirurgie v 19. století došlo k obnovení zájmu o léčbu poranění míchy. První laminektomii k uvolnění stlačené míchy provedl Henry Cline v Londýně v roce 1814 (Williard, 1871). Na českém území se o rekonstrukci přerušené míchy pokusil Maydl již v roce 1884, kdy navrhl resekci fibrosních míšních pahýlů a jejich sešití (převzato z Beneše, 1961). V Kanadě Shirres (1905) implantoval mezi míšní pahýly psí míchu a v USA Woolsey a spol. (1944) formalizovanou lidskou míchu. Rovněž v USA se Freeman v roce 1951 pokusil o anastomozu mezi sakrálním míšním kořenem a interkostálním nervem (Freeman, 1961). Ve druhé polovině 20. století se objevuje řada experimentálních pokusů ovlivnit míšní regeneraci pomocí transplantace zralé i nezralé nervové tkáně (nejčastěji periferní nerv a embryonální tkáň) nebo cizorodého materiálu do ložiška myelopatie (pro přehled viz Nornes a spol., 1984; Bureš a spol., 1984; Němeček a spol., 1984). Všechny tyto pokusy však skončily nezdarem a tak se kromě rekonstrukčních a reinervačních pokusů objevují i snahy o ovlivnění sekundárního míšního poškození (Osterholm, 1974; Němeček a spol., 1974) např. lokální hypotermií (Bricolo a spol., 1976), protektivní myelotomií nebo farmakologicky. Zkoušela se např. hyperbarická oxygenace, katecholaminy nebo látky ovlivňující jejich metabolismus. K redukci edému míchy se zkoušela dehydratační léčba ureou nebo steroidy (převzato z Kunce, 1983).

V současné době je základním opatřením v péči o akutní míšní poranění chirurgická intervence a podávání vysokých dávek metylprednisolonu. Časování chirurgického zákroku - většinou dekomprese míchy a stabilizace fraktury obratlových těl - je s ohledem na případné funkční zlepšení stavu stále nejasné. Některé studie (Vaccaro a spol., 1997; Pollard a spol., 2003; McKinley a spol., 2004) nepotvrdili prospěšnost časné chirurgické intervence, výsledky jiných studií naopak svědčí pro její benefit (Papadopoulos a spol., 2002). Rovněž nejednoznačná je otázka podávání steroidů.

Metylprednisolon u poranění míchy se používá přibližně 30 let s cílem ovlivnit sekundární mechanismy buněčného poškození, které následují po vlastním mechanickém poranění míchy. Pro objasnění efektivity metylprednisolonu u míšních poranění byly navrženy tři velké, randomizované studie - the National Acute Spinal Cord Injury Studies (NASCIS I, II a III). Ani v jedné studii podávání metylprednisolonu však nebylo spojeno se signifikantním zlepšením oproti kontrolním skupinám, pouze při post-hoc analýzách bylo pozorováno malé zlepšení motorického a sensorického skóre (NASCIS II) u pacientů, kde podávání bylo započato do 8 hodin po poranění (Bracken a spol., 1984, 1985, 1990, 1992, 1997). Přes nejednoznačné výsledky těchto studií je v řadě zemí časná chirurgická léčba a podávání metylprednisolonu standardní terapií nebo alespoň doporučeným postupem. Naděje pacientů, zejména s kompletní míšní lézí, na významné funkční zlepšení jsou však stále minimální. Pro neexistenci účinné léčby a závažné socioekonomické dopady je proto poranění míchy předmětem stálého experimentálního zájmu.

Přestože obnova motoriky je považována za hlavní vědecký i klinický cíl, i náprava mnoha dalších potíží vyplývajících z míšního poranění by přispěla k výraznému zlepšení kvality života pacientů. Například funkční obnova na vzdálenost pouze jednoho segmentu v oblasti krční míchy může znamenat možnost spontánního dýchání. Rovněž jakékoliv zlepšení sfinkterových poruch (vyprazdňování močového měchýře a konečníku) by představovalo výrazný rozdíl v kvalitě života. Zmírnění spasticity či chronické bolesti by přineslo velkou úlevu mnoha pacientům.

Snahy o nalezení způsobu regenerace poranění mozku a míchy jsou zejména v posledním desetiletí spojeny s výzkumem kmenových buněk (KB), které jsou schopny diferenciace do různých typů buněk, včetně nervových (Chopp a Li, 2002; Krause, 2002; Mezey a spol., 2000; Orlic a spol., 2001a,b; Prockop a spol., 1997). Nejméně

rizikové pro vznikající klinické studie jsou autologní kmenové buňky kostní dřeně, které nepřinášejí etické překážky. Rizika spojená s jejich odběrem a aplikací jsou dostatečně známá z jejich použití v léčbě hematologických onemocnění.

Poznatek, že kostní dřeň obsahuje kmenové buňky není nový. Hematopoetické kmenové buňky, zodpovědné za tvorbu všech typů krevních buněk v těle, byly rozpoznány před více než 40 lety (Till a McCulloch, 1961; Becker a spol., 1963). Stromální (mesenchymální) buňky kostní dřeně, heterogenní buněčná populace generující kostní, chrupavčitou, tukovou, vazivovou tkáň a retikulární síť podporující krvetvorbu, byly popsány krátce po objevu hematopoetických kmenových buněk (Friedenstein a spol., 1966; Friedenstein a spol., 1970; Owen, 1988). Relativně nedávno byla z cirkulující krve izolována populace progenitorových buněk diferencujících se do cévních endotelových buněk. Zároveň bylo zjištěno, že tato populace pochází z kostní dřeně (Asahara a spol., 1997; Shi a spol., 1998; Ratajczak a spol., 2004). Mesenchymální kmenové buňky kostní dřeně jsou vřetenovité buňky morfologicky podobné fibroblastům, které při počátečním růstu *in vitro* tvoří před první trypsinizací kolonie. Na svém povrchu neexprimují hematopoetické povrchové markery CD34, CD45, CD14, CD31, CD133, naopak exprimují CD90, CD73, CD105, CD166, CD54, CD55, CD13 a CD44 (Pittenger a spol., 1999). *In vitro* se diferencují do mesodermálních buněčných typů: osteocytů (Kassem a spol., 1993), adipocytů (Justesen a spol., 2002) a chondrocytů (Johnstone a spol., 1998), ale také do linií nemesodermálních, například buněk neuronálního typu (Jiang a spol., 2002; Sanchez-Ramos a spol., 2000; Zhao a spol., 2002). V současné době existuje více metod izolace mesenchymálních kmenových buněk. Jsou založeny buď na jejich biologických vlastnostech, jako je selektivní adheze k plastu (Kassem a spol., 1993) - tyto kultury jsou však heterogenní, kontaminované hematopoetickými buňkami - nebo na jejich

imunologických vlastnostech, jako je izolace pomocí monoklonální protiláky Stro-1 (Simmons a Torok-Storb, 1991), či izolace mononukleární frakce kostní dřeně pomocí negativní separace CD45 a glykoprotein A, adherující k lamininu (Reyes a spol., 2001).

Mesenchymální kmenové buňky se stejnými biologickými vlastnostmi byly vedle kostní dřeně izolovány i z jiných orgánů: z periferní krve (Kuznetsov a spol. 2001), synoviálních membrán (De Bari a spol. 2001), tukové tkáně (Gronthos a spol. 2001, Gimble a spol. 2006), svalů (Jankowski a spol. 2002), pupečníkové krve (Rosada a spol. 2003), či zubní dřeně dočasných zubů (Miura a spol. 2003). Zřejmě v těle existuje rozsáhlá síť těchto buněk, která je průběžně doplňována z kostní dřeně. Podle poslední hypotézy mesenchymální kmenové buňky normálně cirkulují v periferní krvi, při stresu či po poranění se začnou množit a jsou chemoatrahovány do kostní dřeně a do léze pomocí vazby mezi receptorem CXCR4, exprimovaným somatickými kmenovými buňkami, a jeho ligandem SDF-1, sekretovaným poraněnou tkání a různými orgány. Osa SDF-1-CXCR4 hraje roli při osídlování nejen kostní dřeně, ale také svalů, jater a nervových tkání, přednostně však kostní dřeně kmenovými buňkami (Kucia a spol. 2004). Cirkulující kmenové buňky tedy mezi sebou soutěží o obsazení SDF-1 pozitivních útočišť ve tkáních. Tato kompetice zřejmě vysvětluje lépe než plasticita kmenových buněk, proč kmenové buňky kostní dřeně byly nalezeny ve svalech, nebo naopak proč svalové satelitní buňky či jaterní kmenové buňky byly izolovány z kostní dřeně (Holden a Vogel 2002, Geiger a spol. 2002, Wagers a spol. 2002). Mesenchymální kmenové buňky produkují různé hematopoetické i nehematopoetické růstové faktory, interleukiny a chemokiny. Některé konstitutivně, jako IL-6,7,8,11,12,14,15, LIF, M-CSF, Flt-3 ligand, či SCF, jiné po stimulaci zánětlivými molekulami, jako IL-1, G-CSF, či GM-CSF (Majumdar a spol. 1998). Zároveň exprimují receptory těchto látek, jako receptor pro IL-1,3,4,6,7, LIF, SCF, G-CSF, IFN-gama, TNF

I + II, TGF-beta I + II, bFGF, PDGF, či EGF (Conget a Minguell 1999). Dále produkují množství molekul extracelulární matrix, například fibronektin, laminin, kolagen, hyaluronan, proteoglykany (Chichester a spol. 1993), a adhesivní molekuly, jako jsou integriny, ICAM, VCAM, ALCAM, LFA-3, L-selektin, endoglin, CD44, či lektiny, například galektin-1 (Pittenger a spol. 1999).

Právě schopnost produkovat některé růstové faktory a cytokiny, které mohou zlepšovat trofiku tkáně v místě poranění a ovlivňovat průběh zánětlivé reakce, se zdá být důležitým faktorem v průběhu regenerace poškozené tkáně.

Po poranění míchy dnes stojíme u čtyř závažných problémů, které bude nutné řešit současně s případnou transplantací KB: 1. zabránit okamžité reakci tkáně na poranění, t.j. buněčné smrti a vytvoření gliální jizvy, 2. potlačit inhibiční vlastnosti mikroprostředí CNS, které normálně brání regeneraci v CNS a naopak podpořit růstový potenciál axonů a poškozených neuronů, 3. správně nasměrovat rostoucí axony tak, aby bylo obnoveno funkční propojení, 4. přemostit lézi a vytvořit optimální podmínky pro přežívající tkáň. Všechny tyto otázky jsou dnes intenzivně zkoumány. Tak např. byly nalezeny inhibiční molekuly, které mají vztah k oligodendrocytům a jejich myelinovým pochvám, byl identifikován s myelinem spojený gen zvaný Nogo, který u potkanů i u člověka blokuje axonální vrůstání do poškozené tkáně (Chen a spol., 2000, GrandPre a spol., 2000, Prinjha a spol., 2000). Bylo provedeno i mnoho pokusů, které užívaly metodu implantace periferních nervů, nebo různých jiných vodičů a lepidel pro usnadnění míšní regenerace. V neposlední řadě jsou to i pokusy strukturálně nahradit (eventuelně přemostit lézi) a simulovat mikroprostředí nervové tkáně, které by jednak usnadnilo vrůstání a propojování buněk a axonů, zabraňovalo by vytvoření astrogliové jizvy a spolu s takovým nosičem by bylo možné úspěšněji osídlit implantací kmenových

buněk irreversibilně poškozenou nervovou tkáň (Woerly a spol., 1999; Lesný a spol., 2002 a 2006; Syková a spol., 2006; Přádný a spol., 2006; Hejčl a spol., 2008).

Preklinické studie ukázaly, že transplantované KB kostní dřeně mohou potenciálně nahradit ztrátu buněk po poranění míchy, rekonstituovat neuronální okruhy a tak propojit dráhy pod a nad míšní lezí (Chopp a spol., 2000, Sasaki a spol., 2001, Akiyama a spol., 2002, Hofstetter a spol., 2002, Inoue a spol., 2003, Saporta a spol., 2003, Wu a spol., 2003, Jendelová a spol., 2004, Urdzíková a spol., 2006). Takové pokusy byly provedeny na potkanech s míšním poraněním a ukázaly, že transplantované buňky v poraněné míše přežívají, migrují do hostitelské tkáně a vedou k regeneraci axonů a k návratu motorických funkcí (Kalyani a spol., 1998, Liu a spol., 1999).

V posledních několika letech se rovněž začínají objevovat i první práce popisující klinické zkušenosti s buněčnou terapií u pacientů po míšním traumatu. Většinou se jedná o lokální nebo systémové podání kmenových buněk kostní dřeně, někdy spojené se stimulací kmenových buněk kostní dřeně pomocí leukocytárního růstového faktoru G-CSF (Chernych a spol., 2007; Yoon a spol., 2007; Moviglia a spol., 2006; Park a spol., 2005). Dalším zdrojem kmenových buněk pro regeneraci poškozené tkáně CNS mohou být gliové buňky čichové sliznice (Negredo a spol., 2008; Kubasak a spol., 2008; Andrews a Stelzner, 2007; Franssen a spol., 2007). I tyto buňky již byly testovány u pacientů po poranění míchy (Lima a spol.2006; Féron a spol., 2005). Kromě výše uvedených buněk byly pro léčbu poraněné míchy zkoušeny intravenózně podávané autologní makrofágy (Knoller a spol., 2005) a buňky získané z fetální nervové a krvetvorně tkáně, které byly podávané subarachnoidálně do okolí léze (Rabinovich a spol., 2003). Všechny dosud publikované klinické studie se týkají malého počtu pacientů a jsou zaměřeny zejména na ověření bezpečnosti navrženého postupu buněčné terapie. Přestože ve všech těchto případech je popisováno časté zlepšení

neurologického deficitu po prodělané buněčné terapii, pro ověření statistické významnosti účinnosti této terapie jsou nutné další studie s větším počtem pacientů.

3.2. Cíle studie

Na základě dostupných výsledků jsme se v roce 2003 rozhodli ve FN Motol iniciovat vznik mezioborové klinické studie (řešitel Prof. Syková a klinický koordinátor Doc. Bojar, grant č. NR 8339-3), jejímž cílem bylo:

1) sledovat bezpečnost transplantace autologních kmenových buněk kostní dřeně a výkonů s ní spojených, stanovit možné komplikace a kontraindikace této terapie
2) stanovit optimální časový interval pro zahájení léčby po poranění a ověřit účinnost oddáleného podání buněk kostní dřeně
3) dlouhodobě sledovat účinnost terapie pomocí opakovaných funkčních vyšetření a pomocí hodnocení rozsahu míšní léze

3.3. Metodika

3.3.1. Odběr a zpracování kostní dřeně

Odběr kostní krve byl prováděn v celkové nebo epidurální anestezii kvalifikovanými hematology se zkušenostmi s tímto odběrem pro účely transplantace krvetvorných buněk. Kostní dřeň se odebírá standardní metodou aspirace dřeňové krve silnou jehlou z lopaty kosti kyčelní. K proniknutí jehly do kostní spongiózy používáme techniku zatloukání paličkou, z jednoho vpichu provádíme obvykle tři aspirace z různých hloubek. Aby nedocházelo ke zbytečné traumatizaci kůže, provádějí se 1 – 3 drobné nářezy kůže, z nichž se pak vějířovitě provádějí vlastní vpichy do kostí. K odběru se používají speciální silné jehly a 10 ml stříkačky předplněné 1 ml isotonického roztoku NaCl s 75 IU heparinu (Heparinum natricum, Spofa, ČR) na 1ml. Porce odebírané kostní krve z jednotlivých punkčních míst/etáží nepřesahují 3 ml kostní krve. Odebrané porce se shromažďují v odběrovém setu Bone Marrow Collection Kit with Pre-Filter and Inline Filters (Baxter R4R2107, USA). Při zachování odběrových objemů jednotlivých porcí (1ml roztoku + 3ml kostní krve) bude dostatečné množství jaderných elementů v 300-500 ml kostní krve. Sběrný vak na konci setu R4R2107 se po skončení odběru uzavře a celá soustava se při pokojové teplotě v transportním kontejneru dopraví k dalšímu zpracování. Po ukončení odběru, který trvá obvykle 0,5 – 1,0 hod., se kožní nářezy ošetří náplasťovým stehem a kompresivním obvazem, v pooperačním období je nutno sledovat event. krvácení. Po prvních 24 hodinách po odběru je vhodné rány převázat a prohlédnout oblast odběru, pozornost věnovat zejména známkám event. infekce. Náplasťové stehy odstraňujeme cca 5. den po výkonu. V prvních 24 hodinách po odběru je rovněž vhodné podávat běžná analgetika. Riziko odběru kostní dřeně je velmi malé a v odborné literatuře se uvádí, že komplikace se vyskytují asi v 0,27% odběrů. Z tohoto nízkého počtu komplikací je pak polovina vážných komplikací způsobena celkovou anestézií (pokud je použita), zbytek infekcemi v místě vpichů. K celkovému objemu nesrážlivé kostní krve ve vaku

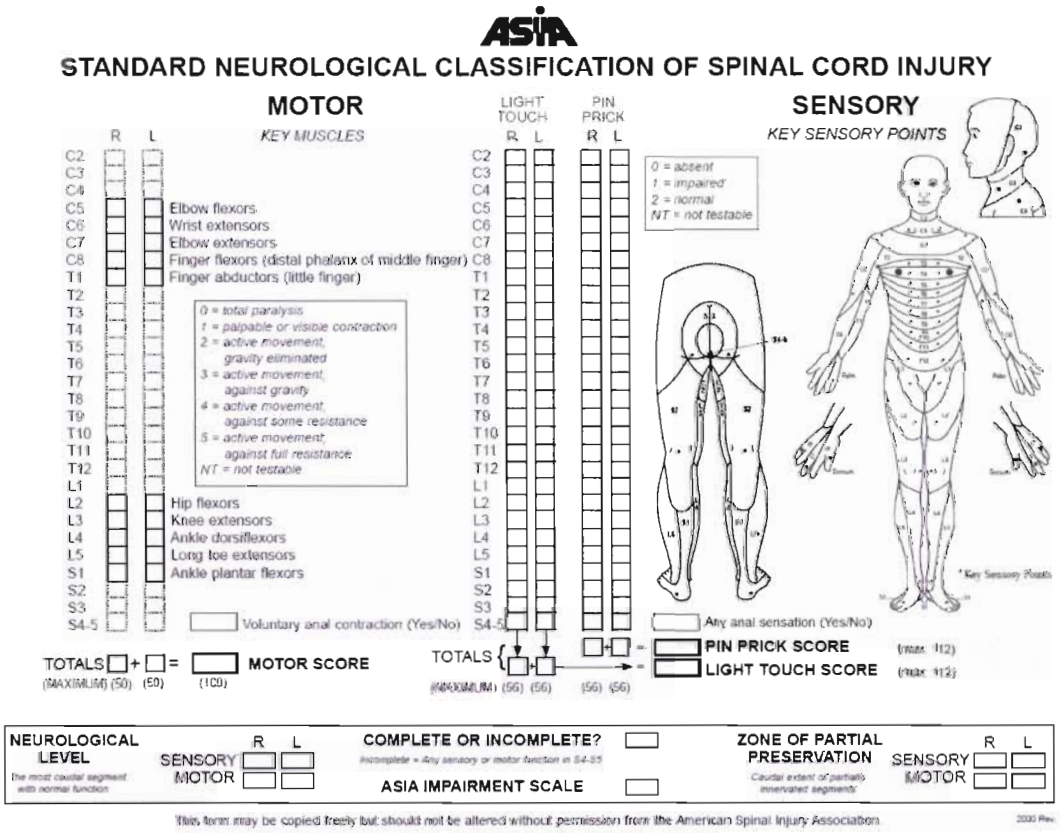
se příslušným portem přidá Gelofusin (B. Braun Melsungen AG, Germany) v objemu 25% celkového objemu kostní krve. Manipulace i následná sedimentace erytrocytů probíhá v laminárním boxu Biohazard. Po sedimentaci erytromasy se v průběhu několika desítek minut supernatant bohatý na jaderné buňky převede pomocí plazmaextraktoru (Plasma Extractor, Baxter, UK) do transferového vaku objemu do 600 ml. Přes Sampling site coupler EMC1401 (Baxter, USA) se sterilně odebere vzorek na zjištění počtu jaderných buněk a centrifugací s následnou úpravou objemu pomocí plazmaextraktoru se upraví koncentrace jaderných buněk na cílový objem. Pro odstranění kontaminujících erytrocytů se použije standardní gradientová centrifugace na HISTOPAQUE-1077 (Sigma-Aldrich Co., Germany) s následným trojím promytím v PBS s 5% BSA a závěrečným převedením do autologní plazmy za současné úpravy na cílovou koncentraci jaderných buněk. Provede se také odběr vzorku na kontrolu sterility a fenotypizaci jaderných buněk průtokovou cytometrií. Počet mononuklárních a CD34 pozitivních buněk aplikovaný každému pacientovi byl 104 ± 55x10^8, resp. 89 ± 70.7x10^6. Předchozí studie ukázali, že počet pluripotentních buněk v kostní dřeni se pohybuje okolo 1 na 10 000 až 1 na 100 000 všech buněk. Pro intravenózní aplikaci nebyly buňky nijak zpracovány, pouze objem plazmy byl redukován pomocí centrifugace. Pro intravenózní aplikaci jaderných buněk byl buněčný koncentrát ponechán v uzavřeném systému transportního vaku až do vlastní aplikace na katetrizační jednotce nebo na oddělení kde byl pacient hospitalizován. Pro intraarteriální podání bylo nutno objem mononukleární frakce redukovat na 20 - 30 ml. KB kostní dřeně byly podány v průběhu 5 hodin od odběru buď cestou katetrizace vertebrální tepny nebou cestou katetrizace periferní žíly (nejčastěji vena cubitalis). Délka aplikace se pohybovala okolo 15 min v případě intraarteriálního podání a 60 min v případě intravenózního podání.

3.3.1. Neurologické vyšetření

Během vstupního a následných kontrolních vyšetření ve 3, 6 a 12 měsících po transplantaci KB byli pacienti vyšetřeni dvěma na sobě nezávislými neurology s určením rozsahu neurologického deficitu podle Frankelovy stupnice a zároveň i podle standardní neurologické klasifikace míšního poranění ASIA. Frankelova škála byla první publikovanou neurologickou stupnicí použitou k charakterizaci pacientů s akutním míšním poraněním (Frankel a spol., 1969). Autoři použili 5 stupňovou škálu, pomocí které definovali rozsah neurologického postižení u 682 pacientů léčených ve Stoke Mandeville Hospital v letech 1951 až 1968. Stupeň A znamenal kompletní motorickou a senzorickou lézi, stupeň B = pod úrovní míšní léze je zachovaná pouze senzorická funkce, C = pod úrovní míšní léze je zachovaná motorická i senzorická funkce, ale motorická funkce není využitelná, D = pod úrovní míšní léze je zachovaná motorická i senzorická funkce, motorická funkce je využitelná, E = normální senzorická i motorická funkce. Tuto škálu si velmi rychle osvojila řada pracovišť na celém světě pro její jednoduchost, ale pro hodnocení malých změn v průběhu rehabilitace přestala brzy vyhovovat. Zejména hodnocení mezi stupněm C a D bylo nepřesné a mohlo se lišit v závislosti na vyšetřujícím personálu. Proto se brzy začaly objevovat různé modifikace této stupnice. V současné době nejčastěji užívanou klasifikací míšních poranění je standarní neurologické vyšetření navržené American Spinal Injury Association ve spolupráci s International Medical Society of Paraplegia v roce 1992 a následně revidované v roce 1996, známé jako ASIA protokol (viz obrázek č. 15).

Protokol ASIA zahrnuje zhodnocení motorických a senzorických funkcí na obou stranách těla a určení stupně neurologického deficitu. Ten se udává v rozsahu A až E, přičemž A = úplná míšní léze (není zachovaná motorická ani senzorická funkce v sakrálních segmentech S4-S5), B = neúplná míšní léze (pod úrovní míšní léze, včetně

sakrálních segmentů S4-S5, je zachovaná pouze senzorická funkce), C = neúplná míšní léze (pod úrovní míšní léze je zachovaná i motorická funkce a svalová síla u více než poloviny z vyšetřovaných svalů je menší než stupeň 3), D = neúplná míšní léze (pod úrovní míšní léze je zachovaná i motorická funkce a svalová síla u více než poloviny z vyšetřovaných svalů je větší nebo rovna stupni 3), E = normální funkce. Motorická funkce je testována pomocí vyšetření svalové síly v 10 hlavních svalových skupinách na každé straně těla. Normální svalová síla v každé vyšetřované svalové skupině je ohodnocena 5 body (maximální celkové motorické skóre je 100). Senzorické funkce jsou testovány pomocí vyšetření citlivosti na taktilní (dotek vatovou štětičkou) a algický (píchnutí špendlíkem) podnět ve 28 dermatomech. Normální funkce je ohodnocena 2 body v každém dermatomu (max. celkové taktilní a algické skóre je 112).



Obr. 15. Schématické znázornění ASIA protokolu.

3.3.2. Elektrofyziologické vyšetření

K objektivizaci funkčního postižení jsme použili elektrofyziologická vyšetření, která umožňují testovat integritu kortikospinální dráhy a dráhy zadních provazců. Jedná se o motorické a somatosenzorické evokované potenciály (MEP a SEP). Tato vyšetření byla provedena ve stejných intervalech jako klinické vyšetření, před a dále po 3, 6 a 12 měsích po transplantaci KB.

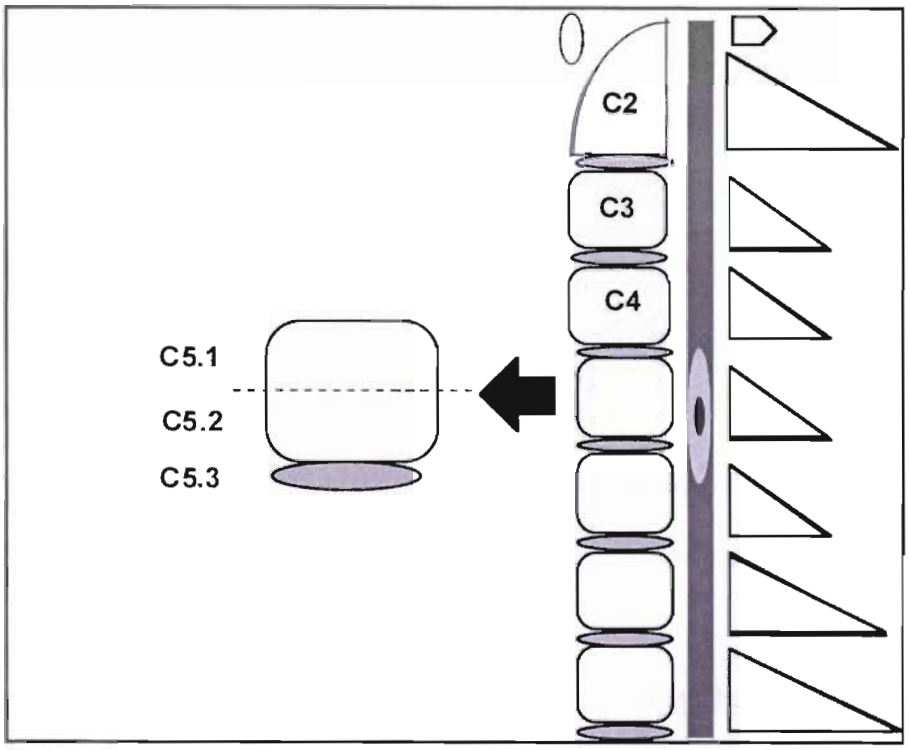
MEP byly vyšetřovány pomocí transkraniální magnetické stimulace (TMS), která využívá magnetického pole k aktivaci vybraných oblastí nervového systému. TMS jsme prováděli pomocí generátoru magnetického pole Magstim 200 (Magstim Company Ltd, UK) se stimulační cirkulární cívkou pro horní končetiny a zdvojenou cívkou pro dolní končetiny. MEP byly vybaveny pomocí stimulace motorické kůry nebo míšních kořenů (centrální nebo periferní stimulace) a odpovědi byly registrovány pomocí konvenčního elektromyografu (Medelec Synergy-Oxford Instruments, UK) ve svalech horních, resp. dolních končetin. Povrchové registrační elektrody byly umístěny nad těmito svaly: biceps brachii a abduktor digiti quinti na horních končetinách, vastus medialis a tibialis anterior na dolních končetinách. Pro další analýzu jsme z každého svalu zaznamenali 6 odpovědí. V každé odpovědi jsme hodnotili celkový kondukční čas - kortikální latenci (doba mezi stimulací mozkové kůry a odpovědí registrovanou ve svalu) a periferní kondukční čas- spinální latenci (doba mezi stimulací míšních kořenů a odpovědí registrovanou ve svalu). Odečtením periferního od celkového kondukčního času získáme centrální motorický kondukční čas. Ke zhodnocení stavu periferních nervů (s cílem vyloučit možné ovlivnění výsledků případnou neuropatií) jsme použili klasické elektromyografické vyšetření pomocí elektrické stimulace periferních nervů.

SEP byly vyšetřovány pomocí elektrické stimulace nervus tibialis a nervus medianus. Podněty byly definovány jako pravoúhlé pulsy s trváním 0.2 ms a frekvencí

3.1 Hz. Povrchové elektrody byly umístěny nad n. tibialis v oblasti vnitřního kotníku a nad n. medianus v oblasti zápěstí, přičemž katoda byla vůči anodě umístěna proximálně. Intenzita podnětu byla nastavena tak, aby podnět vyvolal viditelnou svalovou kontrakci (maximálně však na 25 mA). Povrchové registrační elektrody byly umístěné nad trnové výběžky obratlů Th12 a L1 a nad Erbův bod při registraci SEP z n. tibialis a nad trnový výběžek obratle C6 při registraci SEP z n. medianus. Kortikální odpovědi byly registrovány pomocí povrchových skalpových elektrod umístěných v oblasti Cz´-Fz při stimulaci n. tibialis a v oblasti C3´- Fz nebo C4´- Fz (podle mezinárodního registračního systému „deset-dvacet") při stimulaci n. medianus. Na zaznamenaných odpovědích jsme hodnotili latenci a amplitudu kortikální odpovědi.

3.3.3. Radiologické vyšetření

Všichni pacienti byli před zařazením do klinické studie vyšetřeni pomocí MRI (1.5 T, Philips, Nizozemí). V pravidelných intervalech, spolu s neurologickým vyšetřením bylo dále vyšetřeno 12 pacientů. Jednalo o 6 pacientů s intraarteriální a 6 pacientů s intravenózní aplikací KB. Hodnocení míšní léze jsme prováděli na sagitálních řezech. Na MRI obrazech jsme hodnotili zejména přítomnost edému (intramedulární hyperintenzita signálu na T2 vážených obrazech), krvácení (fokální snížení intenzity signálu na T2 vážených obrazech) a expanzivní chování míchy (zvětšení příčného rozměru míchy v místě poranění). Na následujícím obrázku je schématické znázornění metody popisu lokalizace zobrazené myelopatie.



Obrázek 16. Popis lokalizace úrovně míšního poranění na sagitálních MRI obrazech (podle Flanderse a spol., 1999). Místo poranění je popsáno podle přiléhajících obratlů. Každý segment je rozdělen do 3 oddílů: horní polovina obratlového těla, dolní polovina obratlového těla a meziobratlová ploténka pod příslušným obratlem. Na tomto obrázku je schématicky znázorněn edém míchy, který začíná v oblasti meziobratlové ploténky obratlů C4 a C5 a dosahuje do oblasti horní poloviny obratlového těla C6. Rozsah myelopatie je proto popsán jako C 4.3 – C 6.1. Ložisko krvácení je na tomto obrázku umístěno do oblasti dolní poloviny obratlového těla C5. Jeho umístění bude tedy popsáno jako C 5.2.

3.4. Výsledky

Pro ověření bezpečnosti a účinnosti transplantace KB kostní dřeně v léčbě poranění míchy byla navržena klinická studie „Autologní transplantace kmenových buněk kostní dřeně po akutním spinálním poranění". Jednalo se nerandomizovanou studii, která byla schválená Ministerstvem zdravotnictví České Republiky a Etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole. Do části I této studie bylo zařazeno 20 pacientů s traumatickou míšní lézí. Tito pacienti neměli jiné závažné poranění a netrpěli jiným závažným onemocněním. Všichni pacienti prodělali standardní chirurgickou léčbu, po které byli zařazeni do intenzivního rehabilitačního programu. Před transplantací KB byli vyšetřeni magnetickou rezonancí, elektrofyziologicky (motorické a somatosenzorické evokované potenciály) a neurologicky s určením stupně funkčního postižení podle Frankelovy i podle American Spinal Injury Association (ASIA) stupnice, která více upřesňuje rozsah neurologického deficitu. Pacienti podstoupili transplantaci v době od 1 do 510 dnů po míšním poranění. Transplantace kmenových buněk kostní dřeně byla provedena u 6 pacientů intraarteriální cestou (katetrizací arteria vertebralis), u ostatních pacientů pak intravenózní cestou (katetrizací periferní žíly). Následně byli pacienti v intervalech 3, 6 a 12 měsíců vyšetřeni klinicky a pomocí MRI a elektrofyziologického vyšetření. Do části II této studie bylo doposud zařazeno 13 pacientů, u kterých byli kmenové buňky aplikovány intravenózně. Intervaly vyšetření zůstali beze změny.

Část I klinické studie „Autologní transplantace kmenových buněk kostní dřeně po akutním spinálním poranění"

Do části I této studie bylo v letech 2003 až 2005 zahrnuto 20 pacientů s traumatickou míšní lézí. Jednalo se o 4 ženy a 16 mužů s poraněním krční nebo hrudní míchy ve věku 19 – 41 let. U 5-ti pacientů se podle klasifikace dle ASIA protokolu

jednalo o inkompletní míšní lézi (4 se stupněm B a 1 se stupněm C), ostatní pacienti byli hodnoceni jako kompletní míšní léze (stupeň A). Časový odstup implantace kmenových buněk od poranění míchy byl v rozmezí 10 dnů až 22 měsíců. Šesti pacientům byly kmenové buňky podány cestou katetrizace a. vertebralis, v ostatních případech byla aplikace uskutečněna cestou katetrizace periferní žíly.

Po implantaci kmenových buněk byli pacienti sledováni v pravidelných intervalech (3, 6 a 12 měsíců) na neurologické klinice FN Motol, kde kromě vyšetření klinického (dle protokolu ASIA) a MRI, absolvovali i vyšetření elekrofyziologické (MEP a SEP) za účelem objektivizace postižení kortikospinální dráhy a dráhy zadních provazců.

Do současné doby jsme u pacientů zařazených do této studie nezaznamenali žádné komplikace související s implantací kmenových buněk kostní dřeně. Ze skupiny sedmi pacientů se subakutní míšní lézí (implantace kmenových buněk do 30 dnů po úraze) došlo v pěti případech k významnému zlepšení motorických a/nebo senzorických funkcí, které korelovalo se zlepšeným nálezem v elektrofyziologickém vyšetření (SEP, MEP). Ze skupiny 13-ti pacientů s chronickou míšní lézí (implantace kmenových buněk déle jak 30 dnů po poranění) došlo k částečnému motorickému zlepšení pouze u jednoho pacienta. U ostatních pacientů v této skupině jsme žádné zlepšení ve sledovaných parametrech nezaznamenali.

3.4.1. Neurologické hodnocení

Výsledky po intraarteriálním podání kmenových buněk kostní dřeně

Do této skupiny bylo zařazeno celkem 6 pacientů. Podání KB v horizontu do 30 dní po prodělalém traumatu bylo provedeno u 4 pacientů této skupiny. U 5-ti ze 6-ti pacientů jsme následně zaznamenali zlepšení motorické a/nebo senzorické funkce. Významné funkční zlepšení jsme pozorovali u pacienta, který byl iniciálně klasifikován

jako inkompletní míšní léze (ASIA stupeň B). U tohoto pacienta, po aplikaci KB, došlo ke zlepšení senzorické, ale především i motorické funkce. Při následných kontrolách byl již klasifikován jako pacient s míšní lézí stupně D (ASIA). Ke zlepšení neurologické funkce po transplantaci KB u pacientů s chronickou míšní lézí došlo v jednom případě. Jednalo se o 39-ti letou ženu, 17 měsíců po traumatu míchy s přetrvávající inkompletní míšní lézí (ASIA stupeň C), u které jsme během následných kontroních vyšetření pozorovali nárůst svalové síly ve svalech horních končetin. Tomuto zlepšení odpovídala i změna ve sledovaných elektrofyziologických parametrech pro horní končetiny- a to jak v MEP, tak i v SEP.

Přehledná charakteristika pacientů této skupiny je uvedena v tabulce 7.

Pacient	Věk, Pohlaví	Úroveň míšní léze	Doba BCMT od poranění	ASIA hodnocení před BMCT MS/PPS/LTS	ASIA hodnocení 3m po BMCT MS/PPS/LTS	Zlepšení SEP/MEP	ASIA hodnocení 6m po BMCT MS/PPS/LTS	Zlepšení SEP/MEP	ASIA hodnocení 12m po BMCT MS/PPS/LTS	Zlepšení SEP/MEP
1	25 let (M)	C6	11 dní	A 24/30/30	A 26/48/48	A/N	**B 34/86/84**	A/N	**B 28/69/111**	A/N
2	21 let (M)	C4	18 dní	A 0/19/16			**A 8/29/38**	N/A	**A 3/24/35**	N/A
3	29 let (Ž)	C5	22 dní	A 8/10/10	**A 12/16/15**	A/N	**A 12/15/16**	A/N	**A 9/16/16**	N/N
4	41 let (M)	C6	30 dní	B 35/64/64	**D 63/78/78**	A/N	**D 93/78/78**	A/N	**D 93/78/78**	A/N
5	38 let (M)	Th9	2 měsíce	A 50/67/67	A 52/68/68	N/N	A 54/64/64	N/N	A 51/64/64	N/N
6	39 let (Z)	C5	17 měsíců	C 22/64/64	**C 41/64/64**	N/N	**C 35/64/64**	A/A	**C 36/64/64**	A/A

Tabulka 7. Charakteristika pacientů s intraarteriálním podáním kmenových buněk. Pacienti jsou v tabulce seřazeni podle odstupu podání kmenových buněk od traumatu míchy, který byl v rozmezí 11 dní až 17 měsíců. Kromě jednoho pacienta, jsme u všech zaznamenali zlepšení motorickýckých a/nebo senzorických funkcí, které bylo doprovázeno odpovídajícím zlepšením v elektrofyziologickém vyšetření (MEP, SEP).

Výsledky po intravenózním podání kmenových buněk kostní dřeně

Do této skupiny bylo zařazeno celkem 13 pacientů. Do 30 dní po traumatu míchy byla transplantace KB provedena pouze u 3 pacientů. U jednoho z těchto pacientů jsme pozorovali významné zlepšení zejména senzorické funkce. Jednalo se o pacienta s kompletní míšní lézí (ASIA stupeň A), u kterého bylo podání KB provedeno 10 dní po traumatu míchy. U ostatních pacientů, kterým jsme aplikovali kmenové buňky později, zůstal klinický stav signifikantně nezměněn.

Přehledná charakteristika pacientů této skupiny je uvedena v tabulce 8.

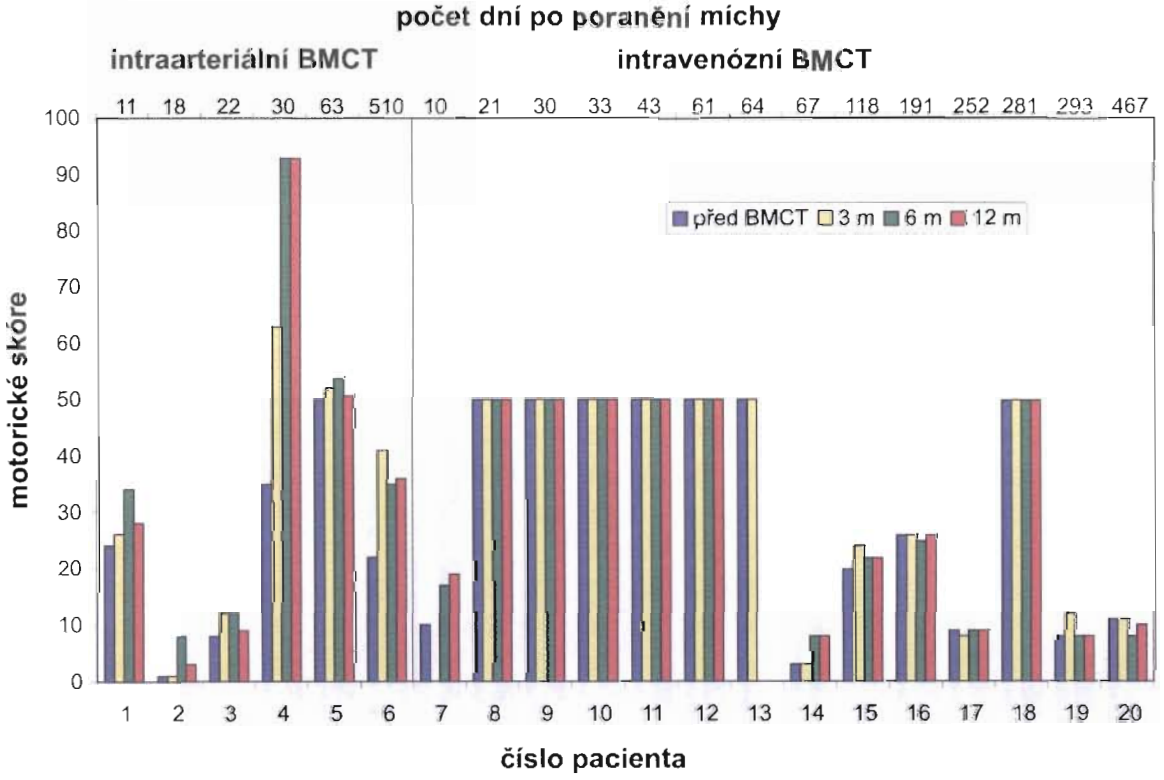
Pacient	Věk, Pohlaví	Úroveň míšní léze	Doba BMCT od poranění	ASIA hodnocení před BMCT MS/PPS/LTS	ASIA hodnocení 3m po BMCT MS/PPS/LTS	Zlepšení SEP/MEP	ASIA hodnocení 6m po BMCT MS/PPS/LTS	Zlepšení SEP/MEP	ASIA hodnocení 12m po BMCT MS/PPS/LTS	Zlepšení SEP/MEP
7	36 let (M)	C6	10 dní	A 10/32/34			**A 17/77/77**	N/N	**A 19/78/78**	A/N
8	40 let (M)	Th11	21 dní	A 50/70/70	A 50/70/70	N/N	A 50/70/70	N/N	A 50/70/70	N/N
9	21 let (M)	Th9	30 dní	A 50/63/63	A 50/62/63	N/N	A 50/64/64	N/N	A 50/64/64	N/N
10	41 let (M)	Th8	33 dní	A 50/64/64	A 50/64/64	N/N	A 50/64/65	N/N	A 50/64/64	N/N
11	24 let (Ž)	Th4	43 dní	A 50/44/44	A 50/44/44	N/N	A 50/44/44	N/N	A 50/44/44	N/N
12	37 let (M)	Th6	2 měsíce	A 50/56/56	A 50/52/52	N/N	A 50/52/52	N/N	A 50/52/52	N/N
13	30 let (M)	Th4	2 měsíce	A 50/42/42	A50/42/42	N/N	zemřel-suicidium			
14	26 let (M)	C5	2 měsíce	B 3/62/62	B 3/62/62	N/N	B 8/62/62	N/N	8/62/62	N/N
15	23 let (M)	C6	4 měsíce	B 20/66/66	B 24/68/68	N/N	B 22/64/64	N/N	B 22/64/64	N/N
16	34 let (M)	C6	6 měsíců	A 26/28/32	A 26/28/32	N/N	A 25/23/23	N/N	A 25/23/23	N/A
17	27 let (M)	C5	8 měsíců	A 9/28/28	A 8/34/34	N/N	A 9/28/28	A/N	A 9/28/28	N/N
18	19 let (M)	Th8	9 měsíců	A 50/64/64	A 50/64/64	N/N	A 50/64/64	N/N	A 50/64/64	N/N
19	26 let (M)	C5	9 měsíců	A 8/30/30	A 12/30/30	N/N	A 8/28/32	N/N	A 8/22/22	N/N
20	24 let (Ž)	C6	15 měsíců	B 11/64/65	B 11/64/64	N/N	B 8/64/64	N/N	B 9/64/64	N/N

Tabulka 8. Charakteristika pacientů s intravenózním podáním kmenových buněk. Pacienti jsou v tabulce seřazeni podle odstupu podání kmenových buněk od míšního traumatu, který byl v rozmezí 10 dnů až 15 měsíců. V této skupině jsme motorické a/nebo senzorické zlepšení zaznamenali pouze u pacienta č. 7.

Hodnocení motorického skóre

Motorické skóre se hodnotí testováním svalové síly ve 20-ti základních svalových skupinách (10 na každé straně těla, 5 na horní končetině a 5 na dolní končetině). Normální svalová funkce každé skupiny je ohodnocena 5-ti body, úplné ochrnutí svalu (plegie) je hodnoceno 0 body. Maximální možný počet získaných bodů je 100.

Přehled hodnocení motorického skóre u pacientů v části I klinické studie je znázorněn na obrázku 17.

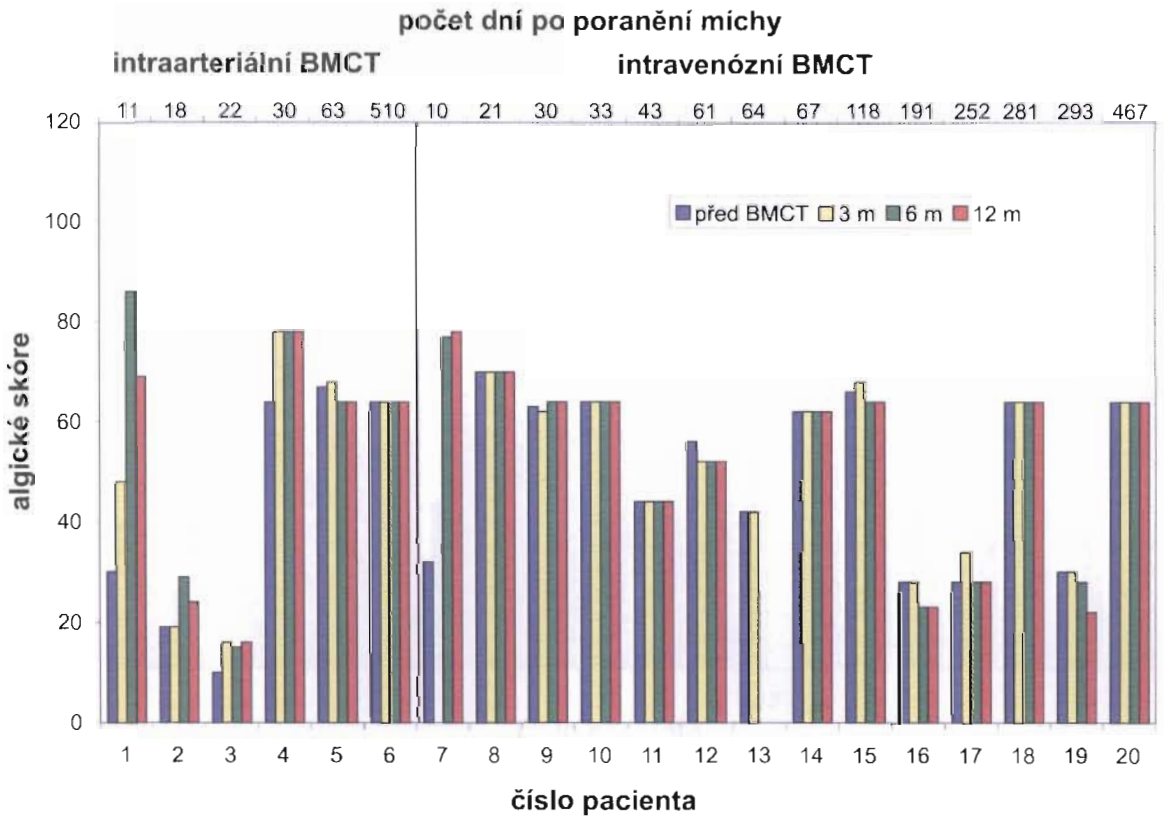


Obrázek 17. Hodnocení motorického skóre podle protokolu ASIA před aplikací kmenových buněk a během následných kontrol. Jednotliví pacienti jsou rozděleni do dvou skupin podle způsobu podání KB a seřazeni podle odstupu mezi podáním KB a poraněním míchy. Zlepšení v motorickém skóre jsme zaznamenali u 5-ti ze 6-ti pacientů s intraarteriální aplikací KB (č. 1, 2, 3, 4 a 6) a u jednoho pacienta s intravenózní aplikací KB (č.7).

Hodnocení algického skóre

Algické skóre (PPS - pin prick score) se hodnotí vyšetřením vnímání bolestivého podnětu ve všech dermatomech (celkem 28) na každé straně těla. K vyšetření se nejčastěji používá ostrý předmět s tenkou špičkou (jehla, špendlík, apod.), kterým se lehce dotýkáme povrchu kůže v jednotlivých dermatomech. Normální funkce v každém dermatomu je ohodnocena 2 body, maximálně získaný počet je tedy 112.

Přehled hodnocení algického skóre u pacientů v části I klinické studie je znázorněn na obrázku 18.

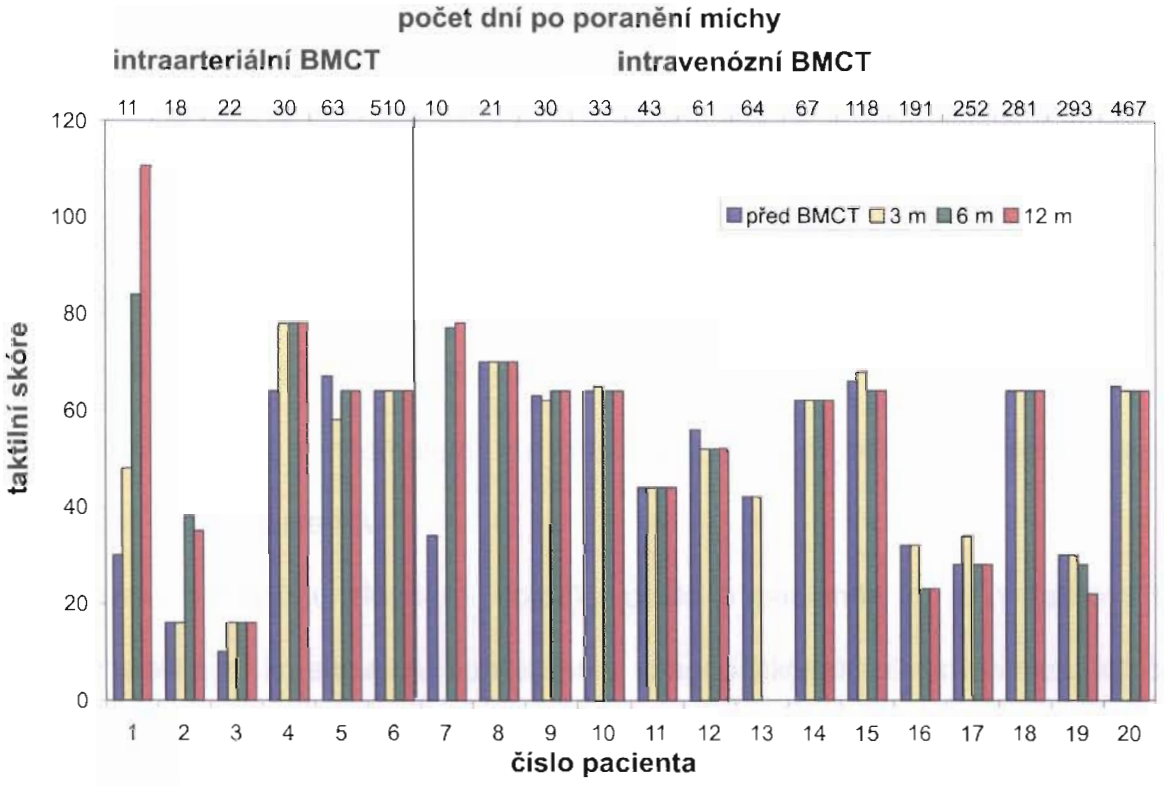


Obrázek 18. Hodnocení algického skóre podle protokolu ASIA před aplikací kmenových buněk a během následných kontrol. Jednotliví pacienti jsou rozděleni do dvou skupin podle způsobu podání KB a seřazeni podle odstupu mezi podáním KB a poraněním míchy. Zlepšení v algickém skóre jsme zaznamenali u 4 ze 6-ti pacientů s intraarteriální aplikací KB (č. 1, 2, 3 a 4) a u jednoho pacienta s intravenózní aplikací KB (č.7).

Hodnocení taktilního skóre

Taktilní skóre (LTS - light touch score) se hodnotí vyšetřením vnímání dotekového podnětu ve všech dermatomech (celkem 28) na každé straně těla. K vyšetření se nejčastěji používá vatová štětička, kterou se lehce dotýkáme povrchu kůže v jednotlivých dermatomech. Normální funkce v každém dermatomu je ohodnocena 2 body, maximálně získaný počet je tedy 112.

Přehled hodnocení taktilního skóre u pacientů v části I klinické studie je znázorněn na obrázku 19.



Obrázek 19. Hodnocení taktilního skóre (LTS- light touch score) podle protokolu ASIA před aplikací kmenových buněk a během následných kontrol. Jednotliví pacienti jsou rozděleni do dvou skupin podle způsobu podání KB a seřazeni podle odstupu mezi podáním KB a poraněním míchy. Zlepšení v taktilním skóre jsme zaznamenali u 4 ze 6-ti pacientů s intraarteriální aplikací KB (č. 1, 2, 3 a 4) a u jednoho pacienta s intravenózní aplikací KB (č.7).

Část II klinické studie „Autologní transplantace kmenových buněk kostní dřeně po akutním spinálním poranění“

Do této části studie bylo od roku 2006 dosud zařazeno 13 pacientů s akutním poraněním míchy. Jedná se o 10 mužů a 3 ženy ve věku od 14 do 42 let. 10 pacientů je klasifikováno jako kompletní míšní léze (stupeň A dle ASIA) a 3 pacienti jako inkompletní míšní léze (všichni stupeň B dle ASIA). Všem pacientům byly kmenové buňky kostní dřeně podány intravenózně cestou katetrizace periferní žíly. V 10-ti případech byly kmenové buňky podány do 30 dnů po úraze, u 3 pacientů byla subakutní transplantace kmenových buněk odložena kvůli zdravotním komplikacím a aplikace byla provedena v rozmezí 51 - 82 dní po traumatu míchy. Pacienti byli klinicky a elektrofyziologicky vyšetřeni stejným způsobem jako pacienti v části I této studie. MRI vyšetření byla provedena jen před aplikací kmenových buněk.

Ani u této skupiny pacientů se dosud žádné komplikace související s implantací kmenových buněk nevyskytly.

Zlepšení motorických a/nebo senzorických funkcí jsme zaznamenali u 4 pacientů – u všech 3 pacientů s inkompletní lézí (ASIA stupeň B) a jednoho pacienta s kompletní míšní lézí (ASIA stupeň A).

K nejvýraznějšímu zlepšení motoriky došlo u pacientky č. 1 (v tabulce 9), kde v době aplikace kmenových buněk jsme diagnostikovali plegii dolních končetin. 3 měsíce po aplikaci jsme při pravidelné kontrole zaznamenali obnovu hybnosti dolních končetin, s přítomností volních svalových kontrakcí ve všech vyšetřovaných svalových skupinách. 6 měsíců po aplikaci byla pacientka schopna v chodítku ujít několik kroků. Tomuto zlepšení odpovídalo i zlepšení elektrofyziologických parametrů, kde při vyšetření MEP jsme nově registrovali odpověď v obou m. tibialis anterior a zvýšení amplitudy v obou m. quadriceps femoris. To odpovídá reintegraci centrální motorické

dráhy v místě poranění a zvýšení počtu funkčních axonů v terčových svalech. V ASIA klasifikaci se pacientka posunula ze stupně B na stupeň D.

Přehledná charakteristika pacientů zahrnutých to této části klinické studie je uvedena v tabulce 9.

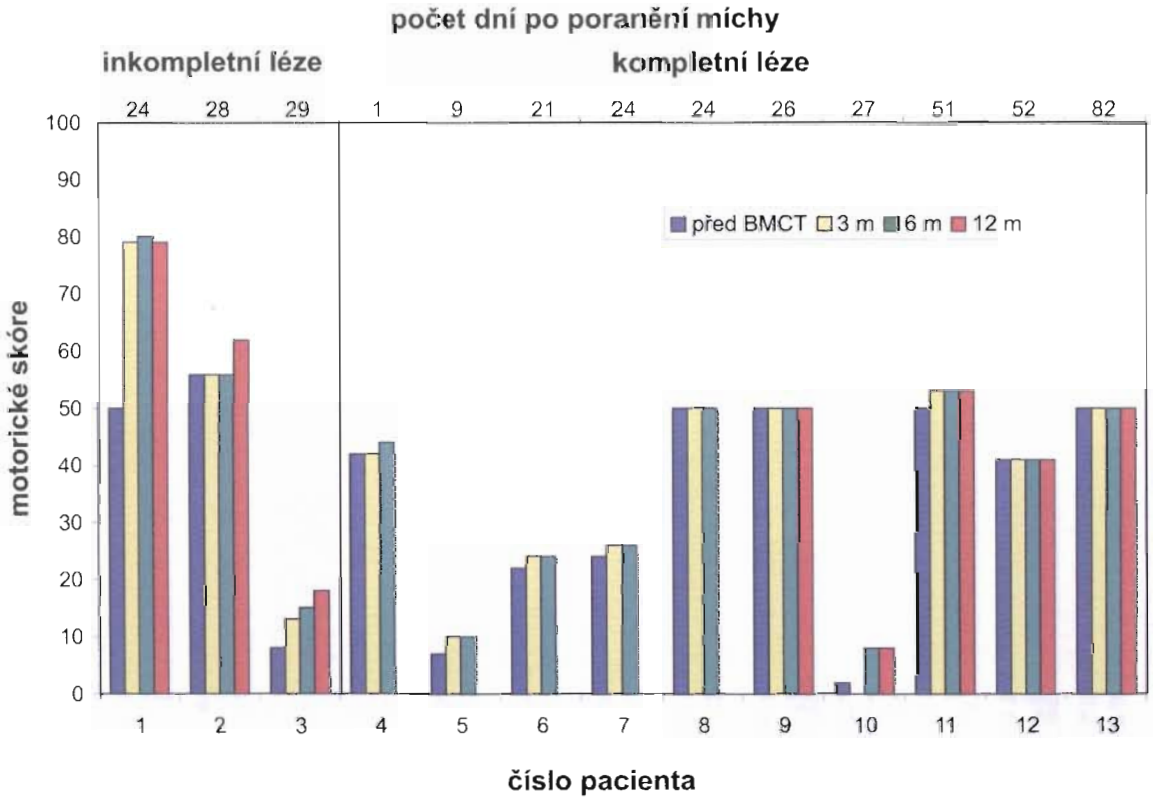
Pac-ient	Věk, Pohla-ví	Úrov-eň míšní léze	Doba BMCT od poran ění	ASIA hodnoce ní před BMCT MS/PPS/ LTS	ASIA hodnoce ní 3m po BMCT MS/PPS/ LTS	Zlepše -ní SEP/ MEP	ASIA hodnoce ní 6m po BMCT MS/PPS/ LTS	Zlepše -ní SEP/ MEP	ASIA hodnoce ní 12m po BMCT MS/PPS/ LTS	Zlepše -ní SEP/ MEP
1	28 let (Ž)	L1	24 dní	B 50/94/94	**D 79/94/94**	N/A	**D 80/94/94**	N/A	**D 79/94/94**	N/A
2	32 let (M)	L2	28 dní	B 56/84/84	**B 56/100/100**	A/N	**B 56/100/100**	A/N	**C 62/100/100**	A/N
3	27 let (M)	C5	29 dní	B 8/62/62	**B 13/62/64**	N/N	**B 15/62/64**	N/N	**B 18/62/64**	N/N
4	39 let (M)	C7	1 den	A 42/26/26	A 42/30/30		A 44/30/30			
5	30 let (M)	C5	9 dní	A 7/26/26	A 10/28/28		A 10/28/28			
6	17 let (M)	C6	21 dní	A 22/32/32	A 24/32/32		A 24/32/32			
7	30 let (M)	C6	24 dní	A 24/20/20	A 26/20/20	N/N	A 26/20/20	N/N		
8	28 let (M)	Th9	24 dní	A 50/64/64	A 50/64/64	N/N	A 50/64/64	N/N		
9	32 let (M)	Th5	26 dní	A 50/46/46	A 50/46/46	N/N	A 50/46/46	N/N	A 50/46/46	N/N
10	16 let (M)	C5	27 dní	A 2/14/14			A 8/16/16	N/N	A 8/16/16	N/N
11	14 let (Ž)	Th10	51 dní	A 50/75/75	A 53/77/77	N/N	A 53/77/77	N/N	A 53/77/77	N/N
12	20 let (M)	C8	52 dní	A 41/35/35	**B 41/64/64**	A/N	**B 41/64/64**	A/N	**B 41/64/64**	A/N
13	42 let (Ž)	Th10	82 dní	A 50/66/66	A 50/66/66	N/N	A 50/66/66	N/N		

Tabulka 9. Charakteristika pacientů v části II klinické studie. V tabulce jsou jako první uvedeni pacienti s inkompletní míšní lézí, následují pacienti s kompletní míšní lézí. Seřazeni byli podle doby aplikace KB od poranění míchy.

Hodnocení motorického skóre

Motorické skóre se hodnotí testováním svalové síly ve 20-ti základních svalových skupinách (10 na každé straně těla, 5 na horní končetině a 5 na dolní končetině). Normální svalová funkce každé skupiny je ohodnocena 5-ti body, úplné ochrnutí svalu (plegie) je hodnoceno 0 body. Maximální možný počet získaných bodů je 100.

Přehled hodnocení motorického skóre u pacientů v části II klinické studie je znázorněn na obrázku 20.

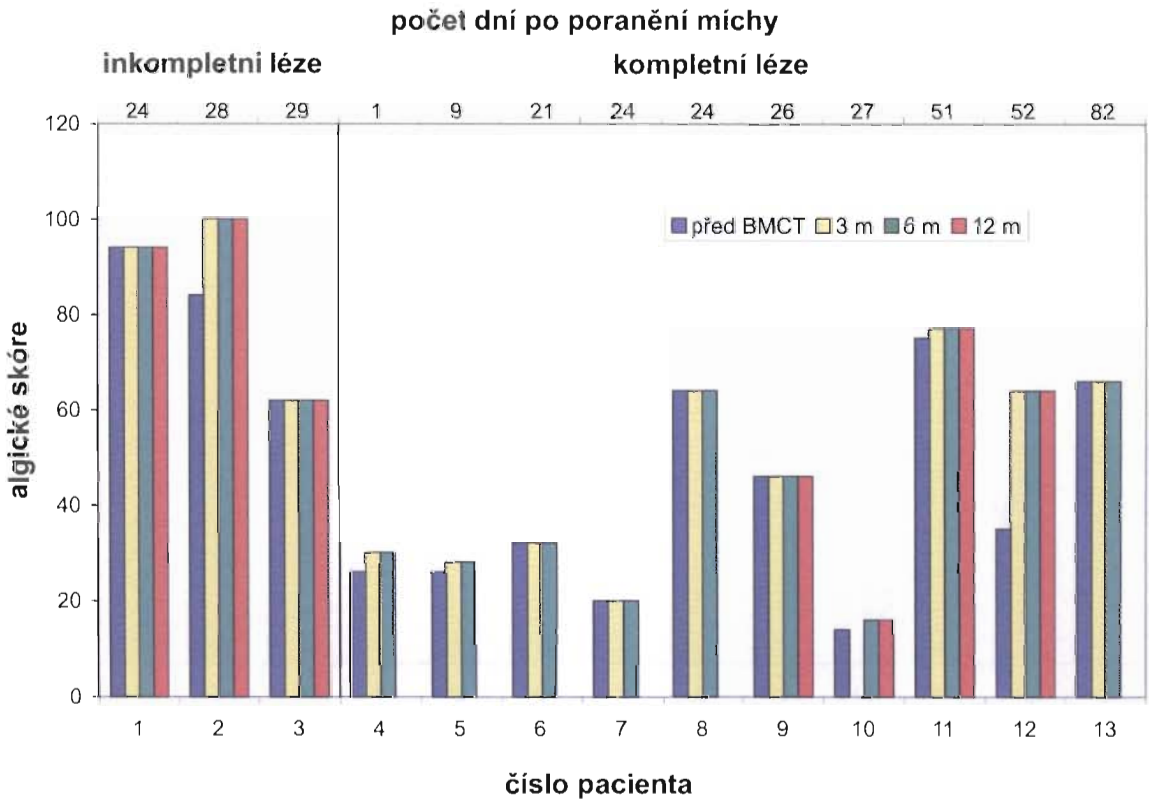


Obrázek 20. Hodnocení motorického skóre podle protokolu ASIA před aplikací kmenových buněk a během následných kontrol. Jednotliví pacienti jsou rozděleni do dvou skupin podle stupně poranění v ASIA klasifikaci a seřazeni podle odstupu mezi podáním KB a poraněním míchy. Zlepšení v motorickém skóre jsme zaznamenali u 3 pacientů s inkompletní míšní lézí (č. 1, 2 a 3). Významné motorické zlepšení jsme nazaznamenali u žádného pacienta s kompletní míšní lézí.

Hodnocení algického skóre

Algické skóre (PPS - pin prick score) se hodnotí vyšetřením vnímání bolestivého podnětu ve všech dermatomech (celkem 28) na každé straně těla. K vyšetření se nejčastěji používá ostrý předmět s tenkou špičkou (jehla, špendlík, apod.), kterým se lehce dotýkáme povrchu kůže v jednotlivých dermatomech. Normální funkce v každém dermatomu je ohodnocena 2 body, maximálně získaný počet je tedy 112.

Přehled hodnocení algického skóre u pacientů v části II klinické studie je znázorněn na obrázku 21.

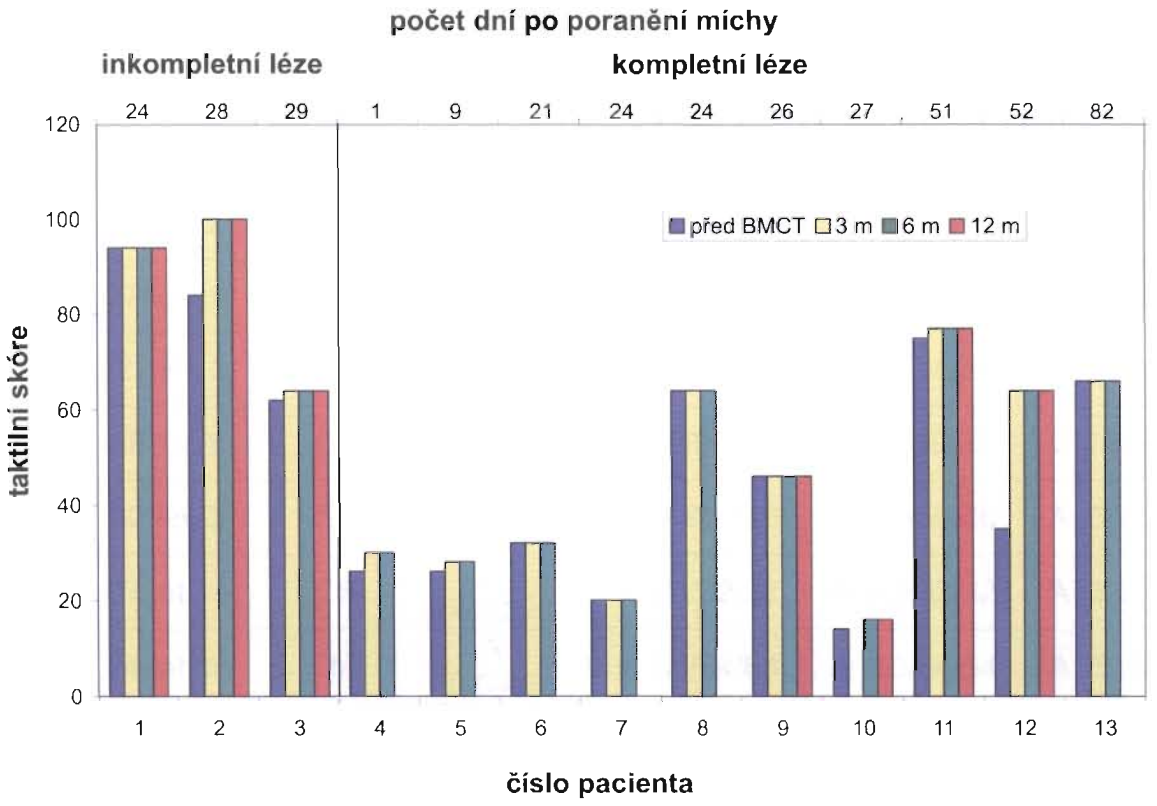


Obrázek 21. Hodnocení algického skóre podle protokolu ASIA před aplikací kmenových buněk a během následných kontrol. Jednotliví pacienti jsou rozděleni do dvou skupin podle stupně poranění v ASIA klasifikaci a seřazeni podle odstupu mezi podáním KB a poraněním míchy. Zlepšení v algickém skóre jsme zaznamenali u jednoho pacienta s inkompletní míšní lézí (č.2) a u jednoho pacienta s kompletní míšní lézí (č.12).

Hodnocení taktilního skóre

Taktilní skóre (LTS - light touch score) se hodnotí vyšetřením vnímání dotekového podnětu ve všech dermatomech (celkem 28) na každé straně těla. K vyšetření se nejčastěji používá vatová štětička, kterou se lehce dotýkáme povrchu kůže v jednotlivých dermatomech. Normální funkce v každém dermatomu je ohodnocena 2 body, maximálně získaný počet je tedy 112.

Přehled hodnocení taktilního skóre u pacientů v části II klinické studie je znázorněn na obrázku 22.



Obrázek 22. Hodnocení taktilního skóre (LTS- light touch score) podle protokolu ASIA před aplikací kmenových buněk a během následných kontrol. Jednotliví pacienti jsou rozděleni do dvou skupin podle stupně poranění v klasifikaci ASIA a seřazeni podle odstupu mezi podáním KB a poraněním míchy. Zlepšení v taktilním skóre jsme zaznamenali u jednoho pacienta s inkompletní míšní lézí (č. 2) a u jednoho pacienta s kompletní míšní lézí (č.12).

Kontrolní skupina pacientů s poraněním míchy

Kontrolní skupina byla vytvořena náhodným výběrem 15-ti pacientů se závažným poraněním míchy, které odpovídalo stupni A nebo B v klasifikaci podle ASIA. Jednalo u pacienty léčené ve FN Motol, kteří nebyli zařazeni do naší klinické studie, ale byli klinicky vyšetřeni stejným způsobem a ve stejných intervalech jako pacienti ve studii. V tabulce 10 je přehled klinického vyšetření podle ASIA protokolu.

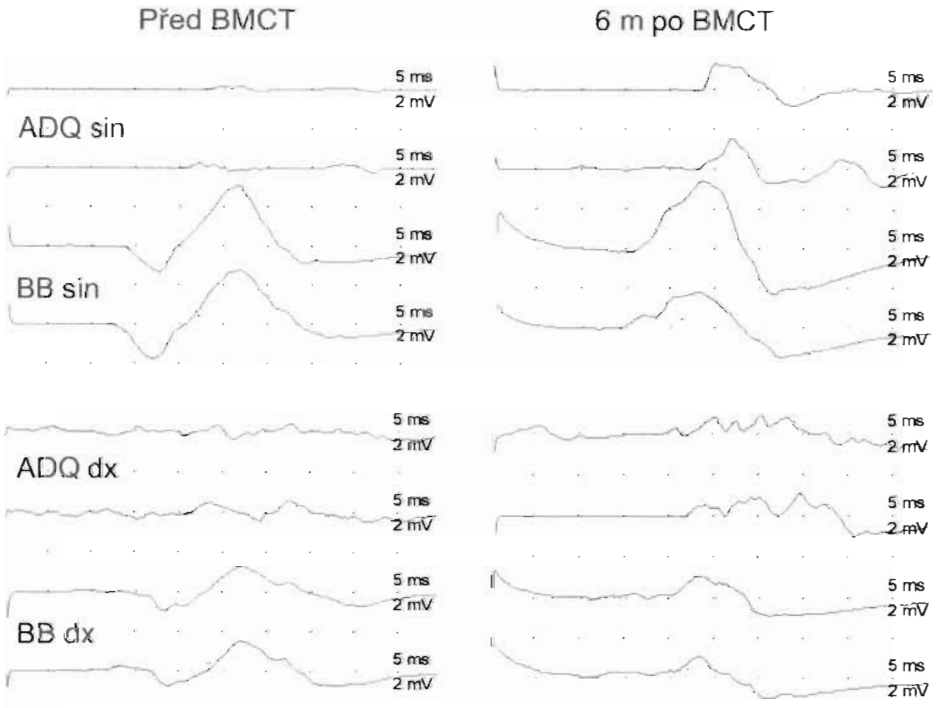
Pacient	Věk, pohlaví	Úroveň léze	ASIA při přijetí MS/PPS/LTS	ASIA 3m po přijetí MS/PPS/LTS	ASIA 6m po přijetí MS/PPS/LTS	ASIA 12m po přijetí MS/PPS/LTS
K1	21 let, m	C5	A 3/17/17	A 3/21/21	A 8/24/24	A 8/24/24
K2	32 let, m	Th10	A 50/68/68	A 50/68/68	A 50/68/68	A 50/68/68
K3	27 let, m	Th5	A 50/46/46	A 50/46/46	A 50/46/46	A 50/46/46
K4	20 let, m	C5	A 8/14/14	A 10/16/16	A 17/16/16	A 14/16/16
K5	19 let, ž	Th10	A 50/72/72	A 50/72/72	A 50/72/72	A 50/72/72
K6	27 let, m	Th6	A 50/50/54	A 50/56/58	A 50/56/58	A 50/56/58
K7	22 let, ž	Th8	B 50/86/86	C 56/86/86	C 62/86/86	C 62/86/86
K8	26 let, ž	C6	B 16/64/64	B 18/98/98	B 20/98/98	B 18/98/98
K9	32 let, ž	Th8	A 50/60/66	A 50/66/66	A 50/66/66	A 50/66/66
K10	37 let, m	C6	A 24/28/28	A 26/32/32	A 28/32/32	A 32/32/32
K11	24 let, m	Th9	A 50/64/64	A 50/64/64	A 50/64/64	A 50/64/64
K12	35 let, m	C7	A 34/30/30	A 42/30/30	A 42/30/30	A 42/30/30
K13	23 let, m	C5	A 5/26/26	A 8/28/28	A 8/28/28	A 7/26/26
K14	18 let, m	C6	A 18/22/22	A 22/28/28	A 26/32/32	A 24/32/32
K15	19 let, m	C4	A 0/14/14	A 2/16/16	A 4/16/16	A 4/16/16

Tabulka 10. Klinická charakteristika pacientů kontrolní skupiny. Významné zlepšení motoriky a/nebo citlivosti jsme pozorovali u dvou pacientů této skupiny. V obou případech se jednalo o pacienty s inkompletní míšní lézí (K7 a K8).

3.4.2. Elektrofyziologické hodnocení

Elektrofyziologická vyšetření (MEP a SEP) byla provedena ve stejných intervalech jako vyšetření klinická. Výhodou těchto vyšetření je fakt, že nevyžadují spolupráci pacienta. Na druhou stranu se jedná o vyšetření časově náročná, která lze provádět jen u stabilizovaných pacientů.

Příklad zaznamenané evokované odpovědi je uveden na obrázku 23.



Obrázek 23. Motorické evokované potenciály ve svalech pravé (dx) a levé (sin) horní končetiny před a 6 měsíců po transplantaci KB. Po transkraniální magnetické stimulaci byly při vstupním vyšetření registrovány odpovědi oboustranně jak v m. abductor digiti quinti (ADQ), tak i v m. biceps brachii (BB). 6 měsíců po aplikaci KB jsme zaznamenali zvýšení amplitudy evokované odpovědi v obou ADQ. Tento nález svědčí pro částečné zlepšení funkce míšního segmentu C8.

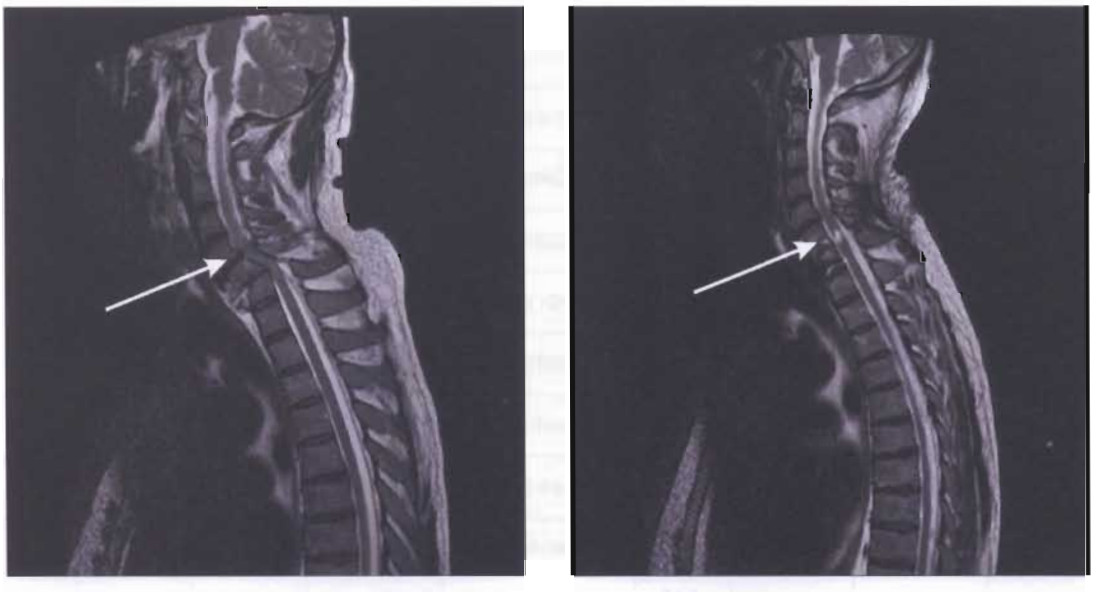
Přehled hodnocených parametrů a jejich výsledky je uveden v tabulce 11. V tabulce uvádíme pouze pacienty, u kterých jsme v průběhu kontrolních vyšetření zaznamenali nějaké změny. Číslování pacientů odpovídá číslování v tabulce 7 a 8.

Pacient	SEP	MEP	před BMCT				kontrola po 3m				kontrola po 6m				kontrola po 12m			
			latence vlevo/vpravo		amplituda vlevo/vpravo		latence vlevo/vpravo		amplituda vlevo/vpravo		latence vlevo/vpravo		amplituda vlevo/vpravo		latence vlevo/vpravo		amplituda vlevo/vpravo	
1	TBN		-	-	-	-	36.8	-	0.4	-	47.2	-	0.5	-	48.0	45.2	0.82	0.23
	MDN		20.3	20.5	1.7	0.9	21.5	21.6	0.6	2.7	20.3	20.3	1.04	2.6	21.6	21.1	2.7	4.1
		BB	13.3	13.3	4.1	0.9	13.0	12.3	6.8	7.0	12.1	12.9	5.8	3.8	12.4	11.3	12.2	8.1
		ADQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		VM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		TA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	TBN		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDN		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		BB	-	-	-	-	-	13.2	-	0.4	-	12.3	-	0.3	-	16.9	-	1.0
		ADQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		VM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		TA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	TBN		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDN		22.8	-	1.4	-	22.6	21.4	1.4	0.6	25.0	25.9	0.16	0.6	-	-	-	-
		BB	11.3	13.3	0.3	0.2	12.0	11.9	1.6	1.3	11.4	11.1	2.0	1.9	11.2	12.3	5.0	5.4
		ADQ	-	-	-	-	-	16.7	-	0.2	27.7	22.7	0.2	0.2	20.1	-	0.2	-
		VM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		TA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	TBN		-	-	-	-	-	50.1	-	0.3	45.3	45.3	0.5	0.7	47.3	45.2	0.3	0.5
	MDN		22.0	21.0	0.9	1.3	21.9	20.0	0.5	0.8	20.3	21.5	0.5	1.5	21.0	21.9	1.2	1.9
		BB	12.2	12.6	4.2	2.1	13.8	10.6	3.8	2.6	11.4	13.8	1.6	3.6	11.5	14.2	11.5	4.4
		ADQ	20.6	21.0	0.3	0.4	-	19.9	-	1.0	21.6	23.1	1.9	1.8	21.1	22.7	2.5	4.8
		VM	-	25.0	-	0.6	32.0	25.0	0.4	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
		TA	-	40.6	-	0.8	-	38.4	-	1.0	-	32.2	-	0.7	-	-	-	-
6	TBN		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDN		-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.8	-	1.0	26.7	23.3	2.4	0.9
		BB					10.5	9.7	2.2	6.2	11.8	10.8	6.5	6.9	12.7	10.6	2.2	5.7
		ADQ					27.5	-	4.1	-	23.8	22.1	4.2	0.4	25.8	28.6	1.0	0.1
		VM					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		TA					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	TBN		-	51.2	-	0.5					-	51.4	-	0.4	44.9	51.4	0.3	0.4
	MDN		20.9	20.8	0.5	0.8					20.9	-	1.2	-	21.6	-	1.2	-
		BB	13.6	12.3	5.8	6.1					10.6	11.1	10.3	18.8	11.1	11.0	11.0	12.3
		ADQ	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-
		VM	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-
		TA	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-
16	TBN		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDN		19.9	20.4	0.8	1.3	20.1	20.3	1.5	1.9	19.9	20.6	1.4	1.4	20.5	20.1	0.5	1.4
		BB	11.9	10.7	4.2	4.2	13.7	16.3	6.1	4.2	11.4	13.5	9.2	7.0	11.2	12.0	6.8	6.8
		ADQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31.5	-	0.7	-
		VM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		TA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabulka 11. Elektrofyziologická charakteristika pacientů u kterých došlo ke změnám v MEP nebo SEP během kontrolních vyšetření po aplikaci KB. Políčka vyplněné pomlčkou znamenají, že sledovaná evokovaná odpověď nebyla výbavná. V případě, že vyšetření nebylo provedeno, zůstávají políčka prázdná.

3.4.3. Radiologické hodnocení

U všech akutních pacientů s poraněním míchy jsme nalezli na MRI obrazech různě velké ložisko myelopatie, způsobené kontuzí nebo kompresí míchy, doprovázené edémem a v několika případech i menším krvácením v místě léze. Rozsáhlá ložiska myelopatie s velkým edémem byla často spojena s expanzivním chováním míchy - a tedy s větším rizikem sekundárního ischemického poškození. V chronické fázi jsme již nacházeli ložiska myelopatie způsobená gliózou, někdy s přítomností drobných či větších kavit. Kontrolní MRI vyšetření byla provedena v intervalech 3, 6 a 12 měsíců po transplantaci kmenových buněk. Na MRI obrazech získaných během těchto vyšetření jsme nepozorovali jiné změny než ty, způsobené regresí edému, krvácení a gliotickým jizvením poškozené tkáně. Příklad takového vývoje je ukázán na obrázku 24.



Obrázek 24. Příklad MRI vyšetření před (vlevo) a 6 měsíců po (vpravo) transplantaci KB kostní dřeně. Sagitální řez míchou zobrazuje posun těla obratle C6 s kompresí a edémem míchy v úrovni C6-C7. Ložisko myelopatie bylo posáno v úrovni C6.1-C7.1, s edémem, jehož kraniokaudální rozměr byl 29 mm. V této úrovni se 6 měsíců po transplantaci KB zobrazuje ložisko gliózy s malou posttraumatickou kavitou.

U pacientů s chronickou míšní lézí se nálezy při kontrolních MRI vyšetřeních nelišily od těch, získaných před transplantací kmenových buněk. Nutno ovšem dodat, že vyšetření bylo ve většině případů doprovázené rušivými artefakty z kovových implantátů (dlahy, šrouby, kovové náhrady obratlových těl, apod.), které se používají při operační stabilizaci poranění páteře. Z těchto důvodů jsme v pozdější fázi této studie ustoupili od pravidelného kontrolního vyšetřování ve výše uvedených intervalech a kontrolní vyšetření jsme indikovali s ohledem na klinický stav jednotlivých pacientů.

Přehled sledovaných parametrů na MRI vyšetření je zobrazen v tabulce 12.

Pacient	Věk, pohlaví	Úroveň míšní léze	Doba MRI od poranění	ASIA hodnocení před BMCT MS/PPS/LTS	Místo léze dle MRI	Délka edému/ gliózy v mm	Krvácení	Expanze míchy	Změna na dalších MRI
1	25 let (M)	C6	10 dní	A 24/30/30	C6.1-C7.2	17	ne	ne	ne
2	21 let (M)	C4	16 dní	A 0/19/16	C2.1-C7.2	56	13 mm	ano	regrese krvácení
4	41 let (M)	C6	28 dní	B 35/64/64	C6.1-C7.1	29	ne	ano	regrese edému
5	38 let (M)	Th9	2 měsíce	A 50/67/67	Th8.1-Th8.3	18	ne	ne	ne
6	39 let (Z)	C5	17 měsíců	C 22/64/64	C5.1-C5.3	13	ne	ne	ne
7	36 let (M)	C6	8 dní	A 10/32/34	C2.3-Th1.2	80	16 mm	ano	regrese krvácení
8	40 let (M)	Th11	19 dní	A 50/70/70	Th11.1	11	ne	ne	ne
9	21 let (M)	Th9	27 dní	A 50/63/63	Th7.1-Th9.2	50	ne	ne	regrese edému
10	41 let (M)	Th8	31 dní	A 50/64/64	Th8.2-Th9.2	24	ne	ne	ne
11	24 let (Ž)	Th4	41 dní	A 50/44/44	Th3.1-Th3.2	10	ne	ne	ne
14	26 let (M)	C5	2 měsíce	B 3/62/62	C4.2-C5.1	13	ne	ne	ne
20	24 let (Ž)	C6	15 měsíců	A 11/64/65	C4.1-C5.2	23	ne	ne	ne

Tabulka 12. MRI hodnocení pacientů v části I klinické studie. Tabulka přehledně zobrazuje MRI nálezy u pacientů s intraarteriální aplikací kmenových buněk (č. 1-6) a vybraných pacientů s intravenózní aplikací kmenových buněk.

3.5. Diskuze

Míšní poranění, zejména ta s velkým neurologickým deficitem (ASIA stupeň A a B) představují v současné době závažný medicínský problém. Řada studií ukazuje na špatnou prognózu těchto pacientů: u pacientů s kompletní míšní lézí (ASIA stupeň A) dojde během 1 roku ke zlepšení pouze asi u 5-6% pacientů (Burns a spol, 2003; Marino a spol., 1999). Poranění míchy představuje komplex událostí (Tator, 1995) a proto úspěšná léčba by měla postihovat několik různých úrovní. V první fázi by se mělo zabránit sekundárnímu poškození tkáně pomocí neuroprotektivní léčby. Následně by se léčba měla zaměřit na obnovu funkce postižené míchy prostřednictvím redukce jizvení poškozené tkáně, potlačení inhibičního efektu některých molekul, stimulace nervových buněk k regeneraci axonů, přemostění defektu, usnadnění prorůstání axonů přes místo poranění a vzniku nových spojení.

Kostní dřeň je tradičně vnímána jako orgán složený z buněk dvou odlišných linií: hematopoetické a stromální (mezenchymální). Narozdíl od hematopoetických kmenových buněk, které jsou dlouhou dobu léčebně využívány u řady hematologických onemocnění, byly mezenchymální kmenové buňky původně studovány pouze s ohledem na jejich úlohu v prostředí krvetvorné tkáně. Teprve nedávné výzkumy vedli k objevu, že MSC mohou být progenitorovými buňkami pro ektodermální, mesodermální a endodermální tkáně (Mezey a spol, 2000). Navíc byl u MSC i hematopoetických kmenových buněk prokázán neuroprotektivní efekt (Chong a spol, 2002). Není pochyb, že kostní dřeň představuje velmi dobře přístupný zdroj kmenových buněk. Rovněž požadavky na kultivaci in vitro nejsou přehnaně náročné, a tak MSC představují ideálního kandidáta pro vznikající studie buněčné terapie.

V naší preklinické studii byly potkanům s balónkovou míšní lézí podávány MSC sedm dní po poranění. U takto léčené skupiny zvířat jsme zaznamenali zlepšení

motorických i sensorických funkcí (Jendelová a spol., 2004; Syková a Jendelová, 2006). Vzhledem k tomu, že zlepšení bylo zaznamenáno i u zvířat, kterým jsme podali veškeré mononukleární buňky kostní dřeně (obsahující okolo 1% MSC), přistoupili jsme k této klinické studii, ve které nebyl požadavek na čisté prostory, které jsou nutné v případě kultivace MSC. Otázka nejvhodnějšího buněčného typu zůstává však zatím nejasná, stejně jako mechanismy léčebného účinku. Jedním z možných mechanismů je tzv. „replacement" efekt, kdy implantované buňky se integrují do hostitelské tkáně a nahrazují buňky poškozené nebo chybějící. V několika studiích byl tento efekt zkoumán u neurálních prekurzorových buněk na modelu míšního poranění. Ukázalo se, že tyto buňky jsou schopny se diferencovat do neuronů, astrocytů a oligodendrocytů a mají pozitivní vliv na zlepšení neurologické funkce (Iwanami a spol., 2005; Ogawa a spol., 2002; Okada a spol., 2005). Do neuronální a gliové linie jsou schopny se diferencovat i MSC (Azizi a spol., 1998; Brazelton a spol., 2000; Eglitis a spol., 1999; Jendelová a spol., 2003; Mezey a spol., 2000; Ohta a spol., 2004). V naší preklinické studii (Jendelová a spol., 2003) jsme implantovali MSC do místa fotochemické léze v mozkové kůře potkanů a sledovali jsme diferenciaci těchto buněk. Zjistili jsme, že pouze asi 5% MSC označených BrdU exprimuje neuronální marker NeuN a nezjistili jsme žádné MSC exprimující astrocytární marker GFAP.

Kromě mechanismu náhrady poškozených buněk, existují i další vysvětlení proč mohou být MSC užitečné v léčbě míšního poranění. Řada studií popisuje MSC jako buňky schopné produkovat některé faktory s pozitivním vlivem na regeneraci nervové tkáně nebo mohou aktivovat endogenní kmenové buňky k migraci do místa poranění. MSC produkují cytokiny jako je kolonie stimulující faktor (CSF), interleukiny a řadu růstových faktorů- SCF, NGF, HGF, BDNF, VEGF (Björklund a Lindvall, 2000; Eaves a spol., 1991; Majumdar a spol., 1998). Rovněž bylo prokázáno, že MSC stimulují gliové

buňky k produkci růstových faktorů, např. NGF a BDNF (Mahmood a spol., 2002; Majumdar a spol., 1998). MSC mohou rovněž usnadnit regeneraci axonů pomocí prostorového směrování nervových výběžků (Hofstetter a spol., 2002). Rozpoznání všech diferenciačních možností MSC a mechanismů, kterými se mohou podílet na regeneraci CNS jsou zatím předmětem pokračujícího výzkumu. Nicméně, dosavadní studie s transplantací MSC na různých modelech poranění CNS (Akiyama a spol., 2002; Chopp a spol., 2000; Hofstetter a spol., 2002; Lu a spol., 2001; Urdzíková a spol., 2006) poskytují přesvědčivé důkazy o jejich schopnosti pozitivně ovlivnit regeneraci tkáně a neurologickou funkci.

Kromě možnosti implantace izolovaných MSC existují dobré důvody pro jejich podávání spolu s dalšími typy jaderných buněk obsažených v kostní dřeni. Mezi ně patří hematopoetické kmenové buňky, makrofágy a lymfocyty. Jedním z důvodů je, že nejsou zatím dostatečně prozkoumány vazby mezi jednotlivými buněčnými subpopulacemi a jejich úlohy v neuronální diferenciaci. Dalším důvodem jsou důkazy o neuroprotektivní roli hematopetických buněk (Chen a spol., 2002; Chong a spol., 2002). Hematopoetické kmenové buňky rovněž produkují řadu cytokinů (Mehler a spol., 1993), z nichž některé mají důležitou úlohu v přežívání a diferenciaci nervových prekurzorových buněk.

V naší klinické studii s jadernými buňkami kostní dřeně jsme zaznamenali funkční zlepšení (v motorickém a/nebo senzorickém skóre) u několika subakutních pacientů, což dobře koresponduje s výsledky preklinických studiích na potkanech a subhumánních primátech (Sasaki a spol., 2001; Iwanami a spol., 2005; Akiyama a spol., 2002). Pozorovaná zlepšení v ASIA a Frankelově stupnici byla většinou pouze ze stupně A na stupeň B. U jednoho pacienta, kterému byly kmenové buňky implantovány intraarteriálně, jsme zaznamenali zlepšení ze stupně B na stupeň D na obou hodnocených stupnicích. Zajímavé bylo, že k funkčnímu zlepšení došlo u 5 ze 6

pacientů, kterým byly KB implantovány intraarteriální cestou (poblíž místa poranění). To je v souladu s výsledky jiné klinické studie, kde byly 6 pacientům s poraněním míchy implantovány jaderné buňky kostní dřeně přímo do místa poranění během 1 týdne od úrazu. Následně byly ještě kmenové buňky kostní dřeně mobilizovány pomocí G-CSF. Tímto způsobem bylo dosaženo funkčního zlepšení u 5 pacientů (Park a spol., 2005).

Naše studie ukázala, že transplantace autologních KB kostní dřeně je bezpečná. Nicméně v současné době nemůžeme jednoznačně prokázat, že pozorované klinické zlepšení u některých pacientů bylo způsobeno buněčnou terapií. Rovněž jsme si vědomi, že v případě akutních pacientů může být částečné funkční zlepšení způsobeno odezněním míšního šoku (Ditunno a spol., 2004). Na druhou stranu, zlepšení jsme pozorovali i u subaktních pacientů, kteří již byli mimo fázi míšního šoku a dále u jednoho chronického pacienta, který byl ve stabilizovaném stavu po několik měsíců před transplantací KB. Je jasné, že správné načasování buněčné terapie hraje důležitou roli v léčbě poranění CNS. Jako optimální se zatím jeví aplikace KB nejdéle do 1-3 týdnů po prodělaném traumatu. Z naší studie rovněž vyplývá, že svou úlohu může sehrát způsob podání. Lepších výsledků při regeneraci poškozené tkáně by patrně mohlo být dosaženo při aplikaci poblíž místa léze - např. katetrizací přívodné tepny, intrathekálně nebo přímou intraspinální aplikací do okraje léze. Dále z naší studie vyplývá, že vhodnými kandidáty buněčné terapie jsou nejen pacienti s kompletní míšní lézí, ale i pacienti s neúplnou lézí (ASIA stupeň B a C), u kterých tato léčba může akcentovat obnovování neurologické funkce poraněné míchy. Je zřejmé, že u pacientů s rozsáhlou strukturální lézí samotná buněčná terapie jen těžko může vést k významnému funkčnímu zlepšení. Bude proto důležité kombinovat tuto léčbu s jinými způsoby, které např. zábrání tvorbě gliové jizvy nebo tvorbě depozit extracelulární matrix, nebo implantací biomateriálů (hydrogelů a nanovláken), které vytvoří vhodné

mikroprostředí usnadňující buněčný a axonální růst. V tomto směru se jako nadějné jeví použití polymerních, biokompatibilních hydrogelů, jejichž viskoelastické a adhezivní vlastnosti umožnují jejich rychlou integraci do hostitelské tkáně (Lesný a spol., 2002 a 2006; Woerly a spol., 1999). Vhodně uspořádáná síť makromolekul na bázi HEMA a HPMA může stimulovat prorůstání nervových vláken a vodou vyplněný volný prostor v hydrogelu poskytuje místo pro difúzi trofických a růstových faktorů uvolněných z okolních buněk hostitelské tkáně. V budoucnosti bude možné modifikací fyzikálních a chemických vlastností vytvářet hydrogely podle specifických potřeb, a dále využívat hydrogely osídlené před implantací různým typem kmenových buněk.

3.6. Závěry

1. Transplantace autologních kmenových buněk u pacientů s poraněním míchy je bezpečná.
2. Optimální dobou pro podání kmenových buněk je aplikace do 1-3 týdnů po proběhlém traumatu.
3. Úspěšnost buněčné terapie míšního poranění je závislá na rozsahu míšní léze – největší naději na obnovení neurologické funkce mají pacienti s inkompletní míšní lézí.
4. Vhodným způsobem podání je aplikace kmenových buněk co nejblíže k místu poranění – v našem případě intraarteriální event. intrathekální nebo intraspinální cestou.
5. Evokované potenciály jsou vhodným pomocným vyšetřením k objektivizaci funkčního zlepšení u poranění míchy.
6. MRI vyšetření pro sledování změn v místě míšní léze po buněčné terapii většinou není vhodné pro časté zatížení artefakty z kovových implantátů.

4. SOUHRN

4.1. Difúzní parametry ECP a energetický metabolismus během tranzientní hypoxie a hypoxie/ischémie

Akutní hypoxie nebo ischémie patří v neurologii k etiologicky nejvýznamnějším jednotkám vedoucím k náhlé mozkové dysfunkci. V časné fázi je jejím podkladem membránová depolarizace vedoucí k nadměrnému přesunu iontů a vody. Buněčný edém vede ke změnšení velikosti ECP a tedy i zvýšení koncetrace látek v něm obsažených, včetně toxických metabolitů. Délka trvání patologického podnětu je určujícím faktorem pro vznik nevratného buněčné poškození formou apopotózy nebo nekrózy. Změny difúzních parametrů způsobené hypoxickým podnětem byly experimentálně studovány dosud pouze na modelu globální anoxie navozené srdeční zástavou. Na tomto modelu byly zjištěny dramatické změny ve velikosti a tortuozitě ECP mozkové kůry, které se rozvinuly během několika minut po zástavě mozkové perfúze. Rozhodli jsme se proto zkoumat změny difúzních parametrů ECP mozkové kůry i na modelech, kde délka trvání patologického podnětu byla časově omezená. Jednalo se o model tranzientní hypoxie a tranzientní hypoxie/ischemie. Získaná data jsme korelovali se změnami v extracelulární koncetraci laktátu, glukózy a glutamátu. Během tranzientní hypoxie/ischémie jsme zaznamenali postupný rozvoj změn difúzních parametrů ECP po celou dobu trvání podnětu. Konečné hodnoty byly obdobné těm, které byly zjištěny při terminální anoxii. Naproti tomu při tranzientní hypoxii byly změny ve velikosti a tortuozitě ECP podstatně menší a byly zaznamenány teprve na konci hypoxického podnětu. Změny v koncentraci laktátu a glukózy byly u obou modelů obdobné, v případě glutamátu byla extracelulární koncentrace na konci hypoxie/ischémie dvojnásobná oproti hodnotám na konci hypoxie. Pokud jsme ale vzali v úvahu změny ve velikosti ECP, byly hodnoty opět obdobné. Na tomto modelu jsme ukázali jak jsou koncetrace

látek přítomných v ECP ovlivněny změnami v objemové frakci ECP. Druhotné zvýšení koncentrace toxických metabolitů je tedy přímo úměrné velikosti buněčného edému. Toto zvýšení může následně akcentovat funkční deficit i strukturální poškození.

4.2. Difúzní parametry ECP a extracelulární matrix gliových nádorů mozku

Pochopení mechanismů, které řídí maligní chování primárních mozkových nádorů, má význam pro prognostické posuzování nádorového onemocnění v rámci neuroonkologické diagnostiky a tyto mechanismy se mohou v budoucnu stát terčem protinádorové léčby. Rozhodli jsme se proto zkoumat změny ve velikosti a geometrii ECP nádorové tkáně a změny ve složení extracelulární matrix v závislosti na různém stupni biologické malignity gliových nádorů. Cílem našich výzkumů se staly zejména dvě skupiny lidských gliomů: nejčastější primární mozkové nádory – astrocytomy a ependymomy, jejichž diagnostika i léčba patří doposud mezi nejkontroverznější v neuroonkologii.

Objemová frakce ECP α byla ve všech studovaných nádorech s výjimkou oligodendrogliomů signifikantně zvýšená. Nárůst objemu ECP v nádorové tkáni byl úměrný rostoucí proliferační aktivitě nádorů i rostoucí hustotě nádorových buněk; schopnost vytvářet prostor pro invadující buňky je tedy doménou agresivních mozkových nádorů. S rostoucím objemem ECP nádorové tkáně však docházelo k výraznému nárůstu difúzních překážek v ECP. Překážky v difúzi látek mezibuněčným prostorem astrocytomů s nízkým stupněm malignity vytváří zejména hustá síť z GFAP-pozitivních nádorových výběžků. Méně bohaté a zkrácené výběžky nádorových buněk u agresivnějších forem astrocytomů hrají menší roli a hlavním důvodem zvýšení tortuozity jejich ECP je přítomnost nadměrně produkovaných glykoproteinů ECM, zejména tenascinu.

Jak v astrocytomech tak v ependymomech jsme zkoumali změny ve složení ECM imunohistochemickou detekcí spektra glykoproteinů ECM. Složení extracelulární matrix nádorů *in situ* se výrazně lišilo od výsledků získaných ve studiích *in vitro* na tkáňových kulturách. Většina studovaných glykoproteinů ECM (laminin, fibronektin, kolagen I, III, IV - VI) byla přítomna pouze v souvislosti s cévami zásobujícími nádorovou tkáň. V ECP nádorové tkáně jsme prokázali přítomnost jen tenascinu a vitronektinu. Jak v astrocytomech, tak v ependymomech je produkce těchto dvou glykoproteinů ECM spojena s vysokým maligním potenciálem nádorů a jejich imunohistochemická detekce má výrazný prognostický význam v bioptické diagnostice.

4.3. Transplantace autologních kmenových buněk kostní dřeně u pacientů s poraněním míchy

Hlavním cílem klinické studie bylo ověření bezpečnosti, účinnosti a nejvhodnější doby transplantace autologních kmenových buněk kostní dřeně u pacientů s poraněním míchy. Do klinické studie probíhající ve FN Motol bylo dosud zařazeno celkem 33 pacientů. Do části I bylo zařazeno 20 pacientů, do části II bylo zařazeno 13 pacientů. Kontrolní skupinu tvořilo 15 pacientů s poraněním míchy, léčených ve FN Motol, kteří nebyli zařazeni do klinické studie.

První pacienti prodělali transplantaci kmenových buněk v roce 2003 a doposud jsme u žádného z nich nezaznamenali žádné komplikace, které by vznikly v souvislosti s buněčnou terapií. Všechny zaznamenané komplikace patří mezi běžné komplikace, které se vyskytují u pacientů s poraněním míchy- např. rozvoj trofických kožních defektů, periferní neuropatie, autonomní dysfunkce, spasticita, častější výskyt močových infekcí. Rovněž pomocí kontrolních vyšetření MRI míchy jsme vyloučili strukturální léze, které by odpovídali formaci novotvarů.

Způsob aplikace kmenových buněk byl rozdělen na formu intraarteriální a intravenózní. Intraarteriální cestou (katetrizací a. vertebralis) byly kmenové buňky podány 6 pacientům. Ostatním pacientům byly kmenové buňky aplikovány intravenózně (katetrizací periferní žíly). U skupiny 6-ti pacientů s intraarteriálním způsobem podání došlo v 5-ti případech ke zlepšení motorických nebo senzorických funkcí. Ze skupiny pacientů s intravenózní aplikací jsme neurologické zlepšení zaznamenali u 4 pacientů.

Pokud jsme porovnávali výsledky u skupiny pacientů s chronickým (déle než 30 dní po úraze) a subakutním (do 30 dní po úraze) poraněním míchy, buněčná terapie vyzněla jednoznačně ve prospěch časného podávání: ze 17 subakutních pacientů jsme klinické zlepšení zaznamenali u 10 z nich. Naopak ze 16 chronických pacientů se zlepšili pouze dva. Mezi 10 zlepšenými subakutními pacienty byli 4, kteří iniciálně byli hodnoceni jako inkompletní míšní léze se stupněm B. Následně se 2 z nich zlepšili až na stupeň D.

Z pomocných vyšetření jsme pro sledování našich pacientů využívali elektrofyziologické (motorické a somatosezorické evokované potenciály) a MRI vyšetření. Elektrofyziologické vyšetření dobře korelovalo s případným motorickým nebo senzorickým zlepšením. Naproti tomu kontrolní MRI vyšetření neprokázalo jiné změny v ložisku myelopatie než regresi edému nebo krvácení. Sledování detailních změn v místě poranění míchy však bylo často limitováno artefakty z kovových implantátů, používaných při chirurgické stabilizaci poraněných obratlů.

Tato studie potvrdila bezpečnost intraarteriální a intravenózní aplikace autologních kmenových buněk kostní dřeně u pacientů s traumatickou míšní lézí. Pozorované zlepšení klinického stavu u některých pacientů však nemusí být způsobeno buněčnou terapií.

5. Seznam použité literatury

Agnati, L.F., Zoli, M., Stromberg, I. and Fuxe, K., Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission, *Neuroscience*, 69 (1995) 711-26.

Akiyama Y, Honmou O, Kato T, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp. Neurol* 2001;167:27-39.

Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 2002;39:229-236.

Andrews MR, Stelzner DJ. Evaluation of olfactory ensheathing and schwann cells after implantation into a dorsal injury of adult rat spinal cord. J Neurotrauma. 2007 Nov;24(11):1773-92.

Attwell, D. (2000), Brain uptake of glutamate: food for thought. J. Nutr. 130:1023S-1025S.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-967.

ASIA/IMSOP. Standards for neurological and functional classification of spinal cord injury-Revised 1992. Chicago, IL: ASIA, 1992.

ASIA/IMSOP. International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury-Revised 1996. Chicago, IL: ASIA, 1996.

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats - similarities to astrocyte grafts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 31;95(7):3908-13.

Ausman J.I., Levin V.A., Brown W.E., Rall D.P. a Fenstermacher J.D. (1977) Brain-tumor chemotherapy. Pharmacological principles derived from a monkey brain-tumor model. *J. Neurosurg.* 46: 155-164.

Bakay L. (1970a) The extracellular space in brain tumours. I. Morphological considerations. *Brain* 93: 693-698.

Bakay L. (1970b) The extracellular space in brain tumours. II. The sucrose space. *Brain* 93: 699-708.

Barbour B. a Hausser M. (1997) Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends Neurosci.* 20: 377-384.

Beck K., Hunter I. a Engel J. (1990) Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4: 148-160.

Becker AJ, McCullough EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature 1963;197:452-454.

Becker D, Sadowsky CL, McDonald JW. Restoring function after spinal cord injury. *Neurologist* 2003;9:1-15.

Bellon G., Caulet T., Cam Y., Pluot M., Poulin G., Pytlinska M. a Bernard M.H. (1985) Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 66: 245-252.

Bender AS, Norenberg MD. Calcium dependence of hypoosmotically induced potassium release in cultured astrocytes. J. Neurosci. 1994 Jul;14(7):4237-43.

Beneš V., (1961): Poranění míchy, SZdN, Praha

Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N.H., Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis, J. *Neurochem.*, 43 (1984) 1369-74.

Benveniste H., Hedlund L.W. a Johnson G.A. (1992) Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke* 23: 746-754.

Benveniste H, Hüttemeier PC. Microdialysis--theory and application. Prog Neurobiol. 1990;35(3):195-215.

Benveniste H, Jørgensen MB, Diemer NH, Hansen AJ. Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia. Acta Neurol Scand. 1988 Dec;78(6):529-36.

Berger T, Müller T, Kettenmann H. Developmental regulation of ion channels and receptors on glial cells. Perspect. Dev. Neurobiol. 1995;2(4):347-56.

Björklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. Nat Neurosci. 2000 Jun;3(6):537-44.

Bliss TM, Sapolsky RM. Interactions among glucose, lactate and adenosine regulate energy substrate utilization in hippocampal cultures. Brain Res. 2001 Apr 27;899(1-2):134-41.

Bolteus A.J., Berens M.E. a Pilkington G.J. (2001) Migration and invasion in brain neoplasms. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 1: 225-232.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 1;92(16):7162-6.

Bosman F.T. a Stamenkovic I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200: 423-428.

Bouffet E., Perilongo G., Canete A. a Massimino M. (1998) Intracranial ependymomas in children: a critical review of prognostic factors and a plea for cooperation. *Med. Pediatr. Oncol.* 30: 319-329.

Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P.J. and Pellerin, L., Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture, J. *Cereb. Blood Flow Metab.*, 23 (2003) 1298-306.

Bracken M.B, Collins WF, Freeman DF, Shepard MJ, et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA,* 251(1):45-52, 1984.

Bracken M.B, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, et al. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury. Results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *Journal of Neurosurgery*, 63(5):704-13, 1985.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury: Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS II). *New England Journal of Medicine*, 322(20):1405-1411, 1990.

Bracken M.B, Shepard MJ, Collins WF, Holford, TR, et al. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *Journal of Neurosurgery*, 76(1): 23-31, 1992.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M,

Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA. 1997 May 28;277(20):1597-604.

Bradley, R.M. a Grabauskas, G. (1998), Neural circuits for taste. Excitation, inhibition, and synaptic plasticity in the rostral gustatory zone of the nucleus of the solitary tract. *Ann. NY Acad. Sci.* 855:467-474.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science. 2000 Dec 1;290(5497):1775-9.

Bricolo A, Ore GD, Da Pian R, Faccioli F. Local cooling in spinal cord injury. Surg. Neurol. 1976 Aug;6(2):101-6.

Brown D.C. a Gatter K.C. (1990) Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17: 489-503.

Brown J.C. a Timpl R. (1995) The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 484-490.

Bureš, J: Regenerace a transplantace v centrálním nervovém systému savců. prognostická úvaha. Čs. Neurol. Neurochir. , 47/2:55-70, 1984

Burns AS, Lee BS, Ditunno JF Jr, Tessler A. Patient selection for clinical trials: the reliability of the early spinal cord injury examination. J. Neurotrauma. 2003 May;20(5):477-82.

Cabrera, M.E., Saidel, G.M. and Kalhan, S.C., A model analysis of lactate accumulation during muscle ischemia, *J. Crit. Care*, 14 (1999) 151-63.

Cater, H.L., Benham, C.D. and Sundstrom, L.E., Neuroprotective role of monocarboxylate transport during glucose deprivation in slice cultures of rat hippocampus, *J Physiol,* 531 (2001) 459-66.

Cater, H.L., Chandratheva, A., Benham, C.D., Morrison, B. and Sundstrom, L.E., Lactate and glucose as energy substrates during, and after, oxygen deprivation in rat hippocampal acute and cultured slices, *J. Neurochem*, 87 (2003) 1381-90.

Castillo M., Smith J.K., Kwock L. a Wilber K. (2001) Apparent diffusion coefficients in the evaluation of high-grade cerebral gliomas. *Am. J. Neuroradiol.* 22: 60-64.

Chen KC, Höistad M, Kehr J, Fuxe K, Nicholson C. Theory relating in vitro and in vivo microdialysis with one or two probes. J. Neurochem. 2002 Apr;81(1):108-21.

Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. Nature. 2000 Jan 27;403(6768):434-9.

Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, Wang L, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam S, Mahmood A, Chopp M. Human bone marrow stromal cells cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J. Neurosci. Res.* 2002;69:687-691.

Chesler M, Kaila K. Modulation of pH by neuronal activity. Trends Neurosci. 1992 Oct;15(10):396-402.

Chernykh ER, Stupak VV, Muradov GM, Sizikov MY, Shevela EY, Leplina OY, Tikhonova MA, Kulagin AD, Lisukov IA, Ostanin AA, Kozlov VA. Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007 Apr;143(4):543-7.

Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ. Extracellular matrix gene expresion by human bone marrow stroma and by marrow fibroblast. *Cell. Adhes. Commun.*

1993;1:93-99.

Chintala S.K. a Rao J.K. (1996) Invasion of human glioma: Role of extracellular matrix proteins. *Front. Biosci.* 1: 324-339.

Chintala S.K., Sawaya R., Gokaslan Z.L., Fuller G. a Rao J.S. (1996) Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in human glioma, both in vivo and in vitro. *Cancer Lett.* 101: 107-114.

Chintala S.K., Tonn J.C. a Rao J.S. (1999) Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int. J. Dev. Neurosci* 17: 495-502.

Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2002 May;22(5):503-14.

Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. Lancet Neurol. 2002 Jun;1(2):92-100.

Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000;11:3001-3005.

Chung C.Y., Murphy-Ullrich J.E. a Erickson H.P. (1996) Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol. Biol. Cell* 7: 883-892.

Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol.* 1999;181:67-73.

Colognato H. a Yurchenco P.D. (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* 218: 213-234.

Crossin K.L. (1996) Tenascin: a multifunctional extracellular matrix protein with a restricted distribution in development and disease. *J. Cell Biochem.* 61: 592-598.

Davies MI, Cooper JD, Desmond SS, Lunte CE, Lunte SM. Analytical considerations for microdialysis sampling. Adv. Drug Deliv. Rev. 2000 Dec 15;45(2-3):169-88.

Davis F.G. a Preston-Martin S. (1998) Epidemiology. Incidence and survival. *V:* Russell and Rubinstein´s Pathology of Tumors of Nervous System. Bigner D.D., McLendon R.E. a Bruner J.M. (eds) Arnold, London, str. 5-45.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum 2001;44:1928-1942.

Deguchi Y, Terasaki T, Kawasaki S, Tsuji A. Muscle microdialysis as a model study to relate the drug concentration in tissue interstitial fluid and dialysate. J. Pharmacobiodyn. 1991 Aug;14(8):483-92.

Delpech B., Maingonnat C., Girard N., Chauzy C., Maunoury R., Olivier A., Tayot J. a Creissard P. (1993) Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur. J. Cancer* 29A: 1012-1017.

DeVivo MJ, Kartus PL, Stover SL, Fine PR. Benefits of early admission to an organised spinal cord injury care system. Paraplegia. 1990 Nov;28(9):545-55.

Dijkhuizen, R.M., Knollema, S., van der Worp, H.B., Ter Horst, G.J., De Wildt, D.J., Berkelbach van der Sprenkel, J.W., Tulleken, K.A. and Nicolay, K., Dynamics of cerebral tissue injury and perfusion after temporary hypoxia-ischemia in the rat: evidence for region-specific sensitivity and delayed damage, *Stroke*, 29 (1998) 695-704.

Ditunno JF, Little JW, Tessler A, Burns AS. Spinal shock revisited: a four-phase model.

Spinal Cord. 2004 Jul;42(7):383-95.

Donahue B., Scott C.B., Nelson J.S., Rotman M., Murray K.J., Nelson D.F., Banker F.L., Earle J.D., Fischbach J.A., Asbell S.O., Gaspar L.E., Markoe A.M. a Curran W. (1997) Influence of an oligodendroglial component on the survival of patients with anaplastic astrocytomas: a report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 38: 911-914.

Duncan J.A. a Hoffman H.J. (1995) Intracranial ependymomas. V: Brain Tumors. Kaye A.H. a Lows E.R. (eds) Churchill Livingstone, Edinburgh

Eaves CJ, Cashman JD, Kay RJ, Dougherty GJ, Otsuka T, Gaboury LA, Hogge DE, Lansdorp PM, Eaves AC, Humphries RK. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. Blood. 1991 Jul 1;78(1):110-7.

Edgerton VR, Ramón-Cueto A, Phelps PE. OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. Brain. 2008 Jan;131(Pt 1):264-76.

Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. Neuroreport. 1999 Apr 26;10(6):1289-92.

Eyre D. (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 4 : 30-35.

Féron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S, Geraghty T, Mackay-Sim A. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain.* 2005 Dec;128(Pt 12):2951-60

Flanders AE, Spettell CM, Friedman DP, Marino RJ, Herbison GJ. The relationship between the functional abilities of patients with cervical spinal cord injury and the severity of damage revealed by MR imaging. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1999 May;20(5):926-34.

Frankel HDH, Hancock DO, Hyslop G, Melzak J, Michaelis LS, Ungar GH, Vernon JDS, Walsh JJ. The value of postural reduction in the initial management of closed injuries of the spine with paraplegia and tetraplegia. *Paraplegia*, 7:179-192, 1969

Franssen EH, de Bree FM, Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. Brain. Res. Rev. 2007 Nov;56(1):236-58.

Fray AE, Boutelle M, Fillenz M. Extracellular glucose turnover in the striatum of unanaesthetized rats measured by quantitative microdialysis. J. Physiol. 1997 Nov 1;504 (Pt 3):721-6.

Freeman, L.W.: Neuronal regeneration in the central nervous system of man. J. Neurosurg. 1961; 18: 417-422.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1966;16:381-390.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell. Tissue Kinet.*,1970;3:393-403.

Geiger H, True JM, Grimes B, Carroll EJ, Fleischman RA, Van Zant G. Analysis of the hematopoietic potential of muscle-derived cells in mice. Blood. 2002 Jul 15;100(2):721-3.

George E.L., Georges-Labouesse E.N., Patel-King R.S., Rayburn H. a Hynes R.O. (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119: 1079-1091.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol. 1991 Apr;138(4):867-73.

Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 2006;98:251-266.

Gladson C.L. (1999) The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58: 1029-1040.

Gladson C.L. a Cheresh D.A. (1991) Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J. Clin. Invest.* 88: 1924-1932.

Gladson C.L., Wilcox J.N., Sanders L., Gillespie G.Y. a Cheresh D.A. (1995) Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *J. Cell Sci.* 108: 947-956.

GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. Nature. 2000 Jan 27;403(6768):439-44.

Grinnell F., Ho C.H. a Wysocki A. (1992) Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound fluid: analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. *J. Invest. Dermatol.* 98: 410-416.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189:54-63.

Hansson, E., Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling, J. *Biol. Chem.*, 269 (1994) 21955-61.

Harada M, Okuda C, Sawa T, Murakami T. Cerebral extracellular glucose and lactate concentrations during and after moderate hypoxia in glucose- and saline-infused rats. Anesthesiology. 1992 Oct;77(4):728-34.

Hayostek C.J., Shaw E.G., Scheithauer B., O'Fallon J.R., Weiland T.L., Schomberg P.J., Kelly P.J. a Hu T.C. (1993) Astrocytomas of the cerebellum. A comparative clinicopathologic study of pilocytic and diffuse astrocytomas. *Cancer* 72: 856-869.

Hejcl A, Urdzikova L, Sedy J, Lesny P, Pradny M, Michalek J, Burian M, Hajek M, Zamecnik J, Jendelova P, Sykova E. Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J. Neurosurg. Spine.* 2008 Jan;8(1):67-73.

Higuchi M., Ohnishi T., Arita N., Hiraga S. a Hayakawa T. (1993) Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 85: 481-487.

Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2199-2204.

Holden C, Vogel G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? Science. 2002 Jun 21;296(5576):2126-9

Holm C, Covey JM, Kerrigan D, Pommier Y. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. Cancer Res. 1989 Nov 15;49(22):6365-8.

Homola A, Zoremba N, Slais K, Kuhlen R, Syková E. Changes in diffusion parameters,

energy-related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient hypoxia/ischemia. Neurosci Lett. 2006 Aug 14;404(1-2):137-42.

Hoyt W.F. a Baghdassarian S.A. (1969) Optic glioma of childhood. Natural history and rationale for conservative management. *Br. J. Ophthalmol.* 53: 793-798.

Huguet, F., Guerraoui, A., Barrier, L., Guilloteau, D., Tallineau, C. and Chalon, S., Changes in excitatory amino acid levels and tissue energy metabolites of neonate rat brain after hypoxia and hypoxia-ischemia, *Neurosci. Lett*, 240 (1998) 102-6.

Inoue M, Honmou O, Oka S, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia* 2003;44:111-118.

Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Yamasaki M, Momoshima S, Ishii H, Ando K, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J. Neurosci. Res.* 2005 Apr 15;80(2):182-90.

Jacobson I, Sandberg M, Hamberger A. Mass transfer in brain dialysis devices--a new method for the estimation of extracellular amino acids concentration. J. Neurosci. Methods. 1985 Nov-Dec;15(3):263-8.

Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. Gene Ther. 2002 May;9(10):642-7.

Jansson A., Lippoldt A., Mazel T., Bartfai T., Ogren S.O., Syková E., Agnati L.F. a Fuxe K. (2000) Long distance signalling in volume transmission. Focus on clearance mechanisms. *Prog. Brain Res.* 125: 399-413.

Jendelova P, Herynek V, deCroos J, Glogarova K, Andersson B, Hajek M, Sykova E. Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* 2003;50:767-776.

Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, Glogarova K, Kroupova J, Anderson B, Bryja V, Burian M, Hajek M, Sykova E. 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.* 2004;76:232-243.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49.

Joester A. a Faissner A. (2001) The structure and function of tenascin in the nervous system. *Matrix Biol.* 20: 13-22.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 1998;238:265.272.

Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol* (Lond) 2001;533:83-89.

Jones F.S. a Jones P.L. (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev. Dyn.* 218: 235-259.

Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calc. Tissue Int.* 2002;71:36-44.

Kaczmarek, L., Kossut, M. a Skangiel-Kramska, J. (1997), Glutamate receptors in cortical plasticity: molecular and cellular biology. Physiol. Rev. 77:217-255.

Kalyani AJ, Piper D, Mujtaba T, Lucero MT, Rao MS. Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J. Neurosci.* 1998 Oct 1;18(19):7856-68.

Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J. Bone Min. Res.* 1993;8:1453-1458.

Katagiri Y.U., Sleeman J., Fujii H., Herrlich P., Hotta H., Tanaka K., Chikuma S., Yagita H., Okumura K. , Murakami M., Saiki I., Chambers A.F. a Uede T. (1999) CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 59: 219-226.

Kempski O, von Rosen S, Weigt H, Staub F, Peters J, Baethmann A. Glial ion transport and volume control. Ann N Y Acad Sci. 1991;633:306-17.

Kim C.H., Bak K.H., Kim Y.S., Kim J.M., Ko Y., Oh S.J., Kim K.M. a Hong E.K. (2000) Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg. Neurol.* 54: 235-240.

Kimelberg HK. Anisotonic media and glutamate-induced ion transport and volume responses in primary astrocyte cultures. J Physiol (Paris). 1987;82(4):294-303.

Kimelberg H.K. a Ransom B.R. (1986) Physiological and pathological aspects of strocyte swelling. *V:* Astrocytes: cell biology and pathology of astrocytes. Federoff S. a Vernadakis A. (eds) Academic Press, New York.

Kimelberg, H.K., Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy, *Glia*, 50 (2005) 389-97.

Kleihues P. a Cavenee W.K. (2000) WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon.

Kleihues P., Kiessling M. a Janzer R.C. (1987) Morphological markers in neuro-oncology. *Curr. Top. Pathol.* 77: 307-338.

Kleihues P. a Ohgaki H. (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol.* 1 : 44-51.

Knoller N, Auerbach G, Fulga V, Zelig G, Attias J, Bakimer R, Marder JB, Yoles E, Belkin M, Schwartz M, Hadani M. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results. *J. Neurosurg. Spine.* 2005 Sep;3(3):173-81.

Knudson W., Biswas C., Li X.Q., Nemec R.E. a Toole B.P. (1989) The role and regulation of tumour-associated hyaluronan. *Ciba Found. Symp.* 143: 150-159.

Kocsis JD, Akiyama Y, Radtke C. Neural precursors as a cell source to repair the demyelinated spinal cord. *J. Neurotrauma* 2004;21:441-449.

Kono K., Inoue Y., Nakayama K., Shakudo M., Morino M., Ohata K., Wakasa K. a Yamada R. (2001) The role of diffusion-weighted imaging in patients with brain tumors. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 22: 1081-1088.

Kornblihtt A.R., Umezawa K., Vibe-Pedersen K. a Baralle F.E. (1985) Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* 4: 1755-1759.

Koyama, Y., Baba, A. and Iwata, H., L-glutamate-induced swelling of cultured astrocytes is dependent on extracellular Ca2+, *Neurosci. Lett*, 122 (1991) 210-2.

Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002 Jun;9(11):754-8.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S,

Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-377.

Kubasak MD, Jindrich DL, Zhong H, Takeoka A, McFarland KC, Muñoz-Quiles C, Roy RR, Edgerton VR, Ramón-Cueto A, Phelps PE. OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. Brain. 2008 Jan;131(Pt 1):264-76.

Kucia M, Ratajczak J, Reca R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol. Dis.* 2004;32:52-57.

Kullmann D.M. a Asztely F. (1998) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications. *Trends Neurosci.* 21: 8-14.

Kunc Z. (1983): Neurochirurgie, Avicenum, Praha

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* 2001;153:1133-1140.

Lehmenkühler A., Syková E., Svoboda J., Zilles K. a Nicholson C. (1993) Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience* 55: 339-351.

Lesný P, De Croos J, Prádný M, Vacík J, Michálek J, Woerly S, Syková E. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. *J. Chem. Neuroanat.* 2002 May;23(4):243-7.

Lesný P, Prádný M, Jendelová P, Michálek J, Vacík J, Syková E. 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.* 2006 Sep;17(9):829-33.

Liang Y., Haring M., Roughley P.J., Margolis R.K. a Margolis R.U. (1997) Glypican and biglycan in the nuclei of neurons and glioma cells: presence of functional nuclear localization signals and dynamic changes in glypican during the cell cycle. *J. Cell Biol.* 139: 851-864.

Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, Hasse-Ferreira A, Capucho C, Peduzzi JD. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J. Spinal Cord Med.* 2006;29(3):191-203

Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. N. Engl. J. Med. 1994 Mar 3;330(9):613-22.

Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakrabortty S, Holekamp TF, McDonald JW. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:6126-6131.

Lönnroth P, Jansson PA, Smith U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. Am. J. Physiol. 1987 Aug; 253 (2 Pt 1):E228-31.

Lu D, Li Y. Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 2001;18:813-819.

Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. AMA Arch Ophthalmol. 1957 Aug;58(2):193-201.

Lundbaek J.A. a Hansen A.J. (1992) Brain interstitial volume fraction and tortuosity in anoxia. Evaluation of the ion-selective micro-electrode method. *Acta Physiol. Scand.* 146: 473-484.

Lynch HT, Fusaro RM, Lynch JF. Cancer genetics in the new era of molecular biology. Ann N Y Acad Sci. 1997 Dec 29;833:1-28.

Magnoni, S., Ghisoni, L., Locatelli, M., Caimi, M., Colombo, A., Valeriani, V. and Stocchetti, N., Lack of improvement in cerebral metabolism after hyperoxia in severe head injury: a microdialysis study, *J. Neurosurg*, 98 (2003) 952-8.

Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain. FASEB J. 1994 Oct;8(13):1003-11.

Mahesparan R., Read T.A., Lund-Johansen M., Skaftnesmo K.O., Bjerkvig R. a Engebraaten O. (2003) Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 105: 49-57.

Mahesparan R., Tysnes B.B., Read T.A., Enger P.O., Bjerkvig R. a Lund-Johansen M. (1999) Extracellular matrix-induced cell migration from glioblastoma biopsy specimens in vitro. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 97: 231-239.

Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 2002;19:1609-1617.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 1998;176:57-66.

Marino RJ, Ditunno JF Jr, Donovan WH, Maynard F Jr. Neurologic recovery after traumatic spinal cord injury: data from the Model Spinal Cord Injury Systems. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1999 Nov;80(11):1391-6.

Margolis R.K. a Margolis R.U. (1993) Nervous tissue proteoglycans. *Experientia* 49: 429-446.

Mathews T. a Moossy J. (1974) Gliomas containing bone and cartilage. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 33: 456-471.

Matthews C.M. a Molinaro G. (1963) A study of the relative value of radioactive substances used for brain tumor localization and of the mechanism of tumor: brain concentration. Uptake in transplantable fibrosarcoma, brain and other organs in the rat. *Brain* 44: 260-277.

Mayer, M.L. a Westbrook, G.L. (1987), The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 28:197-276.

Mazel T., Šimonová Z. a Syková E. (1998) Diffusion heterogeneity and anisotropy in rat hippocampus. *Neuroreport* 9: 1299-1304.

McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997;276:66-71.

McKinley W, Meade MA, Kirshblum S, Barnard B. Outcomes of early surgical management versus late or no surgical intervention after acute spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2004 Nov;85(11):1818-25.

Mehler MF, Rozental R, Dougherty M, Spray DC, Kessler JA. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature* 1993;362:62-65.

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-1782.

Mitrovic N., Dorries U. a Schachner M. (1994) Expression of the extracellular matrix glycoprotein tenascin in the somatosensory cortex of the mouse during postnatal development: an immunocytochemical and in situ hybridization analysis. *J. Neurocytol.* 23: 364-378.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA 2003;100:5807-5812.

Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, Kano Y, Yamabe T, Ito Y. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22:433-440.

Mork S.J., Lindegaard K.F., Halvorsen T.B., Lehmann E.H., Solgaard T., Hatlevoll R., Harvei S. a Ganz J. (1985) Oligodendroglioma: incidence and biological behavior in a defined population. *J. Neurosurg.* 63: 881-889.

Moviglia GA, Fernandez Viña R, Brizuela JA, Saslavsky J, Vrsalovic F, Varela G, Bastos F, Farina P, Etchegaray G, Barbieri M, Martinez G, Picasso F, Schmidt Y, Brizuela P, Gaeta CA, Costanzo H, Moviglia Brandolino MT, Merino S, Pes ME,Veloso MJ, Rugilo C, Tamer I, Shuster GS. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy.* 2006;8(3):202-9.

Muller, M., Science, medicine, and the future: Microdialysis, *Bmj*, 324 (2002) 588-91.

Myllyharju J. a Kivirikko K.I. (2001) Collagens and collagen-related diseases. *Ann. Med.* 33: 7-21.

Negredo P, Rivero JL, González B, Ramón-Cueto A, Manso R. Slow- and fast-twitch rat hind limb skeletal muscle phenotypes 8 months after spinal cord transection and olfactory ensheathing glia transplantation. J Physiol. 2008 May 15;586(10):2593-610.

Němeček S., Petr R, Rozsíval V, Šuba P. Acute spinal trauma in experiment Cas Lek Cesk. 1974 Dec 20;113(50-51):1542-6.

Němeček S.: Směry současného výzkumu poranění míchy v USA. Čs. Neurol. Neurochir. 47/80:38-41, 1984

Nicholson C. a Phillips J.M. (1981) Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J. Physiol* 321: 225-257.

Nicholson C. a Syková E. (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.*, 21: 207-215.

Nicholson C. a Tao L. (1993) Hindered diffusion of high molecular weight compounds in brain extracellular microenvironment measured with integrative optical imaging. *Biophys. J.* 65: 2277-2290.

Nornes H., Bjorklund A., Stenevi U.: Transplantation strategies in spinal cord regeneration. Neural Transplants. Ed Sladek J., Gash D., Plenum publish.,1984

Novak U. a Kaye A.H. (2000) Extracellular matrix and the brain: components and function . *J. Clin. Neurosci.* 7: 280-290.

Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.* 2002 Sep 15;69(6):925-33.

Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, Kuno S, Ide C. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.* 2004 Jun;187(2):266-78.

Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Katoh H, Iwamoto Y, Nakamura M, Miyoshi H, Okano HJ, Contag CH, Toyama Y, Okano H. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J.* 2005 Nov;19(13):1839-41.

Olney JW. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1969 Jul;28(3):455-74.

Olson RJ, Justice JB Jr. Quantitative microdialysis under transient conditions. Anal Chem. 1993 Apr 15;65(8):1017-22.

Osterholm JL.The pathophysiological response to spinal cord injury. The current status of related research. J. Neurosurg. 1974 Jan;40(1):5-33.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001a;410:701-705.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001b;98:10344-10349.

Owen M. Marrow derived stromal stem cells. *J Cell Science Supp* 1988;10:63-76.

Oz B., Karayel F.A., Gazio N.L., Ozlen F. a Balci K. (2000) The distribution of extracellular matrix proteins and CD44S expression in human astrocytomas. *Pathol. Oncol. Res.* 6: 118-124.

Pagni C.A., Giordana M.T. a Canavero S. (1991) Benign recurrence of a pilocytic cerebellar astrocytoma 36 years after radical removal: case report. *Neurosurgery* 28: 606-609.

Papadopoulos SM, Selden NR, Quint DJ, Patel N, Gillespie B, Grube S. Immediate spinal cord decompression for cervical spinal cord injury: feasibility and outcome. *J. Trauma.* 2002 Feb;52(2):323-32.

Park HC, Shims YS, Ha Y, Yoon SH, Park SR, Choi BH, Park HS. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Eng.* 2005;11:913-922.

Paulus W., Huettner C. a Tonn J.C. (1994) Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas: a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. *Int. J. Cancer* 58: 841-846 .

Paulus W., Roggendorf W. a Schuppan D. (1988) Immunohistochemical investigation of collagen subtypes in human glioblastomas. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 413: 325-332.

Paus T., Collins D.L., Evans A.C., Leonard G., Pike B. a Zijdenbos A. (2001) Maturation of white matter in the human brain: a review of magnetic resonance studies. *Brain Res. Bull.* 54: 255-266.

Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Oct 25;91(22):10625-9.

Pellerin, L. and Magistretti, P.J., Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy

hungry neurons, *Neuroscientist*, 10 (2004) 53-62.

Pellerin, L., Pellegri, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J.L., Stella, N. and Magistretti, P.J., Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle, *Dev. Neurosci*, 20 (1998) 291-9.

Persson L, Hillered L. Chemical monitoring of neurosurgical intensive care patients using intracerebral microdialysis. J Neurosurg. 1992 Jan;76(1):72-80.

Pijuan-Thompson V. a Gladson C.L. (1997) Ligation of integrin alpha5beta1 is required for internalization of vitronectin by integrin alphavbeta3. *J. Biol. Chem.* 272: 2736-2743.

Pin, J.P. a Duvoisin, R. (1995), The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.

Pittenger MF, Marshak DR. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. Ed: Marshak DR, Gardner DK, Gottlieb D. 2001;349-374.

Plesnila N, Ringel F, Chang RC, Staub F, Baethmann A. Relevance of calcium homeostasis in glial cell swelling from acidosis. Acta Neurochir Suppl. 1998;71:203-5.

Pollard ME, Apple DF. Factors associated with improved neurologic outcomes in patients with incomplete tetraplegia. *Spine*. 2003 Jan 1;28(1):33-9.

Prádný M, Michálek J, Lesný P, Hejcl A, Vacík J, Slouf M, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 5: hydrolytically degradable materials. J Mater Sci Mater Med. 2006 Dec;17(12):1357-64.

Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. Nature. 2000 Jan 27;403(6768):383-4.

Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100:11917-11923.

Prokopová-Kubinová S. a Syková E. (2000) Extracellular diffusion parameters in spinal cord and filum terminale of the frog. *J. Neurosci. Res.* 62: 530-538.

Prokopová S., Vargová L. a Syková E. (1997) Heterogeneous and anisotropic diffusion in the developing rat spinal cord. *Neuroreport* 8: 3527-3532.

Province M.A., Shannon W.D. a Rao D.C. (2001) Classification methods for confronting heterogeneity. *Adv. Genet.* 42: 273-286.

Pulkkinen L., Gerecke D.R., Christiano A.M., Wagman D.W., Burgeson R.E. a Uitto J. (1995) Cloning of the beta 3 chain gene (LAMB3) of human laminin 5, a candidate gene in junctional epidermolysis bullosa. *Genomics* 25: 192-198.

Qiao, M., Latta, P., Meng, S., Tomanek, B. and Tuor, U.I., Development of acute edema following cerebral hypoxia-ischemia in neonatal compared with juvenile rats using magnetic resonance imaging, *Pediatr. Res.*, 55 (2004) 101-6.

Qiao, M., Malisza, K.L., Del Bigio, M.R. and Tuor, U.I., Transient hypoxia-ischemia in rats: changes in diffusion-sensitive MR imaging findings, extracellular space, and Na+-K+ -adenosine triphosphatase and cytochrome oxidase activity, *Radiology*, 223 (2002) 65-75.

Quist A.P., Rhee S.K., Lin H. a Lal R. (2000) Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J. Cell Biol.* 148: 1063-1074.

Rabinovich SS, Seledtsov VI, Poveschenko OV, Senuykov VV, Taraban VY, Yarochno VI, Kolosov NG, Savchenko SA, Kozlov VA. Transplantation treatment of spinal cord injury patients. *Biomed. Pharmacother.* 2003 Nov;57(9):428-33.

Rascher G., Fischmann A., Kroger S., Duffner F., Grote E.H. a Wolburg H. (2002) Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 104: 85-91.

Ratajczak MZ, Kucia M, Majka M, Reca R, Ratajczak J. Heterogenous populations of bone marrow stem cells-are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem. Cytobiol.* 2004;42:139-146.

Raymond, C.R., Thompson, V.L., Tate, W.P. a Abraham, W.C. (2000), Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation. J. Neurosci. 20:969-976.

Read T.A., Thorsen F. a Bjerkvig R. (2002) Localised delivery of therapeutic agents to CNS malignancies: old and new approaches. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3: 257-273.

Reardon D.A., Akabani G., Coleman R.E., Friedman A.H., Friedman H.S. a spol. (2002) Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J. Clin. Oncol.* 20: 1389-1397.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-2625.

Rice M.E., Okada Y.C. a Nicholson C. (1993) Anisotropic and heterogeneous diffusion in the turtle cerebellum: implications for volume transmission. *J. Neurophysiol.* 70: 2035-2044.

Ritter A.M., Hess K.R., McLendon R.E. a Langford L.A. (1998) Ependymomas: MIB-1 proliferation index and survival. *J. Neurooncol.* 40: 51-57.

Rodriguez L.A., Edwards M.S. a Levin V.A. (1990) Management of hypothalamic gliomas in children: an analysis of 33 cases. *Neurosurgery* 26: 242-246.

Roelcke U., von Ammon K., Hausmann O., Kaech D.L., Vanloffeld W., Landolt H., Rem J.A., Gratzl O., Radu E.W. a Leenders K.L. (1999) Operated low grade astrocytomas: a long term PET study on the effect of radiotherapy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66: 644-647.

Roitbak T. a Syková E. (1999) Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia* 28: 40-48.

Ronne-Engstrom, E., Carlson, H., Liu, Y., Ungerstedt, U. and Hillered, L., Influence of perfusate glucose concentration on dialysate lactate, pyruvate, aspartate, and glutamate levels under basal and hypoxic conditions: a microdialysis study in rat brain, *J Neurochem*, 65 (1995) 257-62.

Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif. Tissue Int.* 2003;72:135-142.

Ross G.W. a Rubinstein L.J. (1989) Lack of histopathological correlation of malignant ependymomas with postoperative survival. *J. Neurosurg.* 70: 31-36.

Rutka J.T., Muller M., Hubbard S.L., Forsdike J., Dirks P.B., Jung S., Tsugu A., Ivanchuk S., Costello P., Mondal S., Ackerley C. a Becker L.E. (1999) Astrocytoma adhesion to extracellular matrix: functional significance of integrin and focal adhesion kinase expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58: 198-209.

Ryan M.C., Christiano A.M., Engvall E., Wewer U.M., Miner J.H., Sanes J.R. a Burgeson R.E. (1996) The functions of laminins: lessons from in vivo studies. *Matrix Biol.* 15: 369-381.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp. Neurol.* 2000;164:247-256.

Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia* 2001;35:26-34.

Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR. Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J. Hem. Stem Cell Res.* 2003 Jun;12(3):271-8.

Scott J.N., Rewcastle N.B., Brasher P.M., Fulton D., Hagen N.A., MacKinnon J.A., Sutherland G., Cairncross J.G. a Forsyth P. (1998) Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. *Can. J. Neurol. Sci.* 25: 197-201.

Shaw E.G., Scheithauer B.W., O'Fallon J.R., Tazelaar H.D. a Davis D.H. (1992) Oligodendrogliomas: the Mayo Clinic experience. *J. Neurosurg.* 76: 428-434.

Scheithauer B.W., Bruner J.M. (1987) The ultrastructural spectrum of astrocytic neoplasms. *Ultrastruct. Pathol.* 11: 535-81.

Shi Q, Raffi S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Strob RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362-367.

Shirres, D.A.: Regeneration of the axons of the spinal cord in man. Montreal Medical Journal. April 1905. Vol. XXXIV: 239-249.

Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J. and Rigor, B.M., Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: further in vitro validation, *J Neurochem*, 69 (1997a) 423-6.

Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J. and Rigor, B.M., Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study, *Brain Res*, 744 (1997b) 105-11.

Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J. and Rigor, B.M., Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia, *Brain Res.*, 774 (1997c) 221-4.

Seiffert D, Keeton M, Eguchi Y, Sawdey M, Loskutoff DJ. Detection of vitronectin mRNA in tissues and cells of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1991 Nov 1;88(21):9402-6.

Silver IA, Erecińska M. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. J Neurosci. 1994 Aug;14(8):5068-76.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone

marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood. 1991 Jul 1;78(1):55-62.

Sonneland P.R., Scheithauer B.W. a Onofrio B.M. (1985) Myxopapillary ependymoma. A clinicopathologic and immunocytochemical study of 77 cases. *Cancer* 56: 883-893.

Soroceanu L., Manning T.J., Jr. a Sontheimer H. (2001) Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 33: 107-117.

Strindberg L, Lönnroth P. Validation of an endogenous reference technique for the calibration of microdialysis catheters. Scand J Clin Lab Invest. 2000 May;60(3):205-11.

Sugahara K. a Kitagawa H. (2000) Recent advances in the study of the biosynthesis of sulfated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 518-527.

Sugahara T., Korogi Y., Kochi M., Ikushima I., Shigematu Y., Hirai T., Okuda T., Liang L., Ge Y., Komohara Y., Ushio Y. a Takahashi M. (1999) Usefulness of diffusion-weighted MRI with echo-planar technique in the evaluation of cellularity in gliomas. *J. Magn. Reson. Imaging* 9: 53-60.

Sun Z.M., Genka S., Shitara N., Akanuma A. a Takakura K. (1988) Factors possibly influencing the prognosis of oligodendroglioma. *Neurosurgery* 22: 886-891.

Svoboda J. a Syková E. (1991) Extracellular space volume changes in the rat spinal cord produced by nerve stimulation and peripheral injury. *Brain Res.* 560: 216-224.

Syková E. Extracellular K+ accumulation in the central nervous system. Prog Biophys Mol Biol. 1983;42(2-3):135-89.

Syková E. (1987) Modulation of spinal cord transmission by changes in extracellular K+ activity and extracellular volume. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 1058-1066.

Syková E. (1992a) Ionic and volume changes in the miroenvironment of nerve and receptor cells. *V:* Progress in Sensery Physiology. Ottoson D. (ed.) Springer-Verlag, Heidelberg, str. 1-167.

Syková E. (1992b) Ion-selective electrodes. *V:* Monitoring neuronal cells: a practical approach. Stamford J. (ed.) Oxford University Press, New York, str. 261-282.

Syková E. Extracellular space volume and geometry of the rat brain after ischemia and central injury. Adv. Neurol. 1997;73:121-35.

Syková E. (2001) Glial diffusion barriers during aging and pathological states. *Prog. Brain Res.* 132: 339-363.

Sykova E, Jendelova P, Glogarova K, Urdzikova L, Herynek V, Hajek M. Bone marrow stromal cells – a promising tool for therapy of brain and spinal cord injury. *Exp. Neurol* 2004;187:220

Sykova E, Jendelova P. Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener. Dis.* 2006;3:62-7.

Syková E., Mazel T. a Šimonová Z. (1998) Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging. *Exp. Gerontol.* 33: 837-851.

Syková E., Mazel T., Vargová L., Voříšek I. a Prokopová-Kubinová S. (2000a) Extracellular space diffusion and pathological states. *Prog. Brain Res.* 125: 155-178.

Syková E., Svoboda J., Polak J. a Chvátal A. (1994) Extracellular volume fraction and diffusion characteristics during progressive ischemia and terminal anoxia in the spinal cord of the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 301-311.

Syková E., Svoboda J., Šimonová Z., Lehmenkühler A. a Lassmann H. (1996) X-irradiation-induced changes in the diffusion parameters of the developing rat brain. *Neuroscience* 70: 597-612.

Syková E., Vargová L., Jendelová P. a Chvátal A. (2000b) Intrinsic optical signals evoked in spinal cord slices and their relation to neural activity and cell swelling. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 1619.

Syková E, Vargová L, Prokopová S, Simonová Z. Glial swelling and astrogliosis produce diffusion barriers in the rat spinal cord. Glia. 1999 Jan;25(1):56-70.

Sykova E, Urdzikova L, Jendelova P, Burian M, Glogarova K, Hajek M. Bone marrow cells – a tool for spinal cord injury repair. *Exp. Neurol.* 2005;193:261-262.

Syková, E., Glia and volume transmission during physiological and pathological states, *J. Neural Transm.*, 112 (2005) 137-47.

Syková, E. and Chvátal, A., Glial cells and volume transmission in the CNS, *Neurochem. Int.*, 36 (2000) 397-409.

Šimonová Z., Svoboda J., Orkand P., Bernard C.C., Lassmann H. a Syková E. (1996) Changes of extracellular space volume and tortuosity in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Physiol. Res.* 45: 11-22.

Tao L. a Nicholson C. (1996) Diffusion of albumins in rat cortical slices and relevance to volume transmission. *Neuroscience* 75: 839-847.

Tator CH. Epidemiology and general characteristics of the spinal cord injury patient. Ed: Benzel EC, Tator CH. 1995;9-13.

Thoreson, W.B., Witkovsky, P. (1999), Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 18:765-810.

Tien R.D., Felsberg G.J., Friedman H., Brown M. a MacFall J. (1994) MR imaging of high-grade cerebral gliomas: value of diffusion-weighted echoplanar pulse sequences. *Am. J. Roentgenol.* 162: 671-677.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.Radiat Res. 1961 Feb;14:213-22.

Trosko J.E. a Ruch R.J. (1998) Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.* 3: 208-236.

Tysnes B.B., Mahesparan R., Thorsen F., Haugland H.K., Porwol T., Enger P.O., Lund-Johansen M. a Bjerkvig R. (1999) Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17: 531-539.

Uhm J.H., Dooley N.P., Kyritsis A.P., Rao J.S. a Gladson C.L. (1999) Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. *Clin. Cancer Res.* 5: 1587-1594.

Ungerstedt, U., Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man, *J. Intern. Med.*, 230 (1991) 365-73.

Urban, M.O., Gebhart, G.F. (1998), The glutamate synapse: a target in the pharmacological management of hyperalgesic pain states. Prog. Brain Res. 116:407-420.

Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony

stimulating factor promote recovery after spinal cord injury in rat. *J. Neurotrauma,* 2006 Sep;23(9):1379-91..

Vaccaro AR, Daugherty RJ, Sheehan TP, Dante SJ, Cotler JM, Balderston RA, Herbison GJ, Northrup BE. Neurologic outcome of early versus late surgery for cervical spinal cord injury. *Spine.* 1997 Nov 15;22(22):2609-13.

Van der Toorn A., Syková E., Dijkhuizen R.M., Vořišek I., Vargová L., Skobisova E., van Lookeren C.M., Reese T. a Nicolay K. (1996) Dynamic changes in water ADC, energy metabolism, extracellular space volume, and tortuosity in neonatal rat brain during global ischemia. *Magn. Reson. Med.* 36: 52-60.

Vargova, L., Jendelova, P., Chvatal, A. and Sykova, E., Glutamate, NMDA, and AMPA induced changes in extracellular space volume and tortuosity in the rat spinal cord, *J Cereb. Blood Flow Metab.*, 21 (2001) 1077-89.

Vargová L, Homola A, Zámecník J, Tichý M, Benes V, Syková E. Diffusion parameters of the extracellular space in human gliomas. Glia. 2003 Apr 1;42(1):77-88.

Vege K.D., Giannini C. a Scheithauer B.W. (2000) The immunophenotype of ependymomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 8: 25-31.

Vernadakis A. a Woodbury D.M. (1965) Cellular and extracellular spaces in developing rat brain. radioactive uptake studies with chloride and inulin. *Arch. Neurol.* 12: 284-293.

Vezina, P. a Kim, J.H. (1999), Metabotropic glutamate receptors and the generation of locomotor activity: interactions with midbrain dopamine. Neurosci. Biobehav. Rev. 23:577-89.

Vogel T., Werber M.M., Guy R., Levanon A., Nimrod A., Legrand C., Gorecki M., Eldor A. a Panet A. (1993) Studies on fibronectin and its domains. I. Novel recombinant cell-binding domain of fibronectin—a modulator of human platelet functions. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 501-509.

Vořišek I., Antonová T., Mazel T., Hájek M. a Syková E. (2003) Diffusion and extracellular space volume fraction in the brain of mice lacking tenascin-R or HNK1 sulfotransferase. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 11: in press.

Vořišek I., Hájek M., Tintěra J., Nicolay K. a Syková E. (2002) Water ADC, extracellular space volume, and tortuosity in the rat cortex after traumatic injury. *Magn. Reson. Med.* 48: 994 -1003.

Vořišek, I. a Syková, E. (1997a), Evolution of anisotropic diffusion in the developing rat corpus callosum. *J. Neurophysiol.* 78:912-919.

Vořišek, I. a Syková, E. (1997b), Ischemia-induced changes in the extracellular space diffusion parameters, K+ and pH in the developing rat cortex and corpus callosum. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17:191-203.

Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science. 2002 Sep 27;297(5590):2256-9.

Walwyn, W.M., Ta-Haung, J., Ackerson, L., Maidment, N.T. a Edgerton, V.R. (1999), Extracellular glutamate in the dorsal horn of the lumbar spinal cord in the freely moving rat during hindlimb stepping. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63:581-588.

Watanabe K., Sato K., Biernat W., Tachibana O., von Ammon K., Ogata N., Yonekawa Y., Kleihues P. a Ohgaki H. (1997) Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin. Cancer Res.* 3: 523 -530.

Wharton S.B., Hamilton F.A., Chan W.K., Chan K.K. a Anderson J.R. (1998) Proliferation and cell death in oligodendrogliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24: 21-28.

Williard (1871): Clines Operation. Chicago, M. Exam.; XII: 585.

Woerly S, Petrov P, Syková E, Roitbak T, Simonová Z, Harvey AR. Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies. Tissue Eng. 1999 Oct;5(5):467-88.

Woolsey, D., Minckler, J., Rezende, N., Klemme, R.: Human spinal cord transplant. Experimental Medicine and Surgery. 1944; n (2): 92-102.

Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord.* 2006 Sep;44(9):523-9.

Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, Noda T, Bai H, Kitada M, Kataoka K, Ohta M, Chou H, Ide C. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 2003;72:343-351.

Ye Z.C., Rothstein J.D. a Sontheimer H. (1999) Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J. Neurosci.* 19: 10767-10777.

Ye Z.C. a Sontheimer H. (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res.* 59: 4383-4391.

Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, Park HC, Park SR, Min BH, Kim EY, Choi BH, Park H, Ha Y. 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.* 2007 Aug;25(8):2066-73.

Zámečník J, Vargová L, Homola A, Kodet R, Syková E. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. Neuropathol Appl Neurobiol. 2004 Aug;30(4):338-50.

Zagzag D., Friedlander D.R., Miller D.C., Dosik J., Cangiarella J., Kostianovsky M., Cohen H., Grumet M. a Greco M.A. (1995) Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. *Cancer Res.* 55: 907-914.

Zhang M.J. (2002) Cox proportional hazards regression models for survival data in cancer research. *Cancer Treat. Res.* 113: 59-70.

Zhang X., Vuolteenaho R. a Tryggvason K. (1996) Structure of the human laminin alpha2-chain gene (LAMA2), which is affected in congenital muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 271: 27664-27669.

Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp. Neurol.* 2002;174:11-20.

Zoremba N, Homola A, Rossaint R, Syková E. Brain metabolism and extracellular space diffusion parameters during and after transient global hypoxia in the rat cortex. Exp Neurol. 2007 Jan;203(1):34-41.

Zulch K.L. (1986) Brain Tumors. Their Biology and Pathology. Springer-Verlag, Berlin

6. Publikace autora

Publikace in extenso

1. Vargová L., **Homola A.**, Zamečník J., Tichý M., Beneš V., Syková E. Diffusion parameters of the extracellular space in human gliomas. *Glia* 2003, 42: 77-88.

   IF 5.013

2. Zámečník J., Vargová L., **Homola A.**, Kodet R., Syková E. Extracellular matrix and diffusion barriers in human astrocytic tumors. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.:* 2004 Aug;30(4):338-50. **IF 2.681**

3. **Homola A.**, Zoremba N., Šlais K., Kuhlen R., Syková E. Changes in diffusion parameters, energy-related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient hypoxia/ischemia. *Neurosci. Lett.* 2006 Aug 14;404(1-2):137-42 **IF 2.092**

4. Syková E., **Homola A.**, Mazanec R., Lachmann H., Konradova SL., Kobylka P., Pádr R., Neuwirth J., Komrska V., Vavra V., Štulik J., Bojar M. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2006;15(8-9):675-87 **IF 3.482**

5. Zoremba N., **Homola A.**, Rossaint R., Syková E. Brain metabolism and extracellular space diffusion parameters during and after transient global hypoxia in the rat cortex. *Exp. Neurol.* 2007 Jan;203(1):34-41 **IF 4.156**

6. Šlais K., Voříšek I., Zoremba N., **Homola A.**, Dmytrenko L., Syková E. Brain metabolism and diffusion in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp. Neurol.* 2008 Jan;209(1):145-54. **IF 4.156**

7. Zoremba N., **Homola A.**, Šlais K., Voříšek I., Rossaint R., Lehmenkühler A., Syková E. Extracellular diffusion parameters in the rat somatosensory cortex during recovery from transient global ischemia/hypoxia. *JCBFM*, v tisku **IF 4.843**

Abstrakta

1. Zámečník J., Vargová L., Jendelová P., **Homola A.**, Kodet R., Syková E. (2000) Extracellular space diffusion parameters in tissue slices of human cortex and glial tumors. *Eur. J. Neurosci. 12*, Suppl. 11: 225.

2. Vargová L., Jendelová P., **Homola A.**, Zámečník J., Syková E. (2000) Extracellular space diffusion parameters in human cortex and gliomas. Abstracts, *IVth European Meeting on Glial Cell Function and Diasease*, Barcelona. Rev. Neurol.: 24: 79.

3. Vargová L., **Homola A.**, Jendelová P., Zámečník J., Tichý M., Beneš V., Syková E. (2000) Extracellular space volume fraction and geometry in human cortex and gliomas. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 1619.

4. Zámečník J., Vargová L., Jendelová P., **Homola A.**, Tichý M., Beneš V., Kodet R., Syková E. (2001) Difúzní parametry extracelulárního prostoru gliových nádorů mozku. *Biomed. Papers* 145: 50.

5. **Homola A.**, Vargová L., Jendelová P., Zámečník J., Tichý M., Beneš V., Syková E. (2001) Diffusion parameters in human gliomas. *Physiol. Res.* 7: 26.

6. **Homola A.**, Vargová L., Jendelová P., Zámečník J., Tichý M., Beneš V., Syková E. (2001) Difúzní parametry v lidských gliomech. *Studentská vědecká konference UK 2. LF*, Praha, 2001.

7. Lesný, P., Munzar, P., **Homola, A.,** Syková, E., Vacík, J., Přádný, M. (2001) Different polymer hydrogels usable for tissue repair and axonal regeneration in spinal cord. *Abstracts, "Changing Views of Cajal's Neuron",* Madrid.

8. **Homola, A.,** Vargová, L., Zámečník, J., Tichý, M., Beneš, V., Syková, E. (2001) Extracellular space volume fraction and geometry in human cortex and glial tumors. *Abstracts, 4th Conference of the Czech Neuroscience Society,* Praha, p. 58.

9. Zámečník, J., Vargová, L., Jendelová, P., **Homola, A.**, Tichý, M., Beneš, V., Kodet, R., Syková, E. (2001) Difúzní parametry extracelulárního prostoru gliových nádorů mozku. *Biomedical Papers, 145 (1),* p. 50.

10. **Homola, A.,** Vargová, L., Jendelová, P., Zámečník, J., Tichý, M., Beneš, V., Syková, E. (2001) Diffusion parameters in human gliomas. *Physiol. Res.*, 50: P8

11. Vargová L., **Homola A.**, Zámečník J., Tichý M., Beneš V., Syková E. (2002) Difúzní parametry extracelulárního prostoru v lidských gliomech. *Kongres klinické neurologie*, Praha, 2002

12. Zámečník J., Vargová L., **Homola A.**, Tichý M., Beneš V., Kodet R., Syková E. (2003) Extracelulární matrix a difúzní bariéry extracelulárního prostoru v astrocytárních nádorech mozku. *Studentská vědecká konference UK 2. LF*, Praha, 25. 4. 2003.

13. Zámečník J., Vargová L., **Homola A.**, Tichý M., Beneš V., Kodet R., Syková E. (2003) Extracelulární matrix a difúzní bariéry extracelulárního prostoru v astrocytárních nádorech mozku. *30. sjezd českých patologů*, Brno, 23. - 24. 5. 2003.

14. Zámečník J., Vargová L., **Homola A.**, Tichý M., Beneš V., Kodet R., Syková E. (2003) Extracellular matrix and diffusion barriers in human astrocytic tumors. *6th IBRO World Congress of Neuroscience*, Praha, 10. - 15. 7. 2003.

15. Zoremba, N., **Homola, A.**, Lehmenkuhler, A., Syková, E. (2003) Extracellular diffusion parameters in rat neocortex during recovery from mild and severe global ischemia. *Abstracts, 6th World Congress of Neuroscience,* Praha, p. 455.

16. Vargová, L., Zámečník, J., **Homola, A.,** Syková, E. (2003) Extracellular space diffusion parameters in human astrogliomas – correlation with tumor malignancy. *Abstracts, 3rd FEPS Congress,* Nice, France, p. 66.

17. Zámečník J., Vargová L., **Homola A.**, Kodet R., Syková E. (2003) Extracellular matrix and diffusion barriers in human astrocytic tumors. *SFN 33rd Annual Meeting,* New Orleans, *USA*, 8. - 12. 11. 2003.

18. **Homola A.**, Zoremba N., Šlais K., Kuhlen R., Syková E. Changes in diffusion parameters, energy related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient global hypoxia and hypoxia/ischemia. *FENS Abstr., vol.3, A132.10, 2006*

19. Šlais K., **Homola A.**, Syková E. (2005) Extracellular diffusion parameters during and after unilateral carotic occlusion in rat. *Fifth Conference of the Czech Neuroscience Society,* Praha, p. 81

20. Šlais K., **Homola A.**, Zoremba N., Kuhlen R., Syková E. (2006) Extracelulární difúzní parametry a metabolizmus mozku po tranzientní globální hypoxii a hypoxii-ischemii u potkanů. Vědecká konference 2. lékařské fakulty UK, Praha

21. Vargová, L., Zámečník, J., **Homola, A.,** Syková, E. (2006) The extracellular matrix and diffusion barriers in human astrocytic tumors. *VII. European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease,* Amsterdam

22. Šlais K., **Homola A.**, Zoremba N., Kuhlen R., Syková E. (2006) Brain metabolism and extracellular diffusion parameters after transient global hypoxia and hypoxia/ischemia in the rat. *4th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair: Cerebral Ischemia and Stroke,* Magdeburg