

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE,  
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA a  
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY AV ČR, v.v.i.



Experimentální přemostění míšního poranění pomocí  
hydrogelů

MUDr. Aleš Hejčl



Dizertační práce

PRAHA, 2009

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

**Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České Republiky**

**Obor:** Neurovědy

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

**Školicí pracoviště:** Ústav experimentální medicíny AVČR, v.v.i.

**Autor:** MUDr. Aleš Hejčl

**Školitel:** prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.

**Oponenti:** .....

.....

.....

**Obhajoba se koná dne:** .....v.....hod.

**kde:**.....

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 1. LF UK v Praze

## **Poděkování**

Tímto bych rád vyjádřil svou vděčnost všem, kteří mi v mé práci pomohli.

Především chci poděkovat své školitelce, prof. MUDr. Evě Sykové, DrSc., ředitelce Ústavu experimentální medicíny AVČR, v.v.i. a zároveň vedoucí Ústavu neurověd a Centra buněčné terapie a tkáňových náhrad 2. LFUK za vedení mé vědecké práce, podporu, cenné připomínky a podněty.

Dále děkuji RNDr. Pavle Jendelové, CSc., vedoucí Laboratoře kmenových buněk a tkáňových kultur, která významným způsobem přispěla k vedení a formování mé vědecké práce. Dále patří můj dík MUDr. Petru Lesnému, za uvedení do problematiky hydrogelů, MUDr. et MDDr. Jiřímu Šedému, PhD., MUDr. Lucii Urdzíkovej, PhD., mgr. Martinu Burianovi, MVDr. Takashi Amemorimu, PhD, MDDr. Davidu Arboledovi a ing. Kataríně Likavčanové-Mašínové, PhD a kolegům z Ústavu makromolekulární chemie AVČR, v.v.i., především pak ing. Martinovi Prádnému, CSc., ing. Jiřímu Michálkovi, CSc., a ing. Evě Krumbholcové.

Za technickou pomoc a spolupráci velmi děkuji Jamesi Duttovi, Haně Hronové, Lence Kohotové, Aleně Veselé, Dominice Duškové a Pavlíně Mackové.

Na závěr bych chtěl poděkovat celé své rodině, která mě při studiu podporovala, a zejména pak své přítelkyni, MUDr. Haně Malíkové, za nesmírnou trpělivost a podporu veškeré mé práce.

## **Grantová podpora**

Tato práce byla podpořena následujícími grantovými projekty: AVOZ50390512, AV0Z50390703, 1M0538, LC554, IAA500390902 IGA, GACR 309/06/1246, MZ 1A8697-5 a EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233)

## Seznam zkratk

aFGF	acidic fibrillary growth factor
ASIA	American Spinal Cord Association grading system for severity of neurologic deficit after acute spinal cord injury
BBB	Basso-Beattie-Bresnahan score, škála k hodnocení motorického deficitu zadních končetin u potkanů s poraněním míchy
BCL	balónková kompresní léze (balloon compression lesion)
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibrillary growth factor
C1-7	krční obratle 1-7
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CSPG	chondroitin sulfát proteoglykany
CNS	centrální nervová soustava
CT	počítačová tomografie
CV	cresyl violet
EOEMA	etoxyetylmetakrylát
ESC	embryonální kmenové buňky (embryonal stem cells)
G-CSG	granulocyty stimulující faktor (granulocyte colony stimulating factor)
GDNF	glial derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GMP	good manufacturing practice
HEB	hematoencefalická bariéra
HEMA	hydroxyethylmetakrylát
HE	hematoxylin-eosin
HPMA	hydroxypropylmetakrylamid
IgG, IgM	imunoglobulin G, M
iPSC	induced pluripotent stem cells, indukované pluripotentní kmenové buňky
IL-1, 6	interleukin 1, 6

L1-5	bederní obratle 1-5
LCA	leukocyte common antigen
LFB	luxol fast blue, luxolová modř
MA-	metakrylát
MAG	myelin associated glycoprotein
MOETA+	[2-(metakryloyloxy)ethyl] trimethylamonium
MRI	magnetic resonance imaging
MSC	mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Study
NF	neurofilamenta
NG2	jeden z proteoglykanů ze skupiny chondroitin sulfát proteoglykanů
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
NSC	neurální kmenové buňky (neural stem cells)
NT-3	neurotrofin 3
NYU	New York University
OEG	olfaktorická glie (olfactory ensheathing glia)
OMgp	oligodendrocyte myelin glycoprotein
OSU	Ohio State University
PBS	roztok pufovaného fosfátu
PEC	polyelektronové komplexy
PNS	periferní nervový systém
RARE	Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
RGD	sekvence aminokyselin arginin-glycin-aspartát
S1-5	křížové (sakrální) obratle 1-5
s.c.	subkutánní
SCI	míšní poranění (spinal cord injury)
S.E.M.	standard error of mean, směrodatná odchylka
SVZ	subventrikulární zóna
Th 1-13	hrudní obratle 1-13

TEA	tetraethylammonium
TNF	tumor necrosis factor
4-OHT	4-hydroxy-tamoxifen

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Patofyziologie poranění míchy.....	2
1.1.1. Primární poranění.....	2
1.1.2. Sekundární poranění.....	3
1.1.2.1. Okamžitá fáze poranění.....	3
1.1.2.2. Akutní fáze.....	5
1.1.2.2.1. Zánět.....	5
1.1.2.2.2. Neurony a buněčná smrt.....	6
1.1.2.2.3. Demyelinizace a oligodendrocyty.....	7
1.1.2.3. Střednědobá fáze.....	8
1.1.2.4. Chronická fáze.....	9
1.1.3. Reparační mechanismy po míšním poranění.....	10
1.1.3.1. Kolaterální sprouting (pučení).....	10
1.1.3.2. Proliferace endymálních buněk po míšním poranění.....	10
1.1.3.3. Specifika rozhraní periferního a centrálního nervového systému.....	11
1.2. Klinické projevy poranění míchy.....	12
1.2.1. Typy míšního poranění.....	14
1.2.1.1. Kompletní míšní syndromy.....	14
1.2.1.2. Inkompletní míšní syndromy.....	15
1.3. Experimentální modely poranění míchy u laboratorního potkana.....	17
1.4. Experimentální terapie poranění míchy pomocí biomateriálů.....	20
1.4.1. Biomateriály – obecně.....	20
1.4.2. Hydrogely.....	22
1.4.2.1. Hydrogely založené na bázi HEMA a HPMA.....	23
1.4.2.2. Hydrogely s pozitivními a negativními povrchovými náboji.....	25
1.4.2.3. Biodegradabilní hydrogely.....	25

1.4.3. Kmenové buňky.....	26
1.4.3.1. Embryonální kmenové buňky (ESC).....	26
1.4.3.2. Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	27
1.4.3.3. Fetální kmenové buňky.....	28
1.4.3.4. Dospělé kmenové buňky.....	29
1.4.3.4.1. Kmenové buňky CNS.....	29
1.4.3.4.2. Kmenové buňky kostní dřeně.....	30
1.4.4. Schwannovy buňky.....	31
1.4.5. Olfaktorická glie.....	32
1.4.6. Aktivované makrofágy.....	33
1.4.7. Blokáda inhibičních faktorů v CNS.....	34
1.4.8. Enzymy degradující inhibitory růstu axonů.....	35
1.4.9. Neurotrofní faktory.....	35
1.4.10. Současná klinická léčba.....	37
1.4.10.1. Kortikoidy.....	37
<b>2. Cíle práce.....</b>	<b>39</b>
<b>3. Metody.....</b>	<b>40</b>
3.1. Laboratorní zvířata.....	40
3.2. Experimentální poranění míchy.....	40
3.3.1. Příprava k experimentální operaci míchy.....	40
3.3.2. Hemisekce míchy.....	41
3.3.3. Transekce míchy.....	41
3.3.4. Balónková kompresní léze.....	41
3.4. Implantace hydrogelu.....	42
3.4.1. Implantace hydrogelu do akutní míšní léze - hemisekce .....	42
3.4.2. Implantace hydrogelu do transekce akutně a po 1 týdnu.....	43
3.4.3. Implantace hydrogelu po balónkové kompresní léze.....	44
3.5. Metodika hodnocení výsledků.....	45
3.5.1. Behaviorální testování.....	45



3.5.2. Hodnocení magnetickou rezonancí.....	48
3.5.3. Retrográdní barvení.....	48
3.5.4. Perfúze zvířat.....	48
3.5.5. Histologické zpracování.....	49
3.5.6. Elektronová mikroskopie.....	50
3.5.7. Morfometrie kavit.....	50
3.5.8. Statistická analýza.....	50
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>51</b>
4.1. Přemostění akutního SCI hydrogely na bázi HEMA a HPMA.....	51
4.2. Přemostění akutního SCI hydrogelem s povrchovým nábojem .....	53
4.3. Přemostění akutního SCI vstřebatelnými hydrogely .....	55
4.4. Akutní a odložené přemostění kavity hydrogelem akutního SCI.....	57
4.5. Vliv implantace hydrogelu a hydrogelu s MSCs na míšní lézi a atrofii míchy v modelu chronického SCI .....	60
4.6. Vliv implantace hydrogelu a hydrogelu s MSCs na motoriku a senzitivitu zadních končetin v modelu chronického SCI .....	66
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>68</b>
5.1. Experimentální model versus míšní poranění v klinické praxi.....	69
5.2. Akutní versus chronická implantace hydrogelu .....	70
5.3. Vliv hydrogelu na atrofii míšní tkáně následkem poranění míchy.....	71
5.4. Implantace hydrogelu do chronické míšní léze.....	72
5.5. Vliv povrchové modifikace hydrogelu na regeneraci míšní tkáně.....	73
5.6. Vstřebatelné hydrogely.....	75
5.7 Kombinovaná léčba – kmenové buňky a hydrogely.....	76
<b>6. Závěry.....</b>	<b>78</b>
<b>7. Souhrn.....</b>	<b>79</b>
<b>8. Summary.....</b>	<b>81</b>
<b>9. Literatura.....</b>	<b>83</b>
<b>10. Přehled publikací autora.....</b>	<b>107</b>

## 1. Úvod

Poranění míchy (SCI, spinal cord injury) je významný zdravotní i společenský problém převážně v ekonomicky rozvinutých zemích světa. Průměrný věk pacientů s poraněním míchy je 40 let. Muži jsou postižení 4x častěji než ženy. Vysoká incidence souvisí s rozvojem automobilové dopravy (převážně motocyklů) a sportovních aktivit zejména v letních měsících (skoky do vody). Incidence poranění míchy je ve vyspělých zemích udávána okolo 5 případů na 100 000 obyvatel. V USA je roční incidence 12 000 případů. V České republice každý rok prodělá úraz páteře či míchy přes 300 lidí. Významný je i faktor ekonomický. Například v USA roční výdaje spojené s léčbou míšního poranění dosahují 10 miliard dolarů (Bracken, 1991, Bracken *et al.*, 1997). Nejčastějším typem ochrnutí je kvadruparéza (30.1% případů), následována kompletní paraplegií (25,6%), kompletní tetraplegií (20,4%), a paraparézou (18.5%). Postižení hybnosti je doprovázeno poruchou senzitivních a autonomních funkcí (Spinal Cord Injury Information Network, <http://www.spinalcord.uab.edu>).

Doposud neexistuje léčba SCI, která by zajistila regeneraci postižené tkáně, a tím se navrátily pokozené funkce. V běžné klinické praxi u pacientů se SCI patří do základního terapeutického algoritmu stabilizační operace páteře v případě nestabilní zlomeniny, aplikace kortikoidů a rehabilitace. Neexistuje léčba, která by zrekonstruovala poškozenou míšní tkáň. V laboratorních podmínkách je testováno mnoho různých léčebných postupů a metod. Přemostění míšního poranění pomocí biomateriálů je jednou z významných oblastí experimentální léčby míšního poranění. Jedny z nejčastěji užívaných biomateriálů jsou hydrogely. Tato práce shrnuje některé naše výsledky s aplikací hydrogelů, sloužících k přemostění defektu v experimentálním míšním poranění.

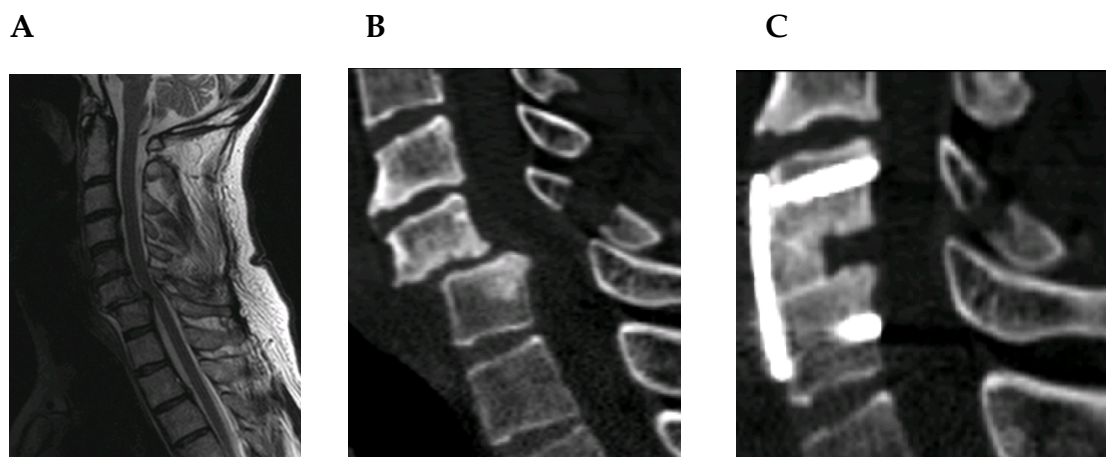
### 1.1. Patofyziologie poranění míchy

Poranění míchy lze z patofyziologického hlediska rozdělit na dvě základní fáze, primární a sekundární poranění.

#### 1.1.1. Primární poranění

Jedná se o vlastní moment traumatu, které postihuje páteř a míchu. Poranění míchy vzniká v návaznosti na poškození osteoligamentózního aparátu páteře buď přímo, při prudkém ohnutí, napnutí nebo rotaci míchy, nebo nepřímo, stlačením kostním úlomkem, fragmentem intervertebrálního disku, nebo cizím tělesem (obr. 1). Morfologická charakteristika poranění míšní tkáně a klinický nález se liší dobou trvání a silou míšní komprese, vytlačení míchy, akcelerací působícími kompresivními silami a kinetickou energií absorbovanou míchou. Poranění míchy často zahrnuje pouze 1 segment či dokonce necelý segment. Vždy je přítomen nějaký zbytek tkáně, takže se téměř nikdy nejedná o histologicky kompletní poranění (jako u kompletní transekce míšní v experimentálním poranění). M. Bunge rozdělila míšní trauma do 4 kategorií (Bunge *et al.*, 1993):

1. Makroskopicky normálně vypadající mícha (10% případů). Makroskopický nález je normální, ale histologické vyšetření prokáže ztrátu normální struktury a demyelinizaci.
2. Kontúze (49% případů). Makroskopická struktura opět vypadá normálně, ale jsou patrné menší oblasti krvácení a nekrózy, které se vyvinou do cystických kavit.
3. Lacerace (21% případů). Je patrné poranění glia limitans s devastujícím poraněním míšního parenchymu, v epicentru je patrná gliální jizva. Mezenchymální jizva je tvořena kolagenem a adhezuje k okolním plenám. Dalším příznakem jsou kavity. Příčinou jsou často fragmenty obratlů či penetrující poranění.
4. Masivní komprese (20% případů). Míšní tkáň je macerována a rozmělněna. Častou příčinou je zlomenina obratlového těla komprimující míchu. Epicentrum míchy je opět tvořeno masivní fibrózní jizvou a kavitami následkem sekundární atrofie míšní tkáně.



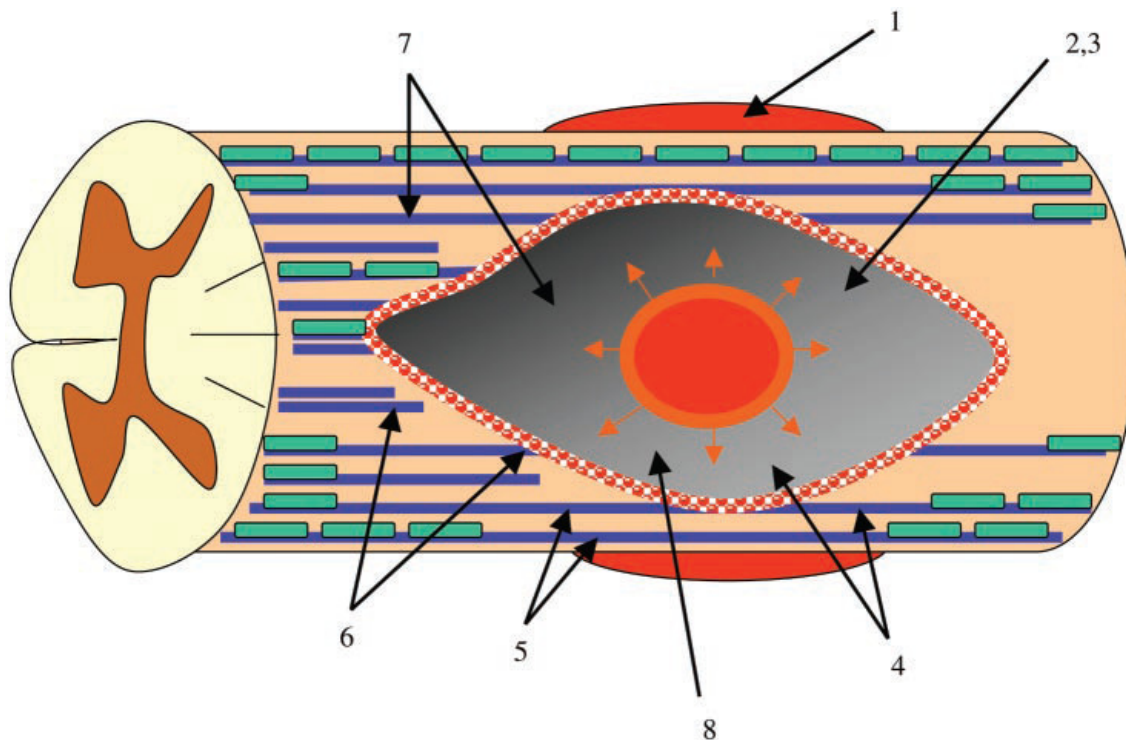
Obr. 1: Poranění míchy (traumatická subluxace C6/7) v obraze MR (A) a v sagitálních CT rekonstrukcích (B). CT sagitální rekonstrukce po stabilizaci segmentu C6/7 z přední přístupu dle Caspara (C).

### 1.1.2. Sekundární poranění

Allen v roce 1911 ukázal, že myelotomie a odstranění posttraumatické hematomyelie mělo za následek zlepšení neurologického nálezu u psů, kteří předtím prodělali experimentální poranění míchy. Přišel s hypotézou „biochemického faktoru“ přítomného v nekrotické tkáni, který je příčinou dalšího poškození míchy (Allen 1911). Dnes je známo, že se jedná o celou sérii procesů, které v čase v průběhu času způsobí sekundární míšní poranění (obr. 2). Lze je v čase rozdělit do 4 fází.

#### 1.1.2.1. Okamžitá fáze poranění (1-2 hodiny po vzniku poranění)

Tato fáze zahrnuje vlastní moment mechanického traumatu, který je následován cévními změnami, jako vazodilatace, hyperémie, petechiální krvácení. V této fázi často nepozočujeme žádné či jen minimální změny, pokud se nejedná o případy masivní komprese či lacerace. Předpokládá se, že většina patologických změn v míše vzniká následkem sekundárních procesů (edém, ischemie, krvácení, zánět, hypertermie, buněčné trauma související s kalcium, volnými radikály, oxid dusnatý, glutamát).



Obr. 2: Primární a sekundárního poranění míchy (volně dle Hulsebosch 2002)

Primární poranění míchy (černý centrální ovál) se radiálně rozšiřuje (červený kruh s oranžovým okrajem) až k rozvoji definitivní léze (šedá oblast). Modré čáry značí axony a zelené čtverce jsou oligodendrocyty. Možnosti intervence označené ve schématu: 1. redukce edému a produkce volných radikálů, 2. neuroprotektce okolní nervové tkáně, která je ohrožena sekundárními procesy, jako jsou např. vysoká koncentrace extracelulárního glutamátu, 3. regulace zánětlivých procesů, 4. ochrana neuronů a glie, které jsou ohroženy apoptózou, 5. reparace demyelinizace a poruchy vedení, 6. podpora růstu axonů vytvořením permissivního extracelulárního prostředí, 7. buněčná terapie, 8. přemostění míšního poranění a transplantace.

#### 1.1.2.2. Akutní fáze (několik hodin až 1-2 dny po poranění)

Akutní fázi provází hlavně edém, krvácení a zánět. Jedná se o kombinaci edému vazogenního a cytotoxického. Vazogenní edém je charakterizován poruchou integrity hematoencefalické bariéry (HEB) s následným únikem plazmy do extracelulárního prostředí. Toto může způsobit redukci krevního tlaku s rozvojem ischemie na podkladě tlakových změn. Cytotoxický edém je charakterizován

intracelulárním edémem, který postihuje hlavně astrocyty. Tento edém pozorujeme od 3 hodin do 3 dnů od traumatu. Může tak ovlivnit funkci astrocytů s devastujícími následky pro míšní tkáň.

Krvácení se převážně objevuje v šedé hmotě míšni jako následek kontúze (centrální hemoragická nekróza). Dochází k ruptuře postkapilárních žil, následkem mechanického přetržení nebo intravaskulární koagulace, která způsobuje venostázu a roztažení cév. Hematom nacházíme v místě poranění zřídka, pokud se nejedná o případy lacerace míchy.

#### 1.1.2.2.1. Záněť

Mechanické poranění míchy způsobí zánětlivou reakci, která je v akutní fázi charakterizována během prvních 2 dnů infiltrací tkáně neutrofily a v následujících dnech pak infiltrací makrofágy a lymfocyty.

#### *Neutrofily a makrofágy*

Během prvního dne se objevuje mírná infiltrace neutrofilů. Maximální koncentrace v místě traumatu je 2. den a téměř vymizí v den třetí. Jejich reakce v míšni tkáni je v porovnání s periferními tkáněmi mírná. Na druhou stranu, v porovnání s traumatem mozku je infiltrace neutrofilů významně větší. Zatímco u poranění mozku jsou neutrofily přítomny jen v okrajových částech poranění, tak u léze míšni je infiltrována rozsáhlá oblast okolního parenchymu. V porovnání s traumatem mozku je množství neutrofilů v místě léze dvojnásobné a v okolní tkáni dokonce čtyřnásobné (Schnell *et al.*, 1999). Má se za to, že působí převážně neurotoxicky na okolní nervovou tkáň.

Makrofágy infiltrují poškozenou míšni tkáň následkem poranění cév a tedy HEB. Na rozdíl od neutrofilů jsou přítomny v místě poranění několik týdnů. Přesto však je infiltrace makrofágů v oblasti míšního poranění relativně malá, a proto dominující roli v obranné reakci u SCI hrají rezidentní mikroglie (Barami a Diaz, 2000)

### *Mikroglie a mikrofágy*

Aktivace rezidentní mikroglie v nejbližším okolí poranění je patrná již od prvního dne a roste celý první týden. Stejně jako u neutrofilů je rozsah tkáně s přítomností aktivované mikroglie v porovnání s mozkovou tkání větší.

### *Lymfocyty*

Během akutní fáze infiltrují lymfocyty místo poranění a okolní míšní parenchym do vzdálenosti až 3-4mm od centra poranění. Na rozdíl od jiných elementů je jejich množství během prvního týdne po poranění v okolí míchy stabilně nízké.

#### 1.1.2.2.2. Neurony a buněčná smrt

Buněčná smrt neuronů u SCI může probíhat buď procesem apoptózy či procesem nekrózy. Proces nekrózy hraje dominantní roli. Ačkoliv v některých pokusech byla pozorována apoptóza u neuronů, neexistují publikované údaje, které by dokázaly tento typ smrti neuronů u poranění míchy u lidí (Emery *et al.*, 1998). Neurony odumírají buď okamžitě po poranění, nebo s odstupem několika hodin. Zatímco v okamžité fázi je příčinou mechanický inzult, tak v pozdní fázi je neuronální smrt dána ischemií tkáně na podkladě snížené perfúze, krvácení a edému (Tator 1991). Dochází tak k poruše velmi citlivé a energeticky náročné iontové rovnováhy na buněčných membránách. Pro život buňky je pak zvláště důležité udržet nízkou intracelulární koncentraci iontu  $Ca^{2+}$ . Důležitou roli přitom hrají membránové receptory excitatorních neurotransmiterů, glutamátu a aspartátu, které se ve vysokých koncentracích nacházejí v posttraumatickém období a způsobují další stimulaci neuronů. Přitom hyperstimulace může vést až k jejich smrti (Olney 1969). Významnou roli hraje zvláště receptor N-methyl-D-aspartátové (NMDA), který je iontovým kanálem pro  $Ca^{2+}$ . Jeho zvýšená aktivita zapříčiňuje zvýšenou propustnost membrán pro  $Ca^{2+}$ . Nadměrná intracelulární koncentrace vápníku aktivuje enzymy,

jako jsou protězy či lipázy s následnou dezintegrací cytoskeletu, buněčných membrán a organel.

Axony odumírají walleriánskou degenerací distálně od somatu neuronu. Postupně dochází k dezintegraci struktury axonů a jejich myelinových obalů. Degeneraci axonů a jejich myelinových pochev tak můžeme pozorovat u motorických drah kaudálně od místa poranění a u senzitivních drah kraniálně od místa poranění (Kakulas 2004).

#### 1.1.2.2.3. Demyelinizace a oligodendrocyty

Myelin se rozpadá časně po míšním poranění. Otok myelinových pochev vede k jejich fragmentaci a fagocytóze mikrořagy. Proces degradace myelinu probíhá téměř vždy společně s poraněním axonů. Není jasné, zdali demyelinizace předchází rozpadu axonů. U lidí s poraněním míchy není primární demyelinizace popsána, kromě případů chronické komprese míchy u cervikální spondylózy. U zvířecích experimentálních modelů může hrát primární demyelinizace významnou roli.

Oligodendrocyty jsou citlivé k míšnímu poranění. Umírají procesem nekrózy, avšak apoptóza oligodendrocytů byla popsána jak v experimentálních studiích, tak v klinických případech u lidí s poraněním míchy (Bunge *et al.*, 1993).

#### 1.1.2.3. Střednědobá fáze (*dny až týdny*)

V této fázi mikroglie eliminují nekrotický detritus, rozvíjí se gliální reakce, edém regreduje a probíhá revaskularizace tkáně spolu se znovuobnovením hematoencefalické bariéry.

#### *Mikroglie*

Klidová mikroglie (ramified microglia) představuje rezidentní histiocyty nervového systému. Jedná se o hlavní buňky, které se starají o odstranění nekrotického detritu, zánětlivou a imunologickou odpověď. Mikroglie je aktivována jeden den po poranění a předchází aktivaci astrocytů. Na úrovni mikroskopické



můžeme pozorovat zvětšení, vyblednutí a pleiomorfní vzhled jejich jader v barvení hematoxylin-eozin. Imunohistochemicky může být jejich aktivace pozorována při použití LCA – leukocyte common antigen. Během několika dnů jsou buňky přestavěny do kulatých, polygonálních buněk, které se označují jako mikrofágy. Tvoří menšinu poolu mikrofágů, neboť většina z nich pochází z krevního řečiště z monocytů. Mohou být patrné v místě poranění týdny až měsíce. Mikroglie secernuje látky, které poškozují okolní tkáň, jako například vytokány, NO, superoxidové aniony, glutamát a proteázy. Na druhou stranu byla popsána sekrece cytoprotektivních látek, jako je například IL-1beta, která podporuje produkci NGF, indikuje sprouting axonů a podporuje regeneraci CNS. Další látkou je IL-6, která brání ztrátě neuronů v předních rozích míšních po axotomii a chrání proti glutamátem indukované toxicitě. Také další produkt, TNF-alfa má neuroprotektivní účinky). Implantace mikroglie do míšního poranění podpořila regeneraci axonů (Rabchevsky and Streit, 1997).

Hlavní funkcí mikrofágů je pravděpodobně fagocytóza. Tato funkce je nesmírně důležitá, neboť v nekrotickém detritu je obsaženo velké množství lipidů, které jsou tak potenciálním zdrojem volných radikálů se všemi jejich škodlivými následky.

### *Astrocyty*

Několik dnů po poranění prodělají astrocyty na okraji léze hypertrofii, jak je patrné z nadměrného objemu jejich cytoplazmy. Jejich jádra se zvětší a zblednou. Na druhou stranu v centru poranění astrocyty odumírají. V aktivovaném stavu obsahují astrocyty velké množství mitochondrií a endoplazmatického retikula, což souvisí s vysokou metabolickou aktivitou (Nathaniel and Nathaniel 1977). Tyto aktivované astrocyty se nazývají gemistocyty. Vrchol hypertrofie je mezi 2 a 3 týdny. Vysílají dlouhé a silné výběžky, které tvoří novou glii limitans a izolují tak poranění od zbytku viabilní tkáně. Reaktivní astrocytóza je dobře patrna při imunohistochemickém barvení pomocí GFAP (glial fibrillary acidic protein).

#### 1.1.2.4. Chronická fáze poranění míchy (*týdny až měsíce*)

##### *Gliová jizva*

Gliová jizva je tvořena převážně hypertrofickými astrocyty s mnoha pevně propletenými výběžky, kdy mnoho z nich je propojeno funkčními komplexy (Reier *et al.*, 1983). Vzniká následkem poranění centrální nervového systému. Proces jizvení zahrnuje mikroglii, prekuzory oligodendrocytů, astrocyty, meningeální buňky a endoteliální buňky cév. Prvními změnami po poranění CNS je příliv krevních elementů, zvláště monocytů a mikrofágů (Perry *et al.*, 1993). Během pár hodin endogenní linie mikrofágů CNS a mikroglie začínají reagovat, hypertrofují, začínají se dělit a dochází k upregulaci mnoha molekul, včetně receptorů komplementu, které se využívají při značení buněk a stupně jejich aktivity (Raivich *et al.* 1999). Během 24 hodin jsou aktivovány prekuzory oligodendrocytů; dělí se, hypertrofují a zvětšují svůj povrch, zvyšují na povrchu buněk hladiny NG2, což je nejdůležitější marker těchto buněk (Levine *et al.* 2001). Astrocyty se aktivují přibližně za 1 až 2 dny. Hypertrofují, tedy zvětšuje se objem buněk a prodlužuje délka výběžků. Část buněk se dělí a významně se navyšuje množství proteinů intermediárních filament – GFAP, vimentinu a nestinu (Wu and Schwartz 1998; Eddleston *et al.* 1993; Ridet *et al.* 1994). Zatímco upregulace GFAP je ve větším rozsahu, upregulace vimentinu a nestinu je více lokalizována do oblasti vlastního poranění. Zvláště u míšních poranění je patrná významná invaze meningeálních buněk, které tak vytvářejí další významnou bariéru míšní regeneraci (Reier *et al.*, 1983). Kolem míšní léze také hypertrofují endoteliální buňky kapilár. Časem většina reaktivních mikroglií a prekursorů oligodendrocytů zmizí, což zanechává v místě poranění hlavně reaktivní astrocyty, meningeální buňky a endoteliální buňky cév, které je vyplňují. Práce Daviese a Silvera ukázaly, že gliální jizva zesiluje inhibici regenerace v porovnání s normální tkání CNS (Davies *et al.* 1997, 1999).

#### 1.1.3. Reparační mechanismy po míšním poranění

##### 1.1.3.1. Kolaterální sprouting (pučení)

Kolaterální sprouting je běžnou reakcí CNS na jeho poranění. Poprvé byl popsán v míše (Liu and Chambers 1958) a krátce poté i v mozku (Raisman 1969). Možnými impulsy ke spuštění sproutingu v dospělém mozku je jakékoliv poranění nebo onemocnění, které způsobuje deafferentaci určité části mozku, jako například neurodegenerativní onemocnění či epilepsie (Moore and Zigmond 1994; Chevassus-Au-Louis *et al.*, 1997). Z reziduálních nervových vláken tak vyrůstají nové axonální kolaterály. Kolaterální sprouting nezajistí obnovení původních anatomických spojení, ale částečnou reinervaci deafferentovaných částí a vzniku mnoha nových spojů zajišťující mnoho významných funkčních změn v uvedené části CNS. Nadměrný sprouting může mít ale jak pozitivní (částečná či úplná restituce funkce), tak i negativní vliv (spasticita, nadměrná bolest).

#### 1.1.3.2. Proliferace endymálních buněk po míšním poranění

Samotné endymální buňky patří mezi neurální kmenové buňky a reagují na míšní poranění. Práce na obojživelnících ukázaly, že během metamorfózy je oblast spinální transekčního poranění reorganizována právě proliferujícími endymálními buňkami (Beattie *et al.*, 1990). Byla také popsána výrazná regenerace descendentních vláken přes místo poranění. Podobné výsledky byly dosaženy i u savců v časně fázi jejich ontogenetického vývoje (Iwashita *et al.* 1994; Wang *et al.* 1996). To může být způsobeno přítomností progenitorových či kmenových buněk, které jsou aktivovány a zrekonstruuji míšní poranění. Tyto buňky mohou poskytnout místo vstupu jak pro axony CNS, tak i pro Schwannovy buňky nebo periferní axony.

#### 1.1.3.3. Specifika rozhraní periferního a centrálního nervového systému

Rozhraní periferního a centrálního nervového systému je rozhraní mezi míchou a předním a zadním míšním kořenem. Ranvierův zářez na rozhraní mezi míchou a míšním kořenem má na jedné straně schwannocyt a na druhé straně oligodendrocyt. Jestliže dojde k poškození motorického axonu v míše, axon regeneruje směrem z centrálního nervového systému přes vstupní zónu předního rohu míšního

do periferního nervu, což značí, že tyto axony mohou překročit z astrocytů směrem ke Schwannovým buňkám (Carlstedt *et al.* 1989). Při poranění dorzálního rohu míšního budou vlákna kořene regenerovat směrem k míše. Jakmile však narazí na hranici schwannocyty-glie v oblasti vstupní zóny, další regenerace je zablokována (Carlstedt 1997; Chong *et al.* 1996). Podobná situace se vyskytuje u experimentálního poranění míchy při implantaci periferních nervů či Schwannových buněk u míšního poranění. Mnoho axonů CNS vrůstá do implantátů, avšak při růstu zpět do prostředí CNS je jejich růst blokován, neboť nejsou schopny růst přes hranici – Schwannovy buňky-astrocyty (David and Aguayo 1981; Xu *et al.* 1995*a,b*).

## 1.2. Klinické projevy poranění míchy

Rozsah neurologického deficitu pod úrovní poranění míchy se hodnotí dle Frankelovy škály či škály ASIA (American Spinal Cord Association grading system for severity of neurologic deficit after acute SCI) – viz. tabulky 1-3. Zatímco před více než 40 lety byl kompletní deficit (ASIA A) pod úrovní míšního poranění zhruba u 2/3 pacientů, tak v současnosti je to 45%. Důvodem tohoto zlepšení je kvalitnější péče v akutním období po traumatu, mezi kterou řadíme akutní imobilizaci (krční límce, vakuová lůžka), léčbu systémové hypotenze, zlepšení ošetrovatelských praktik, apod. Velmi důležitým faktorem jsou lepší bezpečnostní opatření např. u automobilů (bezpečnostní pásy, airbagy, pevnější konstrukce, apod.)

Snížení motorických funkcí označujeme termínem paréza, jejich vyhasnutí jako plegie, souhrnně pak českým termínem obrna. Poškození bílé a šedé hmoty míšní vyústí ve spastickou obrnu. Ta se projeví hypertonií svalstva při ztrátě inhibičních vlivů vyšších center. Poškození předních míšních kořenů v obrnu chabou (přerušeni nervového vlákna). Snížení senzitivních funkcí označujeme jako hypestézie, jejich vyhasnutí termínem anestézie. K nim mohou být přidruženy i

pozitivní senzitivní symptomy, jako jsou bolesti, brnění (parestézie), dysestezie, hyperestézie, hyperpatie a alodynies. Z poruch autonomních funkcí je třeba zmínit poruchu vyprazdňování močového měchýře a močovou retenci (detruzor-sfinkterová dysynergie – snížení tonusu detruzoru a současně zvýšený tonus sfinkteru močového měchýře), poruchu udržení moči (hyperreflexie měchýře), paralytický ileus, anální inkontinenci, erektilní dysfunkci, ortostatickou hypotenzi a autonomní dysregulaci (Sekhon a Fehlings 2001).

**Tabulka 1. Frankelova škála**

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

**Tabulka 2. Hodnocení poranění míchy dle American Spinal Injury Association**

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

D	Inkompletní léze míšni. Zachovaná motorická funkce pod místem poranění, více než polovina klíčových svalů síla 3 a výše.
E	Normální motorické a senzitivní funkce pod místem poranění.

Tabulka 3. ASIA protokol

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

**ASIA** AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION      **ISCOS**      **STANDARD NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY**

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

	R	L	
C5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Elbow flexors
C6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Wrist extensors
C7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Elbow extensors
C8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Finger flexors (distal phalans of middle finger)
T1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Finger abductors (little finger)
UPPER LIMB TOTAL (MAXIMUM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	= <input type="checkbox"/> (50)

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

	R	L	
L2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Hip flexors
L3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Knee extensors
L4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ankle dorsiflexors
L5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Long toe extensors
S1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ankle plantar flexors
LOWER LIMB TOTAL (MAXIMUM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	= <input type="checkbox"/> (50)

Voluntary anal contraction (Yes/No)

**SENSORY**  
KEY SENSORY POINTS

	LIGHT TOUCH		PIN PRICK	
	R	L	R	L
C2				
C3				
C4				
C5				
C6				
C7				
C8				
T1				
T2				
T3				
T4				
T5				
T6				
T7				
T8				
T9				
T10				
T11				
T12				
L1				
L2				
L3				
L4				
L5				
S1				
S2				
S3				
S4-5				
TOTALS (MAXIMUM)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

Any anal sensation (Yes/No)

PIN PRICK SCORE (max: 112)

LIGHT TOUCH SCORE (max: 112)

• Key Sensory Points

NEUROLOGICAL LEVEL: The most caudal segment with normal function. SENSORY:  R  L. MOTOR:  R  L.

COMPLETE OR INCOMPLETE?  Incomplete = Any sensory or motor function in S4-S5. ASIA IMPAIRMENT SCALE:

ZONE OF PARTIAL PRESERVATION: Caudal extent of partially preserved segments. SENSORY:  R  L. MOTOR:  R  L.

This form may be copied freely but should not be altered without permission from the American Spinal Injury Association. rev 03/06

### 1.2.1. Typy míšního poranění

#### 1.2.1.1. Kompletní léze míšni

##### Míšni šok a kompletní transverzální léze míšni

Termín míšni šok se poprvé objevil před více než 150 lety. Cílem bylo rozlišit arteriální hypotenzi na podkladě krvácení od arteriální hypotenze dané ztrátou tonu

sympatiku při poranění míchy (Hall 1850). Tento pojem zahrnuje úplné přerušení míchy ve fyziologickém smyslu, což má za následek dočasnou ztrátu či snížení všech či téměř všech míšních reflexů pod úrovní poranění. Většinou k němu dochází u rychle vzniklých poškození míchy, avšak byly popsány i případy rozvoje poškození míchy v průběhu několika hodin. Reflexy v úrovni sakrální míchy (např. bulbokavernózní) mohou být přitom zachovány. Na horní hranici anestetické zóny se někdy vyskytuje úzká zóna hyperestézie. Ohraničení senzitivního deficitu odpovídá nejkraniálnějšimu postiženému míšnímu segmentu. Stupeň postižení autonomních reflexů během míšního šoku je různý, neboť tyto reflexy jsou vedeny přes vegetativní ganglia míšní. Autonomní dysfunkce se projeví chabou paralýzou močového měchýře, paralytickým ileem, erektilní dysfunkcí, poruchou vazomotoriky (edémy), termoregulace (akrohypotermie), pilomotoriky a sudomotoriky. Míšní šok nastupuje během několika minut a může trvat 4-6 týdnů. Konec fáze míšního šoku u poranění míchy souvisí s návratem míšních reflexů, kdy lze opět vyvolat reflexy šlachově-okosticové. Restaurace reflexní činnosti probíhá v kaudo-kraniálním směru. Reflexní aktivita se vrací a rozvíjí se spastická obrna se zvýšením šlachových a okosticových reflexů, elasticitou, spastickými pyramidovými jevy, rozvíjí se spastický reflexní měchýř. Míšní šok je nutno odlišit od pojmu míšní komoce. Je to poměrně málo probádaný stav. Je definován jako částečná porucha senzitivních či motorických funkcí (nebo obou), která se rychle a úplně upraví během 24-72 hodin. Nikdy se nevyskytuje v souvislosti s trvalým poraněním míchy (Marburg 1936). Kompletní transverzální míšní léze znamená úplnou ztrátu motorických i senzitivních funkcí od místa poranění níže.

#### 1.2.1.2. Inkompletní míšní syndromy

##### *Syndrom centrální míšní šedi (syringomyelický syndrom)*

Nejčastější akutní příčinou je trauma, při pozvolném rozvoji může být příčinou intrameduální tumor či rozvoj syringomyelické dutiny. Ty vedou k postižení spinotalamického traktu ve ventrální komisuře, což se projevuje

poruchou termické a algické citlivosti na obou stranách v postižených segmentech, zatímco taktilní cití je zachováno (syringomyelická disociace) Často se zachová termická a algická citlivost v sakrálních segmentech (sakrální úspora) v důsledku relativního ušetření laterálních částí spinotalamického traktu. Zároveň bývá segmentální chabá paréze s atrofiemi a fascikulacemi z postižení předních rohů míšních.

#### *Syndrom arteria spinalis anterior*

Vzniká při postižení (infarktu) v distribuci arteria spinalis anterior. Postižena je hlavně ventrální části míchy, která zahrnuje v rámci bílé hmoty kortikospinální a spinotalamický trakt a postižení předních rohů míšních. Z toho plyne i klinický obraz, který je charakterizován centrální parézou (tr. corticospinalis) a ztrátou termické a algické citlivosti (tr. spinothalamicus) kaudálně od místa postižení a chabou parézou v postižených segmentech (přední rohy míšní). Taktilní citlivost a propiocepce bývají ušetřeny. Klinicky je tento syndrom podobný syndromu centrální šedi. Spolehlivě je častěji nelze odlišit. Přitom pro syndrom centrální šedi svědčí úspora cití a relativní absence známek postižení kortikospinálního traktu.

#### *Syndrom zadních provazců a tabický syndrom*

Je charakterizován ztrátou homolaterální propiocepce a vibračního cití, zatímco algické a termické cití je relativně neporušeno. Porušena je senzitivní diskriminace, běžné jsou parestázie charakteru brnění a píchání. Dále se manifestuje syndrom senzitivní (míšní) ataxie s pozitivním Rombergovým příznakem. Chůze je ataktická. Pozitivní jsou zkoušky ataxie. Dále při zkouškách na výdrž (např. předpažení) se objevují neuvědomělé pohyby homolaterální končetiny („plave“ v prostoru – pseudoatetóza). Maximálně jsou tyto pohyby vyjádřeny akrálně, na prstech. Účelné používání ruky je tak porušeno, což se v anglosaské literatuře popisuje jako „clumsy“ či „useless hand“.



Tabický syndrom se typicky projevuje u neurosyfilis, dále u diabetes mellitus či u dalších chorob. Postiženy bývají silná propioceptivní a kožní vlákna lumbosakrálních a někdy i cervikálních kořenů. Typickými příznaky jsou lancinující bolesti a parestézie. V objektivním nálezu nacházíme areflexii, hypotonii bez svalové slabosti a abnormality chůze (ataktická chůze). Z poruch citlivosti může být přítomna jen pallypestézie a polohocit na dolních končetinách. Bývá přítomen hypotonický močový měchýř s retencí.

#### *Syndrom zadních a postranních provazců*

Tento typ postižení vzniká typicky u Friedrichovy ataxie či u avitaminózy B12 (v tomto případě v kombinaci s polyneuropatií). Klinicky se projevuje hlavně na dolních končetinách obrazem spastické parezy na podkladě léze laterálního kortikospinálního traktu a ataxii při poškození zadních provazců a spinocerebelárních drah. Výsledkem je spasticko-ataktická chůze.

#### *Hemisyndrom míšní (Brown-Sequardův syndrom)*

Jedná se o úplné poranění pravé či levé poloviny míchy. Následkem je ipsilaterální hemiplegie a ipsilaterální porucha polohocitu a pohybcitu. Na kontralaterální končetině či končetinách je postižení bolestivého a termického cití. Taktilní cití není postiženo, neboť vlákna z jedné strany těla jsou distribuována dráhami v obou polovinách míchy. Kompletní syndrom hemisekce míšní je vzácný, častější je inkompletní, neúplně vyjádřený syndrom. Nejčastější příčinou tohoto syndromu jsou traumata, míšní tumory či roztroušená skleróza.

### **1.3. Experimentální modely poranění míchy u laboratorního potkana**

K posouzení vlivu experimentální léčby u jakéhokoliv typu onemocnění je nutný dobrý zvířecí model a standardní laboratorní podmínky, které umožní jednoduché a dobře reprodukovatelné studium probíhajících změn (ať již patofyziologických či terapeutických). U poranění míchy je nejčastěji využívaným

laboratorním zvířetem potkan. Výhodou je jeho relativně malá náročnost na chov, dobrá manipulovatelnost a nízká náchylnost k infekcím.

Právě u laboratorního potkana bylo vytvořeno několik modelů poranění míchy. Lze je rozdělit na ostré (sekční) a neostré (kontúzní, kompresní) modely. Mezi ostré modely patří:

*Hemisekce* - přetětí poloviny míchy a většinou také vytětí určitého množství tkáně, *de facto* hemiexcize, nicméně tento pojem není v literatuře používán. Často se také používají modifikace hemisekce, tedy parciální hemisekce, jako například dorzální hemisekce. Při hemisekci je přetnuta polovina míšních drah a ipsilaterální poloviny šedé hmoty míšní patřičného segmentu. Klinicky se takové poranění projeví poruchou motoriky ipsilaterální končetiny (končetin při poranění krčních segmentů míšních, laterální provazce míšní), poruchou polohocitu a pohybcitu (zadní provazce míšní) na ipsilaterální straně a poruchou cití bolesti a teploty (boční provazce míšní, tr. spinothalamicus) kontralaterální končetiny. Klinicky tento stav odpovídá Brown-Séquardově syndromu (hemisyndrom míšní). Výhodou hemisekce míšní jako experimentálního modelu je v tom, že funkční deficit u experimentálního zvířete je relativně malý, nevzniká neurogení močový měchýř s poruchou močení a nutností manuální exprese moči.

*Transekce* – přetětí celé míchy (a opět často vytětí určitého množství tkáně). Při transekcii jsou okamžitě přefaty míšní provazce a šedá hmota míšní. Výsledkem je okamžitý vznik trvalé paraplegie (event. kvadruplegie při transekcii krční míchy) s anestézií od přefatého segmentu níže, poruchou hlubokého cití, poruchou močení se vznikem neurogeního močového měchýře. Výhodou transekce míchy je možnost okamžité implantace přemosťujícího materiálu, možnost jednoznačného průkazu regenerace míšních drah pomocí anterográdních či retrográdních barvicích technik a přesvědčivé hodnocení funkčního efektu experimentální terapie pomocí behaviorálních testů, hlavně složky motorické, neboť bez terapie zůstávají laboratorní zvířata vždy paraplegická. Nevýhodou je nutnost intenzivní péče o experimentální zvíře hlavně během prvních 2 týdnů po vzniku poranění. Po dobu

přibližně prvních dvou týdnů je nutné provádět manuální expresi moči z močového měchýře. Další nevýhodou je nebezpečí vzniku hyperalgie s autofagií či vznik infekce močových cest.

Ostré modely jsou vhodné pro sledování regenerace elementů míšní tkáně, převážně axonů, sledování jednotlivých míšních drah pomocí specifického retro- a anterográdního barvení. Často jsou tyto modely využívány k implantacím různých materiálů (Bakshi *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2006). Jejich nevýhodou je nutnost nejenom otevření páteřního kanálu, ale i durálního vaku. Další nevýhodou je také to, že ostré modely odrážejí pouze menšinu reálných klinických situací, neboť většina klinických poranění míchy je kombinací komprese a kontúze.

Výhodou neostrých modelů je, že lépe odrážejí většinu klinických míšních traumat. Jsou vhodné pro sledování vlivu patofyziologie poranění, farmakologické studie různých preparátů a faktorů (Kwon *et al.*, 2002). Dobře umožňují také sledovat funkční efekt experimentální léčby (behaviorální testování). Nevýhodou je v porovnání s ostrými modely horší možnost sledování regenerace míšních drah či jednotlivých nervových vláken. Nejstarším modelem je „weight drop model“ (Allen 1911), jehož principem je upuštění závaží o definované hmotnosti z definované výšky. Jistou modifikací tohoto nejstaršího modelu jsou nové, a technicky sofistikovanější, modely pomocí NYU (New York University) impaktoru (Gruner 1992) či OSU (Ohio State University) impaktoru (Bresnahan *et al.*, 1987). Mezi další podskupinu neostrých modelů patří různé komprese míchy, například parafínem (Ayer 1919), prstem (McVeigh, 1923), aneuryzmální svorkou (Rivlin a Tator, 1978), nebo balónková kompresní léze (Tarlov *et al.*, 1953, Khan a Griebel, 1983, Vanický *et al.*, 2001, Urdzíková *et al.*, 2006).

*Balónková kompresní léze* má mnoho výhod. Dobře napodobuje reálnou klinickou situaci při poranění míchy, například při útlaku míchy při kompresivní fraktuře obratlového těla, nebo při traumatickém výhřezu meziobratlové ploténky. Další výhodou je malá invazivita. Není nutné provádět laminektomii nad místem poranění, což umožňuje následně provést operaci v místě poranění při minimálním

jizvení. Během prvních dnů až cca 2 týdnů dominuje centru poranění nekrosa, krvácení a edém tkáně. V průběhu dalších týdnů se rozvíjí posttraumatická pseudocysta a atrofie míchy. V experimentech, kdy implantujeme přemosťující materiál, je proto vhodné jej aplikovat až s odstupem, nikoliv ihned po indukci míšního traumatu. Tímto modelem lze tedy dobře napodobit i možnou budoucí klinickou situaci při využití takových biomateriálů u pacientů s poraněním míchy.

#### **1.4. Experimentální terapie poranění míchy pomocí biomateriálů**

##### **1.4.1. Biomateriály - obecně**

Míšní léze, tvořená kombinací gliální a mezenchymální jizvy a posttraumatických pseudocyst, je překážkou pro regeneraci axonů. Jednou z metod experimentální léčby míšního poranění je vytvoření přemostění přes místo léze, Mnoho přírodních a umělých biopolymerů se užívá v přemostění experimentálního poranění míchy. Ideální materiál by měl mít několik vlastností:

1. Být imunologicky inertní. Neměl by indukovat reakci proti cizímu tělesu.
2. Fyzikální vlastnosti by se měly co nejvíce blížit extracelulárnímu prostředí centrálního nervového systému, umožnit difúzi neurotrofních faktorů
3. Biomateriál by měl poskytovat podpůrnou strukturu k umožnění regenerace míšní tkáně - axony, gliální buňky, cévy, apod.
4. Biomateriál by měl být dostatečně měkký, aby při jeho aplikaci nezpůsobil poranění okolní míšní tkáně a také aby tento implantát dobře k míšní tkáni adheroval a zajistil ideální vyplnění posttraumatické kavity.

Mezi přírodní materiály patří například kolagen nebo alginátový hydrogel. Implantace mrazem sušeného alginátu do posttransekční dutiny novorozených či mladých laboratorních potkanů stimulovalo nejen vrůstání velkého počtu nemyelinizovaných a myelinizovaných vláken do hydrogelu (Kataoka *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 1999), ale tvořila se funkční spojení přes kavitu spolu s formací synaptických spojení s neurony distálně od kavity (Suzuki *et al.*, 2002).

Syntetické biodegradabilní implantáty zahrnují například polyetylenglykol, fibrinové lepidlo nebo komerčně vyráběný Matrigel (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA) či hydrogely. Po implantaci bioimplantátu PLGA osázeném neurálními kmenovými buňkami, bylo nalezeno mnoho regenerujících axonů v implantátu a v míšní tkáni pod místem traumatu. Jak buněčné tak nebuněčné implantáty zmenšily kavitu a zlepšily funkční výsledek, což přetrvalo až 1 rok po poranění (Lavik *et al.* 2002). Po implantaci samotného Matrigelu poraněné axony neregenerovaly. Na druhou stranu Matrigel použitý jako nosič exogenního vaskulárního endoteliálního růstového faktoru nebo adenoviru kódujícího vaskulární endoteliální růstový faktor stimuluje prodloužení axonů a redukuje odumírání poraněných kortikospinálních vláken (Facchiano *et al.*, 2002).

Výhoda užívání umělých biomateriálů je v tom, že můžeme kontrolovat jejich vlastnosti. Důležitá je velikost pórů, které podporují regeneraci axonů. Několik skupin se pokusilo vytvořit biomateriály s orientovanými póry, aby tak dosáhli směrově indukované regenerace axonů (Dalton *et al.* 2002, Prang *et al.* 2006). Prang ukázal, že po implantaci alginátových hydrogelů s orientovanými póry do akutního poranění míchy, tyto skutečně směřovaly regeneraci axonů. Dále přidáním dospělých neurálních progenitorových buněk do pórů podpořilo regeneraci axonů v kontaktu s buňkami. Dalším důležitým faktorem je mechanická stabilita bioimplantátu. Marchand počátkem 90. let na kolagenovém implantátu, který byl stabilní 2-3 měsíce ukázal, že nezajistí stabilní axonální regeneraci, zatímco prodloužením stability kolagenového implantátu pomocí zesíťování zlepšilo mechanické vlastnosti a zajistilo regeneraci axonů po dobu více než 6 měsíců (Marchand *et al.*, 1993). Časový faktor je obzvláště důležitý při dnešních snahách o syntézu biodegradabilních implantátů.

Je také možné měnit vlastnosti povrchu bioimplantátu, abychom zlepšili jeho biologické vlastnosti. Modifikací agarového gelu extracelulárním proteinem lamininem či nervovým růstovým faktorem (NGF) statisticky významně zvýšilo prodloužení vláken ganglií zadních rohů míšních (Yu *et al.* 1999).

#### 1.4.2. Hydrogely

Hydrogely jsou syntetické polymery. Mají vysoce porézní strukturu, kdy velikost pórů se pohybuje od 10-100 (Přádný *et al.* 2003, 2005; Lesný *et al.* 2002, 2006, Woerly *et al.* 1992, 1999; Bakshi *et al.* 2004, Prang *et al.* 2006). Mají vysoký obsah vody (70-90%).

Historie užití hydrogelů pro medicínské účely je poměrně dlouhá (Wichterle and Lim 1960) a jejich význam postupně roste. U experimentálního poranění míchy se užívají hydrogely jako implantáty sloužící k přemostění posttraumatické kavity s cílem poskytnout nervové tkáni "lešení", které by podpořilo regeneraci nervových vláken přes centrum poranění a umožnilo tak vytvořit tak nová nervová spojení mezi kraniálním a kaudálním koncem míšním.

Pokroky v chemii syntetických polymerů umožnily, že hydrogely jsou jedny z nejslibnějších biomateriálů v současném výzkumu míšního poranění. Některé jejich vlastnosti jsou velmi výhodné k použití právě v oblasti výzkumu regenerace míšní tkáně:

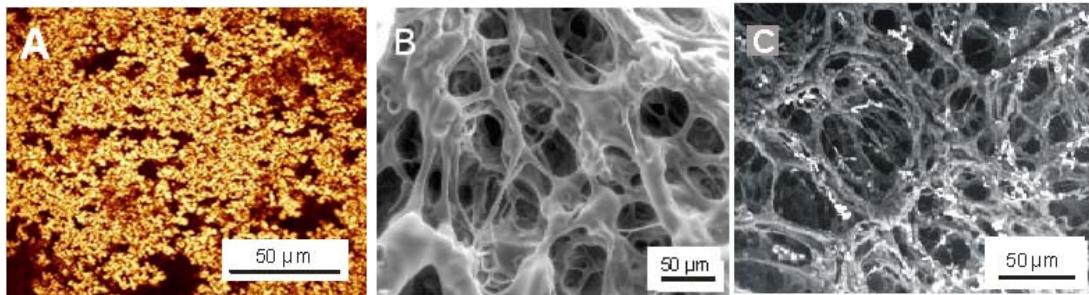
- 1) vzhledem k tomu, že se jedná o syntetické biomateriály, mohou být vyráběny ve velkém množství a můžeme je mít k dispozici předem
- 2) není nutný odběr tkáně z pacientova těla či těla jiného dárce, čímž minimalizujeme další invaze
- 3) jejich chemické a fyzikální vlastnosti můžeme měnit s cílem zlepšit jejich adaptaci v míšní tkáni a zlepšit její regeneraci
- 4) difúzní parametry u hydrogelů po implantaci jsou obdobné těm ve vyvíjející se nervové tkáni (Woerly *et al.*, 1999)
- 5) jejich vlastnosti umožňující rekonstrukci míšní tkáně mohou být ještě zdokonaleny kombinací s jinými terapeutickými modalitami, jako např. v kombinaci s kmenovými buňkami, neurotrofiny či signálními sekvencemi (Loh *et al.*, 2001, Teng *et al.*, 2002, Woerly *et al.*, 2001)

#### 1.4.2.1. Hydrogely založené na hydroxyethylmetakrylátu (HEMA) a hydroxypropylmetakrylamidu (HPMA)

Poly(2-hydroxyethylmetakrylát) (pHEMA) and polyN-(2-hydroxypropyl)-metakrylát jsou syntetické polymery (obr. 3). Naše předchozí studie ukázaly, že jejich viskoelastické vlastnosti se podobají nervové tkáni (Woerly 1999, Lesný *et al.*, 2002). Hydrogely na bázi HEMA jsou ve světě používány několika skupinami zabývajícími se výzkumem regenerace poraněné míchy (Přádný *et al.* 2003, 2005; Lesný *et al.* 2002, 2006; Dalton *et al.*, 2002, Bakshi *et al.*, 2004). Změnou povrchového náboje hydrogelů za použití kopolymerů a polyelektronových komplexů lze dále měnit jejich mechanické vlastnosti nebo obsah vody v rovnovážně-zbobjnalém stavu (Přádný *et al.*, 2005). Zvýšené vrůstání vazivové tkáně společně s nervovými elementy (NF160+ neurofilamenta a Schwannovy buňky) bylo pozorováno u hydrogelů HEMA s pozitivním nábojem. V *in vitro* experimentech pak HEMA+ hydrogely podporovaly růst kmenových buněk kostní dřeně na 3D strukturách hydrogelů v porovnání s HEMA hydrogely s negativním povrchovým nábojem (Lesný *et al.* 2006).

Další metodou ke zlepšení axonální regenerace je zlepšení adhezivních vlastností hydrogelu. Woerly *et al.* studoval hydrogel HPMA s navázanou peptidovou sekvencí (RGD), která zlepšuje adhezivitu buněk. Po implantaci hydrogelu HPMA-RGD se zlepšila adheze k okolní nervové tkáni a propagaci vrůstání a šíření astrocytů a axonů uvnitř implantátu (Woerly *et al.*, 1995). Adhezivní vlastnosti hydrogelů mohou být zlepšeny použitím různých funkčních skupin s kladným či záporným nábojem. Ganglia zadních rohů míšních v kultuře na agarózovém hydrogelu s kovaletně navázaným chitosanem (polycationic polysaccharide) významně prodloužila délku regenerujících axonů (Dillon *et al.*, 1998). Kombinace implantace biomateriálu s neurotrofickými faktory nebo kmenovými buňkami může také zlepšit výsledky regenerace nervové tkáně. Loh *et al.* zjistili, že přidáním BDNF (brain derived neurotrophic factor) či CNTF (ciliary neurotrophic factor) se významně prodlužuje vzdálenost vrůstání axonů do implantátu v porovnání s implantací prostého hydrogelu (Yu *et al.* 1999, Loh *et al.*

2001). Tsai *et al.* použili implantaci pHEMA hydrogelu spolu s různými kombinacemi biomateriálů a růstových faktorů u modelu transekce míchy. V této studii ukázali, že kombinace různých biomateriálů s růstovými faktory může pomoci selektivní regeneraci kmenových drah (Tsai *et al.* 2006). V našich studiích jsme použili oba typy hydrogelových implantátů (Lesný *et al.* 2002, Woerly *et al.* 1999, Přádný *et al.* 2006, Hejčl *et al.* 2008).



Obr. 3: Typy hydrogelů

A. HPMA-RGD hydrogel B. HEMA hydrogel C. Biodegradabilní hydrogel, částečně degradovaný po 2 dnech.

#### 1.4.2.2. Hydrogely s pozitivními a negativními náboji

Jak již bylo uvedeno, jednou z výhod užití syntetických biomateriálů je možnost ovlivnit jejich vlastnosti, včetně např. povrchového náboje. Vliv povrchového náboje na růst buněk byl studován od roku 1975, kdy cílem bylo dosáhnout lepší kultivační podmínky ve zkumavkách. Dnes je dobře známo, že mnoho typů buněk, včetně buněk neuroblastomu (Soekarno *et al.* 1993), lépe adherují k pozitivně nabitým povrchům. Byla pozorována zlepšená adherence a snížená migrace mesenchymálních buněk kostní dřeně (MSCs) na povrchu potaženém pozitivně nabitým indium oxidem cínu (ITO; Qiu *et al.* 1998). Na našem pracovišti jsme provedli studii růstu mesenchymálních buněk kostní dřeně (MSCs) *in vitro* na makroporézních gelech na bázi HEMA. Byly studovány 4 typy hydrogelu HEMA. Lišily se různým povrchovým nábojem. Kopolymer HEMA s natrium metakrylátem (MA-) měl negativní povrchový náboj, kopolymer HEMA s [2-



(metakryloyloxy)ethyl] trimethylamoniem (MOETA+) měl pozitivní elektrický náboj a terpolymer HEMA, MA<sup>-</sup> a MOETA<sup>+</sup> měl jak pozitivní, tak i negativní elektrický náboj. Čtvrtým typem byly polyeletronové komplexy (PEC), které byly “stíněny” protináboji, a tak byl jejich celkový náboj neutrální. Hydrogely měly obdobnou porozitu, což bylo nepřímo prokázáno iontoforetickou metodou (Lesný *et al.* 2006).

#### 1.5.2.3. Biodegradabilní hydrogely

Biodegradabilní či vstřebatelné hydrogely reprezentují významnou skupinu biomateriálů. Podstata jejich užití u poranění CNS je v tom, že mohou poskytovat podpůrnou strukturu na prorůstání elementů nervové tkáně a později v situaci kdy bylo vytvořeno přemostění dostatečně adherující k míšní tkáni, tyto materiály se postupně vstřebají, a tak se eliminuje hmota cizího materiálu z míchy. Tyto materiály však mají i svá omezení. Není například známa ideální doba resorbce. Dalším problémem je nebezpečí vzniku neurotoxických rozpadových produktů (Novikov *et al.*, 2002; Novikova *et al.*, 2003).

#### 1.4.3. Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou charakterizovány schopností sebeobnovy a schopností diferenciací do jakékoliv buňky v organismu. V užším smyslu tuto definici splňují embryonální kmenové buňky (ESC). Existují však i somatické kmenové buňky, které jsou součástí již určité tkáně při narození. Tyto se nazývají dospělé (adultní) kmenové buňky. Tyto buňky se nacházejí také v dětském věku a v pupečnickové krvi. Kmenové buňky lze tedy rozdělit na embryonální, fetální a dospělé (adultní) kmenové buňky.

##### 1.4.3.1. Embryonální kmenové buňky (ESC)

ESC jsou pluripotentní buňky izolované z vnitřní vrstvy blastocysty (Gerlach *et al.*, 2002), které mohou diferencovat v organismu (Nagy *et al.*, 1993). ESC mají

schopnost se měnit v neurony a gliové buňky, které v některých případech mohou exprimovat markery typické pro některé třídy neuronů (Nunes *et al.* 2003).

U SCI mají embryonální kmenové buňky velký terapeutický potenciál. ESC mohou nahradit neurony a buňky glie (Liu *et al.*, 2000). Neurony vzniklé z ESC po injekční aplikaci do poraněné míchy v tkáni přežívají a jsou schopny se do ní integrovat (Deshpande *et al.*, 2006). Také myši ESC implantované do SCI u potkana vedly k funkčnímu zlepšení (McDonald *et al.*, 1999).

Existuje riziko rejekce ESC po transplantaci do tkáně dospělého jedince, proto je nutná dlouhodobá imunosupresivní léčba (Nussbaum *et al.*, 2007).

Mezi omezení této léčby patří: interindividuální rozdíly v terapeutické účinnosti v závislosti na integraci implantované tkáni, nežádoucí účinky – dyskinéza, špatná možnost kontroly diferenciací buněk s rizikem růstu tumorů (Nussbaum *et al.*, 2007; Hagell *et al.*, 1999). Jelikož ESC jsou pluripotentní buňky, jejich užití je spojeno s rizikem vzniku tumorů (Hagell *et al.*, 1999). Možným způsobem eliminace tohoto rizika je přísná charakterizace implantovaných ESC, neboť jak se ukazuje, v určité fázi pasážování je nízká tumorigenní aktivita (Semintore *et al.*, *v tisku*). Další možností je využití neurálních fetálních prekurzorů.

#### 1.4.3.2. Indukované pluripotentní kmenové buňky

Užití embryonálních kmenových buněk je zatíženo etickými a logistickými problémy. Proto je cílem regenerativní medicíny vyvinout takové buňky, které by byly pluripotentní, aniž by bylo nutno pracovat s lidskými embryi. Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) patří mezi nové metody regenerativní medicíny. V roce 2006 Takahashi a Yamanaka dokázali přeměnit dospělé myši fibroblasty pomocí ektopické exprese selektovaných skupin transkripčních faktorů do pluripotentních buněk (Takahashi a Yamanaka 2006). Následné studie ukázaly, že tyto buňky jsou skutečně velmi podobné embryonálním kmenovým buňkám (Maherali *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007). U lidských somatických buněk se taková přeměna na iPSC podařila o rok později (Takahashi *et al.*, 2007).

Geneze iPSC se sestává z několika kroků: 1. výběr faktorů k přeprogramování buněk 2. metody přenosu těchto faktorů 3. výběr cílových buněk 4. parametry exprese těchto faktorů, jako je časování a jejich množství 5. podmínky buněčných kultur 6. identifikace a typizace přeprogramovaných buněk (Maherali a Hochedlinger 2008).

První práce s přeprogramováním myších fibroblastů pracovala s 24 geny, které byly považovány za důležité pro udržení buňky v pluripotentním stavu. Tento počet genů byl následně redukován tak, až dostačovaly k přeprogramování buněk pouze tyto čtyři faktory: Oct4, Sox2, c-Myc a Klf4. Postupnou optimalizací se redukovaly další faktory. Dle posledních studií se klíčovými faktory jeví být Sox 2 a Oct4 (Verfaillie 2009). Významným krokem je eliminace faktoru c-Myc, který často spouštěl v transplantovaných myších nádorové bujení

Původní práce používaly retrovirové či letivirové vektory, což způsobuje riziko vzniku nádorů při spontánní reaktivaci virálních transgenů (Okita *et al.*, 2007). Nejnovější studie však ukazují, že je možné vytvořit iPSC pomocí inzerce plazmidů, adenovirových vektorů, transpozónů, nebo rekombinantních proteinů, zvláště poslední jmenované dále přibližují tuto technologii do klinického užití (Yu *et al.*, 2009; Woltjen *et al.*, 2009; Okita *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2009).

#### 1.4.3.3. Fetální kmenové buňky

Užití fetální tkáně dosáhla zatím největšího klinického rozšíření v léčbě pacientů s Parkinsonovou nemocí. Fetální tkáň obsahující dopaminergní ventrální mesencefalické neurony byly implantovány u pacientů s Parkinsonovou nemocí s rozličnými klinickými výsledky (Hagell a Brundin 2001; Lindvall a Hagell 2001).

V roce 1993 Bregman *et al.* implantovali fetální míšní tkáň u potkanů se SCI. Transplantáty v míšní tkáni přežily. Vytvořila se funkční synapse mezi implantátem a míšní tkání, což vedlo k funkčnímu zlepšení (Bregman *et al.*, 1993). Fetální serotoninergní neurony byly injikovány do modelu chronického míšního poranění, transektce míšni. Tyto buňky projikovaly do šedé hmoty míšni běžně inervované

serotoninergními axony. U modelu kontúze míšní implantovaná tkáň přežila v modelu míšní tkáně více než 2 roky (Reier et al., 1992). Zásadním limitem této léčby je však nutnost velkého množství fetální tkáně, což je spojeno s etickými problémy.

Rozvoj v biologii kmenových buněk umožnil užití neurálních prekurzorů. Neurální prekurzory je možné získat jak z mozku, tak i z míchy plodů. Fetální neurální prekurzory z míchy mají přitom nižší proliferační aktivitu, proto se slibnými jeví prekurzory z mozkové tkáně (Watanabe et al., 2004).

Pollock *et al.*, (2006) pomocí genetické modifikace vytvořili klon imortalizovaných kortikálních buněk mozku. Použili fúzní protein obsahující promotorový gen *c-myc* a hormonální receptor, regulovaný syntetickou látkou 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT). V podmínkách *in vitro* je možné dosáhnout jejich rychlého množení. Avšak v případě nežádoucí proliferace lze podáním tamoxifenu jejich růst zastavit. Jsou schopny se diferencovat do neuronů a astrocytů. Jejich implantace v modelu ischemie mozku zlepšila statisticky významně senzitivní a motorické funkce 6-12 týdnů po implantaci. V současné době je připravena stabilní linie těchto buněk za podmínek GMP (*good manufacturing practice*) a první klinická studie s pacienty po iktu začne příští rok ve Velké Británii.

#### 1.4.3.4. Dospělé kmenové buňky

##### 1.4.3.4.1. Kmenové buňky CNS

V mozku a míše dospělého jedince existují oblasti, kde jsou generovány kmenové buňky (neural stem cells – NSCs). V mozku je to dominantně subventrikulární zóna (SVZ) postranních komor a subgranulární zóna gyrus dentatus. Dále se kmenové buňky CNS nacházejí ve stěně 3. a 4. komory a v míše v okolí centrálního kanálu (ependymální buňky, Weiss *et al.*, 1996). Jejich význam zatím není zcela jasný. V hipokampu se předpokládá jejich přínos pro tvorbu paměti (Kempermann 2002).

Zatímco endogenní NSCs jsou schopny generovat prakticky exkluzivně neurony, *in vitro* jsou schopny generovat neurony, astrocyty i oligodendrocyty.

Poškození CNS (mozku i míchy) zvyšuje množství NSCs v subventrikulární zóně i v okolí centrálního kanálu (Friesel a Maciag, 1995). Humánní neurální prekursorové buňky po implantaci do poraněné míchy potkana jsou schopny nadále proliferovat (Emgård et al., 2009). Implantované NSCs u míšního poranění po 2 týdnech od míšní léze generují u 50% buněk oligodendrocyty a myelinizují axonů. V konečném důsledku se zlepšila motorika zadních končetin (Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2006).

#### 1.4.3.4.2. Kmenové buňky kostní dřeně

Kmenové buňky kostní dřeně se užívají v léčbě pacientů s hematologickými onemocněními mnoho let. Biologie kmenových buněk se v posledních dekádě rozvinula a ovlivnila výrazně i oblast výzkumu v neurovědách. V posledních letech se mezenchymové buňky kostní dřeně (MSCs – mesenchymal stem cells) používají u mnoha poruch CNS, včetně poranění míchy (Prockop 1997, Jendelová *et al.* 2004, Syková a Jendelová 2005, Nandoe *et al.* 2006, Syková *et al.* 2006a,b, Syková a Jendelová 2006, Urdzíková *et al.* 2006, Syková and Jendelová 2007a,b). Bylo prokázáno, že transplantované buňky kostní dřeně mají schopnost zvýšit expresi růstových a trofických faktorů při ischemii mozku potkana (Chen *et al.*, 2002). Mezenchymové buňky kostní dřeně mají schopnost migrovat do místa postižení v závislosti na místních indukčních signálech. In vitro jsou schopny se diferencovat do osteoblastů, chondrocytů, adipocytů a myoblastů (Pittenger *et al.*, 1999; Prockop 1997). Po transplantaci do mozku reagují MSCs na vnitřní signály a mohou ochránit částečně poškozené buňky a zrychlit regeneraci pomocí růstových faktorů (Kopen *et al.* 1999, Brazelton *et al.* 2000, Urdzíková *et al.* 2006, Syková a Jendelová, 2007a). V experimentální studii provedené na našem pracovišti jsme porovnávali aplikaci MSCs, frakci čerstvě připravených mononukleárů kostní dřeně a kostní dřeň stimulovanou granulocyty stimulujícím faktorem (G-CSF). Všechny tři léčebné modalities statisticky významně zlepšily motoriku a čítí zadních končetin potkanů v porovnání s aplikací fyziologického roztoku. Morfometrická analýza také prokázala statisticky významné zvýšení objemu zachovalé bílé hmoty (Urdzíková *et al.* 2006).

### *Klinická studie*

Použití kmenových buněk kostní dřeně v buněčné léčbě může mít několik výhod oproti použití jiných zdrojů buněk: je možné je poměrně jednoduše izolovat, mohou se používat při autologních transplantacích a navíc kmenové buňky kostní dřeně se již dlouho používají v léčbě onemocnění hematopoietické tkáně. Ve Fakultní nemocnici Motol v Praze proběhla klinická studie fáze I/II, která zkoumala bezpečnost aplikace, terapeutické okno, způsob aplikace a funkční efekt autologních buněk kostní dřeně bez manipulací u pacientů s transverzální míšní lézí (Syková *et al.*, 2006a). Tato studie ukázala, že implantace autologních buněk u pacientů s poraněním míchy je bezpečná. Dále ukazuje, že implantace buněk v terapeutickém okně 3-4 týdny po poranění může hrát významnou roli v léčbě, což je ve shodě se studiiemi u hlodavců. Ačkoliv bylo pozorováno funkční zlepšení u některých pacientů, je nutné provést studii větší s homogennější skupinou pacientů a tuto porovnat s kontrolní skupinou, nežli bude moci jednoznačně prokázat efekt kmenových buněk.

#### 1.4.4. Schwannovy buňky

Implantace tkáně periferního nervového systému zlepšuje regeneraci v PNS i u míšních traumat (Jones *et al.*, 2001). Tato schopnost je dána hlavně díky Schwannovým buňkám, které vytvářejí permissivní prostředí díky produkci extracelulární matrix, adhezivních molekul, integrinů a neurotrofních faktorů (Bunge 2001; Geller a Fawcett 2002). Schwannovy buňky mají také významnou roli v distálním segmentu u poranění PNS a při tvorbě synapsí (Son *et al.*, 1996). Vysoce čisté kultury Schwannových buněk mohou být získány z nervových autografů, což lze využít při implantaci autologních buněk (Jones *et al.* 2001). Nevýhodou implantace do míšního poranění je, že axony vrůstají do štěpů ze Schwannových buněk, avšak nedokáží přejít zpět do CNS (hranice Schwannovy buňky – astrocyty, Bunge 2001). Stejně tak Schwannovy buňky nedokážou myelinizovat axony mimo

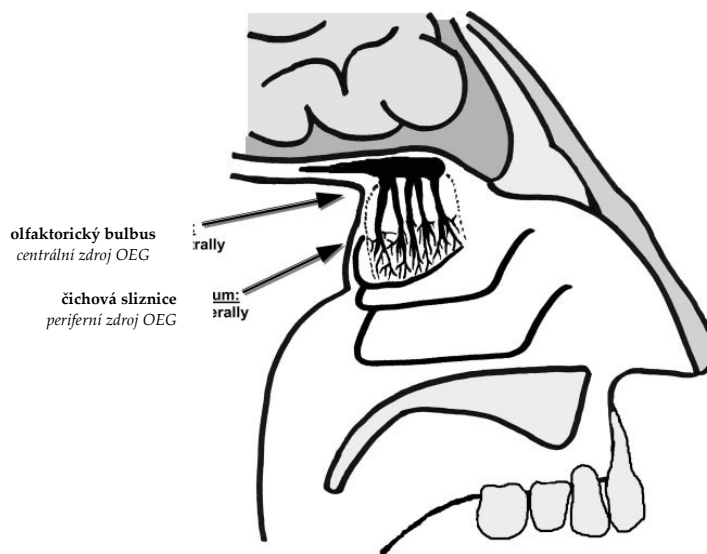
oblast poranění (Xu *et al.*, 1995b). Navíc mohou Schwannovy buňky podpořit tvorbu chondroitin sulfát proteoglykanu (Lakatos *et al.*, 2000) a nejsou schopné podpořit regeneraci v prostředí bohatém na astrocyty (Franklin a Barnett, 1997). Proto i přes některé příznivé výsledky s použitím Schwannových buněk se zdá, že největším přínosem bude jejich kombinace s jinými terapeutickými přístupy (Bunge *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001).

#### 1.4.5. Olfaktorická glie (OEG - olfactory ensheathing glia)

OEG se nacházejí buď v čichovém epitelu, kde pomáhají růstu axonů přes hranici PNS-CNS, nebo centrálně, tedy v olfaktorickém bulbu (Lu a Ashwell, 2002, obr. 4). OEG migrují spolu s rostoucími axony a podporují růst axonů a jejich přežití tím, že podporují neurotrofní faktory a molekuly adheze buněk. OEG poskytují permissivní prostředí pro růst axonů a účinně podporují růst axonů skrze gliální jizvu (Ramon-Cueto *et al.* 1994; Ramon-Cueto *et al.* 1998). Tyto buňky ukázaly pozitivní účinek na regeneraci jak v PNS (Verdu *et al.*, 1999), tak i v CNS (Li *et al.*, 1997; Ramon-Cueto *et al.* 1994; Ramon-Cueto *et al.* 1998; Amemori *et al.*, *v tisku*). Většina experimentálních prací byla provedena s použitím OEG z CNS z olfaktorické bulbu (Lu a Ashwell, 2002). OEG při implantaci do míšní transekce podpořily regenerační účinek Schwannových buněk tím, že umožnily rozsáhlou regeneraci skrze gliální jizvu a dovolily růst axonů na dlouhou vzdálenost (Ramon-Cueto *et al.*, 1998). V dlouhodobých studiích OEG injikované do transekce míchy podpořily axonální regeneraci na dlouhou vzdálenost, což mělo za následek zlepšení motorických a sensitivních funkcí 7 měsíců po transplantaci (Ramon-Cueto *et al.*, 2000). Nevýhodou OEG je jejich zdroj, tedy centrální nervový systém. Proto je snahou aplikovat OEG z čichové sliznice, kde by biopsií bylo možno získat OEG s menšími riziky. Tyto buňky lze purifikovat a namnožit v kultuře. Implantace OEG z nosní sliznice u transekce míchy částečně zlepšila funkci (Lu a Ashwell, 2002).

Některé studie však zpochybňují výhodu OEG oproti Schwannovým buňkám. Při transplantaci Schwannových buněk, OEG nebo kombinace obou typů u míšní

kontúze měly míchy po 3 měsících po aplikaci Schwannových buněk více myelinizovaných axonů a zlepšil se funkční stav v porovnání jak se skupinou léčenou OEG či kombinací OEG a Schwannovy buňky (Takami *et al.*, 2002). Navíc studie užívající OEG a dokazující dobrou myelinizační schopnost těchto buněk mohly být kontaminovány Schwannovými buňkami. Purifikované kultury OEG neformovaly melin a neukázaly asociaci s axony jako u Schwannových buněk. Proto je nutno dalších studií s purifikovanými kulturami OEG (Plant *et al.*, 2002).



Obr. 4: Zdroj olfaktorických gliálních buněk – centrální (olfaktorický bulbus) a periferní (čichová sliznice nosní dutiny, Lu a Ashwell 2002.)

#### 1.4.6. Aktivované makrofágy

Komunikace mezi nervovým a imunitním systémem hraje významnou roli v patofyziologii poranění CNS. Makrofágy jsou atrahovány k místu léze a přecházejí z krevního oběhu do místa poranění a jeho okolí. Jejich úlohou je vyčistit oblast léze od buněčného detritu včetně zbytků myelinu, který obsahuje molekuly inhibující remylinizaci. Makrofágy jsou také zdrojem cytokinů a růstových faktorů, které mohou přispívat k regeneraci CNS (Harel *et al.*, 1989; Heumann *et al.*, 1987; Lindholm *et al.*, 1987). Implantace autologních makrofágů do místa transekce optického



nervu podporuje růst nervových vláken. Tento jev byl též doprovázen zlepšeným odstraněním buněčného detritu a degenerujících částí nervů spolu s přítomností aktivovaných makrofágů/mikroglie podél distálního segmentu nervu (Lazarov-Spiegler *et al.*, 1996). Implantace aktivovaných makrofágů do transektce míšni u potkanů zlepšila motorické funkce, jak ukázalo behaviorální testování i elektrofyziologické hodnocení (motorické evokované potenciály, MEP). Rozsah zlepšení byl závislý na dávce aplikovaných makrofágů (Rapalino *et al.*, 1998). Naproti tomu existují studie, které ukazují, že u poranění míchy se může zlepšit hybnost a redukovat histopatologických známek míšního traumatu (morfometrická analýza) právě odstraněním makrofágů (Popovich *et al.*, 1999). Činnost makrofágů/mikroglie může být jak cytotoxická, tak i protektivní, a významně záleží na charakteru tkáně a přítomnosti a nepřítomnosti jiných buněk imunitního systému, kterým směrem se tyto reakce budou ubírat (Shaked *et al.*, 2004). Ochranná autoimunita je koncept formulovaný skupinou prof. M. Schwartzové z Weizmannova institutu ve městě Rehovot v Izraeli, pomocí něhož se snaží dokázat možnosti zlepšení regenerace terapeutickým ovlivněním autoimunitní reakce při poškození CNS (Schwartz a Yoles 2006).

#### 1.4.7. Blokáda inhibičních faktorů v CNS

Inhibiční prostředí pro regeneraci CNS souvisí s tvorbou inhibičních molekul a látek. Caroni a Schwab poprvé objevili, že myelin produkovaný oligodendrocyty inhibuje regeneraci v CNS (Caroni a Schwab 1988). Jedná se o protein NI-35, také zvaný Nogo, který obsahuje 2 inhibiční domény Nogo-A a Nogo-66 (Chen *et al.*, 2000). IN-1 je monoklonální protilátka, která blokuje Nogo a zlepšuje regeneraci po míšním traumatu (Schnell a Schwab 1990). Dále byly objeveny další inhibiční faktory související s myelinem, s myelinem související glykoprotein (MAG) či s oligodendrocyty související glykoprotein (OMgp). Předpokládá se, že existují další inhibiční molekuly v myelinu, které ještě nebyly objeveny.

#### 1.4.8. Enzymy degradující inhibitory růstu axonů

Další skupinou jsou proteázy. Proteázy štěpí inhibiční součástí gliální jizvy, usnadňují jejich odstranění a zvyšují tak schopnost axonů vrůstat do místa poranění. Mezi takové inhibitory růstu axonů v jizvě patří několik součástí extracelulární matrix, jako např. chondroitin sulfát proteoglykany (CSPG), které jsou ve vysoké míře syntetizovány oligodendrocyty a astrocyty po poranění míchy a inhibují růst axonů (Fawcett a Asher, 1999). V experimentální léčbě se používá enzym chondroitináza ABC, která štěpí boční řetězce CSPG. Tato léčba zlepšuje regeneraci axonů (Yick *et al.*, 2000) a lepším funkčním výsledkům (Bradbury *et al.*, 2002).

#### 1.4.9. Neurotrofní faktory

Neurotrofní faktory jsou molekuly, které mají velký význam jak v běžné fyziologii centrálního nervového systému, tak i v patofyziologii a experimentální léčbě. Existuje množství neurotrofních faktorů, z nichž mezi nejvýznamnější patří následující:

NGF (nerve growth factor) je důležitý pro vývoj a regeneraci nervového systému. Jedná se o nejvíce prostudovaný neurotrofní faktor (Lundborg 2000). NGF je přítomen v nízkých koncentracích v periferním nervu. Při jeho poranění se však upregulují v distálním segmentu (Heumann *et al.*, 1987). Podobně se pak u transektce míchy upreguluje NGF jak v proximálním tak i v distálním segmentu míchy (Murakami *et al.*, 2002). Na buněčné úrovni NGF podporuje přežití, růst a větvení sensitivních neuronů, ale nemá vliv na regeneraci motoneuronů (Tuszynski *et al.*, 1996).

BDNF podporuje přežití motoneuronů a podporuje růst axonů (Henderson *et al.*, 1993), jak motoneuronů (Braun *et al.*, 1996) tak i sensitivních neuronů (Oudega *et al.*, 1999). Výsledky experimentů však u poranění PNS i CNS nejsou jednoznačné (Utleay *et al.*, 1996; Menei *et al.*, 1998), což nejspíše vyplývá s různého způsobu aplikace BDNF. Bylo zjištěno, že BDNF musí být podán ve vysokých koncentracích lokálně, aby pozitivně ovlivnil regeneraci nervu (Jones *et al.*, 2001).

NT-3 (neurotrophin 3), stejně jako BDNF podporuje přežití a růst motoneuronů (Henderson *et al.*, 1993), stejně jako sensitivních axonů (Dijkhuizen *et al.*, 1997). In vivo NT-3 hraje velmi důležitou roli v regeneraci periferních nervů a míchy (Bloch *et al.*, 2001; Menei *et al.*, 1998). NT-3 také zvyšuje schopnost sensitivních axonů růst z ganglií zadních rohů míšních přes hranice PNS-CNS do míchy (Bradbury *et al.*, 1999).

CNTF podporuje přežití (Gravel *et al.*, 1997), růst (Oyesiku *et al.*, 1996) a větvení (sprouting) motoneuronů (Siegel *et al.*, 2000). mRNA CNTF se nachází ve zvýšených koncentracích blízko epicentra při poranění míchy (Oyesiku *et al.*, 1997). Aplikace CNTF po traumatu míchy (Ye *et al.*, 1997) či periferního nervu zvyšuje regeneraci (Newman *et al.*, 1996). Na druhou stranu aplikace CNTF souvisí se zvýšenou gliální jizvou (Levison *et al.*, 1996).

GDNF (glial derived neurotrophic factor) podporuje přežití motorických (Henderson *et al.*, 1994), sensitivních (Matheson *et al.*, 1997) i autonomních (Buj-Bello *et al.*, 1995) neuronů a růst motoneuronů v CNS (Blesch a Tuszynski, 2001) a zlepšuje regeneraci periferních nervů (Fine *et al.*, 2002). Také podporuje vrůstání sensitivních vláken z DRG přes hranici PNS-CNS (Ramer *et al.*, 2000).

aFGF a bFGF podporuje regeneraci periferních nervů (Cordeiro *et al.*, 1989) i míchy (Nakahara *et al.*, 1996). Tyto faktory podporují angiogenezi a mohou tak buď přímo či nepřímo zlepšit regeneraci poraněných nervů (Friesel a Maciag, 1995).

Neurotrofní faktory podporují přežití a růst jak motorických tak i sensitivních nervů, míchy, periferních nervů a růst nervových vláken přes přechodnou zónu PNS-CNS. Avšak při experimentální léčbě poranění nervového systému se výsledky léčby liší díky různým metodám aplikace. Proto se další výzkum soustředí na vývoj a standardizaci kontrolované aplikace vysokých dávek neurotrofních faktorů do místa léze (osmotické pumpy, silikonové rezervoáry, makrosféry, polymery, genová terapie, apod.)

#### 1.5.10. Současná klinická léčba

Mezi zásadní prvky léčby míšního poranění v klinické praxi patří akutní dekomprese a stabilizace poraněné páteře, aplikace kortikoidů (methylprednizolon) v akutní fázi a následná rehabilitace, nejlépe na specializovaném rehabilitačním pracovišti, tzv. spinální jednotce. V České republice jsou spinální jednotky 4 (FN Praha-Motol, KN Liberec, FN Brno-Bohunice, FN Ostrava). Zatímco chirurgická léčba i následná rehabilitace jsou standardními metodami léčby pacientů se SCI, aplikace kortikoidů zatím zůstává kontroverzní problematikou.

#### 1.4.10.1. Kortikoidy

Dlouhodobě diskutovanou metodou léčby míšního poranění je aplikace kortikoidů, hlavně pak methylprednisolonu. Mezi mechanismy účinku při poranění míchy se udává snížení zánětlivé reakce, hydrolýzy a peroxidace lipidů, redukce míšního edému a zlepšení průtoku v cévách poškozené míchy (Xu *et al.*, 1992, 1998; Young a Flamm, 1982; Urdzíkova, 2006, Vanický *et al.*, 2002). Významným milníkem pro klinickou praxi byly výsledky klinické studie National Acute Spinal Cord Injury Study II (NASCIS II). Podle protokolu této studie byla aplikována iniciální dávka 30mg/kg hmotnosti pacienta po dobu 15 minut. Po 45 minutách pak následovala 23-hodinová infúze methylprednisolonu v dávce 5,4 mg/kg hmotnosti pacienta. Tato studie ukázala, že u pacientů léčených methylprednisolonem do 8 hodin po vzniku míšního traumatu dochází ke statisticky významnému zlepšení motorických a senzitivních funkcí v porovnání s těmi léčených placebem (Bracken *et al.*, 1990). Dalším závěrem této studie bylo, že léčba methylprednisolonem započatá více než 8 hodin po míšním traumatu již nepřináší signifikantní zlepšení oproti pacientům léčených placebem. Změnu v protokolu pak ještě přinesla studie NASCIS III, která prodloužila dobu aplikace methylprednisolonu na 48 hodin ve skupině pacientů, u kterých byla započata léčba v období od 3 do 8 hodin po poranění (Bracken *et al.*, 1997). I přes tyto výsledky je studie NASCIS stále velmi debatovanou a silně kritizovanou (Nesathurai, 1998; Hurlbert, 2000; Hugenholtz, 2002). Existují jednotlivá pracoviště i země, jako např. Kanada, kde aplikaci vysokých dávek

methylnprednisolonu u pacienta se SCI hodnotí pouze jako možná léčba, nikoliv doporučená (Hugenholtz *et al.*, 2002). Hlavním důvodem je to, že statisticky významné výsledky byly získány pouze v rámci *post hoc* analýzy, nikoliv jako výsledky primární studie. Existují také protichůdné výsledky jak experimentálních, tak i klinických studií (Green *et al.*, 1980; Vaquero *et al.*, 2006a; Oudega *et al.*, 1999; Bartholdi a Schwab 1995). Významným argumentem proti aplikaci kortikoidů u SCI je zvýšené riziko sepse a pneumonie u pacientů s vysokými dávkami methylnprednisolonu (Bracken *et al.*, 1990, 1997). Dosud tedy neexistuje klinická studie, která by aplikaci vysokých dávek methylnprednisolonu u pacientů se SCI jednoznačně a přesvědčivě obhájila.

## 2. Cíle práce

1. Přemostit akutní SCI hydrogely na bázi HEMA a HPMA. Vytvořit v akutní míšní lézi permissivní prostředí pro regeneraci elementů nervové tkáně.
2. Zlepšit přemostění akutního míšního poranění hydrogelem s povrchovým nábojem. Podpořit buněčnou infiltraci hydrogelu a regeneraci axonů modifikací hydrogelů povrchovými náboji (pozitivní, negativní, pozitivní i negativní, bez náboje).
3. Sledovat rozsah přemostění posttraumatické kavity v závislosti na rychlosti vstřebávání biodegradabilních hydrogelů. Na modelu akutního SCI použít

vstřebatelné hydrogely na bázi kopolymeru HPMA a etoxyetylmetakrylátu (EOEMA) a nalézt vztah mezi rozsahem přemostěné posttraumatické kavity a rychlostí vstřebávání hydrogelu.

4. Odloženou implantací hydrogelu (po 7 dnech) eliminovat rozvoj posttraumatické kavity. V modelu transekce míchy zjistit, zdali odložená implantace hydrogelu na bázi HEMA zmenší objem posttraumatické kavity v porovnání s akutní implantací.

5. Přemostit chronickou míšňí lézi hydrogelem na bázi HPMA, buď s MSCs nebo bez MSCs. Implantací hydrogelu do chronického SCI vytvořit permisivní prostředí, a tak zlepšit regeneraci axonů v chronické míšňí lézi a zmírnit atrofii míchy.

6. Zlepšit motorické a senzitivní funkce zadních končetin u laboratorňích potkanů s chronickým SCI implantací hydrogelu na bázi HPMA nebo hydrogelu na bázi HPMA ošetého MSCs.

### **3. Metody**

#### 3.1. Laboratorňí zvířata

Experimenty s poraněňím míchy byly prováděny na dva měsíce starých laboratorňích potkanech, samcích kmene Wistar. Jednalo se tedy o mladé dospělé jedince. Hmotnostňí rozmezí bylo u potkanů s hemisekcí a transekci 250 – 350g, u potkanů s balónkovou kompresňí lézi z nutnosti standardizace balónkové kompresňí léze při konstantňí velikosti balónku 300-330g v době prováděňí balónkové kompresňí léze.

#### 3.2. Experimentální poraněňí míchy

3.3.1. Příprava k experimentální operaci míchy - anestézie, medikace, předoperační příprava

Všechny implantace hydrogelu byly prováděny v celkové anestézii. Nejprve byl laboratorní potkan přenesen do nádoby, kam jsme vháněli 5% směs isofluranu rychlostí 300ml/min. Zde jsme zvíře ponechali do doby, než bylo dostatečně uspáno (přibližně 5-7 minut). Poté jsme intraperitoneálně aplikovali pentobarbital o koncentraci 10mg/ml v dávce 6 ml/1kg. Experimentální zvíře jsme nechali 10-15 minut v klidu, aby nastoupala dostatečná dávka pentobarbitalu. Antibiotika jsme aplikovali bolusově před operací (ampicilin 0,3 ml i.m. nebo gentamicin 0,05 ml i.m.). U experimentální transekce míšni jsme aplikovali antibiotika – gentamicin ve stejné dávce - po operaci 1x denně po dobu 7 dnů po operaci k prevenci infekce močových cest). Podkožně byl aplikován atropin v dávce 0,2 ml k omezení salivace. Nad hrudní páteří byla vystříhána srst a aplikována lokální anestézie (mesocain 0,3 ml s.c. a i.m.) vzhledem k malému analgetickému účinku pentobarbitalu. Zadní končetiny zvířete byly fixovány k operačnímu stolku. Celá operace byla provedena pod operačním mikroskopem (Zeiss) při 15-25 násobném zvětšení v aseptických podmínkách.

### 3.3.2. Hemisekce míchy

Hemisekce je chirurgické vytětí poloviny míchy obvykle v rozsahu 1-2 segmentů. Prováděli jsme hemisekci v úrovni Th8-9. Z lineárního kožního řezu o délce 2-3 cm ve střední čáře jsme stříhli podkožní tukovou tkáň. Dále jsme separovali paraaxiální svalstvo a skeletizovali hrudní laminy v rozsahu přibližně Th7-Th10. Provedli jsme laminektomii Th8 či Th9 se snesením processus spinosus přiléhajícího vyššího obratlového oblouku – Th7 či Th8. Po získání dostatečného přístupu a zajištění hemostázy jsme provedli transverzální durotomii od střední čáry směrem k pravému okraji míchy v délce 2 mm s následnou hemisekci.

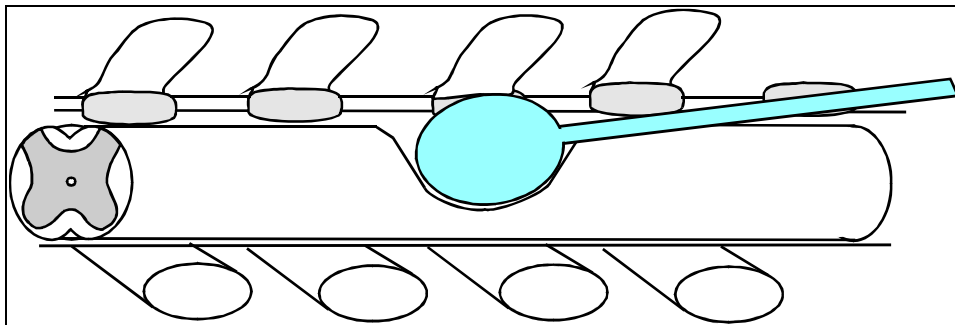
### 3.3.3. Transekce míchy

Transekce míchy je kompletní chirurgické přetětí míchy často s excízi 1 či více míšních segmentů. Transekci jsme také prováděli v úrovni Th8 a přístup byl stejný jako v případě hemisekce. Jen durotomie byla provedena oboustranně od střední čáry v délce 3 mm. Poté jsme provedli vlastní transekci, tedy kompletní přetětí míchy

s vytětím tkáně v délce přibližně 1mm. Pod mikroskopem bylo nutno zkontrolovat hlavně laterální recesy k ověření, že je transekce úplná.

#### 3.3.4. Balónková kompresní léze

Model balónkové kompresní léze (obr. 5), tak jak jej využíváme v našich experimentech, byl vyvinut na oddělení neurobiologie University v Košicích (Vanický *et al.*, 2001). Vedli jsme 2-centimetrový řez kůží ve střední čáře v úrovni Th10-L1 za aseptických podmínek. Laminy Th10-L1 byly skeletizovány a svaly pomocí retraktoru odtaženy laterálně. Vybrousili jsme díрку do laminy Th10 pomocí zubního brousku. Poté byl zaveden 2F Fogarthyho katétr (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA) naplněný destilovanou vodou a napojen na 50  $\mu$ L Hamiltonovu stříkačku 1 cm kraniálně do dorzálního epidurálního prostoru. Balónek byl rychle naplněn vodou na objem 15  $\mu$ l pomocí mikromanipulátoru. Po 5 minutách byl balónek vypuštěn a vytažen. Svaly a kůže byly zašity ve dvou vrstvách.



Obr. 5: Model balónkové kompresní léze (Vanický *et al.*, 2001).

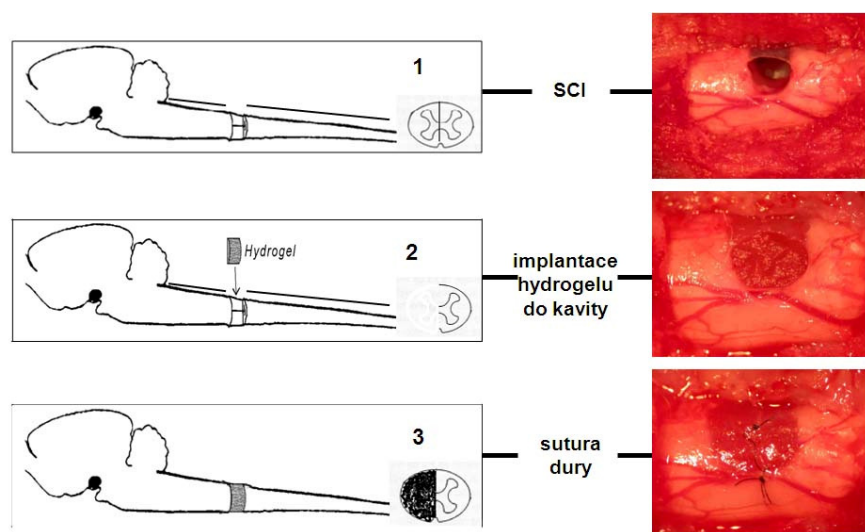
### 3.4. Implantace hydrogelu

#### 3.4.1. Implantace hydrogelu do modelu akutního míšního poranění - hemisekce

U hemisekce jsme provedli excizi míšní tkáně, čímž jsme vytvořili dutinou o velikost přibližně 2x2x2mm. Provedli jsme dostatečnou hemostázu, aby byla dutina



čistá a nevytvoril se hematoma. Jeho pozdější resorpce by měla za následek vznik pseudocysty. Posttraumatickou dutinu jsme vyplnili přemosťujícím materiálem. Velikost implantátu jsme přizpůsobili velikosti a tvaru vytvořené dutiny (obr. 6). Implantát by neměl být příliš velký, aby se netraumatizovala okolní tkáň. Na druhou stranu malá velikost implantátu vede k tomu, že přemostění je nedostatečné, takže i přes implantaci může vzniknout menší pseudocysta znemožňující dostatečnou regeneraci míšní tkáně.



Obr. 6: Implantace hydrogelu do hemisekce. Vlevo nákres, vpravo reálná situace z operace pod operačním mikroskopem.

### 3.4.2. Implantace hydrogelu do transekce akutně a po 1 týdnu

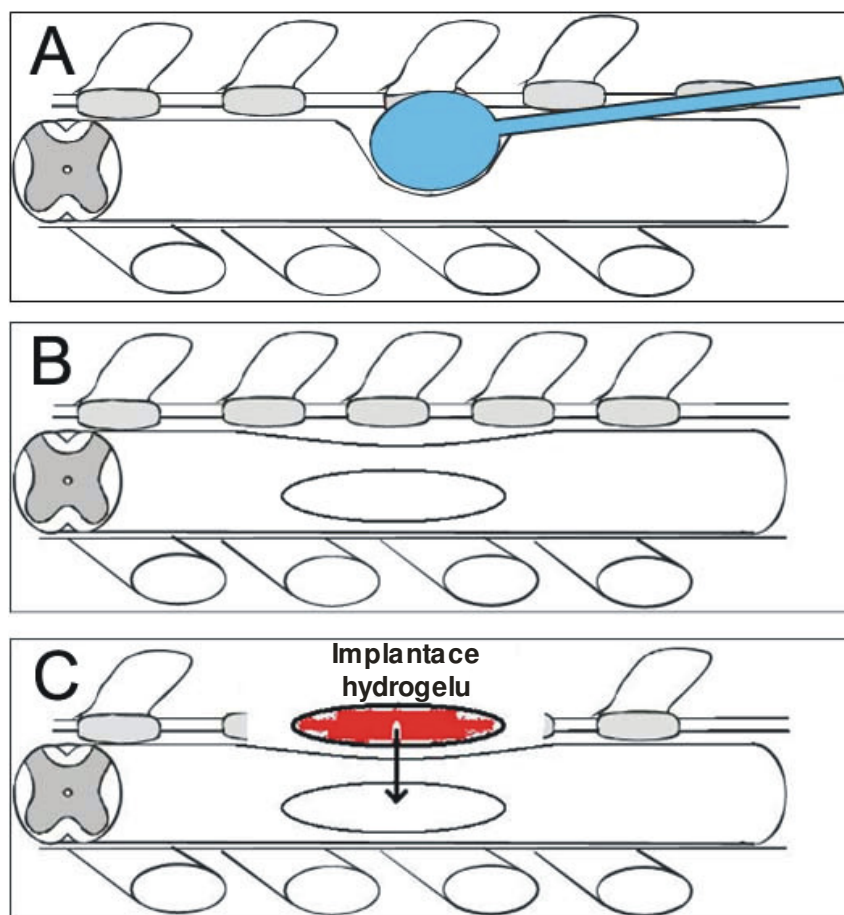
U transekce jsme provedli excizi 1-2 míšních segmentů. Ověřili jsme, že bylo způsobeno kompletnímu přerušení míchy, zvláště v laterálních částech páteřního kanálu, které mohou být hůře přehledné z běžného přístupu. Do vytvořené dutiny jsme implantovali přemosťující biomateriál. Tato implantace se řídí podobnými pravidly jako hemisekce. Výhodou transekce je možnost odložené implantace přemosťujícího biomateriálu. Vzhledem k výraznému jizvení epidurálně je pozdní implantace náročná u hemisekce vzhledem k vysokému riziku poranění míchy v okolí léze. Toto riziko je u transekce menší. V naší studii jsme prováděli implantaci hydrogelu do transekce míchy odloženě po 1 týdnu. Po znovuotevření rány a protěti

jizevnaté tkáně jsme odhalili sešitou tvrdou plenu. Extrahovali jsme suturu tvrdé pleny, odsávali buněčný detritus v místě transekce a odstranili jizevnatou tkáň. Do takto „očistěné“ dutiny jsme implantovali hydrogel. Velikost a tvar jsme opět upravili dle pooperační velikosti a tvaru kavity. Poté jsme znovu zašili tvrdou plenu, svalovou vrstvu a kůži.

### 3.4.3. Implantace hydrogelu do balónkové kompresní léze (obr. 7)

Z lineárního kožního řezu o délce 3-4 cm ve střední čáře jsme prostříhli tukovou tkáň. Dále jsme separovali paraaxiální svalstvo a skeletizovali hrudní laminy v rozsahu přibližně Th7-Th11. Provedli jsme laminektomii Th7-10. Rozsah laminektomie jsme upravili dle peroperačního nálezu poranění míchy (výška poranění, rozsah poranění). Po zajištění hemostázy jsme provedli longitudinální durotomii ve střední čáře dle rozsahu míšního poranění v rozsahu 1-3cm. Tvrdou plenu jsme někdy vyvěsili stehem ke straně k zajištění dostatečného přístupu k poraněné míše. Nad centrem míšního poranění provedli longitudinální dorzální myelotomii. Dostali jsme se do pseudocysty a evakuovali buněčný detritus. Do této pseudocysty jsme implantovali přemosťující materiál. Před vlastní implantací jsme zajistili hemostázu, aby se vytvořil hematoma, který by komprimoval míchu. Velikost implantovaného materiálu jsme přizpůsobili velikosti pseudocysty tak, abychom vyplnili pseudocystu v celém rozsahu, ale aby nepůsobil nadměrným tlakem na okolní míšní tkáň. Tvrdá plena byla zašita pokračujícím stehem (10/0, BBraun). Následně jsme sešili pokračujícím stehem svaly a kůži (4/0, Chirmax).

Tato situace imituje i možnosti i reálnou klinickou situaci, neboť v klinické praxi v budoucnosti při implantaci přemosťujícího materiálu bude toto možné až po stabilizaci klinického (neurologického) stavu.



Obr. 7: Implantace hydrogelu do balónkové kompresní léze.

A. Balónková kompresní léze. B. Vznik posttraumatické pseudocysty 5 týdnů po BCL. C. Implantace hydrogelu 5. týden po BCL z 2-etážové laminektomie.

### 3.5. Metodika hodnocení výsledků

#### 3.5.1. Behaviorální testování

##### *Testování motorických funkcí*

K testování hybnosti zadních končetin po poranění míchy existuje několik testů. Testování pomocí škály dle Bassa, Bresnahan a Beattieho (BBB skóre; Basso *et al.*, 1995) je dnes nejčastěji používaným testem motorických funkcí. Škála je v rozsahu 0 až 21 bodů; 0 znamená žádný pohyb, tedy paraplegii, a 21 pak úplná hybnost dolních končetin. Testovali jsme jedenkrát týdně každou ze zadních končetin zvlášť.

Tabulka 4: BBB skóre

Hodnota	
---------	--

	Charakteristika
0	Žádný viditelný pohyb zadních končetin.
1	Nepatrný pohyb jednoho nebo dvou kloubů, obvykle kyčle a/nebo kolene.
2	Výrazný pohyb jednoho kloubu. Výrazný pohyb jednoho kloubu a nepatrný pohyb dalšího kloubu.
3	Výrazný pohyb dvou kloubů.
4	Nepatrný pohyb všech tří kloubů.
5	Nepatrný pohyb dvou kloubů a současně výrazný pohyb třetího.
6	Výrazný pohyb dvou kloubů a současně nepatrný pohyb třetího.
7	Výrazný pohyb všech tří kloubů.
8	Zametání bez váhové podpory. Plantární umístění packy bez váhové podpory.
9	Plantární umístění packy s váhovou podporou pouze ve stoji. Občasná, častá nebo konzistenční chůze po dorsum pedis s váhovou podporou a absencí plantárního umístění packy.
10	Občasné plantární umístění packy s váhovou podporou a žádná předozadní koordinace.
11	Časté až konzistenční plantární umístění packy s váhovou podporou a žádná předozadní koordinace.
12	Časté až konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a občasná předozadní koordinace.
13	Časté až konzistenční plantární umístění packy s váhovou podporou a častá předozadní koordinace.
14	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Packa je rotována zevně nebo navnitř při zvednutí packy a při prvním kontaktu.
15	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Žádné nebo občasná zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu.
16	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a

	konzistentní předožadní koordinace. Časté zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu a rotována ve fázi zvednutí.
17	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Časté zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí.
18	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu a rotována ve fázi zvednutí.
19	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí. Ocas je při zemi část nebo celou dobu.
20	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Packa je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zvednutí. Nestabilita trupu. Konzistentní zvedání ocasu.
21	Konzistentní plantární umístění packy s váhovou podporou a konzistentní předožadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Stabilita trupu. Konzistentní zvedání ocasu.

### *Testování senzitivních funkcí*

K testování senzitivity u potkanů s poškozením míchy jsme využili plantární test (Plantar test – Ugo Basile, Comerio, USA). Tento test měří rychlost reakce (odtažení packy) na tepelný stimulus. Testování probíhalo 1x týdně (před poraněním, 1 den po poranění a dále 1x týdně) nezávislým jedincem.

### 3.5.2. Hodnocení magnetickou rezonancí

Mícha byla vyšetřena na experimentálním přístroji MR Bruker Biospec 47/20 o síle 4,7 T s vnitřním průměrem magnetu 20 cm s gradientním systémem o síle 200mT/m a páteřní cívkou vlastní výroby (Burian 2004). Sagitální řezy (obrazová matice 512x160 bodů, zorné pole o velikost 10x3cm, tloušťka řezu 0,5mm a mezerou mezi řezy 0,5mm a echo-časem 70ms s repetičním časem 2800 ms) byly snímány běžnými RARE sekvencemi s turbo faktorem 8.

U experimentů s balónkovým poraněním míchy byly míchy potkanů vyšetřovány *in vivo* v týdenních intervalech po poranění a následně 1-2 týdny po implantaci hydrogelu. Poslední vyšetření proběhlo před perfúzí potkana. U potkanů s transekcí byly provedena vyšetření míchy *ex vivo* po extrakci úseku páteře obsahujícího poraněný segment míšní.

### 3.5.3. Retrogradní barvení

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

### 3.5.4. Perfúze zvířat

Po aplikaci nadměrné dávky pentobarbitalu intraperitoneálně jsme provedli thorakotomii, ozřejmili srdce, odstříhli ouško pravé postranní komory a zavedli kanylu přes hrot srdeční do levé srdeční komory. Peristaltickou pumpou jsme aplikovali fosfátový pufovaný roztok k vypláchnutí krve z cévního systému po dobu

přibližně 2 minut a následně 4% roztok paraformaldehydu ve fosfátovém pufru přibližně po dobu 5 minut. Poté byl extrahován úsek páteře o délce 5 cm s centrem v místě poranění. Poté byla mícha vyjmuta z páteře a uložena do téhož stejného fixačního roztoku minimálně přes noc k dalšímu histologickému zpracování.

#### 3.5.5. Histologické zpracování

Úsek míchy o délce 5 cm s epicentrem poranění uprostřed byl zmražen a následně nařezán na kryostatu na podélné řezy o síle 16 a 40  $\mu\text{m}$ .

Pro následné hodnocení integrace hydrogelu do oblasti míšní léze bylo použito standardní barvení hematoxylinem a eosinem (HE). Pro hodnocení infiltrace pórů hydrogelu buňkami barvení kresyl violetí (CV). Barvení luxolovou modří (LFB – luxol fast blue) bylo použito pro morfometrické měření zachovalé míšní tkáně.

Imunohistochemické metody byly použity k identifikaci elementů infiltrujících hydrogelové implantáty: GFAP-Cy3 (1:200, Sigma-Aldrich) barvení na astrocyty, NF 160 (1:200, Sigma-Aldrich) barvení na axony, p75 (1:100, Chemicon International) k identifikaci Schwannových buněk, RECA-1 (1:50, Abcam) k identifikaci vrůstajících cév, ED-1 (1:100, Invitrogen) pro hodnocení makrofágů, CS-56 (1:50, Sigma-Aldrich) pro identifikaci chondroitin sulfátu. Dále byly použity následující sekundární protilátky: Alexa Fluor 488 kozí sekundární protilátkou proti králíkovi IgG (1:200, Invitrogen), IgM Cy3 (1:100, Chemicon International), a Alexa Fluor 594 s kozí sekundární protilátkou proti králíkovi IgG (1:500, Invitrogen).

#### 3.5.7. Elektronová mikroskopie

Míchy byly podélně nařezány na 60  $\mu\text{m}$  řezy a přeneseny na sklíčka, fixovány v 2,5% glutaraldehydu v 0,1M Sörensenova pufru a barveny v 1% osmium tetraoxidu v 0,1M Sörensenově pufru po dobu 2 hodin. Histologické řezy byly následně dehydratovány v etanolu, ponořeny do propylénoxidu a zality v Eponu 812

s použitím želatinových kapslí. Po polymerizaci (72 hodin v 60 °C) bylo krytí odstraněno tekutým dusíkem. Ultratenké řezy (65 nm) byly hodnoceny transmisní elektronovou mikroskopií přístrojem Philips Morgagni 268D (FEI Inc., Hillsboro, OR, USA).

### 3.5.8. Morfometrie kavit

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

### 3.5.9. Statistická analýza

Všechna data byla analyzována s použitím aritmetického průměru  $\pm$  standardní chyba průměru (S.E.M.) Porovnávání dvou početních celků bylo prováděno použitím Studentova t-testu na hladině významnosti  $p < 0.05$  (označené \*). Porovnávání 3 početních celků bylo prováděno použitím jednostranného testu ANOVA s post-hoc LSD testem [ $p < 0.05$  (označené\*)]. Dále byly použity neparametrický Kruskal-Wallisův test a Mann-Whitney test.

## 4. Výsledky

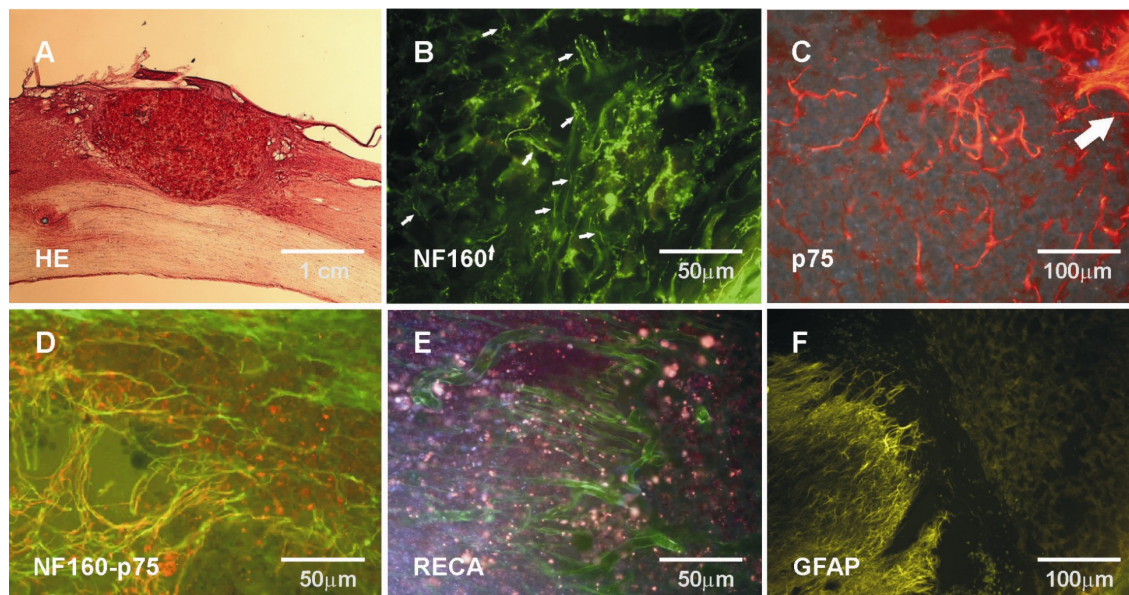
### 4. 1. Přemostění akutního SCI hydrogelů na bázi HEMA a HPMA

Srovnávali jsme 2 typy hydrogelů na bázi 2-hydroxyethylmetakrylátu a hydroxypropylmetakrylamidu v modelu akutního míšního poranění – hemisekce



míšní. Hydrogely byly akutně implantovány do posttraumatické kavity chirurgicky vytvořené v úrovni Th 8. Míšní léze přemostěná hydrogelem byla histologicky hodnocena po 2, 4 a 8 týdnech od operace.

Hydrogely vytvořily přemostění přes chirurgicky vytvořenou kavitu a dobře adherovaly k okolní míšní tkáni ve všech sledovaných obdobích (obr. 8A). Póry hydrogelů byly plně infiltrovány vrostlými buňkami. Nebyla zaznamenána významná reakce proti cizímu tělesu. Do hydrogelů vrůstaly výběžky neuronů z oblasti míšních kořenů i z oblasti okolní míšní tkáně (obr. 8B), Schwannovy buňky z míšních kořenů, cévy (obr. 8C,D,E). Zatímco 2 týdny po implantaci byly tyto elementy převážně v okrajových částech implantátu, za 4 a 8 týdnů již infiltrovaly i centrální části hydrogelů. Astrocyty vrůstaly do hydrogelů jen minimálně a to pouze do okrajových částí (obr. 8f). Dvojitě barvení na axony a Schwannovy buňky ukázalo, že Schwannovy buňky rostou v úzkém kontaktu s axony. Elektronová mikroskopie pak prokázala, že Schwannovy buňky skutečně myelinizují axony hydrogelu.



Obr. 8: Hydrogely na bázi HPMA a HEMA implantované v hemisekci. Hydrogel HEMA přemostňuje kavitu hemisekce (A). Hydrogel HPMA-RGD je infiltrován axony a výběžky Schwannových buněk (B, C). Výběžky Schwannových buněk infiltrovaly hydrogel HPMA-RGD z oblasti míšního kořene (viz šipka, C). Schwannovy buňky rostly podél axonů, vytvářely myelinovou pochvu (D). Cévy vrůstaly do hydrogelu HPMA-RGD z okolní míšní tkáně (E), zatímco astrocyty neinfiltroval hydrogel HEMA (F).

#### **4. 2. Přemostění akutního SCI hydrogelem s povrchovým nábojem**

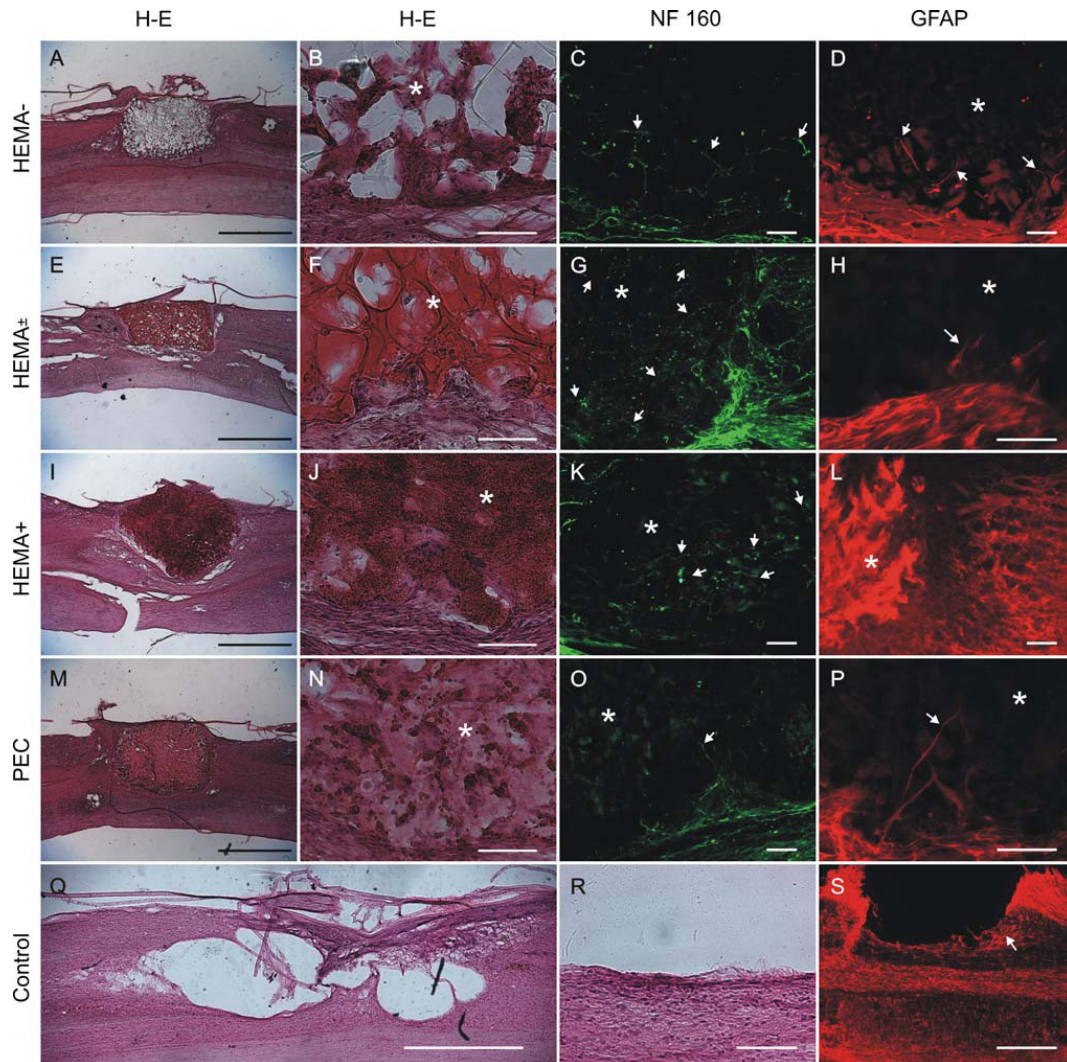
Provedli jsme implantaci hydrogelů na bázi HEMA s různými povrchovými náboji (kladný +, záporný -, kladný i záporný +/-, bez náboje) na modelu akutního SCI (hemisekce) v úrovni Th8. Po 4 týdnech (a následně ve skupinách – s kladným nábojem a bez náboje – i po 6 měsících) jsme histologicky hodnotili integraci hydrogelů do míšňí léze, reakci proti cizímu tělesu, infiltraci pórů pojivovými elementy, a vrůstání výběžků neuronů, axonů.

Hydrogely se záporným nábojem měly své póry jen částečně infiltrovány buňkami pojivové tkáně (obr. 9A,B). Hydrogely, které měly na povrchu pozitivní náboj (+ nebo +/-) měly své póry nejvíce infiltrovány buňkami pojivové tkáně (obr. 9E,F,I,J) Méně buněk bylo pak v hydrogelech se záporným nábojem. Minimum buněk bylo v hydrogelech bez náboje (obr. 9M,N).

Axony vrůstaly do okrajových částí hydrogelů s nábojem, ať záporným (obr. 9C) či kladným (obr. 9G,K). U hydrogelů s kladným nábojem pak infiltrovaly i

centrální části hydrogelu, zatímco u hydrogelů se záporným nábojem jich bylo méně. Minimum axonů vrůstalo do okrajových částí hydrogelů bez náboje (obr. 9O)

Minimální množství astrocytů vrůstalo jen do okrajových částí hydrogelů bez náboje a hydrogelů se záporným nábojem (obr. 9D,P). Žádné astrocyty pak neinfiltrovaly hydrogely s kladným nábojem (obr. 9H,L).



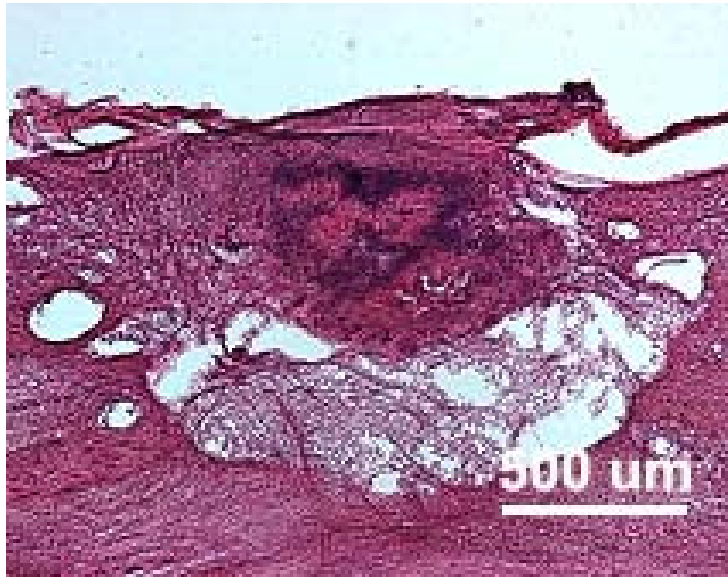
**Obr. 9: Hydrogely HEMA s povrchovými náboji přemostující SCI.**

*Infiltrace 4 typů hydrogelů na bázi HEMA s různými povrchovými náboji tkání (HEMA negativní, HEMA +/-, HEMA + a HEMA bez náboje, neboli polyelektronové komplexy – PEC) pojivovou tkání, axony a astrocyty. Nejvíce axonů a pojivové tkáně bylo v hydrogelech s pozitivním nábojem, nejméně pak v hydrogelech bez náboje.*

### 4.3. Přemostění akutního SCI vstřebatelnými hydrogely

Implantovali jsme 4 typy vstřebatelných hydrogelů na bázi kopolymerů HPMA a etoxyetylnetakrylátu (EOEMA) u hemisekce míšni v úrovni Th8 (Hejčl *et al.*, 2008; Jendelová *et al.*, 2005). Tyto hydrogely měly různou dobu vstřebatelnosti (7 dnů, 9 dnů, 34 dnů a nedegradabilní) na podkladě hydrolýzy. Principem hydrolýzy je nestabilita EOEMA v roztoku o  $\text{pH} > 6$ . Proto se hydrogely obsahující EOEMA po implantaci do míšni tkáně ( $\text{pH} > 6$ ) vstřebávají. Hodnocení integrace vstřebatelných hydrogelů jsme provedli po 1 měsíci od implantace.

Všechny 4 typy hydrogelů byly dobře tolerovány, nepozorovali jsme reakci proti cizímu tělesu. Po 28 dnech nebyl žádný z hydrogelů plně degradován *in vivo*. Oblast kavity vyplněné implantovaným hydrogelem bylo možno rozdělit na 2 části (obr. 10). Periferní část degradovaného hydrogelu a centrální, nedegradovaná část hydrogelu. Velikost či poměr obou částí závisela na rychlosti vstřebatelnosti hydrogelu; tedy největší periferní zóna byla patrná u hydrogelu s dobou vstřebatelnosti 7 dnů. V periferní části byly patrné makrofágy a nově tvořená tkáň řídkého vaziva obsahujícího cévy, výběžky axonů a v okrajových částech též astrocytů. Centrální část byla tvořena amorfni hmotou, kam vrůstaly jen elementy pojivové tkáně. V centrální části jsme nepozorovali výběžků axonů či astrocytů.



**Obr.10: Vstřebatelný hydrogel na bázi HPMA-EOEMA přemostující SCI.**

Vstřebatelný hydrogel na bázi HPMA a EOEMA po implantaci do míšní hemisekce byl hodnocen po 28 dnech (doba vstřebatelnosti je 7 dnů in vitro). Je patrná periferní část, kde je již hydrogel vstřebán a je nahrazen nově vzniklou tkání, zatímco centrální, densní, část obsahuje zbytky hydrogelu.

#### **4.4. Akutní a odložené přemostění posttraumatické kavity hydrogelem akutního SCI**

Implantovali jsme hydrogely na bázi HEMA s pozitivním povrchovým nábojem do transekce míšni v úrovni Th8 u dvou skupin laboratorních potkanů. U 1 skupiny jsme provedli implantaci ihned po provedení transekce míšni (akutní), u 2. skupiny 1 týden po transekcii míšni (odložená). Třetí skupina pak byla kontrolní; u této jsme provedli transekcii bez implantace hydrogelu. Po 3 měsících jsme provedli volumetrické hodnocení posttraumatické pseudocysty.

Odložená implantace hydrogelu statisticky významně redukovala objem posttraumatické kavity v porovnání s okamžitou implantací hydrogelu (obr. 10 a 11). Implantace hydrogelu (obě skupiny) statisticky významně redukovala objem posttraumatické pseudocysty v porovnání s kontrolní skupinou (pouhá transekce, obr. 10 a 11).

Hydrogely u obou skupin byly kompletně infiltrovány buňkami (obr. 13A,B, C), celý objem hydrogelu byl prorostlý cévami (obr. 13D), axony (obr. 13E, F, G), i Schwannovými buňkami (obr. 13H) nikoliv však astrocyty (obr. 13I).

**A**

**B**

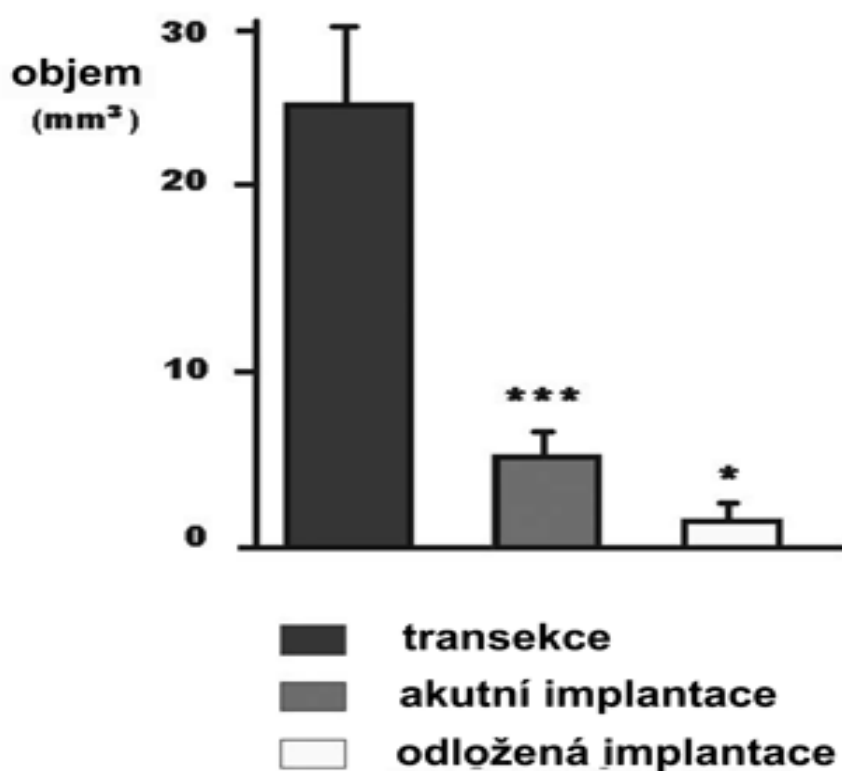
**C**





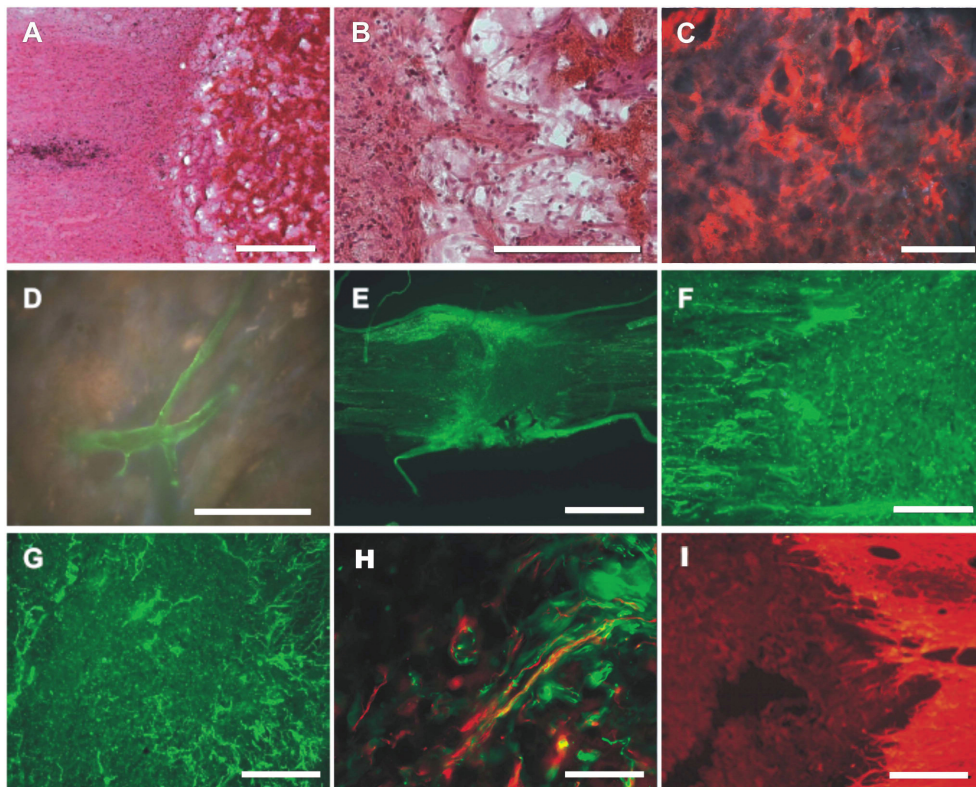
**Obr. 11: Implantace hydrogelu po transekci míchy. Hodnocení po 3 měsících.**

A. Hydrogel byl implantován do transekce míšní (ihned) 3 měsíce od implantace v barvení hematoxylinem-eosinem, měřítko = 500 $\mu$ m. Patrné jsou výrazné posttraumatické pseudocysty. B. Hydrogel byl implantován 1 týden po transekci v barvení hematoxylin-eosinem. Nejsou patrné téměř žádné posttraumatické pseudocysty. C. Hodnocení mích v MRI obraze (ex vivo). Jedná se o stejné míchy, jež jsou na obrázcích A a B. Šipka označuje výraznou pseudocystu po akutní implantaci, hvězdičky značí implantované hydrogely.



**Obr. 12: Volumetrické hodnocení kavit.**

Průměr (spolu se S.E.M.) objemů pseudocystických kavit u kontrolní skupiny, po akutní a odložené implantaci hydrogelu (\* $p$ , 0.05, \*\*\* $p$ , 0.001, Studentův nepárový test).



**Obr. 13: Histologické hodnocení hydrogelu na bázi HEMA přemosťujícího transekcí míšni. Hydrogel byl implantován v subakutní fázi (po 1 týdnu od SCI). A. Kraniální okraj míchy a hydrogelu. Hydrogel dobře adhezuje k míšní tkáni (barvení HE, měřítko = 100 $\mu$ m). B. Řídká pojivová tkáň vytváří spojení mezi míšní tkání a hydrogelem (barvení HE, měřítko = 100 $\mu$ m). C. Proteoglykany chondroitin suflátu infiltrují porézní strukturu hydrogelu (imunobarvení CS56, měřítko = 50 $\mu$ m). D. Cévy vrůstají do hydrogelu a větví se (imunobarvení RECA, měřítko = 50 $\mu$ m). E. Axony rostou z míchy, přes hranici mícha-hydrogel a vrůstají do pórů hydrogelu (imunobarvení NF160-g488, měřítko = 500 $\mu$ m). F a G: Axony rostou přes hranici mícha-hydrogel a vrůstají jak do periferie (F), tak i do centrální části hydrogelu (G, imunobarvení NF 160, měřítko = 100 $\mu$ m). H. Schwannovy buňky vyrůstají z oblasti míšního kořene a vrůstají do pórů hydrogelu společně s axony (dvojitě barvení p75 a NF 160, měřítko = 100 $\mu$ m). I. Astrocyty jen minimálně přerůstaly hranici hydrogel-mícha (imunobarvení GFAP, měřítko = 100 $\mu$ m).**



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

Testovali jsme vliv implantace hydrogelu na bázi HPMA-RGD a hydrogelu HPMA-RGD osázený kmenovými buňkami kostní dřeně v modelu chronického na tkáň v oblasti míšního poranění u laboratorního potkana. Modelem poranění byla balónková kompresní míšní léze a implantace byla provedena 5 týdnů po poranění. Kontrolní skupinu tvořili laboratorní potkani s balónkovou kompresní lézí.

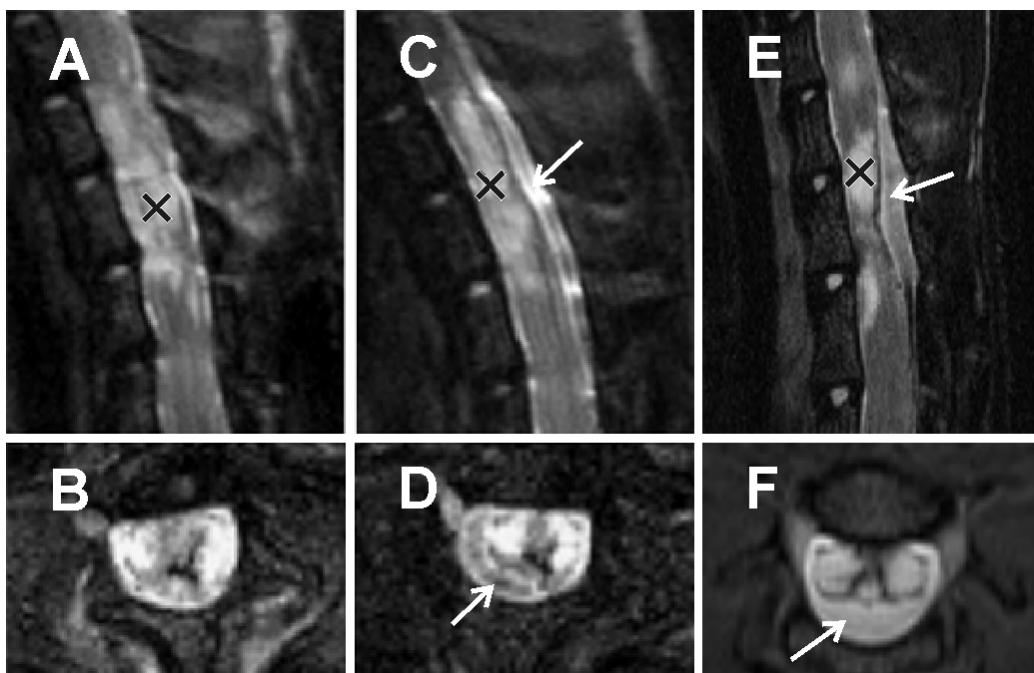
V průběhu experimentu jsme prováděli u vybraných potkanů vyšetření magnetickou rezonancí. Dva dny po BCL jsme pozorovali otok míšní tkáně (hyperintenzní signál v T2 vážených sekvencích, obr. 14A,B), který přetrvával i 3 týdny po SCI (obr. 14C,D). Postupně otok regredoval a rozvíjely se posttraumatické pseudocysty (posttraumatická syringomyelie, obr. 14E,F). Od 3 týdne jsme pozorovali rozvoj atrofie míšní tkáně v místě poranění, což se na MRI projevilo zvětšením subarachnoidálního prostoru (obr. 14C,D). Maximální atrofii míšní tkáně jsme pozorovali na konci pokusu, tedy 6 měsíců po SCI (obr. 14G,H). Hydrogel 1 týden po implantaci měl hyperintenzní signál díky vysokému obsahu vody (obr. 14I,J). Nicméně 5 měsíců po implantaci (6 měsíců po SCI) byl již prakticky izointenzní, což je dáno jeho infiltrací buňkami a redukcí obsahu vody (obr. 14K,L).

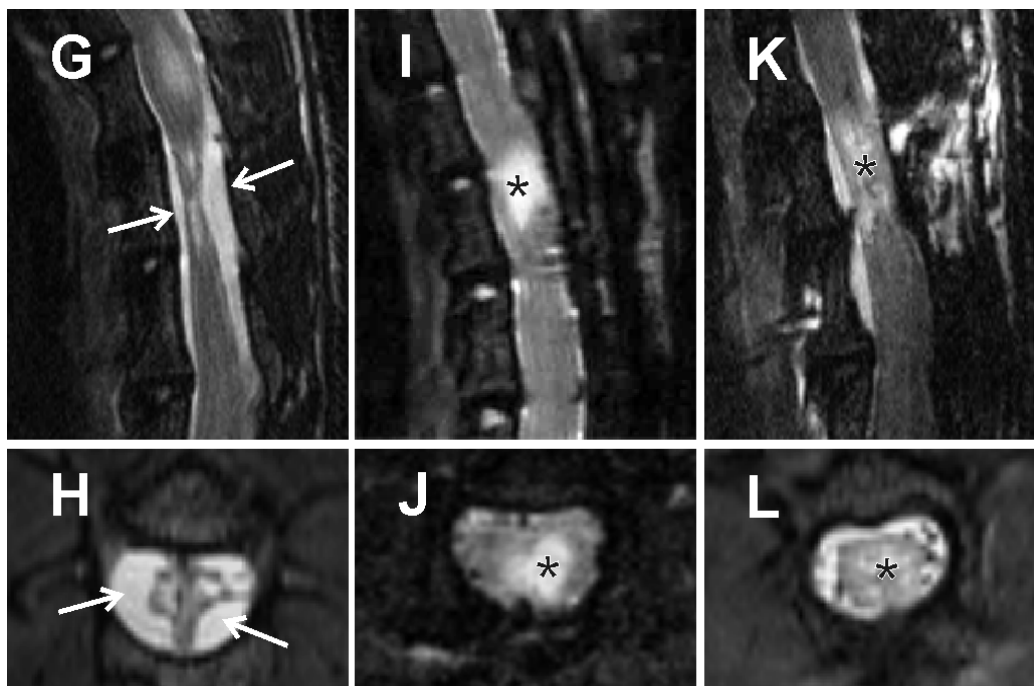
Šest měsíců po SCI jsme provedli perfúzi, histologické zpracování mích u jednotlivých sledovaných skupin. Kontrolní míchy po SCI byly atrofické v porovnání s oběma skupinami s implantovaným hydrogelem (obr. 15). Míšní léze byla u kontrolní skupiny atrofická, tvořená posttraumatickými cystami s minimální reziduální míšní tkání (obr. 16A). V okolí cyst byla astrogliální jizva a na okrajích cyst residuální tkáň s nervovými výběžky (obr. 16C).

U obou skupin s implantovaným hydrogelem HPMA-RGD tyto vytvářely přemostění přes syringomyelickou dutinu a byly infiltrovány cévami, axony, Schwannovými buňkami i astrocyty (obr. 17A-G). Vrstající axony v hydrogelu byly Schwannovými buňkami myelinizovány (obr. 17H,I). U skupiny s implantovaným

hydrogelem s MSC byly kmenové buňky patrné i na konci pokusu, tedy 5 měsíců po implantaci (obr. 17M,N,O).

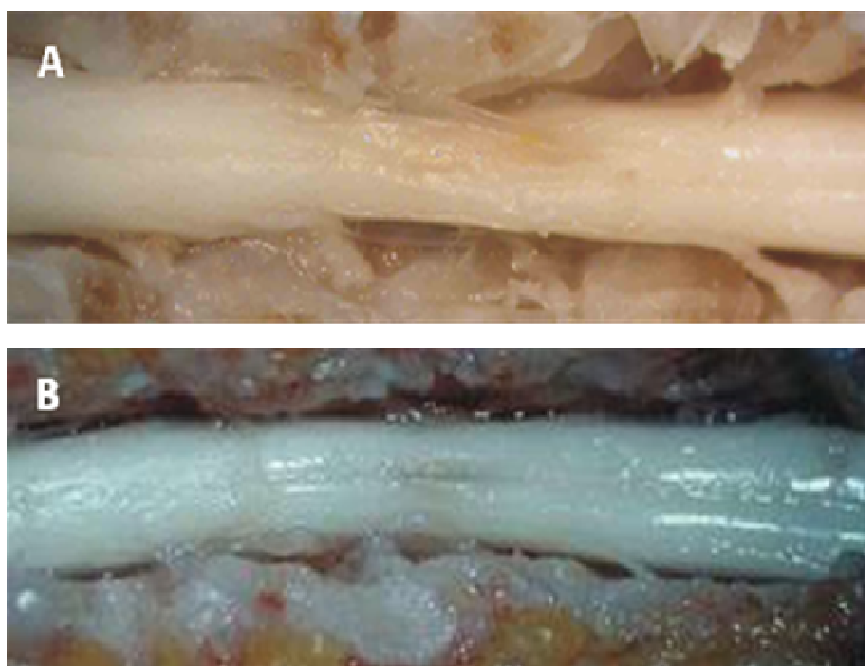
Při morfometrické analýze jsme zjistili, že implantace hydrogelu s kmenovými buňkami kostní dřeně statisticky významně redukuje míšní atrofii kaudálně a kraniálně od centra poškození.





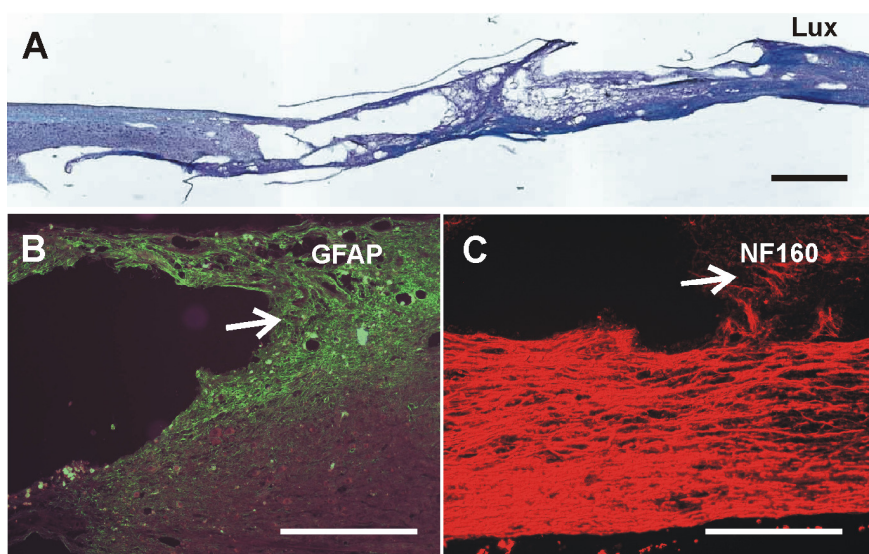
**Obr. 14: Vývoj míšního poranění na MRI (T2-vážené sekvence, sagitální a axiální řezy)**

A, B, Jeden týden po SCI dominuje v oblasti míšní léze otok míšní tkáně (hyperintenzní signál, černý křížek). C, D, Tři týdny po SCI je patrná redukce a demarkace edému s rozvojem lehké atrofie míchy, což zvětšuje objem subarachnoidálního prostoru (bílé šipky). E, F, Pět týdnů po SCI progreduje atrofie míšní a rozvíjí se posttraumatické pseudocysty. G,H, Šest měsíců po SCI je patrná výrazná atrofie míchy s výrazně zvětšeným subarachnoidálním prostorem v okolí míšního poranění (bílé šipky). I,J, Jeden týden po implantaci hydrogelu je patrný v centru poranění hyperintenzní signál s neostrými hranicemi (hydrogel, černá hvězdička). K,L 5 měsíců po implantaci (6 měsíců po SCI) je patrný izointenzní signál v místě implantovaného hydrogelu (hydrogel je infiltrován tkání, redukce množství vody v hydrogelu).



**Obr. 15: Makroskopické hodnocení míchy po SCI a SCI s implantovaným hydrogelem.**

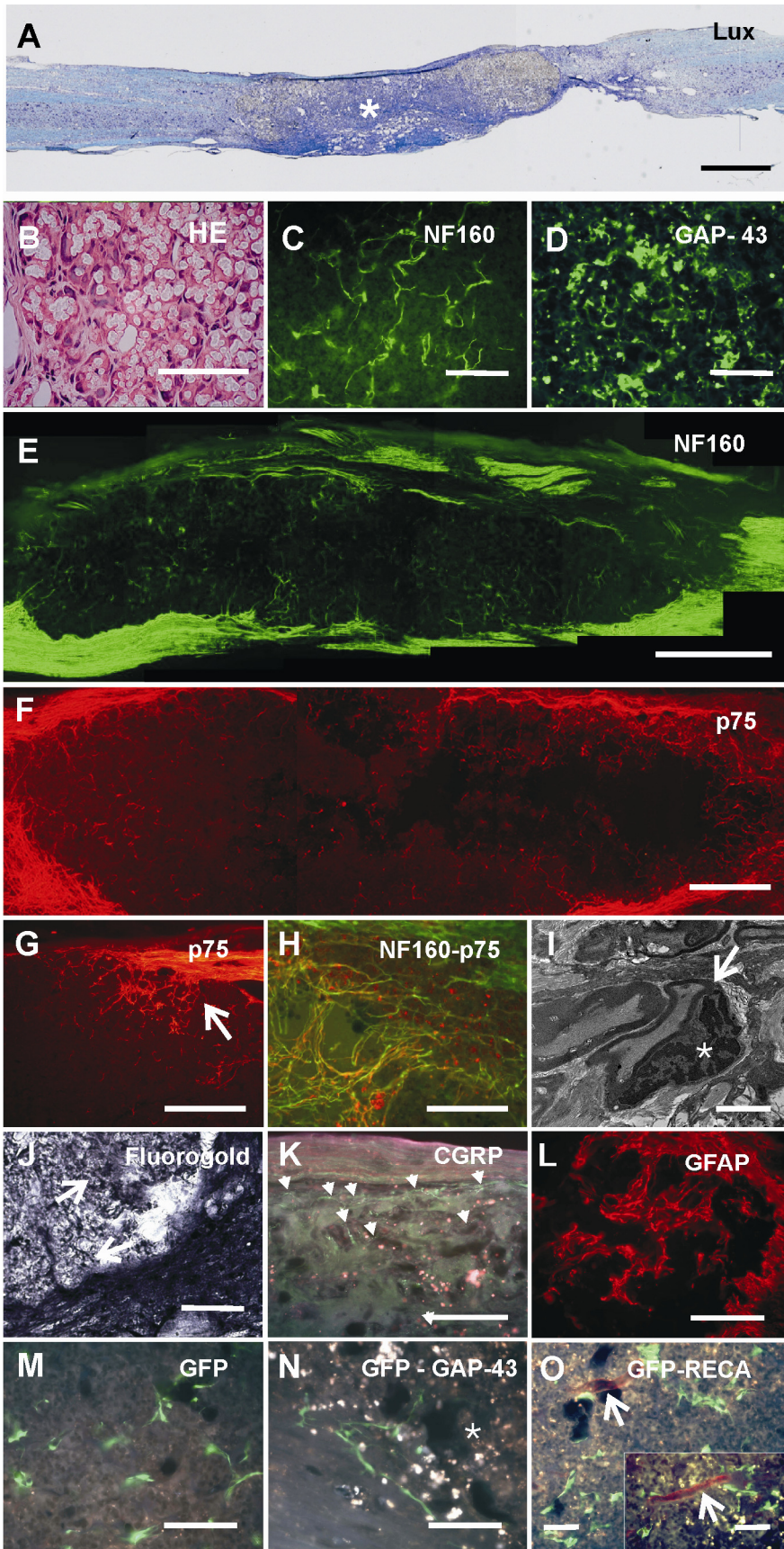
Na makroskopickém obraze míchy 6 měsíců po BCL bez experimentální terapie je patrná atrofie v místě léze (A), na rozdíl od míchy po BCL s implantovaným hydrogelem (B).



**Obr. 16: Míšní tkáň 6 měsíců po poranění (chronická míšní léze)**

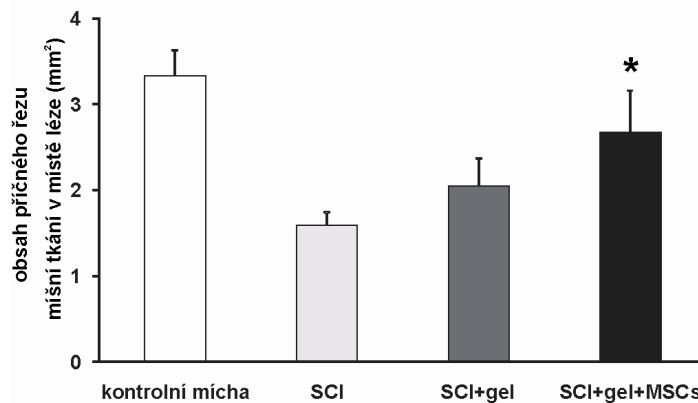
A, Oblasti míšního poranění dominuje atrofie míšní tkáně a četné kavity (měřítko = 500  $\mu\text{m}$ ). B, Astrocyty tvoří hustou síť, astroglální jizvu, kolem posttraumatické kavity (bilá šipka, měřítko = 100  $\mu\text{m}$ ). C, Jen několik málo výběžků nervových buněk (bilá šipka) je patrné v reziduální tkáni v centru míšního poranění (měřítko = 100  $\mu\text{m}$ ).





**Obr. 17: Chronická míšňí léze po implantaci hydrogelu s MSC (6 měsíců po SCI).**

A. Hydrogel (bílá hvězdička) vytvoří přemostění přes centrum léze (měřítko = 500  $\mu\text{m}$ ). B.C. Do periferních (B) stejně jako středových částí (C) hydrogelu vrůstají axony (měřítko B, 100  $\mu\text{m}$ , C, 50  $\mu\text{m}$ ). D. Regenerující axony (GAP-43 pozitivní) jsou přítomny v centru hydrogelu (měřítko = 25  $\mu\text{m}$ ). E. Hydrogel je v celém svém rozsahu infiltrován vrůstajícími nervovými výběžky (měřítko = 500  $\mu\text{m}$ ). F. Také Schwannovy buňky infiltrovaly celý objem hydrogelu (měřítko = 500  $\mu\text{m}$ ). G. Schwannovy buňky rostly z míšňího kořene přes hranici PNS-CNS a odtud vrůstaly do hydrogelu (bílá šipka, měřítko = 100  $\mu\text{m}$ ). H. Dvojitě barvené ukazuje axon (zelený) uvnitř hydrogelu rostoucí spolu se Schwannovou buňkou (červená, měřítko d). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . I. Myelinizace axonu (bílá šipka) Schwannovou buňkou (bílá hvězdička) v obraze elektronové mikroskopie (měřítko = 12  $\mu\text{m}$ ). J. Retrogradní barvení axony CNS vrůstající do hydrogelu (bílá šipka) (měřítko = 50  $\mu\text{m}$ ). K. CGRP-pozitivních axony senzitivních neuron (bílá šipky) infiltrují hydrogel (měřítko = 50  $\mu\text{m}$ ). L. Astrocyty a jejich výběžky nejenže tvořily astroglální jizvu kolem implantovaného hydrogelu, ale také vrůstaly do implantátu. Hojně infiltrovaly periferní části hydrogelu (měřítko = 25  $\mu\text{m}$ ). M. Pět měsíců po implantaci hydrogelu do míšňího poranění tento implantát stále obsahuje živé MSC (měřítko = 50  $\mu\text{m}$ ). N. MSC také cestovaly do míšňí tkáně sousedící s implantovaným hydrogelem (bílá hvězdička, měřítko = 25  $\mu\text{m}$ ). O. MSC nejspíše podpořily infiltraci hydrogelu nově vrůstajícími cévami (bílá hvězdičky), neboť mnoho cév rostlo do implantátu v těsné blízkosti kmenových buněk (detail ve vloženém obrázku, měřítko = 15  $\mu\text{m}$ ).

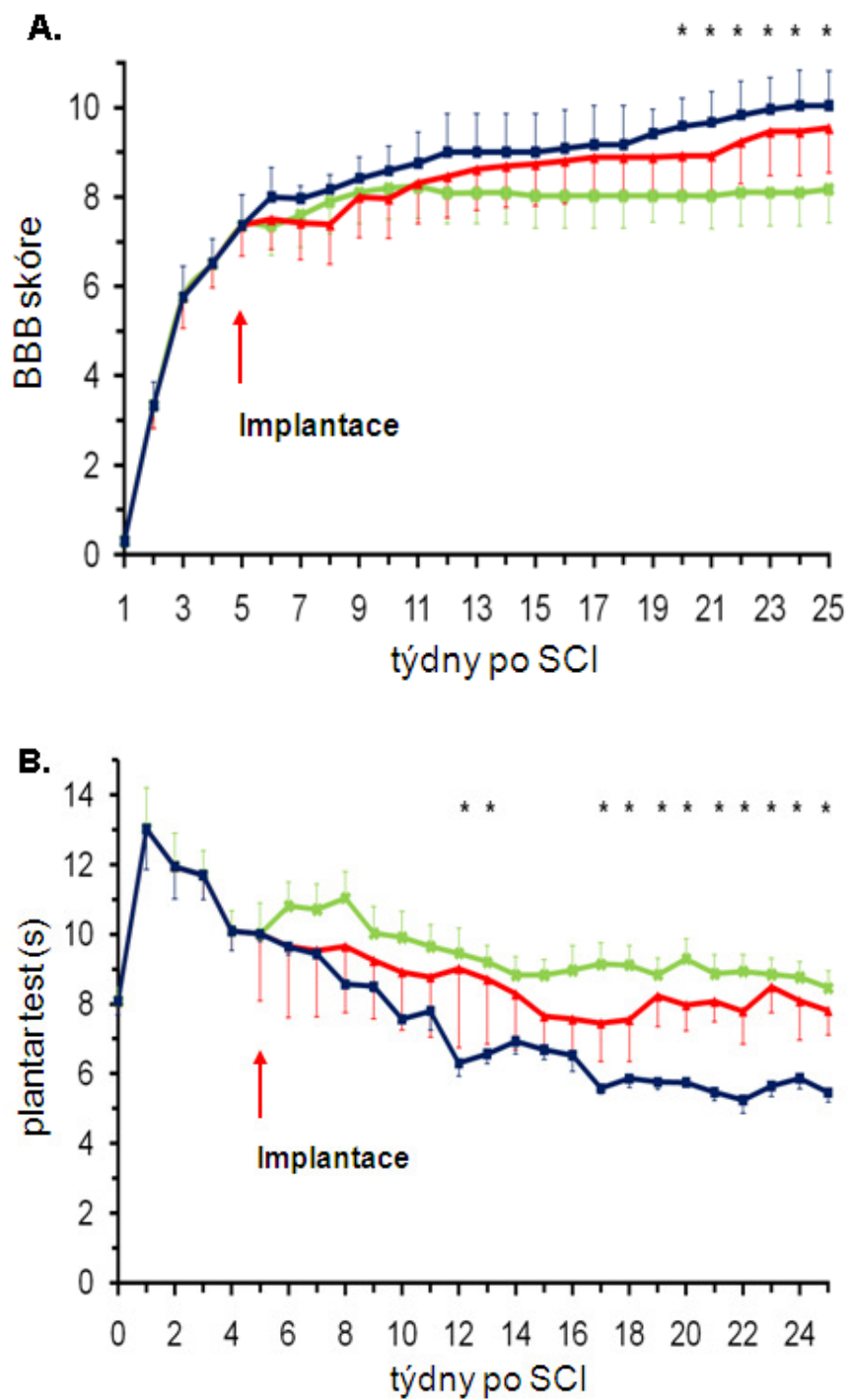


Obr. 18: Hodnocení atrofie míšňí tkáně u balónkové kompresní léze. Grafy značí velikost plochy průřezu zachovalé míšňí tkáně na kraniálním a kaudálním okraji míšňího poranění v úrovni Th8-10 u kontrolní skupiny (bez poranění, kontrolní mícha), u balónkové kompresní léze (SCI), u balónkové kompresní léze po implantaci hydrogelu (SCI+gel) a po implantaci hydrogelu s vyšetřými kmenovými buňkami kostní dřeně (SCI+gel+MSCs). Hvězdička značí statisticky významný rozdíl v porovnání se skupinou zvířat po balónkové kompresní lézi (SCI,  $p < 0.05$ , Studentův nepárový test).

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

Na modelu chronického míšního poranění u laboratorního potkana jsme testovali funkční vliv implantace hydrogelu na bázi HPMA-RGD a hydrogelu HPMA-RGD osázený kmenovými buňkami kostní dřeně. Modelem poranění byla balónková kompresní míšní léze a implantace byla provedena 5 týdnů po poranění. Kontrolní skupinu tvořili laboratorní potkani s balónkovou kompresní lézí. Zvířata byla každý týden behaviorálně testována (BBB a plantar test).

U zvířat s implantovaným hydrogelem osázeným kmenovými buňkami se statisticky významně zlepšila motorika a senzitivita. Sensitivní funkce se zlepšily již v 7. a 8. týdnu po implantaci a následně pak od 12. až do ukončení pokusu. Zlepšení motorických funkcí bylo patrné od 15. týdne a bylo stabilní až do ukončení pokusu. I u skupiny léčené implantací samotného hydrogelu byla tendence ke zlepšení, hlavně ve složce motorické, ale tento rozdíl nebyl v porovnání s kontrolní skupinou statisticky významný (obr. 19).



Obr. 19: Behaviorální testování u chronického SCI po implantaci hydrogelu a hydrogelu s MSC

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



## 5. Diskuze

Poranění míchy není v klinické praxi v současné době léčitelné. V rámci péče o tyto pacienty dnes klinická medicína nabízí v akutní fázi aplikaci metylprednizolonu v dávkování dle studie NASCET III (Bracken *et al.*, 1997) a u nestabilních poranění a těch, u kterých je mícha komprimována, operaci (dekomprese míchy v páteřním kanálu a stabilizaci poraněné páteře). Třetí terapeutickou modalitou je rehabilitace ochrnutých končetin ve specializovaných rehabilitačních centrech (spinální jednotky – Motol, Brno, Ostrava, Liberec) a standardních rehabilitačních odděleních.

Mezi nejčastější formu míšního poranění patří kombinace kontúze a komprese míšní (Kakulas 1984; Bunge *et al.*, 1993). V centru léze se rozvíjí nekróza. Rozvoj patologického ložiska v rámci sekundárního poranění míchy zvětšuje lézi, což má za následek progresi atrofie míšní a rozvoj posttraumatické pseudocysty či pseudocyst. Přemostění posttraumatické pseudocysty je jednou z forem experimentální léčby poranění míchy (Geller a Fawcett 2002).

Přímé rekonstrukční řešení poraněné míšní tkáně není v klinice v současnosti k dispozici. Probíhá zatím jen v experimentálních podmínkách. Hydrogely patří do skupiny bioimplantátů užívaných v experimentální léčbě míšní léze. Jejich výhody souvisejí s jejich vlastnostmi:

1. Jedná se o syntetické materiály, proto nejsme omezeni množstvím, na rozdíl od zdrojů přírodních, není ani nutný odběr materiálu z těla pacienta či jiného jedince před aplikací.
2. Jejich mechanické vlastnosti jsou velmi příznivé pro aplikaci do míšního poranění. Jedná se hlavně o malou míru tuhosti, což zajistí dobrou adaptaci v syringomyelické dutině a tím minimalizuje traumatizaci okolní míšní tkáně.
3. Je možné měnit jejich fyzikální a chemické vlastnosti (náboj, přidávat povrchové funkční skupiny) ke zlepšení regenerace míšní tkáně.

4. Jde o materiály biokompatibilní, a proto nevyvolávají reakci proti cizímu tělesu. Navíc nejsou v medicíně nové. Hydrogely se užívají například ve výrobě kontaktních čoček.

Několik prací našeho i cizích pracovišť ukázalo, že experimentální míšní poranění lze přemostit pomocí hydrogelů (Syková *et al.*, 2006; Hejčl *et al.*, 2008a,b; Hejčl *et al.*, 2009; Hejčl *et al.*, zasláno k publikaci; Woerly *et al.* 1998, 1999). Jestliže se vytvoří experimentální pseudocysta typem sekčního poranění (hemisekce, transekce) a hydrogel se do léze implantuje, dobře k míšní tkáni adheruje a pseudocystu přemostí.

### **5.1. Experimentální modely versus míšní poranění v klinické praxi**

Ve většině experimentálních prací se implantuje hydrogel do sekčního typu míšního poranění, tedy transekce či hemisekce. (Hejčl *et al.* 2008; Woerly *et al.*, 2004, Nomura *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2002). Správně by se mělo udávat parciální či kompletní excize míšního segmentu, neboť vždy se vytne určitý objem míšní tkáně. Tyto experimentální modely ovšem klinicky neodpovídají většině míšních lézí, které jsou způsobeny kombinací míšní komprese a kontúze (Kakulas, 1984; Bunge *et al.*, 1993). V jednom z našich experimentů jsme použili model balónkové míšní kompresní lézi (Vanický *et al.*, 2001). Tento typ experimentálního poranění míchy jsme použili jako model, který se nejlépe blíží reálné klinické situaci. Další jeho výhodou je intaktní páteřní kanál v místě léze, neboť miniinvazivním chirurgickým zákrokem získáme přístup k stlačení míchy balónkem ze segmentů Th13 – L1. V naší práci ukazujeme, že je možné bezpečně provést implantaci hydrogelu do kompresní míšní léze. Při této aplikaci tak nezpůsobíme statisticky významnou funkční změnu u zadních končetin laboratorního potkana. Podobným způsobem aplikoval hydrogel, tzv. Neurogel®, do kontúzní léze i Woerly 3 měsíce od SCI (Woerly *et al.*, 2001). Výhodou aplikace do těchto experimentálních lézí je dobrá imitace reálné klinické situace a lze tedy přiblížit reálné chování hydrogelu v takové lézi. Nicméně i poranění sekčního typu mají v experimentu své opodstatnění. Například u transekce

míchy lze velmi dobře sledovat regeneraci nervových drah přes bioimplantát. Pomocí retrográdních a anterográdních barvení lze demonstrovat prorůstání nervových drah přes hydrogel a tím ukázat, zdali skutečně vlákna rostou a spojí se proximální s distálním pahýlem přes bioimplantát.

## 5.2. Akutní versus chronická implantace hydrogelu

Dalším významným faktorem v experimentální terapii poranění míchy je časování léčby. Aplikace biomateriálů na většině pracovišť probíhá okamžitě po vytvoření míšní léze. Naprostá většina prací zabývajících se aplikací biomateriálů v experimentálním přemostění míchy tyto aplikuje ihned po vytvoření míšní léze (Teng *et al.*, 2002; Bakshi *et al.*, 2004; Woerly *et al.*, 2004). Nicméně, taková situace není klinicky reálná, neboť jakákoliv terapie, a zvláště chirurgická, bude vždy provedena s určitým odstupem od vzniku primární léze. Jeden z faktorů zpoždění je vlastní transport pacienta do nemocnice a následně na operační sál. Tento je otázkou pouze několika hodin. Dalším a jistě významnějším faktorem je obtížně předpověditelný vývoj léze a z toho nejasný klinický výsledek takového poranění u jednotlivého pacienta. Hydrogel aplikovaný v prostředí rozvíjejícího se míšního edému by mohl funkční stav pacienta naopak zhoršit. Jeho aplikace se spíše jeví smysluplná v období morfologické stabilizace léze míšní. V našich experimentech jsme provedli aplikaci ve dvou časových oknech. V jedné práci jsme provedli implantaci hydrogelu do transekce míšní (kompletní excize přibližně 1 míšního segmentu) v úrovni Th 8 ve dvou časových obdobích – okamžitě po transekcii (akutní léčba) a s týdenním odstupem (odložená léčba). Hydrogely implantované po 1 týdnu od vzniku léze statisticky významně redukovaly objem posttraumatické pseudocysty v porovnání s akutní implantací. V naší práci jsme tak ukázali, že i přes stejný klinický efekt (přetrvávající paraplegie) se statisticky významně redukovala rozvíjející se posttraumatická pseudocysta a tím se zmenšila atrofie míšní tkáně.

Nevýhodou transekce coby experimentálního modelu při odložené aplikaci hydrogelu je značné jizvení v epidurálním i subdurálním prostoru. Odložená

aplikace je proto technicky obtížná. Na druhou stranu je transekce výhodnější v porovnání s parciální sekci, hemisekcí, kde by se při odložené aplikaci poranila reziduální tkáň v operovaném segmentu vzhledem k nutné velké manipulaci v jizevnatém prostoru. Proto při odložené aplikaci je vhodné použít model míšního poranění, u kterého není významné jizvení v místě léze v okolí poraněné míchy, například balónková kompresní léze (viz níže).

### **5.3. Vliv hydrogelu na atrofii míšní tkáně následkem poranění míchy**

Hydrogel, coby implantát, slouží nejenom jako přemostění přes posttraumatickou kavitu, ale má také vliv na okolní míšní tkáň. Hydrogel může redukovat velikost astroglální jizvy v okolí míšní léze (Woerly *et al.*, 2004). Dle našich výsledků také implantace hydrogelu redukuje atrofii okolní míšní tkáně. Přitom odložená implantace hydrogelu u sekčního poranění může ještě významněji redukovat atrofii okolní míchy (Hejčl *et al.*, 2008). V naší další práci (Hejčl *et al.*, *zasláno k publikaci*), kdy jsme provedli implantaci hydrogelu do balónkové léze až 5 týdnů po vzniku léze, hydrogely s vyšetými MSC statisticky významně redukovaly atrofii míšní tkáně oproti kontrolní skupině (BCL bez implantace). Také u skupiny, ve které byl implantován jen hydrogel, byla průměrná velikost zachovalé tkáně větší v porovnání s kontrolní skupinou (BCL bez implantace); tento rozdíl však nebyl statisticky významný.

Hydrogel, implantovaný do posttraumatické kavity, dobře adhezuje k okolní míšní tkáni. Porézní struktura implantátu umožňuje vrůstání cév, které mohou zajistit dodávku živin a axonů. Tím, že hydrogel nabízí „lešení“ pro vrůstání elementů CNS (Teng *et al.*, 2002; Bakshi *et al.*, 2004; Woerly *et al.*, 2004) a redukuje gliální jizvu (Woerly *et al.*, 2004), umožní tak nejspíše zachovat okolní míšní tkáň a zabráni její nekrotizaci.

### **5.4. Implantace hydrogelu do chronické míšní léze**

Většina experimentálních prací se týká akutní či subakutní fáze míšního poranění. Přesto existují i práce zabývající se chronickou či subchronickou fází SCI. Ve většině prací je i implantace u chronických lézí prováděna 1 až 6 měsíců od SCI. Přímá injekce stromálních buněk kostní dřeně (BMSCs – bone marrow stromal cells) 3 měsíce od indukce těžkého SCI zlepšila funkční výsledky. Dle histologického vyšetření implantované buňky vytvářely v místě poranění buněčná přemostění. Některé buňky také exprimovaly neuronální a gliální markery a byla patrná proliferace buněk ependymu (Zurita a Vaquéro 2004). Implantace štěpu kombinujícího fetální tkáň mozku a periferních nervů po 3 měsících od vzniku SCI zlepšila funkci zadních končetin, zesílila svalovou hmotu a podpořila vznik nových nervových vláken generovaných z oblasti štěpu a vedoucích až k nervosvalovým ploténkám (Zurita *et al.*, 2001).

Implantace hydrogelu, coby léčebná modalita SCI, je možná také spíše v chronické fázi, nikoliv v akutní z důvodů výše uvedených. Existuje jen málo studií hodnotících vliv implantace hydrogelu do chronické míšní léze. Hydrogel (Neurogel®) implantovaný u potkanů s kontúzní lézí 14 týdnů po SCI a držných v obohaceném prostředí (*angl.* enriched environment) byl infiltrován výběžky myelinizovaných nervových vláken, cév i astrocytů, což se projevilo ve funkčním zlepšení motoriky zadních končetin u potkanů v porovnání s kontrolní skupinou. V naší studii jsme provedli implantaci hydrogelu osetého kmenovými buňkami MSC 5 týdnů od balónkové kompresní léze. Jedná se o neostrou inkompletní lézi míšní, tak jako ve většině klinických případů. Implantace hydrogelu do takovéto léze proto velmi dobře napodobuje možnou budoucí aplikaci u pacientů se SCI. BCL umožňuje hodnotit vliv implantovaného hydrogelu na funkci míchy, atrofii a regeneraci míšní tkáně. Senzitivita se rychleji zlepšila v porovnání s motorickou funkcí. Již ve 12. a 13. týdnu po BCL (7. a 8. týden po implantaci hydrogelu) byl pozorován statisticky významný rozdíl oproti kontrole. Tento rozdíl se pak stabilizoval od 17. týdne a byl patrný až do 25. týdne po BCL. U motorické funkce byl průběh zlepšení pomalejší. Statisticky významnému zlepšení se objevilo ve 20. týdnu po BCL, tedy v 15. týdnu

po implantaci hydrogelu s MSC. Přitom ani po 6 měsících nebylo patrné zřetelné plateau a lze předpokládat, že se mohlo rozvíjet další funkční zlepšení. Tyto funkční výsledky ukazují, že zvláště u chronických lézí je nutná dlouhodobá observace před tím, než můžeme výsledek považovat za definitivní. Histologická vyšetření jsme provedli 6 měsíců od SCI, tedy necelých 5 měsíců od implantace hydrogelu. Tento byl kompletně infiltrován cévami, výběžky neuronů myelinizovaných Schwannovými buňkami a také astrocyty. Zároveň jsme pozorovali redukci atrofie míšní tkáně (Hejčl *et al.*, zasláno k publikaci).

Hydrogely tedy představují slibnou modalitu v léčbě chronického SCI. Jejich potenciál se zvyšuje v kombinaci s dalšími modalitami, jako je kombinace s kmenovými buňkami (Hejčl *et al.*, zasláno k publikaci) či obohacené prostředí (angl. enriched environment, Woerly *et al.*, 2004). Nevyřešenou otázkou zatím zůstává délka terapeutického okna a doba, po kterou lze očekávat zlepšování jak ve složce morfologické, tak především funkční.

## **5.5. Vliv povrchové modifikace hydrogelu na regeneraci míšní tkáně**

Jednou z výhod hydrogelů je to, že se jedná o syntetické materiály. Je tedy možno modifikovat jejich fyzikální a chemické vlastnosti s cílem zlepšit regeneraci funkcí CNS. Jedním ze způsobů je modifikace povrchových vlastností hydrogelů (náboj, adhezivní molekuly). V jedné z našich studií jsme hodnotili vliv povrchového náboje hydrogelu na podkladě různých funkčních skupin. Dle této studie pozitivní povrchový náboj na hydrogelu zvyšuje vrůstání axonů a elementů pojivové tkáně do pórů hydrogelů. Buněčná adheze k implantátu je jednou z vlastností s významným vlivem na biokompatibilitu a redukci atrofie míšní tkáně. Povrchový náboj je jedním z faktorů ovlivňujících buněčnou adhezi (Han *et al.*, 2005; Lesný *et al.*, 2006). Existuje několik studií, které porovnávají buněčnou adhezi na pozitivně či negativně nabitých površích. Výsledky se přitom různí. Při porovnání adsorpce fibronektinu na pozitivních a negativních površích byla tato vyšší na těch pozitivních (Wittmer *et al.*, 1996). Zatímco podle některých prací je vyšší adhezivita buněk na pozitivně nabitých

s polykationtovými funkčními skupinami (Richert *et al.*, 2004a,b), dle jiných byla zjištěna nejsilnější adhezivita a šíření buněk po površích s negativním nábojem (Kidambi *et al.*, 2004). U hydrogelů s negativně nabitými funkčními skupinami byla zjištěna zvýšená infiltrace pojivové tkáně (Woerly *et al.*, 1992), zatímco jiné práce neprokázaly žádný vliv povrchového náboje (Mendelsohn *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2005). Z těchto prací můžeme shrnout, že neexistuje všeobecný konsenzus vlivu povrchového náboje biomateriálu na adhezi buněk. V naší studii jsme použili hydrogely, které všechny měly polarizované funkční skupiny na svém povrchu. Existují však některé práce, které ukazují, že hydrogely bez polarizovaných funkčních skupin mají horší adhezivitu a jsou infiltrovány menším množstvím buněk než u hydrogelů s polarizovanými funkčními skupinami (Woerly *et al.*, 1992; Hallab *et al.*, 1995).

Výsledky našich studií ukazují, že axonální regeneraci podpořily hydrogely s pozitivními funkčními skupinami v porovnání s hydrogely s negativními funkčními skupinami. Hydrogely s pozitivně nabitými funkčními skupinami podpořily vrůstání axonů do centrálních částí hydrogelu. Navíc všechny tři typy hydrogelů s polarizovanými skupinami (HEMA+, HEMA+/-, HEMA-) podpořily axonální regeneraci v porovnání s hydrogelem bez náboje. V souladu s naší studií i předchozí studie ukázaly, že neurony preferenčně adherují k povrchům s pozitivním nábojem (Bledi *et al.*, 2000; Lakard *et al.*, 2004; Oliva *et al.*, 2003; Branch *et al.*, 2000).

Regenerace axonů může být také ovlivněna chemickými modifikacemi povrchu. Woerly *et al.* studoval hydrogel na bázi HPMA s navázanými oligopeptickými sekvencemi (RGD). PHPMA-RGD hydrogel ukázal silnější adhezi k okolní tkáni a podpořil vrůstání a šíření astrocytů a neurofilament do hydrogelu (Woerly *et al.*, 1995). Míšní ganglia v kultuře na agarózovém hydrogelu s kovalentně navázaným chitosanem ukázala statisticky významně větší délku regenerujících axonů (Lakard *et al.*, 2005).

Z naší i ostatních studií je jasné, že při další syntéze biomateriálů pro rekonstrukční operace míšní tkáně je nutné dbát na povrchové vlastnosti materiálů.

Vlastnosti a schopnosti jednotlivých skupin, které mohou ovlivnit povrchové vlastnosti hydrogelů je nutno ještě nadále studovat.

## 5.6. Vstřebatelné hydrogely

Vstřebatelné, neboli biodegradabilní hydrogely reprezentují významnou skupinu biomateriálů. Hlavní výhodou biodegradabilních hydrogelu je to, že mohou poskytnout základní strukturální kostru pro regeneraci elementů nervové a poté, co je defekt přemostěn novou tkání, struktura gelu se postupně rozpadne. Existuje několik málo prací, které se zabývají užitím biodegradabilních hydrogelů u SCI (Novikov *et al.*, 2002; Novikova *et al.*, 2003). Vhodným využitím biodegradabilních hydrogelů je kombinace např. s růstovými faktory, kde postupná degradace zajistí kontrolované uvolňování takového faktoru do okolí. Například kombinace vstřebatelného hydrogelu na bázi laktátu v kombinaci s NT-3 zlepšila funkci a prodloužila růst kortikospinální dráhy a raphe-spinálního traktu (Piantino *et al.*, 2006).

Přesto existuje několik omezení tohoto přístupu, jako je například nebezpečí vzniku neurotoxických degradačních produktů (ani v jedné z výše uvedených studií nebyly zaznamenány). Dalším otazníkem zůstává rychlost degradace. V naší studii jsme zjistili, že u biodegradabilních hydrogelů na bázi kopolymeru HPMA EOEMA se implantát postupně rozpadá z periferních částí směrem k centru (Přádný *et al.*, 2006; Hejčl *et al.*, 2008). Tato část je nahrazena novou tkání, obsahující cévy, nervové výběžky. V centrální části pak zbývá amorfni hmota nevstřebaných zbytků hydrogelu. Bude tedy nutno zjistit ideální rozpadovou rychlost hydrogelu, která umožní nově vznikající tkáni plně přerůst místo defektu a zároveň zajistí kompletní degradaci implantátu, včetně jeho centrální části.

## 5.7. Kombinovaná léčba – kmenové buňky a hydrogely

Kmenové buňky patří mezi velmi slibnou modalitu léčby SCI. Jejich jednotlivé podskupiny mohou různým způsobem přispět k funkční i morfológické rekonstrukci



SCI. Embryonální, fetální i dospělé buňky CNS jsou schopny generovat nové neurony a gliální elementy, jsou tedy schopny nahradit ztracené buňky (angl. REPAIR). Na druhou stranu, dominantním přínosem MSC je záchrana poraněných buněk a buněk v ohrožení sekundárním traumatem (angl. RESCUE). Mohou tak působit pomocí neurotrofinů, indukovat proliferaci endogenních kmenových buněk, podpořit myelinizaci axonů, podpořit revaskularizaci poraněné míšní tkáně, redukovat atrofii míšní a rozvoj posttraumatické kavity a astrogliální jizvu (Urdzíková *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2004; Akiyama *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2001)

V mnoha pracích jak na našem (Prockop 1997, Urdzíková *et al.*, 2006; Jendelová *et al.* 2004, Syková and Jendelová 2005, Nandoe *et al.* 2006, Syková *et al.* 2006a,b, Syková and Jendelová 2006, Urdzíková *et al.* 2006, Syková and Jendelová 2007a,b) tak i jiných pracovištích bylo dokázáno, že léčba míšního poranění pomocí kmenových buněk kostní dřeně (systémová i lokální) statisticky významně zlepšuje motorických a sensitivní funkce zadních končetin a k redukci atrofie míšní. Přitom některé práce dokazují, že lokální léčba má lepší výsledky nežli systémová aplikace (Vaquero *et al.*, 2006b). Navíc MSC mohou mít pozitivní vliv na motorickou funkci i regeneraci poraněné míchy i v chronické fázi SCI (Zurita *et al.*, 2006, 2008). Hydrogel tedy může sloužit nejen jako základní struktura pro regeneraci elementů míšní tkáně, ale i jako nosič kmenových buněk. Dle naší studie jsou schopny MSC přežívat v hydrogelu minimálně po dobu 5 měsíců od implantace (Hejčl *et al.*, zasláno k publikaci). Implantací hydrogelu s vyšetými kmenovými buňkami můžeme zajistit lokální působení kmenových buněk a kombinaci pozitivního vlivu obou modalit.

## 6. Závěry

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

byla nahrazena novou tkání, obsahující regenerující axony. Velikost periferní části byla přímo úměrná rychlosti vstřebávání hydrogelu.

4. Transekce míchy má za následek rozvoj progresivně se zvětšující posttraumatické kavity. Odložená implantace hydrogelu (po 7 dnech) po 3 měsících statisticky významně redukovala objem posttraumatické kavity v porovnání s okamžitou implantací. Implantace hydrogelu statisticky významně zmenšuje objem kavity v porovnání s transekcí míchy.

5. Hydrogel na bázi HPMA, buď s MSCs nebo bez MSCs, přemostil chronickou míšňí lézi. Do implantátu vrůstaly axony, Schwannovy buňky, astrocyty, cévy i pojivová tkáň. MSCs byly přítomny v hydrogelu i 5 měsíců po implantaci. Implantace hydrogelu ošetěho MSCs u chronického SCI statisticky významně redukovala atrofii míšňí tkáňě.

6. Implantace hydrogelu ošetěho MSCs do chronického SCI, na rozdíl od implantace hydrogelu samotného, vedla ke statisticky významnému zlepšění motorické i senzitivní funkce zadních končetin u laboratorního potkana ve srovnání s chronickým SCI bez léčby.

## **7. Souhrn**

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

Fyzikální modifikace (např. povrchový náboj) hydrogelů mohou zlepšit přemostění akutního SCI. V hemisekci míšňí jsme implantovali hydrogely na bázi HEMA s povrchovými náboji a porovnali s hydrogelem bez náboje. Hydrogely

s povrchovým nábojem po 1 měsíci podpořily adhezi pojivových buněk a růst axonů do implantátu v porovnání s hydrogelem bez náboje.

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

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

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

## **8. Summary**

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

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

surface charge improved connective tissue adhesion and growth of axons compared to a hydrogel without charge.

Biodegradable hydrogels may bridge a lesion followed by complete resorption. In a model of acute SCI we implanted hydrogels based on the copolymer of HPMA and etoxyethylmethacrylate (EOMA) degraded from the periphery, which was substituted with new tissue after 1 month, to the center, comprising amorphous residuals of the hydrogel.

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

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

## 9. Literatura

1. Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci.* 2002; 22:6623–6630.
2. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *J Am Med Assoc.* 1911; 57:878-880.
3. Amemori T, Jendelová P, Růžičková K, Arboleda D, Syková E. Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat. *Cytherapy. v tisku*

4. [Atkinson PP](#), [Atkinson JL](#). Spinal shock [Mayo Clin Proc](#). 1996; 71:384-9.
5. Ayer JB. Cerebrospinal fluid in experimental compression of the spinal cord. [Arch Neurol Psychiat](#). 1919; 2:158-164.
6. [Bakshi A](#), [Fisher O](#), [Dagci T](#), [Himes BT](#), [Fischer I](#), [Lowman A](#). Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury. [Neurosurg Spine](#). 2004;1:322-9.
7. Barami K, Diaz FG. Cellular transplantation and spinal cord injury. [Neurosurgery](#) 2000; 47:691-700.
8. Bartholdi D, Schwab ME. [Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat](#). [Brain Res](#). 1995; 672:177-86.
9. [Basso DM](#), [Beattie MS](#), [Bresnahan JC](#). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. [J Neurotrauma](#). 1995; 12:1-21.
10. Beattie MS, Lopate G, Bresnahan JC. Metamorphosis alters the response to spinal cord transection in *Xenopus laevis* frogs. [J Neurobiol](#). 1990; 21:1108-1122.
11. Bledi Y, Domb AJ, Linial M. [Culturing neuronal cells on surfaces coated by a novel polyethyleneimine-based polymer](#). [Brain Res Brain Res Protoc](#). 2000; 5:282-9.
12. Blesch A, Tuszynski MH. GDNF gene delivery to injured adult CNS motor neurons promotes axonal growth, expression of the trophic neuropeptide CGRP, and cellular protection. [J Comp Neurol](#). 2001; 436:399-410
13. Bloch J, Fine EG, Bouche N, Zurn AD, Aebischer P. Nerve growth factor and neurotrophin-3-releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. [Exp Neurol](#). 2001; 172:425-32
14. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, 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. [N Engl J Med](#). 1990; 322:1405-11.



15. 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; 277:1597-604.
16. Bradbury EJ, Khemani S, King VR, Priestley JV, McMahon SB. NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord. Eur J Neurosci. 1999; 11:3873-3883.
17. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. Nature. 2002; 416:636-40.
18. Branch DW, Wheeler BC, Brewer GJ, Leckband DE. [Long-term maintenance of patterns of hippocampal pyramidal cells on substrates of polyethylene glycol and microstamped polylysine.](#) IEEE Trans Biomed Eng. 2000; 47:290-300.
19. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures. J Neurol Sci. 1996; 136:17-23.
20. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. [From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice.](#) Science. 2000; 290:1775-9.
21. Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD 3rd, Noyes DH. [A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device.](#) Exp Neurol. 1987; 95:548-70.
22. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Reier PJ, Dai HN, McAtee M, Gao D. Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. Exp Neurol. 1993; 123:3-16.

23. Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A, Davies AM. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron*. 1995; 15:821–28.
24. Bunge MB. Bridging areas of injury in the spinal cord. *Neuroscientist*. 2001; 7:325–39.
25. Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, Marcillo A, Quencer RM. [Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination.](#) *Adv Neurol*. 1993; 59:75-89.
26. Carlstedt T, Cullheim S, Risling M, Ulfhake B. Nerve fibre regeneration across the PNS-CNS interface at the root-spinal cord junction. *Brain Res Bull*. 1989; 22:93-102.
27. Carlstedt T. Nerve fibre regeneration across the peripheral-central transitional zone. *J Anat*. 1997; 190:51-56.
28. Caroni P, Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*. 1988; 1:85–96.
29. 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; 403:434–39.
30. Chevassus-Au-Louis N, Niquet J, Ben-Ari Y et al. Cellular plasticity. In: Engel J Jr, Pedley TA, eds. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997; 133-155.
31. Chong MS, Woolf CJ, Turmaine M, Emson PC, Anderson PN. Intrinsic versus extrinsic factors in determining the regeneration of the central processes of rat dorsal root ganglion neurons: the influence of a peripheral nerve graft. *J Comp Neurol*. 1996; 370:97-104.

32. Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R. Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83:1013–19.
33. [Dalton PD](#), [Flynn L](#), [Shoichet MS](#). Manufacture of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as nerve guidance channels. *Biomaterials.* 2002; 23:3843-51.
34. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science.* 1981; 214:931-3.
35. Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature.* 1997; 390:680-683.
36. Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 1999; 15:5810-5822.
37. [Deshpande DM](#), [Kim YS](#), [Martinez T](#), [Carmen J](#), [Dike S](#), [Shats I](#), [Rubin LL](#), [Drummond J](#), [Krishnan C](#), [Hoke A](#), [Maragakis N](#), [Shefner J](#), [Rothstein JD](#), [Kerr DA](#). Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol.* 2006; 60:32-44.
38. Dijkhuizen PA, Hermens WT, Teunis MA, Verhaagen J. Adenoviral vector directed expression of neurotrophin-3 in rat dorsal root ganglion explants results in a robust neurite outgrowth response. *J Neurobiol.* 1997; 33:172–84.
39. Dillon GP, Yu X, Sridharan A, Ranieri JP, Bellamkonda RV. [The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold.](#) *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998; 9:1049-69.
40. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease *Neuroscience.* 1993; 54:15-36.
41. Emgård M, Holmberg L, Samuelsson EB, Bahr BA, Falci S, Seiger A, Sundström E. [Human neural precursor cells continue to proliferate and exhibit low cell death after transplantation to the injured rat spinal cord.](#) *Brain Res.* 2009; 1278:15-26.

42. Emery E, Aldana P, Bunge MB, [Puckett W](#), [Srinivasan A](#), [Keane RW](#), [Bethea J](#), [Levi AD](#). Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1998; 89:911–920.
43. Facchiano F, Fernandez E, Mancarella S, Maira G, Miscusi M, D'Arcangelo D, Cimino-Reale G, Falchetti ML, Capogrossi MC, Pallini R. [Promotion of regeneration of corticospinal tract axons in rats with recombinant vascular endothelial growth factor alone and combined with adenovirus coding for this factor](#). *J Neurosurg*. 2002; 97:161-8.
44. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull*. 1999; 49:377–91.
45. Fine EG, Decosterd I, Papaloizos M, Zurn AD, Aebischer P. GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur J Neurosci*. 2002; 15:589–601.
46. Franklin RJ, Barnett SC. Do olfactory glia have advantages over Schwann cells for CNS repair? *J Neurosci Res*. 1997; 50:665–72
47. Friesel RE, Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEBJ*. 1995; 9:919–25.
48. Geller HM, Fawcett JW. Building a bridge: engineering spinal cord repair. *Exp Neurol*. 2002; 174:125–36.
49. Gerlach M, Braak H, Hartmann A, [Jost WH](#), [Odin P](#), [Priller J](#), [Schwarz J](#). Current state of stem cell research for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol*. 2002; 249:33–5.
50. Gravel C, Gotz R, Lorrain A, Sendtner M. Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor leads to long-term survival of axotomized motor neurons. *Nat Med*. 1997; 3:765–70.
51. [Green BA](#), [Kahn T](#), [Klose KJ](#). [Surg Neurol](#). A comparative study of steroid therapy in acute experimental spinal cord injury. 1980; 13:91-7.
52. [Gruner JA](#). A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. [J Neurotrauma](#). 1992; 9:123-6.

53. Hagell P, Schrag A, Piccini P, et al. Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain* 1999;122:1121-32.
54. Hagell P, Brundin P. Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60:741-52.
55. Hagell P, Schrag A, Piccini P, Jahanshahi M, Brown R, Rehnström S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Odin P, Wenning GK, Morrish P, Gustavii B, Björklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O. Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain*. 1999; 122:1121-32.
56. Hall M. On the diseases and derangements of the nervous system, in their primary forms and in their modifications by age, sex, constitution, hereditary disposition, excesses, general disorder, and organic disease. London: H. Bailliere. 1841.
57. Hall M. Synopsis of the Diastaltic Nervous System. London: J Mallett. 1850.
58. Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Clark R, Moses RL. [Cell adhesion to biomaterials: correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein, and cell morphology.](#) *J Long Term Eff Med Implants*. 1995; 5:209-31.
59. Han DW, Sub Lee M, Park BJ, Kim JK, Park JC. [Enhanced neurite outgrowth of rat neural cortical cells on surface-modified films of poly\(lactic-co-glycolic acid\).](#) *Biotechnol Lett*. 2005; 27:53-8.
60. [Harel A](#), [Fainaru M](#), [Shafer Z](#), [Hernandez M](#), [Cohen A](#), [Schwartz M](#). Optic nerve regeneration in adult fish and apolipoprotein A-I. *J Neurochem*. 1989; 52:1218-28.
61. Hejčl A., Lesný P., Příkladný M., Šedý J., Zámečník J., Jendelová P., Michálek J., Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 6: 3D hydrogels with positive and negative surface charges and polyelectrolyte complexes in spinal cord injury repair. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20:1571-7.
62. Hejčl A, Urdzíkova L, Lesný P, Příkladný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Zámečník J, Jendelová P, Syková E. Acute and delayed implantation of positively

- charged HEMA scaffold in spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurosurgery (Spine)*. 2008a; 8: 67-73.
63. Hejčl A., Lesný P., Příkladný M., Michálek J., Jendelová P., Syková E. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol Res*. 2008b; 57:S121-32.
64. Hejčl A, Šedý J, Kapcalová M, Arboleda Toro D, Amemori T, Lesný P, Likavčanová- Mašínová K, Burian M, Krumbholcová E, Příkladný M, Michálek J, Hájek M, Jendelová P, Syková E. HEMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *submitted*
65. Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, [Karihaloo M](#), [Rullamas J](#), [Evans T](#), [McMahon SB](#), [Armanini MP](#), Berkemeier L, Phillips HS, Rosenthal A. Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature*. 1993; 363:266–70.
66. Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M,
67. Simmons LC, Moffet B, Vandlen RA, Koliatsos VE, Rosenthal A. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*. 1994; 266:1062–64.
68. Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, [Misko TP](#), [Shooter E](#), [Thoenen H](#). Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987; 84:8735–39.
69. Hugenholtz H, Cass DE, Dvorak MF, Fewer DH, Fox RJ, Izukawa DM, Lexchin J, Tuli S, Bharatwal N, Short C. High-dose methylprednisolone for acute closed spinal cord injury--only a treatment option. *Can J Neurol Sci*. 2002; 29:227-35.
70. Hurlbert RJ Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*. 2000; 93:1-7.
71. [Hwang JJ](#), [Jelacic S](#), [Samuel NT](#), [Maier RV](#), [Campbell CT](#), [Castner DG](#), [Hoffman AS](#), [Stayton PS](#). Monocyte activation on polyelectrolyte multilayers. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2005; 16:237-51.

72. Iwashita Y, Kawaguchi S, Murata M. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature*. 1994; 367:167-70.
73. Jendelová P, Herynek V, Urdžíková L, Glogarová K, Kroupová J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hijek M, Syková 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; 76:232-43.
74. Jendelová P, Lesný P, Hejčl A, Příkladný M, Michálek J, Syková E. The implantation of biodegradable macroporous polymer hydrogels into the injured rat spinal cord. *Experimental Neurology* 2005; 193: 248.
75. Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, acellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J. Physiol*. 2001; 533:83–89.
76. Kakulas BA. [Pathology of spinal injuries](#). *Cent Nerv Syst Trauma*. 1984; 1:117-129.
77. Kakulas BA. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2004; 42:549-563.
78. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, Morshead CM, Fehlings MG. [Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury](#). *J Neurosci*. 2006; 26:3377-89.
79. [Kataoka K, Suzuki Y, Kitada M, Ohnishi K, Suzuki K, Tanihara M, Ide C, Endo K, Nishimura Y](#). Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats. [J Biomed Mater Res](#). 2001 Mar 5;54(3):373-84.
80. Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neuroscience*. 2002; 22: 635–8.
81. Khan M, Griebel R. [Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques](#). *Can J Neurol Sci*. 1983; 10:161-5.

82. Kidambi S, Lee I, Chan C. [Controlling primary hepatocyte adhesion and spreading on protein-free polyelectrolyte multilayer films.](#) J Am Chem Soc. 2004; 126:16286-7.
83. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. [Enhanced in situ detection of beta-glucuronidase activity in murine tissue.](#) J Histochem Cytochem. 1999; 47:965-8.
84. Lakard S, Herlem G, Propper A, Kastner A, Michel G, Vallès-Villarreal N, Gharbi T, Fahys B. [Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials.](#) Bioelectrochemistry. 2004; 62:19-27.
85. Lakard S, Herlem G, Valles-Villareal N, Michel G, Propper A, Gharbi T, Fahys B. [Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications.](#) Biosens Bioelectron. 2005; 20:1946-54.
86. Lakatos A, Franklin RJ, Barnett SC. Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. Glia. 2000; 32:214–25.
87. Lavik E, Teng YD, Snyder E, Langer R. Seeding neural stem cells on scaffolds of PGA, PLA, and their copolymers. Methods Mol Biol. 1992; 198: 89–97.
88. [Lazarov-Spiegler O](#), [Solomon AS](#), [Zeev-Brann AB](#), [Hirschberg DL](#), [Lavie V](#), [Schwartz M](#). [FASEB J](#). Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. 1996; 10:1296-302.
89. 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; 23:243-7.
90. 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; 17:829-33.
91. Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. Trends Neurosci. 2001;24:39-47



92. Levison SW, Ducceschi MH, Young GM, Wood TL. Acute exposure to CNTF in vivo induces multiple components of reactive gliosis. *Exp Neurol*. 1996; 141:256–68.
93. Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science*. 1997; 277:2000–2.
94. Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. [Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve](#). *Nature*. 1987; 330:658-9.
95. Lindvall O, Hagell P. Cell therapy and transplantation in Parkinson's disease. *Clin Chem Lab Med*. 2001; 39: 356-61.
96. Liu CN, Chambers WW. Intrasprouting of dorsal root axons. *Arch Neurol Psych*. 1958; 79:46-61.
97. [Liu S](#), [Qu Y](#), [Stewart TJ](#), [Howard MJ](#), [Chakraborty S](#), [Holekamp TE](#), [McDonald JW](#). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2000; 97:6126-31.
98. [Loh NK](#), [Woerly S](#), [Bunt SM](#), [Wilton SD](#), [Harvey AR](#). The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts. [Exp Neurol](#). 2001; 170:72-84.
99. Lu J, Ashwell K. Olfactory ensheathing cells: their potential use for repairing the injured spinal cord. *Spine*. 2002; 27:887–92.
100. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am*. 2000; 25:391–414.
101. [Maherali N](#), [Hochedlinger K](#). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. [Cell Stem Cell](#). 2008; 3:595-605.
102. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly

- reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007; 1: 55–70.
103. Marburg O. Die traumatischen Erkrankungen des Gehirns und Rückenmarks. In: Bumke O, Foerster O, editors. *Handbuch der Neurologie*. Vol 11. Berlin. Julius Springer. 1936; 1-177.
104. Marchand R, Woerly S, Bertrand L, Valdes N. Evaluation of two cross-linked collagen gels implanted in the transected spinal cord. *Brain Res Bull*. 1993; 30: 415-22.
105. Matheson CR, Carnahan J, Urich JL, Bocangel D, Zhang TJ, [Yan Q](#). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins. *J Neurobiol*. 1997; 32:22–32.
106. [McDonald JW](#), [Liu XZ](#), [Qu Y](#), [Liu S](#), [Mickey SK](#), [Turetsky D](#), [Gottlieb DI](#), [Choi DW](#). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med*. 1999; 5:1410-2.
107. McVeigh. Experimental cord crushes with special reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas in the spinal cord affected. *Arch Surg*. 1923; 7:573-600.
108. Mendelsohn JD, Yang SY, Hiller J, Hochbaum AI, Rubner MF. [Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films](#). *Biomacromolecules*. 2003; 4:96-106.
109. Menei P, Montero-Menei C, Whittemore SR, Bunge RP, Bunge MB. Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 1998; 10:607–21.
110. Moore RY, Zigmond MJ. Compensatory mechanisms in central neurodegenerative disease. In: Calne DB, ed. *Neurodegenerative Diseases*. Philadelphia: Saunders, 1994; 355-370.

111. Murakami Y, Furukawa S, Nitta A, Furukawa Y. Accumulation of nerve growth factor protein at both rostral and caudal stumps in the transected rat spinal cord. *J Neurol Sci.* 2002; 198:63–69.
112. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. [Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:8424-8.
113. Nakahara Y, Gage FH, Tuszynski MH. Grafts of fibroblasts genetically modified to secrete NGF, BDNF, NT-3, or basic FGF elicit differential responses in the adult spinal cord. *Cell Transpl.* 1996; 5:191–204.
114. Nathaniel EJ, Nathaniel DR. Astroglial response to degeneration of dorsal root fibers in adult rat spinal cord. *Exp Neurol.* 1977; 54:60-76.
115. Nesathurai S. Steroids and spinal cord injury: revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. *J Trauma.* 1998; 45:1088-93.
116. Newman JP, Verity AN, Hawatmeh S, Fee WE Jr, Terris DJ. Ciliary neurotrophic factors enhances peripheral nerve regeneration. *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996; 122:399–403.
117. Novikov LN, Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth JO. [A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury.](#) *Biomaterials.* 2002; 23:3369-76.
118. Nomura H, Baladie B, Katayama Y, Morshead CM, Shoichet MS, Tator CH. [Delayed implantation of intramedullary chitosan channels containing nerve grafts promotes extensive axonal regeneration after spinal cord injury.](#) *Neurosurgery.* 2008; 63:127-41.
119. Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. [Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury.](#) *Curr Opin Neurol.* 2003;16:711-5.
120. Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, [Goodman RR](#), [McKhann G 2nd](#), [Jiang L](#), [Kang J](#), [Nedergaard M](#), [Goldman SA](#). Identification and isolation of multipotential

neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. [Nat Med.](#) 2003; 9:439-47.

121. [Nussbaum J](#), [Minami E](#), [Laflamme MA](#), [Virag JA](#), [Ware CB](#), [Masino A](#), [Muskheli V](#), [Pabon L](#), [Reinecke H](#), [Murry CE](#). Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. [FASEB J.](#) 2007; 21:1345-57.
122. [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; 187:266-78.
123. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007; 448:313–317.
124. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008; 322:949-953.
125. [Oliva AA Jr](#), [James CD](#), [Kingman CE](#), [Craighead HG](#), [Banker GA](#). Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing. [Neurochem Res.](#) 2003; 28:1639-48.
126. Olney JW. Brain lesion, obesity and other disturbances in mice trend with monosodium glutamate. *Science.* 1969; 164:719
127. Oudega M, Hagg T. Neurotrophins promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Brain Res.* 1999; 818:431–38.
128. Oudega M, Vargas CG, Weber AB, Kleitman N, Bunge MB. [Long-term effects of methylprednisolone following transection of adult rat spinal cord.](#) *Eur J Neurosci.* 1999; 11:2453-64.
129. Oyesiku NM, Wigston DJ. Ciliary neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth from spinal cord neurons. *J Comp Neurol.* 1996; 364:68–77.

130. Oyesiku NM, Wilcox JN, Wigston DJ. Changes in expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor  $\alpha$  after spinal cord injury. *J Neurobiol.* 1997; 32:251–61.
131. Perry VH, Andersson PB, Gordon S. Macrophages and inflammation in the central-nervous-system. *Trends Neurosci.* 1993; 16:268-273.
132. [Piantino J](#), [Burdick JA](#), [Goldberg D](#), [Langer R](#), [Benowitz LI](#). An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2006; 201:359-67.
133. Plant GW, Carrier PF, Cuervo EP, Bates ML, Pressman Y, [Bunge MB](#), [Wood PM](#). Purified adult ensheathing glia fail to myelinate axons under culture conditions that enable Schwann cells to form myelin. *J Neurosci.* 2002; 22:6083–91.
134. Pollock K, Stroemer P, Patel S, Stevanato L, Hope A, Miljan E, Dong Z, Hodges H, Price J, Sinden JD. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol.* 2006; 199:143-55.
135. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT. [Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury.](#) *Exp Neurol.* 1999; 158:351-65.
136. Prádný M, Lesný P, Fiala J, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part I. Copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate with methacrylic acid. *Collect Czech Chem Commun.* 2003; 68:812-22.
137. Prádný M, Lesný P, Smetana K Jr, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, Syková E. [Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part II. Copolymers with positive and negative charges, polyelectrolyte complexes.](#) *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16:767-73.

138. 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; 17:1357-64.
139. Prang P, Müller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, Faber C, Vroemen M, Bogdahn U, Weidner N. [The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels.](#) Biomaterials. 2006; 27:3560-9.
140. Prockop DJ. [Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.](#) Science. 1997; 276:71-4.
141. [Qiu Q](#), [Sayer M](#), [Kawaja M](#), [Shen X](#), [Davies JE](#). Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. [J Biomed Mater Res.](#) 1998; 42:117-27.
142. Rabchevsky AG, Streit WJ. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. J Neurosci Res. 1997; 47:34-48.
143. Raisman G. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. Brain Res. 1969; 14:25-48.
144. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. [Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function.](#) Brain Res Brain Res Rev. 1999; 30:77-105.
145. Ramer MS, Priestley JV, McMahon SB. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. Nature. 2000; 403:312-16.
146. Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. Exp. Neurol. 1994; 127:232-44.
147. Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. J Neurosci. 1998; 18:3803-15.

148. Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*. 2000; 25:425–35.
149. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M. [Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats.](#) *Nat Med*. 1998; 4:814-21.
150. Reier PJ, Stensaas LJ, Guth L. The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system. In: Kao CC, Bunge RP, Reier PJ, eds. *Spinal cord reconstruction*. New York: Raven Press. 1983; 163-195.
151. [Reier PJ](#), [Stokes BT](#), [Thompson FJ](#), [Anderson DK](#). Fetal cell grafts into resection and contusion/compression injuries of the rat and cat spinal cord. *Exp Neurol*. 1992; 115:177-88.
152. Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. [Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking.](#) *Biomacromolecules*. 2004a; 5:284-94.
153. [Richert L](#), [Engler AJ](#), [Discher DE](#), [Picart C](#). Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films. [Biomacromolecules](#). 2004b; 5:1908-16.
154. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*. 1994; 20:570-7.
155. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol*. 1978 Jul;10(1):38-43.
156. 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.
157. Sekhon LH, Fehlings MG. [Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury.](#) *Spine*. 2001; 15:S2-12.

158. Seminatore C, Ponetes J, Ellman D, Kozubenko N, Itier V, Tine S, Tritschler L, Guidou E, Blondeau J, Lhuillier M, Bugi A, Jendelova P, Sykova E, Perrier AL, Finsen B, Onteniente B. Influence of the ischemic environment on teratoma and tumour formativ by human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Stroke. v tisku*.
159. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*. 1992; 360:757–59.
160. Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Okabe M, Yone K, Komiya S, Taga T. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol*. 2004;189:33-44.
161. [Shaked I](#), [Porat Z](#), [Gersner R](#), [Kipnis J](#), [Schwartz M](#). Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. [J Neuroimmunol](#). 2004; 146:84-93.
162. Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature*. 1990; 343:269–72.
163. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*. 1999; 11:3648-58.
164. Schwartz M, Yoles E. [Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond](#). *J Neurotrauma*. 2006; 23:360-70.
165. Siegel SG, Patton B, English AW. Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. *Exp Neurol*. 2000; 166:205–12.
166. Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci*. 1996; 19:280–85.



167. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008; 322:945-949.
168. Suzuki K, Suzuki Y, Ohnishi K, Endo K, Tanihara M, Nishimura Y. Regeneration of transected spinal cord in young adult rats using freeze-dried alginate gel. *NeuroReport*. 1999; 10:2891–2894.
169. Suzuki Y, Kitaura M, Wu S, Kataoka K, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C. Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord. *Neurosci Lett*. 2002; 318:121–124.
170. Syková E, Jendelová P. Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1049:146-160.
171. Syková E, Jendelová P. Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis*. 2006; 3:62-7.
172. Syková E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konrádová SL, Kobylka P, Pádr R, Neuwirth J, Komrska V, Vávra V, Stulík J, Bojar M. [Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury](#). *Cell Transplant*. 2006a; 15:675-87.
173. Syková E, Jendelová P, Urdzíkova L, Lesný P, Hejcl A. [Bone marrow stem cells and polymer hydrogels--two strategies for spinal cord injury repair](#). *Cell Mol Neurobiol*. 2006b; 26:1113-29.
174. Syková E, Jendelová P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS. *Cell Death Differ*. 2007a; 14:1336-1342.
175. Syková E, Jendelová P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2007b; 16:367-383.
176. Takahashi K, Yamanaka S. [Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors](#). *Cell*. 2006; 126:663-76.

177. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131:861–872.
178. Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, [Bunge MB](#). Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci*. 2002; 22:6670–81.
179. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. [Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression](#). *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1953; 70:813-9.
180. Tator CH. Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effect. *Neurochirurgie*. 1991; 37:291-302.
181. Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, Langer R, Snyder EY. [Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:3024-9.
182. Tsai EC, Dalton PD, Shoichet MS, Tator CH. [Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection](#). *Biomaterials*. 2006; 27:519-33.
183. Tuszynski MH, Gabriel K, Gage FH, Suhr S, Meyer S, [Rosetti A](#). Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury. *Exp Neurol*. 1996; 137:157–73.
184. Utley DS, Lewin SL, Cheng ET, Verity AN, Sierra D, Terris DJ. Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg*. 1996; 122:407–13.
185. Urdzíkova L, Jendelová P, Glogarová K, Burian M, Hájek M, Syková E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-

- colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006; 23:1379-91.
186. Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Cízková D, Gálik J. [A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat.](#) *J Neurotrauma*. 2001; 18:1399-407.
187. [Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C, Bonilla C.](#) Early administration of methylprednisolone decreases apoptotic cell death after spinal cord injury. [Histol Histopathol](#). 2006a; 21:1091-102.
188. Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M. [Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration?](#) *Neurosci Lett*. 2006b; 398:129-34.
189. Verdu E, Navarro X, Gudino-Cabrera G, Rodriguez FJ, Ceballos D, [Valero A, Nieto-Sampedro M.](#) Olfactory bulb ensheathing cells enhance peripheral nerve regeneration. *Neuroreport*. 1999; 10:1097-101.
190. Verfaillie C. [Pluripotent stem cells.](#) *Transfus Clin Biol*. 2009; 16:65-9.
191. Wang XM, Terman JR, Martin GF. Evidence for growth of supraspinal axons through the lesion after transection of the thoracic spinal cord in the developing opossum *Didelphis virginiana*. *J Comp Neurol*. 1996; 371:104-115.
192. Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Fujita Y, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H. [Comparison between fetal spinal-cord- and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord injury.](#) *Dev Neurosci*. 2004; 26:275-87.
193. Wichterle O, Lim D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature*. 1960; 185: 117-118.
194. Wittmer RC, Phelps JA, Saltzman WM, Van Tassel PR. [Fibronectin terminated multilayer films: protein adsorption and cell attachment studies.](#) *Biomaterials*. 2007; 28:851-60.

195. Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, [Reynolds BA](#). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* 1996; 16:7599–7609.
196. Woerly S, Doan VD, Sosa N, de Vellis J, Espinosa-Jeffrey A. [Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord.](#) *J Neurosci Res.* 2004; 75:262-72.
197. [Woerly S](#), [Laroche G](#), [Marchand R](#), [Pato J](#), [Subr V](#), [Ulbrich K](#). Intracerebral implantation of hydrogel-coupled adhesion peptides: tissue reaction. *J Neural Transplant Plast.* 1995; 5:245-55.
198. Woerly S, Lavallée C, Marchand R. [Intracerebral implantation of ionic synthetic hydrogels: effect of polar substrata on astrocytosis and axons.](#) *J Neural Transplant Plast.* 1992; 3:21-34.
199. 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; 5:467-88.
200. Woerly S, Pinet E, de Robertis L, Van Diep D, Bousmina M. [Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides \(NeuroGel\).](#) *Biomaterials.* 2001; 22:1095-111.
201. Woerly S, Pinet E, De Robertis L, Bousmina M, Laroche G, Roitback T, Vargová L, Syková E. [Heterogeneous PHPMA hydrogels for tissue repair and axonal regeneration in the injured spinal cord.](#) *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998; 9:681-711.
202. [Woltjen K](#), [Michael IP](#), [Mohseni P](#), [Desai R](#), [Mileikovsky M](#), [Hämäläinen R](#), [Cowling R](#), [Wang W](#), [Liu P](#), [Gertsenstein M](#), [Kaji K](#), [Sung HK](#), [Nagy A](#). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009; 458:766-770.
203. Wu VW, Schwartz JP. [Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives.](#) *J Neurosci Res.* 1998; 15:675-681.

204. [Xu J](#), [Qu ZX](#), [Hogan EL](#), [Perot PL Jr](#). Protective effect of methylprednisolone on vascular injury in rat spinal cord injury. [J Neurotrauma](#). 1992; 9:245-53.
205. [Xu J](#), [Fan G](#), [Chen S](#), [Wu Y](#), [Xu XM](#), [Hsu CY](#). Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. [Brain Res Mol Brain Res](#). 1998; 59:135-42.
206. Xu XM, Guénard V, Kleitman N, Aebischer P, Bunge MB. A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol*. 1995a; 134:261-272.
207. Xu XM, Guénard V, Kleitman N, Bunge MB. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol*. 1995b; 351:145-60.
208. Ye JH, Houle JD. Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Exp Neurol*. 1997; 143:70–81.
209. Yick LW, Wu W, So KF, Yip HK, Shum DK. Chondroitinase ABC promotes axonal regeneration of Clarke's neurons after spinal cord injury. *Neuroreport*. 2000; 11:1063–67.
210. Young W, Flamm ES. [Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury](#). *J Neurosurg*. 1982; 57:667-73.
211. Yu X, Dillon GP, Bellamkonda RB. [A laminin and nerve growth factor-laden three-dimensional scaffold for enhanced neurite extension](#). *Tissue Eng*. 1999; 5:291-304.
212. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. [Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences](#). *Science*. 2009; 324:797-801.
213. Zurita M, Vaquero J, Oya S, Montilla J. [Functional recovery in chronic paraplegic rats after co-grafts of fetal brain and adult peripheral nerve tissue](#). *Surg Neurol*. 2001; 55:249-54.

214. Zurita M, Vaquero J. [Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation.](#) Neuroreport. 2004; 15:1105-8.
215. Zurita M, Vaquero J. [Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: Functional and morphological outcome one year after transplantation.](#) Neuroscience Letters. 2006; 402:51-56.
216. Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, Santos M, De Haro J, Oya S, Aguayo C. [Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells.](#) Transplantation. 2008; 86:845-853.

## **10. Přehled publikací autora**

### *10.1. Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce*

1. Hejčl A, Lesný P, Přádný M, Šedý J, Zámečník J, Jendelová P, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 6: 3D hydrogels with positive and negative surface charges and polyelectrolyte complexes in spinal cord injury repair. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20:1571-7. (IF 2007 1,581)
2. Hejčl A, Urdzíkova L, Lesný P, Přádný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Zámečník J, Jendelová P, Syková E: Acute and delayed implantation of positively charged HEMA scaffold in spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurosurgery (Spine)*. 2008; 8:67-73. (IF 2006 1,478)
3. Hejčl A., Lesný P., Přádný M., Michálek J., Jendelová P., Syková E.: Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol Res*. 2008; 57 Suppl 3:S121-32. (IF 2006 2,093)
4. Přádný M, Michálek J, Lesný P, Hejčl A, Vacík J, Šlouf M, Syková E: Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 5. Hydrolytically degradable materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006; 17:1357-64. (IF 2005 1,248).
5. Syková E, Jendelová P, Urdzíkova L, Lesný P, Hejčl A: Bone Marrow Stem Cells and Polymer Hydrogel-Two Strategie for Spinal Cord Injury Repair. 2006; 26:1111-27. (IF 2005 2,022).
6. Hejčl A, Šedý J, Kapcalová M, Arboleda Toro D, Amemori T, Lesný P, Likavčanová- Mašínová K, Burian M, Krumbholcová E, Přádný M, Michálek J, Hájek M, Jendelová P, Syková E. HPMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *zasláno k publikaci Stem Cells and Development*.
7. Šedý J, Urdzíkova L, Likavčanová K, Hejčl A, Jendelová P, Syková E: A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rat. *Neuroscience Letters*. 2007; 423:167-171. (IF 2006 2,092).
8. [Šedý J, Likavčanová K, Urdzíkova L, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Jendelová P, Syková E](#): Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses*. 2008; 70:308-313 (IF 2006 1,299).

9. Šedý J, Urdzíkova L, Likavčanová K, Hejčl A, Burian M, Jendelová P, Zicha J, Kuneš J, Syková E: Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma*. 2007; 24:1487-501. (IF 2006 3,453)

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

*Publikace 7-10 souvisejí s tématem dizertační práce, ale nejsou přímým podkladem.*

Impakt faktor prací, které jsou podkladem či souvisejí s dizertační prací: 18,927

#### *10.3. Publikace bez IF, které souvisejí s tématem dizertační práce*

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

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

#### *10.4. Ostatní publikace autora s IF*



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

14. Hejčl A, Sameš M. Mikrodialýza v neurochirurgii. *Cesk Slov Neurol N*. 2009; 72 v tisku. (IF 2008 0,319).

15. Bartoš R, Jech R, Vymazal J, Petrovický P, Vachata P, Hejčl A, Zolal A, Sameš M. Validity of primary motor area localization with fMRI versus electric cortical stimulation: A comparative study. *Acta Neurochir (Wien)*. 2009; 151:1071-80 (IF 2007 1,391).

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

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

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

IF všech publikací: 21,415

#### *10.5. Ostatní významné publikace autora bez IF*

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

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