

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

**a**

**Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.**

Studijní program: Neurovědy



**Mgr. Václav Vaněček**

**Nanotechnologie a biomateriály pro využití  
v buněčné terapii míšního poranění**

Nanotechnology and biomaterials for application in cell therapy of spinal cord injury

Dizertační práce



Školitel: prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.  
Praha 2013

## **Prohlášení**

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

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

V Praze, 20.3.2013

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval všem, kteří se podíleli na vedení a formování této dizertační práce.

Především děkuji své školitelce prof. MUDr. Evě Sykové, DrSc., ředitelce Ústavu experimentální medicíny AV ČR a vedoucí Ústavu neurověd 2. LF UK za vedení a podporu v průběhu celé doby mého postgraduálního studia.

Velmi děkuji také RNDr. Pavle Jendelové, PhD a PharmDr. Šárce Kubinové, PhD za jejich odborné zkušenosti a významnou pomoc v mé vědecké práci.

Dále pak děkuji doc. Vitalii Zablotskému, DrSc. a Ing. Alexandru Dejnekovi, PhD z Fyzikálního ústavu AV ČR za cenné rady a konzultace z oblasti fyziky a Ing. Michalovi Babičovi, PhD z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR za důležité poznatky z oblasti chemie nanomateriálů.

Za technickou pomoc a spolupráci bych rád vyjádřil díky Jamesi Duttovi, Lence Kohoutové, Aleně Veselé, Michalovi Douděrovi a Pavlíně Mackové.

Velmi děkuji také své rodině a přátelům za nekončící podporu a motivaci během mého studia.

Grantová podpora: AVOZ 50390703, 1M0538, LC 554, GAAV IAA 500 390 902, KAN200200651, P108/10/1560, GA ČR 309/08/H079, 203/09/1242, P207/12/J013, P304/12/1370, P304/11/0731, P304/11/0653, IAA500390902, AVOZ10100522.

## Seznam zkratek

AEMA	aminoethyl-metakrylát
ALS	amyotrofická laterální skleróza
Bcl-2	protein asociovaný s B-lymfomem (B-cell lymphoma protein)
BDNF	mozkový neurotrofní faktor (brain derived neutrofic factor)
BBB	lokomoční test hodnotící motorické funkce (autoři Basso, Beattie, Besnahan)
CNS	centrální nervový systém
CIE	Mezinárodní komise pro osvětlení (Commission Internationale de l'Eclairage)
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gillova sekvence
CGGA	Cys-Gly-Gly-Ala sekvence
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DMEM	Dulbeccem modifikované Eaglovo medium
DPA	dopamin
DPA-HA	dopamin-hyaluronát
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina etylen-diamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
ESC	embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells)
FBS	fetální bovinní sérum
FGF-2	fibroblastový růstový faktor 2 (fibroblast growth factor 2)
GAP-43	růstový protein 43 (growth associated protein 43)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
HA	hyaluronan
HEB	hematoencefalická bariéra
HEMA	hydroxyethylmetakrylát
HPMA	2-hydroxypropylmetakrylamid
HRP	křenová peroxidáza (horse-radish peroxidase)
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells)
IKVAV	Ile-Lys-Val-Ala-Val sekvence
MMP	matrixové metaloproteinázy
MR	magnetická rezonance

MRI	zobrazování magnetickou rezonancí (magnetic resonance imaging)
MSC	mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
NSC	neurální kmenové buňky (neural stem cells)
NF	neurofilamenta
P(HEMA-AEMA)	poly(2-hydroxyethylmetakrylát-co-2-aminoetylmetakrylát-co-ethylen dimetakrylát)
PAN/PVC	poly(akrylonitril)/poly(vinylchlorid)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
PDI	index polydisperzity (polydispersity index)
PI	polydisperzita
PHEMA	poly(hydroxyethylmetakrylát)
PHPMA	poly[N-(2hydroxypropyl)metakrylamid]
PDMAA	poly(dimethylakrylamid)
PLA	kyselina polyláktová (poly-lactic acid)
PLL	poly-L-laminin
PNN	perineuronální síť (perineuronal net)
RMM	redukované modifikované medium
RGD	Arg-Gly-Asp sekvence
SC	Schwannovy buňky (Schwann cells)
SCI	míšní poranění (spinal cord injury)
SPION	superparamagnetické nanočástice oxidu železa (superparamagnetic iron oxide nanoparticles)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )
TGF- $\beta$ 2	transformující růstový faktor $\beta$ 2 (transforming growth factor $\beta$ 2)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
YIGSR	Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg sekvence

# Obsah

1	Úvod .....	8
1.1	Patofyziologie míšního poranění .....	9
1.1.1	Akutní fáze .....	9
1.1.2	Subakutní fáze .....	10
1.1.3	Chronická fáze .....	11
1.1.4	Glová jizva .....	12
1.1.5	Endogenní regenerace míšního poranění .....	12
1.1.6	Úloha proteinů extracelulární matrix v růstu a regeneraci axonů .....	13
1.2	Současná klinická léčba .....	14
1.3	Strategie moderní léčby .....	14
1.4	Buněčná terapie .....	15
1.4.1	Kmenové buňky .....	15
1.4.1.1	Embryonální kmenové buňky .....	16
1.4.1.2	Fetální kmenové buňky .....	16
1.4.1.3	Indukované pluripotentní buňky (iPSC) .....	17
1.4.1.4	Dospělé kmenové buňky .....	18
1.4.1.4.1	Neurální kmenové buňky .....	18
1.4.1.4.2	Mezenchymální kmenové buňky (MSC) .....	19
1.4.2	Schwannovy buňky (SC) .....	19
1.4.3	Způsoby aplikace buněčné terapie pro léčbu míšního poranění .....	20
1.4.4	Zvyšování efektivity buněčné terapie .....	21
1.4.5	Monitorování buněčné terapie .....	22
1.5	Nanočástice v biomedicíně .....	23
1.5.1	Struktura SPION .....	23
1.5.2	Povrchové obaly SPION .....	24
1.5.3	Biologické vlastnosti SPION internalizovaných do buněk .....	25
1.5.4	Fyzikální vlastnosti SPION .....	26
1.5.5	Cílené magnetické doručování značených buněk .....	27
1.6	Biomateriály .....	28
1.6.1	Nanovlákna .....	29
1.6.2	Hydrogely .....	29
1.6.3	Biomodifikace povrchu hydrogelů .....	31
1.6.4	Použití hydrogelů v kombinaci s buňkami .....	33
2	Hypotézy a cíle práce .....	34
3	Metodika .....	35
3.1	Buněčná kultivace .....	35
3.1.1	Mezenchymální kmenové buňky (MSC) .....	35
3.1.2	Diferenciace MSC .....	35
3.1.3	Kultura lidských chondrocytů .....	36
3.1.4	Lidské fetální neurální prekurzory .....	36
3.2	Hydrogely .....	37
3.2.1	Příprava a charakterizace hydrogelů .....	37
3.2.2	Kultivace buněk na hydrogelech .....	38
3.2.3	Histologické zpracování hydrogelů .....	39
3.2.4	Kvantitativní analýza růstu buněk na hydrogelech .....	39
3.3	Superparamagnetické nanočástice oxidu železa (SPION) .....	40
3.3.1	Příprava a charakterizace SPION obalených dopamin-hyaluronátovým asociátem .....	40

3.3.2	Hodnocení růstu a viability buněk značených SPION .....	41
3.3.3	Efektivita značení buněk SPION.....	41
3.3.4	Značení buněk SPION pokrytými poly-L-lysinem pro magnetické cílení.....	42
3.3.5	Relaxometrie SPION.....	42
3.3.6	Balónková kompresní léze .....	42
3.3.7	Aplikace magnetického implantátu.....	43
3.3.8	Postoperační péče .....	43
3.3.9	Transplantace buněk.....	44
3.3.10	Transkardiální perfuze.....	44
3.3.11	Histologické zpracování a analýza.....	44
3.4	Statistická analýza .....	45
4	Výsledky.....	46
4.1	Biokompatibilita SPION a značení buněk .....	46
4.1.1	Růst a viabilita značených buněk .....	46
4.1.2	Efektivita značení buněk .....	49
4.1.3	Diferenciace značených MSC do chondrocytů .....	53
4.1.4	Relaxometrie SPION .....	55
4.2	Magnetické cílení MSC značených SPION do míšní léze .....	57
4.2.1	Cílené doručování buněk <i>in vitro</i> .....	57
4.2.2	Cílené magnetické doručování buněk do míšní léze .....	58
4.2.3	Analýza a návrh optimalizace magnetického systému.....	60
4.2.4	Modelování cíleného magnetického doručování.....	62
4.3	Bioadhezivní vlastnosti Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaného hydrogelu .....	64
4.4	Diferenciace neurálních prekurzorů na Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaném hydrogelu.....	68
5	Diskuse .....	71
5.1	Biokompatibilita, efektivita značení a zobrazování SPION.....	72
5.2	Cílené magnetické doručování značených MSC do míšní léze .....	75
5.2.1	Vliv magnetického pole na cílení značených buněk .....	75
5.2.2	Model cíleného doručování buněk .....	78
5.3	Vliv biomodifikace hydrogelu na růst a diferenciaci MSC a NSC <i>in vitro</i> .....	79
6	Závěry.....	83
7	Souhrn .....	84
8	Summary .....	85
9	Literatura .....	86
10	Přehled publikací autora .....	101
11	Přehled abstraktů .....	102

# 1 Úvod

Poranění míchy patří mezi vážná a devastující traumata s dlouhodobými následky a psychologickými a socioekonomickými dopady nejen na postiženého, ale také na jeho blízké okolí. Poškození míchy vzniká obvykle následkem poranění páteře, ke kterému v současné době dochází nejčastěji při automobilových nehodách, sportovních úrazech nebo násilných činech (střelná poranění). Incidence poranění míchy se v České republice odhaduje na 200-300 případů ročně (Doležal, 2004). Statistiky vedené v USA uvádějí výskyt kolem 40 případů na milion obyvatel ročně (McDonald et al., 2002a).

V současné době však nejsou k dispozici léčebné metody, které by umožnily regeneraci poškozené nervové tkáně a obnovu ztracených funkcí. Dnešní standardní léčebné postupy zahrnují chirurgickou stabilizaci a znehybnění páteře po poranění, aplikaci kortikosteroidů v akutní fázi poranění a později rehabilitaci (McDonald et al., 2002a). Ačkoliv moderní pokroky v chirurgických intervencích a v péči po poranění páteře a míchy výrazně snížily mortalitu a prodloužily život postižených, je morbidita pacientů s míšním poraněním stále vysoká. Současné možnosti léčby jsou obvykle málo efektivní a pouze mírná funkční zlepšení jsou většinou dosahována časnou dekomprezí a následnou rehabilitací (Ruff et al., 2012). Složitost patologie míšního poranění vyžaduje vývoj nových léčebných technik, které pomohou regenerovat poškozenou nervovou tkáň.

Metody regenerativní medicíny, využívající transplantace kmenových buněk, implantace hydrogelů přemostujících poškozenou nervovou tkáň či podání růstových faktorů, vedoucí k prevenci sekundárního poranění míchy a regeneraci poškozené tkáně jsou v současné době směry se slibnými preklinickými i klinickými výsledky.

Tato práce se zabývá studiem nových nástrojů a léčebných prostředků využitelných v terapii míšního poranění. Pojednává o biologických a funkčních vlastnostech nových biomateriálů na bázi hydrogelů využitelných k přemostění míšního poranění a dále o vlastnostech a využití nanočástic k monitorování a cílení buněčné terapie.

## **1.1 Patofyziologie míšního poranění**

Z patofyziologického hlediska lze míšní poranění (angl. spinal cord injury - SCI) rozdělit na primární a sekundární. **Primárním** poraněním je označován vlastní mechanický proces poškození míšní tkáně v důsledku traumatu (Taoka et al., 1998). Nejčastěji k primárnímu poranění dochází kontuzí nebo kompresí míchy způsobenou změnou polohy nebo destrukcí obratlů, intervertebrálních disků a ligament. K úplnému přetnutí míchy dochází velmi zřídka, v poraněné tkáni je většinou zachováno určité množství axonů procházejících poraněnou oblastí (McDonald et al., 2006; Rowland et al., 2008). Tento fakt je významný z terapeutického hlediska, neboť díky tomu zde mohou být uplatněny nové přístupy zlepšující funkci reziduální nervové tkáně (např. remyelinizací zbývajících axonů) a také rehabilitace (Edgerton et al., 2006). V důsledku primárního úrazu dochází k mechanickému poškození neurální a dalších měkkých tkání včetně cévního endotelu, což vede ke krvácení (často petechiálnímu), intravaskulární trombóze a otoku (Tator et al., 1997). Porucha funkce neuronů přispívá k rozvoji míšního šoku (Ditunno et al., 2004) a vede ke ztrátě funkce v úrovni a pod úrovni míšního poranění.

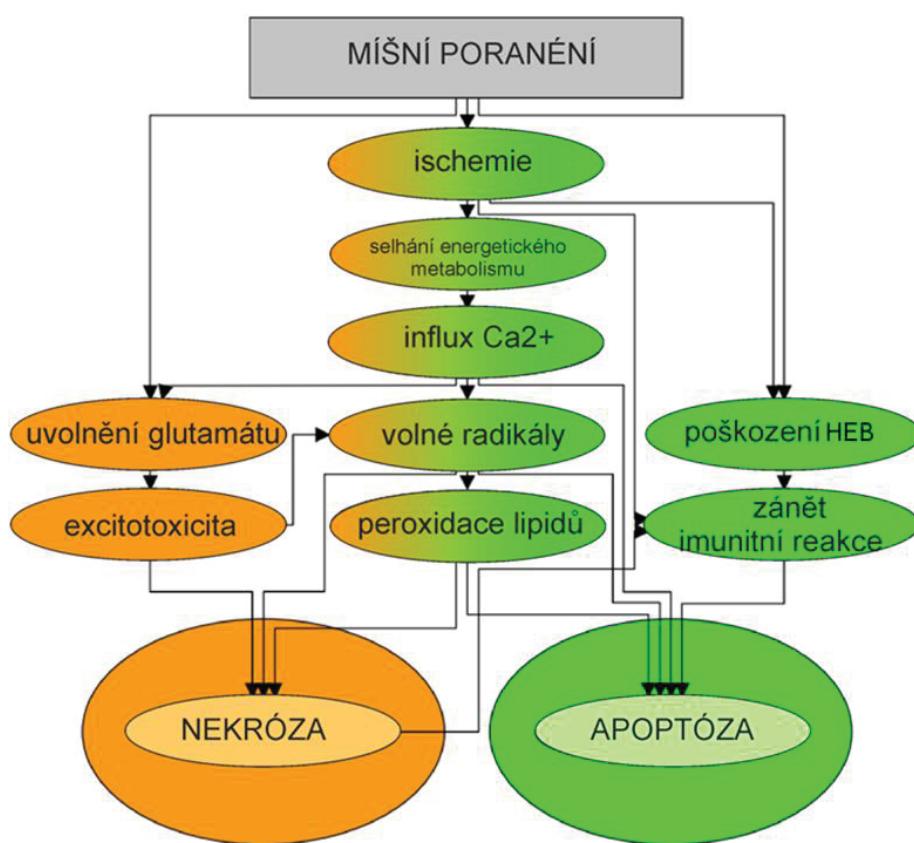
V důsledku primárního poranění se rozvíjí buněčné a neurochemické **sekundární** procesy, které mohou být rozděleny podle doby od poranění do tří fází: akutní, subakutní a chronické. Fáze SCI se však do značné míry prolínají a je obtížné je přesně oddělit (Hulsebosch, 2002; Rowland et al., 2008; Oyinbo, 2011).

### **1.1.1 Akutní fáze**

Za akutní fázi SCI se považuje časové rozmezí 2-48 hodin po úrazu. Během této fáze se rozšiřuje oblast poranění. Charakteristická je zvýšená tvorba volných radikálů, rozvoj excitotoxicity glutamátu a zánětu (Tator et al., 1991). Poruchy mikrovaskulatury a ztráta normálních regulačních mechanismů způsobují hypoperfuzi míchy. Dochází k edému neuronálních a gliových buněk v důsledku ischemie a blokádě vedení akčních potenciálů (Kakulas, 2004). Poškozená hematoencefalická bariéra (HEB) umožňuje vstup toxicích látek a infiltraci krevních buněk do míšního parenchymu, kde se podílejí na zánětlivé reakci. Neuroimunitní odpověď na vaskulární reakce a proteiny sekretované aktivovanými astrocyty a mikrogliei mohou dále zvýšit propustnost HEB, usnadnit leukocytům migraci do poškozené tkáně a tím dále urychlit rozvoj zánětu (Weber et al., 2007). V případě míšního poranění může zánětlivá reakce hrát jak negativní tak pozitivní roli a je velmi komplikovaná. TNF- $\alpha$  je klíčový zánětlivý mediátor, který je po SCI zvýšeně exprimován v neuronech, gliích

i endoteliálních buňkách (Yan et al., 2001). Inhibice jeho signální kaskády vedla k funkčnímu zlepšení po SCI (Bethea et al., 1999). Bylo ovšem také ukázáno jak *in vitro*, tak *in vivo*, že TNF- $\alpha$  může mít po SCI neuroprotektivní účinek; myši s delecí receptoru pro TNF- $\alpha$  vykazovali vyšší počet apoptotických buněk, větší lézi a zhoršené motorické funkce ve srovnání s kontrolními zvířaty (Kim et al., 2001). Imunitní odpověď a její vhodná modulace hraje v terapii SCI významnou roli (Ronsyn et al., 2008).

V průběhu akutní fáze SCI dochází k buněčné smrti mechanismem nekrózy i apoptózy. Nekróza neuronů je důsledkem výše zmíněného mechanického poškození, porušení buněčných membrán a excitotoxicity. U myelinizujících buněk oligodendrocytů byla po SCI pozorována apoptóza jak v akutní tak i v dalších fázích SCI (Sahni et al., 2010). Blokáda apoptózy je tak jedním z terapeutických cílů v léčbě SCI (obr.1).



Obrázek 1. Schematické znázornění sekundárních patologických procesů po míšním poranění. Podle (Klussmann et al., 2005).

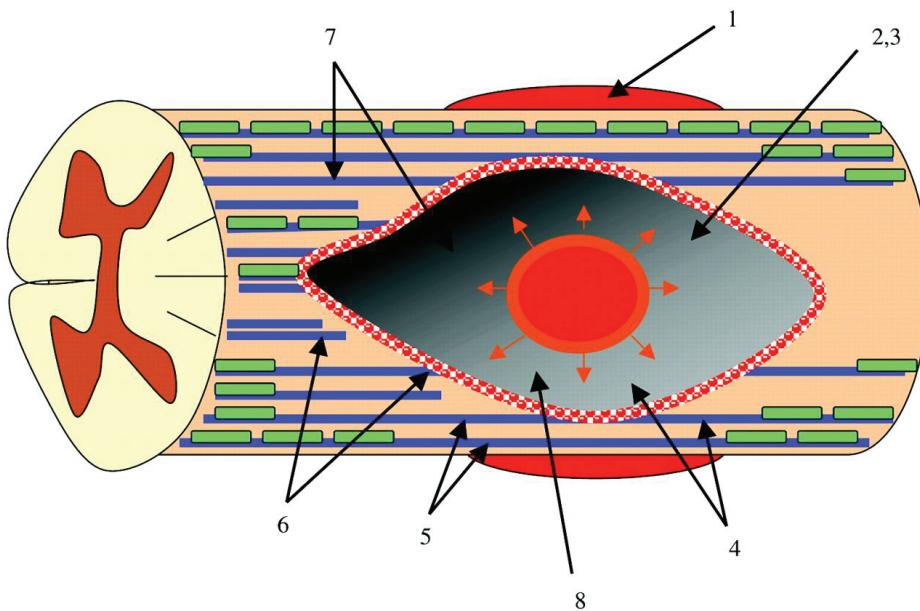
### 1.1.2 Subakutní fáze

Subakutní fáze SCI se popisuje v rozmezí cca od 2 dnů do dvou týdnů po poranění (Rowland et al., 2008; Hejčl et al., 2011). Je charakterizovaná velkou aktivitou mikroglíi a jejich participací na zánětlivých procesech. Fagocytóza nekrotického buněčného detritu a

odstraňování zbytků myelinu, může přispět k podpoře axonální regenerace. V tomto časovém období po poranění dochází také k hypertrofii astrocytů na okrajích léze a jejich aktivaci. V centru poranění naopak pokračuje jejich odumírání a nekróza. Aktivované astrocyty jsou zvýšeně metabolicky aktivní, proliferují a oddělují agresivní prostředí léze od zbytků tkáně (Eddleston et al., 1993). Dochází k tvorbě astrocytární (gliální) jizvy, která je bariérou pro regeneraci neuronů (viz dále).

### 1.1.3 Chronická fáze

Chronická fáze SCI nastupuje v průběhu týdnů po poranění a trvá v řádu let. Je charakterizována pokračující apoptózou, jizvením, demyelinizací, stabilizací gliové jizvy a formací cyst (obr. 2). Zánik oligodendrocytů vytvářejících myelinové pochvy neuronů způsobuje demyelinizaci nervových vláken (Fawcett et al., 1999). V průběhu této fáze se stabilizuje neurologický deficit pacientů (McDonald et al., 2002b) a objevuje se extenční spasticita. V důsledku tvorby cysty a jejího zvětšování může dojít k rozvoji syringomyelie. Byly pozorovány známky regenerace a axonálního růstu, což může vést k částečné reinervaci, ale i např. k chronické bolesti (Christensen et al., 1997).



Obrázek 2. Primární poranění míchy (červený kruh), které se postupně zvětšuje, až dosáhne konečného rozsahu léze (šedá oblast). Modré jsou vyznačeny axony, zeleně oligodendrocyty. Možnosti terapeutického působení jsou vyznačeny čísly: (1) redukce edému a volných radikálů, (2) neuroprotekce okolní tkáně léze zasažené sekundárními procesy, (3) modulace zánětlivé odpovědi, (4) záchrana neuronů a glie ohrožených apoptózou (5), remyelinizace, (6) podpora růstu axonů vytvořením permisivního prostředí, (7) náhrada odumřelých buněk (buněčná terapie), (8) přemostění mišního poranění (kavity). Podle (Hulsebosch, 2002).

#### **1.1.4 Gliová jizva**

Gliová jizva vzniká následkem různých poranění CNS a je tvořena převážně astrocyty, mikrogliemi a oligodendrocyty. Po SCI dochází k migraci makrofágů z krevního oběhu a mikroglíí z okolní tkáně do místa poranění (Kreutzberg, 1996). Astrocyty migrují do místa poškození, hypertrofují, přičemž se prodlužuje délka a struktura jejich výběžků. Astrocytární reakce je provázena zvýšením exprese gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP), vimentinu a nestinu (Abnet et al., 1991).

Samotná struktura gliální jizvy (těsně spojené buňky) je fyzickou překážkou pro růst axonů. Reaktivní astrocyty produkují ve zvýšené míře také různé molekuly extracelulární matrix (např. chondroitin sulfátové proteoglykany), které inhibují růst neuronů (Eddleston et al., 1993). Později dochází také k aktivaci prekurzorů oligodendrocytů a eventuálně meningeálních buněk v okolní tkáni. Oligodendrocyty významně přispívají k inhibiční povaze jizvy například produkcí inhibičních molekul Nogo a dalších proteoglykanů (Schnell et al., 1990). Také meningeální buňky migrující do oblasti léze tvoří významnou bariéru pro růst axonů. Gliová jizva je hlavním důvodem inhibice jak regenerace axonů, tak i jejich remyelinizace (Fawcett et al., 1999).

#### **1.1.5 Endogenní regenerace míšního poranění**

Vedle destruktivních patologických změn jsou po SCI spuštěny i neuroprotektivní a neuroregenerační procesy. Po poranění dochází ke zvýšené expresi genů a proteinů asociovaných s regenerací neuronů jako je GAP-43 nebo  $\beta$ -2 tubulin (Hoffman, 1989). Byla pozorována zvýšená lokální exprese neurotrofických faktorů jako je FGF-2, TGF- $\beta$ 2, NGF, BDNF a VEGF, které se podílejí na růstu neuronů (Oudega, 2007). Matrixové metaloproteinázy (MMP) se podílejí na remodelaci extracelulární matrix a modifikaci gliové jizvy. Lze také pozorovat spontánní růstu axonů přes poškozenou tkáň a náznaky remyelinizace díky aktivaci a migraci Schwannových buněk z periferie (Salgado-Ceballos et al., 1998). V důsledku poranění se také aktivují systémové reparační funkce. Například substance P po poranění CNS mobilizuje CD29 $^{+}$  buňky (např. mesenchymální kmenové buňky), které se pak podílejí na regeneraci (Hong et al., 2009). Významnou roli v regeneraci hrají také různé formy adaptivních změn (plasticity), díky kterým může dojít k omezené kompenzaci ztracených funkcí (Thuret et al., 2006). Růst axonů (tzv. sprouting) a jejich větvení jsou další důležité mechanizmy obnovy, které jsou však limitovány inhibičním prostředím v lézi (Raineteau et al., 2001).

Neurogeneze probíhá v poraněné míše velmi omezeně (Vessal et al., 2007). Po SCI jsou aktivovány ependymové a periependymové buňky podél centrálního kanálu, které migrují do místa poškození (Johansson et al., 1999; Horner et al., 2000) a vytvářejí nové prekurzory astrocytů a oligodendrocytů (Meletis et al., 2008). Prokázána byla také přítomnost neurálních kmenových buněk v různých oblastech mozku (subgranulární zóně gyru dentatu hipokampu, zadní periventrikulární zóně a subventrikulární zóně postranních komor předního mozku), které jsou schopny se diferencovat do různých buněk nervového systému a migrovat do poškozených oblastí (Lie et al., 2004).

I když nervová tkáň po poranění produkuje různé faktory, které mohou podpořit růst a vedení axonu přes místo léze, je endogenní regenerace nedostatečná pro obnovení poškozené struktury a funkce.

### **1.1.6 Úloha proteinů extracelulární matrix v růstu a regeneraci axonů**

Extracelulární matrix (ECM) je komplexní síť polysacharidů a fibrózních proteinů obklopující buňky. Proteiny ECM mají jednak podpůrnou roli, tvořící strukturální základ tkání a také ovlivňují chování buněk sekvestrací a lokálním uvolňováním růstových faktorů a interakcí s buňkami přes povrchové adhezivní receptory typu integrinů (Rao et al., 2009). Specializovaná síť molekul ECM těsně obklopující nervové buňky se nazývá perineuronální síť (PNN). Za fyziologických podmínek se molekuly PNN jako je neurocan, brevican, tenascin, chondroitin-sulfát proteoglykan a molekuly asociované s myelinem podílí na migraci a vedení nervových buněk, tvorbě synapsí a neuronální plasticitě.

Molekuly ECM jako například laminin a fibronektin reagují s integrinovými receptory na povrchu nervových buněk. Integrinové molekuly na povrchu neuronů zprostředkovávají růst, adhezi, vedení a migraci buněk (Gardiner 2011). V nervovém systému je exprese lamininu a fibronektinu důsledně regulována a podílí se na nervové migraci, axonálním růstu během embryonálního vývoje a regeneraci.

Důsledkem poranění CNS dochází ke změnám ve složení a aktivitě PNN. Charakteristické je zvýšení tvorby chondroitinsulfátových proteoglykanů v oblasti gliové jizvy, která po poranění CNS tvoří bariéru pro regeneraci a růst neuronů. Po poranění se také zvyšuje exprese endogenního fibronektinu a lamininu jejichž přítomnost je nutná k regeneraci neuronů (Luckenbill-Edds, 1997).

Modulace ECM a dezintegrace gliové jizvy po poranění je jedním z přístupů k léčbě CNS. Využití bakteriálního enzymu chondroitinázy ABC vedlo k redukcii inhibičních proteoglykanů a ke zvýšení prorůstání axonů přes lézi. Akutní podání polylamininu po

míšním poranění zase vedlo k inhibici zánětlivých procesů a neuroprotekci (Menezes et al., 2010).

## **1.2 Současná klinická léčba**

Současný přístup k terapii míšního poranění zahrnuje zejména aplikaci kortikosteroidů (metylprednisolon) v akutní fázi, akutní chirurgickou dekomprezii a stabilizaci páteře s následnou rehabilitací na speciálních pracovištích (Vaverka et al., 2002; Hejčl et al., 2011). Časná chirurgická intervence a rehabilitace jsou standardní metody léčby, aplikace kortikosteroidů je však stále debatovanou otázkou. Ačkoliv byla jejich aplikace při míšním poranění ověřena klinickou studií (NASCIS II) (Bracken et al., 1997), kde došlo k signifikantnímu zlepšení motorických a senzorických funkcí pacientů, je jejich použití, zejména z důvodu nežádoucích účinků, diskutabilní. Někteří autoři také poukazují na omezenou validitu výsledků této klinické studie (Nesathurai, 1998; Hurlbert, 2000). Existují také studie, které efekt kortikosteroidů při míšním poranění neprokázaly (Green et al., 1980; Bartholdi et al., 1995). Předpokládané mechanizmy neuroprotektivního účinku kortikosteroidů jsou zejména inhibice peroxidace lipidů a zánětlivých cytokinů, modulace imunitní odpovědi, redukce míšního edému a zlepšení průtoku v cévách poškozené míchy (Kwon et al., 2004).

## **1.3 Strategie moderní léčby**

Z výše uvedeného souhrnu patologických procesů po míšním poranění vyplývá nutnost hledání komplexních léčebných postupů, které budou působit proti inhibičnímu prostředí v lézi a umožní regeneraci axonů. Jednou z navrhovaných možností léčby míšního poranění je podání neurotrofických, neuroprotektivních látek a růstových faktorů jako je BDNF, NGF nebo neurotrofin 3 či malých molekul typu cAMP, které regulují růst a podporují přežití neuronů (Thuret et al., 2006). Nadějně se také ukázalo využití protilátek proti inhibičním faktorům asociovaných s myelinem. Například podání protilátky proti Nogo-A podporuje prorůstání axonů v lézi (Fouad et al., 2004). Jak již bylo zmíněno, modulace ECM pomocí enzymu chondroitinázy ABC degradující inhibiční molekuly chondroitin sulfátu vede k regeneraci a funkčnímu zlepšení u potkanů (Bradbury et al., 2002).

Pokroky ve výzkumu kmenových buněk otevírají nové perspektivy v léčbě poranění CNS. Moderní experimentální léčba míšního poranění zahrnuje kombinaci několika terapeutických postupů, jako jsou transplantace kmenových i somatických buněk, implantace biomateriálů a nanomateriálů nahrazujících poškozenou nervovou tkáň, genovou terapii či podání růstových a neurotrofních faktorů nebo enzymů (Kubinová et al., 2012). Výsledky

proběhlých či probíhajících preklinických i klinických studií jsou příslibem pro úspěšnou léčbu SCI pomocí buněčné terapie (Syková et al., 2006b; Ronsyn et al., 2008).

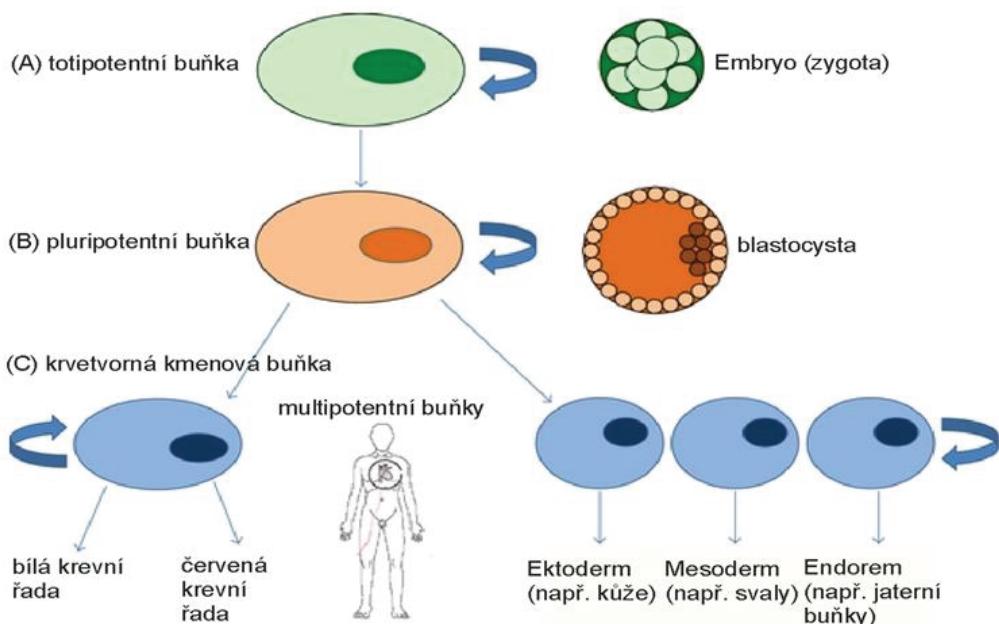
## 1.4 Buněčná terapie

Cílem transplantace buněk po míšním poranění je regenerovat nebo nahradit ztracené nebo poškozené buňky (hlavně neurony a oligodendrocyty), poskytnout trofické a růstové faktory uvolňované buňkami pro růst a obnovu neuronů a modulovat prostředí v poškozené míše tak, aby mohla být usnadněna regenerace axonů (Sahni et al., 2010; Skalníková et al., 2011).

### 1.4.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky schopné sebeobnovy asymetrickým dělením, které mohou dát vzniknout tkáňově nebo orgánově specifickým buňkám s různými funkcemi (Gurudutta et al., 2012).

Kmenové buňky lze dělit podle jejich vývojového potenciálu na totipotentní, pluripotentní a multipotentní buňky (obr. 3). **Totipotentní**, tzn. schopné tvořit veškeré buňky a tkáně embrya, můžeme označit pouze buňky zygoty. **Pluripotentní** jsou embryonální kmenové buňky primitivního ektodermu izolované z vnitřní vrstvy blastocysty. Mohou z nich vzniknout buňky všech tří zárodečných vrstev. Dalším typem buněk jsou **multipotentní** kmenové buňky, které se nalézají ve tkáních a orgánech – vznikají z nich specializované typy tkáně, ze kterých tyto buňky pocházejí (Kirschstein et al., 2001).



Obrázek 3. Schéma vývojového potenciálu kmenových buněk. Podle (Diez Villanueva et al., 2012).

### **1.4.1.1 Embryonální kmenové buňky**

Embryonální kmenové buňky (ESC) jsou pluripotentní buňky izolované z embryoblastu raného savčího zárodku (blastocysty). Tyto buňky jsou schopny neomezené proliferace *in vitro* a jejich linie si udržují schopnost diferenciace do buněk všech tří zárodečných typů. Transplantace nediferencovaných ESC do imunodeficientních potkanů vede k tvorbě teratomů, které obsahují buňky všech tří zárodečných vrstev (Thomson et al., 1998). Pomocí různých diferenciаčníх faktorů je možné ESC *in vitro* diferencovat do různých buněčných typů, včetně neurálních prekurzorů. Bylo ukázáno, že transplantace ESC do poškozené míchy potkana vedla ke zlepšení pohybové funkce a tyto buňky se diferencovaly do astrocytů a oligodendrocytů (McDonald et al., 1999). Neurální buněčné typy derivované *in vitro* z ESC mají slibný terapeutický potenciál. Kirstead a spol. například ukázali, že oligodendrocyty derivované z ESC přispěly k remyelinizaci poškozených neuronů a funkci míchy (Faulkner et al., 2005; Keirstead et al., 2005). Neurální prekurzory derivované z lidských ESC byly po transplantaci do myšího mozku schopny přežítí a diferenciace do neuronů a astrocytů (Zhang et al., 2001). Optimalizací diferenciаčníх protokolů lze snížit tumorigenicitu neurálních prekurzorů derivovaných z ESC (Kozubenko et al., 2010).

První klinická studie využívající prekurzory oligodendrocytů získané diferenciací z ESC byla zahájena americkou firmou Geron v roce 2010. Tato studie však byla provedena pouze na malém počtu pacientů a nepřinesla jednoznačné výsledky. Byla ukončena v roce 2011 z ekonomických důvodů (Lukovic et al., 2012).

V současné době zejména etické důvody a nebezpečí tvorby teratomů obracejí pozornost k terapeutickému využití jiných buněčných typů, např. indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC) (Denker, 2006). Studiem ESC však můžeme získat hlubší porozumění průběhu obnovy buněk lidského těla a využít tyto znalosti při léčbě a rozvoji buněčné terapie (Syková, 2001).

### **1.4.1.2 Fetální kmenové buňky**

Fetální kmenové buňky jsou multipotentní buňky, které mohou být izolovány z fetální krve, kostní dřeně, nervové, epitelialní a dalších druhů fetální tkáně (O'Donoghue et al., 2004).

Bregman a spol. transplantovali fetální míšní tkáň potkanům s míšním poraněním a pozorovali zvýšené prorůstání axonů a funkční zlepšení u transplantovaných zvířat (Bregman et al., 1993). Bylo také ukázáno, že neurální prekurzory derivované z potkaní embryonální

míchy a expandované *in vitro* byly schopny po transplantaci *in vivo* tvořit neurony a zlepšily motorické funkce u zvířat po SCI (Ogawa et al., 2002). V klinických studiích hodnotících transplantaci lidské fetální neurální tkáně obsahující mesencefalické neurony pacientům s Parkinsonovou nemocí byly prokázány pozitivní symptomatické výsledky. Nevýhodou transplantace tkáně byl ovšem její nedostatek a nežádoucí účinky (diskinesy) projevující se u některých pacientů (Lindvall, 2003; O'Donoghue et al., 2004).

Pro klinickou aplikaci tohoto typu buněk je nutným předpokladem vytvoření definované linie lidských neurálních prekurzorů odvozených z fetální neurální tkáně. Pollock a Stroemer ve své studii prokázali, že je možné vytvořit funkční immortalizovanou linii kortikálních buněk mozku, které jsou schopny se diferencovat do neuronů a astrocytů a jejíž růst je možno regulovat (Pollock et al., 2006). Po implantaci neurálních prekurzorů linie SPC-01 derivovaných z lidské fetální míchy potkanům s míšním poraněním byla pozorována redukce poškození bílé hmoty, diferenciace těchto buněk do motoneuronů a zlepšení motorických funkcí (Amemori et al., 2011). Lidské fetální neurální prekurzory transplantované miniprasatům s míšním poraněním přežívaly 7 týdnů po transplantaci a preferenčně se diferencovaly do neuronů (Usvald et al., 2010).

Kromě fetálních neurálních kmenových buněk jsou v popředí zájmu i fetální mezenchymální kmenové buňky. Tyto buňky získané z krve fetu v prvním trimestru mohou diferencovat *in vitro* a *in vivo* do prekurzorů oligodendrocytů a mají tak potenciál pro buněčnou terapii (Kennea et al., 2009).

#### **1.4.1.3 Indukované pluripotentní buňky (iPSC)**

Překážkami pro klinické využití kmenových buněk v terapii jsou zejména problémy s imunitní odpovědí po alogenní buněčné transplantaci, obtížné získání některých typů buněk nebo etické otázky. iPSC jsou relativně novým typem kmenových buněk, jejichž využití by mohlo zmíněné problémy překonat. Přeprogramováním dospělých somatických buněk konkrétního pacienta pomocí transkripčních faktorů lze vytvořit tzv. indukované pluripotentní buňky, které jsou schopné diferenciace do různých buněčných typů a jsou imunologicky tolerované (Salewski et al., 2010).

Původně byly iPSC derivované z myších fibroblastů pomocí retrovirální transfekce transkripčních faktorů pro skupinu 4 genů indukujících pluripotenci (Oct4, Sox2, Klf2 a c-Myc) (Takahashi et al., 2006). Pomocí stejného principu byly připraveny iPSC i z lidských fibroblastů (Yu et al., 2007). Později bylo zjištěno, že iPSC mohou být derivovány ze somatických buněk optimalizovaným protokolem bez přítomnosti virových vektorů (Kaji et

al., 2009) pouze s využitím malých molekul nebo růstových faktorů (Huangfu et al., 2008; Zhou et al., 2009).

Indukované pluripotentní buňky mohou být, mimo jiných buněčných typů, diferencovány do funkčních motoneuronů stejně efektivně jako diferenciaci z embryonálních buněk, jak bylo prokázáno immunohistochemicky a pomocí elektrofyziologie *in vitro* (Karumbayaram et al., 2009). V nedávných experimentech bylo ukázáno, že transplantace neuroepitelových buněk derivovaných z lidských iPSC do míšního poranění u potkana zlepšila motorické funkce. Transplantované buňky byly schopny se diferencovat do neurálních buněk a přímo přispět k částečnému obnovení funkcí (Fujimoto et al., 2012). Na našem pracovišti byly úspěšně využity neurální prekurzory derivované z iPSC v experimentální léčbě míšního poranění (Jendelová et al., 2011) a iktu, kde tyto buňky po transplantaci redukovaly sekundární degeneraci a bylo pozorováno i zlepšení somatosenzorických a motorických funkcí (Polentes et al., 2012b). iPSC však mohou mít díky svým pluripotentním vlastnostem podobné nevýhody jako embryonální kmenové buňky.

V současnosti proto probíhají studie bezpečnosti, tumorigenicity a genetické stability iPSC, které jsou nutné před využitím těchto buněk v klinické medicíně (Yamanaka, 2009; Riggs et al., 2012). Nedávné experimenty také ukazují, že je možné přímo indukovat tvorbu funkčních motoneuronů genetickou modifikací např. fibroblastů, bez využití iPSC (Son et al., 2011).

#### **1.4.1.4 Dospělé kmenové buňky**

##### **1.4.1.4.1 Neurální kmenové buňky**

Neurální kmenové buňky (NSC) jsou multipotentní buňky schopné diferenciace do neuronů, oligodendrocytů a astrocytů. Tyto buňky mohou být efektivně kultivovány *in vitro* (Cattaneo et al., 1990) a lze je izolovat ze subventrikulární zóny stěn komor dospělého nervového systému a také z gyru dentatu hipokampu (Johansson et al., 1999). Multipotentní neurální kmenové buňky se vyskytují také v míšní tkáni, zejména v oblasti centrálního míšního kanálu (Barnabe-Heider et al., 2008). Endogenní NSC se podílí na regeneraci poškozených neuronů a glie při různých patologických stavech. Tato spontánní tvorba neurálních prekurzorů je však nedostatečná pro plnou náhradu ztracených neuronů (Macas et al., 2006). Na potkaním modelu bylo ukázáno, že transplantace neurálních prekurzorů do míšního poranění vede k remyelinizaci axonů a zlepšení motoriky (Karimi-Abdolrezaee et al., 2006). Také v experimentech na primátech bylo potvrzeno, že *in vitro* kultivované NSC

transplantované do míchy se diferencovaly do neuronů, astrocytů a oligodendrocytů a signifikantně zlepšily motorické funkce u transplantovaných zvířat (Iwanami et al., 2005). NSC mohou být vhodné k léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je Parkinsonova, či Alzheimerova choroba (Einstein et al., 2008).

#### **1.4.1.4.2 Mezenchymální kmenové buňky (MSC)**

MSC jsou multipotentní dospělé kmenové buňky, které byly poprvé identifikovány a izolovány skupinou Alexandra Friedensteina z kostní dřeně (Friedenstein et al., 1974). Později byly tyto buňky identifikovány v různých typech tkáně, včetně tukové tkáně, kůže, periferní krve a pupečníkové krve. Bylo ukázáno, že MSC jsou schopny diferenciace jak do tkáně mezenchymálního původu (kost, chrupavka, tuková tkáň, nebo šlachy) (Pittenger et al., 1999), tak i transdiferenciace například do hepatocytů, insulín-produkujících buněk nebo neuronů (Tropel et al., 2006; Neshati et al., 2010). Funkční vlastnosti neurálních buněk získaných transdiferenciací z MSC jsou však debatovanou otázkou (Franco Lambert et al., 2009).

MSC lze relativně snadno izolovat a kultivovat a použít k různým terapeutickým účelům včetně poruch CNS (Arboleda et al., 2011; Forostyak et al., 2011). Pozitivní efekt transplantace MSC po míšním poranění byl prokázán v mnoha pracích. Po intravenózní nebo intratekální aplikaci MSC potkanům po míšním poranění došlo k signifikantnímu zlepšení motorických testů a regeneraci míšní tkáně (Urdzíková et al., 2006; Osaka et al., 2010). Mechanismus účinku působení MSC spočívá především v produkci růstových faktorů, protizánětlivých cytokinů a antiapoptotických faktorů, které mají neuroprotektivní účinek a podporují remyelinizaci a regeneraci neuronů (Uccelli et al., 2011; Quertainmont et al., 2012). Vedle parakrinních, imunomodulačních a trofických účinků MSC bylo také ukázáno, že MSC mají schopnost migrovat do poškozené tkáně po míšním poranění a iktu (Syková et al., 2007a).

MSC jsou atraktivní pro využití v buněčné terapii SCI zejména díky možnosti snadné izolace a kultivace, schopnosti diferencovat do různých buněčných typů, efektivitě v preklinických studiích a jejich relativní bezpečnosti (Syková et al., 2006a; Walker et al., 2009).

#### **1.4.2 Schwannovy buňky (SC)**

Schwannovy buňky jsou gliové buňky, jejichž hlavní funkcí je myelinizace periferních nervů. SC nejsou buňky kmenové. Po poranění a přerušení kontaktu Schwannovy buňky s

axonem u nich však byla popsána schopnost dediferenciace z dospělého typu na nevyzrálý typ, který je fenotypově velmi podobný prekurzoru Schwannových buněk (Parkinson et al., 2008; Jessen et al., 2010). Po poranění periferních nervů jsou SC schopny zahájit kaskádu reakcí, které vedou k produkci růstových faktorů a molekul extracelulární matrix. Vytvářejí prostředí umožňující regeneraci a podporují růst a vedení poškozeného axonu (Oudega, 2007). Po transplantaci periferních SC do kontuzního míšního poranění byla pozorovaná integrace transplantovaných buněk v poškozené míše, zvýšená axonální regenerace a myelinizace a redukce kavity (Martin et al., 1993) i zlepšení motoriky prokázané pomocí BBB testu (Takami 2002). Hill a spol. (Hill et al., 2006) ve své práci dokazuje extensivní migraci endogenních p75<sup>+</sup> SC po transplantaci SC potkanům s míšní lézí a poukazuje na možný podíl endogenních SC na terapeutickém efektu.

V několika studiích bylo také využito kombinací biomateriálů a SC k přemostění léze, což vedlo k zlepšení regenerace, prorůstání axonů v materiálu a zlepšení remyelinizace (Xu et al., 1995). Ukázalo se však, že SC nedokáží migrovat ven z transplantantu do míšní tkáně a nepodporují tak regenerující axony v jejich růstu z oblasti transplantátu SC zpět do tkáně hostitele (Xu et al., 1997). Předpokládá se, že SC nejsou schopny dostatečné migrace a proliferace v oblasti s četným výskytem astrocytů (jako je gliální jizva) (Franklin et al., 1997). Aplikací dalších růstových faktorů do míšní tkáně lze však prorůstání axonů z implantátů podpořit (Bamber et al., 2001). Tyto nežádoucí reakce transplantovaných SC v prostředí s vysokým výskytem astrocytů (Plant et al., 2001; Lakatos et al., 2003) jsou důvodem pro přehodnocení přístupu k terapii pomocí SC (Barnett et al., 2004) a uplatňování kombinace jiných postupů spolu s transplantací SC (Fouad et al., 2005). Chau a spol. například použili kombinaci PAN/PVC nosiče osázeného SC s chondroitinázou ABC a pozorovali značné množství regenerujících axonů prorůstajících rozhraní nosič-tkáň (Chau et al., 2004). Nedávné výsledky také ukazují, že kotransplantace SC a MSC může být efektivnější než transplantace buněk samotných (Ban et al., 2011).

Potenciál k využití v léčbě míšního poranění mají také olfaktorické gliové buňky (Franssen et al., 2007)

#### **1.4.3 Způsoby aplikace buněčné terapie pro léčbu míšního poranění**

Důležitými parametry ovlivňujícími léčebný účinek buněk je počet transplantovaných buněk a způsob podání. Buňky je možno aplikovat intravenózně, intratekálně (intraventrikulárně nebo subarachnoidálně), intraarteriálně nebo přímo intraspinalně. Často využívané je přímé podání buněk do míchy. Vyžaduje ovšem invazivní zásah do tkáně a je

provázeno větším operačním rizikem ve srovnání s ostatními možnostmi podání (Hejčl et al., 2011). Nejméně invazivní způsob je podání intravenózní. MSC a jiné typy buněk jsou schopny do určité míry po intravenózním podání migrovat do místa poranění díky chemoatraktantům sekernovaným poškozenou tkání (Wang et al., 2002; Osaka et al., 2010). Jiné práce však ukazují, že počet buněk, který byl nalezen v místě léze po i.v. podání, byl minimální. Courtney a spol. (Courtney et al., 2009) hodnotili různé cesty podání pro léčbu míšní léze a uvádí, že intratekální podání buněk lumbální punkcí je výrazně efektivnější než intravenózní a méně invazivní v porovnání s přímou aplikací buněk do léze.

Bylo ukázáno, že po transplantaci MSC lumbální punkcí probíhá funkční regenerace poškozené míchy lépe při vyšší dávce transplantovaných buněk (Pal et al., 2010). Ve studii hodnotící vliv počtu transplantovaných neurálních prekurzorů na funkční zlepšení po míšním poranění však nebyl efekt vyšších dávek prokázán. Při transplantaci vysokého počtu buněk naopak docházelo ke zhoršení poranění a zánětlivé reakci (Kumamaru et al., 2012). Efektivní podání optimálního počtu buněk do místa léze je důležitým předpokladem úspěšné terapie.

#### **1.4.4 Zvyšování efektivity buněčné terapie**

Rozvoj buněčné terapie a nutnost řešení specifických problémů, jako je optimální distribuce buněk v organizmu, dosažení dostatečné koncentrace buněk v určitém místě, maximalizace jejich terapeutického efektu a zvýšení bezpečnosti terapie, vede v posledních letech k hledání optimalizovaných přístupů k podání buněk a jejich cílenému doručování (Wagner et al., 2009).

Jedním z přístupů jak zvyšovat efektivitu podaných buněk je genetická úprava buněk tak, aby produkovaly ve zvýšené míře určité proteiny. Tento přístup byl uplatněn například u MSC geneticky modifikovaných pro zvýšenou tvorbu některých neurotrofických faktorů. Takto upravené MSC zlepšily funkční výsledky u zvířecích modelů roztroušené sklerózy a ALS (Suzuki et al., 2008; Lu et al., 2009). Efektivita podaných buněk může být také zvýšena prodloužením života buněk v organizmu příjemce po transplantaci. Například geneticky upravené MSC exprimující ve zvýšené míře antiapoptotický faktor Bcl-2, přežívaly po transplantaci déle a díky tomu přispěly k většímu zlepšení srdeční funkce u potkanů s modelovým poškozením myokardu (Li et al., 2007). Klinické využití těchto metod je však limitováno riziky vyplývajícími z genetických úprav buněk.

Efektivita podání buněk může být také zvýšena cíleným doručováním buněk do místa poškození. Toho může být dosaženo například navázáním specifických protilátek na povrch buněk různými biochemickými metodami. Takto značené buňky pak mohou být díky

přítomnosti specifického peptidu navedeny do určitého místa v organizmu (Wagner et al., 2009). Cíleného doručování NSC po intraarteriálním podání do specifických oblastí mozku může být také dosaženo pomocí selektivního otevřání hematoencefalické bariéry v určitých regionech mozku ultrazvukem zaměřovaným pomocí MR. Podané neurální prekurzory tak mohly být cíleny do předem určených oblastí mozku (Burgess et al., 2011). Buňky je také možné cílit a koncentrovat v místě účinku pomocí magnetického pole. Pro tento účel je nutné cílené buňky označit vhodnými magnetickými částicemi a tím je učinit vnímatelné k aplikovanému magnetickému poli (viz Kapitola 1.5.5.).

#### **1.4.5 Monitorování buněčné terapie**

V oblasti regenerativní medicíny je pro úspěšné a bezpečné využití buněčné terapie nutné sledovat osud a chování transplantovaných buněk a je nutné odlišit transplantované buňky od buněk příjemce (Syková et al., 2007b).

Transplantované buňky je možné detektovat v organizmu experimentálních zvířat *ex vivo*, například pomocí různých endogenních markerů specificky rozpoznávajících určitý typ transplantovaných buněk, detekcí značených buněk získaných z transgenních zvířat (např. detekce signálu proteinu GFP) nebo pomocí exogenního značení vneseného do buňky před transplantací (např. fluorescenční barvy, BrdU) (Paramore et al., 1992; Flax et al., 1998; Hudson et al., 2004). Pro *in vivo* zobrazování transplantovaných buněk jsou k dispozici různé metody, jako například optické zobrazování, pozitronová emisní tomografie (PET), SPECT nebo MRI (Bernsen et al., 2010). *In vivo* zobrazování je možné použít v klinické praxi a umožnuje monitorování dynamických změn, jako je přežívání a migrace buněk v organizmu příjemce.

Sledování osudu buněk pomocí MR má několik výhod oproti ostatním metodám: (i) je to metoda neinvazivní, (ii) nevyužívá ionizující záření, (iii) je možné dosáhnout vysokého rozlišení zobrazení a (iv) poskytuje informace o buňkách v anatomických a funkčních souvislostech (Syková et al., 2009; Bernsen et al., 2010). Předpokladem detekce buněk pomocí MR je jejich označení vhodnou kontrastní látkou, která ovlivní kontrast výsledného obrazu. Vhodnými kontrastními látkami jsou superparamagnetické nanočástice oxidu železa (SPION) (podrobněji níže), které se používají například v diagnostickém zobrazování jater (rozlišení normální a nádorové tkáně) (Bulte et al., 2004). Metoda detekce transplantovaných buněk značených SPION pomocí MR byla experimentálně úspěšně použita v CNS, játrech (Wang et al., 2001), ledvinách (Ittrich et al., 2007) a pankreatických ostrůvcích (Biancone et al., 2007). V oblasti CNS byla tato technika sledování osudu značených buněk demonstrována

na potkaním modelu míšního poranění a modelu iktu po intracerebrálním i po systémovém podání (Syková et al., 2007b; Syková et al., 2011). MSC a ESC značené SPION a transplantované do lézí mozku a míchy migrovaly do léze a zlepšily funkční výsledky pokusných zvířat (Jendelová et al., 2004; Syková et al., 2005).

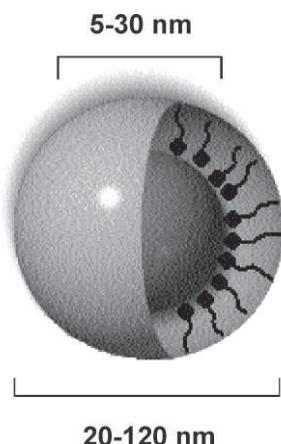
## 1.5 Nanočástice v biomedicíně

Všeobecně se jako nanočástice označují organické nebo anorganické materiály o velikosti přibližně 1-100 nm. Pro různé aplikace v regenerativní medicíně jsou vyvýjeny různé druhy nanočastic, jako například liposomy, kvantové tečky, nanotrubičky nebo nanočástice oxidu železa (Ferreira, 2009).

Nanočástice oxidu železa (SPION - superparamagnetic iron oxide nanoparticles) jsou primárně vyvýjeny jako kontrastní látky pro zobrazování pomocí MR. Experimentálně jsou také využitelné v diagnostice a léčbě onemocnění CNS. Díky magnetickým vlastnostem SPION je možné jejich využití také k nasměrování značených molekul nebo buněk do cílového místa pomocí vnějšího magnetického pole (Wahajuddin et al., 2012).

### 1.5.1 Struktura SPION

SPION jsou nejčastěji tvořeny superparamagnetickým jádrem (magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , maghemit  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) a povrchovým obalem různé struktury (obr. 4). Mohou být syntetizovány fyzikálními nebo chemickými metodami. Tzv. „mokré“ chemické metody umožňují na rozdíl od komplikovaných fyzikálních metod lepší kontrolu procesu, velikosti a složení výsledných nanočastic (Gupta et al., 2005). Oxidy železa ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nebo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) jsou typicky syntetizovány koprecipitací vodních roztoků  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  solí přidáním zásady. Složení, tvar a velikost nanočastic pak záleží na typu použitých solí (chloridy, sulfáty, nitrity, perchloráty), poměru  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , pH a iontové síle roztoku (Gupta et al., 2005; Horák et al., 2007a). Během nebo po syntéze mohou být částice pokryty vrstvou různého složení (angl. coating), která slouží nejen ke stabilizaci nanočastic, ale také chrání částice proti oxidaci (Horák et al., 2007b; Babič et al., 2009).



Obrázek 4. Schéma superparamagnetické nanočástice s jádrem z oxidu železa a polymerním obalem.

### 1.5.2 Povrchové obaly SPION

Povrchový obal je důležitým prvkem pro stabilitu nanočástic v roztoku i vlastní funkci nanočástic. SPION se vyznačují hydrofobním povrchem s velkým poměrem povrch/objem (Gupta et al., 2005). Koloidní roztok nanočástic má v důsledku působení fyzikálních sil mezi jednotlivými částicemi tendenci k aglomeraci. Z tohoto důvodu je nutné pro praktické použití suspenzi nanočástic stabilizovat, například vhodnou povrchovou modifikací (Babič et al., 2008). Povrch nanočástic může být modifikován anorganickými (Au, Si), nepolymerními nebo nejčastěji polymerními sloučeninami. Využití vhodného obalu též snižuje toxicitu nanočástic (Horák et al., 2009).

Požadavky na vlastnosti obalu SPION se dále liší podle účelu, ke kterému jsou částice připravovány (kontrast krevního řečiště, orgánů, intracelulární značení, nosiče molekul, separace buněk atd.) (Horák et al., 2009; Wahajuddin et al., 2012). Aby se omezilo vychytávání částic buňkami retikuloendotelového systému (RES) po systémovém podání a zvýšil se poločas částic (např. pro zvýšení kontrastu cévního řečiště), je nutné SPION pokrýt hydrofilním obalem (např. dextranem, karboxyextranem), a tak snížit adsorbci proteinů na povrch částic a vychytávání částic makrofágy. Na druhou stranu je možné využít vychytávání částic buňkami RES ke zvýšení kontrastu a zobrazování uzlin a jater, kde se ve zvýšené míře hromadí (Bulte et al., 2004).

Na polymerní obal SPION mohou být také navázány různé bioaktivní molekuly, např. protilátky. Částice je pak možné využít jako nosiče léčiv do určitého místa nebo je možné díky tomu zvýšit jejich internalizaci specifickým typem buněk.

Pro intracelulární značení kmenových buněk je nutné připravit takové částice, které budou buňkami efektivně internalizovány. Buňky pak mohou být v kultuře označeny SPION a

následně zobrazeny pomocí MR. Efektivita značení buněk a tedy detekce pomocí MR závisí na typu buněk, typu SPION částice, jejím polymerním obalu a koncentraci SPION v kultivačním mediu. V naší laboratoři se dlouhodobě zabýváme studiem designu a vlastností různých typů nanočastic pro intracelulární značení buněk. Jako velmi účinné pro zvýšení efektivity značení oproti komerčnímu preparátu Endorem® se ukazuje pokrytí SPION takovými molekulami, u kterých lze předpokládat jejich interakci s buněčnou membránou a indukci internalizace SPION do buněk. Takovými molekulami jsou např. poly-L-lysin, manóza nebo polydimetylakrylmid (PDMAA) (viz níže) (Horák et al., 2007b; Babič et al., 2008; Babič et al., 2009). Ideální polymerní obal nanočastic musí zajistit efektivní značení buněk, dostatečnou stabilitu, vysokou biokompatibilitu a relaxativitu nanočastic pro zobrazení pomocí MR.

### **1.5.3 Biologické vlastnosti SPION internalizovaných do buněk**

Vychytávání častic buňkami závisí na velikosti častic, povrchových vlastnostech, náboji, koncentraci častic v kultivačním mediu a také inkubačním času v kultuře. Předpokládá se, že nanočastic mohou být do buňky vychytávány různými mechanizmy, například nespecifickou endocytózou (Lu et al., 2007) či endocytózou zprostředkovanou receptorem (Ferreira, 2009; Yang et al., 2011). Po přechodu membránou se nanočastic internalizují v endosomech a jsou poté transportovány do lysozomů, kde mohou být degradovány, exocytózou vyloučeny z buňky nebo mohou opustit endo-lysozomální kompartment a vycestovat do jiné části buňky (Ferreira, 2009). Předpokládá se, že SPION jsou po internalizaci do buňky biodegradovány a uvolněné železo je zpracováno normálními biochemickými pochody metabolismu železa (Thorek et al., 2008; Gu et al., 2011). Samotný náboj nanočastic a její elektrostatické interakce s negativně nabité buněčnou membránou jsou určující faktory v procesu internalizace do buňky. Náboj nanočastic také ovlivňuje adsorpci proteinů z kultivačního media na povrch častic a tím může ovlivnit vychytávání do buněk (Ferreira, 2009). Například častic pokryté kladně nabitém poly-L-lysinem mají schopnost indukovat endocytózu právě prostřednictvím elektrostatických interakcí se záporně nabitém povrchem buněčných membrán (Babič et al., 2008). Příkladem receptorově zprostředkované endocytózy nanočastic mohou být častic pokryté manózou, pro kterou mají buňky specifický receptor (Horák et al., 2007b).

Vzhledem k tomu, že v savčích buňkách se běžně vyskytuje feritin (superparamagnetický krystalit ferihydritu s průměrem cca 5-10 nm obalený kulovitou vrstvou proteinových řetězců apoferitinu), je u SPION předpokládaná nízká toxicita (Frankel

et al., 1991; Singh et al., 2010; Yamamoto et al., 2011). Nicméně vliv internalizovaných SPION na biologii buňky není zcela objasněn. Díky jejich rozměrům v řádu nanometrů mohou mít nanočástice jiné nebo specifické biologické účinky než částice větších rozměrů (Singh et al., 2007). van Buul a spol. (van Buul et al., 2011) se zabývali viabilitou, metabolickou aktivitou, diferenciací a profilem cytokinů uvolňovaných z lidských MSC značených SPION a konstatovali bezpečnost značení buněk nanočásticemi. Práce Huang a spol. (Huang et al., 2009) dokonce ukazuje, že značení SPION může podporovat proliferaci MSC snižováním intracelulárního  $H_2O_2$ . Jsou však popsána i určitá rizika v souvislosti s využití SPION ke značení buněk. Některé práce ukazují, že značení buněk SPION může snižovat schopnost diferenciace (Kostura et al., 2004), ovlivňovat cytoskelet buněk (Berry et al., 2004), či zvyšovat množství volných radikálů a poškozovat DNA a proteiny a molekuly v buňce (Novotná et al., 2012). Význam těchto dílčích reakcí a reálná toxicita SPION však dosud nebyla adekvátně zhodnocena (Singh et al., 2010). Je zřejmé, že spolu s přípravou nových nanočastic je nutné zároveň sledovat jejich biologické efekty a identifikovat případné nežádoucí účinky (Kubinová et al., 2010b).

#### 1.5.4 Fyzikální vlastnosti SPION

Důležitou vlastností SPION je jejich superparamagnetismus. Superparamagnetismus je forma magnetismu, která se objevuje u velmi malých magnetických nanočastic, jejichž magnetický moment volně rotuje. Při vystavení magnetickému poli jsou tyto částice zmagnetizovány, podobně jako paramagnetické materiály. Při odejmutí magnetického pole se magnetizace ztrácí, částice si ale zachovávají silné paramagnetické vlastnosti (odtud název superparamagnetismus) a vysokou vnímavost k magnetickému poli (Gupta et al., 2005). Superparamagnetické chování častic záleží nejen na složení, jejich velikosti a teplotě, ale je ovlivňováno také sousedními nanočásticemi a charakterem jejich povrchu (Horák et al., 2007a). Díky této vlastnosti je stabilita koloidních roztoků SPION větší než je stabilita roztoků častic větších rozměrů nebo jejich shluků, které jsou feromagnetické a mají větší tendenci k aglomeraci (Woodward et al., 2007).

Na přítomnost stacionárního magnetického pole reagují SPION tak, že jsou přitahovány ve směru stoupajícího gradientu pole. Díky tomu mohou být buňky značené SPION zadrženy v určitém místě nebo cíleny do určitého místa jejich působení. Gradient magnetického pole nutný ke koncentraci značených buněk v určité oblasti může být generován různými zdroji, jako jsou permanentní magnety vně těla, implantované magnety nebo kombinované systémy feromagnetických objektů, např. stenty, či jehly, které generují

lokalizované magnetické pole (Nishida et al., 2006; Polyak et al., 2008). *In vitro* byly k cílení buněk využity i systémy MR (Riegler et al., 2010; Riegler et al., 2011). Snahou autorů je nalézt prakticky využitelný magnetický systém s optimálními vlastnostmi pro cílení značených buněk do konkrétní oblasti organizmu.

V přítomnosti nestacionárního magnetického pole vytvářeného například radiofrekvenčním elektrickým polem mohou SPION produkovat teplo. Této vlastnosti nanočastic se využívá při léčbě nádorových onemocnění magnetickou hypertermií (Pankhurst et al., 2003).

SPION způsobují lokální nehomogenitu magnetického pole v okolní tkáni, což vede ke zkrácení tzv. relaxačních časů  $T_2$  a snížení signálu MR. Díky tomu mohou být použity jako kontrastní látky pro zobrazení pomocí MR (Horák et al., 2011).

### 1.5.5 Cílené magnetické doručování značených buněk

Využití SPION k magnetickému cílení léčiv je dlouhodobě studováno zejména v oblasti chemoterapie a radioterapie (Hafeli, 2004). Cílené doručování umožnuje zvýšit koncentraci léčiva v místě účinku a naopak snížit množství léku v jiných částech organizmu, a tím omezit případné systémové nežádoucí účinky (Sarwar et al., 2012). Naproti tomu studium cílení buněk do místa jejich účinku je v současné době stále v počátcích (Kyrtatos et al., 2009).

*In vivo* bylo magnetické cílení buněk značených SPION pomocí externích permanentních magnetů demonstrováno u zvířecích modelů při cílení buněk do jater (Arbab et al., 2004), myokardu (Cheng et al., 2010), arterie carotis communis (Kyrtatos et al., 2009) nebo retiny (Yanai et al., 2012).

Při aplikaci buněk pro léčbu defektů CNS je nutno zvažovat efektivitu různých způsobů aplikace buněk. Jak již bylo zmíněno výše, dosažení dostatečné koncentrace buněk v místě léze je základním předpokladem úspěšné buněčné terapie. V jedné z prvních prací zabývající se cílením buněk do míšní léze pomocí permanentního magnetu Nishida a spol. (Nishida et al., 2006) popsali zvýšení počtu SPION značených buněk v oblasti míchy pod implantovaným magnetem po intratekální aplikaci buněk lumbální punkcí. Později bylo popsáno i zlepšení motorických funkcí u potkanů díky buňkám magneticky cíleným do oblasti léze (Sasaki et al., 2011).

Možnost manipulace značenými buňkami v magnetickém poli byla využita i při osidlování nosičů buněk (scaffoldů) pro aplikaci v tkáňovém inženýrství. Kazunori Shimidzu

například navrhl metodiku osazování porézních kolegenových a PLA nosičů SPION značenými buňkami pomocí magnetu (Shimizu et al., 2006; Shimizu et al., 2007)

## 1.6 Biomateriály

Využití biomateriálů je v současné době považováno za velmi perspektivní metodu pro léčbu míšního poranění. Gliová jizva a kavita, která se po vážném poranění míchy vytvoří v oblasti léze, brání prorůstání axonů. Terapeutickým přístupem se slibnými preklinickými výsledky je přemostění léze vhodným biomateriélem, který poskytuje jednak strukturální podporu pro růst a regeneraci axonů, a zároveň slouží jako nosič pro léčivé látky nebo buňky (Johnson et al., 2010; Kubinová et al., 2012).

K léčbě míšního poranění jsou experimentálně využívány různé přírodní (např. kolagen, alginát, želatina, kys. hyaluronová) a syntetické (PLA, PHEMA, PHPMA) polymery. Nevýhodou využívání přírodních materiálů je jejich variabilita a možná imunogenicita. Naproti tomu syntetické materiály mohou být připravovány kontrolovanými procesy a jejich fyzikální a chemické vlastnosti mohou být různě modifikovány. Důležité vlastnosti materiálů pro aplikaci do poškozené míchy shrnuje tabulka č.1. Biomateriály lze podle jejich osudu v organizmu rozdělit na degradovatelné a nedegradovatelné (Zhong et al., 2008). Důležitou vlastností biomateriálů je jejich biokompatibilita, tj.materiál nemá toxické nebo škodlivé účinky na biologický systém.

Požadavky na vlastnosti materiálů pro využití v léčbě míšního poranění	
Designové prvky	Specifické požadavky
Biokompatibilita	Netoxický, neimunogenní
Mechanické vlastnosti	Minimální invazivita při aplikaci, dobrá integrace do tkáně
Sterilizovatelnost	Zabránění zanešení infekce
Degradovatelnost vs nedegradovatelnost	Fyzikálně chemická stabilita vs optimální degradační vlastnosti
Porozita	Propustnost, umožnění vrůstání axonů, vaskularizace
Orientované kanály	Kontrolovaný růst a vedení axonů
Povrchové vlastnosti	Kontrolovaná a vedená adheze buněk a neuritů
Cílené doručení buněk	Poskytování vhodného prostředí pro růst buněk
Cílené doručení biomolekul	Indukce permisivního prostředí pro růst axonů(například neutralizace inhibičních molekul, redukce zánětu, neuroprotekce, přítahování endogenních kmenových buněk aj.)
Elektrická vodivost	Stimulace neuronální aktivity
Možnost průmyslové výroby	Komercionalizace produktu

Tabulka 1. Požadavky na vlastnosti biomateriálů pro využití v léčbě míšního poranění. Podle (Kubinová et al., 2012).

### **1.6.1 Nanovlákna**

Nanovlákna jsou velmi tenká vlákna s průměrem menším než jeden mikrometr, která mohou tvořit prostorové sítě (Subramanian et al., 2009). Struktura nanovlákných sítí napodobuje strukturu ECM a může podporovat růst, adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk (Martins et al., 2007). Nanovlákna mohou být připravena jak z materiálů syntetických (např. kyselina poly-L-mléčná, PLGA, nebo poly-vinylalkohol), tak přírodních (kolagen, želatina, algináty, chitosan). Nejpoužívanějšími metodami pro přípravu nanovláken pro využití v tkáňovém inženýrství je příprava nanovláken zvlákňováním pomocí tzv. elektrospinningu (Murugan et al., 2007). Nanovlákné tkaniny mohou být použity jako nosiče buněk vhodné pro léčbu míšního poranění. Vlákna v nanovlákné tkanině mohou být uspořádaná náhodně nebo mohou být prostorově orientovaná v jednom směru. Uspořádáním nanovláken tak lze orientovat růst buněk na materiálu určitým směrem (Kubinová et al., 2010a).

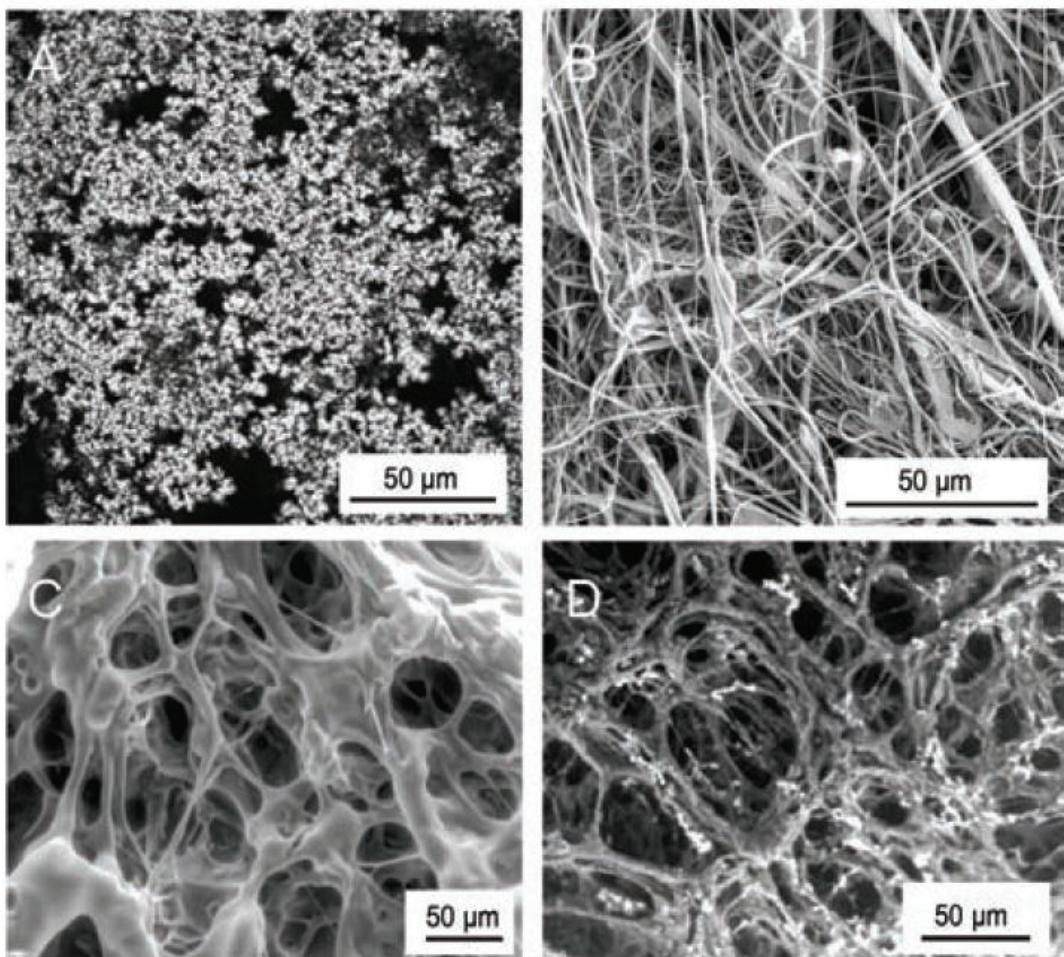
Bylo například ukázáno, že neurony adherují a rostou na nanovláknech vytvořených z kyseliny poly-L-mléčné (Yang et al., 2005). Po voperování nanovlákných implantátů do poškozené míchy se tyto implantáty integrovaly do poškozené tkáně a bylo pozorováno vrůstání cév, pojivové tkáně a nervových výběžků. Rozsah vrůstání tkáně do materiálu závisel na prostorové orientaci nanovlákných vrstev (Přádný et al., 2007). Bioaktivní vlastnosti nanovláken lze také modifikovat imobilizací různých funkčních skupin nebo léčiv do struktury vlákna (Holáň et al., 2011; Míčková et al., 2012).

### **1.6.2 Hydrogely**

Hydrogely jsou hydrofilní polymery s vysokým obsahem vody (70-90%) a porézní strukturou s velikostí pórů v rozmezí od 10 do 100  $\mu\text{m}$  (Lesný et al., 2002; Lesný et al., 2006). Díky svým vlastnostem vázat vodu a možnosti modifikovat jejich fyzikálně chemické vlastnosti jsou tyto materiály v popředí zájmu již od 60. let, kdy byly objeveny Otto Wichterlem a Drahoslavem Límem (Wichterle et al., 1960). Vlastnosti hydrogelů jsou velmi výhodné pro použití v léčbě míšního poranění. Materiály tohoto typu lze modifikovat tak, že vykazují mechanické a strukturální vlastnosti podobné neurální tkáni. Přemostění míšního poranění implantací vhodného typu hydrogelu vedlo ke snížené tvorbě jizvy a k vytvoření vhodného prostředí pro růst buněk a difúzi neuroaktivních látek včetně růstových faktorů (Woerly et al., 1999; Lesný et al., 2002).

Důležitou vlastností hydrogelů je velikost a struktura pórů v materiálu. Porozita materiálu hraje roli v mechanických vlastnostech a stabilitě materiálu, revaskularizaci, difúzi látek a také adhezi, morfologii a funkci buněk. Póry v materiálu mohou být uspořádány

náhodně nebo mohou být směrově orientovány. Orientované póry v materiálu mohou sloužit jako vodiče pro transplantované buňky rostoucí na gelu. Po implantaci hydrogelu s orientovanými póry do míšní léze, mohou být také vrůstající axony směrovány orientací pórů v materiálu (Prang et al., 2006).



*Obrázek 5. Experimentální biomateriály pro léčbu míšního poranění. HPMA-RGD hydrogel (A), nanovlákkenný nosič (B), HEMA hydrogel (C), biodegradabilní HEMA hydrogel částečně degradovaný po 2 dnech (D). Podle (Hejčl et al., 2008a).*

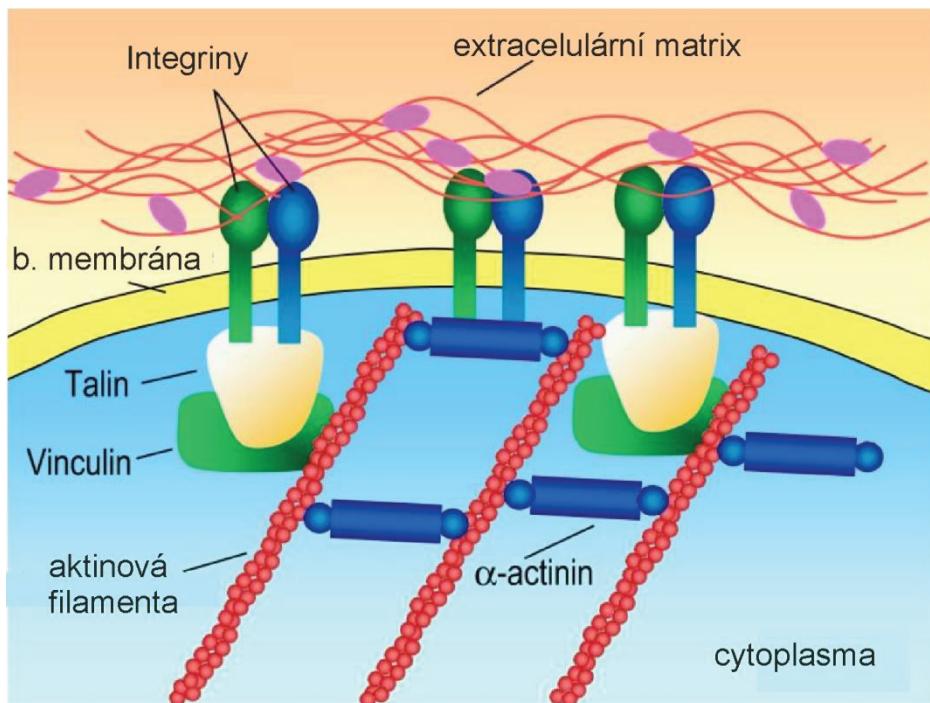
Pro aplikaci v léčbě SCI jsou vyvíjeny různé druhy biodegradabilních i nedegradabilních polymerních materiálů. Mezi degradabilní polymery patří například polyuretan, kyselina poly-glykolová, poly-mléčná (Cai et al., 2007) a poly( $\epsilon$ -kaprolakton). Mezi slibné nedegradabilní polymery patří látky založené na poly(2-hydroxyethyl metakrylátu) (PHEMA) a PHPMA (poly[N-(2hydroxypropyl)metakrylamid]) (Hejčl et al., 2008b). PHEMA je vhodný materiál díky dobrým mechanickým vlastnostem a ověřený řadou úspěšných aplikací v biomedicíně (kontaktní čočky, nosiče léčiv) (Atzet et al., 2008).

Viskoelastické vlastnosti modifikované PHEMA jsou velmi podobné vlastnostem nervové tkáně (Lesný et al., 2002; Hejčl et al., 2008a). Na našem pracovišti byla regenerace míšní tkáně studována po implantaci hydrogelů na bázi PHEMA a jeho derivátů s různými povrchovými náboji. Ukázalo se, že zejména PHEMA hydrogely s pozitivním povrchovým nábojem adherovaly dobře ke tkání a byly schopny přemostit míšní lézi a redukovat posttraumatickou kavitu (Syková et al., 2006a). Subakutní implantace PHEMA hydrogelu 1 týden po kompletní transekci míchy vedla k lepšímu přemostění kavy a redukcii pseudocysty než implantace hydrogelu okamžitě po indukci poranění (Hejčl et al., 2008b). Ačkoliv jsou hydrogely na bázi PHEMA velmi dobře tolerované *in vivo*, jejich nevýhodou je, že postrádají funkční skupiny, které by umožnily připojit biologicky aktivní molekuly zlepšující vlastnosti materiálu (např. zlepšující adhezi, růst či nebo diferenciaci buněk). Jedním z cílů této práce je proto také optimalizace povrchové struktury toho typu hydrogelu.

### 1.6.3 Biomodifikace povrchu hydrogelů

Povrchové vlastnosti hydrogelů jako je náboj nebo povrchové molekuly, mohou být modifikovány za účelem zlepšení jejich jejich biokompatibility nebo schopnosti regenerace nervové tkáně.

Signály nutné k přežití a proliferaci buněk, specifické genové transkripcí nebo například růstu axonů jsou zprostředkovány kontaktem buněk mezi sebou nebo s ECM (Rao et al., 2009). Interakce tkáně a buněk s hydrogelem může být velmi podstatně ovlivněna faktory ovlivňujícími buněčnou adhezi na povrch materiálu. Adheze buněk je zprostředkována vazbou transmembránových integrinových receptorů na specifické molekuly ECM, jako je laminin, kolagen nebo fibronektin (Huvaneers et al., 2009). Vazba integrinů na proteiny ECM probíhá prostřednictvím specifických peptidových sekvencí (epitopů) (Rao et al., 2009). Vazba těchto sekvencí s integriny buňky vede k vytvoření tzv. fokálních adhezí a ke spuštění kaskády vnitrobuněčných reakcí, které ovlivňují molekuly cytoskeletu např. aktin. Mezi nejdůležitější proteiny podílející se na tvorbě komplexu fokálních adhezí patří talin, vinkulin nebo aktinin (obr.6) (Bačáková et al., 2004).



Obrázek 6. Proteiny účastníci se kaskády integrinem zprostředkované adheze buněk na substrát. Podle (Rao et al., 2009).

Syntetické polymery obvykle nemají adhezivní vlastnosti, protože postrádají adhezivní vazebná místa rozpoznatelná buňkami (Yu et al., 2005). Zlepšení specifických adhezivních vlastností hydrogelů lze dosáhnout například navázáním specifických vazebných míst (epitopů) proteinů ECM na strukturu hydrogelu (von der Mark et al., 2010). Příkladem jsou peptidové sekvence odvozené od fibronektinu (RGD) nebo lamininu jako je YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) nebo IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) (Tashiro et al., 1989; Park et al., 2007). Výhodou použití krátkých specifických sekvencí adhezivních proteinů nad použitím celých proteinů je snadná příprava a možnost inkorporace těchto peptidů na povrch materiálů v relativně větší hustotě než v přirozené ECM (Silva et al., 2004). Zhang a kol. například charakterizovali peptidovou sekvenci Arg-Gly-Asp (RGD) navázanou na polykaprolaktonový polymer a prokázali zlepšení růstu a přežívání MSC na tomto materiálu (Zhang et al., 2009). Hydrogely na bázi hydroxypropylmetylakrylamidu (HPMA) s imobilizovanou sekvencí RGD byly implantovány do mozku potkana a došlo ke zlepšení adheze materiálu k okolní tkáni a vrůstání neurofilament a GFAP pozitivní tkáně na povrch a dovnitř materiálu (Woerly et al., 1995).

Vedle imobilizace různých sekvencí molekul ECM, je možné hydrogel modifikovat například cholesterolom a zvýšit tak adhezi buněk na materiálu optimalizací poměru hydrofilních a hydrofobních skupin na materiálu (Kubinová et al., 2009; Kubinová et al.,

2011a). Ve struktuře hydrogelů je také možné vytvářet chemické gradienty růstových faktorů pro kontrolovaný růst a migraci buněk (Nguyen et al., 2011).

#### **1.6.4 Použití hydrogelů v kombinaci s buňkami**

Materiály typu hydrogelů mohou podpořit regeneraci míšního poranění (např. redukcí tvorby gliální jizvy a tvorby cysty), pro efektivní léčbu je však nutné kombinovat jejich použití s dalšími postupy. Hydrogel může sloužit nejen jako základní struktura nutná k regeneraci míšní tkáně, ale může být využit jako nosič či lešení (angl. scaffold) pro různé typy kmenových buněk. Kombinací buněk a hydrogelu lze vytvořit konstrukt, který by měl převzít roli půrizené tkáně a její funkce. Implantací hydrogelu s kmenovými buňkami je možné zajistit lokální působení kmenových buněk v místě léze (Hejčl et al., 2011). Bylo ukázáno, že léčba míšního poranění pomocí hydrogelů osazených MSC vedla k zlepšení motorických a senzorických funkcí u pokusných zvířat (Hejčl et al., 2010; Syková et al., 2010; Zeng et al., 2011). Například implantace hydrogelu na bázi 2-hydroxypropylmetakrylamidu (HPMA) s imobilizovanou sekvencí RGD na povrchu a osázeném MSC vedla k signifikantnímu zlepšení motorických a senzorických funkcí u testovaných zvířat s indukovanou chronickou míšní lézi v porovnání se samotným hydrogelem a kontrolní skupinou. Axony, cévy a astrocyty prorůstaly do implantovaného gelu, který přemostil míšní lézi (Hejčl et al., 2010). Tato strategie se v současné době považuje za efektivní přístup k léčbě míšního poranění (Syková et al., 2006a; Perale et al., 2011).

## 2 Hypotézy a cíle práce

Cílem této práce byl vývoj a studium nových materiálů na bázi hydrogelů a studium nanočástic vyvíjených za účelem zefektivnění buněčné terapie míšního poranění. Studována byla jak biokompatibilita, tak funkční vlastnosti připravených hydrogelů a nanočástic ve vztahu ke kmenovým buňkám využívaných k léčbě SCI. V popředí zájmu byla interakce biomateriálů s mezenchymálními kmenovými buňkami (MSC), protože tento typ buněk začíná být v současnosti používán v klinické praxi.

Cílem práce bylo ověření následujících hypotéz:

1. SPION pokryté dopamin-hyaluronátovým (DPA-HA) asociátem lze využít ke značení MSC a jejich zobrazení pomocí MR.
  - Pro potvrzení této hypotézy jsme zhodnotili efektivitu značení buněk částicemi připravenými v různém poměrném složení obalu, posoudili jejich toxicitu, vliv na viabilitu, proliferaci a diferenciaci značených buněk. Využitelnost nanočástic pro zobrazení MR jsme zhodnotili měřením relaxivity nanočástic.
2. MSC značené SPION je možné efektivně cíleně doručit a koncentrovat do oblasti míšní léze pomocí implantovaného permanentního magnetu.
  - Kvalitativně a kvantitativně jsme zhodnotili efektivitu využití magnetického cílení buněk značených SPION na modelovém defektu poškozené míchy a charakterizovali jednoduchý magnetický systém pro cílení buněk založený na permanentním magnetu. Navrhli jsme možné směry k optimalizaci magnetického systému pro cílenou buněčnou terapii.
3. Biokompatibilitu a bioadhezivní vlastnosti hydrogelu na bázi PHEMA pro využití v léčbě míšního poranění lze zdokonalit modifikací jeho povrchu peptidem Ac-CGGASIKVAVS-OH obsahujícím sekvenci IKVAV odvozenou od lamininu.
  - Předpokladem pro využití hydrogelu v kombinaci s buňkami je jeho schopnost zachytit na svém povrchu dostatečný počet buněk a podpořit jejich růst a diferenciaci. Proto jsme *in vitro* charakterizovali a kvantifikovali bioadhezivní vlastnosti nového modifikovaného hydrogelu. Hodnotili jsme zachycení, adhezi a růst MSC na povrchu hydrogelu a také a vliv sekvence IKVAV na diferenciaci neurálních prekurzorů.

### **3 Metodika**

#### **3.1 Buněčná kultivace**

##### **3.1.1 Mezenchymální kmenové buňky (MSC)**

MSC byly izolovány z kostní dřeně 4 týdenních potkanů kmene Wistar. Stejným způsobem byly získány GFP<sup>+</sup> MSC z transgenní linie potkanů kmene Sprague-Dowley (kód linie: TgN acro/act EGFP-4Osb). Kostní dřeň byla izolována z femurů a tibií potkanů. Po předávkování isofluranem byla zvířata dekapitována, femury a tibiae byly vyjmuty a důkladně očištěny od měkkých tkání. V laminárním boxu byly odštípnuty epifýzy kostí a kostní dřeň vymyta do zkumavky s použitím jehly a injekční stříkačky naplněné Dullbeccem modifikovaným mediem podle Eagle (DMEM, Invitrogen, CA, USA) s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) (PAA Laboratories, Pasching, Rakousko) a antibiotikem Primocinem® (2 µl/ml, Lonza, Cologne, Německo). Obsah zkumavky byl jemně suspendován a suspenze byla vysazena na Petriho misku. Po 24 hodinách bylo vyměněno medium, a tím byly také odstraněny neadherující buňky. Medium bylo dále vyměnováno 2x týdně. Po dosažení přibližně 80% konfluence byly adherované buňky pasážovány pomocí roztoku trypsinu a EDTA. Buňky byly kultivovány v inkubátoru v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> při 37 °C. V experimentech jsme využívali buňky první až třetí pasáže. Růst a typickou vřetenovitou morfologii buněk jsme průběžně monitorovali mikroskopicky.

##### **3.1.2 Diferenciace MSC**

K průkazu multipotence MSC byl využit diferenciační test do adipocytů, osteoblastů a chondrocytů.

K indukci chondogeneze byla využita tzv. metoda peletové kultury (Wescoe et al., 2008). Buňky byly přeneseny do polypropylenových zkumavek, centrifugovány a diferencovány do chondrocytů v peletové kultuře (250000 buněk/peleta) v mediu (DMEM) bez přítomnosti séra, doplněném o diferenciační faktory: dexametason 0.1 µM (Sigma, St Louis, USA), lidský transformující růstový faktor β1 (hTGF-β1, 10 ng/mL; Millipore, Billerica, MA, USA), kyselina L-askorbová (0,05 mM; Sigma), ITS+ universální kultivační suplement 1% (BD Biosciences, Bedford, USA). Zkumavky byly inkubovány při 37 °C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a medium bylo měněno 2x týdně. Chondrogenní pelety byly po 20-22 dnech v kultuře fixovány formaldehydem, zality do parafinového bločku a nakrájeny na řezy o

tloušťce 5  $\mu\text{m}$ . Řezy byly barveny Alciánovou modří podle standardní histologické metodiky (Schutze et al., 2005).

Adipogeneze byla indukována u buněk nasazených na šesti jamkovou destičku v počtu 10000 buněk/cm<sup>2</sup>. Buňky byly kultivovány do dosažení konfluence ve standardním mediu a poté dále kultivovány v mediu obsahujícím DMEM, dexametason (1 $\mu\text{M}$ ; Sigma), 3-isobutyl-1-metylxitantin (0,5 mM; Sigma), indomethacin (0,1 mM; Sigma), insulin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma) a Primocin® (2  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ). Medium bylo měněno 2x týdně. Po deseti dnech byly buňky fixovány a obarveny olejovou červení pro zobrazení lipidových depozit (Schutze et al., 2005).

K indukci osteogeneze byly buňky nasazeny na šesti jamkovou destičku v hustotě 3000 buněk/cm<sup>2</sup>. Po 24 hodinách bylo přidáno medium obsahující DMEM, 10% FBS, dexametason (0,1  $\mu\text{M}$ ),  $\beta$ -glycerofosfát (10 mM; Sigma), kyselinu L-askorbovou (0,1 mM) a Primocin® (2  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ). Medium bylo měněno 2x týdně. Po 20 dnech byly buňky fixovány formaldehydem a typická kalciová depozita obarvena Alizarinovou červení (Schutze et al., 2005).

### 3.1.3 Kultura lidských chondrocytů

Chondrocyty byly získány biopsií z menisku koleního kloubu. Meniskální fragmenty byly rozmělněny a promyty PBS. Následně byly natráveny 0,25% roztokem trypsin/EDTA po dobu 1 hodiny a poté roztokem 0,25% kolagenázy typu I přes noc. Získané buňky byly promyty PBS a vysazeny na kultivační misku (75 cm<sup>2</sup>) a kultivovány v mediu obsahujícím DMEM/F12, FBS 10% a Primocin® (2  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ).

### 3.1.4 Lidské fetální neurální prekurzory

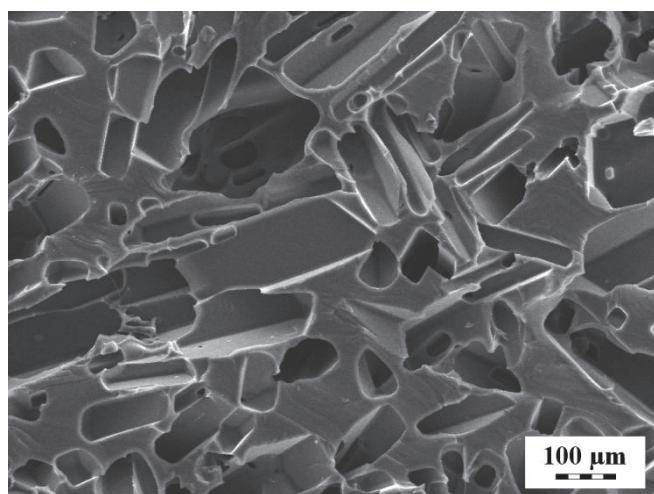
Lidské fetální neurální prekurzory linie SPC-01-GFP-3 (stabilní imortalizovaná linie) byly derivovány z 8 týdenní lidské fetální míchy a imortalizovány podle dříve popsaného postupu v laboratoři Jacka Price z Kings College v Londýně (Pollock et al., 2006). Buňky byly modifikovány genem c-mycER<sup>TAM</sup>. Produkt toho genu stimuluje proliferaci buňky za přítomnosti 4-hydroxytamoxifenu. V případě nepřítomnosti tamoxifenu se růst buněk zpomalí a buňky mohou diferencovat do neuronů a astrocytů. Buňky SPC-01 byly kultivovány v redukovaném modifikovaném mediu (RMM), které obsahovalo DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, UK), 3% lidský sérový albumin (Baxter Healthcare Ltd., UK), lidský apotransferrin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), putrescin dihydrochlorid (16,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), lidský rekombinantní insulin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), progesteron (60 ng/ml), L-glutamin (2 mM), selenit sodný (40 ng/ml), hEGF (20 ng/ml), 4-hydroxytamoxifen (100 nM) a lidský  $\beta$ -FGF (10ng/ml) (Sigma-Aldrich,

UK). Po dosažení přibližně 80% konfluence byly buňky pasážovány a využity v experimentech.

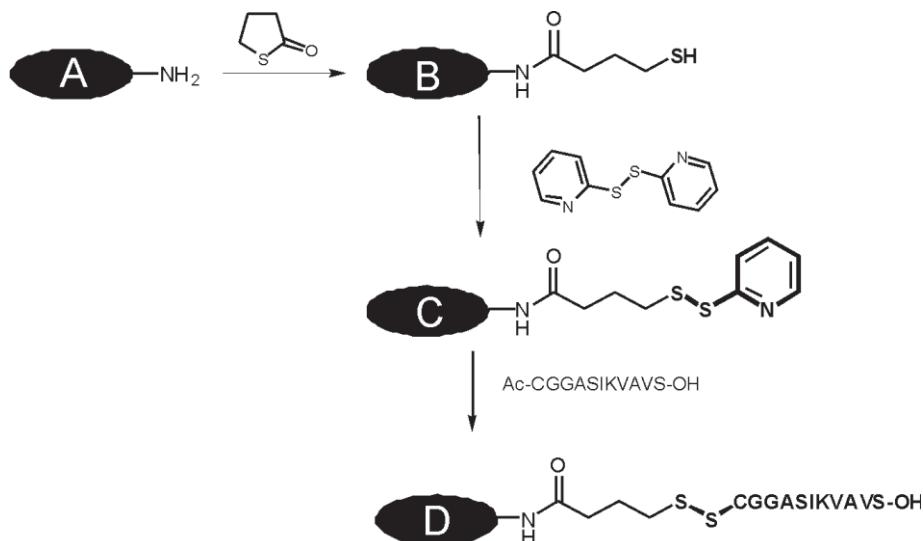
## 3.2 Hydrogely

### 3.2.1 Příprava a charakterizace hydrogelů

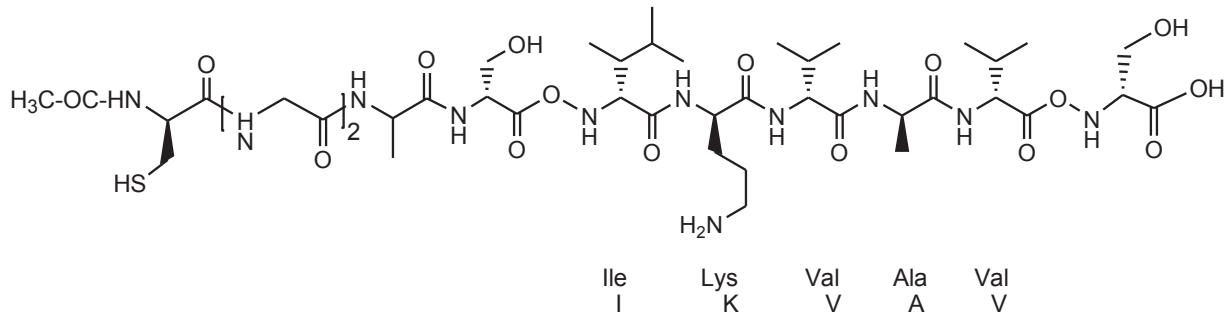
Syntéza studovaných hydrogelů byla provedena na Ústavu makromolekulární chemie AVČR. Jejich složení a charakterizace je detailně popsána v přiložené publikaci (Kubinová et al., 2010c). Radikálovou kopolymerizací 2-hydroxyethylmetakrylátu (HEMA) s malým množstvím 2-aminoethylmetakrylátu (AEMA) za přítomnosti krystalů oxalátu amonného jako porogenu byl nejprve v injekční stříkačce připraven reaktivní superporézní polymerní hydrogel poly(2-hydroxyethylmetakrylát-co-2-aminoethylmetakrylát-co-ethylen dimetakrylát), zkráceně P(HEMA-AEMA). Mikroskopická struktura P-(HEMA-AEMA) je zobrazena na obrázku č. 7. Výsledné válečky hydrogelu byly nařezány na tenké disky (tloušťka 0,7mm) (obr. 8A). Na tyto hydrogelové disky byla reakcí s  $\gamma$ -thiobutyrolaktonem zavedena sulfhydrylová skupina (-SH) (obr. 8B), na kterou po aktivaci 2,2'-dithiopyridinem a zavedení thiopyridinové skupiny (TPy) (obr. 8C) možno navázat peptidovou sekvenci Ac-CGGSIKVAV-OH (zkráceně IKVAV, struktura na obr. 9) přes -SH skupinu cysteinu (obr. 8D). Bioadhezivní vlastnosti MSC byly studovány jak na výsledném IKVAV modifikovaném hydrogelu (obr. 8D), tak u jeho jednotlivých prekurzorů (obr. 8A,B,C).



Obrázek 7. Mikrofotografie řezu superporézního P(HEMA-AEMA) hydrogelu pořízená skenovací elektronovou mikroskopíí (Kubinová et al., 2010c).



Obrázek 8. Aktivace P(HEMA-AEMA) (A) pomocí  $\gamma$ -thiobutyrolaktonu za vzniku P(HEMA-AEMA)-SH (B) a dále 2,2'-dithiopyridinu za vzniku P(HEMA-AEMA)-Tpy (C) s následnou imobilizací Ac-CGGASIKVAVS-OH na povrchu hydrogelu za vzniku P(HEMA-AEMA)-Ac-CGGASIKVAVS-OH (D) (Kubinová et al., 2010c).



Obrázek 9. Struktura peptidu Ac-CGGASIKVAVS-OH (Kubinová et al., 2010c).

### 3.2.2 Kultivace buněk na hydrogelech

Hustota buněk na gelu a růst buněk byly hodnoceny 4 hodiny po osazení vzorků hydrogelů MSC a kultivaci v médiu obsahujícím sérum, tak i bez séra. Sterilní vzorky hydrogelů byly umístěny do 24 jamkové destičky s kultivačním mediem (1ml na jamku), osazeny suspenzí MSC (30000 buněk na jamku) a kultivovány v inkubátoru se stabilní

vlhkostí v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při 37°C po dobu 4 hodin. Hydrogely byly poté promyty PBS a fixovány 4% formaldehydem.

Neurální prekurzory SPC-01-GFP-3 (100000 buněk/jamku) byly vysety na vybrané gely P(HEMA-AEMA)-SH nebo Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikované vzorky hydrogelu v 24 jamkové destičce s RMM mediem a kultivovány po dobu 28 dní.

### **3.2.3 Histologické zpracování hydrogelů**

Imunofluorescenční barvení hydrogelů osazených MSC bylo provedeno po fixaci vzorků 4% formaldehydem v PBS, promytím 0,1% PBS s Chemiblockerem (1:20) (Millipore, USA) a 0,5% Tritonem X-100 (Sigma-Aldrich, UK) v PBS. Buňky byly inkubovány s phalloidinem fluorescenčně značeným Alexa-Fluor 564 (1:300) (Molecular Probes, USA) a s protilátkou proti vinkulinu (1:200) zředěnou v 0,1% PBS obsahující 1% sérový albumin a Triton X-100 (0,5%) a sekundární kozí protilátkou proti myšímu IgG konjugovanou s Alexa-Fluor 488 jako fluoroforem (1:200) (Molecular Probes, USA).

Neurální prekurzory SPC-01-GFP-3 byly značeny protilátkami proti β-III tubulinu (1:200) (Sigma-Aldrich, UK), nestinu (1:2000) (Chemicon, USA), neurofilamentům (NF 70) (1:200) (Sigma-Aldrich, UK) a synaptofyzinu (1:1000), které byly zředěny v PBS (0,1%) obsahující 1% BSA a Triton X-100 (0,5%). Vizualizace byla provedena sekundární kozí protilátkou proti myšímu IgG konjugovanou s Alexa Fluor 594 (1:200) (Molecular Probes, USA). Jádra byla obarvena DAPI (1:200). Snímky preparátů byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu LSM 510 DUO (Carl Zeiss, Rochester, NY).

### **3.2.4 Kvantitativní analýza růstu buněk na hydrogelech**

Počet MSC adherovaných na gelu byl kvantifikován ze tří náhodných nepřekrývajících se oblastí gelu nasnímaných pomocí fluorescenčního mikroskopu Axioskop 2 Plus (zvětšení 100, čočka 10/0,75) a softwaru Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Hustota buněk zachycených na gelu byla vyjádřena jako průměrný počet buněk na mm<sup>2</sup>.

Pro kvantitativní zhodnocení adheze buněk na povrchu hydrogelů byla pro každý hydrogel změřena průměrná plocha adherované buňky. Nejméně 30 buněk na každém typu hydrogelu bylo náhodně skenováno laserovým konfokálním mikroskopem (excitační vlnová délka 488 nm) a buněčná plocha byla hodnocena pomocí softwaru Image J. Každý typ hydrogelu byl hodnocen v triplikátech.

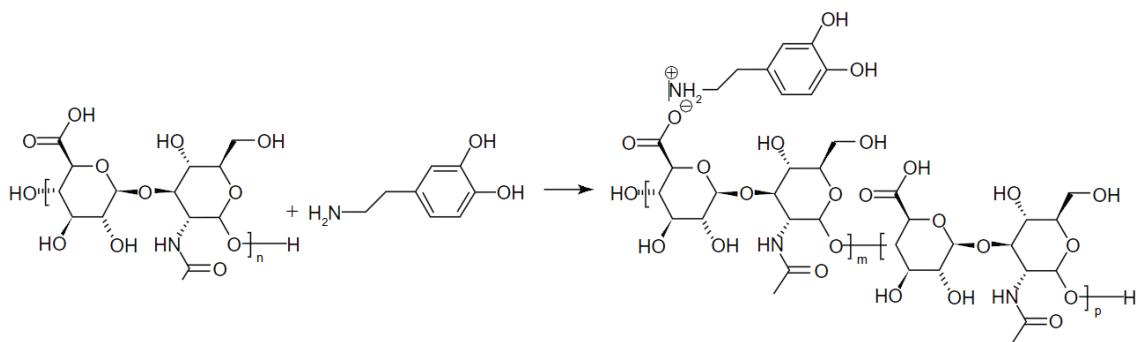
Růst a diferenciace neurálních prekurzorů byly analyzovány imunohistologicky po 1,7,14 a 28 dnech kultivace barvením specifických markerů (β-III tubulin, nestin,

neurofilamenta NF-70 a synaptofyzin). Kvantitativní analýza růstu neurálních prekursorů byla provedena porovnáním počtu immunoreaktivních buněk s celkovým počtem viabilních DAPI pozitivních buněk. Pro každý neurální marker bylo pomocí konfokálního mikroskopu analyzováno nejméně 20 náhodných snímků oblastí hydrogelu.

### 3.3 Superparamagnetické nanočástice oxidu železa (SPION)

#### 3.3.1 Příprava a charakterizace SPION obalených dopamin-hyaluronátovým asociátem

Nanočástice studované v této práci byly vyvinuty v Ústavu makromolekulární chemie AVČR. Jejich příprava, složení, podrobná charakteristika a fyzikálně-chemické metody analýzy jsou popsány v přiložené publikaci (Babič et al., 2012). Výchozí nanočástice maghemitu ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) byly připraveny řízenou oxidací (pomocí NaClO) magnetitu ( $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) připraveného koprecipitací chloridů železitého a železnatého slabou bází ( $\text{NH}_3$ ) ve vodném prostředí. Dále byly tyto částice pokryty obalem různého složení. Povrch  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  byl pokryt dopamin-hyaluronátovým asociátem (DPA-HA) (obr. 10) tak, že roztoky DPA-HA asociátu připravené v různém hmotnostním poměru DPA/HA byly smíseny za intenzivní sonikace ultrazvukovým hrotom opět v různém poměru s koloidním roztokem  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanočastic. Kontrolní částice byly pokryty pouze dopaminem (DPA) nebo hyaluronanem (HA) v různém poměru ke  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Výsledné koloidní roztoky nanočastic obsahovaly vždy stejně množství železa (4,4 mg/Fe ml). Tabulka 2 (str. 48) shrnuje připravené nanočástice a jejich složení.



Obrázek 10. Vznik a struktura DPA-HA asociátu z HA a DPA. Podle (Babič et al., 2012).

### **3.3.2 Hodnocení růstu a viability buněk značených SPION**

MSC izolované z kostní dřeně potkana a lidské chondrocyty byly vysazeny v koncentraci 100000 buněk/ml média a kultivovány v příslušném mediu (viz výše) v kultivační destičce. Buňky byly označeny SPION, tj. ke kultuře buněk byl přidán koloidní roztok připravených nanočástic (DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ve výsledné koncentraci 50  $\mu$ l na 10 ml kultivačního media (tj. 15,4  $\mu$ g Fe/ml) nebo komerční částice Endorem®. Buňky byly následně kultivovány 48 hodin. Poté byly částice vymyty z kultivační jamky s použitím PBS a značené buňky byly sklizeny pomocí roztoku trypsinu/EDTA a spočítány.

Vliv SPION na proliferaci buněk byl zjištěn porovnáním počtu značených a neznačených buněk po 48 hodinách kultivace. Průměrný počet neznačených buněk v jamce po 48 hodinách (kontrola) byl považován za 100% a průměrný počet značených buněk byl vyjádřen jako procento relativní ke 100 % kontroly. Experimenty byly prováděny v triplikátech na buňkách ze tří různých izolací.

Viabilita značených MSC a chondrocytů byla stanovena pomocí 0,1% trypanové modři. Počet živých (neobarvených) buněk a celkový počet buněk v suspenzi byl zjištěn spočítáním buněk pomocí Bürkerovy komůrky a viabilita byla vyjádřena v procentech.

### **3.3.3 Efektivita značení buněk SPION**

Buňky označené SPION byly v kultivačních destičkách fixovány roztokem 4% formaldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4) po dobu 30 minut a následně barveny hexakyanoželeznatanem draselným (Lachema, ČR) reagujícím specificky se železitými ionty za vzniku hexakyanoželeznatanu železitého (berlínská modř). Jádra byla barvena jádrovou červení (Sigma-Aldrich, UK). Efektivita značení byla zjištěna spočítáním buněk obarvených berlínskou modří a neobarvených buněk v pěti optických polích nasnímaných mikroskopem (Axioplan Imaging II, zvětšení 100, čočka 10/0,75) v každé jamce a vyjádřena v procentech. Intenzita modrého zbarvení buněk byla měřena kolorimetricky. S využitím programu Matlab (6.0 Image Processing Toolbox™ MathWorks, Natick, USA) byla v barevném prostoru CIE L\*a\*b předem spočítána stupnice barvení berlínskou modří (kolorimetrická škála) v rozsahu od neznačených buněk do maximálně značených částic (bez buněk). Kolorimetrická škála odpovídající vzestupné intenzitě barvení berlínskou modří byla validována před začátkem měření. Pro každou buňku na obrázku byla intenzita barvení vyjádřena jako index na barevné škále. Ze získaných dat byl sestrojen graf distribuce intenzity barvení buněk, kde množství železitého komplexu uvnitř buněk odpovídá intenzitě značení.

### **3.3.4 Značení buněk SPION pokrytými poly-L-lysinem pro magnetické cílení**

Pro experimenty s magnetickým cílením buněk jsme využili dříve charakterizované SPION pokryté poly-L-lysinem, připravené podle zavedého protokolu (Babič et al., 2008). Kultura MSC byla inkubována s částicemi v koncentraci 15,4 µg Fe/1ml media po dobu 72 hodin. Po 72 hodinách byly nanočástice vymyty z kultury pomocí PBS a značené buňky použity v experimentech.

Pro ověření funkčnosti magnetického systému *in vitro* byly značené buňky nasazeny na Petriho misku (100000 buněk/miska) s permanentním magnetem nebo nemagnetickou kontrolou fixovanou na spodu misky. Po 48 hodinách byl magnet odejmut a buňky byly fixovány formaldehydem. Distribuce buněk na misce byla pozorována fluorescenčním mikroskopem.

### **3.3.5 Relaxometrie SPION**

Relaxometrie SPION byla provedena s využitím relaxometru Minispec® 0,5 T (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany). Koloidní roztoky nanočastic byly naředěny na koncentraci 0,022 mg železa/ml a dispergovány ultrazvukem po dobu 10 minut. Měření  $T_2$  relaxačních časů bylo provedeno pomocí Carr-Purcell-Meiboom-Gillovy (CPMG) multispinové sekvence se vzdáleností ech 2 ms a repetičním časem 5 sekund. Změřené relaxační časy byly konvertovány na relaxivitu (převrácená hodnota relaxačního času  $T_2$  vztažená na koncentraci, tj. relaxivita = $1/T_2/\text{konzentrace}$ ).

Vzorky obsahující suspenzi fixovaných značených buněk, tzv. fantomy, byly připraveny disperzí suspenze buněk v 4% želatině a měřeny při 0,5 T a při 4,7 T. Relaxační  $T_2$  časy při 0,5 T byly měřeny pomocí výše zmíněné sekvence. Při 4,7 T byla využita CPMG multispinová-echo sekvence s echo časem 8,63 ms a repetičním časem 5 sekund. Výsledkem měření byl sled  $T_2$  vážených obrazů (se vzrůstajícím  $T_2$  vážením), ze kterých byly spočítány  $T_2$  relaxační časy. Relaxační poměry byly spočítány jako převrácené hodnoty relaxačních časů vztažené na 1 milion buněk /1ml (Babič et al., 2012).

### **3.3.6 Balónková kompresní léze**

V experimentech bylo použito celkem 32 dospělých samců potkanů kmene Wistar. Abychom minimalizovali rozdíly mezi jednotlivými zvířaty, použili jsme potkany pouze o velikosti 250-300g. Zvířata byla umístěna ve zvěřinci Ústavu experimentální medicíny AVČR

se standardním hodinovým cyklem den/noc, teplotou 23 °C a krmena standardní dietou *ad libitum*.

Akutní míšní poranění jsme u pokusných zvířat provedli podle zavedeného protokolu pro modelovou balónkovou kompresní míšní lézi (Vanický et al., 2001; Urdzíková et al., 2011). Pokusným zvířatům byla v inhalační anestezii (3% isofluran) odstraněna srst v okolí C7-Th12 a kůže byla dezinfikována. V oblasti Th7-Th10 byl proveden lineární kožní řez. Zádové svalstvo bylo skalpelem odloučeno na obou stranách od obratlového sloupce a odsunuto laterálně. V rozsahu Th10-Th11 byly odstraněny processi spinosi a byla provedena částečná laminektomie v oblasti Th10. Tím byl získán přístup do epidurálního prostoru. Fogarthyho katetr naplněný destilovanou vodou a připojený k Hamiltonově stříkačce s mikromanipulátorem byl zaveden do epidurálního prostoru a zasunut 1 cm kranialně tak, že balónek byl umístěn v úrovni Th8-Th9. Poté byl balonek rychle vyplněn 15 µl vody a ponechán 5 minut uvnitř epidurálního prostoru. Následně byl balónek vypuštěn a odstraněn z epidurálního prostoru. Během procedury byla kontrolována teplota zvířete *per rectum* a udržována na teplotě 37°C.

### 3.3.7 Aplikace magnetického implantátu

Po indukci léze byl implantován malý magnetický implantát (13x7x2 mm, neodymový magnet, povrchová magnetická indukce  $B_s=0.35\text{T}$ , remnantní magnetické pole  $B_r=1,2\text{T}$ ; ABC magnet s.r.o. Česká republika) pokrytý silikonovým potahem nebo nemagnetický plastový implantát (kontrola). Implantát byl umístěn nad obratlovým sloupcem v oblasti Th8-Th9 (nad oblastí léze, processi spinosi Th8-Th9 byly odstraněny) a fixován v paravertebrálních svalech. Povrch magnetu nebo kontrolního implantátu byl přibližně 4,5 mm nad oblastí léze (uvážíme-li tloušťku obratlové laminy, měkkou tkáň pod magnetem a silikonový potah magnetu). Po implantaci byly měkké tkáně a kůže zašity v anatomických vrstvách. Magnet byl odstraněn vždy na konci experimentu po perfuzi zvířete.

### 3.3.8 Postoperační péče

Operovaná zvířata byla umístěna do sterilních klecí s kontrolovanou cirkulací vzduchu po dvou pro minimalizaci sociálního stresu z izolace. Infekci a komplikacím z poruchy vyprazdňování močového měchýře po míšním poranění bylo předcházeno pravidelným manuálním vyprazdňováním močového měchýře a preventivně byl podáván gentamicin (0.05 mL, i.m., Gentamicine Lek®; Lek Pharmaceuticals, Ljublanja, Slovenia).

### **3.3.9 Transplantace buněk**

GFP<sup>+</sup> MSC značené SPION byly transplantovány intratekálně lumbální punkcí 7 dní po indukci míšního poranění. Průběh magnetického vychytávání buněk jsme sledovali ve čtyřech časových intervalech (12, 24, 72 a 168 hodin) po transplantaci buněk. Pro každý časový interval byla skupině potkanů s implantovaným magnetickým implantátem (n=4) a kontrolní skupině (n=4) aplikována intratekálně suspenze značených buněk ( $0,5 \times 10^6$  v 50 µl PBS pomocí sterilní 25G jehly. Transplantovaným zvířatům byla denně podávána imunosuprese cyklosporinem (10 mg/kg, ip, Sandimmun®; Novartis, Basel, Switzerland).

### **3.3.10 Transkardiální perfuze**

Zvířata byla usmrcona v časových intervalech 12, 24, 72 a 168 hodin po transplantaci. V hluboké anestezii po předávkování pentobarbitalem (i.p., 150 mg/kg) bylo provedeno otevření hrudníku a zpřístupnění srdce. Po odstranění pravého ouška byla zavedena kanya přes hrot srdeční do levé srdeční komory. Kanyou byl aplikován pomocí peristaltické pumpy nejprve fyziologický roztok po dobu 2 minut, čímž byla krev vypláchnuta z cévního systému. Následně byl použit po dobu 5 minut roztok 4% formaldehydu ve fosfátovém pufru k fixaci tkáně. Poté byla extrahována páteř a uložena do roztoku paraformaldehydu po dobu 24 hodin. Následně byla vyjmuta mícha k dalšímu histologickému zpracování.

### **3.3.11 Histologické zpracování a analýza**

Míchy byly vyjmuty z páteřního kanálu, umístěny přes noc do 4% roztoku formaldehydu a poté přeneseny do 10% a 20% sacharózy. Po zmražení byly vzorky nařezány na kryotomu na podélné řezy (14 µm tloušťka) a barveny DAPI. Aby bylo možné pozorovat kolokalizaci signálu GFP<sup>+</sup> buněk s přítomností SPION, bylo železo v některých histologických řezech barveno hexakyanoželeznatanem draselným za vzniku berlínské modři. Infiltrace makrofágů do léze byla detekována barvením na CD68 (ED-1, Serotec, UK) s následným kontrastním barvením jádrovou červenou. Komplexy antigen-protilátky byly zobrazeny s pomocí biotin-streptavidinového detekčního systému (LSAB2 System, HRP; DakoCytomation, CA) s 3,3'-diaminobenzidinem (DAB) jako chromogenenem (Vector Laboratories, CA).

Počet GFP<sup>+</sup> buněk byl stanoven podle dříve popsané metody (Mothe et al., 2008). GFP<sup>+</sup> buňky obsahující DAPI pozitivní jádro byly spočteny na každém šestém řezu v 18 mm (9x2 mm) úseku míchy se středem léze v centru měřeného úseku. Celkový počet

transplantovaných buněk přítomných v míše byl získán vynásobením počtu buněk ve spočtených řezech šesti. Histologická a obrazová analýza byla provedena pomocí mikroskopu a obrazového softwaru Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Rochester, NY).

### **3.4 Statistická analýza**

Signifikance rozdílu počtu buněk mezi skupinou s implantovaným magnetem a kontrolní skupinou v jednotlivých časových intervalech byla zjišťována pomocí Studentova t-Testu na hladině významnosti  $p<0,05$ .

Rozdíly v průměrné ploše růstu buněk a počtu buněk na jednotlivých testovaných hydrogelech byly analyzovány jednocestným ANOVA testem. Rozdíl byl považován za signifikantní pokud  $p<0,05$ . Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel.

## 4 Výsledky

### 4.1 Biokompatibilita SPION a značení buněk

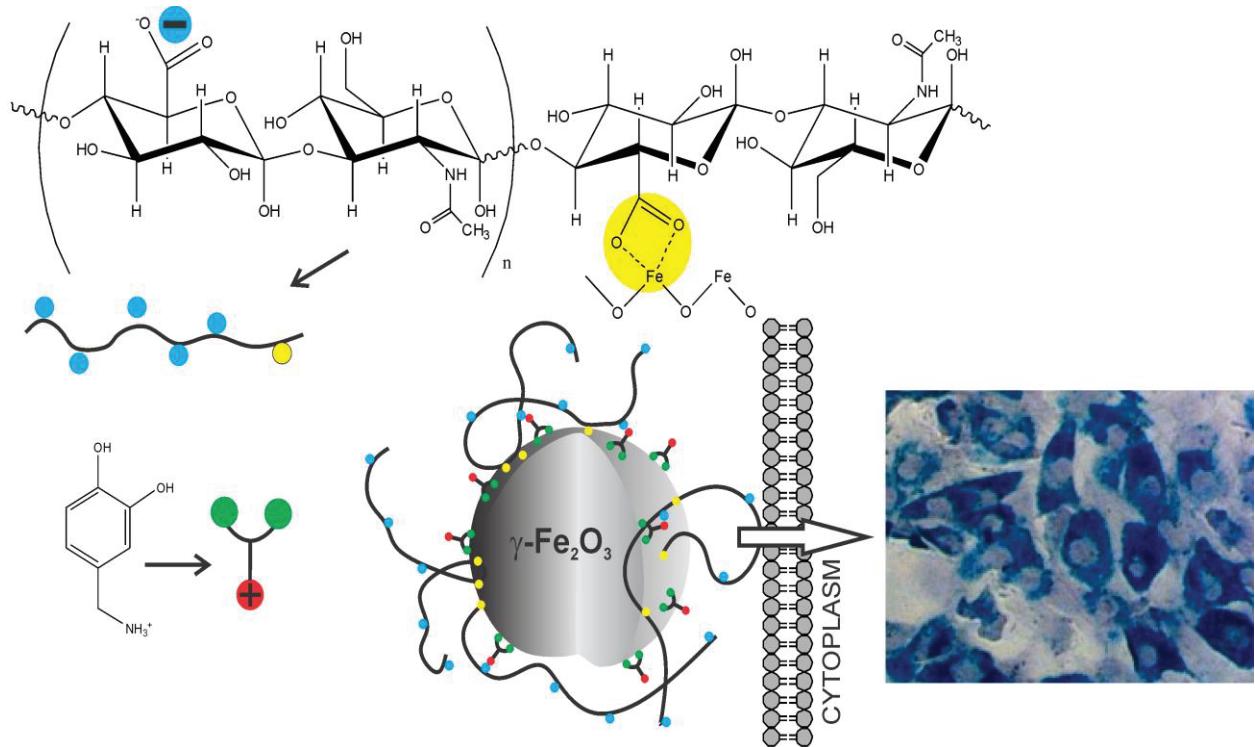
Povrchová modifikace je jednou z možností, kterou je možné zvýšit vychytávání SPION buňkami. V našich experimentech jsme jako látku vytvářející funkční obal SPION použili kyselinu hyaluronovou (HA). Dopamin (DPA) jsme využili jako vazebnou molekulu obalu k povrchu nanočástice (obr. 11).

Abychom mohli posoudit dílčí vliv obou složek tvořících strukturu obalu častic, tedy DPA a HA, na výsledné chování nanočastic, bylo připraveno několik skupin SPION lišících se složením obalu - DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (přehledně v tabulce 2). Obalení častic samotným DPA (skupina I) nebo HA (skupina II) bylo použito jako kontrola a porovnáno s česticemi obalenými asociátem těchto dvou molekul (DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (skupina III), připravovaným ve třech různých hmotnostních poměrech DPA/HA (označeno jako IIIA-C). V každé skupině byly připraveny tři vzorky s konstantní koncentrací  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a stoupající koncentrací příslušného obalu.

Biologické vlastnosti a stabilita připravených nanočastic jsou významně předurčeny fyzikálně-chemickými vlastnostmi jejich koloidního roztoku a podstatně ovlivňují použitelnost nanočastic pro značení buněk. Zjišťovány byly čtyři parametry (hydrodynamický poloměr, polydisperzita, zeta-potenciál a pH roztoku) závisející zejména na složení nanočastic, tj. hmotnostním poměru obal/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (tabulka 2). Fyzikálně-chemické vlastnosti připravených nanočastic jsou detailně popsány v přiložené publikaci (Babič et al., 2012).

#### 4.1.1 Růst a viabilita značených buněk

Abychom zhodnotili akutní toxicitu nových SPION, sledovali jsme růst a viabilitu značených MSC (tabulka 2). Neznačené buňky zdvojnásobily *in vitro* svůj počet v průběhu 48 hodin. Růst značených buněk byl mírně zpomalen (70-100% kontroly). Nejpomalejší růst ( $54\% \pm 4\%$ ) byl pozorován u buněk značených česticemi  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bez polymerního obalu. Viabilitu značených buněk jsme testovali pomocí trypanové modři. Změny složení obalu ani zvyšující se koncentrace DPA-HA neovlivnily podstatně buněčnou viabilitu (tabulka 2). Pokles viability byl pozorován pouze u buněk značených česticemi bez obalu ( $83.5\% \pm 0.5\%$ ). Viabilita buněk značených komerčně dostupnými česticemi Endorem® dosáhla 85%. U chondrocytů značených připravenými česticemi jsme nepozorovali rozdíly ve viabilitě a růstu mezi značenými a neznačenými buňkami.



Obrázek 11. Strukturní a schématické znázornění obalených nanočástic. Anorganické jádro nanočástice ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  – šedě) je obaleno dopamin-hyaluronátovým asociátem (aktivní místa znázorněna barevně, tj. zeleně aktivní hydroxy skupiny DPA silně se vážící na povrch částic, červeně amino skupina DPA zodpovědná za asociaci hyaluronanu, žlutě aktivní  $\text{COO}^-$  skupina HA vážící se na povrch částic se slabší afinitou a modře volná  $\text{COO}^-$  skupina). Těmito částicemi je možno efektivně značit buňky v kultuře (barvení buněk berlinskou modří). Podle (Babič et al., 2012)

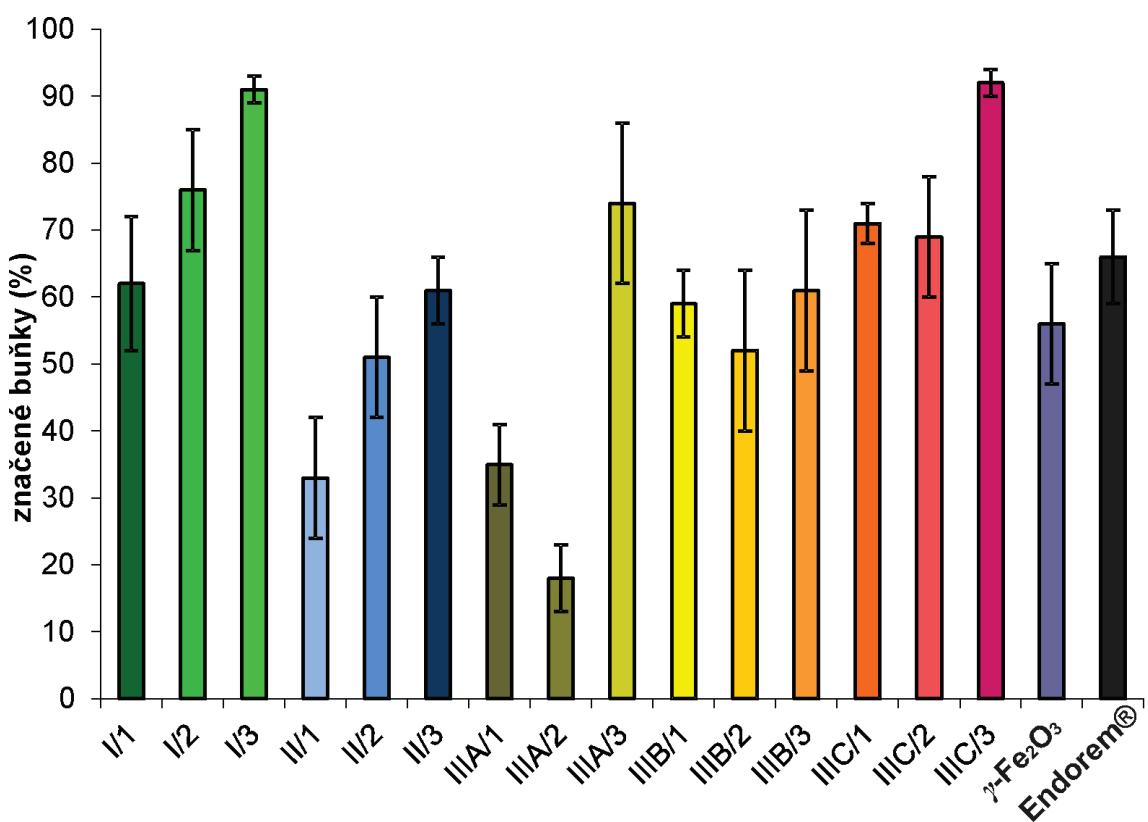
Označení skupiny	Typ částice	Typ obalu	DPA/HA (m/m)	obal/Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (m/m)	hydrodynamický průměr D <sub>h</sub> (nm)	polydispersita	zeta potenciál (mV)	růst buněk (%)	viabilita buněk (%)	relaxivita r <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> /mmol Fe)
<b>I</b>	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	-	-	0	83.7 ± 0.6	0.129 ± 0.006	-53.4 ± 0.8	54 ± 4	83.5 ± 0.5	123 ± 0.3
<b>I/1</b>	DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA	-	0.011	87 ± 0.2	0.147 ± 0.004	-53 ± 2	86 ± 8	89 ± 1.0	167 ± 0.3
<b>I/2</b>	DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA	-	0.022	97 ± 5	0.158 ± 0.003	-48.2 ± 0.06	76 ± 8	86.7 ± 0.9	91.8 ± 0.3
<b>I/3</b>	DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA	-	0.045	5587 ± 796 s	0.244 ± 0.157 s	-7.31 ± 0.04 a	78 ± 6	90.5 ± 0.5	98.9 ± 0.2
<b>II/1</b>	HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	HA	-	0.11	107 ± 1	0.283 ± 0.006	-67 ± 1	89 ± 6	95.5 ± 0.5	267.2 ± 0.6
<b>II/2</b>	HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	HA	-	0.22	125 ± 7	0.291 ± 0.004	-79.3 ± 0.8	81 ± 3	97 ± 0.2	256.7 ± 0.5
<b>II/3</b>	HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	HA	-	0.45	151 ± 3	0.312 ± 0.003	-77.4 ± 0.7	100 ± 9	96 ± 0.7	305.4 ± 0.7
<b>III/A/1</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/I	0.0075	0.11	118 ± 0.4	0.298 ± 0.003	-60 ± 1	71 ± 8	96 ± 1.2	-
<b>III/A/2</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/I	0.0075	0.22	836 ± 12	0.485 ± 0.008	-56 ± 0.4	93 ± 3	95.5 ± 1.5	-
<b>III/A/3</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/I	0.0075	0.45	656 ± 18	0.369 ± 0.009	-76 ± 1.1	69 ± 10	95.5 ± 1.2	-
<b>III/B/1</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/2	0.01936	0.11	108 ± 0.4	0.275 ± 0.005	-65.9 ± 1	100 ± 11	95 ± 1.0	-
<b>III/B/2</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/2	0.01936	0.22	130 ± 5	0.293 ± 0.001	-68 ± 3	78 ± 6	93 ± 1.0	-
<b>III/B/3</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/2	0.01936	0.45	153 ± 0.6	0.314 ± 0.003	-70 ± 1	99 ± 13	94.5 ± 1.7	-
<b>III/C/1</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/3	0.03842	0.11	98 ± 0.3	0.267 ± 0.001	-66.4 ± 4	103 ± 3	94 ± 1.0	260.6 ± 0.3
<b>III/C/2</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/3	0.03842	0.22	120 ± 0.1	0.283 ± 0.003	-70 ± 1	68 ± 1	94.5 ± 0.5	263.3 ± 0.3
<b>III/C/3</b>	DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	DPA-HA/3	0.03842	0.45	1181 ± 41 s	0.543 ± 0.003 s	-77.8 ± 0.4 a	94 ± 9	95 ± 1.4	282.7 ± 0.3
<i>Endorem®</i>	-	-	-	-	-	-	-	79 ± 5	85 ± 1.0	127.0 ± 0.9
<i>Nezařazené buňky (kontrola)</i>	-	-	-	-	-	-	-	100 ± 0	97.6 ± 1.0	-

Tabulka 2. Charakteristika a složení testovaných dopamin-maghemitových (DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , skupina I), hyaluronan-maghemitových (HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , skupina II) a dopamin-hyaluronan-maghemitových nanočastic (DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , skupina III). V každé skupině byly připraveny tři vzorky s různým hmotnostním poměrem obal/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , tj. s konstantní koncentrací  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a stoupající koncentrací obalu. Ve skupině III byl obal čistic připravován navíc ve třech různých poměrech DPA/HA (III A-C). s = sediment. m/m = hmotnostní poměr.

#### 4.1.2 Efektivita značení buněk

Efektivitu značení potkaních MSC nanočásticemi jsme hodnotili po obarvení značených buněk berlínskou modří. Ve všech testovaných skupinách (I, II, III) bylo největší procento označených buněk pozorovatelné po značení nanočásticemi s nejvyšším koncentrací DPA (obr. 12). Více než 90% buněk bylo označeno s DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočásticemi skupiny IIIC/3 a DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupiny I/3. Poslední zmíněné částice však již tvořily shluky a také adherovaly na povrch buněk a kultivační misky.

Výrazně lepší efektivita značení v porovnání s komerčními částicemi Endorem® (66%) byla dosažena s použitím částic skupiny IIIA/3 (74%) a I/2 (76%).

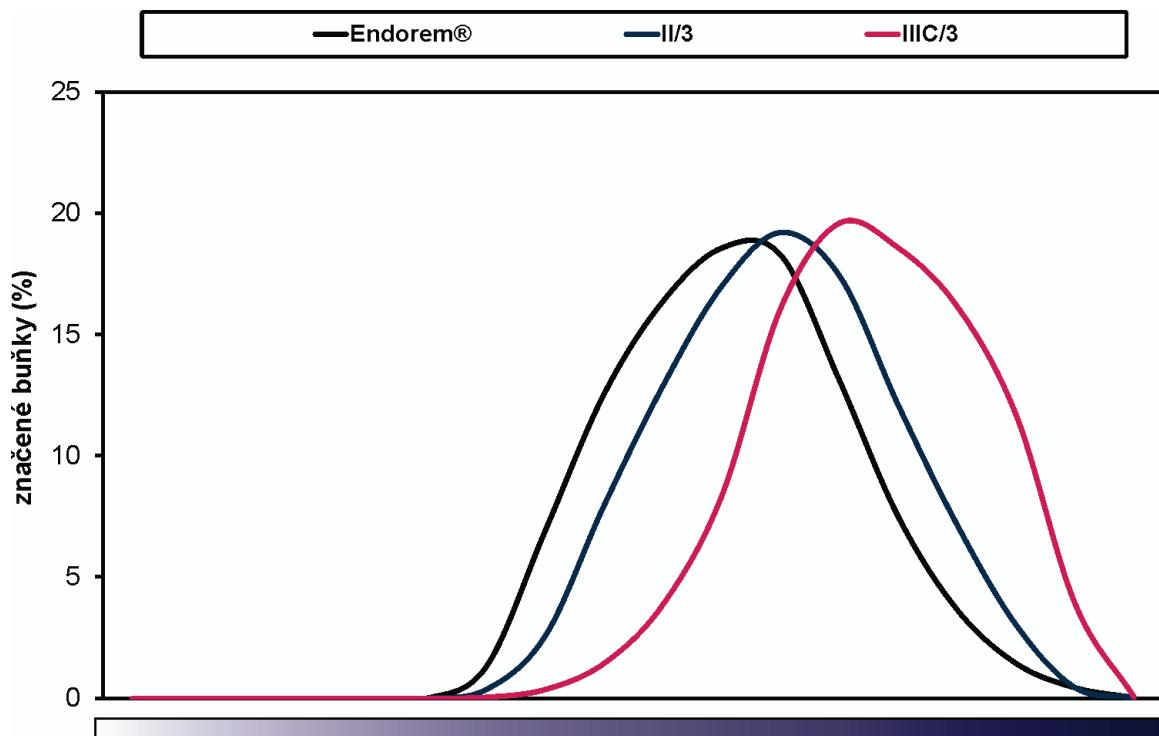


Obrázek 12. Efektivita značení MSC HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočásticemi skupiny II/I-3, DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočásticemi skupiny I/I-3, DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočásticemi IIIA/I-3, IIIB/I-3 a IIIC/I-3, samotného  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a Endorem® vyjádřená v procentech značených buněk.

Koloidní roztok nanočástic obsahující 15,4 µg Fe/ml byl přidán ke kultuře a buňky byly kultivované 72 hodin. Experimenty byly prováděny v triplikátech spočítáním pěti optických polí z každé jamky ( $n=15$ ).

Efektivita značení menší než s Endoremem® byla pozorována u nepokrytých  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (56%) a nanočastic skupiny IIIA/I (35%), IIIA/2 (18%) a IIIB/2 (52%). Značení ostatními částicemi bylo s Endoremem® srovnatelné (61%-71%).

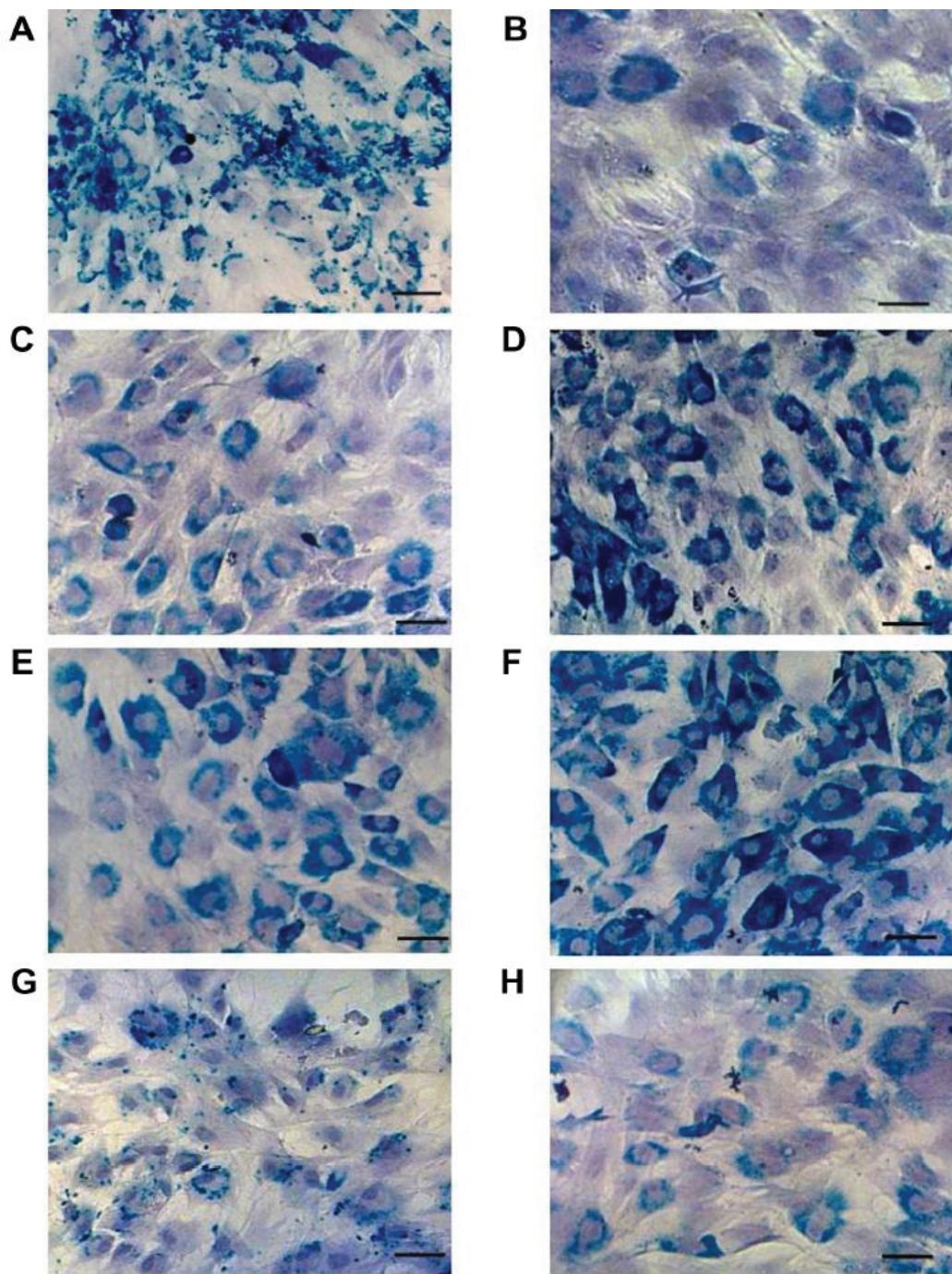
Abychom mohli porovnat množství kontrastní látky internalizované do buněk, změřili jsme distribuci intenzity barvení berlinskou modří u značených buněk (obr. 13). Největší intenzita barvení byla nalezena u buněk značených DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočasticemi III/C/3. Obdobný výsledek byl získán u DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupiny I/3, avšak tyto částice adherovaly na povrchu buněk a nejsou proto zahrnuty v obrázku 13. Mezi ostatními částicemi, které reprezentuje křivka skupiny II/3 nebyl patrný rozdíl. Nejnižší intenzita značení berlinskou modří byla pozorována u častic značených Endoremem® a neobaleným  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



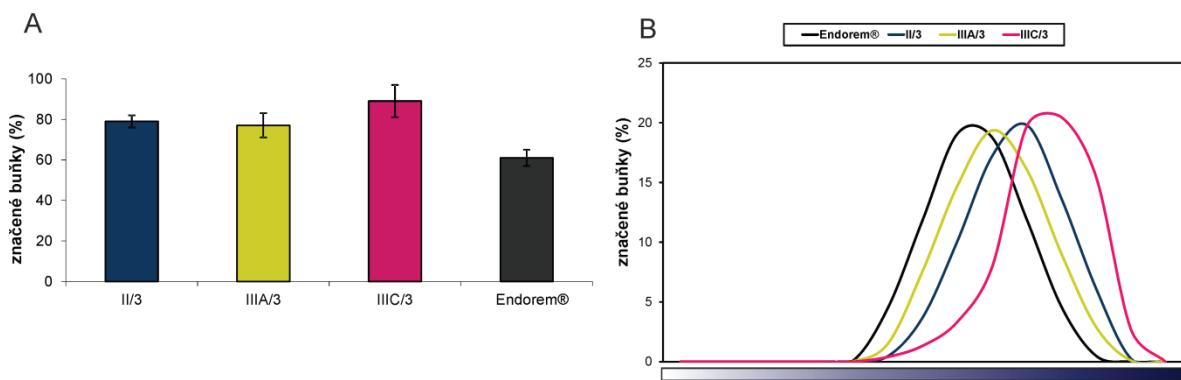
Obrázek 13. Stupnice intenzity barvení berlinskou modří na základě změření neznačených buněk a maximálně značených nanočastic (bez buněk). Reprezentativní křivky distribuce intenzity barvení buněk (osa X) značených částicemi DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupiny III/C/3, HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupiny II/3 a Endoremem®. Osa Y ukazuje procentuální zastoupení buněk pro jednotlivé intenzity barvení.

Mikroskopické obrázky značených buněk (obr. 14) dobře doplňují výše popsané výsledky. Je patrné, že částice HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> byly méně vychytávány buňkami, pravděpodobně kvůli desorci HA z povrchu částic (obr. 14B). Částice HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupiny II/3 (obr. 14C) obsahující největší koncentraci HA značily buňky srovnatelně s Endoremem® (obr. 14G) nebo samotným  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (obr. 14H). Z mikroskopických snímků buněk značených DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> je zřejmé, že DPA hraje významnou roli při internalizaci částic do buněk (obr. 14A). DPA uděluje maghemitovým částicím kladný náboj, a zároveň výrazně nepřispívá k nárůstu průměru částice. Čím více DPA je navázáno na nanočástici, tím více se projeví interakce s negativně nabitém buněčnou membránou a je také pravděpodobné, že se na částice budou více adsorbovat proteiny z kultivačního media (Babič et al., 2008). Oba efekty vedou k vyšší internalizaci částic do buněk. Při vysokých koncentracích DPA (skupina I/3) již ale částice agregují a „přilepí“ se na povrchu buněčné membrány nebo na dno kultivační misky (obr. 14A). Nejvyšší koncentrace DPA, která může být použita pro značení buněk je tedy u skupiny I/2. Naproti tomu HA působí jako sterická bariéra nežádoucí agregace (protektivní obal), který omezuje adsorci proteinů a vznik kompaktních shluků částic. Nejfektivnější označení buněk je tedy dosažitelné s částicemi obalenými DPA-HA asociátem. Na obrázku 14 D-F je názorně vidět synergický efekt DPA a HA. Ve skupině částic pokryté DPA-HA asociátem (III/C) se efektivita a intenzita značení zvyšovaly se vzrůstající koncentrací DPA.

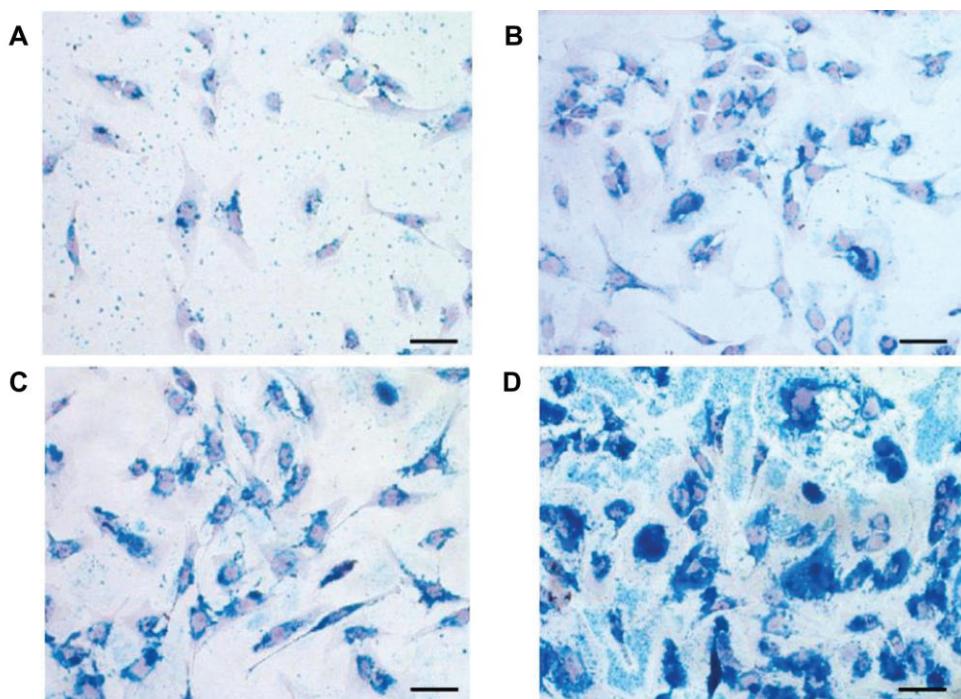
Značení chondrocytů bylo provedeno obdobně jako značení MSC (obr. 15A). Byly testovány pouze částice II/3, IIIA/3 a IIIC/3, protože tyto částice nejfektivněji značily MSC. Všechny testované nanočástice vykazovaly vysokou efektivitu značení. Nejvyšší efektivita značení byla pozorována u DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástic skupiny IIIC/3 a následně HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> II/3 a DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> IIIA/3. Obdobné výsledky byly získány při měření distribuce intenzity barvení (obr. 15B). Na rozdíl od výsledků získaných po označení MSC byla u částic HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> II/3 pozorována zvýšená efektivita značení a také vyšší intenzita barvení než u DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> IIIA/3. Mikroskopické obrázky tyto výsledky potvrzují (obr. 16). Při značení chondrocytů částicemi DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupiny IIIC/3 tyto částice mírně adherovaly na povrch buněk (obr. 16D).



Obrázek 14. Mikrofotografie značených MSC barvených berlinskou modří. (A) zobrazuje DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupinu I/3, (B) HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupinu II/1 a (C) skupinu II/3, (D) skupinu IIIC/1, (E) IIIC/2 a (F) IIIC/3, (G) Endorem® a (H) samotný  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Měřítko = 25  $\mu$ m.



Obrázek 15. (A) Efektivita značení lidských chondrocytů vyjádřená jako počet buněk pozitivních na barvení berlinskou modří. (B) Distribuce intenzity barvení berlinskou modří měřená u lidských chondrocytů.

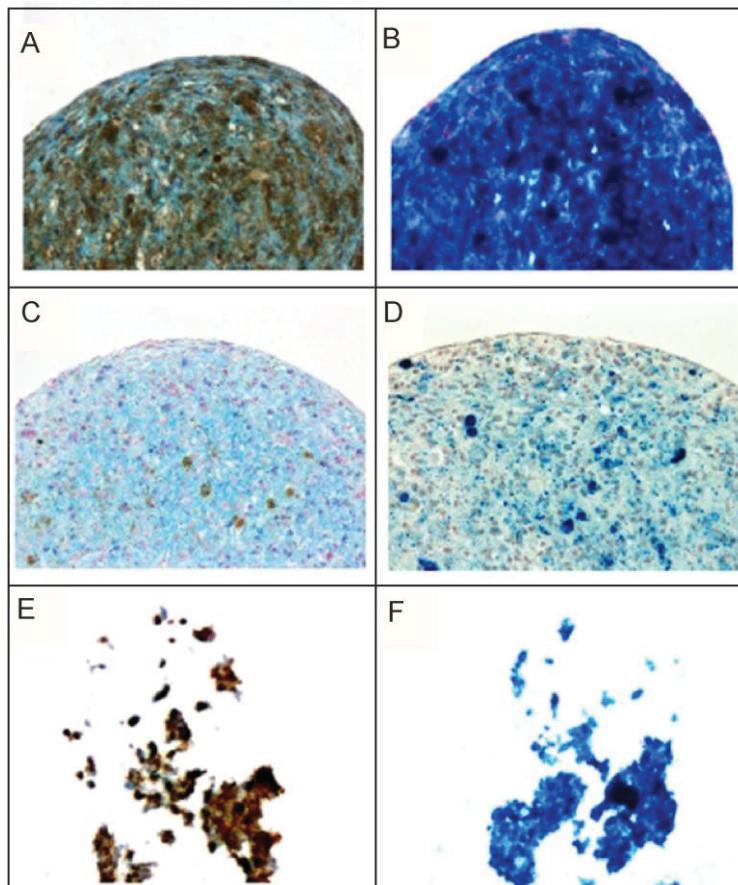


Obrázek 16. Značené lidské chondrocyty v kultuře barvené berlinskou modří. (A) Endorem®, (B) DPA-HA- $\gamma$ - $Fe_2O_3$  (skupina IIIA/3), (C) HA- $\gamma$ - $Fe_2O_3$  (skupina II/3) a (D) DPA-HA- $\gamma$ - $Fe_2O_3$  (skupina IIIC/3). Měřítko = 25  $\mu$ m.

#### 4.1.3 Diferenciace značených MSC do chondrocytů

Z hlediska využití SPION v buněčné terapii je velmi důležitá schopnost zachování diferenciаčního potenciálu kmenových buněk. Ačkoliv jsou SPION nanočástice všeobecně považovány za relativně bezpečné, bylo publikováno několik studií popisujících vliv SPION na chondrogenní diferenciaci MSC (Farrell et al., 2008; Henning et al., 2009). Protože HA je hojně přítomen v tkáni chrupavky, byla testována chondrogenní diferenciace potkaních

MSC značených vybranými částicemi obsahující HA, tedy HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> II/3, DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> III/3 a Endoremem® jako kontrolou. Po 20 denní inkubaci v chondrogenním mediu byly buňky značené DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> IIIC/3 (obr. 17A,B) a Endorem® (obr. 17C,D) schopny formace chondrogenní pelety pozitivní na barvení Alciánovou modří, což je průkazem chondrogenní diferenciace MSC *in vitro* (Bosnakovski et al., 2004). Naproti tomu buňky značené HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> II/3 nebyly schopny vytvořit peletu a diferenciace neproběhla (obr. 17E,F). Barvení berlinskou modří potvrdilo, že značené buňky obsahují železo. Množství železa bylo zřetelně vyšší u pelet značených DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočásticemi (skupina IIIC/3) a HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (skupina II/3) než u Endoremu® značených buněk. To odpovídá vyšším efektivitám značení buněk těmito nanočásticemi v porovnání s Endoremem®. Výsledky tedy ukazují, že chondrogenní diferenciace MSC může být negativně ovlivněna HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočásticemi.



Obrázek 17. Chondrogení diferenciace značených MSC. Obrázek A a B ukazuje buňky značené DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (skupiny IIIC/3), C a D Endorem® a E a F HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> skupiny (II/3). V levém sloupci jsou buňky barveny pomocí Alciánové modři (marker chondrogení diferenciace), v pravém sloupci pomocí berlinské modři (železo). SPION přítomné v buňkách jsou pozorovatelné jako hnědá (A,C,E) nebo modrá depozita (B,D,F).

#### 4.1.4 Relaxometrie SPION

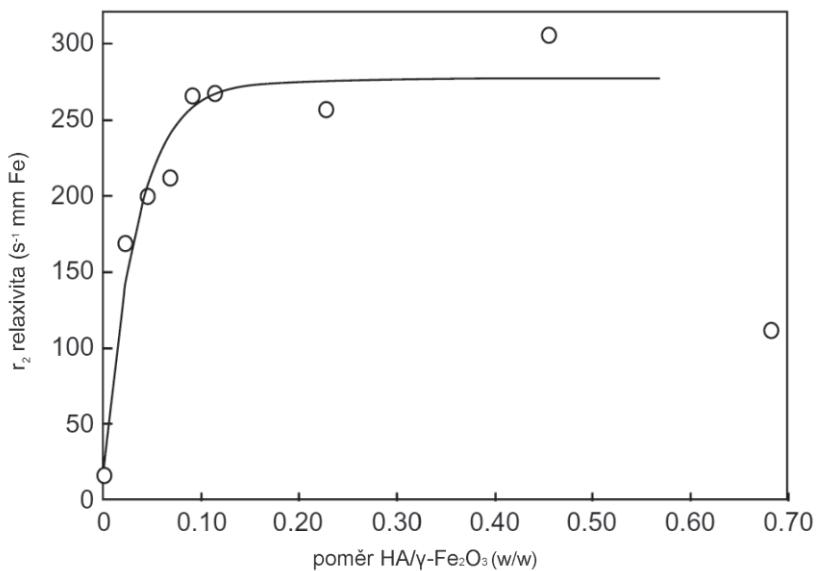
Kontrast viditelný na magnetické rezonanci nezáleží pouze na protonové hustotě měřeného objektu, ale v případě  $T_1$  a  $T_2$  vážených obrazů zejména na relaxačních časech. Relaxometrie umožňuje přímé měření relaxativit (tzn. převrácených hodnot relaxačních časů vztažených na koncentraci), které zohledňují koncentraci paramagnetické nebo superparamagnetické látky a interakce molekul vody, které se liší podle velikosti a rozpustnosti daných magnetických částic.

Tabulka 2 shrnuje relaxativity DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástic. DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástice s nízkým poměrem DPA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (skupina I/I) vykazovaly vyšší relaxativitu než samotné  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Při vyšším poměru DPA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (I/2 a I/3) se relaxativita snížila, pravděpodobně kvůli agregaci nanočástic. Během agregace částic se mohl zmenšit kontakt nanočástic a molekul vody kvůli vyloučení vody z vnitřní oblasti aggregátů částic.

Relaxivita HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástic (skupina II) byla podstatně větší než DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástic a zvyšovala se s rostoucím poměrem HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Závislost byla přibližně logaritmického tvaru (obr. 18). Se zvyšujícím se poměrem HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se pravděpodobně mohlo zvyšovat množství vody obklopující částice díky vysoké hydrofilitě HA a díky tomu se zvyšoval kontrast na MR. Avšak při velmi vysokých HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> poměrech se částice shlukovaly a sedimentovaly a relaxivita se tak snížila (poslední bod na obrázku 18).

DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástice vykazovaly podobné hodnoty relaxativity jako HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, tj. relaxivita byla podstatně větší než u DPA nanočástic. To je potvrzením důležitosti HA pro stabilitu koloidního roztoku částic a pro chemickou výměnu vody, která hraje důležitou roli při vzniku relaxačních časů vodních molekul.

Relaxační poměry suspenzí značených buněk v želatině byly měřeny při 0,5 a 4,7 T (tabulka 3). Hodnoty relaxačních poměrů buněčných suspenzí záleží nejen na relaxativitě nanočástic, ale hlavně na počtu částic internalizovaných buňkami (tj. koncentraci částic v buňkách). Ačkoliv částice HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vykazovaly největší hodnoty relaxativity (díky koloidální stabilitě a výborné výměně vody), největší relaxační poměry byly identifikovány u buněk značených DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> při poměru DPA/HA = 0,01936 (tabulka 3). Při vyšších DPA/HA poměrech (0,03842) se relaxivita snížila, pravděpodobně v důsledku agregace vedoucí k sedimentaci, což snižuje jak relaxativitu nanočástic, tak internalizaci částic buňkami.



Obrázek 18. Závislost relaxivity  $\text{HA-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  částic (skupina II) na hmotnostním poměru  $\text{HA}/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Rovná část konstantních relaxativit vymezuje interval koncentrace HA, kdy dojde k vysycení povrchu maghemitové částice vazbami HA, ale ještě nedochází k agregaci částic (poslední bod).

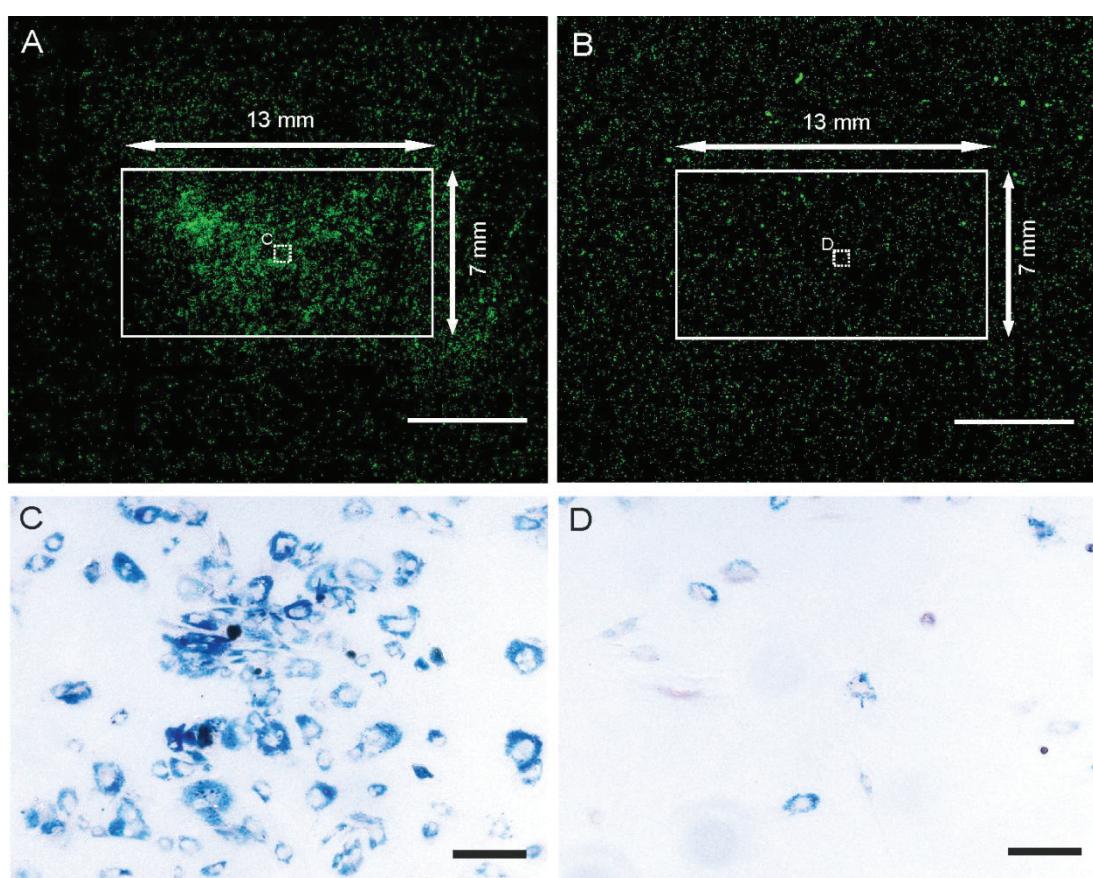
	$R_2 (\text{s}^{-1}/10^6 \text{ rMSCs/mL})$ při <b>0.5 T</b>	$R_2 (\text{s}^{-1}/10^6 \text{ rMSCs/mL})$ při <b>4.7 T</b>
$\text{HA-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ II/3	$3.7 \pm 0.4$	$7.8 \pm 0.3$
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIB/3	$6.7 \pm 0.1$	$11.6 \pm 0.8$
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIC/3	$3.3 \pm 0.3$	$5.8 \pm 1.0$

Tabulka 3. Relaxační poměry suspenzí MSC značených SPION.

## 4.2 Magnetické cílení MSC značených SPION do míšní léze

### 4.2.1 Cílené doručování buněk *in vitro*

Možnost cíleně navádět buňky značené SPION do určitého místa byla nejprve otestována *in vitro*. Experimenty potvrdily, že značené buňky mohou být koncentrovány uprostřed Petriho misky nad místo, pod kterým je fixován permanentní magnet. V kontrolních miskách (bez vlivu magnetického pole) byly buňky distribuovány rovnoměrně v celé misce. Histologické barvení potvrdilo přítomnost SPION v buňkách (obr. 19)

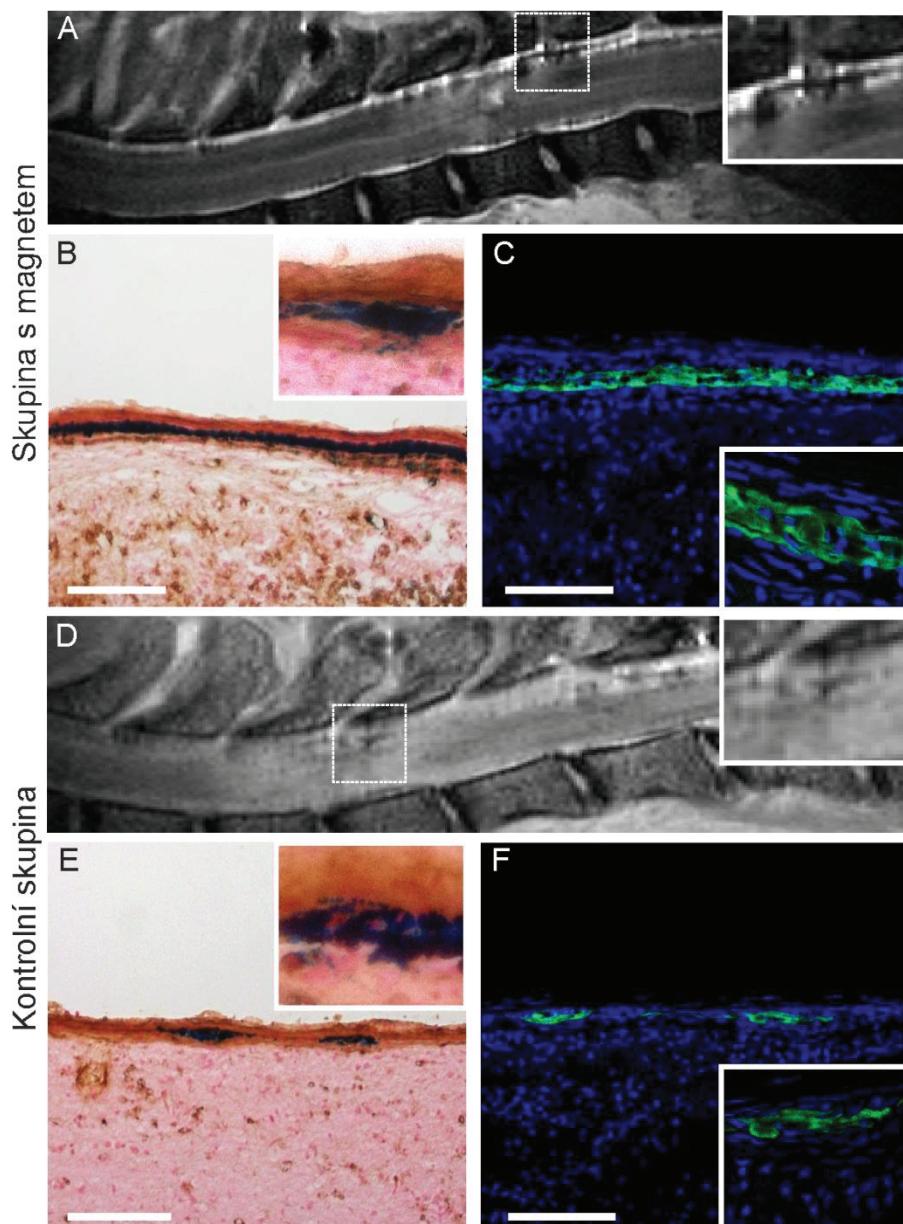


Obrázek 19.  $GFP^+$  MSC značené SPION a nasazené na Petriho misku s permanentním magnetem fixovaným na spodu misky byly přitahovány do oblasti nad magnetem (A). Bílý obdélník představuje okraje magnetu. V kontrolní skupině bez magnetu byly buňky rovnoměrně rozptýleny po kultivační misce. Na výřezu (C a D) je vidět zvětšená oblast uprostřed misky nad magnetem a kontrolní misky. Buňky byly barveny berlínskou modří. Měřítko odpovídá 5000  $\mu\text{m}$  (A,B) a 50  $\mu\text{m}$  (C,D).

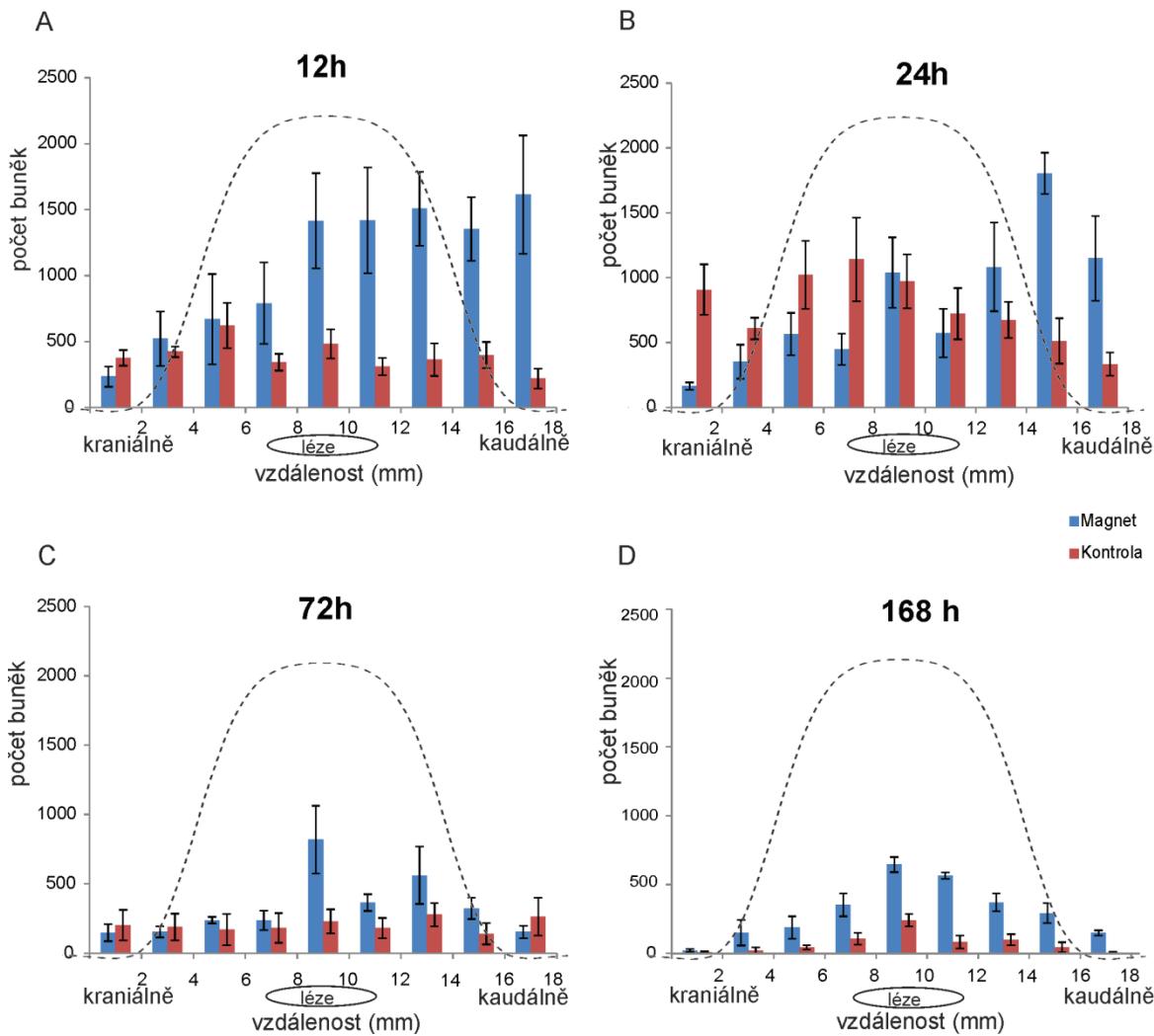
#### **4.2.2 Cílené magnetické doručování buněk do míšní léze**

Cílené doručování značených buněk *in vivo* jsme hodnotili u potkanů s míšní lézí. Histologická analýza řezů míchy prokázala přítomnost SPION značených GFP<sup>+</sup> MSC po intratekální aplikaci jak ve skupinách s magnetickým implantátem, tak v kontrolních skupinách. Obrázek 20 ukazuje charakteristické histologické a MR zobrazení ve skupině s magnetem a v kontrolní skupině 72 hodin po implantaci buněk. Analogické výsledky byly nalezeny u skupin v ostatních testovaných časových intervalech. U skupiny s magnetem je na MR obrazech patrný silný hypointenzivní signál SPION značených částic v oblasti léze (obr. 20A), v porovnání se slabým signálem pozorovaným u kontrolní skupiny (obr. 20D). Ve skupině s magnetem byly buňky lokalizovány v oblasti poškozené míchy v dorsálním intratekálním prostoru ve shluku pod magnetickým implantátem. Na histologických řezech byla pozorovatelná kolokalizace barvení SPION berlínskou modří (obr. 20B) se signálem GFP<sup>+</sup> transplantovaných buněk (obr. 20C). Pozorované buňky byly negativní na ED1-DAB barvení, čímž byla vyloučena možnost, že se jedná o makrofágy (obr. 20B,E). V oblasti léze u kontrolní skupiny bylo identifikováno výrazně méně transplantovaných buněk (obr. 20E,F). Lokalizace transplantovaných buněk v míchách s magnetem dobře korelovala s distribucí magnetického pole a gradientu implantátu nad místem léze, který přitahoval a koncentroval buňky v blízkosti léze a zabraňoval jejich pohybu kraniálním směrem (obr. 21). Naproti tomu v kontrolní míše byly buňky distribuované relativně rovnoměrně podél sledovaného úseku míchy.

Ve skupinách s magnetickým implantátem byl celkový počet buněk v měřeném úseku míchy nejvyšší 12 hodin po implantaci ( $9595 \pm 2231$  buněk) a dále se snižoval po 24 hodinách ( $7181 \pm 939$  buněk), 72 hodinách ( $3002 \pm 581$  buněk) a 168 hodinách ( $2734 \pm 174$  buněk). U kontrol byl celkový počet buněk 12 hodin po implantaci signifikantně nižší v porovnání s magnetickou skupinou ve stejném čase ( $3538 \pm 625$ ) ( $p < 0.05$ ). Nejvyšší počet buněk byl nalezen 24 hodin po implantaci ( $6894 \pm 1520$  buněk) s následným poklesem 72 hodin ( $1837 \pm 600$ ) a 168 hodin ( $720 \pm 137$ ) po implantaci. Počet buněk pozorovaný 168 hodin po implantaci byl signifikantně nižší v porovnání s počtem buněk po stejném časovém období u skupiny s magnetickým implantátem (viz. kapitola 4.2.4).



Obrázek 20. Silný hypointezní MR signál buněk značených SPION byl patrný v oblasti léze ve skupině s magnetickým implantátem (A) v porovnání se slabým signálem v kontrolní skupině (D). Pozitivní barvení berlínskou modří (B) kolokalizovalo na histologických řezech se signálem transplantovaných  $GFP^+$  MSC (C) zachycených v oblasti pod magnetem. Buněčná jádra jsou značena DAPI (modře) (C a F). Buňky obsahující železo byly negativní při barvení charakteristickým pro makrofágy (protilátka proti ED-1) (B a E). Výrazně méně SPION značených buněk bylo nalezeno v oblasti léze v kontrolní skupině bez magnetu (E,F).



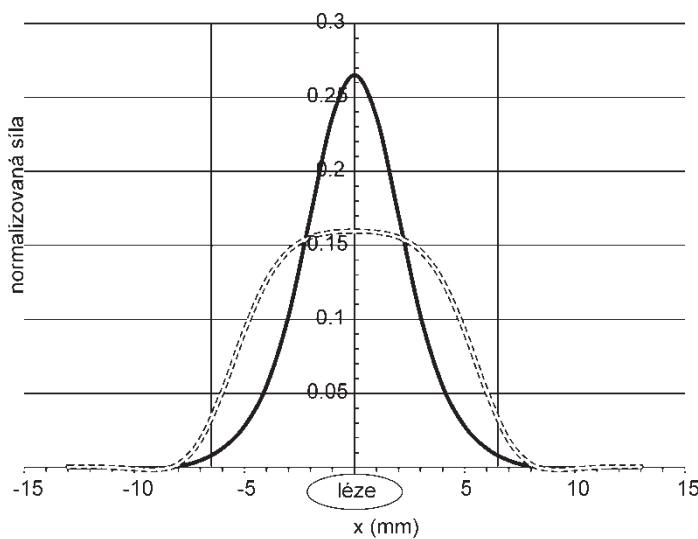
Obrázek 21. Distribuce transplantovaných buněk v 18 mm úseku poraněné míchy 12, 24, 72 a 168 hodin po intratekální aplikaci. Distribuce buněk odpovídá rozložení magnetických sil implantátu nad místem léze, který přitahuje a koncentruje buňky poblíž léze a zabraňuje jejich postupu směrem kraniálně. Čárkované je vyznačena vypočtená distribuce z-komponenty magnetické síly pro magnet tvaru destičky ve vzdálenosti 4,5 mm od povrchu magnetu.

#### 4.2.3 Analýza a návrh optimalizace magnetického systému

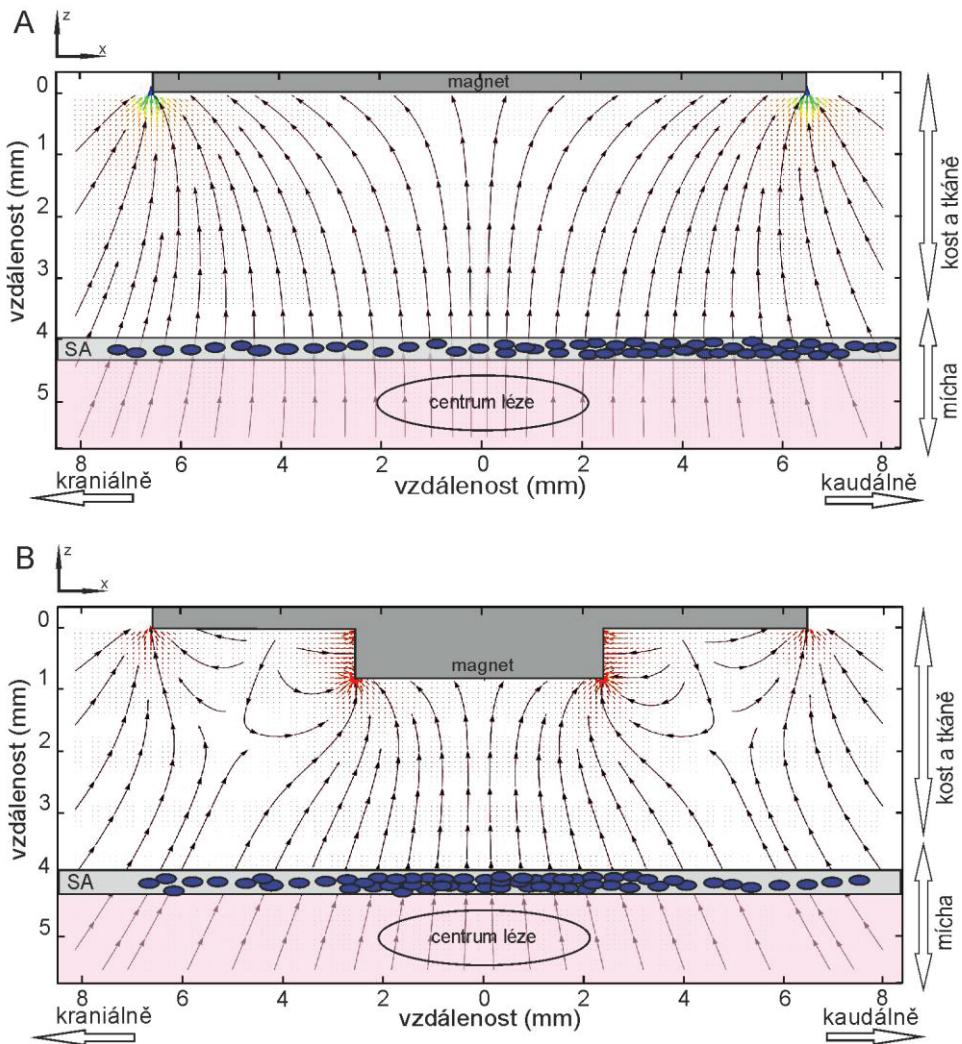
Srovnáme-li experimentálně získanou distribuci transplantovaných buněk v měřeném úseku míchy s distribucí magnetických sil, lze pozorovat jejich korelací. Na obrázku 21 je zobrazena distribuce magnetické síly kolmá na rovinu míchy (x), vypočítaná pro destičkový magnet použitý v našich experimentech (13x7x2 mm), ve vztahu k pozici buněk ve sledovaném úseku míchy. Pozorovatelná nerovnoměrnost v distribuci buněk je zjevně způsobena aplikací buněk intratekálně lumbální punkcí a jejich primárně jednosměrnou

migrací kraniálně směrem k magnetu s uvedenou distribucí sil. Charakter distribuce značených buněk je dán spolupůsobením fyzikální vlivů a jejich biodistribucí. Optimalizací magnetického systému je možno dosáhnout přesnější a efektivnější distribuce buněk v oblasti poranění. Na základě experimentů provedených s jednoduchým magnetem je možno pro cílené doručování buněk navrhnout využití magnetů speciálního tvaru, které v prostoru vytvářejí modulované magnetické pole.

Jak lze odvodit z obrázku č. 22, distribuce magnetické síly vypočtená pro destičkový magnet má spíše plochý tvar a oblast působení síly neodpovídá pozici a rozměru experimentální léze (3-4 mm). Pro lokální cílení buněk do místa léze je nutné magnetické síly zúžit a zaměřit. Toho může být dosaženo například využitím magnetu s jedním středovým výstupkem. Tímto způsobem je možno teoreticky dosáhnout značného zvýšení magnetické síly, a tím i lepšího soustředění síly a tedy značených buněk do místa léze. Další výhodou takového magnetu je dostatečně silná z-komponenta magnetické síly, díky které magnet přitahuje značené buňky. Obrázek 23A a B ukazuje vypočtenou distribuci magnetické síly na (z,x)-plošném grafu pro destičkový magnet a magnet s výstupkem a schematickou distribuci transplantovaných buněk v subarachnoideálním prostoru pod vlivem magnetické síly. Magnet s výstupkem poskytuje dostatečně silnou z-komponentu magnetického pole nutnou pro efektivní lokalizovanou atrakci buněk, zatímco destičkový magnet přitahuje buňky především k okraji magnetu. Gradient magnetického pole, jeho směr, síla a distribuce mohou být dále regulovány počtem, pozicí, výškou a šířkou výstupku.



Obrázek 22. Z-komponenta magnetické síly vypočtená pro destičkový magnet (čárkován) a navrhovaný magnet se středovým výstupkem (černě) zobrazená schematicky nad oblastí léze (elipsa). Magnetická síla byla vypočtena pro plochu 4,5 mm nad povrchem magnetu. Vertikální čáry ukazují okraje magnetu.



Obrázek 23. Simulované magnetické siločáry poblíž povrchu destičkového magnetu (A) a magnetu s výstupkem (B). Šipky ukazují směr sil působících na magneticky značené buňky. Schematicky je znázorněna odpovídající distribuce buněk (modré kuličky) v subarachnoidálním prostoru pod oběma typy magnetu. Oblasti nejsilnějšího magnetického gradientu jsou vzestupně označeny zeleně, žlutě a červeně.

#### 4.2.4 Modelování cíleného magnetického doručování

Jedním ze základních problémů při magnetickém cílení buněk je jeho efektivita. Popis cílení buněk matematickým modelem, který zohledňuje magnetické síly a parametry magnetu, geometrii a objem prostoru, v kterém jsou buňky přítomny a životnost transplantovaných buněk, umožní důkladněji porozumět dynamice tohoto procesu a ovlivnit jeho chování požadovaným způsobem.

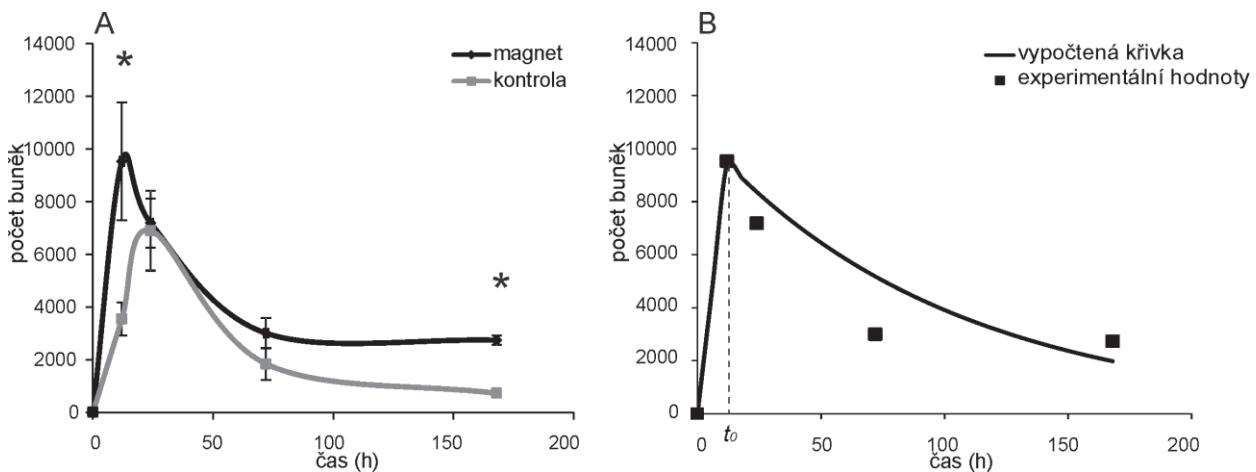
Cílené doručování buněk je limitováno jak biologickými, tak fyzikálními faktory. Předpokládejme, že určité množství  $N_0$  magneticky značených buněk bylo aplikováno do intratekálního prostoru. V průběhu času  $\tau_{bio}$  se počet buněk snižuje z biologických důvodů

jako je doba života buněk, možné imunologické reakce proti transplantovaným buňkám, apoptóza, eventuální cytotoxicita nanočástic atd. Naproti tomu fyzikální proces vychytávání buněk je řízen zejména magnetickými silami působícími na SPION značené buňky. Průběh tohoto procesu může být popsán charakteristickým časem  $\tau_{ph}$ , jenž závisí na gradientu magnetického pole, efektivitě značení buněk SPION, magnetickému momentu nanočástic a geometrii experimentu.

Za teoretického předpokladu, že magnetická síla působí na značené buňky poblíž povrchu magnetu v efektivní oblasti  $S$  a že aplikované buňky se pohybují v cerebrospinální tekutině v subarachnoidálním prostoru o objemu  $V$ , je pak možno rovnici vyjádřit počet vychytaných buněk v čase  $t$ . Detailní odvození matematických vztahů je uvedeno v přiložené publikaci (Vaněček et al., 2012).

Závislost počtu buněk v místě léze na čase získané experimentálně analýzou histologických řezů (obr. 24A) je možné korelovat s průběhem navržené funkce popsané rovnicí  $N(t) = N_0(1 - \text{Exp}(-t/\tau_{ph}))$ . Na obrázku 23A je patrný počáteční lineární růst počtu vychytaných buněk v závislosti na čase. Po dosažení určité koncentrace buněk  $N(t)$  se však jejich počet začíná snižovat v důsledku zmíněných biologických faktorů.

Navržený matematický model, vymezený pro krátké časové rozmezí ( $t < t_{ph}$ ), předpovídá lineární závislost vychytávání buněk na čase. Tato závislost byla experimentálně potvrzena pro časové období menší než 12 hodin. Z experimentálních dat na obrázku 20A lze určit fyzikální charakteristický čas  $\tau_{ph}$  na přibližně 26 dní. Teoreticky by během této doby byla, v případě absence biologických faktorů zodpovědných za snižování počtu buněk, většina transplantovaných SPION značených buněk vychytána. Nicméně při časových dispozicích, kdy je  $t > 24\text{h}$ , vlivy biologických faktorů překonávají fyzikální a způsobují pozorovaný pokles v počtu zachycených živých buněk. Celý proces magnetického cílení buněk lze tedy popsat kombinací dvou časově závislých funkcí s rozdílnými charakteristickými časy  $\tau_{bio}$  a  $\tau_{ph}$  :  $N_1(t) = N_0(1 - \text{Exp}(-t/\tau_{ph}))$  pro  $t < t_0$  a  $N_2(t) = N_1(t_0)\text{Exp}(-(t-t_0)/\tau_{bio})$  pro  $t > t_0$ , kde  $t_0$  je moment, kdy biologické činitele začnou převažovat nad fyzikálními. Charakteristická křivka této závislosti je vynesena v grafu na obrázku 24B.



Obrázek 24. Graf (A) ukazuje průměrný počet buněk, zachycených v různé době po transplantaci v měřené oblasti míchy pomocí magnetu (černě) a v kontrolních skupinách (šedě). Signifikantní rozdíl v počtu buněk mezi magnetickou a kontrolní skupinou byl nalezen v čase 12 a 168 hodin po implantaci buněk ( $p<0.05$ ). Graf (B) ukazuje modelovou křivku závislosti počtu buněk v lézi na čase, zohledňující fyzikální a biologické faktory ovlivňující průběh magnetického cílení.

#### 4.3 Bioadhezivní vlastnosti Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaného hydrogelu

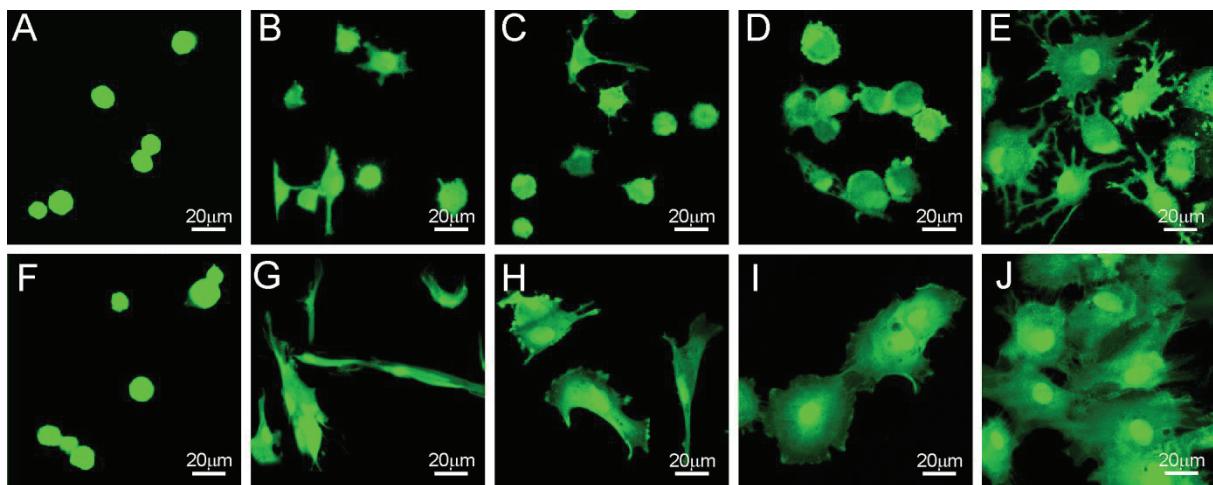
Abychom zhodnotili základní bioadhezivní vlastnosti nového hydrogelu pro léčbu míšního poranění, sledovali jsme vliv peptidové sekvence Ac-CGGASIKVAVS-OH (pro přehlednost zkráceně IKVAV) imobilizované na povrchu modifikovaného PHEMA hydrogelu na adhezi a morfologii buněk. Studován byl také vliv funkčních skupin prekurzorů tohoto hydrogelu, tj. amino skupiny ( $-NH_2$ ), sulfhydrylové skupiny ( $-SH$ ) a dithiopyridinové skupiny ( $-Tpy$ ), využitých v průběhu jeho syntézy. Imobilizace peptidové sekvence IKVAV na povrchu funkcionálizovaného hydrogelu bylo dosaženo pomocí sekvence aminokyselin CGGA (cys-gly-gly-ala), která byla vložena mezi aktivní sekvenci (IKVAV) a povrch hydrogelu. Cystein v sekvenci obsahuje reaktivní  $-SH$  skupinu nutnou pro imobilizaci peptidu na povrch hydrogelu. GGA peptid byl vložen pro oddálení aktivní IKVAV sekvence od povrchu hydrogelu. Serin (S) se nativně vyskytuje ve struktuře lamininu vedle sekvence IKVAV a byl inkorporován do peptidu z důvodu usnadnění jeho syntézy (Jucker et al., 1991). Tímto novým přístupem byl získán superporézní hydrogel s lamininovou sekvencí (Ac-

CGGASIKVAVS-OH) imobilizovanou v dostatečné vzdálenosti od povrchu hydrogelu, aby se minimalizovalo riziko inaktivace peptidu (Kubinová et al., 2010c).

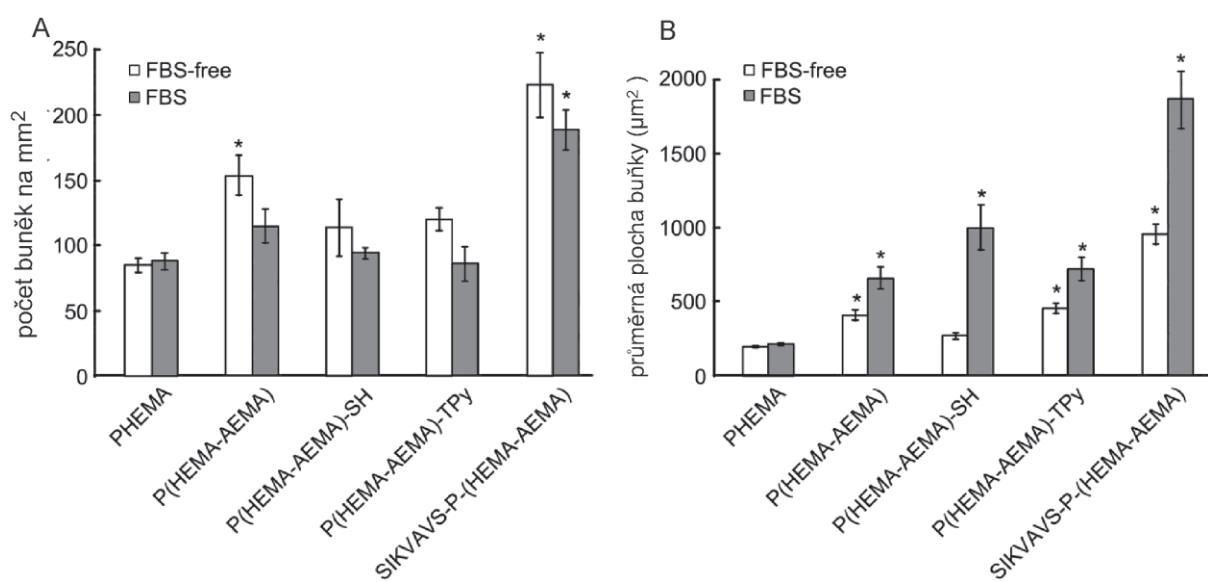
Hodnotili jsme buněčnou adhezi po 4 hodinové kultivaci na prekurzorech finálního hydrogelu, tj. P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-**SH**, P(HEMA-AEMA)-**Tpy**, finálním P(HEMA-AEMA)-**Ac-CGGASIKVAVS-OH** a samotném PHEMA jako standardu. Abychom zhodnotili vliv séra na adhezi buněk, kultivovali jsme MSC na hydrogelech jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti séra v kultivačním mediu. Z výsledků našich předchozích experimentů vyplynulo, že kultivace MSC po dobu 4 hodin bez přítomnosti séra signifikantně neovlivňuje viabilitu buněk (Kubinová et al., 2009). Fetální bovinní sérum (FBS), které je nutné pro kultivaci buněk v kultuře obsahuje různé proteiny jako albumin, fibronektin nebo vitronektin, které jsou schopny adsorpce na povrch substrátu a umožňují adhezi buněk prostřednictvím integrinových receptorů (Yamada et al., 2003). Hodnocení adheze a morfologie buněk v nepřítomnosti séra tak umožnilo zhodnotit přímý vliv různých povrchových struktur na interakce s buňkami.

Buňky zachycené po vysetí na PHEMA hydrogelu v **nepřítomnosti séra** adherovaly (obr. 25A) na povrch hydrogelu ve sférickém tvaru a nedošlo k jejich rozprostření na povrch hydrogelu. Částečně adherované buňky s krátkými výběžky byly pozorované u P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH, P(HEMA-AEMA)-Tpy hydrogelů (obr. 25B-D). Odlišná morfologie buněk byla pozorována u Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaného hydrogelu (obr. 25E). MSC, které rostly a rozprostřely se na povrchu tohoto hydrogelu, tvorily četná lamelipodia a membránové protruze v reakci na přítomnost vazebních míst rozpoznaných jejich integrinovými receptory.

V **přítomnosti séra** buňky dobře adherovaly ke všem testovaným hydrogelům P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH, P(HEMA-AEMA)-TPy, P(HEMA-AEMA)-Ac-CGGASIKVAVS-OH, mimo PHEMA (obr. 25F). Kvantitativní analýza potvrdila významně vyšší hustotu a plochu buněk na Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaném hydrogelu v porovnání s P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH, P(HEMA-AEMA)-TPy, jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti séra. Ve srovnání s PHEMA byla také pozorována signifikantně lepší adheze buněk v nepřítomnosti séra na P(HEMA-AEMA) a P(HEMA-AEMA)-TPy a v přítomnosti séra u P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH, P(HEMA-AEMA)-TPy (obr. 26A,B).



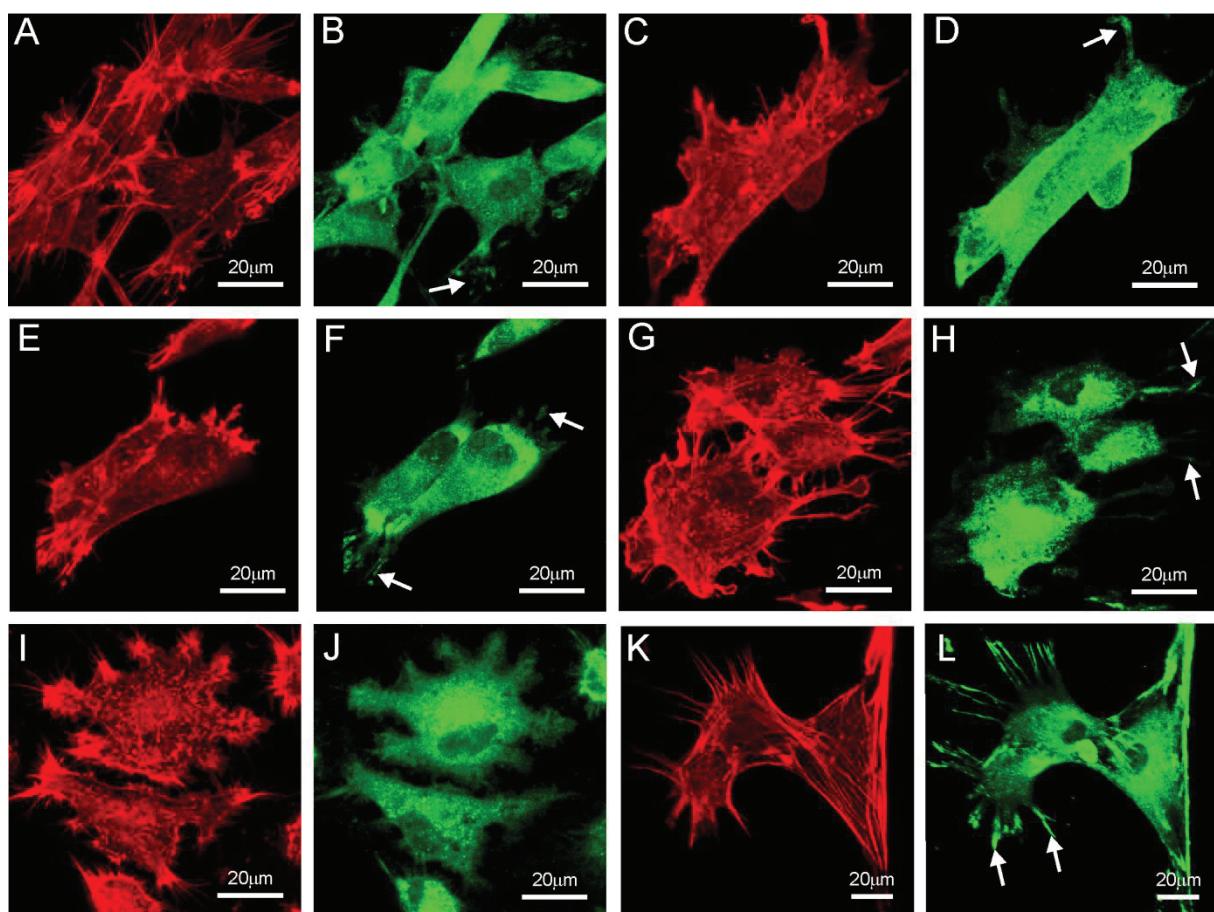
Obrázek 25. Fotografie MSC kultivovaných 4 hodiny na PHEMA (A,F), P(HEMA-AEMA) (B,G), P(HEMA-AEMA)-SH (C,H), P(HEMA-AEMA)-Tpy (D,I) a Ac-CGGASIKVAV-OH modifikovaná P(HEMA-AEMA) (E,J) v mediu neobsahujícím FBS sérum (A-E) a v mediu se sérem (F-J).



Obrázek 26. Hustota buněk (graf A) a průměrné plochy adhezovaných  $GFP^+$  MSC buněk (graf B) po 4 hodinách kultivace na různých hydrogelech v přítomnosti (FBS) a nepřítomnosti séra (FBS-free) v mediu.  $p < 0.05$  ve srovnání s PHEMA hydrogolem.

Organizace cytoskeletu a tvorba fokálních adhezí byly hodnoceny imunofluorescenčním barvením na F-aktin a vinkulin (obr. 27). Na fotografiích pořízených konfokálním mikroskopem je patrná tvorba aktinových filament po 4 hodinách kultivace

MSC v přítomnosti séra na hydrogelech P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH, P(HEMA-AEMA)-TPy (obr. 27A-H). Tvorba aktinových vláken nebyla po 4 hodinách pozorována u PHEMA a v nepřítomnosti séra u P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH, P(HEMA-AEMA)-TPy. Naproti tomu, po 4 hodinách kultivace MSC na IKVAV modifikovaném hydrogelu, bylo možné pozorovat aktinová filamenta a tvorbu tenkých filopodií na okraji buněčných protruzí buněk jak v nepřítomnosti (obr. 27I,J), tak v přítomnosti séra (obr. 27G,H). Přítomnost vinkulinových fokálních adhezí na zakončení aktinových filament byla patrná na IKVAV modifikovaném gelu již po 4 hodinové kultivaci a velmi jasně po 3 dnech kultivace (obr. 27L). V menší míře bylo možné pozorovat vznik vinkulinových adhezních míst i na ostatních hydrogelech (obr. 27, bílé šipky)



Obrázek 27. Fotografie MSC kultivovaných na P(HEMA-AEMA) (A,B), P(HEMA-AEMA)-SH (C,D), P(HEMA-AEMA)-Tpy (E,F) a Ac-CGGASIKVAV-OH modifikované P(HEMA-AEMA) (G-L) v mediu obsahujícím FBS (A-H,K,L), v mediu bez FBS (I,J) v průběhu 4 hodin (A-J) nebo 3 dní (K,L). Barvení aktinu (A,C,E,G,I,K) a vinkulinu (B,D,F,H,J,L). Šipky ukazují vinkulinová adhezní místa.

#### **4.4 Diferenciace neurálních prekurzorů na Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaném hydrogelu**

Lidské fetální neurální prekurzory (NSC) byly kultivovány na IKVAV modifikovaném hydrogelu s cílem zhodnotit vliv imobilizované sekvence na růst a diferenciaci těchto buněk. Výsledky byly srovnány s růstem NSC na hydrogelu P(HEMA-AEMA)-SH, který vykazoval nejlepší bioadhezivní vlastnosti zjištěné při kultivaci MSC (viz výše). Hustota buněk se v průběhu kultivace postupně zvyšovala na obou typech gelu s lepšími výsledky u IKVAV modifikace. Na obou typech gelu buňky rostly a proliferovaly ve shlucích, a to více v pórech gelu než na jeho povrchu.

Histologické i kvantitativní hodnocení neurální diferenciace bylo provedeno po 1, 2 a 4 týdnech kultivace. Týden po osazení IKVAV modifikovaného gelu tvořily neurální buňky shluky pozitivní na nestin s výběžky pozitivními na  $\beta$ -III tubulin (obr. 28C,D). Buňky rostoucí na P(HEMA-AEMA)-SH hydrogelu tvořily menší shluky se slabou pozitivitou na  $\beta$ -III tubulin a nestin (obr. 28A,B). Na IKVAV modifikovaném hydrogelu bylo nalezeno 65% buněk pozitivních na  $\beta$ -III tubulin, zatímco na P(HEMA-AEMA)-SH pouze 0,1% (Tabulka 4).

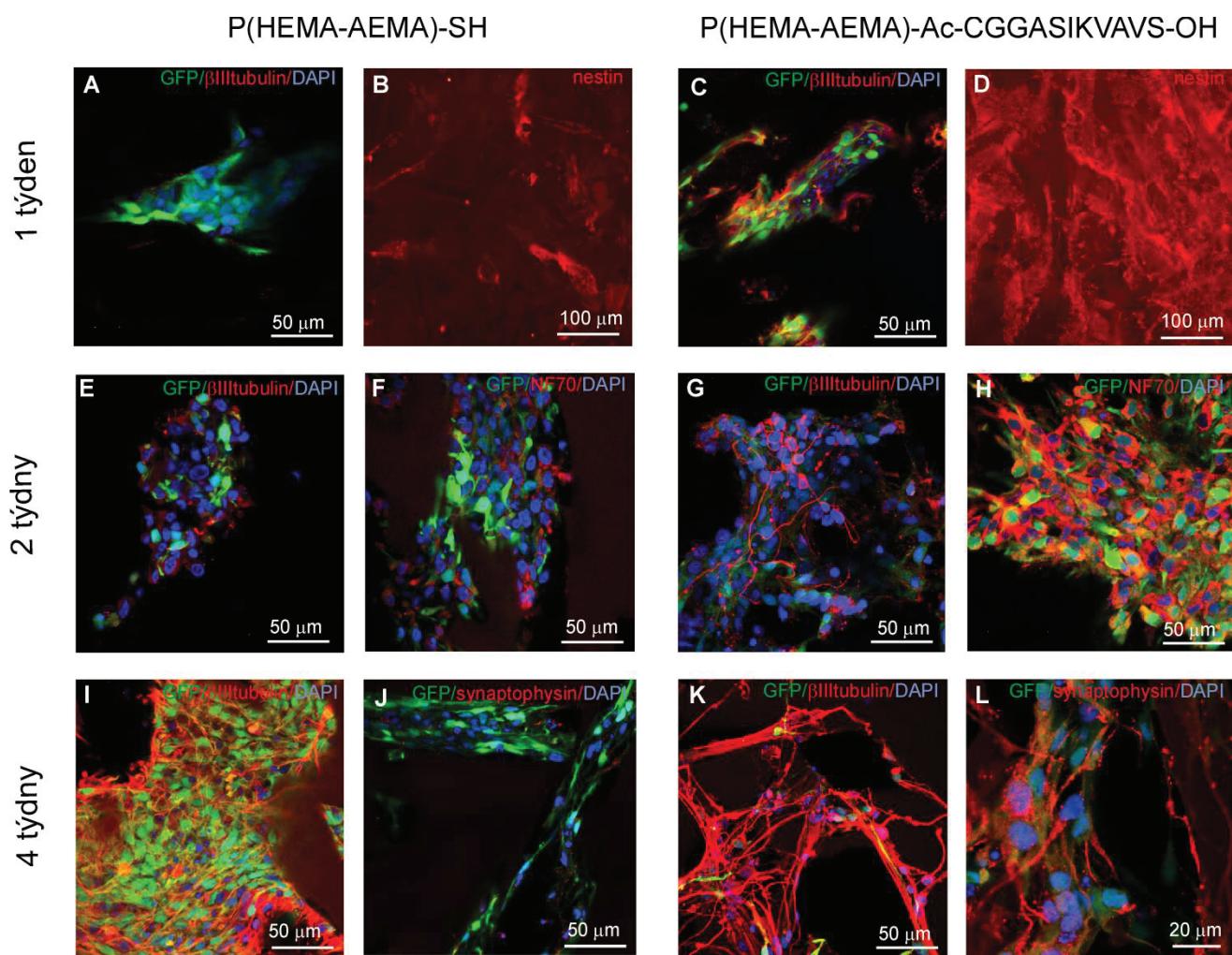
	1 týden	2 týdny		4 týdny		
	$\beta$ III-tubulin	$\beta$ III-tubulin	NF 70	$\beta$ III-tubulin	NF70	synaptofyzin
P(HEMA-AEMA)-SH	0,1%	2,2%	31,8%	41,2%	10,7%	12,3%
Ac-CGGASIKVAVS-OH	65,8%	41,6%	52,0%	38,4%	18,1%	42,2%

Tabulka 4. Počty buněk exprimujících neurální markery během kultivace na Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikované P-(HEMA-AEMA) a na P-(HEMA-AEMA)-SH hydrogelu.

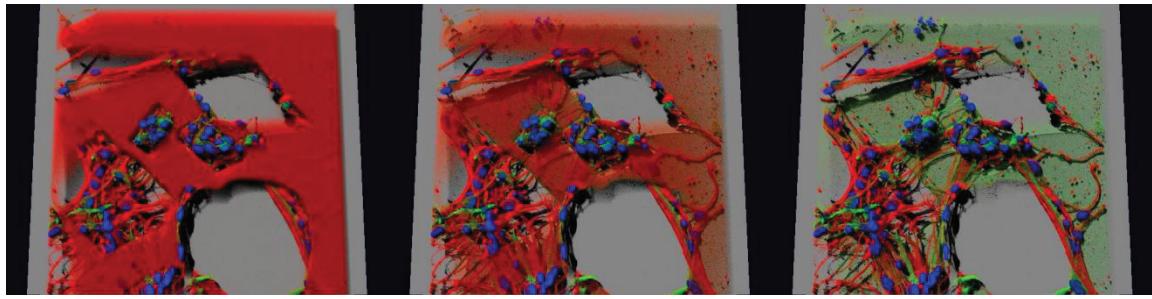
Po 2 týdnech kultivace NSC proliferovaly na obou testovaných hydrogelech (obr. 28F,I). Byly však patrné rozdíly v morfologii a imunocytochemickém barvení neurálních markerů. NSC rostoucí na IKVAV modifikovaném hydrogelu tvořily dlouhé výběžky a více se podobaly neuronům. Celkem 41,6% buněk bylo pozitivních na  $\beta$ -III tubulin (obr. 28G) a 52% na NF 70 (obr. 28H). Naproti tomu NSC rostoucí na P(HEMA-AEMA)-SH hydrogelu netvořily pozorovatelné výběžky v takové míře a pouze 2,2% bylo pozitivních na  $\beta$ -III tubulin a 31,85% na NF 70.

Po 4 týdnech kultivace byla hustota buněk pozitivních na  $\beta$ -III tubulin srovnatelná u obou typů hydrogelů (obr. 28I,K). Buňky rostoucí na IKVAV modifikovaném gelu vykazovaly větší pozitivitu na NF 70 (18.7%) v porovnání s P(HEMA-AEMA)-SH hydrogelem (10,7%). 42,2% buněk rostoucích na IKVAV modifikovaném gelu bylo pozitivních na synaptofyzin a byly patrné časté výběžky buněk (obr. 28L). Naproti tomu buňky rostoucí na P(HEMA-AEMA)-SH byly jen z 12,3% pozitivní na synaptofyzin s nezřetelnou neurální morfologií (obr. 28J). Buňky prorůstaly strukturu materiálu a vrůstaly do pórů gelu (obr. 29).

Výše uvedené výsledky ukazují, že modifikace Ac-CGGASIKVAVS-OH podporuje adhezi, proliferaci a diferenciaci NSC na P(HEMA-AEMA) hydrogelu během prvních dvou týdnů kultivace.



Obrázek 28. Neurální prekurzory kultivované na P(HEMA-AEMA)-SH (A,B,E,F,I,J) a Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikované P(HEMA-AEMA) (C,D,G,H,K,L) po dobu 1 týdne (A-D), 2 týdnů (E-H) a 4 týdnů (I-L).



Obrázek 29. 3D rekonstrukce fotografie neurálních prekurzorů pořízené konfokálním mikroskopem po 4 týdnech kultivace na Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaném hydrogelu. Po postupném softwarovém odfiltrování struktury gelu (červená plocha) je dobře patrný růst neurálních prekurzorů v pórech materiálu (barvení - modře DAPI, červeně β-III tubulin, zeleně GFP protein).

## **5 Diskuse**

Míšní trauma patří k fyzicky a psychicky velmi devastujícím poraněním s douhodobými následky, pro které v současné době stále neexistuje účinná léčba (Doležal, 2004). Předpokládá se, že pro úspěšnou terapii míšního poranění bude nutno kombinovat různé přístupy a strategie, které povedou ke zlepšení stavu pacientů (Thuret et al., 2006). Nové přístupy by měly být ideálně šité na míru konkrétním pacientům a měly by vést k cílené regeneraci poškozené míšní tkáně. Využití biomateriálů a nanotechnologií představují nadějné možnosti, jak zefektivnit terapii SCI. Cílem této práce bylo zhodnotit a popsat biologické a funkční vlastnosti nových hydrogelů a nanočástic připravovaných pro léčbu míšního poranění v Oddělení neurověd ÚEM AVČR a Centra neurověd 2. LF UK.

Studie na našem i jiných pracovištích ukázaly, že léčba poruch nervového systému pomocí buněčné terapie je perspektivním směrem se slibnými klinickými i preklinickými výsledky (Syková et al., 2006b; Syková et al., 2006a; Forostyak et al., 2011; Polentes et al., 2012a). K rozvoji léčby defektů CNS pomocí buněčné terapie významně přispěl i vývoj metod umožňujících neinvazivní sledování osudu buněk v organizmu po jejich podání (Jendelová et al., 2004; Syková et al., 2007b). Pomocí MR je možno detekovat a sledovat SPION značené transplantované buňky a na základě získaných poznatků optimalizovat terapeutický protokol, zvolit vhodnou cestu podání nebo určit terapeutické okno, v průběhu kterého je terapie nejfektivnější. V současné době však nejsou na trhu vhodné kontrastní látky pro terapeutické monitorování buněčné terapie. Navíc SPION, které byly donedávna komerčně dostupné (Endorem®, Feridex®), nemají optimální vlastnosti pro intracelulární značení buněk (Kostura et al., 2004; Horák et al., 2009). Vývoj nových SPION vhodných pro značení a monitorování buněk pomocí MR je tedy logickým krokem na cestě k dalšímu poznání a praktickému využití buněčné terapie.

Osud transplantovaných buněk v organizmu významně předurčuje způsob aplikace. Z dosud publikovaných prací vyplývá, že pro aplikaci buněk do míšní léze je nejvíce efektivní přímá transplantace buněk do oblasti léze a nejméně účinné je intravenózní podání buněk (Courtney et al., 2009; Hejcl et al., 2011). Kompromisem mezi uspokojivou efektivitou a přijatelnou invazitou je intratekální transplantace buněk do mozkomíšního moku pomocí lumbální punkce. Účinek buněčné terapie velmi závisí na efektivitě transplantace a na počtu transplantovaných buněk, které mohou terapeuticky působit v místě léze (Pal et al., 2010). Bylo například ukázáno, že po poranění CNS je míra remyelinizace v míše úměrná počtu transplantovaných buněk (Inoue et al., 2003). Nízká efektivita transplantace často nemůže být

kompenzována zvýšením počtu podávaných buněk z důvodu příliš velkého objemu suspenze buněk nebo z důvodu nedostatku buněk pro transplantaci. Z těchto důvodů je vedle prokazování účinnosti a bezpečnosti buněčných terapií jednou z důležitých oblastí vývoj nových metod cíleného doručování buněk, které by umožnily maximalizovat počet buněk v lézi. Jednou z metod umožňujících cílené doručování buněk je využití SPION k označení buněk a jejich následné doručení a koncentrování v místě léze pomocí magnetického pole. Podobně byly v CNS k cílené terapii pomocí magnetického pole využity například magnetolipozomy obsahující protinádorová léčiva (Zhao et al., 2012).

Lokálního působení růstových faktorů nebo buněk v SCI lze dosáhnout i s využitím nosičů na bázi hydrogelů. Osazením hydrogelu buňkami či navázáním léčiv na gel vznikne konstrukt, s jehož pomocí lze jak fyzicky přemostit kavitu po míšním poranění, tak lokálně v místě poranění poskytnout účinek inkorporovaných léčiv nebo buněk rostoucích na nosiči. Tento přístup vyžaduje konstrukci nosiče, který bude biokompatibilní, bude mít kontrolovanou porozitu a permeabilitu, vhodné fyzikální vlastnosti a bude podporovat adhezi, proliferaci a eventuelně diferenciaci buněk (Kubinová et al., 2012).

## **5.1 Biokompatibilita, efektivita značení a zobrazování SPION**

Nové magnetické nanočástice pro intracelulární značení kmenových buněk jsme hodnotili z hlediska cytotoxicity, účinnosti značení a možnosti zobrazení pomocí MR.

Hodnocení a využití nových SPION pro značení kmenových buněk je dlouhodobým vědecko-výzkumným tématem našeho pracoviště (Syková et al., 2005, 2007a; Syková et al., 2011). V počátečních studiích byl pro magnetické značení buněk využíván komerčně dostupný preparát Endorem®. Ukázalo se však, že tento preparát, původně výrobcem vyvíjený jako systémová kontrastní látka, nemá vhodné vlastnosti pro intracelulární značení buněk (zejména kvůli velmi nízké efektivitě značení buněk). Pro optimální značení buněk bylo potřeba vyvinout takové nanočástice, které by efektivně značily buňky, zlepšily jejich kontrast na MR po transplataci, měly optimální fyzikální vlastnosti a neovlivňovaly viabilitu a diferenciační potenciál kmenových buněk (Horák et al., 2009). Vhodnou strategií ke zlepšení značení buněk se ukázalo využití modifikací povrchů SPION molekulami, které indukují endocytózu (Babič et al., 2008; Babič et al., 2009). Tuto strategii naplňuje i využití hyaluronanu jako obalu nanočástic. Receptor pro hyaluronovou kyselinu (CD 44) je přítomen na povrchu většiny savčích buněk včetně MSC. CD44 hraje významnou roli v adhezi a migraci buněk a také endocytóze (Culty et al., 1992; Pittenger et al., 1999; Vachon et al., 2006; Poulsom, 2007).

Jednou z prvních prací popisujících povrchovou úpravu nanočástic pomocí DPA a HA je práce Yuahana Lee a spol. (Lee et al., 2008). Ve své práci se inspirovali složením adhezivních proteinů sekretovaných mlži druhu *Mytilus edulis* (slávka jedlá), které obsahují velké množství dopaminu, pomocí kterých tito živočichové mohou přilnout k povrchům. Nejdůležitější vlastností dopaminu pro adhezi a interakci s povrhy je jeho ortho-dihydroxyfenylová skupina (catechol), která tvoří silné vazby s různými anorganickými (včetně kovů) a organickými povrhy, které jsou silnější než interakce biotin-streptavidin. Na rozdíl od Lee a spol., kteří syntetizovali magnetické nanokrystaly fyzikální metodou termální dekompozice, jsou SPION použité v této práci syntetizované široce používanou a bezpečnější koprecipitační metodou a následně pokryté obalem.

Abychom posoudili vliv jednotlivých složek obalu nově připravených nanočástic na jejich vlastnosti, důkladně jsme hodnotili částice v různém složení obalu a poměru složek. Před praktickým využitím SPION jako intracelulárních kontrastních látek je nutné posoudit toxicitu využívaných částic a efektivitu značení. Označení buněk částicemi nesmí mít negativní dopad na viabilitu, proliferaci, diferenciaci a funkci buněk (Bernsen et al., 2010). V našich experimentech jsme nanočástice využili ke značení MSC a chondrocytů. Viabilita ani proliferační potenciál buněk značených DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nebyly podstatně rozdílné v porovnání s neznačenými buňkami a byly lepší než u buněk značených komerčně dostupným Endoremem®.

Účinnost značení buněk pomocí SPION je důležitým parametrem, protože efektivnější označení buněk vede k jejich lepší detekci pomocí MR. Z našich výsledků vyplývá, že částice pokryté pouze DPA penetrovaly velmi dobře do buněk díky kladnému náboji aminoskupiny DPA. DPA samotný má významnou úlohu při internalizaci částic do buněk a jeho koncentrace je důležitá k dosažení efektivního značení. Internalizace je více závislá na koncentraci dopaminu, a ne tak výrazně na koncentraci HA. Přítomnost samotné HA na povrchu částic internalizaci zvyšuje pouze mírně (v porovnání s DPA). Jak jsme však ukázali, je využití samotného DPA ke zvýšení internalizace částic do buněk schématem „čím více DPA, tím lepší internalizace“ omezeno agregací částic, která je jednak důsledkem snížení zeta-potenciálu pod mez stability a navíc také zvýšenou tvorbou nežádoucích shluků v důsledku adsorpce sérových proteinů z kultivačního media. Nejlepšího značení buněk bylo dosaženo s částicemi pokrytými asociátem DPA-HA. HA v tomto případě zřejmě přispívá ke stabilizaci částic jak pomocí náboje, tak stericky. Množství buněk pozitivních na barvení berlínskou modří bylo nejvyšší (85%) u buněk značených DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (skupina III/3). Využití asociátu DPA/HA a jeho následné navázání na maghemitové nanočástice přes

hydroxylové skupiny je tedy optimálním postupem jak vytvořit SPION pro efektivní značení buněk, protože tyto částice jsou ochotně buňkami internalizovány a pozitivně zde působí synergický efekt DPA a HA, tedy obou složek obalu. Protože MSC a chondrocyty exprimují receptor pro HA (CD44) (Ishida et al., 1997; Zhu et al., 2006) lze předpokládat, že je internalizace DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástic pravděpodoně receptorem zprostředkovaný proces. K interakci těchto částic s negativně nabitém buněčnou membránou může navíc přispět přítomnost kladně nabité aminoskupiny DPA. Synergické působení DPA-HA tak pravděpodobně usnadňuje vychytávání částic buňkami v kultuře.

Účinnost značení MSC pomocí DPA-HA nanočástic byla srovnatelná s velmi dobrou účinností značení pomocí dříve připravených nanočástic pokrytých poly-L-lysinem (Horák et al., 2009). Při značení buněk nebylo nutné použít žádné transfekční činidlo jako v případě značení MSC některými jinými autory (Hoehn et al., 2002). Kvůli možné toxicitě těchto látek je pro klinické využití značených buněk použití transfekčních činidel nevhodné. Pro využití značených kmenových buněk je velmi důležité, aby nebyl značením ovlivněn jejich diferenciální potenciál. Někteří autoři poukazují na možnost ovlivnění potenciálu značených MSC diferencovat do chondrocytů. Míra ovlivnění diferenciálního potenciálu se může lišit u různých nanočástic (Horák et al., 2011), proto je nutné diferenciaci značených buněk sledovat pomocí diferenciálních testů. V našich experimentech jsme pozorovali rozdíly mezi jednotlivými typy částic obsahujících HA v ovlivnění schopnosti buněk diferencovat. Chondrogenní diferenciace značených buněk byla ovlivěna u částic pokrytých pouze hyaluronátem, nebyla však ovlivněna u finálních DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanočástic. Úloha HA v chondrogenní diferenciaci není přesně známa. Ng a spol. ve své práci ukázali, že po přidání HA o molekulové hmotnosti  $2,5 \times 10^5$  do kultivačního media byla v závislosti na koncentraci tohoto přidaného HA snížena syntéza agrekanu a HA v buněčné kultuře chondrocytů (Ng et al., 1995). Je možné, že v našich experimentech se reziduální volné molekuly HA přichytily k povrchu buněk, zabránily tvorbě pelet a znemožnily chondrogenní diferenciaci. Naproti tomu přítomnost DPA v DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vedla k větší efektivitě značení bez negativního účinku na formování pelety a chondrogenní diferenciaci, pravděpodobně díky lepší internalizaci těchto částic buňkami a omezení desorpce HA do kultivačního media.

Ukázali jsme také, že buňky značené DPA/HA částicemi mohou být dobře detekovatelné pomocí MR. Nejvyšší relaxivita byla změřena u částic DPA-HA-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> s poměrem DPA/HA 0,01936 (tabulka 3). Při vyšším poměru DPA/HA se (0,03842) se však relaxivita opět snížila, pravděpodobně v důsledku agregace vedoucí k sedimentaci, což snížilo jak relaxivitu částic, tak vychytávání částic buňkami. Přestože tyto částice mají nižší

relaxivitu než dříve studované částice pokryté manózou a poly-L-lysinem (Horák et al., 2009), vykazují lepší hodnoty relaxačních poměrů u značených buněk díky vyšší internalizaci částic buňkami.

Kromě dobré biokompatibilty a detekovatelnosti pomocí MR je další výhodou nových DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oproti jiným typům částic velké množství volných karboxylových skupin pro případné navázání molekul léčiv, protilátek, fluorescenčních značek, růstových faktorů nebo kancerostatik. Potenciálně je tento typ nanočástic vhodný pro široké spektrum aplikací.

## 5.2 Cílené magnetické doručování značených MSC do míšní léze

Cílení léčiv pomocí magnetického pole je dlouhodobě studováno zejména v oblasti chemoterapeutik a radioterapeutik. Navázáním léčiva na magnetický nosič, aplikací do krevního řečiště a následným zacílením a vychytáním pomocí magnetického pole je možné dosáhnout žádoucí vysoké koncentrace léčiva v cílové tkáni bez vedlejších nežádoucích účinků na okolní tkáň (Hafeli, 2004).

Principy magnetického cílení buněk jsou v současné době také využívány v systémech pro magnetickou separaci buněk (Hatch et al., 2001). Rostoucí význam buněčných terapií a zájem cílit aplikované buňky do místa léze podnítily vývoj metod využitelných k cílení buněk *in vivo*. Hlavní výhodou cílené terapie je snížení počtu buněk nutného pro léčbu a koncentrování buněk v místě poranění.

Cílené magnetické doručování buněk do oblastí mozku a míchy bylo studováno různými autory (Arbab et al., 2004; Nishida et al., 2006; Sasaki et al., 2011). Pro efektivní využití magnetického doručování je však nutný detailnější popis a analýza použitých magnetických systémů. Proto jsme provedli *in vivo* a *in vitro* experimenty s cílem kriticky zhodnotit možnosti využití permanentního magnetu k cílení buněk do míšní léze a navrhli model průběhu cíleného doručování buněk.

### 5.2.1 Vliv magnetického pole na cílení značených buněk

Předpokladem využití SPION k magnetickém cílení buněk je přítomnost magnetických sil působících na částice. Síla je důsledkem přítomnosti magnetického pole a také gradientu magnetického pole, tzn. mírou změny síly pole v prostoru. Síla  $F_m$  působící na magnetickou částici s bodovým dipolovým momentem  $m$  ve statickém magnetickém poli  $B$  je definována jako

$$\vec{F}_m = (\vec{m} \vec{\nabla}) \vec{B} \quad (4),$$

kde  $\nabla$  je operátor nabla,  $\vec{m} = \vec{m}_x i + \vec{m}_y j + \vec{m}_z k$ ,  $\vec{B} = B_x \vec{i} + B_y \vec{j} + B_z \vec{k}$  a  $\vec{i}, \vec{j}, \vec{k}$  jsou jednotkové vektory v Cartesianském systému souřadnic (Pankhurst et al., 2003).

Pokud je magnetický materiál umístěn v magnetickém poli o síle  $H$ , individuální magnetické momenty v materiálu přispívají k jeho celkové magnetické odpovědi. Materiál je tedy možno zmagnetizovat. V případě buněk označených SPION může být celková magnetizace buňky vyjádřena jako  $\vec{M} = \Sigma \vec{m} / V_c$ , kde  $\Sigma m$  je součet magnetických momentů částic a  $V_c$  je objem buňky. Magnetizace materiálu  $M$  je závislá na velikosti magnetického pole  $H$  podle vztahu  $M = \chi H$ , kde  $\chi$  je magnetická susceptibilita.

Magnetická síla působící na značené buňky může být pak vyjádřena jako

$$\vec{F}_m = \frac{V_c \chi}{\mu_0} (\vec{B} \vec{\nabla}) \vec{B} = \frac{V_c \chi}{\mu_0} \left( B_x \frac{\partial}{\partial x} + B_y \frac{\partial}{\partial y} + B_z \frac{\partial}{\partial z} \right) (\vec{i} B_x + \vec{j} B_y + \vec{k} B_z) \quad (5),$$

kde  $V_c$  je objem buňky,  $\mu_0$  je permeabilita volného prostoru,  $B = \mu_0 H$  je magnetická indukce a  $H$  je síla magnetického pole (Pankhurst et al., 2003).

Magnetická síla, která působí na buňky, se zvyšuje s rostoucí susceptibilitou značených buněk (tj. s vyšším obsahem SPION v buňce) a závisí na gradientu magnetického pole, jak vyplývá z rovnic (4) a (5).

Bylo ukázáno, že permanentní magnety, často využívané k experimentálnímu magnetickému cílení buněk do mozku a míchy, jsou omezeny svými fyzikálními vlastnostmi, zejména distribucí a velikostí magnetických sil a gradientu (Sarwar et al., 2012). Síla magnetického pole rychle klesá se zvyšující se vzdáleností od povrchu magnetu. Fyzikální limity magnetů a jejich dopad na efektivitu cílení buněk je nutno analyzovat, zohlednit při hodnocení účinnosti použitých magnetických systémů a při návrhu zlepšení, které bude vést k větší efektivitě cíleného doručování buněk (Hatch et al., 2001; Wahajuddin et al., 2012). Pro navržení obecného principu k optimalizaci magnetů pro magnetické cílení buněk jsme analyzovali gradienty magnetického pole pomocí dříve popsané matematické metodiky (Zablotskii et al., 2010).

Možnost lokalizovat MSC značené SPION pomocí permanentního magnetu nejprve ověřili *in vitro*. Po vysazení SPION značených buněk na Petriho misku s magnetem připevněným na spodu misky byly buňky přitahovány do oblasti nad magnetem. Tento výsledek je v souladu s dobře dokumentovaným pozorováním pozorováním jiných autorů (Frasca et al., 2009; Schafer et al., 2010).

Po implantaci magnetického implantátu pokrytého biokompatibilním silikonovým obalem do oblasti nad poškozenou míchou jsme nepozorovali žádné nežádoucí reakce. Jak bylo následně dobře vidět na MR a také potvrzeno histologicky, po intratekální transplantaci buněk potkanům byly transplantované buňky přítomny ve shlucích v subarachnoidálním prostoru a nemigrovaly hlouběji do poškozené tkáně. Mothe a spol. (Mothe et al., 2011) ve své práci popisuje transplantaci neznačených MSC do míchy cestou lumbální punkce 1 týden po kompresním míšním poranění. Buňky po implantaci setrvaly v intratekálním prostoru podél míchy a nemigrovaly do míšní tkáně. Naproti tomu jiní autoři popisují schopnost MSC migrovat do míšní léze po intratekální aplikaci (Satake et al., 2004). Rozdílná schopnost buněk migrovat do léze může být vysvětlena různými typy míšního poranění ve studiích a také transplantací buněk v různé době po poranění. Sasaki a spol. (Sasaki et al., 2011) ve své nedávné práci popsali pozitivní efekt MSC značených SPION a cílených do míšní léze na behaviorální výsledky pokusných potkanů. Transplantované buňky byly lokalizovány na povrchu míchy v subarachnoidálním prostoru v oblasti léze pod magnetickým implantátem. V jejich práci však nebyl popsán detailnější rozbor použitého magnetického systému.

Pozorovaný vznik shluků buněk v důsledku magnetického cílení může mít důležitý význam. Trojrozměrné vícebuněčné shluky buněk jsou považovány za odolnější vůči nehostinnému prostředí, jakým může být míšní léze. Buňky si ve shluku také mohou navzájem poskytovat mechanickou a parakrinní podporu. V důsledku tvorby shluku a specifických mezibuněčných signálů se exprese některých genů a faktorů v buňkách ve shluku může lišit od samostatných buněk (Lin et al., 2008), což může vést k rozdílnému terapeutickému efektu v porovnání s necílenými buňkami. Hamasaki a spol. (Hamasaki et al., 2005; Hamasaki et al., 2007) například ukázali, že magneticky označené neurální progenitorové buňky je možno lokalizovat *in vitro* pomocí magnetu na určité místo organotypického řezu mozku. Lokalizované buňky si zachovaly diferenciální potenciál a podporovaly axonální růst více než buňky rozptýlené v kultuře.

V našich experimentech jsme zjistili signifikantní rozdíl v distribuci a počtu transplantovaných buněk v okolí léze mezi skupinou pokusných zvířat s magnetem a kontrolní skupinou bez magnetu. MSC intratekálně aplikované do subarachnoidálního prostoru byly vychytávány a koncentrovány nad lézí pod magnetickým implantátem. Tato zjištění jsou v souladu s prací Nishidy a spol. (Nishida et al., 2006), kde byla měřena plocha, kterou zaujímaly GFP<sup>+</sup> MSC transplantované do zdravé míchy v oblasti pod magnetickým implantátem. V porovnání s kontrolou byla nalezena vyšší koncentraci buněk v oblasti pod magnetem. Na rozdíl od této studie jsme místo měření plochy signálu GFP použili metodu

přímého počítání buněk a určili tak počet a distribuci buněk přesněji. Distribuce buněk v okolí léze korelovala s vypočtenou distribucí magnetických sil v okolí použitého magnetu. Buňky byly koncentrovány v blízkosti léze, v důsledku distribuce sil magnetu (z-komponenta) však nebylo jejich cílení zaměřeno přesně do místa léze. Navíc, relativně slabá planární x-komponenta neumožnila vychytávat buňky dostatečně efektivně. Magnetická síla totiž působí ve směru nejstrmějšího růstu gradientu magnetického pole (v případě destičkového magnetu na jeho pólech, obr. 23). Pro efektivní cílení buněk do místa léze je tedy nutno vlastnosti magnetického systému optimalizovat. Jedním z navrhovaných přístupů může být změna tvaru použitého magnetu a dosažení optimální modulace magnetického pole a gradientu. Jinou možností je využití velmi malých magnetů (v rozměrech mm) a nastavení optimálního magnetického pole jejich správnou konfigurací (Zablotskii et al., 2010).

Mezioborový přístup ke studiu magnetického cílení buněk dovoluje odhalit a popsat důležité detaily v procesu magnetického cílení buněk na teoretické i praktické úrovni. To představuje základ pro praktické využití magnetického cílení buněk v biomedicíně.

### 5.2.2 Model cíleného doručování buněk

Na základě analýzy získaných dat (počtu buněk v čase po transplantaci) byl navržen predikční matematický model magnetického cílení buněk, ve kterém je proces cílení buněk charakterizován specifickými časy  $\tau_{ph}$  a  $\tau_{bio}$ .  $\tau_{ph}$  (jež definuje rychlosť vychytávání buněk) může být ovlivněn vlastnostmi magnetu či nanočástic. Pokud snížíme  $\tau_{ph}$  (tedy v podstatě čas, který potřebuje magnet k přitažení buněk), zvýší se rychlosť vychytávání a počet vychytaných buněk. Snížení  $\tau_{ph}$  lze dosáhnout například výběrem vhodného magnetu s dostatečnou silou, tvarem a aktivní plochou. Využití magnetů malých velikostí se zachovanými magnetickými parametry by umožnilo snížit  $\tau_{ph}$  a zvýšit rychlosť vychytávání. Výpočty lze prokázat, že zmenšení rozměrů magnetu (například o faktor  $x$ ) se zachováním všech magnetických charakteristik, vede ke zvýšení gradientu magnetického pole faktorem  $x$  (Zablotskii et al., 2010).

Naproti tomu  $\tau_{bio}$  je hůře kontrolovatelná proměnná. Jeden z důležitých faktorů ovlivňujících  $\tau_{bio}$  transplantovaných buněk je například dávka a typ využitých nanočástic. V našich předchozích studiích jsme ukázali, že poly-L-lysinem pokryté SPION k cílení buněk efektivně značí potkaní MSC a viabilita značených buněk neklesá v 1-5 pasáži pod 75% v porovnání s neznačenými buňkami (Horák et al., 2009). Některé studie však poukazují na možné negativní účinky nanočástic na buňky. V nedávné práci (Novotná et al., 2012) bylo u lidských MSC značených SPION detekováno zvýšené oxidativní poškození lipidů, proteinů a

DNA. Nejvhodnější typ a dostatečná bezpečná dávka SPION pro značení buněk a magnetické cílení však dosud nebyla stanovena.

K dosažení maximální efektivity testovaného magnetického systému by měl být magnet odebrán z těla pokusného zvířete nejpozději v čase  $t_0$  (obr. 24). Optimální doba pro odebrání magnetu je definována vzájemným vztahem  $\tau_{ph}$  a  $\tau_{bio}$ . Prodleva v odebrání magnetu může mít za následek snížení počtu zachycených živých buněk v lézi (kvůli odumírání aplikovaných buněk v cílové oblasti) nebo další vychytávání již odumřelých buněk unášených CSF. Cytokiny uvolňované poškozenou míšní tkání také nemohou atrahovat transplantované buňky. Odebráním magnetu ihned po vychytání maximálního počtu buněk je možno maximalizovat počet živých buněk v oblasti léze, které pak mohou mít terapeutický účinek. Znalost a kontrola  $\tau_{ph}$  a  $\tau_{bio}$  časů tak umožnuje zvýšit efektivitu cíleného doručování buněk.

Cheng a spol. (Cheng et al., 2010) ve své práci zabývající se magnetickým cílením buněk do poškozeného myokardu popsali efekt krátkodobé aplikace magnetu na zvýšení koncentrace značených transplantovaných buněk (buněk derivovaných z kardiosfér) v místě ischemie, zabránění odplavení buněk krevním průtokem a zlepšené dlouhodobé přijetí buněčného transplantátu. Ukázali také, že po magnetickém cílení se transplantované buňky podílely na zlepšení myokardiální funkce jak přímo (diferenciací do kardiomyocytů), tak nepřímo parakrinním efektem. Parakrinní efekt, sekreci růstových faktorů, imunomodulační či antiapoptotický efekt lze očekávat i u MSC transplantovaných a cílených do míšního poranění (Uccelli et al., 2011). Jak ukázal ve své práci Sasaki a spol. (Sasaki et al., 2011), po zacílení SPION značených MSC do oblasti míšní léze se vzhledem ke kontrolním zvířatům bez magnetického cílení zvýšila exprese mRNA vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), který se podílí na vaskularizaci míšního poranění a GAP-43, který je tvořen v růstovém vrcholu axonů. Lze předpokládat, že optimalizací cíleného doručování buněk do míšní léze bude možné zvýšit efektivitu transplantace. Jak jsme prokázali v našich experimentech, při využití magnetického cílení buněk je však nutné zohlednit jak fyzikální vlastnosti použitého magnetu, tak i další faktory, které mohou ovlivnit viabilitu a funkci transplantovaných buněk.

### **5.3 Vliv biomodifikace hydrogelu na růst a diferenciaci MSC a NSC *in vitro***

Přemostění postraumatické kavy vhodným materiélem, který podpoří regeneraci poškozené míchy, je jednou z možností léčby míšního poranění. Tento přístup může být obzvláště vhodný v případech chronického míšního poranění, kdy například samotná

transplantace buněk nemusí být dostatečně účinná. Bylo opakován experimentálně ukázáno, že míšní poranění lze přemostit pomocí materiálů na bázi hydrogelů a že tato terapie vede k pozitivním histologickým změnám a ke zlepšení pohyblivosti pokusných zvířat (Syková et al., 2010; Perale et al., 2011). *In vivo* a *in vitro* byly studovány různé hydrogely s různými povrchovými modifikacemi. V našich předchozích studiích se jako velmi efektivní ukázalo využití hydrogelů modifikovaných adhezivní peptidovou sekvencí RGD odvozenou od fibronektinu, proteinu ECM (Hejčl et al., 2010). Proto se i další studie zaměřily na vývoj nových hydrogelů modifikovaných proteiny ECM nebo odvozenými peptidy.

Syntetický superporézní hydrogel na bázi PHEMA, modifikovaný peptidovou sekvencí Ac-CGGASIKAVS-OH obsahující sekvenci IKVAV odvozenou od lamininu, jsme charakterizovali *in vitro* z hlediska jeho biokompatibility, bioadhezivních vlastností a vlivu na diferenciaci neurálních prekurzorů. Modifikovaný hydrogel byl připraven kovalentním navázáním peptidové sekvence na povrch hydrogelu. To je zvláště důležité pro použití materiálu *in vivo*, kde by měl být materiál funkční po dobu měsíců až let. Vazba adhezivních molekul pomocí technik založených na slabých interakcích (např. fyzikální adsorpce, elektrostatické přichycení) totiž často neimobilizuje molekuly na materiálu dostatečně silně, což může vést později k jejich disociaci (Rao et al., 2009).

Kontakt buněk s materiélem probíhá v několika krocích : (1) počáteční zachycení buněk, (2) adheze a rozprostření buňky, (3) organizace aktinového cytoskeletu a (4) vytvoření specifických fokálních kontaktů. Je známo, že mezibuněčné kontakty a kontakty buněk s ECM jsou důležité pro regeneraci tkání (LeBaron et al., 2000). Fyzické rozprostření buněk na substrátu má silný vliv na intracelulární děje v buňce. Buňky, které se rozprostřou na širší plochu pomocí adhezních míst, lépe přežívají a rychleji proliferují než buňky, které nejsou rozprostřené (Chen et al., 1997). Chování buněk ve smyslu viability, migrace, proliferace a diferenciace je významně ovlivněno mírou (rozsahem) jejich adheze na substrát (Bačáková et al., 2004).

Předchozí systematická studie Kubinové a spol. (Kubinová et al., 2009) zabývající se bioadhezivními vlastnostmi hydrogelů na bázi PHEMA ukázala, že se díky porozitě hydrogelu zvyšuje zachycení vysetých buněk na gelu a také, že přítomnost bioadhezivních komponent vede k lepší buněčné adhezi a růstu buněk díky aktivaci integrinových receptorů na povrchu buněk. Integrinová vazebná místa mohou být buď imobilizována na hydrogelu (např. sekvence RGD, SIKVAV) anebo může být spojení integrin-substrát nepřímo zprostředkováno bioadhezivními sérovými proteiny, které se adsorbují na povrch materiálu ze

séra v médiu použitého při kultivaci buněk. Proto je nutné sledovat bodahezivní parametry *in vitro* jak vlivem přítomnosti séra, tak i bez něj.

V souladu s dřívějšími výsledky se MSC po vysazení zachytily na povrchu nemodifikovaného superporézního PHEMA hydrogelu, ale nerozrostly se a zůstaly ve tvaru kuliček. Ve srovnání s PHEMA nemělo zavedení amino, sulfhydrylové nebo dithiopyridinové skupiny signifikantní vliv na počet zachycených buněk na gelu, avšak po zavedení funkčních skupin se signifikantně zlepšil růst buněk (zvětšila se průměrná plocha porostlá buňkami), obzvlášť v přítomnosti séra. Přítomnost sérových proteinů v kultivačním mediu nezvýšila signifikantně počet zachycených buněk, ale byla příčinou zvýšeného růstu buněk na všech studovaných modifikacích hydrogelu, kromě nemodifikované PHEMA. Tato zjištění jsou v souladu s předchozí *in vitro* studií s PHEMA hydrogely modifikovanými cholesterolom, kde se sérové proteiny adsorbovaly na molekuly cholesterolu (Kubinová et al., 2009). To naznačuje, že modifikace PHEMA zavedením AEMA a následné navázání sulfhydrylové a dithiopyridylové skupiny vede k adsorpci integrinových vazebních proteinů ze séra v kultivačním mediu na povrch gelu a tím ke zlepšení růstu buněk.

Zvýšená adheze a růst buněk na Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaném gelu ukazuje, že IKVAV epitop imobilizovaný na PHEMA hydrogelu byl schopen vázat integrinový receptor a efektivně zprostředkovat interakce buněk s povrchem gelu. Vazba integrinů na molekuly ECM je zprostředkována krátkými peptidovými motivy ve struktuře proteinu. Protože izolace či syntéza celých proteinů je obtížná, je výhodnější využít ke zprostředkování adheze buněk tyto specifické peptidové sekvence, které se snadno syntetizují a méně pravděpodobně podléhají sterickým změnám ve srovnání s celými proteiny (Hoehn et al., 2002). Uvádí se, že pokud je povrch modifikován rozšířenou aktivní peptidovou sekvencí (v našem případě rozšířenou o sekvenci CGGA), byla pozorována lepší interakce buněk s materiélem v porovnání s krátkými sekvencemi YIGSR nebo IKVAV, pravděpodobně v důsledku lepší schopnosti napodobit reálnou konformaci lamininu a tedy lepší interakce s integrinovým receptorem na povrchu buněk (Yu et al., 2005). V předchozí studii Kubinové a spol. imobilizace kompletního lamininu na PHEMA hydrogelu nevedla k vyšší adhezi buněk na povrch gelu ani ke zlepšení růstu buněk nebo změně morfologie, pravděpodobně v důsledku nevhodného prostorového uspořádání lamininu po jeho imobilizaci na povrchu PHEMA (Kubinová et al., 2009). Podobně bylo snížení aktivity lamininu po imobilizaci na PEG hydrogel pozorováno i jinými autory (Chung et al., 2008).

Signální molekuly, různé růstové faktory a cytokiny a také struktura a mechanické vlastnosti ECM se přirozeně významným způsobem podílejí na vytváření mikroprostředí

(niky) a na směrování osudu a chování kmenových buněk v CNS (Williams et al., 2009). Napodobování mikroprostředí určující osud buněk, tedy např. využívání bioaktivních materiálů podporujících růst a diferenciaci, je nadějným směrem v oblasti tkáňového inženýrství (Silva et al., 2004; Gunn et al., 2005; Williams et al., 2009). Naše výsledky ukázaly, že kovalentní navázání peptidové sekvence Ac-CGGASIKVAVS-OH na superporézní P(HEMA-AEMA) hydrogel podporuje adhezi, proliferaci a diferenciaci NSC během prvních dvou týdnů kultivace. Kvantitativní analýza, prováděná v průběhu 4 týdenní kultivace, potvrdila podpůrný efekt imobilizované sekvence IKVAV na neurální diferenciaci. Na IKVAV modifikovaném hydrogelu bylo pozorováno větší procentuální zastoupení  $\beta$ -III tubulinu a NF 70 pozitivních buněk v prvních dvou týdnech kultivace a více synaptofyzin-pozitivních, tedy vyzrálejších neurálních buněk (Sarnat et al., 1999) na konci 4 týdne. Je známo, že vyšší exprese  $\beta$ -III tubulinu se nachází u vyvíjejících se a regenerujících neuronů během longitudinálního růstu axonu. Indukce genové exprese NF 70 je zase spojována s radiálním růstem axonu u vyzrávajících neuronů (Hoffman et al., 1988). To odpovídá našim výsledkům ukazujícím snížení množství  $\beta$ -III tubulinu ve vyzrálejších buňkách kultivovaných na IKVAV modifikovaném hydrogelu a zároveň většímu množství vyzrálých synaptofyzin-pozitivních buněk v pozdější fázi kultivace (Tab.2).

Na základě výsledků této *in vitro* studie vlastností Ac-CGGASIKVAVS-OH modifikovaného PHEMA hydrogelu byl připraven hydrogel s orientovanou porozitou a mechanickými vlastnostmi optimalizovanými pro míšní tkáň. Tento hydrogel byl implantován potkanům do míšní hemisekce a transekce. Po osmi týdnech byla pozorována dobrá integrace hydrogelu do míšní tkáně, infiltrace konektivní tkáně a vrůstání neurofilament, Schwannových buněk a cév do pórů gelu (Kubinová et al., 2011b). Dosavadní slibné výsledky dosažené s tímto novým typem hydrogelu budou dále rozvíjeny v preklinických studiích v kombinaci s buněčnou terapií.

## **6 Závěry**

1. SPION pokryté DPA-HA asociátem lze efektivně využít ke značení MSC. Využití asociátu DPA-HA k obalení nanočástic je výhodnější, než využití dílčích molekul HA nebo DPA, protože asociátem obalené částice mají vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, jejich koloidní roztok je stabilní a lze je lépe zobrazit pomocí MR. Tyto částice pronikají dobře do buněk a zároveň vykazují u značených buněk vyšší hodnoty relaxačních poměrů. DPA-HA částice nesnižují viabilitu a proliferaci buněk a neovlivňují chondrogenní diferenciаční potenciál MSC. Navíc, díky volným funkčním skupinám je možné tyto částice využít i k případnému navázání různých molekul.
2. Implantací magnetu jsme dosáhli zacílení a koncentrování SPION značených buněk do oblasti míšní léze. Ukázali jsme, jak implantovaný magnet ovlivňuje distribuci buněk a kinetiku transplantace po intratekálním podání MSC značených SPION. Analyzovali jsme limity jednoduchého magnetického systému založeného na dostupném permanentním magnetu a navrhli jsme zlepšení efektivity magnetického systému modelací tvaru magnetu a magnetického pole.
3. Prokázali jsme výraznou schopnost PHEMA hydrogelu modifikovaného peptidovou sekvencí IKVAV podporovat adhezi a růst MSC. Dále jsme ukázali, že IKVAV modifikace hydrogelu efektivně podporuje růst, adhezi a diferenciaci lidských fetálních neurálních prekurzorů v průběhu prvních dvou týdnů kultivace buněk na hydrogelu.

## 7 Souhrn

Nové přístupy k léčbě míšního poranění využívají pokroku v oblasti nanotechnologií, biomateriálů a transplantace kmenových buněk.

Výsledky prezentované v této práci ukazují, že SPION obalené stabilním iontovým asocioátem dopaminu a hyaluronanu lze využít k bezpečnému a efektivnímu značení MSC. Efektivita značení, viabilita buněk i relaxivita částic byla vyšší ve srovnání s komerčními částicemi Endorem®. Tyto nové částice je tak možné využít k neinvazivnímu monitorování buněčné terapie pomocí MR.

SPION lze také využít k cílenému doručování MSC do místa léze. Značené buňky mohou být koncentrovány v oblasti léze pomocí implantovaného magnetu. Proces cílení buněk závisí na fyzikálních vlastnostech použitého magnetu a dalších biologických faktorech. Účinnost magnetického systému je možné zvýšit například změnou tvaru či velikosti magnetu a tím vyladit magnetickou sílu a gradient magnetického pole pro efektivní cílení buněk.

Slibným terapeutickým přístupem k léčbě míšního poranění je využití hydrogelů a zvláště kombinace hydrogelů a kmenových buněk k přemostění poranění a vytvoření permisivního prostředí pro vrůstání axonů. Imobilizace peptidu Ac-CGGASIKVAVS-OH na povrch superporézního hydrogelu na bázi PHEMA významně zvýšila jeho bioadhezivní vlastnosti a schopnost podporovat diferenciaci a růst lidských fetálních neurálních prekurzorů. Tako modifikovaný hydrogel je velmi atraktivní pro využití nejen v léčbě míšního poranění, ale i v dalších oblastech tkáňového inženýrství.

## 8 Summary

New approaches for the treatment of SCI use advances in the fields of nanotechnology, biomaterial science and cell therapy.

The results presented in this thesis showed that superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with a stable dopamine-hyaluronane associate can be used for the safe and effective labeling of MSC. Cell labeling efficiency, viability and the relaxivity of the tested particles were significantly better than those obtained with the commercial particles Endorem®. The DPA-HA coated nanoparticles can be used for the noninvasive monitoring of cell therapy using MRI.

Furthermore, we showed that SPION can be used for the targeted delivery of MSC to the site of a spinal cord lesion. The labeled cells can be concentrated in the lesion area by means of a magnetic implant. The process of cell targeting depends on the physical characteristics of the magnetic implant as well as on the biological features of the cells and nanoparticles, as we described with a proposed mathematical model. It is possible to modify the properties of the magnetic system, e.g. by changing the shape or size of the magnet, thus tuning the magnetic force distribution and the gradient of the magnetic field necessary for effective cell targeting.

A promising therapeutic strategy for the treatment of spinal cord injury is the use of hydrogels, which can be used to bridge a spinal cord lesion either alone or in combination with stem cells. We showed that the bioadhesive properties of a superporous hydrogel based on PHEMA can be significantly improved by the covalent immobilization of Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide on the surface of the hydrogel. The modified hydrogel also supports the differentiation and growth of neural precursors. The Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified PHEMA hydrogel is thus an attractive candidate for further application in neural tissue engineering.

## 9 Literatura

- Abnet K, Fawcett JW, Dunnett SB. Interactions between meningeal cells and astrocytes in vivo and in vitro. *Brain Res Dev Brain Res.* 1991; 59(2):187-196.
- Amemori T, Romanyuk N, Jendelová P, Herynek V, Turnovcová K, Mareková D, Kapcalová M, Price J, Syková E. Human fetal spinal stem cells improve locomotion function after spinal cord injury in rat. *Glia.* 2011; 59(S1):S42-S154.
- Arbab AS, Jordan EK, Wilson LB, Yocum GT, Lewis BK, Frank JA. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. *Hum Gene Ther.* 2004; 15(4):351-360.
- Arboleda D, Forostyak S, Jendelová P, Mareková D, Amemori T, Pivoňková H, Mašínová K, Syková E. Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol.* 2011; 31(7):1113-1122.
- Atzet S, Curtin S, Trinh P, Bryant S, Ratner B. Degradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-polycaprolactone hydrogels for tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules.* 2008; 9(12):3370-3377.
- Babič M, Horák D, Jendelová P, Herynek V, Prokš V, Vaněček V, Lesný P, Syková E. The use of dopamine-hyaluronate associate-coated maghemite nanoparticles to label cells. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7:1461-1474.
- Babič M, Horák D, Trchová M, Jendelová P, Glogarová K, Lesný P, Herynek V, Hájek M, Syková E. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem.* 2008; 19(3):740-750.
- Babič M, Horák D, Jendelová P, Glogarová K, Herynek V, Trchová M, Likavčanová K, Lesný P, Pollert E, Hájek M, Syková E. Poly(N,N-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem.* 2009; 20(2):283-294.
- Bačáková L, Filová E, Rypáček F, Svorčík V, Starý V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res.* 2004; 53 Suppl 1:S35-45.
- Bamber NI, Li H, Lu X, Oudega M, Aebischer P, Xu XM. Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cell-seeded mini-channels. *Eur J Neurosci.* 2001; 13(2):257-268.
- Ban DX, Ning GZ, Feng SQ, Wang Y, Zhou XH, Liu Y, Chen JT. Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells: the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats. *Regen Med.* 2011; 6(6):707-720.
- Barnabe-Heider F, Frisen J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell.* 2008; 3(1):16-24.
- Barnett SC, Chang L. Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend? *Trends Neurosci.* 2004; 27(1):54-60.
- 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(1-2):177-186.
- Bernsen MR, Moelker AD, Wielopolski PA, van Tiel ST, Krestin GP. Labelling of mammalian cells for visualisation by MRI. *Eur Radiol.* 2010; 20(2):255-274.
- Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis AS. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials.* 2004; 25(23):5405-5413.
- Bethéa JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loor K, Green J, Dietrich WD. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 1999; 16(10):851-863.

- Biancone L, Crich SG, Cantaluppi V, Romanazzi GM, Russo S, Scalabrino E, Esposito G, Figliolini F, Beltramo S, Perin PC, Segoloni GP, Aime S, Camussi G. Magnetic resonance imaging of gadolinium-labeled pancreatic islets for experimental transplantation. *NMR Biomed.* 2007; 20(1):40-48.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Ishiguro T, Okumura M, Iwanaga T, Kadosawa T, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol.* 2004; 32(5):502-509.
- 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., Piepmeyer 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(20):1597-1604.
- 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(6881):636-640.
- 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(1):3-16.
- Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* 2004; 17(7):484-499.
- Burgess A, Ayala-Grosso CA, Ganguly M, Jordao JF, Aubert I, Hynynen K. Targeted delivery of neural stem cells to the brain using MRI-guided focused ultrasound to disrupt the blood-brain barrier. *PLoS One.* 2011; 6(11):e27877.
- Cai J, Ziembka KS, Smith GM, Jin Y. Evaluation of cellular organization and axonal regeneration through linear PLA foam implants in acute and chronic spinal cord injury. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 83(2):512-520.
- Cattaneo E, McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature.* 1990; 347(6295):762-765.
- Courtney P, Samdani AF, Betz RR, Fischer I, Neuhuber B. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009; 34(4):328-334.
- Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol.* 1992; 116(4):1055-1062.
- Denker HW. Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. *J Med Ethics.* 2006; 32(11):665-671.
- Diez Villanueva P, Sanz-Ruiz R, Nunez Garcia A, Fernandez Santos ME, Sanchez PL, Fernandez-Aviles F. Functional multipotency of stem cells: what do we need from them in the heart? *Stem Cells Int.* 2012; 2012:817364.
- Ditunno JF, Little JW, Tessler A, Burns AS. Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord.* 2004; 42(7):383-395.
- Doležal J. Traumatická léze míšní. *Urologie pro praxi.* 2004; 4:146-155.
- Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 1993; 54(1):15-36.
- Edgerton VR, Kim SJ, Ichiyama RM, Gerasimenko YP, Roy RR. Rehabilitative therapies after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2006; 23(3-4):560-570.
- Einstein O, Ben-Hur T. The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases. *Arch Neurol.* 2008; 65(4):452-456.

- Farrell E, Wielopolski P, Pavljasevic P, van Tiel S, Jahr H, Verhaar J, Weinans H, Krestin G, O'Brien FJ, van Osch G, Bernsen M. Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369(4):1076-1081.
- Faulkner J, Keirstead HS. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injury. *Transpl Immunol.* 2005; 15(2):131-142.
- Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999; 49(6):377-391.
- Ferreira L. Nanoparticles as tools to study and control stem cells. *J Cell Biochem.* 2009; 108(4):746-752.
- Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billinghamurst LL, Jendoubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, Snyder EY. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(11):1033-1039.
- Forostyak S, Jendelová P, Kapcalová M, Arboleda D, Syková E. Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cyotherapy.* 2011; 13(9):1036-1046.
- Fouad K, Klusman I, Schwab ME. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *Eur J Neurosci.* 2004; 20(9):2479-2482.
- Fouad K, Schnell L, Bunge MB, Schwab ME, Liebscher T, Pearse DD. Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci.* 2005; 25(5):1169-1178.
- Franco Lambert AP, Fraga Zandonai A, Bonatto D, Cantarelli Machado D, Pegas Henriques JA. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation.* 2009; 77(3):221-228.
- Frankel RB, Papaefthymiou GC, Watt GD. Variation of Superparamagnetic Properties with Iron Loading in Mammalian Ferritin. *Hyperfine Interactions.* 1991; 66(1-4):71-82.
- Franklin RJ, Barnett SC. Do olfactory glia have advantages over Schwann cells for CNS repair? *J Neurosci Res.* 1997; 50(5):665-672.
- Franssen EH, de Bree FM, Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev.* 2007; 56(1):236-258.
- Frasca G, Gazeau F, Wilhelm C. Formation of a three-dimensional multicellular assembly using magnetic patterning. *Langmuir.* 2009; 25(4):2348-2354.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974; 17(4):331-340.
- Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, Tsujimura K, Sanosaka T, Juliandi B, Semi K, Namihira M, Komiya S, Smith A, Nakashima K. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells.* 2012; 30(6):1163-1173.
- Green BA, Kahn T, Klose KJ. A comparative study of steroid therapy in acute experimental spinal cord injury. *Surg Neurol.* 1980; 13(2):91-97.
- Gu J, Xu H, Han Y, Dai W, Hao W, Wang C, Gu N, Xu H, Cao J. The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. *Sci China Life Sci.* 2011; 54(9):793-805.

- Gunn JW, Turner SD, Mann BK. Adhesive and mechanical properties of hydrogels influence neurite extension. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 72(1):91-97.
- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005; 26(18):3995-4021.
- Gurudutta GU, Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Tripathi RP. Stem cell therapy: a novel & futuristic treatment modality for disaster injuries. *Indian J Med Res*. 2012; 135:15-25.
- Hafeli UO. Magnetically modulated therapeutic systems. *Int J Pharm*. 2004; 277(1-2):19-24.
- Hamasaki T, Tanaka N, Ishida O, Yanada S, Kamei N, Fujiwara Y, Nishida K, Nakanishi K, Sharman P, Kawamata S, Ochi M. Characterization of labeled neural progenitor cells for magnetic targeting. *Neuroreport*. 2005; 16(15):1641-1645.
- Hamasaki T, Tanaka N, Kamei N, Ishida O, Yanada S, Nakanishi K, Nishida K, Oishi Y, Kawamata S, Sakai N, Ochi M. Magnetically labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote axon growth in organotypic cocultures. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007; 32(21):2300-2305.
- Hatch GP, Stelter RE. Magnetic design considerations for devices and particles used for biological high-gradient magnetic separation (HGMS) systems. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2001; 225(1-2):262-276.
- Hejčl A, Jendelová P, Syková E. Experimental reconstruction of the injured spinal cord. *Adv Tech Stand Neurosurg*. 2011; 37:65-95.
- Hejčl A, Lesný P, Přádný M, Michálek J, Jendelová P, Štulík J, Syková E. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol Res*. 2008a; 57 Suppl 3:S121-132.
- Hejčl A, Urdzíková L, Šedý J, Lesný P, Přádný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Zámečník J, Jendelová P, Syková E. Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine*. 2008b; 8(1):67-73.
- Hejčl A, Šedý J, Kapcalová M, Toro DA, Amemori T, Lesný P, Likavčanová-Mašínová K, Krumbholcová E, Přádný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Jendelová P, Syková E. HPMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. 2010; 19(10):1535-1546.
- Henning TD, Sutton EJ, Kim A, Golovko D, Horvai A, Ackerman L, Sennino B, McDonald D, Lotz J, Daldrup-Link HE. The influence of ferucarbotran on the chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Contrast Media Mol Imaging*. 2009; 4(4):165-173.
- Hill CE, Moon LD, Wood PM, Bunge MB. Labeled Schwann cell transplantation: cell loss, host Schwann cell replacement, and strategies to enhance survival. *Glia*. 2006; 53(3):338-343.
- Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S, Focking M, Arnold H, Hescheler J, Fleischmann BK, Schwindt W, Buhrlé C. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(25):16267-16272.
- Hoffman PN. Expression of GAP-43, a rapidly transported growth-associated protein, and class II beta tubulin, a slowly transported cytoskeletal protein, are coordinated in regenerating neurons. *J Neurosci*. 1989; 9(3):893-897.
- Hoffman PN, Cleveland DW. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85(12):4530-4533.
- Holáň V, Chudičková M, Trošan P, Svobodová E, Krulová M, Kubinová Š, Syková E, Sirc J, Michálek J, Jukličková M, Munzarová M, Zajícová A. Cyclosporine A-loaded and

- stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *J Control Release*. 2011; 156(3):406-412.
- Hong HS, Lee J, Lee E, Kwon YS, Lee E, Ahn W, Jiang MH, Kim JC, Son Y. A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29(+) stromal-like cells. *Nat Med*. 2009; 15(4):425-435.
- Horák D, Babič M, Macková H, Beneš MJ. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *J Sep Sci*. 2007a; 30(11):1751-1772.
- Horák D, Babič M, Jendelová P, Herynek V. Multifunctional magnetic nanoparticles for cell imaging. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 2011; 40:228-228.
- Horák D, Babič M, Jendelová P, Herynek V, Trchová M, Pientka Z, Pollert E, Hájek M, Syková E. D-mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem*. 2007b; 18(3):635-644.
- Horák D, Babič M, Jendelová P, Herynek V, Trchová M, Likavčanová K, Kapcalová M, Hájek M, Syková E. Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009; 321(10):1539-1547.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 2000; 20(6):2218-2228.
- Huang DM, Hsiao JK, Chen YC, Chien LY, Yao M, Chen YK, Ko BS, Hsu SC, Tai LA, Cheng HY, Wang SW, Yang CS, Chen YC. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2009; 30(22):3645-3651.
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*. 2008; 26(11):1269-1275.
- Hudson JE, Chen N, Song S, Walczak P, Jendelova P, Sykova E, Willing AE, Saporta S, Bickford P, Sanchez-Ramos J, Zigova T. Green fluorescent protein bone marrow cells express hematopoietic and neural antigens in culture and migrate within the neonatal rat brain. *J Neurosci Res*. 2004; 76(2):255-264.
- Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ*. 2002; 26(1-4):238-255.
- Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*. 2000; 93(1 Suppl):1-7.
- Huvanees S, Danen EH. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*. 2009; 122(Pt 8):1059-1069.
- Chau CH, Shum DK, Li H, Pei J, Lui YY, Wirthlin L, Chan YS, Xu XM. Chondroitinase ABC enhances axonal regrowth through Schwann cell-seeded guidance channels after spinal cord injury. *FASEB J*. 2004; 18(1):194-196.
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science*. 1997; 276(5317):1425-1428.
- Cheng K, Li TS, Malliaras K, Davis DR, Zhang Y, Marban E. Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circ Res*. 2010; 106(10):1570-1581.
- Christensen MD, Hulsebosch CE. Chronic central pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1997; 14(8):517-537.
- Chung IM, Enemchukwu NO, Khaja SD, Murthy N, Mantalaris A, Garcia AJ. Bioadhesive hydrogel microenvironments to modulate epithelial morphogenesis. *Biomaterials*. 2008; 29(17):2637-2645.

- Inoue M, Honmou O, Oka S, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia*. 2003; 44(2):111-118.
- Ishida O, Tanaka Y, Morimoto I, Takigawa M, Eto S. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *J Bone Miner Res*. 1997; 12(10):1657-1663.
- Ittrich H, Lange C, Togel F, Zander AR, Dahnke H, Westenfelder C, Adam G, Nolte-Ernsting C. In vivo magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: detection and monitoring at 3T. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 25(6):1179-1191.
- Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Yamasaki M, Momoshima S, Ishii H, Ando K, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res*. 2005; 80(2):182-190.
- Jendelová P, Kozubenko N, Amemori T, Turnovcová K, Seminatore C, Jirák D, Onteniente B, Syková E. The Use of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Precursors in the Treatment of Brain and Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*. 2011; 20(4):564-564.
- Jendelová P, Herynek V, Urdziková L, Glogarová K, Kroupová J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hájek 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(2):232-243.
- Jessen KR, Mirsky R. Control of Schwann cell myelination. *F1000 Biol Rep*. 2010; 2.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999; 96(1):25-34.
- Johnson PJ, Tatara A, Shiu A, Sakiyama-Elbert SE. Controlled release of neurotrophin-3 and platelet-derived growth factor from fibrin scaffolds containing neural progenitor cells enhances survival and differentiation into neurons in a subacute model of SCI. *Cell Transplant*. 2010; 19(1):89-101.
- Jucker M, Kleinman HK, Ingram DK. Fetal rat septal cells adhere to and extend processes on basement membrane, laminin, and a synthetic peptide from the laminin A chain sequence. *J Neurosci Res*. 1991; 28(4):507-517.
- Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009; 458(7239):771-775.
- Kakulas BA. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2004; 42(10):549-563.
- 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(13):3377-3389.
- Karumbayaram S, Novitch BG, Patterson M, Umbach JA, Richter L, Lindgren A, Conway AE, Clark AT, Goldman SA, Plath K, Wiedau-Pazos M, Kornblum HI, Lowry WE. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells*. 2009; 27(4):806-811.
- Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2005; 25(19):4694-4705.
- Kennea NL, Waddington SN, Chan J, O'Donoghue K, Yeung D, Taylor DL, Al-Allaf FA, Pirianov G, Themis M, Edwards AD, Fisk NM, Mehmet H. Differentiation of human

- fetal mesenchymal stem cells into cells with an oligodendrocyte phenotype. *Cell Cycle.* 2009; 8(7):1069-1079.
- Kim GM, Xu J, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G, Xu XM, Hsu CY. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci.* 2001; 21(17):6617-6625.
- Kirschstein R, Skirboll L. Stem cells:Scientific progress and future research directions. NIH. 2001:1-41.
- Klussmann S, Martin-Villalba A. Molecular targets in spinal cord injury. *J Mol Med (Berl).* 2005; 83(9):657-671.
- Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed.* 2004; 17(7):513-517.
- Kozubenko N, Turnovcová K, Kapcalová M, Butenko O, Anděrová M, Rusnaková V, Kubišta M, Hampl A, Jendelová P, Syková E. Analysis of in vitro and in vivo characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Transplant.* 2010; 19(4):471-486.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996; 19(8):312-318.
- Kubinová Š, Syková E. Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2010a; 19(3):144-156.
- Kubinová Š, Syková E. Nanotechnology for treatment of stroke and spinal cord injury. *SO - Nanomedicine (Lond)* 2010 Jan;5(1):99-108. 2010b; 5(1).
- Kubinová Š, Syková E. Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury. *Regen Med.* 2012; 7(2):207-224.
- Kubinová Š, Horák D, Syková E. Cholesterol-modified superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2009; 30(27):4601-4609.
- Kubinová Š, Horák D, Hejčl A, Plichta Z, Kotek J, Syková E. Highly superporous cholesterol-modified poly(2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for spinal cord injury repair. *J Biomed Mater Res A.* 2011a; 99(4):618-629.
- Kubinová Š, Horák D, Kozubenko N, Vaněček V, Prokš V, Price J, Cocks G, Syková E. The use of superporous Ac-CGGASIKVAWS-OH-modified PHEMA scaffolds to promote cell adhesion and the differentiation of human fetal neural precursors. *Biomaterials.* 2010c; 31(23):5966-5975.
- Kubinová Š, Forostyak S, Hejčl A, Baranovičová L, Horák D, Plichta Z, Prokš V, Syková E. Sikvav-modified poly(2-hydroxyethylmethacrylate) hydrogel scaffolds with oriented channels for spinal cord injury treatment. *Histol Histopathol.* 2011b; 26(Supplement1).
- Kumamaru H, Ohkawa Y, Saiwai H, Yamada H, Kubota K, Kobayakawa K, Akashi K, Okano H, Iwamoto Y, Okada S. Direct isolation and RNA-seq reveal environment-dependent properties of engrafted neural stem/progenitor cells. *Nat Commun.* 2012; 3:1140.
- Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.* 2004; 4(4):451-464.
- Kyrtatos PG, Lehtolainen P, Junemann-Ramirez M, Garcia-Prieto A, Price AN, Martin JF, Gadian DG, Pankhurst QA, Lythgoe MF. Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009; 2(8):794-802.
- Lakatos A, Barnett SC, Franklin RJ. Olfactory ensheathing cells induce less host astrocyte response and chondroitin sulphate proteoglycan expression than Schwann cells

- following transplantation into adult CNS white matter. *Exp Neurol.* 2003; 184(1):237-246.
- LeBaron RG, Athanasiou KA. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials. *Tissue Eng.* 2000; 6(2):85-103.
- Lee Y, Lee H, Kim YB, Kim J, Hyeon T, Park H, Messersmith PB, Park TG. Bioinspired Surface Immobilization of Hyaluronic Acid on Monodisperse Magnetite Nanocrystals for Targeted Cancer Imaging. *Adv Mater.* 2008; 20(21):4154-4157.
- Lesný P, Přádný 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(9):829-833.
- Lesný P, De Croos J, Přádný M, Vacík J, Michálek J, Woerly S, Syková E. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. *J Chem Neuroanat.* 2002; 23(4):243-247.
- Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klöpsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lutzow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells.* 2007; 25(8):2118-2127.
- Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:399-421.
- Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J.* 2008; 3(9-10):1172-1184.
- Lindvall O. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res.* 2003; 47(4):279-287.
- Lu CW, Hung Y, Hsiao JK, Yao M, Chung TH, Lin YS, Wu SH, Hsu SC, Liu HM, Mou CY, Yang CS, Huang DM, Chen YC. Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling. *Nano Lett.* 2007; 7(1):149-154.
- Lu Z, Hu X, Zhu C, Wang D, Zheng X, Liu Q. Overexpression of CNTF in Mesenchymal Stem Cells reduces demyelination and induces clinical recovery in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neuroimmunol.* 2009; 206(1-2):58-69.
- Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997; 23(1-2):1-27.
- Lukovic D, Moreno Manzano V, Stojkovic M, Bhattacharya SS, Erceg S. Concise review: human pluripotent stem cells in the treatment of spinal cord injury. *Stem Cells.* 2012; 30(9):1787-1792.
- Macas J, Nern C, Plate KH, Momma S. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci.* 2006; 26(50):13114-13119.
- Martin D, Schoenen J, Delree P, Rigo JM, Rogister B, Leprince P, Moonen G. Syngeneic grafting of adult rat DRG-derived Schwann cells to the injured spinal cord. *Brain Res Bull.* 1993; 30(3-4):507-514.
- Martins A, Araujo JV, Reis RL, Neves NM. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomedicine (Lond).* 2007; 2(6):929-942.
- McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. *Lancet.* 2002a; 359(9304):417-425.
- McDonald JW, Belegu V. Demyelination and remyelination after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2006; 23(3-4):345-359.
- McDonald JW, Becker D, Sadowsky CL, Jane JA, Sr., Conturo TE, Schultz LM. Late recovery following spinal cord injury. Case report and review of the literature. *J Neurosurg.* 2002b; 97(2 Suppl):252-265.

- 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(12):1410-1412.
- Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisen J. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* 2008; 6(7):e182.
- Menezes K, de Menezes JR, Nascimento MA, Santos Rde S, Coelho-Sampaio T. Polylaminin, a polymeric form of laminin, promotes regeneration after spinal cord injury. *FASEB J.* 2010; 24(11):4513-4522.
- Mičková A, Buzgo M, Benada O, Rampichová M, Fišar Z, Filová E, Tesarová M, Lukáš D, Amler E. Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules.* 2012; 13(4):952-962.
- Mothe AJ, Tator CH. Transplanted neural stem/progenitor cells generate myelinating oligodendrocytes and Schwann cells in spinal cord demyelination and dysmyelination. *Exp Neurol.* 2008; 213(1):176-190.
- Mothe AJ, Bozkurt G, Catapano J, Zabojova J, Wang X, Keating A, Tator CH. Intrathecal transplantation of stem cells by lumbar puncture for thoracic spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord.* 2011; 49(9):967-973.
- Murugan R, Ramakrishna S. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Eng.* 2007; 13(8):1845-1866.
- Nesathurai S. Steroids and spinal cord injury: revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. *J Trauma.* 1998; 45(6):1088-1093.
- Neshati Z, Matin MM, Bahrami AR, Moghimi A. Differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells and their impact on type 1 diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 2010; 66(2):181-187.
- Ng CK, Handley CJ, Preston BN, Robinson HC, Bolis S, Parker G. Effect of exogenous hyaluronan and hyaluronan oligosaccharides on hyaluronan and aggrecan synthesis and catabolism in adult articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 316(1):596-606.
- Nguyen EH, Schwartz MP, Murphy WL. Biomimetic approaches to control soluble concentration gradients in biomaterials. *Macromol Biosci.* 2011; 11(4):483-492.
- Nishida K, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Hamasaki T, Yanada S, Mochizuki Y, Ochi M. Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid. *Neuroreport.* 2006; 17(12):1269-1272.
- Novotná B, Jendelová P, Kapcalová M, Rossner P, Jr., Turnovcová K, Bagryantseva Y, Babič M, Horák D, Syková E. Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2012; 210(1):53-63.
- O'Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. *Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2004; 18(6):853-875.
- Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res.* 2002; 69(6):925-933.
- Osaka M, Honmou O, Murakami T, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.* 2010; 1343:226-235.
- Oudega M. Schwann cell and olfactory ensheathing cell implantation for repair of the contused spinal cord. *Acta Physiol (Oxf).* 2007; 189(2):181-189.

- Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011; 71(2):281-299.
- Pal R, Gopinath C, Rao NM, Banerjee P, Krishnamoorthy V, Venkataramana NK, Tote S. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Cyotherapy*. 2010; 12(6):792-806.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*. 2003; 36(13):R167-R181.
- Paramore CG, Turner DA, Madison RD. Fluorescent labeling of dissociated fetal cells for tissue culture. *J Neurosci Methods*. 1992; 44(1):7-17.
- Park H, Cannizzaro C, Vunjak-Novakovic G, Langer R, Vacanti CA, Farokhzad OC. Nanofabrication and microfabrication of functional materials for tissue engineering. *Tissue Eng*. 2007; 13(8):1867-1877.
- Parkinson DB, Bhaskaran A, Arthur-Farraj P, Noon LA, Woodhoo A, Lloyd AC, Feltri ML, Wrabetz L, Behrens A, Mirsky R, Jessen KR. c-Jun is a negative regulator of myelination. *J Cell Biol*. 2008; 181(4):625-637.
- Perale G, Rossi F, Sundstrom E, Bacchigia S, Masi M, Forloni G, Veglianese P. Hydrogels in spinal cord injury repair strategies. *ACS Chem Neurosci*. 2011; 2(7):336-345.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411):143-147.
- Plant GW, Bates ML, Bunge MB. Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral Schwann cell graft-transsected spinal cord interface. *Mol Cell Neurosci*. 2001; 17(3):471-487.
- Polentes J, Jendelová P, Cailleret M, Braun H, Romanyuk N, Tropel P, Brenot M, Itier V, Seminatore C, Baldauf K, Turnovcová K, Jirák D, Teletin M, Come J, Tournois J, Reymann K, Syková E, Viville S, Onteniente B. Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. *Cell Transplant*. 2012a.
- Polentes J, Jendelová P, Cailleret M, Braun H, Romanyuk N, Tropel P, Brenot M, Itier V, Seminatore C, Baldauf K, Turnovcová K, Jirák D, Teletin M, Come J, Tournois J, Reymann K, Syková E, Viville S, Onteniente B. Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. *Cell Transplant*. 2012b.
- 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(1):143-155.
- Polyak B, Fishbein I, Chorny M, Alferiev I, Williams D, Yellen B, Friedman G, Levy RJ. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of stent stents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105(2):698-703.
- Poulsom R. CD44 and hyaluronan help mesenchymal stem cells move to a neighborhood in need of regeneration. *Kidney Int*. 2007; 72(4):389-390.
- Prang P, Muller 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(19):3560-3569.
- Přádný M, Lesný P, Martinová L, Michálek J, Syková E. Nonwoven polymeric nanofiber scaffolds utilizable for spinal cord injury repair. *Drugs of the Future*. 2007; 32:67-67.

- Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, Sid S, Schoenen J, Franzen R. Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. *PLoS One*. 2012; 7(6):e39500.
- Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(4):263-273.
- Rao SS, Winter JO. Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Front Neuroeng*. 2009; 2:6.
- Riegler J, Allain B, Cook RJ, Lythgoe MF, Pankhurst QA. Magnetically assisted delivery of cells using a magnetic resonance imaging system. *Journal of Physics D-Applied Physics*. 2011; 44(5).
- Riegler J, Wells JA, Kyrtatos PG, Price AN, Pankhurst QA, Lythgoe MF. Targeted magnetic delivery and tracking of cells using a magnetic resonance imaging system. *Biomaterials*. 2010; 31(20):5366-5371.
- Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, Bush KM, Chan V, Knoepfler PS. Induced Pluripotency and Oncogenic Transformation Are Related Processes. *Stem Cells Dev*. 2012.
- Ronsyn MW, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Jorens PG, Ponsaerts P. Can cell therapy heal a spinal cord injury? *Spinal Cord*. 2008; 46(8):532-539.
- Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*. 2008; 25(5):E2.
- Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2012; 235(1):78-90.
- Sahni V, Kessler JA. Stem cell therapies for spinal cord injury. *Nat Rev Neurol*. 2010; 6(7):363-372.
- Salewski RP, Eftekharpour E, Fehlings MG. Are induced pluripotent stem cells the future of cell-based regenerative therapies for spinal cord injury? *J Cell Physiol*. 2010; 222(3):515-521.
- Salgado-Ceballos H, Guizar-Sahagun G, Feria-Velasco A, Grijalva I, Espitia L, Ibarra A, Madrazo I. Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats. *Brain Res*. 1998; 782(1-2):126-135.
- Sarnat HB, Born DE. Synaptophysin immunocytochemistry with thermal intensification: a marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system. *Brain Dev*. 1999; 21(1):41-50.
- Sarwar A, Nemirovski A, Shapiro B. Optimal Halbach permanent magnet designs for maximally pulling and pushing nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2012; 324(5):742-754.
- Sasaki H, Tanaka N, Nakanishi K, Nishida K, Hamasaki T, Yamada K, Ochi M. Therapeutic effects with magnetic targeting of bone marrow stromal cells in a rat spinal cord injury model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011; 36(12):933-938.
- Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004; 29(18):1971-1979.
- Shimizu K, Ito A, Honda H. Enhanced cell-seeding into 3D porous scaffolds by use of magnetite nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006; 77(2):265-272.
- Shimizu K, Ito A, Arinobe M, Murase Y, Iwata Y, Narita Y, Kagami H, Ueda M, Honda H. Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering. *J Biosci Bioeng*. 2007; 103(5):472-478.
- Schafer R, Bantleon R, Kehlbach R, Siegel G, Wiskirchen J, Wolburg H, Kluba T, Eibofner F, Northoff H, Claussen CD, Schlemmer HP. Functional investigations on human

- mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles. *Bmc Cell Biology*. 2010; 11.
- Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature*. 1990; 343(6255):269-272.
- Schutze N, Noth U, Schneidereit J, Hendrich C, Jakob F. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun Signal*. 2005; 3(1):5.
- Silva GA, Czeisler C, Niece KL, Beniash E, Harrington DA, Kessler JA, Stupp SI. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science*. 2004; 303(5662):1352-1355.
- Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*. 2010; 1.
- Singh S, Nalwa HS. Nanotechnology and health safety--toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007; 7(9):3048-3070.
- Skalníková H, Motlík J, Gadher SJ, Kovářová H. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. *Proteomics*. 2011; 11(4):691-708.
- Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, Toma JS, Rafuse VF, Woolf CJ, Eggan K. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell*. 2011; 9(3):205-218.
- Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci*. 2009; 16:108.
- Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Hayes A, Bellantuono I, Aebischer P, Svendsen CN. Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol Ther*. 2008; 16(12):2002-2010.
- Syková E. Pokroky v transplantacích a výzkumu kmenových buněk. *Bulletin HPB*. 2001; 9:4-9.
- 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.
- Syková E, Jendelová P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS. *Cell Death Differ*. 2007a; 14(7):1336-1342.
- Syková E, Jendelová P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2007b; 161:367-383.
- Syková E, Jendelová P, Herynek V. MR tracking of stem cells in living recipients. *Methods Mol Biol*. 2009; 549:197-215.
- Syková E, Jendelová P, Herynek V. Magnetic resonance imaging of stem cell migration. *Methods Mol Biol*. 2011; 750:79-90.
- Syková E, Jendelová P, Urdziková L, Lesný P, Hejčl A. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels--two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol*. 2006a; 26(7-8):1113-1129.
- Syková E, Jendelová P, Hejčl A, Kozubenko N, Amemori T. Stem Cells and Hydrogel Bridges for the Treatment of Acute and Chronic Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*. 2010; 19(3):366-366.
- Syková E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konrádová SL, Kobylka P, Padr R, Neuwirth J, Komrska V, Vávra V, Štulík J, Bojar M. Autologous bone marrow

- transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2006b; 15(8-9):675-687.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4):663-676.
- Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol.* 1998; 56(3):341-358.
- Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Yamada Y. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 1989; 264(27):16174-16182.
- Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* 1991; 75(1):15-26.
- Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1997; 86(3):483-492.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282(5391):1145-1147.
- Thorek DL, Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials.* 2008; 29(26):3583-3590.
- Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(8):628-643.
- Tropel P, Platet N, Platet JC, Noel D, Albrieux M, Benabid AL, Berger F. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006; 24(12):2868-2876.
- Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011; 24(1):59-64.
- Urdzíková 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(9):1379-1391.
- Urdzíková L, Likavčanová-Mašínová K, Vaněček V, Růžička J, Šedý J, Syková E, Jendelová P. Flt3 ligand synergizes with granulocyte-colony-stimulating factor in bone marrow mobilization to improve functional outcome after spinal cord injury in the rat. *Cyotherapy.* 2011; 13(9):1090-1104.
- Usvald D, Vodicka P, Hlucilova J, Prochazka R, Motlik J, Kuchorova K, Johe K, Marsala S, Scadeng M, Kakinohana O, Navarro R, Santa M, Hefferan MP, Yaksh TL, Marsala M. Analysis of dosing regimen and reproducibility of intraspinal grafting of human spinal stem cells in immunosuppressed minipigs. *Cell Transplant.* 2010; 19(9):1103-1122.
- Vachon E, Martin R, Plumb J, Kwok V, Vandivier RW, Glogauer M, Kapus A, Wang X, Chow CW, Grinstein S, Downey GP. CD44 is a phagocytic receptor. *Blood.* 2006; 107(10):4149-4158.
- van Buul GM, Kotek G, Wielopolski PA, Farrell E, Bos PK, Weinans H, Grohnert AU, Jahr H, Verhaar JA, Krestin GP, van Osch GJ, Bernsen MR. Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides. *PLoS One.* 2011; 6(2):e17001.
- Vaněček V, Zablotskii V, Forostyak S, Růžička J, Herynek V, Babič M, Jendelová P, Kubinová Š, Dejneca A, Syková E. Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7:3719-3730.

- Vanický I, Urdzíková L, Saganová K, Čížková D, Gálik J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma*. 2001; 18(12):1399-1407.
- Vaverka M, Hrabálek L. Míšní poranění - doporučené postupy pro praktické lékaře. CLS JEP. 2002;1-8.
- Vessal M, Aycock A, Garton MT, Ciferri M, Darian-Smith C. Adult neurogenesis in primate and rodent spinal cord: comparing a cervical dorsal rhizotomy with a dorsal column transection. *Eur J Neurosci*. 2007; 26(10):2777-2794.
- von der Mark K, Park J, Bauer S, Schmuki P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*. 2010; 339(1):131-153.
- Wagner J, Kean T, Young R, Dennis JE, Caplan AI. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr Opin Biotechnol*. 2009; 20(5):531-536.
- Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2012; 7:3445-3471.
- Walker PA, Shah SK, Harting MT, Cox CS, Jr. Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation. *Dis Model Mech*. 2009; 2(1-2):23-38.
- Wang L, Li Y, Chen J, Gautam SC, Zhang Z, Lu M, Chopp M. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol*. 2002; 30(7):831-836.
- Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol*. 2001; 11(11):2319-2331.
- Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(6):467-477.
- Wescoe KE, Schugar RC, Chu CR, Deasy BM. The role of the biochemical and biophysical environment in chondrogenic stem cell differentiation assays and cartilage tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*. 2008; 52(2):85-102.
- Wichterle O, Lim D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*. 1960; 185(4706):117-118.
- Williams CA, Lavik EB. Engineering the CNS stem cell microenvironment. *Regen Med*. 2009; 4(6):865-877.
- 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(4):245-255.
- Woerly S, Petrov P, Sykova E, Roitbak T, Simonova 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(5):467-488.
- Woodward RC, Heeris J, St. Pierre TG, Saunders M, Gilbert EP, Rutnakornpituk M, Zhang Q, Riffle JS. A comparison of methods for the measurement of the particle-size distribution of magnetic nanoparticles. *Journal of Applied Crystallography*. 2007; 40(s1):s495-s500.
- Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol*. 1995; 351(1):145-160.
- Xu XM, Chen A, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB. Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J Neurocytol*. 1997; 26(1):1-16.
- Yamada KM, Pankov R, Cukierman E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(8):959-966.

- Yamamoto SI, Okada T, Uraoka Y, Yamashita I, Hasegawa S. Static and dynamic observation of supermolecular protein, ferritin, using high-speed atomic force microscope. *Journal of Applied Physics*. 2011; 109(3).
- Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009; 137(1):13-17.
- Yan P, Li Q, Kim GM, Xu J, Hsu CY, Xu XM. Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma*. 2001; 18(5):563-568.
- Yanai A, Hafeli UO, Metcalfe AL, Soema P, Addo L, Gregory-Evans CY, Po K, Shan X, Moritz OL, Gregory-Evans K. Focused magnetic stem cell targeting to the retina using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cell Transplant*. 2012.
- Yang CY, Tai MF, Lin CP, Lu CW, Wang JL, Hsiao JK, Liu HM. Mechanism of cellular uptake and impact of ferucarbotran on macrophage physiology. *PLoS One*. 2011; 6(9):e25524.
- Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2005; 26(15):2603-2610.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318(5858):1917-1920.
- Yu TT, Shoichet MS. Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2005; 26(13):1507-1514.
- Zablotzkii V, Jose MP, Silvia L, Jose Ignacio P-L, Vicente R, Cristina G-P. High-Field Gradient Permanent Micromagnets for Targeted Drug Delivery with Magnetic Nanoparticles. *AIP Conference Proceedings*. 2010; 1311(1):152-157.
- Zeng X, Zeng YS, Ma YH, Lu LY, Du BL, Zhang W, Li Y, Chan WY. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Three Dimensional Gelatin Sponge Scaffold Attenuate Inflammation, Promote Angiogenesis and Reduce Cavity Formation in Experimental Spinal Cord Injury. *Cell Transplant*. 2011.
- Zhang H, Lin CY, Hollister SJ. The interaction between bone marrow stromal cells and RGD-modified three-dimensional porous polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*. 2009; 30(25):4063-4069.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001; 19(12):1129-1133.
- Zhao M, Chang J, Fu X, Liang C, Liang S, Yan R, Li A. Nano-sized cationic polymeric magnetic liposomes significantly improves drug delivery to the brain in rats. *J Drug Target*. 2012; 20(5):416-421.
- Zhong Y, Bellamkonda RV. Biomaterials for the central nervous system. *J R Soc Interface*. 2008; 5(26):957-975.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009; 4(5):381-384.
- Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A, Wu GD. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*. 2006; 24(4):928-935.

## 10 Přehled publikací autora

Publikace s impact faktorem (IF), které jsou podkladem dizertační práce:

1. **Vaněček, V.**, Zablotskii, V., Forostyak, S., Růžička, J., Babič, M., Herynek, V., Jendelová, P., Kubinová, Š., Dejneka, A., Syková, E. Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury *International Journal of Nanomedicine*, 2012;7:3719-30. Epub 2012 Jul 16. **IF:3,1**  
Osobní přispění: Koncepce a příprava práce, příprava buněčných kultur a značení buněk, indukce míšní léze u potkanů, transplantace buněk, analýza histologických vzorků, zpracování a interpretace dat.
2. Babič, M., Horák, D., Jendelová, P., Herynek, V., Prokš, V., **Vaněček, V.**, Lesný, P., Syková, E. The use of dopamine-hyaluronate associate-coated maghemite nanoparticles to label cells *International Journal of Nanomedicine*, 2012;7:1461-74. Epub 2012 Mar 16 Published: 2012 **IF:3,1**  
Osobní přispění: Příprava buněčných kultur, značení buněk a jejich hodnocení, diferenciace buněk, zpracování dat.
3. Kubinová, Š., Horák, D., Kozubenko, N., **Vaněček, V.**, Prokš, V., Price, J., Cocks, G., Syková, E. The use of superporous Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified PHEMA scaffolds to promote cell adhesion and the differentiation of human fetal neural precursors. *Biomaterials*. 2010 Aug;31(23):5966-75. Epub 2010 May 18. **IF: 7,4**  
Osobní přispění: Příprava buněčných kultur, kultivace buněk na hydrogelech, mikroskopické a kvantitativní hodnocení adheze, růstu a diferenciace buněk, zpracování a interpretace dat.

Publikace s IF, které souvisejí s tématem dizertační práce:

4. Turnovcová, K., Růžičková, K., **Vaněček, V.**, Syková, E., Jendelová, P. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy*. 2009;11(7):874-85. **IF 2,9**
5. Urdzíková, L., Likavčanová-Mašínová, K., **Vaněček, V.**, Růžička, J., Šedý, J., Syková, E., Jendelová, P. Flt3 ligand synergizes with granulocyte-colony-stimulating factor in bone marrow mobilization to improve functional outcome after spinal cord injury in the rat. *Cytotherapy*. 2011 Oct;13(9):1090-104. Epub 2011 May 4. **IF: 2,9**

Ostatní publikace bez IF:

6. **Vaněček, V.**, Kubinová, Š., Syková, E. Nanotechnology in regenerative medicine *Nanomagazine UK*. 2010;21:32-35 ISSN 1757-2517

Celkový impact faktor: 19,4

## 11 Přehled abstraktů

- **Vaněček V.**, Klíma K., Kohout A., Jiroušek O., Štulík J., Syková E. 3rd TERMIS world congress, Vídeň 2012. Prezentace posteru: Mesenchymal stem cells promote bone tissue regeneration in a preclinical rat model of vertebral body defect. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; 6 (Suppl.1), s. 42
- **Vaněček V.**, Růžička J., Forostyak S., Babič M., Herynek, V., Dejneka A., Zablotskii V., Kubinová S., Jendelová, P., Syková, E. 19th international konference on magnetism, Korea 2012. Magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Abstract book*, s. 46
- **Vaněček V.**, Klíma K., Kohout A., Jiroušek O., Štulík J., Syková E. 15th annual meeting of International society for cellular therapy, Seattle, USA 2012 Prezentace posteru: Use of bone scaffold combined with mesenchymal stem cell for the treatment of vertebral body defects. *Cytotherapy* 2012; 14, Abstract supplement, s. 58
- Lesný P., Langkramer S., Argyriou A., **Vaněček V.**, Klíma K., Syková E. Preclinical evaluation of investigational human multipotent mesenchymal stem cells based medicinal products. REMEDIC Santander Summer School; Santander, Španělsko, 2011
- **Vaněček V.**, Forostyak S., Jendelová P., Syková E. 8th International stem cell school in regenerative medicine, Stockholm, Švédsko, 2010. Prezentace posteru. Magnetic targeting of mesenchymal stem cells in the spinal cord. *Abstract book*, s.62
- **Vaněček V.**, Kubinová Š., Kozubenko, N., Horák D., Prokš V., Price, J., Syková E. Studentská vědecká konference 2. LF UK, Praha 2010. Prezentace posteru: Superporous SIKVAV modified PHEMA scaffold promotes stem cell adhesion and the differentiation of human fetal neural precursors, *Abstract book*, s.61
- **Vaněček V.**, Kubinová Š., Kozubenko N., Horák D., Prokš V., Price J., Syková E. Conference of the Czech and Slovak Neuroscience Societies, Praha, 2009. Prezentace posteru Superporous SIKVAV modified PHEMA scaffold promotes stem cell adhesion and differentiation of human fetal neural precursors. *Abstract book*, s. 29

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce



# Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury

Václav Vaněček<sup>1,5</sup>

Vitalii Zabolotskii<sup>2</sup>

Serhiy Forostyak<sup>1,5</sup>

Jiří Růžička<sup>1</sup>

Vít Herynek<sup>3</sup>

Michal Babič<sup>4</sup>

Pavla Jendelová<sup>1,5</sup>

Šárka Kubinová<sup>1</sup>

Alexandr Dejneka<sup>2</sup>

Eva Syková<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine AS CR, Prague, Czech Republic;

<sup>2</sup>Institute of Physics AS CR, Prague, Czech Republic; <sup>3</sup>MR-Unit, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic; <sup>4</sup>Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, Prague, Czech Republic; <sup>5</sup>Department of Neuroscience, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

**Abstract:** The transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) is currently under study as a therapeutic approach for spinal cord injury, and the number of transplanted cells that reach the lesioned tissue is one of the critical parameters. In this study, intrathecally transplanted cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles were guided by a magnetic field and successfully targeted near the lesion site in the rat spinal cord. Magnetic resonance imaging and histological analysis revealed significant differences in cell numbers and cell distribution near the lesion site under the magnet in comparison to control groups. The cell distribution correlated well with the calculated distribution of magnetic forces exerted on the transplanted cells in the subarachnoid space and lesion site. The kinetics of the cells' accumulation near the lesion site is described within the framework of a mathematical model that reveals those parameters critical for cell targeting and suggests ways to enhance the efficiency of magnetic cell delivery. In particular, we show that the targeting efficiency can be increased by using magnets that produce spatially modulated stray fields. Such magnetic systems with tunable geometric parameters may provide the additional level of control needed to enhance the efficiency of stem cell delivery in spinal cord injury.

**Keywords:** magnetism, mesenchymal stem cell, nanoparticle, spinal cord injury, modeling

## Introduction

Spinal cord injury (SCI) is a devastating traumatic injury leading to the loss of neurons, axonal degeneration, a serious neurological deficit, and permanent invalidity. Despite extensive research, there is currently no effective therapy for SCI.<sup>1,2</sup> The development of new methods that allow for the restoration of tissue function in the injured spinal cord represents a major challenge for regenerative medicine. One of the promising treatment approaches tested in preclinical and clinical studies is the transplantation of stem cells into the damaged spinal cord.<sup>3,4</sup>

Mesenchymal stem cells (MSC) are under intensive study as a potential therapeutic tool, particularly for the treatment of bone,<sup>5</sup> cartilage,<sup>6</sup> cardiac<sup>7</sup> and neural diseases, including stroke,<sup>8</sup> amyotrophic lateral sclerosis,<sup>9</sup> and SCI.<sup>10,11</sup> Numerous studies have demonstrated their benefit in promoting anatomic and functional recovery after transplantation in animal models of SCI.<sup>11–14</sup> The mechanisms underlying the therapeutic effect of MSC are primarily the secretion of growth factors and cytokines supporting neuronal repair,<sup>15</sup> immunomodulation,<sup>16</sup> and antiapoptotic effects,<sup>17,18</sup> which promote regenerative processes in the central nervous system.

Important parameters influencing the effect of cell transplantation are the number of transplanted cells, the site of transplantation, as well as the route of administration.

Correspondence: Václav Vaněček  
Institute of Experimental Medicine AS CR,  
Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4,  
Czech Republic  
Tel +420 241 062 717  
Fax +420 241 062 706  
Email vanecek@biomed.cas.cz

Less invasive cell transplantation, but sufficient cell retention and engraftment in the tissue of interest, are essential for the effective implementation of cellular transplantation strategies in regenerative medicine. When administering stem cells intended to affect SCI, direct injection, lumbar puncture, and intravenous or intraarterial injection are the commonly used methods. Intrathecal administration via lumbar puncture has been described as being more efficient than intravenous administration and less invasive in comparison to direct injection.<sup>19</sup> As the number of cells in the lesion is one of the critical parameters, it is important to find an efficient means of cellular delivery, ideally one that would concentrate or facilitate the homing of cells to the site of injury.

For monitoring the efficiency of cell transplantation, cellular homing or targeting, grafted cells can be labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) and detected by means of magnetic resonance imaging (MRI).<sup>20,21</sup> In addition, cells labeled with SPION can be manipulated in a magnetic field<sup>22,23</sup> and successfully targeted to different organs. Previous studies in this area have focused on targeting cells into the liver<sup>24</sup> or injured brain<sup>25</sup> or have evaluated the homing of cells into the healthy spinal cord with the use of a magnetic system based on a permanent magnet.<sup>26</sup> However, a more detailed evaluation of such magnetic systems is often missing in the literature.

In an effort to improve the efficiency of cell transplantation into the damaged spinal cord, we evaluated both theoretically and experimentally an *in vivo* magnetic targeting system based on a slab-shaped commercially available permanent magnet. We propose an improved magnetic system for targeting labeled cells in a spinal cord lesion and provide a mathematical model describing such cell targeting.

## Materials and methods

### Cell preparation

MSC were obtained from 4-week-old green fluorescent protein (GFP) transgenic Sprague Dawley rats, transgenic line code TgN (acro/act-EGFP) 4Osb. The animals were deeply anesthetized, the femurs and tibias were dissected and the bone marrow was plated on Petri dishes containing Dulbecco's modified Eagle's medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH), and Primocin™ (100 µg/mL; Lonza Cologne AG, Koeln, Germany). Cells were allowed to adhere; nonadherent cells were removed after 48 hours by replacing the medium. Adherent cells were cultivated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, and the medium was changed twice a week. After reaching

near-confluence, the cells were harvested by a Trypsin/EDTA solution (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA). After two to three passages, the cells were labeled with SPION and transplanted into animals. The cells were characterized as MSC by their spindle-shaped morphology and adherence to plastic, while their multipotency was confirmed by their differentiation into adipocytes, osteoblasts, and chondroblasts according to a standard differentiation protocol.<sup>9,27</sup> The cells were positive for CD90 and fibronectin and negative for CD11b and CD45.<sup>20</sup>

### Cell labeling with SPION

For cell labeling, poly-L-lysine-coated SPION were used in this study. The nanoparticles were prepared and characterized as described previously.<sup>28</sup> Cultures of MSC were incubated with SPION (50 µL/10 mL of culture medium, ie, 15.4 µg of iron/1 mL media) 72 hours prior to experiments. After 72 hours, the nanoparticles were washed out and the labeled cells were implanted into the animals.

For *in vitro* experiments, SPION-labeled cells were plated in a Petri dish (100,000 cells/dish) with a permanent magnet or a nonmagnetic plastic substitute fixed on the bottom of the dish. After 48 hours, the magnet or nonmagnetic substitute was removed and the cells were fixed with paraformaldehyde. The distribution of cells in the Petri dish was observed under a fluorescence microscope.

### Balloon-induced spinal cord compression lesion model

The use of animals in this study was approved by the ethics committee of the Institute of Experimental Medicine ASCR (Prague, Czech Republic). All efforts were made to minimize the number of animals used in the study. A balloon compression lesion was performed in a total of 32 male Wistar rats (280–300 g) as described by Urdzikova et al.<sup>11</sup> Briefly, the animals were anesthetized with 2% isoflurane (Forane®; Abbott Laboratories, Queenborough, UK) and shaved on the back from C7 to Th 12. Under sterile conditions, the skin was cut in the midline from Th7–Th12. The soft tissue was removed, as well as the spinous processes of vertebrae Th8–Th11. A catheter was filled with saline and connected to a Hamilton syringe. The catheter was inserted into the epidural space and advanced cranially for 1 cm, so that the center of the balloon rested at the Th8–Th9 level of the spinal cord. The balloon was rapidly inflated with 15 µL of saline for 5 minutes. The catheter was then deflated and removed. Subsequently, a small magnetic implant (13 × 7 × 2 mm, neodymium magnet with magnetic

induction at the surface  $B_s = 0.35$  T and remnant magnetic field  $B_r = 1.2$  T; ABC Magnet Ltd, Prague, Czech Republic) covered with a biocompatible silicone plastic coating or a non-magnetic plastic implant was inserted on the top of the vertebral column at Th8–Th9 (above the lesion site) and fixed and sutured in the muscles, so that the surface of the magnet rested approximately 4–4.5 mm above the lesion site (considering the thickness of the vertebral bone [lamina], the tissue below the magnet, and the magnet coating). The soft tissue and skin were sutured with unresorbable thread, and the animals were allowed to feed and drink ad libitum.

## Cell transplantation

The rats were transplanted intrathecally 1 week after injury. To study the effect of magnetic targeting as a function of time, animals were sacrificed 12, 24, 72, or 168 hours after transplantation. A lumbar puncture was performed as described previously.<sup>29</sup> The rats were anesthetized with 2% isoflurane, and the skin was cut at the L5–L6 level. For each time interval, a group of animals with a magnet ( $n = 4$ ) and another group with a nonmagnetic substitute ( $n = 4$ ) were injected with 0.5 million SPION-labeled MSC in 50  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS) using a sterile 25 G needle. All animals were immunosuppressed daily with cyclosporine (10 mg/kg, ip, Sandimmun®; Novartis, Basel, Switzerland), and bacterial infection was prevented by gentamicine (0.05 mL, im, Gentamicine Lek®; Lek Pharmaceuticals, Ljubljana, Slovenia).

## Magnetic resonance imaging

At the end of the experiment, the animals were intracardially perfused under deep anesthesia (pentobarbital 150 mg/kg; Sigma, St Louis, MO) with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS. The vertebrae were dissected and ex-vivo magnetic resonance images (MRI) were obtained using a 4.7 T Bruker spectrometer (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) equipped with a volume resonator coil. Sagittal images were obtained using a standard T2-weighted turbo spin-echo sequence. The sequence parameters were: repetition time (TR) = 2000 ms, effective echo time (TE) = 70 ms, turbo factor = 16, number of acquisitions (AC) = 48, slice thickness = 0.75 mm, FOV = 5 × 2.5 cm and matrix 256 × 256.

## Histology and image analysis

Spinal cords were dissected, postfixed overnight in 4% paraformaldehyde, and transferred to 10% and 20% sucrose. After freezing, the spinal cords were cryosectioned into longitudinal sections (14  $\mu$ m thickness) and counterstained

with DAPI. In order to visualize the colocalization of the GFP signal with SPION labeling, iron in the serial histological sections was detected by staining with potassium ferrocyanide (Lachema, Brno, Czech Republic) to produce ferric ferrocyanide (Prussian blue) according to a standard staining protocol. To detect the possible infiltration of macrophages in the lesion, staining for CD68 (ED1; Serotec, Oxford, UK) was performed followed by counterstaining with Nuclear Fast Red (Sigma). Antigen-antibody complexes were visualized using a biotin-streptavidin detection system (LSAB2 System, HRP; DakoCytomation, Carpinteria, CA) with 3,3'-diaminobenzidine as the chromogen (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The number of GFP<sup>+</sup> cells was quantified using a procedure described previously.<sup>30</sup> GFP<sup>+</sup> cells containing a DAPI-positive nucleus were counted in every sixth section in an 18 mm (9 × 2 mm) segment with the epicenter of the lesion in the center of the segment. The total number of surviving transplanted cells was obtained by multiplying the number of cells in the counted sections by 6 to compensate for the sampling frequency. Histological and image analyses were performed using a Zeiss Axioskop Light microscope (Carl Zeiss, Rochester, NY) and image analysis software.

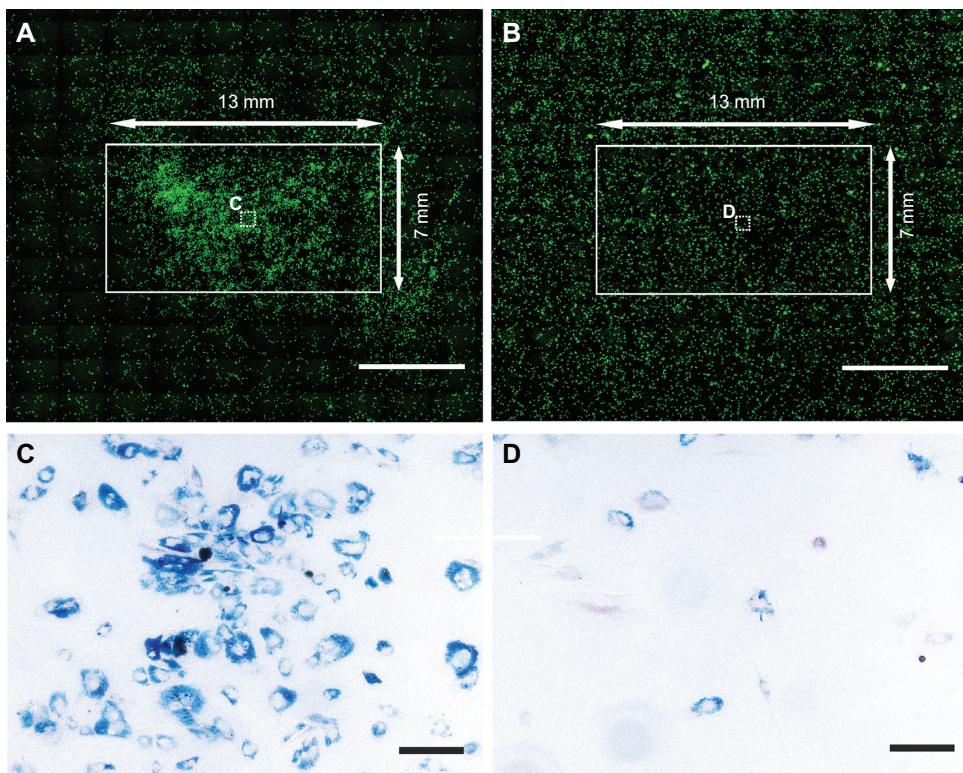
## Statistical analysis and mathematical modeling

The statistical significance of differences in cell counts in the spinal cord lesions between the magnet and nonmagnet groups was determined using Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant if  $P < 0.05$ . Data are expressed as means ± standard error of mean. In the subarachnoid space the distribution of the magnetic forces acting on the magnetically labeled cells from a permanent magnet was calculated analytically with the help of explicit expressions for the magnetic stray fields.<sup>31</sup> The kinetics of the cells' accumulation near the lesion site are described by a mathematical model elaborated with regard to both the biological and physical factors affecting the cell distribution.

## Results

### In vitro magnetic targeting

In vitro studies showed that in a Petri dish, MSC labeled with SPION can be attracted by magnetic force to the region above the magnet (Figure 1A and C). In control dishes, without the influence of the magnet, the cells were uniformly distributed (Figure 1B and D). Prussian blue staining confirmed the presence of iron oxide nanoparticles in the cells.



**Figure 1** In the magnet group (**A**), GFP cells labeled with SPION and seeded in a Petri dish were attracted to the region above the magnet ( $13 \times 7 \times 2$  mm, the white solid-line rectangle depicts the magnet's edges). In the control group (**B**), the cells were spread uniformly throughout the dish and did not concentrate in the region above the plastic substitute. (**C** and **D**) show enlarged views of the white boxes in the middle of the magnet (**A**) or nonmagnet area (**B**).

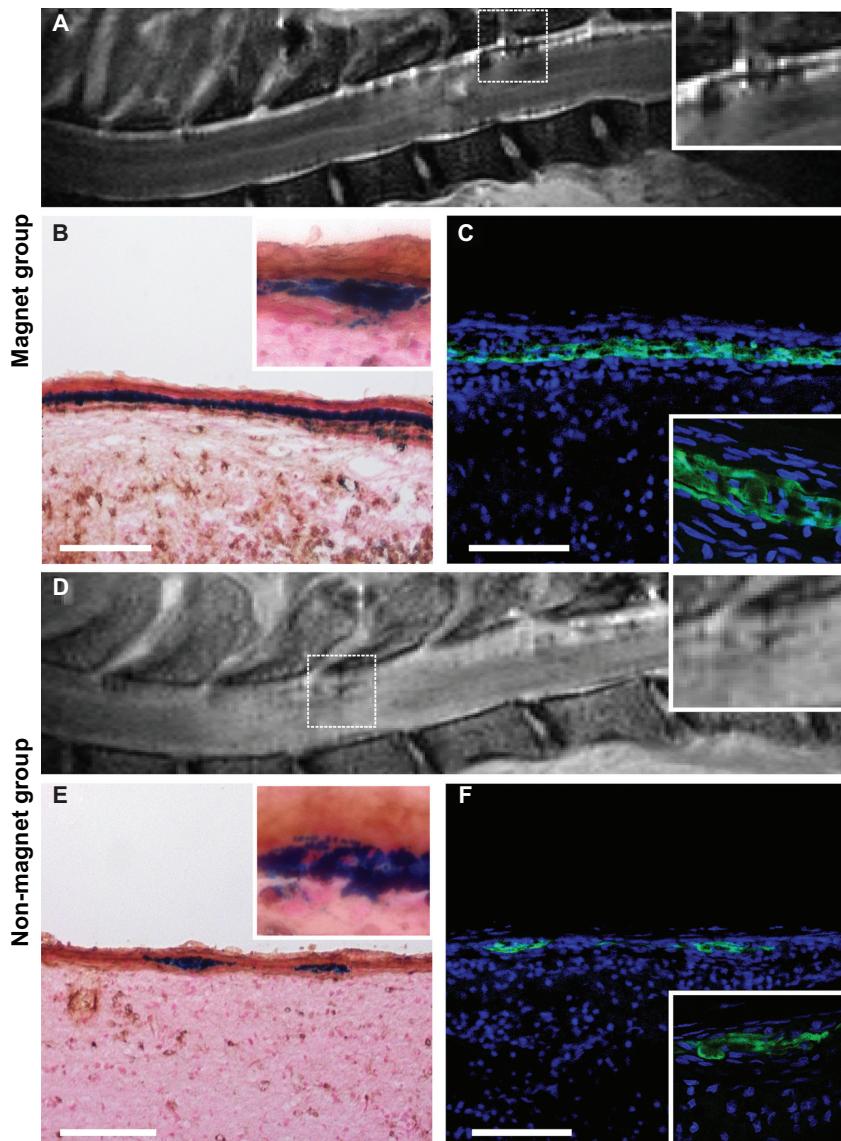
**Notes:** Cells were stained for iron to produce Prussian blue. Scale bars = 5000  $\mu\text{m}$  (**A** and **B**) and 50  $\mu\text{m}$  (**C** and **D**).

**Abbreviations:** GFP, green fluorescent protein; SPION, superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

## Magnetic targeting in a spinal cord lesion

Histological analysis of spinal cord sections revealed transplanted SPION-labeled GFP<sup>+</sup> cells in both the magnet and control groups. MRI scans and histological findings were similar in the magnet groups at each time point, as were the scans and findings for the control groups at each time point. In order to avoid needless duplication, Figure 2 shows representative MRI and histological images of a spinal cord in both the magnet and control groups at a single time point, 72 hours after transplantation. MRI scans showed a larger hypointense signal of SPION-labeled cells in the lesion area in the magnet group (Figure 2A) in contrast to the weak signal observed in the control group (Figure 2D). In the magnet groups, the cells were located in clusters mostly in the dorsal intrathecal space of the spinal cord below the magnetic implant. Prussian blue staining (Figure 2B) colocalized with the GFP signal (Figure 2C) in serial histological sections. The observed Prussian blue-positive cells were negative for ED1-DAB staining, thus excluding the presence of local macrophages loaded with iron (Figure 2B and E). In the control groups, fewer cells were identified in the lesion

area (Figure 2E and F). The cell distribution in the magnet groups correlated with the magnetic forces of the magnetic implant above the lesion site (see details in the text below), which attracted and concentrated the cells near the lesion and prevented the cells from advancing more cranially (Figure 3). In the control groups, the cells were distributed more uniformly along the measured spinal cord segment. Quantitative analysis revealed that the mean total number of cells found in the measured segment in the magnet groups was the highest 12 hours after cell administration ( $9595 \pm 2231$  cells), followed by a continual decrease after 24 hours ( $7181 \pm 939$  cells), 72 hours ( $3002 \pm 581$  cells) and 168 hours ( $2734 \pm 174$  cells). In the controls, the number of cells 12 hours after administration ( $3538 \pm 625$  cells) was significantly lower in comparison to the magnet group ( $P < 0.05$ ). The highest number was found after 24 hours ( $6894 \pm 1520$  cells), followed by a decrease after 72 hours ( $1837 \pm 600$  cells) and 168 hours ( $720 \pm 138$  cells); the number of cells observed at 168 hours was significantly lower ( $P < 0.05$ ) in comparison with the cell number found at the same time point in the magnet group.



**Figure 2** A strong hypointense magnetic resonance signal of SPION-labeled cells was found near the lesion area in the magnet group after intrathecal application (**A**) in contrast to the nonmagnet group (**D**). Intense Prussian blue staining (**B**) colocalized with the GFP signal (**C**) in the area under the magnet. Cell nuclei are stained with DAPI (blue) (**C** and **F**). The iron-containing cells in both groups were negative for brown ED-Istaining for macrophages (**B** and **E**) (sections counterstained with Nuclear Fast Red). A few SPION-labeled cells were found in the lesion area in the nonmagnet group (**E**) colocalizing with the GFP signal (**F**).

Note: Scale bars = 100  $\mu$ m.

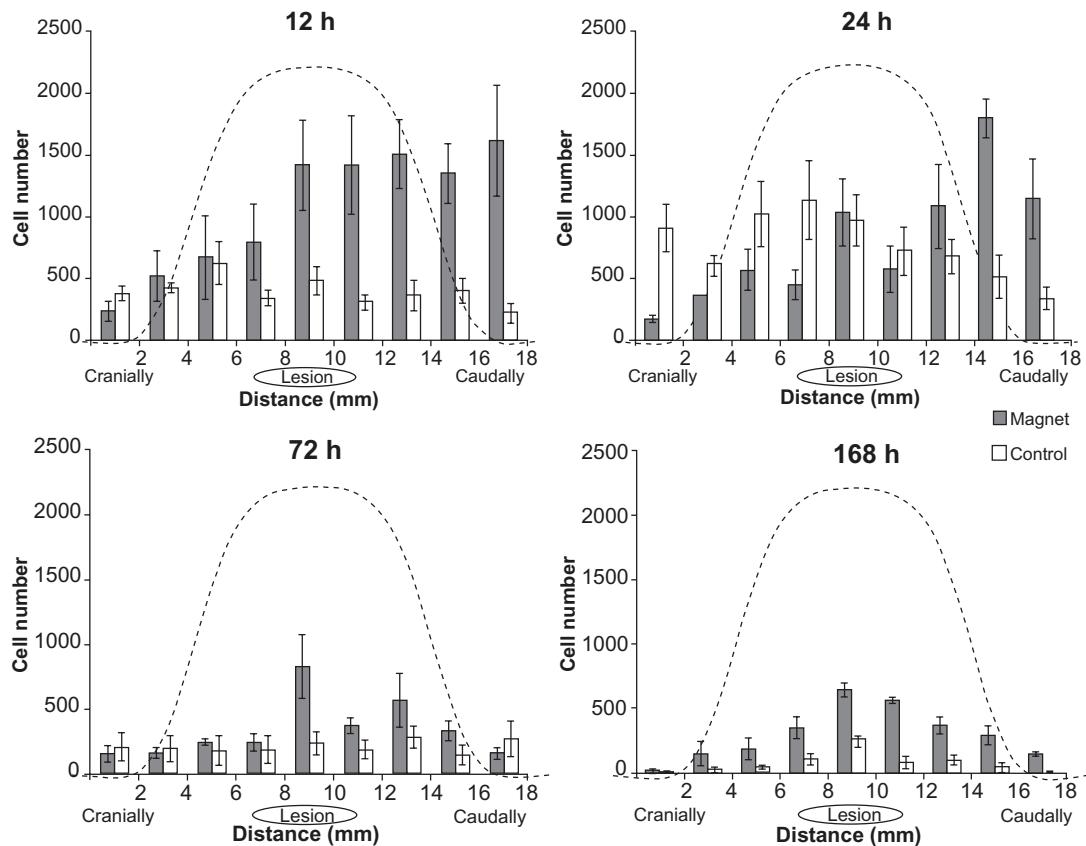
Abbreviations: GFP, green fluorescent protein; SPION, superparamagnetic iron oxide nanoparticles; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

### Theoretical analysis of the magnetic forces acting on SPION-labeled cells from a slab-shaped permanent magnet in the spinal cord

The magnetic force acting on a cell loaded with magnetic nanoparticles can be calculated as

$$\vec{F}_m = \frac{V_c \chi}{\mu_0} (\vec{B} \vec{\nabla}) \vec{B} = \\ = \frac{V_c \chi}{\mu_0} \left( B_x \frac{\partial}{\partial x} + B_y \frac{\partial}{\partial y} + B_z \frac{\partial}{\partial z} \right) (\vec{i} B_x + \vec{j} B_y + \vec{k} B_z) \quad (1)$$

where  $V_c$  is the cell volume,  $\chi$  is the magnetic susceptibility of a cell relative to the cerebrospinal fluid,  $\nabla$  is the operator nabla,  $i, j$ , and  $k$  are the unit direction vectors of a Cartesian coordinate system,  $\mu_0$  is the permeability of free space,  $B = \mu_0 H$  is the magnetic induction, and  $H$  is the magnetic field strength.<sup>32</sup> Note that the force component perpendicular (z-component) to the channel walls plays a major role in the targeted capture of cells. In Figure 3, we show the scaled magnetic force as a function of cell position on the x-scale, calculated for the slab-shaped magnet used in our experiments (13 × 7 × 2 mm) as described previously.<sup>31</sup>



**Figure 3** Distribution of cells in an 18 mm long segment of the injured spinal cord 12, 24, 72, and 168 hours after intrathecal injection.

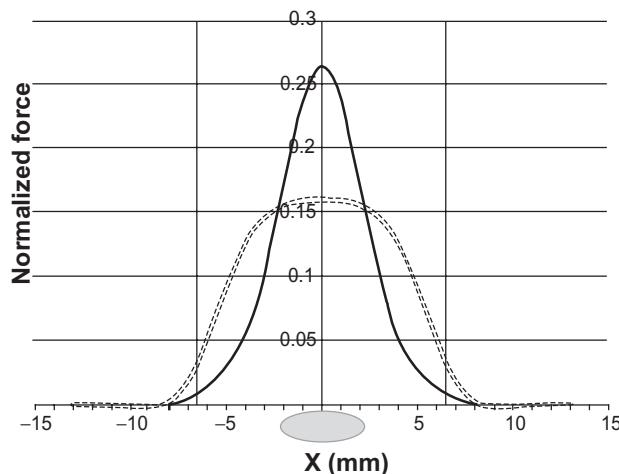
**Notes:** The cell distribution correlates with the magnetic forces of the magnetic implant above the lesion site, which attracts and concentrates the cells near the lesion and prevents the cells from advancing more cranially. The dashed lines depict the calculated distribution of the z-component of the magnetic forces for a slab-shaped magnet at a distance of 4.5 mm from the magnet's surface.

Comparing the experimentally achieved stem cell distributions (Figure 3) with the force distribution, one can see their strong resemblance. The visible asymmetry in the cell distributions is obviously caused by the cells' injection into the lumbar space and their primarily unidirectional cranial migration through the cerebrospinal fluid (CSF). During stem cell targeting, the interplay between the physical distribution of the cells (governed by the magnetic forces) and their biodistribution results in the cell patterns shown in Figure 3. We suggest that by optimizing the physical (magnetic) force distribution, one can achieve a more precise and effective cell targeting near the site of injury. The main idea of the optimization method relies on the fact that magnetic cell targeting can be improved by using a magnet of special shape that produces spatially modulated stray fields.<sup>31,33</sup>

## Optimizing magnet geometry for focusing magnetically labeled cells

As seen from Figure 4 (dashed curve), the calculated force distribution of a slab-shaped magnet is rather flat, and the

capturing area does not fit well with the 3–4 mm-sized lesion site. For medical applications, it is often important to capture magnetic cells more locally. In such a case, the magnetic system should be optimized for narrow focusing, which could be achieved by, for example, a slab-shaped magnet with one central step. The magnetic force distribution generated with such a stepped magnet is shown in Figure 4 by the black curve (the step size is 4 × 7 × 2 mm). Thus, adding only one step on a flat magnet significantly increases the magnetic force and allows for the more precise focusing of magnetically labeled cells to the lesion site. An additional advantage of the proposed stepped magnet is its strong horizontal force component (*x*-component), due to which the stepped magnet attracts the magnetically labeled stem cells. Figure 5A and B show: (i) the magnetic force distributions in the (*x,z*)-plane for flat and stepped magnets calculated analytically by using previously reported explicit expressions for the magnetic stray fields produced by a uniformly magnetized slab<sup>31</sup> and (ii) the schematic distributions of the transplanted cells in the subarachnoid space affected by the magnetic forces.



**Figure 4** Scaled z-component of the magnetic force (normalized to  $\chi\mu_0 V M_s^2/a$ , where  $M_s$  is the saturation magnetization of the magnet and  $a$  is the lateral half-size of the magnet) calculated as a function of the coordinate in the cerebrospinal fluid channel for a slab-shaped magnet (dashed) and one with a central step  $4 \times 7 \times 2$  mm (black).

**Note:** The force was calculated for the plane 4.5 mm above the magnet's surface. The vertical lines indicate the boundaries of the magnet,  $x_b = \pm 6.5$  mm ( $13 \times 7 \times 2$  mm). The lesion site is shown as a grey ellipse at the origin of the coordinate system.

A comparison of Figure 5A and B clearly demonstrates that the use of a stepped magnet provides the planar components of the magnetic forces needed for attracting the labeled cells to the lesion site, while a flat magnet attracts cells mainly to the edge of the magnet. As seen from Figure 5B, many areas with high field gradients are located near the stepped magnet. This allows the use of such a magnet for targeted cell delivery to lesion sites of specific geometry. The magnetic field gradient value and direction, as well as the force distribution, could be tuned by changing the number of steps and their positions, as well as the step sizes and heights.

## Modeling cell targeting

One of the crucial problems in stem cell targeting is its efficiency. The efficiency of magnetic targeting is limited by both physical and biological factors. Indeed, as described above, only thousands from half a million injected cells were captured near the lesion site. Hence, a description of the cell targeting by a mathematical model, taking into account the magnetic forces and the magnet's parameters, the geometry and volume of the cerebrospinal channel, and the characteristic life span of the cells would significantly advance our understanding of this dynamic process.

Let us assume that  $N_0$  of magnetically labeled cells were injected in a channel (subarachnoid space). With time  $\tau_{bio}$ , the number of cells decays on a time scale due to biological reasons: the finite life span of the cells, immunological reactions against the transplanted cells, apoptosis due to

cell-to-cell interactions, possible nanoparticle toxicity, etc. On the other hand, in the channel volume, the physical process of cell capture is mainly governed by the magnetic forces acting on the stem cells loaded with SPION. This process is characterized by the characteristic time  $\tau_{ph}$ , which depends on the magnetic field gradient (forces), the number of SPION per cell, the magnetic moment of the nanoparticles, and the experimental geometry. The main force to be overcome by the magnetic force is the drag force of the cerebrospinal fluid,  $F_d = 6\pi\mu Rv$ , where  $R$  is the mean cell size,  $v$  is the difference between the cell and fluid velocities, and  $\mu$  is the fluid viscosity.

Assuming that magnetic forces act on cells near the magnet surface within an effective area  $S$  and that the cells circulate with the cerebrospinal fluid in the subarachnoid space of an overall volume  $V$ , we now calculate the number of captured cells. In the whole volume, a decrease in the number of cells due to their attraction to the magnet, during time  $dt$ , is described as

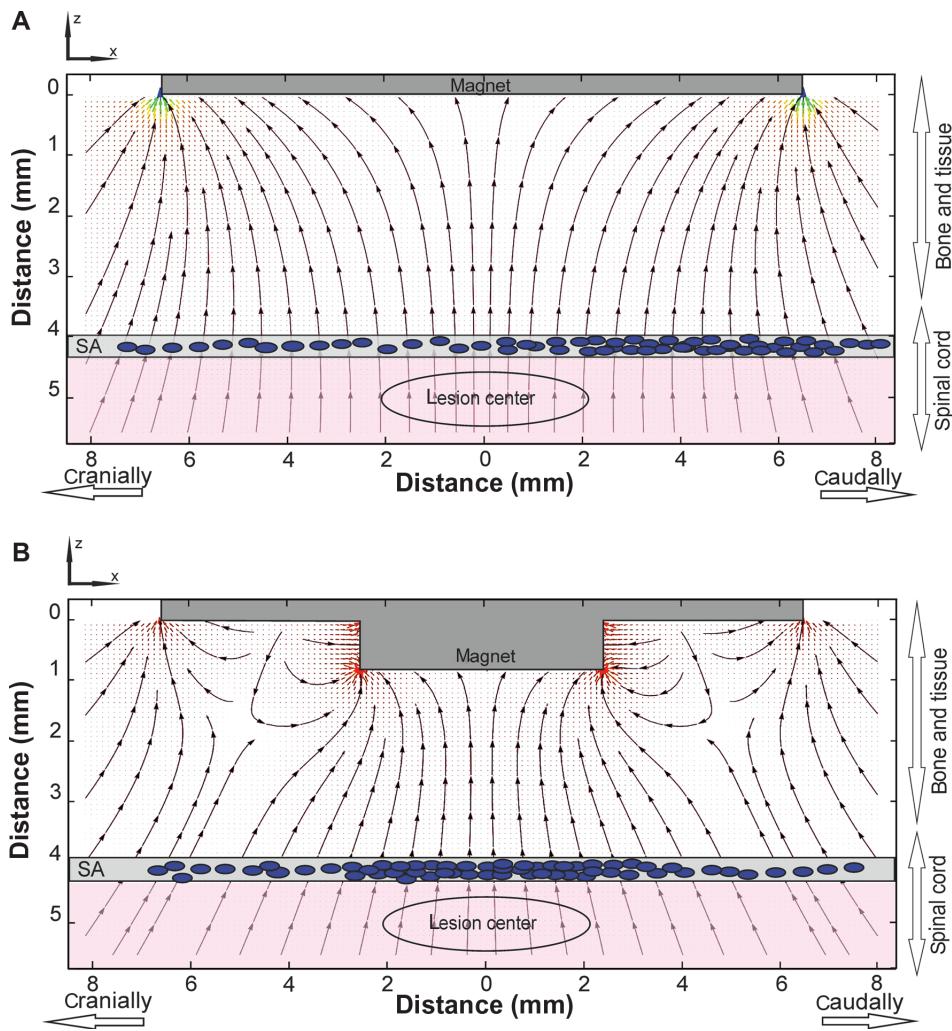
$$dN_V(t) = -\frac{N_V(t) < v > S dt}{V} \quad (2)$$

where  $N_V(t)$  is the remaining number of cells in the volume. Integrating Eq. 2 from 0 to  $t$  and taking into account that  $N_V(0) = N_0$  as well as that the number of captured cells is  $N(t) = N_0 - N_V(t)$ , one can arrive at

$$N(t) = N_0 \left( 1 - e^{-t/\tau_{ph}} \right) \quad (3)$$

where  $\tau_{ph} = V/(S < v >)$  is the characteristic time and  $< v >$  is the mean cell velocity determined by the balance of the forces: magnetic, drag and tether to the channel walls (adhesion forces). In the limiting case when  $t \ll \tau_{ph}$ , as follows from Eq 3, the number of captured cells linearly depends on time:  $N(t) = N_0 t / \tau_{ph}$ . It is also seen from Eq 3 that the capturing efficiency  $N(t)/N_0$  and the rate  $dN/dt = N_0 / \tau_{ph} = N_0 S < v > / V$  strongly depends on the magnetic force values (in the last expression the mean cell velocity is directly proportional to the magnetic drag force), the effective magnet area, and the channel volume.

Now we analyze the consequences of Eq. 3 and compare them with the experimental data shown in Figure 6A, where the number of trapped cells is plotted as a function of time. As seen from this figure, initially the number of captured cells linearly increases with time, then, after reaching a certain cell concentration,  $N(t)$  starts to decay due to the previously mentioned biological factors. During this linear increase



**Figure 5** Magnetic force lines near the surfaces of flat (A) and stepped (B) magnets.

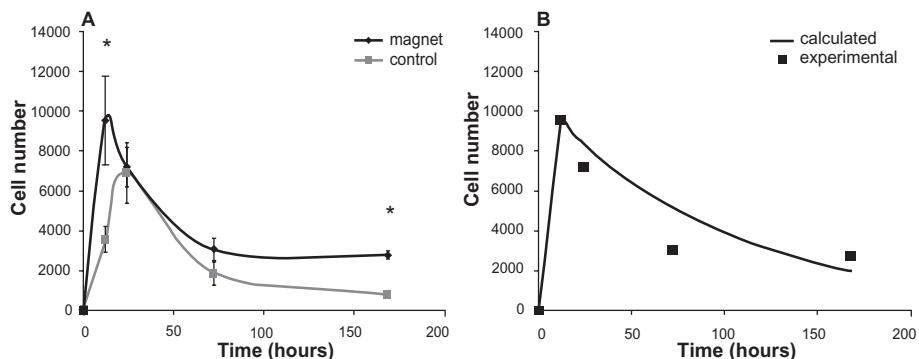
**Notes:** The arrow lines show the directions of forces acting on a magnetically labeled cell. The corresponding distribution of transplanted cells in the subarachnoid space of the spinal cord under both types of magnet is schematically shown by the blue dots. The areas with the highest values of the magnetic force are progressively marked in green, orange, and red.

(Figure 6A) the capturing rates are 794 and 287 cells/hour with and without the magnet, respectively. Obviously, for the same number of injected cells, the capturing rate is lower when the magnet is not present.

Our model, specified on the smallest time scale ( $t \ll \tau_{ph}$ ), predicts the linear dependence of the captured cells on time,  $N(t) = N_0 t / \tau_{ph}$ , which experimentally was observed for  $t < 12$  hours. From the data shown in Figure 6A, one can determine the physical characteristic time as  $\tau_{ph} = 12(N_0 / N(12)) = 12 \cdot 0.5 \cdot 10^6 / 9525 = 630$  hours = 26 days. During this time, the majority of the injected SPION-labeled cells would theoretically be captured by the magnet in the absence of the biological factors that are responsible for cell loss. However, on the time scale  $t > 24$  hours (see Figure 6), the biological factors' influence exceeds that of the physical

factors and causes the observed decrease in the size of the trapped cell colony. The whole process of magnetic stem cell targeting can be described by a combination of two time-dependent functions with different characteristic times:  $N_1(t) = N_0(1 - \text{Exp}(-t/\tau_{ph}))$  for  $t < t_0$  and  $N_2(t) = N_1(t_0) \text{Exp}(-(t-t_0)/\tau_{bio})$  for  $t > t_0$ , where  $t_0$  is the moment of time when the biological factors start to prevail over the physical ones. An exemplary plot of this dependence calculated for  $\tau_{bio} = 80$  hours and  $t_0 = 12$  hours is shown in Figure 6B. The values of  $\tau_{bio} = 80$  hours and  $\tau_{ph} = 630$  hours were determined by fitting the experimental data shown in Figure 6.

It should be stressed here, that to achieve maximal efficiency in stem cell delivery in this magnetic system and experimental setup geometry, the magnet must be removed from the rat's body before the time  $t_0$ . The optimal time of



**Figure 6** Total number of captured cells in the measured area with (black) and without (grey) a magnet versus time (in hours) (A). Calculated (curve) and experimental (filled squares) time dependencies of the magnetically captured cells influenced by both physical and biological factors (B).

magnet removal is determined by the interplay of the two characteristic times:  $\tau_{ph}$  and  $\tau_{bio}$ . Because of the fact that  $\tau_{bio}$  is hardly a controllable quantity, to reach the maximal possible efficiency one should decrease the characteristic time  $\tau_{ph} = V/(S \langle v \rangle)$ , eg, by a proper choice of the magnet's strength, shape, and operating area. For example, as seen from the expression for the physical characteristic time  $\tau_{ph} = V/(S \langle v \rangle)$ , the use of magnets of the smallest sizes ( $L = V/S$ ) with all of the magnetic parameters preserved would allow  $\tau_{ph}$  to decrease and increase the capture rate. A delay in magnet removal might decrease the number of captured live cells in the lesion site because of cell death in the target area or the possible further uptake of dead cells due to cerebrospinal fluid flow. Also, cytokines released by the lesioned tissue cannot attract transplanted cells to the lesion site. By removing the magnet, one can maximize the number of live cells, which can have a therapeutic effect in the lesioned tissue. Thus, the knowledge and control of both of the characteristic times ( $\tau_{ph}$  and  $\tau_{bio}$ ) allow us to increase the targeting efficiency.

## Discussion

We studied the possibility of targeting MSC labeled with SPION into the damaged spinal cord by means of magnetic targeting. In view of the fact that the number of MSC that reach the lesioned neural tissue after transplantation is considered to be low,<sup>34</sup> especially at short time intervals postimplantation, we believe that this approach can be beneficial for improving the effectiveness of cell transplantation.

Prior to in vivo use, we tested the permanent magnet-based targeting system in vitro. In our previous study, we showed that the efficiency of cell labeling with poly-L-lysine-coated SPION ranges from 72%–84%.<sup>35</sup> After we seeded labeled cells on a Petri dish, they were attracted to the region above the magnet and concentrated in the target area.

These results are in good agreement with the findings of other authors.<sup>36,37</sup>

After the implantation of the slab-shaped magnet covered with a biocompatible silicone coating, we did not observe any pathology or inflammation around the implant, suggesting the safety of the procedure. The transplantation of labeled cells intrathecally via lumbar puncture was performed 1 week after SCI, which is considered to be within the range of the optimal therapeutic window.<sup>38</sup> Intrathecal application has been repeatedly reported to be a clinically attractive method for cell delivery into the spinal cord because of its low invasiveness and relative simplicity.<sup>39</sup>

As shown by a hypointense MRI signal (due to the presence of SPION in the transplanted cells) and confirmed by histological staining, the transplanted cells were present in the subarachnoid space in both the magnet and nonmagnet groups and did not migrate deeply into the spinal cord tissue. Interestingly, Mothe et al<sup>34</sup> transplanted nonlabeled MSC via lumbar puncture into the spinal cord 1 week after a compression injury and reported that the majority of transplanted cells were located in the intrathecal space distributed along the spinal cord and did not migrate into the spinal cord parenchyma. They did not observe the exclusive homing of MSC to the SCI site and suggested that after intrathecal administration, some cells might be attracted or trapped in the lesion site due to a meningeal reaction or the swelling of the spinal cord. The possible entrapment of cells in the damaged lesion tissue might explain the increase in cell numbers in the lesion observed over time in the nonmagnet control group. In contrast, other authors reported that MSC have the ability to migrate into the lesion parenchyma when transplanted intrathecally.<sup>40</sup> This discrepancy might be explained by differences in the various types of SCI and variations in the transplant intervals,<sup>34</sup> since the migration of cells from the CSF to the lesion might vary in different types of SCI.

The cerebrospinal fluid circulation within the subarachnoid space functions as a closed hydraulic system protecting the central nervous system.<sup>41</sup> It must be noted that the circulation of the CSF plays an important role in cell transport after intrathecal transplantation. There are several models of CSF circulation suggested in the literature;<sup>42–44</sup> however, the flow dynamics of the CSF are still not fully understood. CSF circulation might also vary between pathologic and normal conditions.

Based on our results, we suggest that the magnet should be removed in order to efficiently target the cells to the lesion site. It must be taken into account that without the removal of the magnet, the magnet might even prevent the cells from migrating deeply into the lesion site. Recently, Sasaki et al<sup>45</sup> reported a significant effect of SPION-labeled MSC magnetically targeted via the CSF to a spinal cord lesion on the behavioral outcome of rats with SCI. They observed the transplanted cells on the surface of the spinal cord in the subarachnoid space; the cells did not migrate into the spinal cord tissue. However, they did not report a detailed evaluation of their magnetic system nor whether they removed the magnet or not. Experimental validation of an increase in capturing efficiency caused by magnet removal at the proper time will be presented in a forthcoming paper.

We have shown that in the lesioned area of the spinal cord, there was a significant difference in cell distribution between the magnet and nonmagnet groups. The cells circulating in the subarachnoid space were gathered under the magnetic implant. This correlates well with the study of Nishida et al.<sup>26</sup> These authors measured the area of GFP-positive cells in the healthy spinal cord under a magnetic implant (5 mm in diameter, 3 mm in height, 350 mT) after the administration of SPION-labeled cells via lumbar puncture and reported a higher concentration of cells in the subarachnoid space below the magnetic implant one day after intrathecal transplantation. In contrast to Nishida et al, we directly counted the number of implanted cells instead of measuring the GFP-positive area, a more accurate approach to determining the number of cells and the cell distribution in the lesion site. As we have shown, the number of cells that can be concentrated near the target area by using a simple slab-shaped permanent magnet was significantly higher in comparison to the non-magnet group. These findings agree with theoretical calculations of the magnetic properties of such a magnetic implant. However, the distribution of the (z) component of the magnetic force of a slab-shaped magnet is flat and does not precisely focus the cells at the lesion site. Moreover, due to the weak planar (x) component of

the magnetic force, the cells are not effectively attracted with such a magnet.

Periodically magnetized structures producing nonuniform magnetic field spatial distributions for magnetic targeting applications were previously studied analytically as well as by simulations by Häfeli et al.<sup>46</sup> However, to the best of our knowledge, the theoretical concepts of magnetic targeting in the spinal cord are poorly discussed in the literature. In order to predict the behavior of a magnetic targeting system, we introduced a mathematical model in which the process of cell targeting is characterized by the specific times  $\tau_{ph}$  and  $\tau_{bio}$ .

One of the crucial factors influencing the  $\tau_{bio}$  of a transplanted cell is the dose and type of iron oxide nanoparticle used for cell labeling. As we recently showed, SPION might cause oxidative damage to biological macromolecules as well as DNA damage, which might in turn influence the biological behavior of the cells and  $\tau_{bio}$ .<sup>47</sup> Various types of SPION with different coatings are under development; however, the most appropriate type and dose of nanoparticles for cell labeling and magnetic targeting remain to be determined.

Considering the limitations of the above-mentioned magnetic system based on a simple slab-shaped magnet, we suggested an improved tunable magnetic system allowing for the precise focusing of magnetically labeled cells to a target in the spinal cord that will be experimentally tested in future experiments.

## Conclusion

In conclusion, the targeting of SPION-labeled MSC into the injured rat spinal cord was achieved with the use of an implanted slab-shaped permanent magnet. We showed how the magnetic implant affects the distribution and kinetics of the transplanted cells in the spinal cord after intrathecal implantation. The magnetic system based on a commercially available magnet appears to be functional despite being limited by both physical and biological factors. These limitations are discussed, and the improvement of the magnetic targeting system by tuning the magnetic force distribution is suggested. The proposed magnetic delivery system can be attractive for clinical application development.

## Acknowledgment

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (P304/12/1370, P304/11/0731, P304/11/0189, P304/11/0653) and the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (AVOZ50390703, IAA500390902, AV0Z10100522). The authors thank James Dutt for his critical reading of the manuscript.

## Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

- Kubinova S, Sykova E. Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury. *Regen Med*. 2012;7(2):207–224.
- Talac R, Friedman JA, Moore MJ, et al. Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials*. 2004;25(9):1505–1510.
- Sykova E, Homola A, Mazanec R, et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2006;15(8–9):675–687.
- Arboleda D, Forostyak S, Jendelova P, et al. Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2011;31(7):1113–1122.
- Kim J, Kim IS, Cho TH, et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007;28(10):1830–1837.
- Fan H, Hu Y, Zhang C, et al. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a PLGA-gelatin/chondroitin/hyaluronate hybrid scaffold. *Biomaterials*. 2006;27(26):4573–4580.
- Gaebel R, Ma N, Liu J, et al. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(35):9218–9230.
- Borlongan CV, Glover LE, Tajiri N, Kaneko Y, Freeman TB. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders. *Prog Neurobiol*. 2011;95(2):213–228.
- Forostyak S, Jendelova P, Kapcalova M, Arboleda D, Sykova E. Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*. 2011;13(9):1036–1046.
- Kubinova S, Sykova E. Nanotechnology for treatment of stroke and spinal cord injury. *Nanomedicine (Lond)*. 2010;5(1):99–108.
- Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006;23(9):1379–1391.
- Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res*. 2010;1343:226–235.
- Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol*. 2002;1(2):92–100.
- Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia*. 2002;39(3):229–236.
- Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res*. 2002;69(5):687–691.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 15 2005;105(4):1815–1822.
- Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol*. 2006;198(1):54–64.
- Wilkins A, Kemp K, Ginty M, Hares K, Mallam E, Scolding N. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res*. 2009;3:63–70.
- Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I, Neuhuber B. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;328–334.
- Jendelova P, Hrynek V, Urdzikova L, et al. 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(2):232–243.
- Sykova E, Jendelova 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.
- Huang Z, Pei N, Wang Y, et al. Deep magnetic capture of magnetically loaded cells for spatially targeted therapeutics. *Biomaterials*. 2010;31(8):2130–2140.
- Wilhelm C, Bal L, Smirnov P, et al. Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled endothelial progenitor cells. *Biomaterials*. 2007;28(26):3797–3806.
- Arbab AS, Jordan EK, Wilson LB, Yocum GT, Lewis BK, Frank JA. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. *Hum Gene Ther*. 2004;15(4):351–360.
- Song M, Kim YJ, Kim YH, Roh J, Kim SU, Yoon BW. Using a neodymium magnet to target delivery of ferumoxide-labeled human neural stem cells in a rat model of focal cerebral ischemia. *Hum Gene Ther*. 2010;21(5):603–610.
- Nishida K, Tanaka N, Nakanishi K, et al. Magnetic targeting of bone marrow stromal cells into spinal cord: through cerebrospinal fluid. *Neuroreport*. 21 2006;17(12):1269–1272.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–317.
- Babic M, Horak D, Trchova M, et al. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem*. 2008;19(3):740–750.
- De la Calle JL, Paino CL. A procedure for direct lumbar puncture in rats. *Brain Res Bull*. 2002;59(3):245–250.
- Mothe AJ, Tator CH. Transplanted neural stem/progenitor cells generate myelinating oligodendrocytes and Schwann cells in spinal cord demyelination and dysmyelination. *Exp Neurol*. 2008;213(1):176–190.
- Zablotzkii V, Pastor JM, Larumbe S, et al. High-field gradient permanent micromagnets for targeted drug delivery with magnetic nanoparticles. *AIP Conf Proc*. 2010;1311:152–157.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2003;36(13):R167–R181.
- Zablotzkii V, Lunov O, Dejneca A, et al. Nanomechanics of magnetically driven cellular endocytosis. *Appl Phys Lett*. 2011;99(18):183701–183703.
- Mothe AJ, Bozkurt G, Catapano J, et al. Intrathecal transplantation of stem cells by lumbar puncture for thoracic spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord*. 2011;49(9):967–973.
- Horak D, Babic M, Jendelova P, et al. Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *J Magn Magn Mater*. 2009;321(10):1539–1547.
- Cheng K, Li TS, Malliaras K, Davis DR, Zhang Y, Marban E. Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circ Res*. 2010;106(10):1570–1581.
- Schafer R, Bantleon R, Kehlbach R, et al. Functional investigations on human mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles. *BMC Cell Biol*. 2010;11:22.
- Sykova E, Jendelova P, Urdzikova L, Lesny P, Hejcl A. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels—two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol*. 2006;26(7–8):1113–1129.
- Bakshi A, Hunter C, Swanger S, Lepore A, Fischer I. Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. *J Neurosurg Spine*. 2004;1(3):330–337.
- Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(18):1971–1979.
- Pardridge WM. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. *Fluids Barriers CNS*. 2011;8:7.
- Di Chiro G. Observations on the circulation of the cerebrospinal fluid. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*. 1966;5:988–1002.

43. Greitz D, Hannerz J. A proposed model of cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1996;17(3):431–438.
44. Linninger AA, Xenos M, Sweetman B, Ponkshe S, Guo X, Penn R. A mathematical model of blood, cerebrospinal fluid and brain dynamics. *J Math Biol.* 2009;59(6):729–759.
45. Sasaki H, Tanaka N, Nakanishi K, et al. Therapeutic effects with magnetic targeting of bone marrow stromal cells in a rat spinal cord injury model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2011;36(12):933–938.
46. Häfeli UO, Gilmour K, Zhou A, Lee S, Hayden ME. Modeling of magnetic bandages for drug targeting: Button vs Halbach arrays. *J Magn Magn Mater.* 2007;311(1):323–329.
47. Novotna B, Jendelova P, Kapcalova M, et al. Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2012;210(1):53–63.

International Journal of Nanomedicine

Dovepress

## Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>



## The use of superporous Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified PHEMA scaffolds to promote cell adhesion and the differentiation of human fetal neural precursors

Šárka Kubinová <sup>a</sup>, Daniel Horák <sup>b,c,\*</sup>, Nataliya Kozubenko <sup>a,c</sup>, Václav Vaněček <sup>a,c,e</sup>, Vladimír Proks <sup>b,c</sup>, Jack Price <sup>d</sup>, Graham Cocks <sup>d</sup>, Eva Syková <sup>a,c,e</sup>

<sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic

<sup>c</sup> Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Charles University, V Úvalu 84, 150 18 Prague 5, Czech Republic

<sup>d</sup> Centre for the Cellular Basis of Behaviour, Institute of Psychiatry, King's College London, 125 Coldharbour Lane, London SE5 9NU, United Kingdom

<sup>e</sup> Department of Neuroscience, 2nd Medical Faculty, Charles University, V Úvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 March 2010

Accepted 21 April 2010

Available online 18 May 2010

#### Keywords:

Cell adhesion

Laminin

Mesenchymal stem cell

Neural cell

PolyHEMA

### ABSTRACT

Modifications of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) with laminin-derived Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide sequences have been developed to construct scaffolds that promote cell adhesion and neural differentiation. Radical copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate with 2-aminoethyl methacrylate (AEMA) and ethylene dimethacrylate in the presence of ammonium oxalate crystals resulted in the formation of superporous P(HEMA-AEMA) hydrogels. They were reacted with  $\gamma$ -thiobutyrolactone to yield 2-(4-sulfanylbutanamido)ethyl methacrylate (P(HEMA-AEMA)-SH) unit. The Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide was immobilized to the sulphydryl groups of P(HEMA-AEMA)-SH by 2',2'-dithiodipyridine linking reagent via 2-[4-(2-pyridylidisulfanyl)butanamido]ethyl methacrylate (P(HEMA-AEMA)-TPy). The adhesion and morphology of rat mesenchymal stem cells were investigated on the Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) as well as on PHEMA, P(HEMA-AEMA)-SH and P(HEMA-AEMA)-TPy hydrogels. Superporous Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified PHEMA scaffolds significantly increased the number of attached cells and their growth area on the hydrogel surface in the absence and in the presence of serum in the culture medium. Additionally, the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide supported the attachment, proliferation, differentiation and process spreading of human fetal neural stem cells during the first two weeks of expansion and contributed to the formation of a high percentage of more mature neural cells after four weeks of expansion. The Ac-CGGASIKVAVS-OH modification of superporous P(HEMA-AEMA) hydrogels improves cell adhesive properties and promotes neural stem cell differentiation.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Superporous three-dimensional scaffolds have been recently designed to provide support for tissue regeneration and the required transport of nutrients and metabolites to and from cells [1]. A range of polymer materials, both biodegradable and non-degradable, has been investigated in tissue engineering. While degradable polymers include polyurethane, polyphosphazene, poly(glycolic acid), poly(lactic acid) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) [2], poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) is a non-degradable material [3]. PHEMA is suitable as a scaffold material due to its good mechanical strength, elasticity, and long history of successful

application in medicine as well as because it can be easily fabricated in various architectures [4]. It is well tolerated *in vivo*; however, it lacks functional groups to which biological molecules can be easily attached. Therefore, reactive comonomers, typically containing carboxyl and amino groups, are incorporated in the material [5].

To improve bioadhesive properties in various tissue engineering applications, considerable efforts have been made to modify biomaterial surfaces by the immobilization of integrin binding epitopes of extracellular matrix (ECM) molecules, such as those from fibronectin, laminin and collagens [6]. The advantage of using these short epitopes rather than the whole protein is their easy manufacture, high stability and the possibility to incorporate the epitopes available for receptor binding at high surface density relative to the natural ECM [7]. Well-characterized cell adhesion ligands are fibronectin-derived RGD [8] or laminin-derived YIGSR and IKVAV peptides [9–12]. IKVAV has been shown to promote cell adhesion, migration, differentiation, growth, and neurite extension

\* Corresponding author. Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Heyrovsky Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic. Tel.: +420 296 809 260; fax: +420 296 809 410.

E-mail address: horak@imc.cas.cz (D. Horák).

[7,13–16]. Covalent coupling of cell adhesion ligands to polycaprolactone scaffolds has been shown to promote the adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells [8] or adipose-derived stem cells [9]. YIGSR and SIKVAV peptides have also been covalently coupled to P(HEMA-AEMA) hydrogels to enhance neural cell adhesion and neurite outgrowth [5].

The aim of this work was to investigate cell-surface interactions using the IKVAV adhesive peptide sequence covalently attached to a PHEMA scaffold. Various immobilization procedures were used to link the peptide to polymer materials including *N*-hydroxysuccinimide/1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (NHS/EDC) chemistry on amino, carboxyl and sulfhydryl groups, or maleimide [17–19]. The copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) with a low amount of 2-aminoethyl methacrylate (AEMA) was used to produce a reactive polymer hydrogel capable of modification with the laminin-derived Ac-CGGA-SIKVAVS-OH peptide terminated with acetylcysteine (Fig. 1). P(HEMA-AEMA) hydrogel was therefore reacted with  $\gamma$ -thiobutyrolactone to introduce sulfhydryl groups, which after activation with 2,2'-dithiodipyridine immobilized the Ac-CGGASIKVAVS-OH sequence via the SH groups of cysteine. To characterize the bio-adhesive properties of superporous Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels, the attachment and morphology of rat mesenchymal stem cells (MSCs) were studied. As PHEMA hydrogels have been previously investigated as a material for the regeneration of spinal cord injury [20] and, moreover, since laminin is a fundamental substrate in neuronal development, the effect of the Ac-CGGASIKVAVS-OH modification on neural cell adhesion, growth and differentiation was further investigated using human fetal neuronal precursors.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA; Röhm, Germany) and ethylene dimethacrylate (EDMA; Ugilor S.A., France) were purified by distillation. 2,2'-Azobisisobutyronitrile (AIBN; Fluka, Buchs, Switzerland) was crystallized from ethanol and used as an initiator. Ammonium oxalate (Lachema, Brno, Czech Republic) was crystallized from water under the formation of 30–90  $\mu$ m thick and ca. 0.3–10 mm long needle-like crystals and used as a porogen. 2-Aminoethyl methacrylate (AEMA) hydrochloride (Aldrich, St. Louis, MO, USA),  $\gamma$ -thiobutyrolactone (Aldrich), 2,2'-dithiodipyridine (Fluka, Buchs, Switzerland), imidazole (Fluka), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (Fluka), methanol (Lachema, Neratovice, Czech Republic) and dichloromethane (DCM; Lachema) were used as received. *N,N*-Dimethylformamide (DMF) was purchased from Lachema, Neratovice (Czech Republic) and purified by distillation under vacuum in the presence of ninhydrin solution. Protected Fmoc amino acids (Fmoc-AA) Fmoc-Gly-Ser( $\psi$ <sup>Me,Me</sup> pro)-OH and Fmoc-Val-Ser( $\psi$ <sup>Me,Me</sup> pro)-OH protected building block were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); 1-hydroxybenzotriazole (HOBT), *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIIC), trifluoroacetic acid (TFA) and 1,2-ethanedithiol (EDT) were purchased from Sigma–Aldrich. All other chemicals were from Lachema.

Ultrapure Q water ultrafiltered on a Milli-Q Gradient A10 System (Millipore, Molsheim, France) was used for all experiments.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), DMEM/Ham's F12 and fetal bovine serum (FBS), purchased from PAA Laboratories (Pasching, Austria), Primocin<sup>TM</sup> (Lonza, Cologne, Germany) and human serum albumin (Baxter, Deerfield, IL, USA) were used for cell cultivation. Reduced modified medium (RMM) contained DMEM/F12 and 3% human serum albumin. Human apo-transferrin, putrescine DiHCl, human recombinant insulin, progesterone, l-glutamine, sodium selenite, hEGF, and 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) were purchased from Sigma–Aldrich and human b FGF from PeproTech GmbH (Hamburg, Germany).

For immunofluorescent staining, Chemiblocker, mouse anti-nestin (clone 10C2), mouse anti-neurofilament 70 kDa (clone DA2) and mouse anti-synaptophysin (clone SY38), purchased from Millipore (Temecula, CA, USA), Triton X-100, bovine serum albumin (BSA), mouse anti-vinculin (clone hVIN-1) and mouse anti- $\beta$ III-tubulin (clone SDL3D10), purchased from Sigma–Aldrich, Alexa-Fluor 568 phalloidin, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and goat anti-mouse IgG antibody conjugated with Alexa-Fluor 488 and with Alexa-Fluor 594, purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Paisley, UK), were used.

### 2.2. Preparation of superporous P(HEMA-AEMA) hydrogels

A 5 ml polyethylene injection syringe equipped with a stainless filter was loaded with a suspension of freshly crystallized ammonium oxalate (2.55 g; 42.3 vol.%) in water, the excess solution removed by centrifugation, and the crystals washed with ethanol then dried at room temperature. HEMA (2.45 g), 2-aminoethyl methacrylate (AEMA; 25 mg; 1 wt.%), ethylene dimethacrylate (EDMA; 25 mg; 1 wt.%), AIBN (10 mg) and 1,4-dioxane (1.25 ml) were added. Excess solution was removed, and the mixture polymerized at 60 °C for 16 h. At the end of the reaction, the syringe was cut lengthwise, the hydrogel cylinder removed and cut with a razor to 0.7 mm thick discs. The resulting poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-2-aminoethyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), P(HEMA-co-AEMA-co-EDMA) – in further text abbreviated as P(HEMA-AEMA), discs were immersed first in a saturated NaCl solution for 24 h (to avoid cracks), then successively washed with 0.01 M HCl aqueous solution (each time 100 ml) for 4 days, and finally with water.

### 2.3. Synthesis of Ac-CGGASIKVAVS-OH

The Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide (Scheme 1) was prepared by a stepwise solid-phase synthesis on chlorotriptyl resin (Merck, Darmstadt, Germany). Pseudodoproline protected peptide blocks were used for the incorporation of Gly-Ser and Val-Ser peptide fragments.

A cycle of the synthesis (10 ml of solvent per gram of the resin) consisted of the following steps: (i) washing three times with DMF for 2 min, (ii) deprotection with 25% piperidine in DMF for 5 min, (iii) washing with DMF for 2 min, (iv) deprotection with 25% piperidine in DMF for 15 min, (v) washing four times with DMF for 2 min, and (vi) activation/coupling by the addition of 3 equivalents of Fmoc-AA in DMF preactivated with 3 equivalents of HOBT and DIIC (45 min). The coupling efficiency was monitored by a visual test with bromophenol blue [21]. Incomplete coupling reactions were repeated from steps (v) to (vi). Before cleavage, the resin was finally washed three times successively with DMF (1 min), DCM (1 min) and methanol (1 min). The cleavage and deprotection of the peptide were carried out in TFA:H<sub>2</sub>O:EDT (95:4:1 v/v/v) solution. Deprotected peptides were precipitated from the solutions in diethyl ether, dissolved in acetic acid and the acetic acid was evaporated under vacuum. The identity of the protected peptide was confirmed by MALDI–TOF MS analysis on a Bruker Biflex III mass spectrometer using a reflection mode and 2,5-dihydroxybenzoic acid as a matrix (5:1 matrix/peptide ratio). The spectrum showed dominant ions at 1033.9, 1055.9 and 1090.03 m/z, which are consistent with the expected protonated molecular ion M + H<sup>+</sup>, the sodium adduct ion M + Na<sup>+</sup> and the potassium adduct ion M + K<sup>+</sup> (Fig. 2).

### 2.4. Reaction of P(HEMA-AEMA) hydrogel with $\gamma$ -thiobutyrolactone

Forty P(HEMA-AEMA) discs were immersed in water (50 ml), and an aqueous solution (2.5 ml) of imidazole (0.34 g) and  $\gamma$ -thiobutyrolactone (0.5 ml) was added under

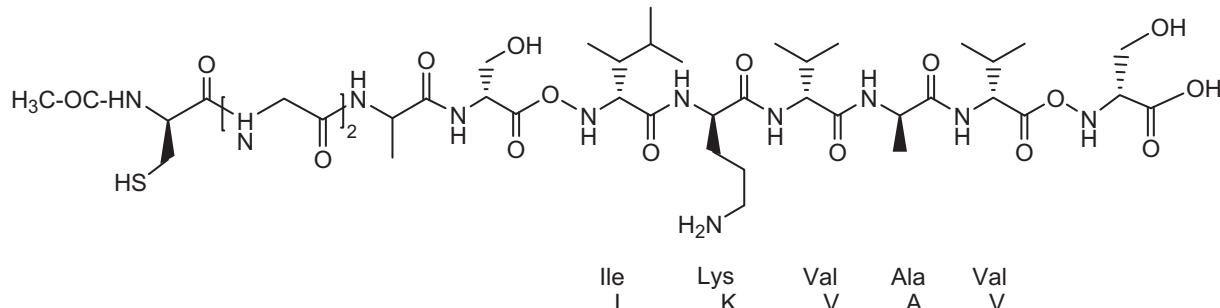
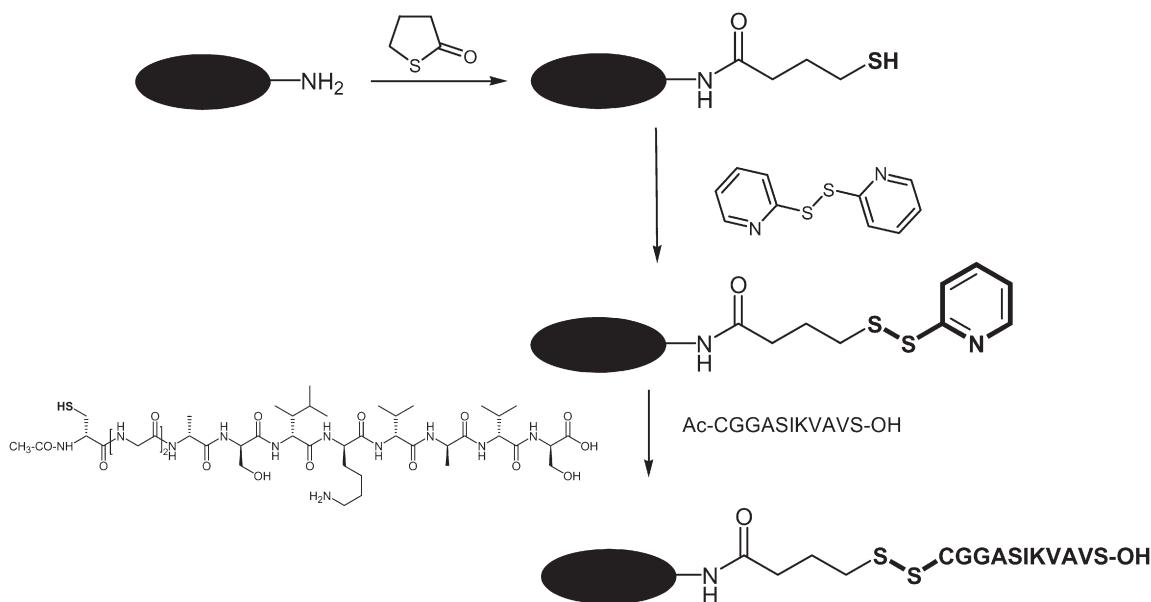


Fig. 1. Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide.



**Scheme 1.** Activation of P(HEMA-AEMA) hydrogel with  $\gamma$ -thiobutyrolactone and 2,2'-dithiodipyridine and the immobilization of Ac-CGGASIKVAVS-OH.

an argon atmosphere and the mixture gently stirred for 16 h (Scheme 1). At the end of the reaction, the discs were washed four times with water (80 ml), a 20% solution of ethanol in water and finally with water under an argon atmosphere. The resulting 2-(4-sulfanylbutanamido)ethyl methacrylate intermediate was denoted as P(HEMA-AEMA)-SH.

## 2.5. Activation with 2,2'-dithiodipyridine

2-(4-Sulfanylbutanamido)ethyl methacrylate hydrogel discs were immersed in a solution consisting of 0.1 M phosphate buffer (pH 8; 60 ml) and ethanol (20 ml). A solution of 2,2'-dithiodipyridine (25 mg) in ethanol (0.5 ml) was added, and the hydrogels reacted for 1 h under an argon atmosphere (Scheme 1). The discs were washed with a solution of 0.1 M phosphate buffer (pH 8; 60 ml) and ethanol (20 ml), then four times with water (80 ml) under an argon atmosphere. The resulting intermediate containing 2-[4-(2-pyridyldisulfanyl)butanamido]ethyl methacrylate was denoted as P(HEMA-AEMA)-TPy.

## 2.6. Immobilization of Ac-CGGASIKVAVS-OH

Thiopyridine-activated hydrogel discs (P(HEMA-AEMA)-TPy) were immersed in a solution of Ac-CGGASIKVAVS-OH (9.5 mg) in 1,1,1,3,3-hexafluoro-2-propanol (0.1 ml) and phosphate buffer (pH 8; 7 ml). The reaction proceeded for 16 h under gentle stirring and an argon atmosphere (Scheme 1). After the reaction, the UV–VIS spectrum of the solution was measured, and the hydrogels were washed five times

with water (60 ml). P(HEMA-AEMA)-Ac-CGGASIKVAVS-OH [termed SIKVAV-modified P(HEMA-AEMA)] discs were sterilized in ethanol (70 vol.%) for 40 h, transferred in a sterile 100 ml reagent bottle and repeatedly washed with sterile Q water to replace the ethanol under sterile conditions.

## 2.7. Characterization

A scanning electron micrograph was recorded on a JSM 6400 scanning electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). The sample was sputter-coated with 4 nm of Pt before imaging. The seeded cells were monitored on an AxioCam HRc Axioscop 2 Plus fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany) and a LSM 510 DUO laser scanning confocal microscope (Zeiss). To monitor the changes in the medium before and after the reaction of the hydrogel with Ac-CGGASIKVAVS-OH, UV–VIS spectroscopy of the eluates was performed using a Lambda 20 spectrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). The IR spectra of the polymers were recorded on a Perkin-Elmer FT-IR spectrometer Paragon 1000 PC. Elemental analysis was determined using a Perkin-Elmer model 2400 CHNS/O analyzer. To determine swelling ( $S_w$ ) and water regain in the pores ( $P$ ), hydrogel cylinders were swollen in water for 24 h, then the water was removed from the pores by suction on a glass filter and the polymer dried.

$$P = (m_w - m_c)/m_c \text{ (ml/g)}, \quad S_w = (m_c - m_o)/m_o,$$

where  $m_o$ ,  $m_w$  and  $m_c$  are the weights of dried and water-swollen hydrogels before and after the removal of water from the pores using a vacuum of water pump, respectively.

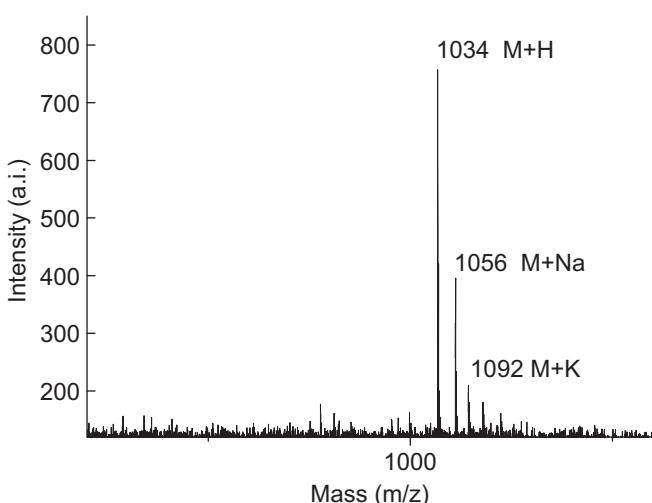
## 2.8. Cell culture

### 2.8.1. Rat mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated either from Wistar rats or from the enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic line of TgN (acro/act-EGFP)4Osb [22], which expresses EGFP under the control of a chicken promoter for  $\beta$ -actin and a cytomegalovirus enhancer. Briefly, femurs were dissected from 4-week-old rats. The ends of the bones were cut, and the marrow was extruded using a needle and a syringe with MSC culture medium containing DMEM with 10% FBS and Primocin™ (100  $\mu$ g/ml). After 24 h, the non-adherent cells were removed by replacing the medium. Cultures were kept in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C; cells up to the third passage were used for seeding hydrogel discs.

### 2.8.2. Human fetal neural stem cells

The human fetal neural stem cell (NSC) line SPC-01\_GFP-3, which is a conditionally immortalized cell line, was generated from 8-week-old human fetal spinal cord. For immortalization of the cell line, a previously described approach was used [23]. Briefly, retroviral vectors encoded the chimeric myc-ERTAM gene, which fused c-myc with a mutant of the estrogen receptor sensitive to 4-hydroxytamoxifen (4-OHT). The c-myc immortalized the cells (i.e., drove their continuous, stable expansion) while maintaining phenotypic and karyotypic stability in part through the activation of telomerase activity. This activity was regulated by 4-OHT. In the absence of 4-OHT, c-myc activity was absent, and the cells ceased constitutive expansion. SPC-01 cells were cultured in reduced modified media (RMM) which



**Fig. 2.** m/z spectrum of the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide.

contained DMEM/F12, 3% human serum albumin, human apo-transferrin (100 µg/ml), putrescine DiHCl (16.2 µg/ml), human recombinant insulin (5 µg/ml), progesterone (60 ng/ml), L-glutamine (2 mM), sodium selenite (40 ng/ml), hEGF (20 ng/ml), 4-OHT (100 nM) and human bFGF (10 ng/ml).

#### 2.8.3. Cell culture on hydrogel scaffolds

In cell attachment studies, the cell density and the cell growth area of EGFP-MSCs were determined 4 h after seeding in the presence and in the absence of serum in the culture medium. Sterile hydrogel discs were placed into a 24-well plate with MSC culture medium (1 ml per well; with or without FBS), seeded with a suspension of 30,000 EGFP-MSCs per disc and incubated in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C for 4 h. The hydrogels were then washed three times with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min and washed again three times with PBS. The number of attached cells was counted in three non-covered areas scanned from each disc using an AxioCam HRC Axioscop 2 Plus fluorescent microscope and ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The cell density per mm<sup>2</sup> was calculated from the number of cells counted in the objective field area. For quantitative evaluation of the extent of cell spreading on the hydrogel surface, the cell growth area was determined on each type of hydrogel; at least 30 cells were scanned using a laser scanning confocal microscope at 488 nm excitation wavelength, and their growth area was determined using ImageJ software. Each type of hydrogel was seeded in triplicate. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were determined using a one-way ANOVA test.

A suspension of SPC-01\_GFP-3 cells ( $10^5$ ) was seeded on P(HEMA-AEMA)-SH or Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogel discs in a 24-well plate with RMM medium and cultured for 28 days. The growth and differentiation of SPC-01\_GFP-3 cells were analyzed using immunofluorescent labeling for βIII-tubulin, nestin, neurofilaments and synaptophysin after 1, 7, 14 and 28 days. Quantitative analysis was carried out by counting the number of immunoreactive cells and comparing that number to the total number of viable cells as determined by DAPI staining. A minimum of 20 random fields from a laser scanning confocal microscope were analyzed for each type of marker.

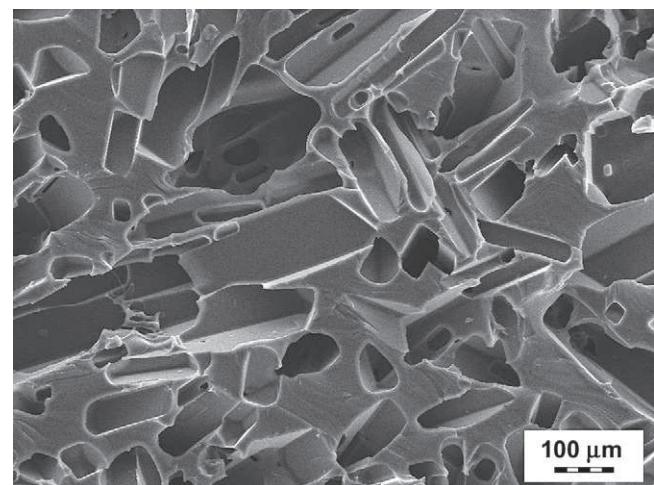
#### 2.8.4. Immunofluorescent staining

For immunofluorescent staining, cells grown on hydrogel discs were fixed in paraformaldehyde in PBS for 15 min, washed with 0.1 M PBS and treated with Chemiblocker (1:20) and Triton X-100 (0.5%) in PBS. MSCs were incubated with Alexa-Fluor 568 phalloidin (1:300) and with an antibody to vinculin (1:200) diluted in 0.1 M PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and Triton X-100 (0.5%). This was followed by incubation with a secondary goat anti-mouse IgG antibody conjugated with Alexa-Fluor 488 (1:200) diluted in 0.1 M PBS containing Triton X-100 (0.5%). SPC-01\_GFP cells were incubated with antibodies to βIII-tubulin (1:200), nestin (1:2000), NF70 (1:200) or synaptophysin (1:1000) diluted in PBS (0.1 M) containing 1% BSA and Triton X-100 (0.5%). This was followed by incubation in secondary goat anti-mouse IgG antibody conjugated with Alexa-Fluor 594 (1:200). The nuclei were visualized using DAPI (1:200). Fluorescent images were acquired by a LSM 510 DUO laser scanning confocal microscope (Zeiss).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preparation of superporous P(HEMA-AEMA) hydrogels

This report is a continuation of our earlier published works on PHEMA hydrogels prepared for tissue engineering [24]. P(HEMA-AEMA) hydrogel slabs were prepared by the bulk radical copolymerization of HEMA with low amounts (1 wt.%) of both 2-aminoethyl methacrylate (AEMA) and ethylene dimethacrylate (EDMA). While AEMA introduced an amino functionality for the subsequent attachment of a biomolecule, e.g., of a cell adhesive peptide, with the aim of improving cell adhesion, cross-linking with EDMA hindered dissolution of the polymer. Polymerizations were run in syringes where all the monomers (HEMA, AEMA and EDMA) were dissolved in 1,4-dioxane in the presence of freshly crystallized ammonium oxalate porogen (42.3 vol.%) [25]. The salt, which was in the form of needle-like crystals, was dissolved and washed out after completion of the polymerization creating interconnected pores in the polymer matrix (Fig. 3). The cylinders resulting from the polymerization were cut to 0.7 mm thick discs that were then further modified to facilitate the immobilization of the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide. Elemental analysis of the resulting P(HEMA-AEMA) hydrogel confirmed the presence of nitrogen (0.35 wt.%), indicating that AEMA was incorporated in the polymer (Table 1). This amount roughly corresponded to the



**Fig. 3.** SEM micrograph of a cross-section of the superporous P(HEMA-AEMA) hydrogel.

theoretical content of nitrogen in synthesized microspheres (0.15 wt.%) calculated from the feed composition if the accuracy of the nitrogen analysis ( $\pm 0.2$  wt.%) is considered. Such a low AEMA content was, however, not detectable using IR spectroscopy as no difference between the PHEMA and P(HEMA-AEMA) spectra was found (data not shown). As expected, water regain in the pores of the P(HEMA-AEMA) hydrogel was 0.45 ml/g, which corresponds to the volume of ammonium oxalate added in the polymerization. The swelling of P(HEMA-AEMA) reached 1 ml/g, which is more than the equilibrium water swelling of homogeneous PHEMA [26] (~39%). This discrepancy can be explained by the water contained in closed pores.

#### 3.2. Reaction of P(HEMA-AEMA) hydrogel with γ-thiobutyrolactone and activation with 2,2'-dithiodipyridine

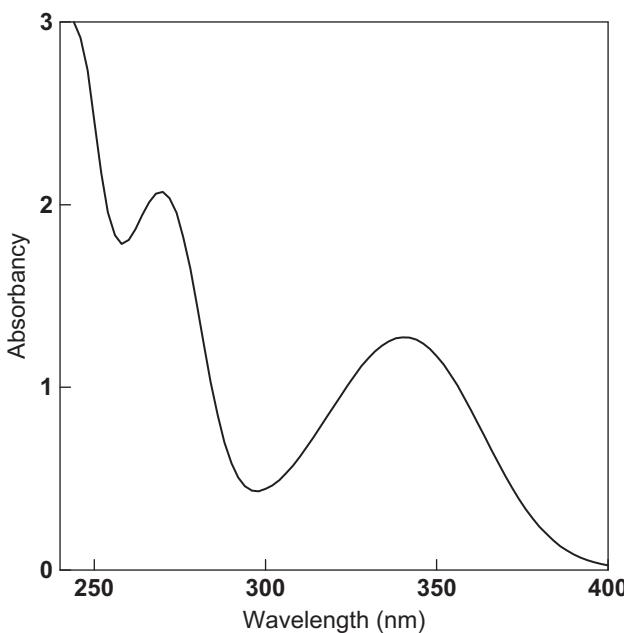
The treatment of the amine group of the P(HEMA-AEMA) hydrogel with γ-thiobutyrolactone provided a 2-(4-sulfanylbutanamido)ethyl methacrylate compound having a sulphydryl functional group and an alkyl-OCNH-alkyl spacer moiety (Scheme 1). Elemental analysis of P(HEMA-AEMA)-SH found 0.45 wt.% S, indicating the completion of the reaction with γ-thiobutyrolactone (Table 1). The amount of sulfur found was higher than that calculated (0.19 wt.%) assuming a quantitative reaction; however, it is also necessary to take into account a possible error in the sulfur determination ( $\pm 0.3\%$ ). The reaction of 2,2'-dithiodipyridine with 2-(4-sulfanylbutanamido)ethyl methacrylate (P(HEMA-AEMA)-SH) gave 2-[4-(2-pyridylsulfanyl)butanamido]ethyl methacrylate (the resulting product is denoted as P(HEMA-AEMA)-TPy; Scheme 1) containing 0.84 wt.% S according to elemental analysis (Table 1). The sulfur content was thus almost doubled compared with that in γ-thiobutyrolactone-modified hydrogel, thus suggesting successful activation with 2,2'-dithiodipyridine.

**Table 1**  
Results of elemental analysis of hydrogels (wt.%).

P(HEMA-AEMA)	P(HEMA-AEMA)-SH	P(HEMA-AEMA)-TPy	Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA)
0.35 <sup>a</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.84 <sup>b</sup>	0.67 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Nitrogen.

<sup>b</sup> Sulfur.



**Fig. 4.** UV–VIS spectrum of the solution after the reaction of P(HEMA-AEMA)-TPy hydrogel with Ac-CGGASIKVAVS-OH measured against the reference (phosphate buffer, pH 8).

### 3.3. Immobilization of Ac-CGGASIKVAVS-OH

Conventional anchoring of the IKVAV peptide through NHS/EDC chemistry reduced peptide activity [27]. In order that the IKVAV was not bound close to the hydrogel surface, possibly inducing its inactivation, a GGA spacer was incorporated in the peptide sequence (Fig. 1) to distance the active peptide part from the surface. Moreover, cysteine (C) was included as the N-terminal amino acid of the peptide. Cysteine contains a highly reactive sulphydryl group necessary for the immobilization of the peptide on the hydrogel surface. The Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide was thus immobilized on P(HEMA-AEMA)-TPy hydrogel discs (Scheme 1). Elemental analysis of SIKVAVS-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels confirmed the presence of 0.67 wt.% of S, suggesting the successful immobilization of the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide on the hydrogel (Table 1). This was also supported by the release of 2-thiopyridone with

characteristic absorption bands at 271 nm and 341 nm in the UV spectrum of the solution after the immobilization of Ac-CGGASIKVAVS-OH (Fig. 4). Analogous results were published earlier [28].

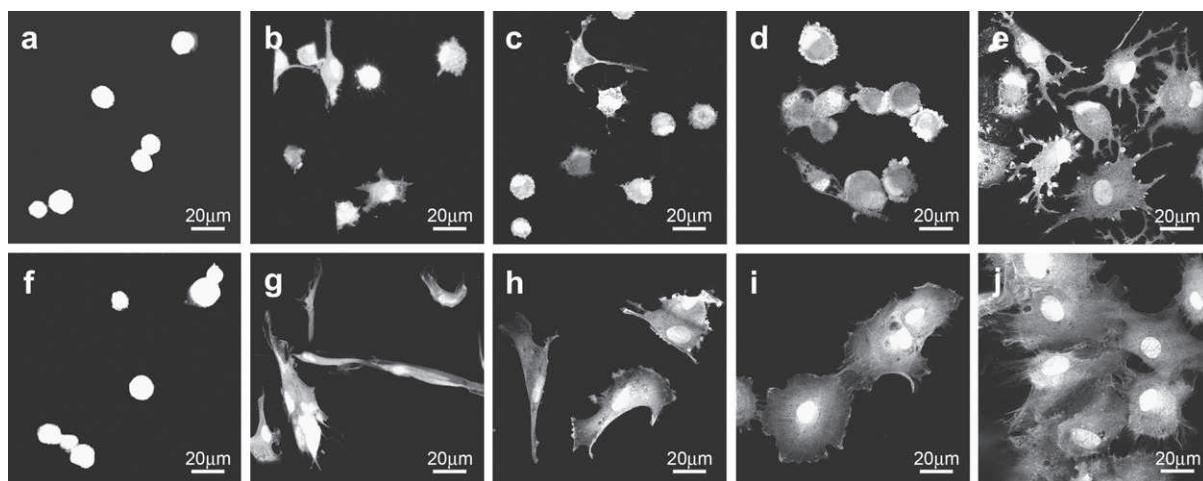
### 3.4. Cell studies

#### 3.4.1. Cell attachment and the morphology of MSCs

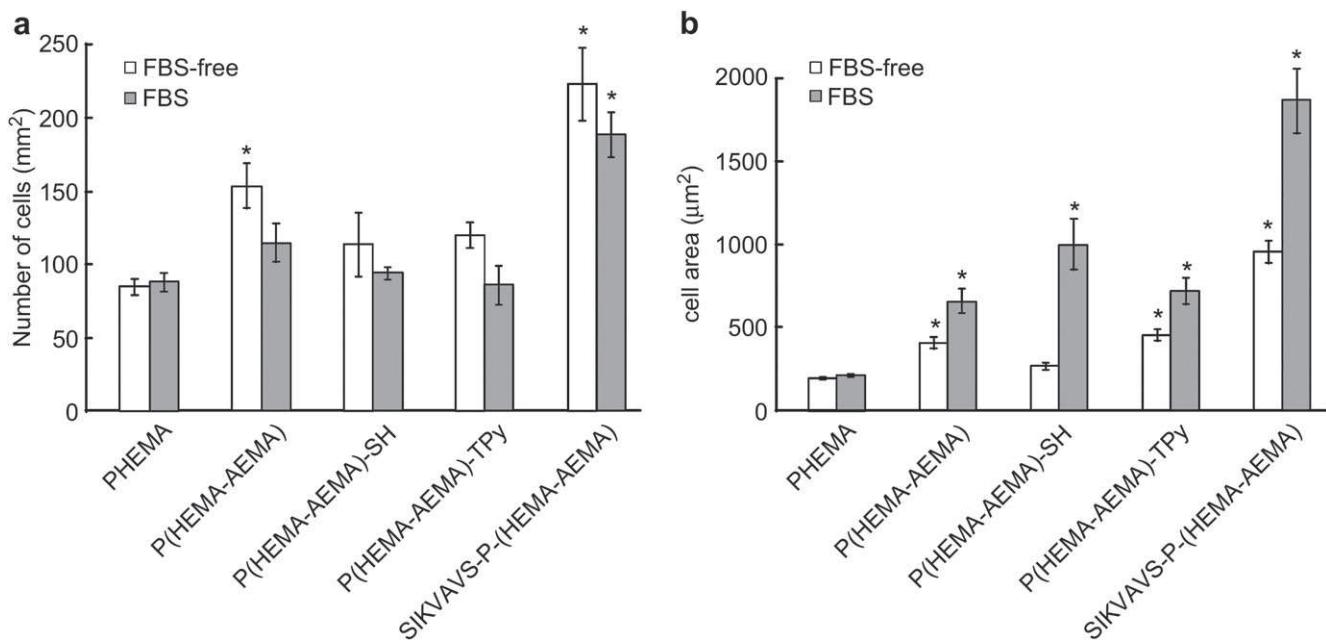
The role of the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide as well as the amino, thiobutyrolactone and dithiopyridine functionalities on PHEMA hydrogels were investigated by determining the cell density and cell growth area of MSCs on PHEMA, P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH, P(HEMA-AEMA)-TPy and Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels after 4 h of culture. To reveal the role of serum in cell adhesion, EGFP-MSCs and MSCs were cultured in the presence, as well as in the absence, of FBS in the culture medium. In our previous experiments, the cultivation of MSCs for 4 h in the absence of serum did not significantly affect cell viability [24]. Fetal bovine serum (FBS), which is required for cell growth in culture, is a mix of proteins containing mainly bovine serum albumin, but also proteins such as fibronectin or vitronectin that are adsorbed onto the substrate surface, thus enabling cell adhesion through integrin receptor links [29]. The evaluation of cell attachment and cell morphology in the absence of serum can thus reveal the real contribution of various surface chemistries to cell-surface interactions.

In the absence of serum, cells attached to neat PHEMA hydrogels remained in a spherical shape and did not spread (Fig. 5a), as described in detail previously [24]. Partly flattened cells that began to spread were attached to P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH and P(HEMA-AEMA)-TPy hydrogels (Fig. 5b–d). On the other hand, a remarkably different morphology of adhered cells, together with a strong cellular affinity, was found on the Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels. Fig. 5e shows that MSCs that had spread on the Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogel surface formed numerous branched lamelipodia and membrane protrusions, thus confirming the presence of active binding domains recognized by the cells via their integrin receptors.

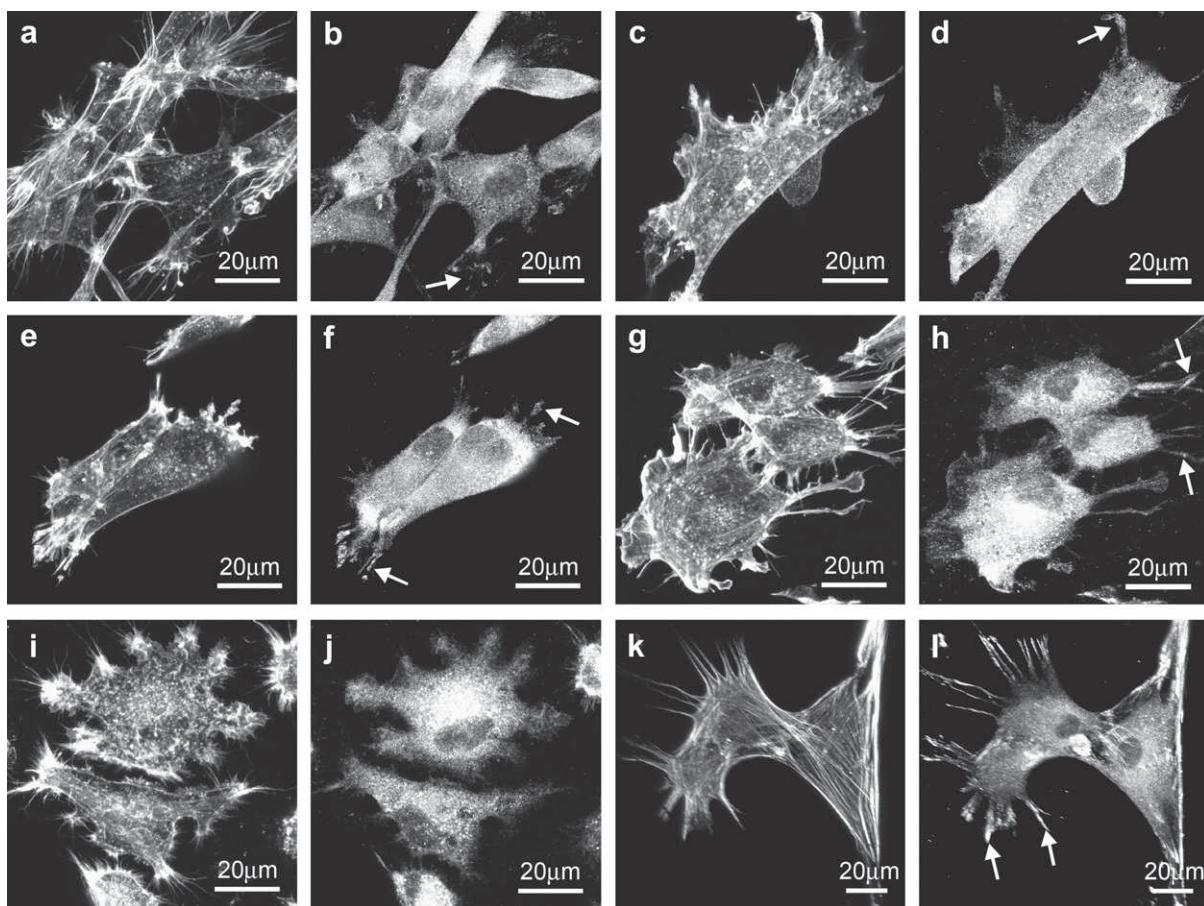
In the presence of serum, MSCs spread well on P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH, P(HEMA-AEMA)-TPy as well as on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels (Fig. 5g–j), but not on neat PHEMA hydrogels (Fig. 5f). Quantitative analysis revealed a significantly higher cell density and cell growth area on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) than that on



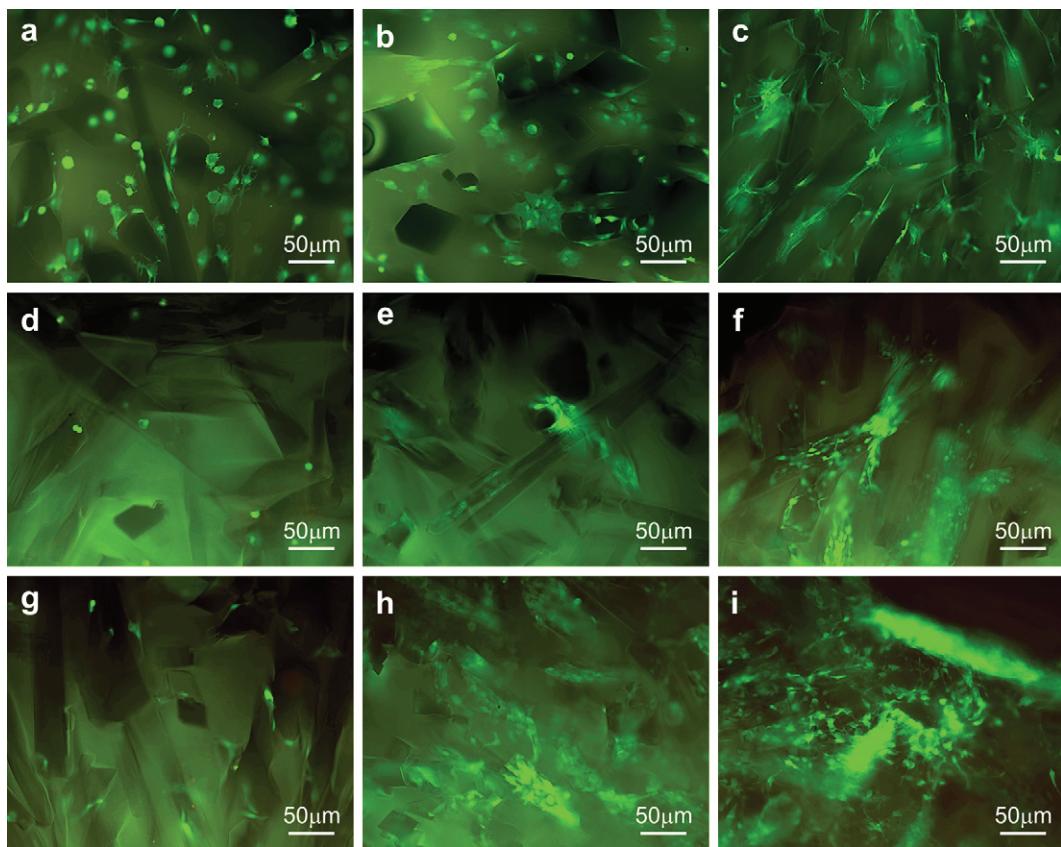
**Fig. 5.** Laser scanning confocal micrographs of MSCs cultivated on superporous (a, f) PHEMA, (b, g) P(HEMA-AEMA), (c, h) P(HEMA-AEMA)-SH, (d, i) P(HEMA-AEMA)-TPy and (e, j) Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) in (a–e) FBS-free and (f–j) FBS-containing medium for 4 h.



**Fig. 6.** (a) Cell density and (b) the cell growth area of EGFP-MSCs seeded on different hydrogels for 4 h in the presence and the absence of serum (FBS) in the culture medium. \*p < 0.05 compared to PHEMA hydrogel.



**Fig. 7.** Laser scanning confocal micrographs of MSCs cultivated on superporous (a, b) P(HEMA-AEMA), (c, d) P(HEMA-AEMA)-SH, (e, f) P(HEMA-AEMA)-TPY and (g–l) Ac-GGA-SIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA), in (a–h, k, l) FBS-containing medium and in (i, j) FBS-free medium for (a–j) 4 h or (k, l) 3 days of culture. Immunofluorescent staining was done for (a, c, e, g, i, k) phalloidin and (b, d, f, h, j, l) vinculin. Vinculin adhesion spots are indicated by arrows.



**Fig. 8.** Fluorescent micrographs of (a, b) EGFP-MSCs, (c) MSCs and (d–i) SPC-01\_GFP-3 cultured on (a–c, g–i) AcCGGA SIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) and on (d–f) P(HEMA-AEMA)-SH hydrogel slabs for (a) 4 h in the absence of serum, (b) 4 h in the presence of serum, (c) 3 days, (d, g) 1 day, (e, h) 1 week and (f, i) 2 weeks. (c) MSCs were stained for vinculin.

P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH and P(HEMA-AEMA)-TPy hydrogels both in the presence and in the absence of serum (Fig. 6a, b). Moreover, when compared to neat PHEMA, a significantly higher cell growth area was found on P(HEMA-AEMA) and P(HEMA-AEMA)-TPy hydrogels in the absence of serum and on P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH and P(HEMA-AEMA)-TPy in the presence of serum (Fig. 6b).

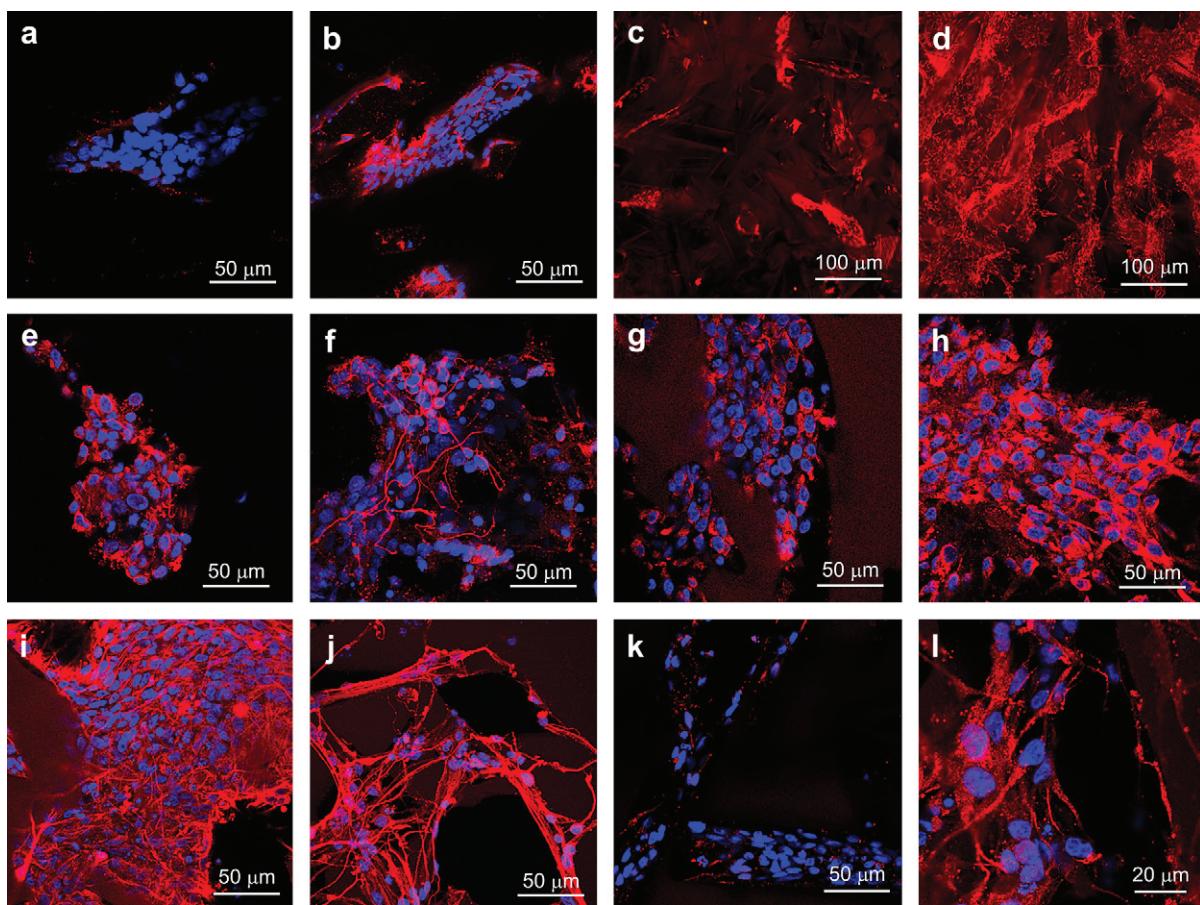
In our previously published work we have shown that the porosity of the PHEMA scaffold promoted cell attachment, but the presence of a bioadhesive component led to proper cell adhesion and growth [24] via an integrin link to specific domains. These integrin binding sites can be originally immobilized in the scaffold (e.g., RGD, IKVAV) or the integrin–substrate link can be indirectly mediated through bioadhesive serum proteins that adsorb on the substrate. Accordingly, MSCs attached on the superporous PHEMA scaffold did not spread and kept their spherical shape. When compared to PHEMA, the introduction of amino, sulphydryl or dithiopyridyl functionalities had no significant effect on the number of attached cells, but significantly improved cell spreading (cell growth area), particularly in the presence of serum (Fig. 6). This suggests that the modification of superporous PHEMA hydrogels by the incorporation of AEMA and also the subsequent introduction of sulphydryl and dithiopyridyl groups promoted the adsorption of integrin binding serum proteins and consequently cell spreading.

As a confirmation of the successful Ac-CGGASIKVAVS-OH immobilization on the P(HEMA-AEMA) hydrogel, markedly increased cell density as well as cell growth area, independent of the presence of serum, were found. This indicates that the IKVAV epitope of the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide attached to the PHEMA

hydrogel was available for integrin receptor binding and thus could effectively mediate cell-surface interaction. Unlike the native protein laminin, IKVAV epitope immobilization through a CGGA spacer provided a short-distance interface between the active peptide and the scaffold with greater stability. As was shown in a previous report [24], the immobilization of laminin on PHEMA hydrogels did not improve either the number of attached cells or their morphology, probably due to the inadequate spacing or configuration of the laminin on the PHEMA surface, both of which are necessary for contact with integrins on the cell surface.

As follows from Fig. 6a, the presence of serum proteins in the culture medium did not significantly increase the number of attached cells, but increased the cell growth area on all studied hydrogel modifications, except PHEMA. This is in agreement with a previous study of cell attachment on cholesterol-modified PHEMA hydrogels, where the serum proteins adsorbed onto the cholesterol moiety even decreased its high cell affinity [24].

To study cell adhesion on the hydrogel surface, the cytoskeletal organization and focal adhesion were investigated using immunofluorescent staining for F-actin and vinculin (Fig. 7). Confocal micrographs of MSCs confirmed the development of early actin filaments after 4 h of culture on P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH as well as on P(HEMA-AEMA)-TPy hydrogels in the presence of the serum (Fig. 7a–h). No apparent actin fiber formation was observed after 4 h of culture on PHEMA, and in the absence of the serum on P(HEMA-AEMA), P(HEMA-AEMA)-SH and P(HEMA-AEMA)-TPy hydrogels (not shown). However, after 4 h of culture on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels, MSCs developed actin filaments and formed numerous thin filament



**Fig. 9.** NSCs cultivated on (a, c, e, g, i, k) P(HEMA-AEMA)-SH and (b, d, f, h, j, l) Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels for (a–d) 1 week, (e–h) 2 weeks and (i–l) 4 weeks. Immunofluorescent staining for (a, b, e, f, i, j)  $\beta$ III-tubulin/DAPI, (c, d) nestin, (g, h) NF70/DAPI and (k, l) synaptophysin/DAPI.

terminals (filopodia) on the margin of cell protrusions in the absence (Fig. 7i, j) as well as in the presence of serum (Fig. 7g, h). Vinculin staining revealed diffuse staining throughout the cell cytoplasm and around cell nuclei (Fig. 7b, d, f, h, j). The characteristic development of the vinculin focal adhesion spots located at the ends of actin filaments was well documented on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels after 3 days of culture (Fig. 7l), but some vinculin spots were also observed already after 4 h of culture, as indicated by arrows in Fig. 7.

Morphological observations after 4 h as well as after 3 days of culture on the Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels revealed that MSCs were localized mostly on the flat hydrogel surface; fewer cells grew in the hydrogel pores, where they had long and thin shapes as they adapted to the porous surface (Fig. 8a–c).

#### 3.4.2. Differentiation and growth of neural precursor cells

To analyze the effect of the Ac-CGGASIKVAVS-OH ligand on the growth and differentiation of neural cells (NSCs), human fetal NSCs

(SPC-01\_GFP-3 line) were cultured on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogel and their growth was compared with that of NSCs grown on P(HEMA-AEMA)-SH hydrogel.

Fig. 8d–i shows the adhesion and the proliferation of NSCs seeded on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) (Fig. 8g–i) and on P(HEMA-AEMA)-SH hydrogels (Fig. 8d–f) during the first two weeks of cultivation. The cell density gradually increased on both hydrogels, with a higher cell density and better cell adhesion on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels compared to P(HEMA-AEMA)-SH hydrogels. On both hydrogels, NSCs grew and proliferated in clusters distributed in the pores rather than on the flat hydrogel surface.

Histological evaluation together with a quantitative analysis of neural differentiation was performed after 1, 2 and 4 weeks of cultivation. One week after NSC seeding, neural cells grown on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels formed larger nestin-positive groups with some  $\beta$ III-tubulin-positive processes (Fig. 9b, d), while cell clusters on P(HEMA-AEMA)-SH hydrogel were smaller, less attached to the hydrogel surface and

**Table 2**

Quantitative analysis of neural-specific marker expression.

	1 week	2 weeks		4 weeks		
	$\beta$ III-tubulin	$\beta$ III-tubulin	NF70	$\beta$ III-tubulin	NF70	Synaptophysin
P(HEMA-AEMA)-SH	0.1%	2.2%	31.8%	41.2%	10.7%	12.3%
Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA)	65.8%	41.6%	52.0%	38.4%	18.1%	42.2%

Proportion of cells that expressed neural-specific markers during their expansion on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) and P(HEMA-AEMA)-SH hydrogels.

staining for  $\beta$ III-tubulin (Fig. 9a) and nestin (Fig. 9c) was weak. Quantitative analysis revealed 65.8%  $\beta$ III-tubulin-positive cells on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) compared to 0.1% on P(HEMA-AEMA)-SH (Table 2).

After two weeks of culture, NSCs proliferated on both types of hydrogels (Fig. 8f, i), but they revealed differences in cell morphology and immunocytochemical staining for neuronal markers. NSCs growing on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels formed long processes and displayed a neuron-like morphology: 41.6% of cells were positive for  $\beta$ III-tubulin (Fig. 9f) and 52% for NF70 (Fig. 9h). In contrast, NSCs grown on P(HEMA-AEMA)-SH hydrogels did not show a neuron-like morphology and revealed weaker staining for  $\beta$ III-tubulin (2.2%, Fig. 9e) as well as for NF70 (31.85%, Fig. 9g).

After four weeks of culture, the density of  $\beta$ III-tubulin-positive neural cells was very similar on both types of hydrogels (Fig. 9i, j). However, the cells growing on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels revealed a more clearly neuron-like morphology and were more positive for NF70 – 18.7%, compared to 10.7% of NF70-positive cells found on P(HEMA-AEMA)-SH hydrogels. Moreover, 42.2% of the cells were positive for synaptophysin and displayed neuronal processes that spread on the Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogel surface (Fig. 9l). On the other hand, neural cells growing on P(HEMA-AEMA)-SH hydrogels revealed just 12.3% of cells positive for synaptophysin, and these cells did not have a specific neuronal pattern (Fig. 9k).

The data thus suggest that the Ac-CGGASIKVAVS-OH modification enhanced the attachment, proliferation and differentiation of NSCs on P(HEMA-AEMA) hydrogels during the first two weeks of expansion. After 2 weeks of culture, the NSCs proliferated and differentiated to a similar extent on both types of hydrogels. In the case of cell clusters, however, it is hard to evaluate the actual effect of the substrate on cell proliferation, as most of the cells, after their expansion on the hydrogel surface, grew on the lower layers of cells as if on a feeder layer, without any direct contact with the hydrogel. Nevertheless, quantitative analysis performed during 4 weeks of cell expansion confirmed the supportive effect of the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide on neural differentiation: a greater proportion of  $\beta$ III-tubulin- and NF70-positive cells as well as more mature neural cells (synaptophysin-positive) were found on Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels when compared to P(HEMA-AEMA)-SH hydrogels. It has already been shown that a high level of  $\beta$ III-tubulin expression is found in developing and regenerating neurons during the longitudinal growth of axons. In contrast, the induction of NF70 gene expression is associated with the radial growth of axons in maturing neurons [30]. This finding correlates with our results showing a decrease in  $\beta$ III-tubulin expression levels in cells growing on the Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels (Table 2).

#### 4. Conclusions

The IKVAV sequence is known as a neurite/guiding integrin binding epitope present in the extracellular protein laminin. In this study, a novel Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide was immobilized on a superporous P(HEMA-AEMA) hydrogel via  $\gamma$ -thiobutyrolactone and 2,2'-dithiodipyridine. The immobilization of the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide onto the thiopyridine-modified P(HEMA-AEMA) hydrogel was monitored using UV-VIS spectroscopy. The capability of the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide to expose its active sequences for integrin receptor binding was demonstrated by improved cell attachment and spread on superporous Ac-CGGASIKVAVS-OH-modified P(HEMA-AEMA) hydrogels in the presence as well as in the absence of serum in the culture medium, as well as by the improved differentiation of NSCs. In addition, when compared to neat PHEMA hydrogels, the introduction of amino, sulphydryl or

dithiopyridyl functionalities yielded a significant improvement of cell adhesion, but not of cell attachment, suggesting the partial contribution of these hydrogel modifications to cell affinity. The results indicate that the modification of PHEMA with the Ac-CGGASIKVAVS-OH peptide is an effective method to increase cell adhesion. The bioadhesive properties of the Ac-CGGASIKVAVS-OH modification of P(HEMA-AEMA) hydrogels thus highlight its potential for tissue engineering applications.

#### Acknowledgment

We thank James Dutt for critical reading of the manuscript. This work was supported through grants: the EC FP6 project Artemis (LSHM-CT-2007-037862), AVOZ 503 90 703, 1M0538, LC 554, GAAV IAA 500 390 902, KAN200200651, P108/10/1560, GA CR 309/08/H079.

#### References

- [1] Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 2005;7:518–24.
- [2] Rice MA, Sanchez-Adams J, Anseth KS. Exogenously triggered, enzymatic degradation of photopolymerized hydrogels with polycaprolactone subunits: experimental observation and modeling of mass loss behavior. *Biomacromolecules* 2006;7:1968–75.
- [3] Horál D, Jayakrishnan A, Arshady R. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. Preparation and properties. Vol. 1. In: Arshady R, editor. *Introduction to polymeric biomaterials*. The PMB series. London: Citus Books; 2003. p. 65–107.
- [4] Atzet S, Curtin S, Trinh P, Bryant S, Ratner B. Degradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-polycaprolactone hydrogels for tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules* 2008;9:3370–7.
- [5] Yu TT, Shoichet MS. Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:1507–14.
- [6] von der Mark K, Park J, Bauer S, Schmuki P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: Cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 2009;339:131–53.
- [7] Silva GA, Czeisler C, Niece KL, Beniash E, Harrington DA, Kessler JA, et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science* 2004;303:1352–5.
- [8] Zhang H, Lin CY, Hollister SJ. The interaction between bone marrow stromal cells and RGD-modified three-dimensional porous polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials* 2009;30:4063–9.
- [9] Santiago LY, Nowak RW, Rubin JP, Marra KG. Peptide-surface modification of poly(caprolactone) with laminin-derived sequences for adipose-derived stem cell applications. *Biomaterials* 2006;27:2962–9.
- [10] Lin X, Takahashi K, Liu Y, Zamora PO. Enhancement of cell attachment and tissue integration by a IKVAV containing multi-domain peptide. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:1403–10.
- [11] Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth KS. The effects of cell–matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials* 2007;28:3004–11.
- [12] Jongpaiboonkit L, King WJ, Murphy WL. Screening for 3D environments that support human mesenchymal stem cell viability using hydrogel arrays. *Tissue Eng* 2009;15:343–53.
- [13] Park H, Cannizzaro C, Vunjak-Noyakovic G, Langer R, Vacanti CA, Farokhzad OC. Nanofabrication and microfabrication of functional materials for tissue engineering. *Tissue Eng* 2007;13:1867–77.
- [14] Bryant SJ, Anseth KS. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res* 2002;59(1):63–72.
- [15] Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleiman HK, et al. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 1989;264:16174–82.
- [16] Gunn JW, Turner SD, Mann BK. Adhesive and mechanical properties of hydrogels influence neurite extension. *J Biomed Mater Res* 2005;72:91–7.
- [17] Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM, Thompson KM, Wilson C, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res* 2004;21:2234–46.
- [18] Metters AT, Anseth KS, Bowman CN. A statistical kinetic model for the bulk degradation of PLA-*b*-PEG-*b*-PLA hydrogel networks: Incorporating network non-idealities. *J Phys Chem B* 2001;105:8069–76.
- [19] Homsy CA. Bio-compatibility in selection of materials for implantation. *J Biomed Mater Res* 1970;4(3):341–56.
- [20] Hejcl A, Lesny P, Pradny M, Michalek J, Jendelova P, Stulik J, et al. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol Res* 2008;57:121–32.

- [21] Krchnak V, Vagner J, Lebl M. Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid–base indicator. *Int J Pept Protein Res* 1988;32:415–6.
- [22] Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdóttir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 2002;532:227–30.
- [23] Pollock K, Stroemer P, Patel S, Stevanato L, Hope A, Miljan E, et al. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol* 2006;199:143–55.
- [24] Kubinová Š, Horák D, Sýková E. Cholesterol-modified superporous poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2009;30:4601–9.
- [25] Horák D, Hlídková H, Hradil J, Lapčíková M, Šlouf M. Superporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based scaffolds: Preparation and characterization. *Polymer* 2008;49:2046–54.
- [26] Wichterle O. Hydrogels. Vol. 15. In: Mark HF, Gaylord NG, Bikales NM, editors. Encyclopedia of polymer science and technology. New York: J. Wiley; 1971. p. 273–91.
- [27] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007;32:762–98.
- [28] Grassetto DR, Murray Jr JF. Determination of sulphydryl groups with 2,2'- and 4,4'-dithiodipyridine. *Arch Biochem Biophys* 1967;119:41–9.
- [29] Yamada KM, Pankov R, Cukierman E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:959–66.
- [30] Hoffman PN, Cleveland DW. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:4530–3.



# The use of dopamine-hyaluronate associate-coated maghemite nanoparticles to label cells

Michal Babic<sup>1,2</sup>

Daniel Horak<sup>1,2</sup>

Pavla Jendelova<sup>2,3</sup>

Vit Herynek<sup>2,4</sup>

Vladimir Proks<sup>1,2</sup>

Vaclav Vanecek,<sup>2,3</sup>

Petr Lesny<sup>2,3</sup>

Eva Sykova<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovsky Sq 2, <sup>2</sup>Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Charles University, V Uvalu 84, <sup>3</sup>Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, <sup>4</sup>Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958, Prague, Czech Republic

**Abstract:** Sodium hyaluronate (HA) was associated with dopamine (DPA) and introduced as a coating for maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles obtained by the coprecipitation of iron(II) and iron(III) chlorides and oxidation with sodium hypochlorite. The effects of the DPA anchorage of HA on the  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> surface on the physicochemical properties of the resulting colloids were investigated. Nanoparticles coated at three different DPA-HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and DPA/HA ratios were chosen for experiments with rat bone marrow mesenchymal stem cells and human chondrocytes. The nanoparticles were internalized into rat bone marrow mesenchymal stem cells via endocytosis as confirmed by Prussian Blue staining. The efficiency of mesenchymal stem cell labeling was analyzed. From among the investigated samples, efficient cell labeling was achieved by using DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with DPA-HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 0.45 (weight/weight) and DPA/HA = 0.038 (weight/weight) ratios. The particles were used as a contrast agent in magnetic resonance imaging for the labeling and visualization of cells.

**Keywords:** nanoparticles, dopamine, hyaluronate, cell labeling, magnetic

## Introduction

Magnetic nanoparticles and nanowires are currently utilized in a wide variety of medical diagnostic and therapeutic applications such as hyperthermia, cell sorting, cell tracking and tissue engineering,<sup>1</sup> as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI), and for the manipulation and spatial organization of cells.<sup>2</sup> Cell labeling with magnetic nanoparticles is an increasingly common method for cell separation as well as for the repeated noninvasive monitoring of the migration and distribution of transplanted cells in the host tissue by MRI.<sup>3</sup>

As water in the tissue contains most of the protons, MRI in fact detects the distribution of tissue water. However, MRI contrast can also be weighted by different physical properties of the detected water molecules, the most important of which are the so-called relaxation times T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, or T<sub>2</sub>\*, thus even native MRI (without the application of contrast agents) provides valuable information about the tissue. However, the resolution of MRI is too low to detect single cells, therefore it is necessary to label transplanted cells with a suitable contrast agent to enable their subsequent detection using MRI. Although MRI does not detect the contrast agent itself, contrast agents considerably alter the relaxation times of water in their vicinity and thus influence the contrast of the images. As a result, the size of the area impacted by a contrast agent is considerably larger than the size of the contrast agent – or the size of the labeled cell – itself. Superparamagnetic nanoparticles create local inhomogeneities in a static field leading to the considerable shortening of T<sub>2</sub> and T<sub>2</sub>\* relaxation times and rapid signal loss.

Correspondence: Daniel Horak  
Institute of Macromolecular Chemistry,  
Academy of Sciences of the  
Czech Republic, Heyrovsky Sq 2,  
162 06 Prague 6, Czech Republic  
Tel +420 296 809 260  
Fax +420 296 809 410  
Email horak@imc.cas.cz

Their presence is therefore manifested by hypointense areas in a T<sub>2</sub>-weighted or T<sub>2</sub>\*-weighted MRI.

Magnetic cell labeling could also aid cell-based therapies by directing stem cells to diseased locations<sup>4</sup> and providing cell-based carriers to transport therapeutic genes to tumors.<sup>5</sup> Iron oxide nanoparticles, especially maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ones, are the most suitable magnetic material because of their biocompatibility and their superparamagnetic properties. Iron oxide contained in endosomes and lysosomes is metabolized into elemental iron by hydrolytic enzymes.<sup>6</sup> The advantage of iron is that the human body is designed to process excess iron, and it is stored mainly in the protein ferritin. For most in vivo applications, the efficient internalization of nanoparticles into specific cells requires the minimization of undesired biological interactions such as nonspecific targeting (plasma protein adsorption) and short blood lifespan due to opsonization, which induces the removal of the particles by the reticuloendothelial system. To achieve the efficient and specific cellular uptake of magnetic nanoparticles requires the nanoparticle surface to be modified with suitable ligands or transfection agents, which also enhances colloid stability and cell interactions. Surface modifications can also be used to minimize toxicity. Modifications of neat or dextran-coated iron oxide with human immunodeficiency virus-Tat peptide,<sup>7,8</sup> dendrimers,<sup>9</sup> lipofection agents,<sup>10,11</sup> poly(L-lysine),<sup>12–14</sup> and carboxymethyl chitosan<sup>15</sup> have recently been reported.

Hyaluronate (HA), a naturally occurring polysaccharide consisting of  $\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyl- $\beta$ -1,4-glucuronide and having a molecular weight ranging from 1–10,000 kDa, is an abundant component of the extracellular matrix,<sup>16</sup> the synovial fluid, and connective, epithelial, and neural tissues.<sup>17</sup> As a result of its ability to form hydrated expanded matrices, HA has often been used in cosmetic applications such as soft tissue augmentation. Moreover, in various studies HA has been utilized as a targeting ligand directed at cancer cells.<sup>18,19</sup> At the same time, HA-immobilized iron oxide nanoparticles allow tumor tissue imaging. The advantage of HA for clinical applications is that it is biocompatible, antigenic, and negatively charged, thus forming ionic bonds with positively charged proteins to increase its affinity towards cells. The disadvantage of HA lies in its rapid resorption<sup>20,21</sup> unless it is crosslinked or chemically modified. HA interacts with HA receptors such as CD44, RHAMM, and ICAM-1, which triggers intracellular signals influencing cellular proliferation, differentiation, and migration.<sup>18</sup>

The aim of the present work was to explore the potential usefulness of dopamine (DPA) as an agent to anchor HA to the iron oxide surface, using different DPA/HA ratios in

the formation of a biomimetic shell. The second aim was to investigate the effect of a DPA-HA coating on iron oxide nanoparticles in terms of cell behavior, internalization, and differentiation, which could contribute to a better understanding of cell–biomaterial interactions. The pivotal role of anchoring a DPA-HA conjugate on the nanoparticle surface via bioinspired adhesion in MRI and cellular uptake was already described by Lee et al.<sup>18</sup> A key feature of DPA is the ortho-dihydroxyphenyl (catechol) functional group in planar ordering, which forms strong bonds with various inorganic (including transition metals)/organic surfaces that were shown to be stronger than biotin–streptavidin interactions.<sup>22</sup> In contrast to Lee et al,<sup>18</sup> who synthesized magnetic nanocrystals by the thermal decomposition of an iron oleate complex, which required their transfer to water using cetyltrimethylammonium bromide, the new approach in the present study uses  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles prepared by a coprecipitation method in water and subsequent coating with a DPA-HA associate.

## Material and methods

### Materials

Iron(II) chloride tetrahydrate (FeCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O) and iron(III) chloride hexahydrate (FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), sodium hypochlorite solution (NaClO) from Bochemie (Bohumín, Czech Republic), and sodium citrate dihydrate from Lachema (Brno, Czech Republic). Sodium HA (molecular weight: ~300,000) was obtained from Contipro Pharma (Dolní Dobrouč, Czech Republic), DPA hydrochloride and N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride from Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, MO), and the commercial contrast agent Endorem® from Guerbet (Roissy, France). Ultrapure Q-water ultrafiltered on a Milli-Q® Gradient A10® system (Millipore SAS, Molsheim, France) was used throughout the work. All other reagent grade chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. For histological staining, potassium ferrocyanide (Lachema) and Alcian Blue (Sigma-Aldrich) were used. Phosphate buffered saline (PBS) was from Sigma-Aldrich.

### Association of HA with DPA

In a typical experiment, HA (0.402 g; 1 mmol) was dissolved in 30 mL of Q-water and the solution purged with nitrogen prior to the addition of N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (19 mg; 0.1 mmol) and DPA (19 mg; 0.1 mmol). The mixture was adjusted to pH 5 by the addition of 1 M hydrochloric acid and then the

reaction proceeded in darkness for 12 hours at laboratory temperature with stirring under a nitrogen atmosphere. As the resulting mixture was colorless, DPA was not oxidized during the reaction. The DPA-HA associate was separated and purified by double precipitation in an excess of acetone. The precipitate was then dissolved in Q-water and freeze-dried.

### Synthesis of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles

A solution of iron(II) chloride (0.2 mol/L) and iron(III) chloride (0.2 mol/L) in a 1:2 molar ratio was coprecipitated in an excess of 0.5 M ammonium hydroxide by a procedure described earlier.<sup>23</sup> After 15 minutes, the product was repeatedly separated in a magnetic field and washed with Q-water to reach peptization. The colloid was subsequently sonicated for 5 minutes (Ultrasonic Homogenizer 4710 series; Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, IL; 40% output) and oxidized with 5 weight percent sodium hypochlorite aqueous solution in the presence of 0.1 M sodium citrate solution. The washing and sonication procedures were then repeated. The resulting colloid was filtered through a cellulose nitrate membrane filter with 0.45  $\mu\text{m}$  pores. The colloid contained typically ~40 mg  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /mL as estimated by weight analysis.

### Coating of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles with DPA-HA associate

A water solution (0.5, 1, or 2 mL) of lyophilized DPA-HA (10 mg/mL) was passed through a syringe filter with a cellulose nitrate membrane (0.22  $\mu\text{m}$  pores) and diluted with Q-water. Neat  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  colloid (~1 mL; 44 mg of dry  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) was added to the diluted DPA-HA solution, the total volume was adjusted to 10 mL, and the mixture was sonicated for 5 minutes. Coating with neat DPA and HA was done as a control.

### Characterization of the nanoparticles

The hydrodynamic diameter ( $D_h$ ), polydispersity (PI), and zeta potential were determined by dynamic light scattering with an Autosizer Lo-C<sup>®</sup> (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). pH was measured on a pH meter (211; Hanna Instruments, Smithfield, RI) equipped with an Orion 9802BN micro-combination pH electrode (Balatta, Australia). Particle morphology, particle size, and the particle size distribution were examined by a Spirit G<sup>2</sup> Tecnai<sup>TM</sup> transmission electron microscope (TEM; FEI, Brno, Czech Republic) by measuring at least 300 particles for each sample. The particle size distribution was characterized by the polydispersity index (PDI), calculated as the

ratio of weight-average to number-average particle diameter. Elemental analysis was performed on a PerkinElmer 2400 CHN apparatus (PerkinElmer, Waltham, MA). Size exclusion chromatography was performed on a KNAUER Smartline 1000 system (KNAUER, Berlin, Germany) with a PDA Smartline 2800 detector and Alltech<sup>®</sup> 3300 evaporative light scattering detector (Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL). Measurements were carried out on a TSKgel G6000PW column (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Germany) using 0.3 M ammonium acetate buffer as an isocratic eluent.

### Cell cultures

To isolate rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), femurs were dissected from 4-week-old Wistar rats. The ends of the bones were cut, and the marrow extruded with 5 mL of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with L-glutamine (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) using a needle and syringe. Marrow cells were plated in 80-cm<sup>2</sup> tissue culture flasks in DMEM/10% fetal bovine serum with 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin. After 24 hours, the nonadherent cells were removed by replacing the medium. The medium was changed every 2–3 days as the cells grew to confluence. The cells were lifted by incubation with 0.25 weight percent trypsin solution.

As a second model, human chondrocytes isolated from human cartilage were used. Human chondrocytes were obtained from meniscal biopsies of the knee joint. Meniscal fragments were minced, washed with PBS, and digested in 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Invitrogen Life Technologies, Paisley, United Kingdom) for 1 hour and subsequently in 0.25% collagenase type I in DMEM/F12 medium overnight. Recovered cells were washed with PBS and plated in a 75-cm<sup>2</sup> tissue culture flask in DMEM/F12 medium containing 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin.

### Cell labeling, cell growth, and cell viability

Rat MSCs and human chondrocytes, 100,000 cells/mL media, were cultured in a twelve-well culture dish, and a colloid containing 15.4  $\mu\text{g}$  of iron per mL of DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , or Endorem was added; the incubation lasted for 48 hours. The nanoparticles were washed out using PBS and then the cells were harvested by trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid and counted. The mean numbers of unlabeled cells were taken as 100%, and the mean numbers of labeled cells were expressed as percentages

relative to the 100% control. All experiments were done in triplicate and performed on cells from three different cultures. The viability of rat MSCs and human chondrocytes was determined using the trypan blue (0.1 weight percent) exclusion test.

### Labeling efficiency and staining intensity

The iron oxide-labeled cells were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 30 minutes, washed, and stained for iron to produce ferric ferrocyanide (Prussian Blue). Nuclei were counterstained with nuclear fast red (Sigma-Aldrich). Labeling efficiency was determined by manually counting the number of Prussian Blue-stained and unstained cells in five optical fields from each plate using an Axioplan® Imaging II microscope at 100 $\times$  magnification and a 10 $\times$ /0.75 objective lens, an AxioCam® digital camera, and AxioVision® 4 software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). The intensity of Prussian Blue-stained cells was measured colorimetrically. The scanned images with manually labeled cells were processed by the MATLAB® 6.0 Image Processing Toolbox™ (MathWorks, Natick, MA). Before the analysis, the colorimetric scale from the image colors corresponding to the increasing intensities of the Prussian Blue staining of the cells was validated. Each Prussian Blue-stained cell in the image was then processed and the intensity of the cytoplasmic staining determined as the intensity of the color of the cytoplasm on the scale. As a result, two parameters were obtained: (1) the presence or absence of a label inside the cells expressed as the percentage of labeled cells and (2) the amount of label inside the cells, which correlates with the intensity of the staining.

### Cell differentiation

Rat MSCs were labeled with HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles or the commercial contrast agent Endorem. The cells were incubated with the nanoparticles at a concentration of 15.4  $\mu$ g iron/mL media. After 72 hours of incubation, the contrast agents were washed out by removing the medium and rinsing the cell monolayer three times with PBS.

To induce chondrogenesis, the labeled cells were harvested, transferred to polypropylene tubes, and differentiated in pellet cultures (250,000 cells/pellet) in freshly prepared serum-free medium containing DMEM, 0.1  $\mu$ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), hTGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL; Millipore Corporation, Billerica, MA), 0.05 mM L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 1% ITS+ Universal Culture Supplement (BD Biosciences, San Jose, CA) and Primocin™ (100  $\mu$ g/mL; Lonza Cologne GmbH, Cologne, Germany). The tubes were incubated at

37°C in 5% carbon dioxide. The medium was changed twice a week. Chondrogenic pellets were harvested after 20 days in culture, fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin blocks, cut into 5  $\mu$ m sections, and stained with Alcian Blue and Prussian Blue using standard methods.

### MRI relaxometry

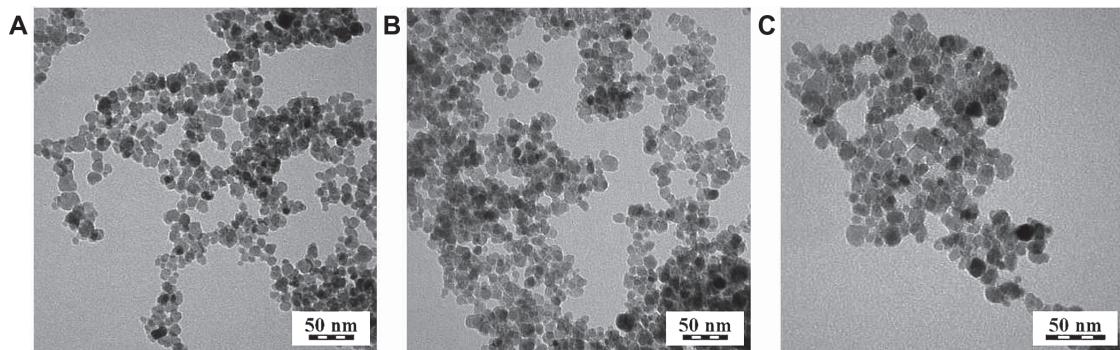
MRI relaxometry of the coated  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles was performed using a Minispec® 0.5 T relaxometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany). HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> colloids were diluted to final concentrations of 0.022 mg iron/mL and sonicated for 10 minutes prior to the measurement. T<sub>2</sub> relaxometry was performed with a Carr-Purcell-Meiboom-Gill multispin-echo sequence with an echo spacing of 2 milliseconds and repetition time of 5 seconds. The measured relaxation times were converted to relaxivities (reciprocal values of relaxation times T<sub>2</sub> related to concentration, ie, relaxivity = 1/T<sub>2</sub>/concentration).

Phantoms containing suspensions of fixed labeled cells were prepared by dispersing the suspensions in gelatin to eliminate sedimentation of the cells on the bottom of the test tube, then measured at 0.5 T (Minispec 0.5 T relaxometer; Bruker) and at 4.7 T (BioSpec® 4.7 T spectrometer; Bruker). T<sub>2</sub> relaxation times at 0.5 T were measured with the same sequence and parameters as stated above. At 4.7 T, a Carr-Purcell-Meiboom-Gill multispin-echo sequence with an echo spacing of 8.63 milliseconds and repetition time of 5 seconds was used. The sequence provided a set of T<sub>2</sub>-weighted images (with increasing weighting), from which T<sub>2</sub> relaxation times were calculated. Relaxation rates were calculated as the reciprocal values of relaxation times related to one million cells per 1 mL.

As superparamagnetic nanoparticles have a markedly smaller effect on T<sub>1</sub> and are used solely as a T<sub>2</sub> contrast agent, T<sub>1</sub> of the nanoparticles was not measured.

### Results and discussion

$\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was selected as the most stable iron oxide.  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles were obtained by the coprecipitation of iron(II) and iron(III) chlorides in ammonium hydroxide, and the resulting magnetite (FeO·Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) was oxidized to  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with sodium hypochlorite. The Mossbauer spectra published previously confirmed that the iron oxide constituting the nanoparticles was predominantly  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.<sup>24</sup> TEM was used to determine the shape, size, and uniformity of the dried nanoparticles. TEM analysis indicated that uncoated  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles showed a rather narrow size distribution (PDI = 1.30) with an average size of the nanoparticles of



**Figure 1** Transmission electron micrograph of **(A)** neat maghemite and dopamine-hyaluronate-maghemite nanoparticles, **(B)** Run IIIA/1 (dopamine-hyaluronate/maghemite = 0.11 weight/weight; dopamine/hyaluronate = 0.0075 weight/weight), and **(C)** Run IIIA/3 (dopamine-hyaluronate/maghemite = 0.3 weight/weight; dopamine/hyaluronate = 0.0075 weight/weight).

10.7 nm (Figure 1A). The  $D_h$  and zeta potential of colloidal  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  were estimated using dynamic light scattering at pH ~8.  $D_h$  was  $83.7 \pm 0.6$  nm and PI was  $0.129 \pm 0.006$ , confirming the above-mentioned relatively narrow size distribution, and the zeta potential reached  $-53.4 \pm 0.8$  mV, reflecting good colloidal stability. The difference in particle size measured with TEM and dynamic light scattering can be ascribed to the dynamic fluctuations of colloidal nanoparticles in comparison with the dried state and also to the different statistical methods used in the two kinds of measurements.

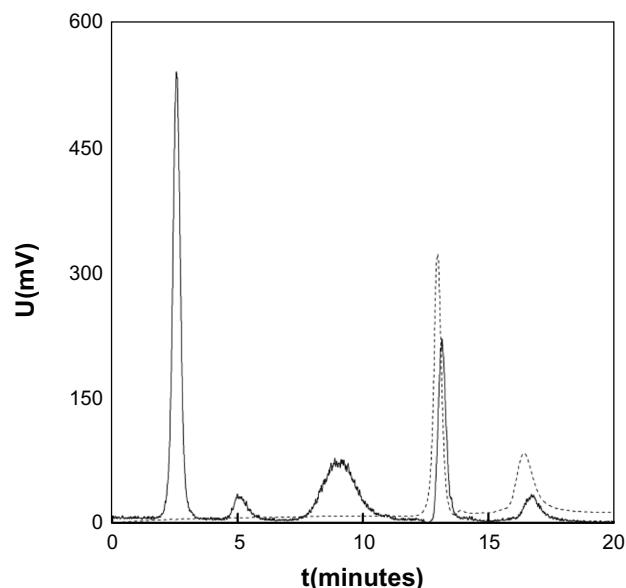
## Modification of HA

In an attempt to obtain a DPA-HA associate, conventional *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride/DPA chemistry was investigated in an HA (molecular weight: ~300,000) solution at ten different pH values ranging from 5–10. A small amount of sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) was added to avoid the irreversible oxidation of DPA. Coupling was also studied with dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide; both agents were combined with a *N*-hydroxysuccinimide in a water/*N,N*-dimethylformamide, (1/3 volume/volume) mixture. Another technique using *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium hexafluorophosphate was tested as well. However, the formation of a covalent bond between HA and DPA was never confirmed by size exclusion chromatography (Figure 2). In the chromatogram, the main signal recorded by the diode array detection ultraviolet detector (256 nm) was that of DPA (elution time 13 minutes), while signals in the area of high molecular weight compounds were absent. Signals recorded by the evaporative light scattering detector at elution times of 2.5, 5, and 9 minutes typical for high molecular weight compounds were ascribed to HA. This is contrary to information from reports in which the formation of a covalent bond between

HA and DPA was assumed according to nuclear magnetic resonance spectra.<sup>18,25,26</sup> Carbodiimides, thus, were not found to be suitable coupling agents to covalently attach DPA to HA. Nevertheless, the reaction between the amine groups of DPA and the carboxyl groups of HA yielded an ionic associate (Figure 3) as confirmed by elemental analysis; compared with HA, nitrogen content was increased in the DPA-HA associate (Table 1).

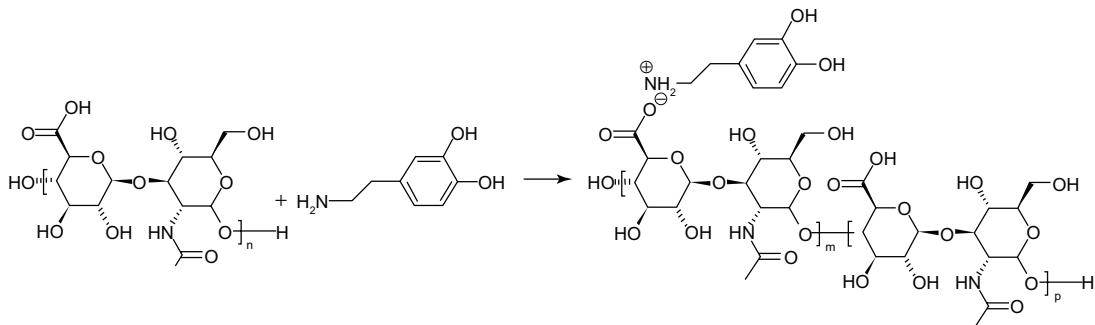
## Coating of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles with DPA, HA, and DPA-HA associate

Modifying the surface of iron oxide nanoparticles is a common strategy to enhance the cellular uptake of nanoparticles.



**Figure 2** Size-exclusion chromatogram of dopamine-hyaluronate in 0.3 M ammonium acetate buffer (pH 6.5). Evaporative light scattering detection (solid line) and diode array detection at 256 nm (dashed line).

**Abbreviations:** t, time; U, voltage.



**Figure 3** Association of hyaluronate with dopamine.

In the present study, HA was intentionally included as a modifying agent to provide a protective shell preventing particle aggregation, while bidentate DPA should serve as an anchoring moiety. It is an advantage of DPA that the catechol derivatives tightly bind onto the surface of iron oxide particles,<sup>27</sup> resulting in the formation of DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> complexes. In contrast, HA does not show such a strong interaction with  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The reactive amino groups of DPA can then act as coupling links for further association with modifying or cell targeting agents.<sup>28</sup> In this report, an ionic DPA-HA associate was first prepared and added to  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, with DPA being attached to iron oxide via hydroxyl groups,<sup>29</sup> while amino groups associated HA (Figure 3). According to TEM, the size of the DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles was between 7.6–9.5 nm (Figure 1B and C), ie, almost the same as that of neat particles. The PDI was 1.26–1.34, which is in accordance with the PDI of neat particles.

Several groups of DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles were prepared differing in their composition (Table 2). Coatings by neat DPA (Group I) or neat HA (Group II) were used as controls and compared with DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles (Group III) prepared at three different DPA/HA ratios; they were denoted as IIIA–C (Table 2). In each group, three samples with a constant concentration of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and an increasing concentration of DPA-HA associate (or neat DPA or HA) were prepared (Table 2). Four parameters were measured as functions of the DPA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and DPA-HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mass ratios: D<sub>h</sub>, PDI, zeta potential, and pH.

With an increasing HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or DPA-HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratio, the D<sub>h</sub> and PDI increased, probably due to the thicker shell; at the same time, the zeta potential and pH decreased (Table 2). The zeta potential is an indicator of the colloidal stability of magnetic nanoparticles in an aqueous medium. The high negative electric charge on the surface of the HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles (Runs I/1, I/2, II/1–3, and III) possessing a zeta potential in the range between –48 mV and –79 mV prevented their aggregation in water due to the repulsion among the particles. This negative charge was provided by the ionized carboxylic groups of HA, ensuring the colloidal stability of the HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dispersions. At a high DPA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratio (Run I/3), the zeta potential already approached zero (–7 mV) due to the positive charge of the large amounts of DPA; as a result, colloidal stability was lost. Aggregation was also observed with DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles Run IIIC/3, characterized by a high DPA content in the DPA-HA associate. This was probably due to the relatively high zeta potential of the discrete particles (Run I/3, Table 2) caused by the fast complexation of small positively-charged DPA molecules to their surface. In contrast, bulky negatively-charged HA was exposed on the surface of particle aggregates, thus inducing the high negative charge of DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Run IIIC/3 (–78 mV; Table 2). The particle size decreased in the sequence IIIA > III/B > III/C; in the same sequence DPA/HA increased, ie, the number of anchoring groups was higher, thus inducing a more compact DPA-HA layer.

## Cell growth and viability

In order to evaluate the acute toxicity of DPA-HA-coated  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, the growth and viability of labeled rat MSCs were examined. Unlabeled rat MSCs doubled their population within 48 hours, while cells labeled with coated nanoparticles grew slightly slower (70%–100% of control). The slowest growth (54% ± 4%) was observed in cells labeled

**Table 1** Elemental analysis of hyaluronate and dopamine-hyaluronate associate

Elemental analysis (wt%)	C	H	N	Na
HA	39.82	5.30	3.19	6.43
DPA-HA associate	39.82	5.79	3.85	2.67

**Abbreviations:** C, carbon; DPA, dopamine; H, hydrogen; HA, hyaluronate; N, nitrogen; Na, sodium; wt%, weight percent.

**Table 2** Characteristics of dopamine-maghemitite, hyaluronate-maghemitite, and dopamine-hyaluronate-maghemitite nanoparticles and the viability, number of rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled with different nanoparticles and relaxivities of phantoms containing a suspension of neat maghemite or surface-modified maghemite nanoparticles

Run	Coating	DPA/HA (w/w)	Coating/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (w/w)	$D_h$ (nm)	PI	Zeta potential (mV)	Cell growth (%) mean $\pm$ SD	Cell viability (%) mean $\pm$ SD	$r_2$ (s $^{-1}$ /mmol Fe)
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	–	0	83.7 $\pm$ 0.6	0.129 $\pm$ 0.006	-53.4 $\pm$ 0.8	54 $\pm$ 4	83.5 $\pm$ 0.5	123 $\pm$ 0.3	
DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ I/I	DPA	–	0.011	87 $\pm$ 0.2	0.147 $\pm$ 0.004	-53 $\pm$ 2	86 $\pm$ 8	89 $\pm$ 1.0	167 $\pm$ 0.3
DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ I/2	DPA	–	0.022	97 $\pm$ 5	0.158 $\pm$ 0.003	-48.2 $\pm$ 0.06	76 $\pm$ 8	86.7 $\pm$ 0.9	91.8 $\pm$ 0.3
DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ I/3	DPA	–	0.045	5537 $\pm$ 796 <sup>a</sup>	0.244 $\pm$ 0.157 <sup>a</sup>	-7.31 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	78 $\pm$ 6	90.5 $\pm$ 0.5	98.9 $\pm$ 0.2
HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ II/I	HA	–	0.11	107 $\pm$ 1	0.283 $\pm$ 0.006	-67 $\pm$ 1	89 $\pm$ 6	95.5 $\pm$ 0.5	267.2 $\pm$ 0.6
HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ II/2	HA	–	0.22	125 $\pm$ 7	0.291 $\pm$ 0.004	-79.3 $\pm$ 0.8	81 $\pm$ 3	97 $\pm$ 0.2	256.7 $\pm$ 0.5
HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ II/3	HA	–	0.45	151 $\pm$ 3	0.312 $\pm$ 0.003	-77.4 $\pm$ 0.7	100 $\pm$ 9	96 $\pm$ 0.7	305.4 $\pm$ 0.7
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIA/I	DPA-HA/I	0.0075	0.11	118 $\pm$ 0.4	0.298 $\pm$ 0.003	-60 $\pm$ 1	71 $\pm$ 8	96 $\pm$ 1.2	–
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIA/2	DPA-HA/I	0.0075	0.22	836 $\pm$ 12	0.485 $\pm$ 0.008	-56 $\pm$ 0.4	93 $\pm$ 3	95.5 $\pm$ 1.5	–
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIA/3	DPA-HA/I	0.0075	0.45	656 $\pm$ 18	0.369 $\pm$ 0.009	-76 $\pm$ 1.1	69 $\pm$ 10	95.5 $\pm$ 1.2	–
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIB/I	DPA-HA/2	0.01936	0.11	108 $\pm$ 0.4	0.275 $\pm$ 0.005	-65.9 $\pm$ 1	100 $\pm$ 11	95 $\pm$ 1.0	–
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIB/2	DPA-HA/2	0.01936	0.22	130 $\pm$ 5	0.293 $\pm$ 0.001	-68 $\pm$ 3	78 $\pm$ 6	93 $\pm$ 1.0	–
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIB/3	DPA-HA/2	0.01936	0.45	153 $\pm$ 0.6	0.314 $\pm$ 0.003	-70 $\pm$ 1	99 $\pm$ 13	94.5 $\pm$ 1.7	–
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIC/1	DPA-HA/3	0.03842	0.11	98 $\pm$ 0.3	0.267 $\pm$ 0.001	-66.4 $\pm$ 4	103 $\pm$ 3	94 $\pm$ 1.0	260.6 $\pm$ 0.3
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIC/2	DPA-HA/3	0.03842	0.22	120 $\pm$ 0.1	0.283 $\pm$ 0.003	-70 $\pm$ 1	68 $\pm$ 1	94.5 $\pm$ 0.5	263.3 $\pm$ 0.3
DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ IIIC/3	DPA-HA/3	0.03842	0.45	1181 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0.543 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	-77.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	94 $\pm$ 9	95 $\pm$ 1.4	282.7 $\pm$ 0.3
Endorem®	–	–	–	–	–	–	79 $\pm$ 5	85 $\pm$ 1.0	127.0 $\pm$ 0.9
Unlabeled cells (control)	–	–	–	–	–	–	100 $\pm$ 0	97.6 $\pm$ 1.0	–

Note: <sup>a</sup>Sediment; cell growth compared to unlabeled control cells (=100%).

Abbreviations:  $D_h$ , hydrodynamic diameter; DPA, dopamine;  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , maghemite; HA, hyaluronate; PI, polydispersity;  $r_2$ , relaxivity; SD, standard deviation; w/w, weight/weight.

with uncoated  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles. The viability of rat MSCs was tested using the trypan blue exclusion test. Varying the composition of the coating and increasing the concentration of DPA-HA did not substantially influence rat MSC viability (Table 2). A small decrease in viability ( $83.5\% \pm 0.5\%$ ) was observed in cells labeled with uncoated  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles. The viability of Endorem-labeled rat MSCs, considered the gold standard among commercial contrast agents used for cell labeling, reached about 85%. These results are comparable with those from previous studies.<sup>30</sup> When labeling chondrocytes, differences in growth and viability between labeled and unlabeled cells were not observed.

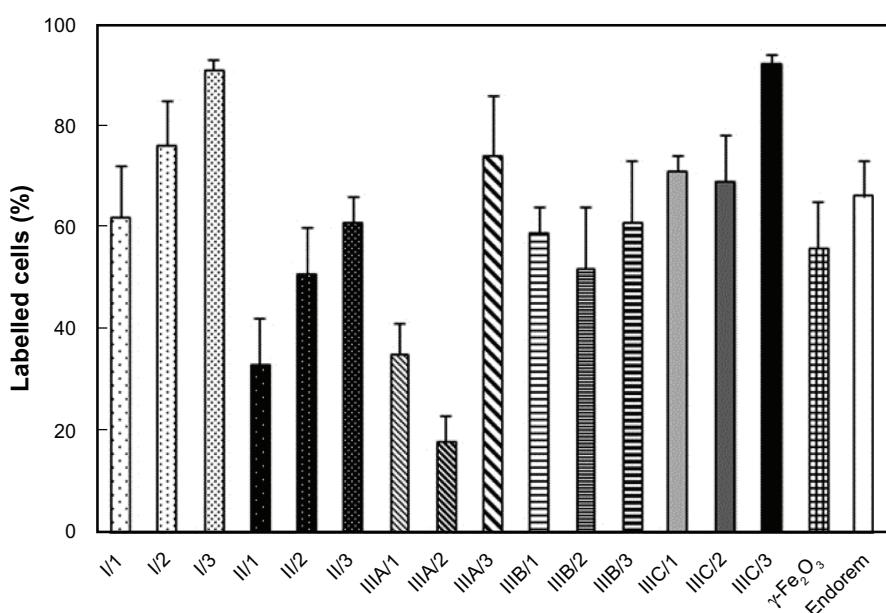
## Cell labeling efficiency

The uptake of nanoparticles into rat MSCs (expressed as the percentage of labeled cells) was investigated using Prussian Blue staining. The cells were evaluated as to whether they were stained or not; the intensity of staining was not considered. In each group (Runs I, II, III), the highest percentage of labeled cells was obtained with nanoparticles containing the highest DPA concentration (Figure 4). Over 90% labeled cells was achieved with DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles Run IIIC/3 and DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles Run I/3. However, the latter particles formed clumps and also adhered to the cell surface and the bottom of the culture well.

A labeling efficiency superior to that obtained with the commercial contrast agent Endorem (66%) was also achieved with nanoparticles Run IIIA/3 (74%) and I/2 (76%). A labeling efficiency less than that obtained with Endorem was observed with uncoated  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (56%) and nanoparticles Run IIIA/1 (35%), Run IIIA/2 (18%), and Run IIIB/2 (52%). The remainder of the nanoparticles gave results comparable with Endorem within the range of 61%–71%.

To compare how much label was taken into the cells, the distribution of the intensity of Prussian Blue staining inside the labeled cells was studied (Figure 5). The highest intensity of Prussian Blue staining was detected in cells labeled with DPA-HA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles Run IIIC/3. Similar results were obtained with DPA- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  Run I/3; however, these particles adhered to the cell surface and are therefore not shown in Figure 5. There were no marked differences among the rest of the coated nanoparticles, and a representative curve (Run II/3) is presented in Figure 5. The lowest intensity of Prussian Blue staining was observed in cells labeled with Endorem (Figure 5) or neat  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (not shown).

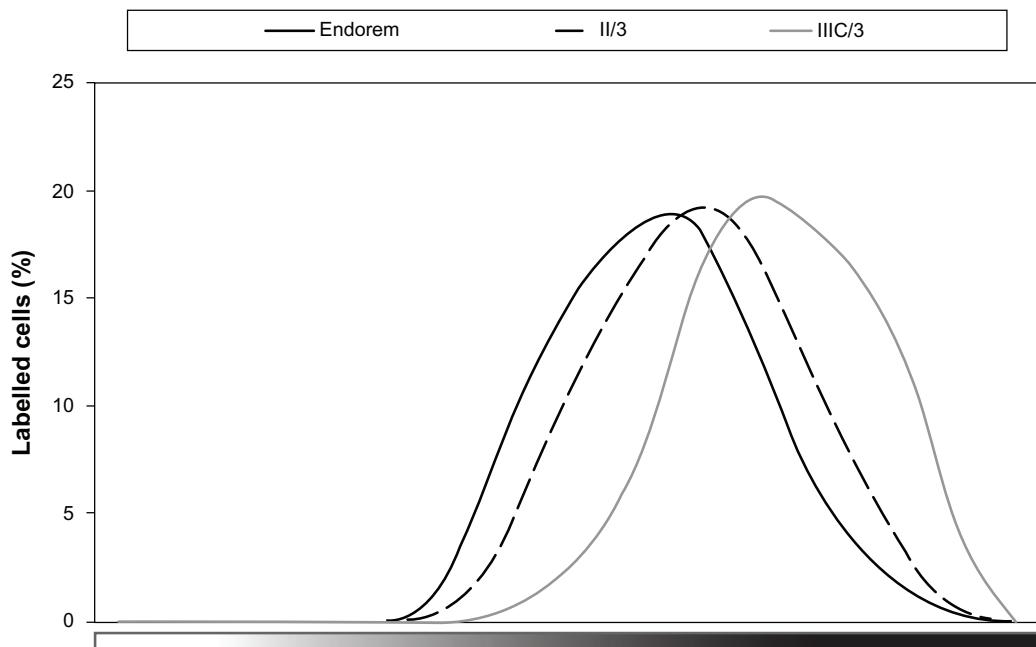
Representative histological images of Prussian Blue staining are shown in Figure 6. They underline the results described in Figures 4 and 5. It was obvious that the bulky, negatively-charged HA molecule was internalized in cells less efficiently than positively-charged poly(L-lysine)-coated nanoparticles.



**Figure 4** Labeling efficiency is expressed as the percentage of rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled with hyaluronate-maghemite nanoparticles Runs II/1–3, dopamine-maghemite nanoparticles Runs I/1–3, dopamine-hyaluronate-maghemite nanoparticles Runs IIIA/1–3, IIIB/1–3, and IIIC/1–3, neat maghemite, and Endorem® (Guerbet, Roissy, France).

**Notes:** A colloid containing 15.4  $\mu\text{g}$  of iron per mL was added to the culture media for 72 hours. All experiments were done in triplicate, counting five optical fields from each well ( $n = 15$ ).

**Abbreviation:**  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , maghemite.



**Figure 5** In the MATLAB® 6.0 Image Processing Toolbox™ (MathWorks, Natick, MA), the color scale of Prussian Blue staining was precomputed from unstained and maximally stained nanoparticles (without cells) in CIE L\*a\*b color space and experimentally validated on images with stained cells.

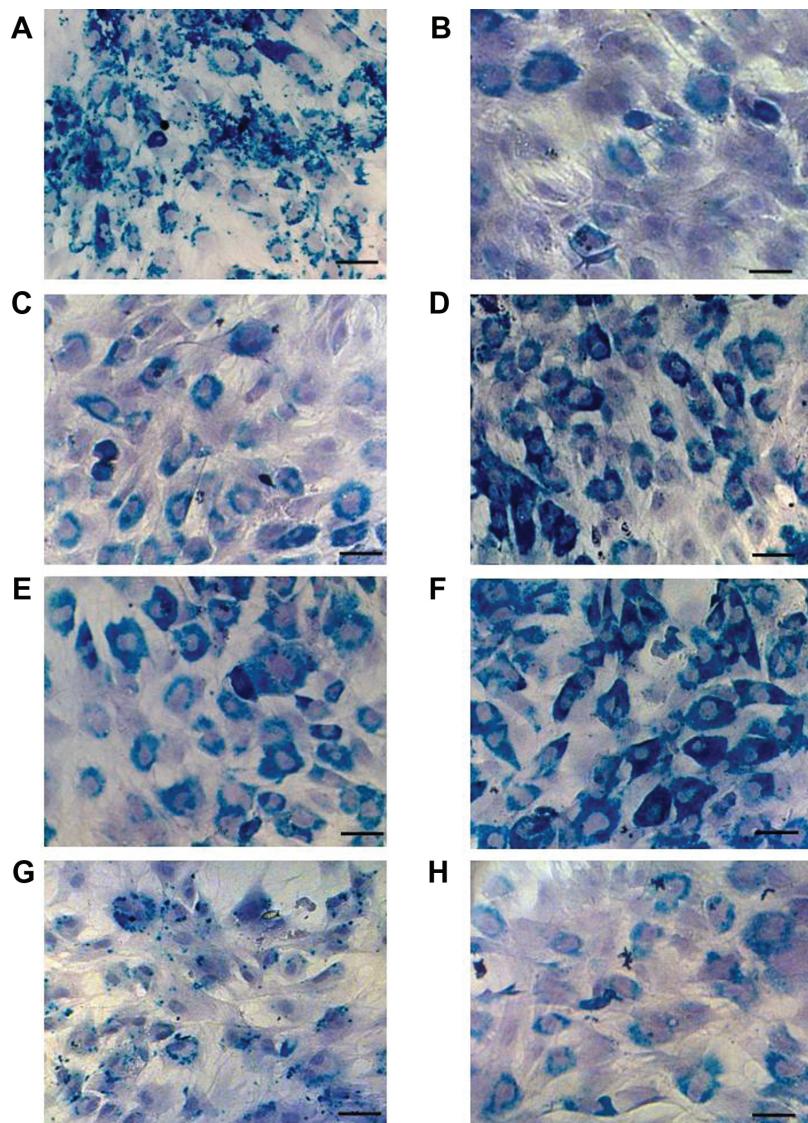
**Notes:** The cells in each image were manually labeled, and for each cell the staining intensity as an index on the precomputed color scale was averaged. As a result, the figure shows representative curves of the distribution of the intensity of Prussian Blue staining (X axis) of rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled with dopamine-hyaluronate-maghemite nanoparticles Run IIIC/3, hyaluronate-maghemite nanoparticles Run II/3, and Endorem® (Guerbet, Roissy, France). The Y axis shows the percentage of cells for each labeling intensity.

HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles exhibited a low cellular uptake, presumably because of HA desorption (Figure 6B). Only HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run II/3 (Figure 6C), containing the highest concentration of HA, were comparable with Endorem (Figure 6G) or neat  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Figure 6H). The fact that DPA, which induces the adsorption of serum proteins, played an important role in cell internalization was confirmed by microscopic observation of Prussian Blue-stained rat MSCs labeled with DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles (Figure 6A). DPA renders  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with positive charges, which is desirable, while at the same time maintaining a small size favorable for internalization by the cells. It can be supposed that the more DPA on the particles, the greater the aggregation with proteins in the culture medium. Such aggregates are too large to be internalized by the cells. At a high concentration of DPA (Run I/3), the particles already stuck to the cell membranes and to the well bottom. Therefore, the highest concentration that could be safely used for cell labeling was that used in Run I/2. In contrast, HA acts as a steric barrier (protective shell) minimizing nanoparticle aggregation. Figure 6D–F nicely document the synergistic effect of HA and DPA. In the group including DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run IIIC, the efficiency as well as the intensity of the cell labeling increased with increasing DPA concentration.

Superior results were obtained with the labeling of human chondrocytes (Figure 7A). From each group only Runs II/3, IIIB/3, and IIIC/3 were tested, since these nanoparticles performed best in rat MSC labeling. All tested nanoparticles achieved a labeling efficiency over 90%; the highest labeling intensity was obtained with DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run IIIC/3, followed by HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Run II/3 and DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Run IIIB/3. Similar results were obtained in the distribution of the intensity of Prussian Blue staining (Figure 7B). In contrast to the results obtained in rat MSCs, HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run II/3 showed a higher labeling efficiency, as well as staining intensity, than DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run IIIB/3. Histological images (Figure 8) clearly support the data shown in Figure 7. In contrast to the results observed in rat MSCs, DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run IIIC/3 already aggregated and also adhered to the cell surface (Figure 8D). As MSCs and chondrocytes possess receptors for HA (CD44), iron oxide uptake is therefore most likely a receptor-mediated process.

### Cell differentiation into chondrogenic phenotypes

For the use of stem cells in cell therapies, their ability to differentiate in the presence of superparamagnetic

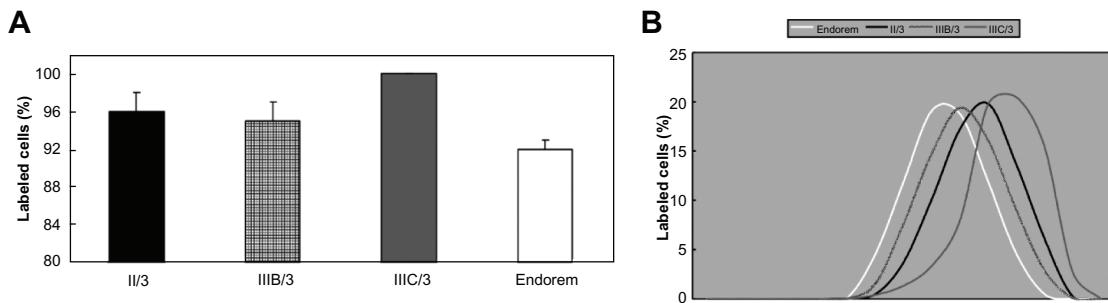


**Figure 6** Microscopic observation of Prussian Blue-stained rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled with **(A)** dopamine-maghemite nanoparticles Run I/3, **(B)** hyaluronate-maghemite nanoparticles Run II/1 and **(C)** Run II/3, dopamine-hyaluronate-maghemite nanoparticles **(D)** Run IIIC/1, **(E)** Run IIIC/2, and **(F)** Run IIIC/3, **(G)** Endorem® (Guerbet, Roissy, France), and **(H)** neat maghemite.

**Notes:** Cell nuclei are counterstained with hematoxylin. Scale bar 25  $\mu$ m.

nanoparticles is crucial. Although iron oxide nanoparticles are generally considered as safe, there are several reports in the literature that differently coated superparamagnetic iron oxide particles negatively affect the chondrogenic differentiation of MSCs.<sup>31,32</sup> Some superparamagnetic iron oxides are suspected to produce reactive oxygen species<sup>33</sup> or affect the cytoskeleton and cell membrane.<sup>34</sup> Since HA is present in cartilage, the chondrogenic differentiation of rat MSCs labeled with HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run II/3, DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run IIIC/3, and Endorem was tested. After 20 days of incubation in chondrogenic medium, the cells labeled with DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run

IIIC/3 and with Endorem formed solid chondrogenic pellets with positive Alcian Blue staining, confirming differentiation into chondrocytes (Figure 9A and C). In contrast, the cells labeled with HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run II/3 were not able to form a proper pellet (Figure 9E) and no differentiation was observed. Prussian Blue staining confirmed that the labeled cells contained iron (Figure 9B–F). The amount of iron was apparently higher in cells and pellets containing DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run IIIC/3 and HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run II/3 than in Endorem-labeled pellets, which corresponded to the higher labeling efficiency of these nanoparticles compared to Endorem. The results show that the chondrogenic



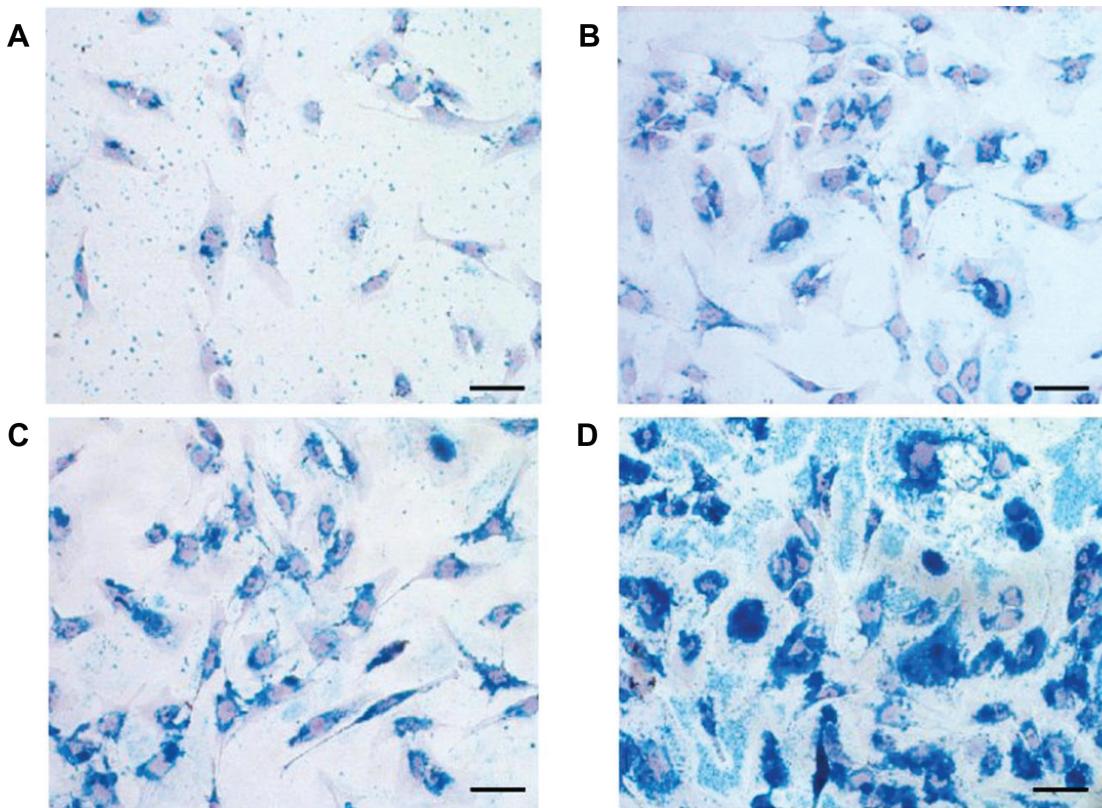
**Figure 7** (A) Labeling efficiency of human chondrocytes expressed as the number of Prussian Blue-positive cells. (B) Distribution of Prussian Blue labeling intensity in human chondrocytes.

differentiation of MSCs could be impaired by HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. The exact effect of HA on chondrogenic differentiation is not clear. Ng et al showed that exogenous HA of molecular weight  $2.5 \times 10^5$  Da, when added to the culture medium of an explant culture of articular cartilage, inhibited both aggrecan and HA synthesis in a concentration-dependent manner.<sup>35</sup> It can be speculated that residual bulky HA molecules remaining in the media or attached to the cell surface prevent pellet formation and thus impair chondrogenic

differentiation. In contrast, the presence of DPA not only leads to a higher amount of label inside the cells, but also has no negative effect on pellet formation and subsequently on chondrogenic differentiation, most probably due to the better internalization of the nanoparticles inside the cells.

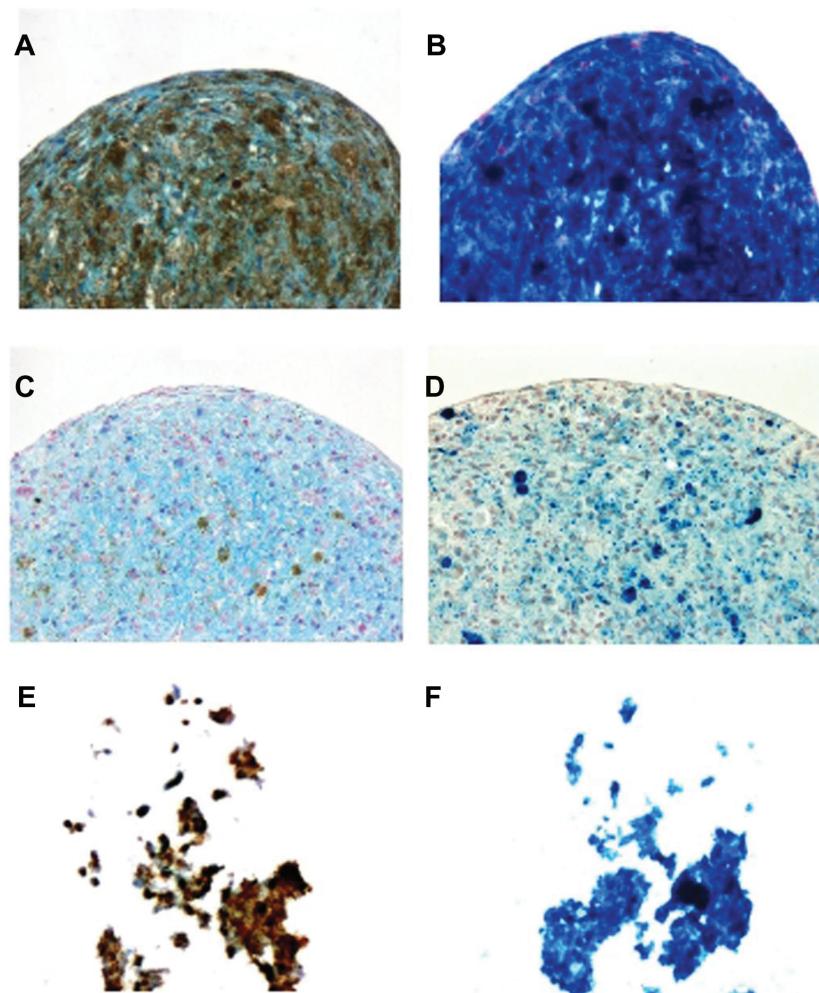
### MRI relaxometry

Contrast in an MRI depends not only on the proton density of the measured object, but (in the case of T<sub>1</sub>-weighted or



**Figure 8** Prussian Blue staining of human chondrocytes labeled with (A) Endorem® (Guerbet, Roissy, France), (B) dopamine-hyaluronate-maghemite nanoparticles Run IIIB/3, (C) hyaluronate-maghemite nanoparticles Run II/3, and (D) dopamine-hyaluronate-maghemite nanoparticles Run IIIC/3.

**Notes:** Cell nuclei are counterstained with nuclear fast red. Scale bar 25  $\mu$ m.



**Figure 9** To determine whether hyaluronate molecules, which are also present in the cartilage extracellular matrix, can affect chondrogenic differentiation, rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled with (A and B) dopamine-hyaluronate-maghemite nanoparticles Run IIC/3, (C and D) Endorem® (Guerbet, Roissy, France), and (E and F) hyaluronate-maghemite nanoparticles Run II/3 were differentiated into a chondrogenic phenotype.

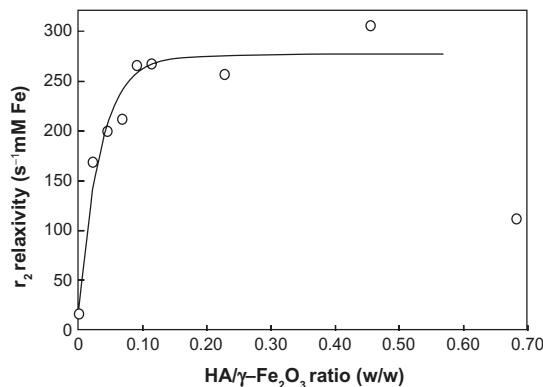
**Notes:** The left column shows staining for Alcian Blue (a marker of chondrogenic differentiation), while the right column represents Prussian Blue staining. Iron is visible as (A, C and E) brown or (B, D and F) blue deposits.

$T_2$ -weighted images) predominantly on relaxation times. Relaxometry enables the direct measurement of relaxivities (ie, the reciprocal values of relaxation times related to concentration), which reflect both the concentration of paramagnetic or superparamagnetic substances and water exchange, which also varies with the size and solubility of the given magnetic particles.

Table 2 summarizes the relaxivities of DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and DPA-HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles obtained at a low DPA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratio (Run I/1) displayed a higher relaxivity than did neat  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. At higher DPA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratios (Runs I/2 and I/3), relaxivity decreased. The authors speculate that a higher DPA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratio may lead to greater nanoparticle aggregation. During aggregation, contacts between the nanoparticles and water

molecules are reduced due to the exclusion of water from the interior of the aggregates.

The relaxivity of HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles (Group II) was substantially higher than that of DPA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and increased with an increasing HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratio (Figure 10). The dependence approximately followed an exponential fit (solid line in Figure 10, calculated without the last point). The authors hypothesize that with an increasing HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratio, the amount of water surrounding the particles increased due to the extremely high hydrophilicity of HA. HA carries large amounts of water molecules in the close vicinity of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles, thus increasing MRI contrast. However, at very high HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratios (HA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ~0.6 weight/weight and more), HA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles sedimented and relaxivity decreased (last point in Figure 10).



**Figure 10** Dependence of the relaxivity of hyaluronate-maghemite nanoparticles Group II on the hyaluronate/maghemite ratio.

**Note:** The solid line represents an exponential fit.

**Abbreviations:** Fe, iron; HA, hyaluronate; γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, maghemite; r<sub>2</sub>, relaxivity.

DPA-HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles revealed a similar relaxivity as did HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, ie, relaxivity was substantially higher than in nanoparticles associated with DPA only. This confirmed the importance of HA for ensuring the stability of the colloid and for water exchange, which plays a crucial role in water relaxation.

The relaxation rates of gelatin containing suspensions of labeled cells and measured at 0.5 and 4.7 T are shown in Table 3. The relaxation rates of the cell suspensions depended not only on the relaxivity of the nanoparticles used for cell labeling, but mainly on the number of particles internalized by the cells. Although HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles exhibited the highest relaxivities (because HA ensured colloidal stability and excellent water exchange), the highest relaxation rate was found in cells labeled with DPA-HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles at a DPA/HA ratio = 0.01936 (weight/weight) (Table 3). It could thus be hypothesized that DPA associated at a moderate concentration substantially improved cellular uptake.

Nevertheless, at a higher DPA/HA ratio (0.03842 weight/weight), relaxivity again decreased, probably due to aggregation leading to sedimentation, which lowered both the relaxivity of the nanoparticles and also the cellular uptake of the particles.

**Table 3** Relaxation rates of rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled with surface-modified maghemite nanoparticles

	R <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> /10 <sup>6</sup> rMSCs/mL) at 0.5 T	R <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> /10 <sup>6</sup> rMSCs/mL) at 4.7 T
HA-γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> II/3	3.7 ± 0.4	7.8 ± 0.3
DPA-HA-γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> IIIB/3	6.7 ± 0.1	11.6 ± 0.8
DPA-HA-γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> IIIC/3	3.3 ± 0.3	5.8 ± 1.0

**Abbreviations:** DPA, dopamine; γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, maghemite; HA, hyaluronate; R<sub>2</sub>, relaxation rates; rMSCs, rat bone marrow mesenchymal stem cells.

## Conclusion

The surface properties of γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles play a key role in their permeation through the cell membrane. HA was therefore associated with a DPA anchoring group and the resulting coating was used for the efficient surface modification of γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. While the DPA moiety had a high affinity for the γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> surface, because the catechol groups of DPA formed stable chemical bonds on the iron oxide surface, HA ensured colloidal stability and boosted the relaxivity of the iron oxide. Surface-modified magnetic nanoparticles were used for rat MSC and chondrocyte labeling. Even though γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles coated with DPA alone penetrated into the cells due to the positive DPA charge, the best results were obtained with the formation of a DPA-HA ionic associate on the particles. Viability assays revealed no significant differences in either the proliferation or viability of cells labeled with DPA-HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles compared to unlabeled cells. A low concentration of DPA-HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles was sufficient to achieve clearly visible contrast in MRI. DPA was involved in the internalization of the nanoparticles by the cells, and its concentration was important to achieve good cell labeling. The presence of HA on the surface of the nanoparticles may mediate their penetration into cells via the cell membrane and facilitate their uptake by MSCs. The percentage of Prussian Blue-stained cells was highest (85%) in cells labeled with DPA-HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles Run IIIC/3. Thus, the association of DPA to the HA chain and the subsequent anchoring of DPA-HA on the γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> surface via hydroxyl groups played a pivotal role in cellular uptake and MRI. Similarly, the chondrogenic differentiation of labeled cells was successfully achieved only with DPA-HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. The advantage of DPA-HA-γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles consists in the availability of a large number of carboxyl groups for the prospective attachment of target molecules, antibodies, proteins, fluorescent labels, therapeutic agents (growth hormones), or cancerostatics. At the same time, MRI can detect the labeled cells, thus enabling their tracking in the tissue, which is important in applications such as cell imaging, cell tracking, cell-based therapies, and tissue engineering. Such nanoparticles might also be useful for the labeling of neurons, glial cells, or cartilage.

## Acknowledgments

The financial support of the Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/09/1242, P207/12/J013, and P304/12/1370), the European Commission (DiaTools project no 259796) and the Center for Cell Therapy and Tissue Repair (No 1M0538) is

gratefully acknowledged. The authors thank James Dutt for critical reading of the manuscript.

## Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

1. Horak D, Babic M, Mackova H, Benes MJ. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *J Sep Sci*. 2007;30(11):1751–1772.
2. Tanase M, Felton EJ, Gray DS, Hultgren A, Chen CS, Reich DH. Assembly of multicellular constructs and microarrays of cells using magnetic nanowires. *Lab Chip*. 2005;5(6):598–605.
3. Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, et al. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(26):15256–15261.
4. Arbab AS, Jordan EK, Wilson LB, Yocum GT, Lewis BK, Frank JA. In vivo trafficking and targeted drug delivery of magnetically labeled stem cells. *Hum Gene Ther*. 2004;15(4):351–360.
5. Muthana M, Scott SD, Farrow N, et al. A novel magnetic approach to enhance the efficacy of cell-based gene therapies. *Gene Ther*. 2008; 15(12):902–910.
6. Gaihre B, Khil MS, Kang HK, Kim HY. Bioactivity of gelatin coated magnetic iron oxide nanoparticles: in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(2):573–581.
7. Lewin M, Carlesso N, Tung CH, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*. 2000;18(4):410–414.
8. Josephson L, Tung CH, Moore A, Weissleder R. High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem*. 1999;10(2):186–191.
9. Bulte JW, Douglas T, Witwer B, et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19(12):1141–1147.
10. Babic M, Horak D, Trchova M, et al. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem*. 2008;19(3): 740–750.
11. Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology*. 2003;228(2):480–487.
12. Terrovitis JV, Bulte JW, Sarvananthan S, et al. Magnetic resonance imaging of ferumoxide-labeled mesenchymal stem cells seeded on collagen scaffolds – relevance to tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006; 12(10):2765–2775.
13. Ju S, Teng G, Zhang Y, Ma M, Chen F, Ni Y. In vitro labeling and MRI of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Magn Reson Imaging*. 2006;24(5):611–617.
14. Park BH, Jung JC, Lee GH, et al. Comparison of labeling efficiency of different magnetic nanoparticles into stem cell. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp*. 2008;313–314:145–149.
15. Zhu AP, Fang N, Chan-Park MB, Chan V. Interaction between O-carboxymethylchitosan and dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayer. *Biomaterials*. 2005;26(34):6873–6879.
16. Kuo JW. *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.
17. Kawaguchi H. Functional polymer microspheres. *Prog Polym Sci*. 2000; 25(8):1171–1210.
18. Lee Y, Lee H, Kim YB, et al. Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging. *Adv Mater*. 2008;20(21):4154–4157.
19. Lim EK, Kim HO, Jang E, et al. Hyaluronan-modified magnetic nanoclusters for detection of CD44-overexpressing breast cancer by MR imaging. *Biomaterials*. 2011;32(31):7941–7950.
20. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 2006;85(8):699–715.
21. Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem*. 2001;276(22):19420–19430.
22. Lee H, Lee BP, Messersmith PB. A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature*. 2007;448(7151):338–341.
23. Horak D, Babic M, Jendelova P, et al. D-mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem*. 2007;18(3): 635–644.
24. Zaveta K, Lancok A, Marysko M, Pollert E, Horak D. Superparamagnetic properties of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  particles: Mossbauer spectroscopy and DC magnetic measurement. *Czech J Phys*. 2006;56 Suppl 3:E83–E91.
25. Choi KY, Lee S, Park K, et al. Preparation and characterization of hyaluronic acid-based hydrogel nanoparticles. *J Phys Chem Solids*. 2008;69(5–6):1591–1595.
26. Darr A, Calabro A. Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(1):33–44.
27. Xu C, Xu K, Gu H, et al. Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2004;126(32):9938–9939.
28. Basti H, Ben Tahar L, Smiri LS, et al. Catechol derivatives-coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles as potential MRI contrast agents. *J Colloid Interface Sci*. 2010;341(2):248–254.
29. Rajh T, Chen LX, Lukas K, Liu T, Thurnauer MC, Tiede DM. Surface restructuring of nanoparticles: an efficient route for ligand-metal oxide crosstalk. *J Phys Chem B*. 2002;106(41):10543–10552.
30. Babic M, Horak D, Jendelova P, et al. Poly(N,N-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem*. 2009;20(2):283–294.
31. Henning TD, Sutton EJ, Kim A, et al. The influence of ferucarbotran on the chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Contrast Media Mol Imaging*. 2009;4(4):165–173.
32. Farrell E, Wielopolski P, Pavljasevic P, et al. Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369(4): 1076–1081.
33. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*. 2001;55(6):333–339.
34. Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis AS. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalization. *Biomaterials*. 2004;25(23):5405–5413.
35. Ng CK, Handley CJ, Preston BN, Robinson HC, Bolis S, Parker G. Effect of exogenous hyaluronan and hyaluronan oligosaccharides on hyaluronan and aggrecan synthesis and catabolism in adult articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316(1):596–606.

**International Journal of Nanomedicine**

**Publish your work in this journal**

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

**Dovepress**

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Publikace, které souvisejí s tématem dizertační práce

# Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media

Karolina Turnovcova<sup>1,2</sup>, Katerina Ruzickova<sup>1</sup>, Vaclav Vanecek<sup>1,2</sup>,  
Eva Sykova<sup>1,2</sup> and Pavla Jendelova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, and <sup>2</sup>Department of Neuroscience and Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Charles University, 2nd Medical Faculty, Prague, Czech Republic

## Background aims

Human mesenchymal stromal cells (*bMSC*) are a promising tool for future clinical application, but their use requires rapid cell expansion in media suitable for clinical use. Therefore, we tested the influence of several culture media on colony formation, population doubling (PD) time, cell cycle and surface marker expression.

## Methods

*bMSC* isolated from human bone marrow (BM) obtained from healthy donors were seeded and expanded in different culture media:  $\alpha$ -minimum essential medium (MEM) supplemented with 2.5%, 5%, 10% or 20% fetal bovine serum (FBS), 5% or 10% human cord blood serum (hCBS), 5% or 10% human blood serum from AB adult donors (*hABS*), or mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM™). The number, diameter and total area of the colonies formed and PD time were determined, and the cell cycle and 16 surface markers were analyzed.

## Results

Colony-forming efficiency was best in  $\alpha$ -MEM/hCBS and  $\alpha$ -MEM/*hABS*, good in MSCGM and worst in  $\alpha$ -MEM/FBS. The shortest

PD time was achieved in media enriched with human sera or MSCGM, while the time was increased in  $\alpha$ -MEM/FBS. The largest proliferating fraction was seen in MSCGM followed by media enriched with human sera; the fraction was smallest in  $\alpha$ -MEM/FBS. Staining for CD34, CD45, CD235a and CD271 was negative, while that for CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and human leukocyte antigen (HLA)-A, -B, -C was positive in all media tested. Media with human serum did not adversely affect the differentiation potential of *bMSC*, and differentiation into osteoblasts was enhanced.

## Conclusions

The choice of serum influences *bMSC* expansion and cell properties;  $\alpha$ -MEM supplemented with *hABS* seems to be a promising candidate for clinical use.

## Keywords

cell cycle, cell differentiation, cell-surface antigens, clinical trials, colony-forming units, population doubling time.

## Introduction

Human mesenchymal stromal cells (*hMSC*) are a promising tool for future clinical application. *hMSC* are non-hematopoietic stem cells isolated from adult tissues such as bone marrow (BM), adipose tissue, dental pulp and peripheral blood. *hMSC* are multipotent, adherent cells with the capacity to differentiate into various cell lines, including osteoblasts, chondroblasts and adipoblasts.

In the case of severe tissue ischemia or damage, mesenchymal stromal cells (MSC) can be attracted to the damaged site, where they influence repair and regenerative processes. MSC can be mobilized from the marrow or expanded in culture and delivered to the damaged site by direct or systemic injection [1]. An important property of MSC is their production of a broad spectrum of bioactive macromolecules that establish a regenerative microenvironment in injured

Correspondence to: Pavla Jendelova, PhD, Institute of Experimental Medicine AS CR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Czech Republic.  
E-mail: jendel@biomed.cas.cz

tissue and exert potent immunosuppressive and anti-inflammatory effects. MSC release regulatory cytokines and paracrine factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), beta fibroblast growth factor ( $\beta$ FGF), interleukin (IL)-6, placental growth factor (PIGF), monocyte chemoattractant protein 1 [2], granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), IL-6, IL-11 and leukemia inhibitory factor (LIF) [3]; in addition, MSC can modulate the host immune system [4]. They are thought to promote functional recovery and induce the survival and regeneration of numerous damaged tissues and organs, such as neural tissue (by the production of brain-derived neurotrophic factor and beta-nerve growth factor) [5], inflamed bowel tissue [6] and injured skin [2]; they can also modulate hepatocellular death and liver regeneration in rats [7]. Current clinical trials in humans are based on the immunosuppressive, immunomodulatory and trophic properties of hMSC, as well as on their putative capacity to differentiate into specific cells in the target tissue; a brief overview of the past, present and future of stem cell-based therapies in clinical practice is provided in the review of Bajada *et al.* [8]. hMSC have been investigated for the treatment of skeletal diseases and traumas such as osteogenesis imperfecta, osteodysplasia, distal tibial fracture, multi-trauma, kidney failure, lupus erythematosus, liver diseases, heart failure, coronary heart disease, including myocardial infarct, and other pathologies. Information about current clinical trials can be found at the website <http://www.clinicaltrials.gov>, accessed on August 12, 2009 under the keywords 'human mesenchymal stem cells'. In the majority of experiments, hMSC are isolated and expanded in medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) [9]. However, a risk of prion transmission is associated with using FBS, as is contamination by atypical animal pestiviruses in bovine serum products [10] and the risk of developing an immune response to FBS in human patients [11–13]. To overcome these problems, the use of autologous human sera is recommended [14]. However, collecting a sufficient volume of autologous serum could be, in the case of serious injury or disease, practically impossible. Also, the application of hMSC in clinical medicine requires not only rapid cell expansion in a safe medium suitable for clinical use, but also that the cells should retain their surface markers and physiologic properties.

Growing research interest focused on hMSC has led to several ambiguities and inconsistencies in defining

mesenchymal stromal cells, which are also often termed mesenchymal stem cells. To clarify the definition of hMSC, the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) issued a position statement that recommended that the term hMSC should refer to plastic-adherent, spindle-shaped or fibroblast-like cells forming colonies before the first trypsinization in culture. hMSC cultivated *in vitro* should express CD73, CD90 and CD105 but not human leukocyte antigen (HLA)-DR, CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  or CD19 [15]; eventually, they should also express CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD71, CD106, CD120, CD124, CD166 and major histocompatibility complex (MHC) I [9,16–20].

In this study, we tested the influence of several culture media on cell expansion and cell properties. We focused on the colony-forming properties, population doubling time (PD), cell cycle and expression of surface markers.

## Methods

### Cell cultures

Human MSC were obtained by BM aspiration from 25 healthy 19–41-year-old donors; the mononuclear fraction containing hMSC was collected using Ficoll density-gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden; [www.gelifesciences.com/cellprep](http://www.gelifesciences.com/cellprep)). Briefly, 3 mL Ficoll was layered with 2 mL marrow aspirate mixed with 2 mL phosphate-buffered saline (PBS) in a centrifuge tube and centrifuged at 400 g for 40 min. The mononuclear layer was then transferred to a sterile tube [21]. The cell suspension was seeded on 10-cm Petri dishes at different seeding densities, according to the type of experiment (see below). The hMSC were isolated based on their selective adherence to the plastic surface [22], then expanded in nine different culture media: alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 2.5%, 5%, 10% or 20% FBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 5% or 10% human cord blood serum (hCBS; Stem Cell Pro Ltd, Prague, Czech Republic), 5% or 10% allogeneic human blood serum from AB adult donors (hABS; from the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic, prepared as described below), containing 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (P/S), or mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM™; Lonza/Cambrex, Basel, Switzerland). The cells were not pooled, i.e. each sample was tested separately in triplicate.

Cell isolation was done in the same media as the expansion, so the cells were never exposed to more than one type of serum. Non-adherent cells were removed after 3 days, then the media were changed twice per week. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. All tissue culture flasks and dishes were obtained from TPP (Trasadingen, Switzerland; <http://www.tpp.ch>).

### **Human sera preparation**

The sera for cultivation were prepared from the blood of healthy adult AB donors. The sera were prepared within 72 h of blood withdrawal. The blood was collected into anti-coagulant-free glass flasks and allowed to clot, then centrifuged and the serum layer removed. The collected sera were frozen in flasks, then thawed, pooled, aliquoted and stored at -20°C. Thus, before being used for cultivation, the blood samples were frozen and thawed twice. Before media preparation, the serum was filtered through a 0.22-μm PES membrane syringe filter (TPP).

### **Colony-forming properties and PD**

After Ficoll density-gradient centrifugation, a cell suspension containing  $1 \times 10^6$  mononuclear cells was seeded on 10-cm Petri dishes, i.e. c. 1300 cells/cm<sup>2</sup>. After 2 weeks of cultivation, the hMSC colonies were stained with 0.5% crystal violet. The colony-forming properties were assessed by counting colonies with a diameter >2 mm and calculating the total areas of the colonies.

For assessing the PD time, cells were detached after forming large colonies and plated at a density of 150 cells/cm<sup>2</sup> on 3.5-cm Petri dishes. Five circles (20 mm<sup>2</sup> each) were marked on the bottom of each seeded Petri dish. The number of hMSC was counted in those five circles in each dish for 4 consecutive days. We calculated the average value of cell propagation (F) as the number of cells found in the circles divided by the number of cells found in the circles on the previous day in the same dish. The PD time between any two consecutive days was therefore  $PD = 2/F \times \text{time}$  in hours between consecutive counts of the cell numbers in the same dish. The average PD time over the course of the 4-day experiment was then calculated for each replicate as  $PD_{1-2} + PD_{2-3} + PD_{3-4/3} = PD$ .

### **Cell cycle**

Cells were seeded at 5000 cells/cm<sup>2</sup> on 10-cm Petri dishes, cultivated for another week and then detached with

trypsin/ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA). The cell suspension was fixed and permeabilized in 70% ethanol overnight in the dark at 4°C. DNA was stained with propidium iodide/RNase staining buffer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA; <http://www.bdbiosciences.com>) in a volume of 500 μl (containing  $10^6$  cells) for 15 min at room temperature, then washed in PBS. DNA content was analyzed on a FACSAria flow cytometer using FACSDiVa Software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA; <http://www.bdbiosciences.com>).

### **Cell differentiation**

To induce chondrogenesis, cells were harvested, transferred to polypropylene tubes and differentiated into chondrocytes in pellet cultures (250 000 cells/pellet) in serum-free medium containing α-MEM, dexamethasone (0.1 μM; Sigma, St Louis, MO, USA), human transforming growth factor-beta1 (hTGF-β1; 10 ng/mL; Millipore, Billerica, MA, USA), L-ascorbic acid (0.05 mM; Sigma), BDTM ITS+ universal culture supplement premix 1% (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) and P/S (Gibco BRL, Paisley, UK). The tubes were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator and the medium was changed twice a week. Chondrogenic pellets were harvested after 20–22 days in culture. The pellets were fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin blocks and cut into 5-μm thick sections. Samples were then stained with Alcian blue using standard staining methods [23].

To induce adipogenic differentiation, the cells were seeded in six-well plates at a density of 10 000 cells/cm<sup>2</sup>. Cells were grown to confluence and treated with medium containing α-MEM and either 10% FBS, 10% hABS or 10% hCBS, dexamethasone (1 μM), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (0.5 mM; Sigma), indomethacine (0.1 mM; Sigma), insulin (10 μg/mL; Sigma) and P/S. The medium was changed twice a week. After 10 days the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Oil Red [23].

To induce osteogenesis, the cells were seeded in six-well plates at a density of 3000 cells/cm<sup>2</sup>. Cells were allowed to adhere for 24 h, then osteogenic medium containing α-MEM and either 10% FBS, 10% hABS or 10% hCBS, dexamethasone (0.1 μM), β-glycerophosphate (10 mM; Sigma), L-ascorbic acid (0.1 mM) and P/S was added. The medium was changed twice a week. After 7–20 days of culture, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Alizarin Red [23].

### Expression of surface markers

After forming large colonies, cells were transferred into 150-cm<sup>2</sup> flasks and cultivated to achieve a sufficient number of cells (minimum 2.5×10<sup>5</sup> cells/sample, thus at least 6×10<sup>6</sup> cells in total). Therefore, we used cells from the third or fourth passage. When the cell monolayer reached its maximal confluence, the cells were detached with trypsin/EDTA, washed with PBS/2% bovine serum albumin (BSA) and labeled with the respective primary and secondary antibodies according to the manufacturer's recommendations for flow cytometry, then washed and fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C overnight prior to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, which was performed using a FACS Aria flow cytometer and FACSDiVa Software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA; <http://www.bdbiosciences.com>).

The following 16 primary antibodies were used: CD10 IgG1-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD34 IgG1-FITC, CD105 IgG2a-Dyomics 647, HLA-DR+DP IgG2a-FITC (Exbio Antibodies, Vestec, Czech Republic; <http://www.exbio.cz>), CD29 IgG1-phycoerythrin (PE), CD44 IgG2b-FITC, CD49a IgG1-PE, CD71 IgG2a-PE, CD73 IgG1-PE, CD90 IgG1-FITC, CD271 IgG1-PE, HLA-A,-B,-C IgG1κ-FITC (BD Pharmingen; <http://www.bdbiosciences.com>), CD45 IgG1-PE-and cyanine, i.e. IgG1-PE-cyanine 5 (Cy5), CD61/51 IgG1-PE, CD235a IgG1-PE (Dako, Glostrup, Denmark; <http://www.dako.com>) and unconjugated anti-fibroblast surface marker IgM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; <http://www.sigmaaldrich.com>). Anti-mouse IgM-FITC (Exbio Antibodies, Vestec, Czech Republic; <http://www.exbio.cz>) was used as a secondary antibody in conjunction with anti-fibroblast surface marker. Isotype controls were purchased from Dako: IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-Pe-Cy5, IgG2a-PE and IgG2b-FITC. At least 10 000 stained cells were acquired, and the gates were set so that no more than 1% of the cells were positive when stained with the isotype controls.

### Statistical analysis

The numbers of colonies, PD times and cell cycle were evaluated using a one-way ANOVA, and the results were considered significant when  $P<0.05$ . The data are expressed as mean±SE, and the correlation coefficient between PD time and cell cycle was calculated.

## Results

### Defining the hMSC

To meet the criteria of the ISCT, we characterized our cells, grown in standard culture conditions (in 10% FBS),

as expressing CD90, CD105 and CD73 and negative for CD45, CD34, CD11b, CD19 and HLA-DR+DP. In addition, we differentiated the cells into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts (Figure 1A–C) to confirm their multipotent potential.

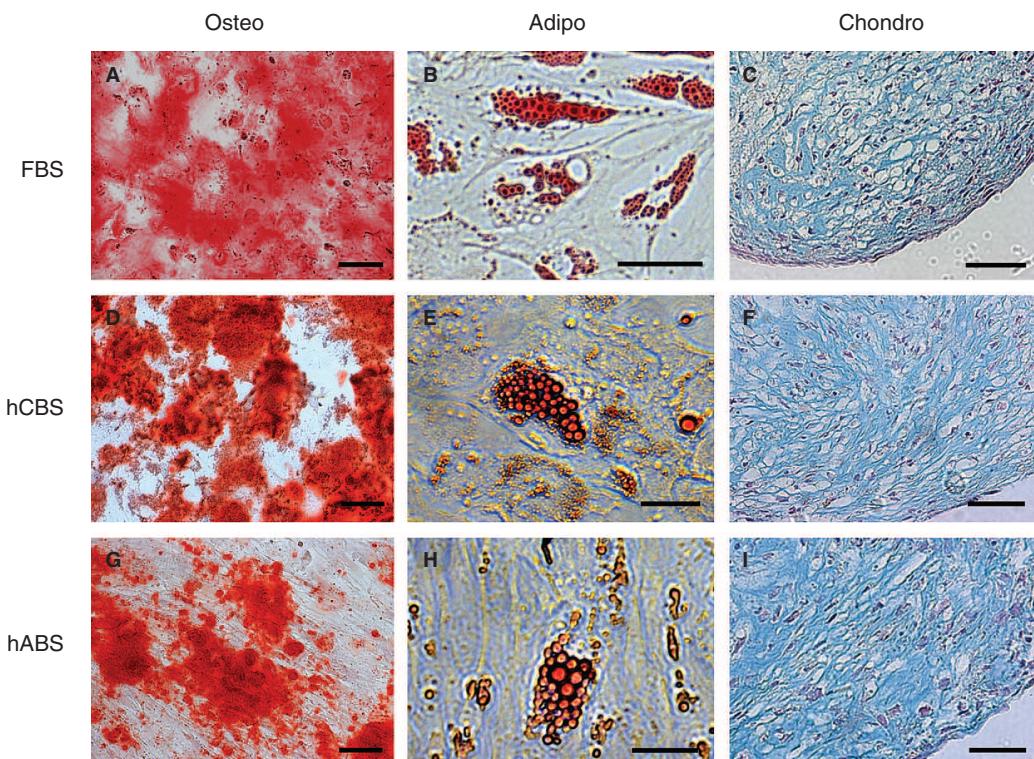
### Colony-forming properties and cell morphology

The colony-forming properties were assessed by counting those colonies with a diameter >2 mm and calculating the diameters and total areas of the colonies after crystal violet staining. The number of colonies (Figure 2A) was significantly smaller only in 5% and 20% α-MEM/FBS sera; however, the diameter of the colonies (Figure 2B) was significantly larger in human ABS and MSCGM, followed by CBS and FBS. These findings indicated that the adherent cells from the mononuclear fraction could attach when cultivated in any of the tested media; however, their growth was much more pronounced in human sera and in a medium that is designed for MSC expansion. Generally, the colony-forming efficiency (total area of colonies; Figure 2C) was better in α-MEM/human sera and MSCGM than in α-MEM/FBS. A 10% concentration of FBS gave better results than 5% or 2.5%, while a 20% concentration of FBS was the worst. The  $P$ -value as calculated by ANOVA was <0.001, and pair-wise comparisons revealed significant differences between all α-MEM/FBS media and the other formulations.

Cells grown in human and cord blood sera were larger, with elongated cell bodies and processes, while cells cultured in FBS were smaller and had a flat, rounded shape (Figure 3A, B). When reaching confluency, MSC from human sera were uniformly spindle shaped, while MSC grown in FBS remained flat (Figure 3C, D) and never reached confluency.

### Cell cycle and PD

Cell-cycle analyzes were performed by DNA content assessment. FACS analyzes revealed that, while a small population of cells were proliferating ( $S+G2+M=10\%$ ), approximately 90% of the cells were in phase G1/G0. No significant differences among the tested media were found in terms of the fraction of proliferating cells ( $P$  by ANOVA >0.05; Figure 4A). The size of the proliferating fraction among cells grown in any particular media showed high variability (data not shown). This variability was not donor age-dependent or media-dependent; most probably it



**Figure 1.** Differentiation capacity of hMSC. Differentiation into osteoblasts was demonstrated by calcium deposits stained with Alizarin Red. The cells were differentiated in the presence of 10% FBS (A), 10% hCBS (D) and 10% hABS (G). Differentiation into adipoblasts was confirmed by the formation of lipid droplets stained with Oil Red O. The cells were differentiated in the presence of 10% FBS (B), 10% hCBS (E) and 10% hABS (H). Differentiation into chondroblasts was demonstrated by staining with Alcian Blue. The differentiation medium was serum free but the cells were expanded in 10% α-MEM/FBS (C), 10% α-MEM/hCBS (F) and 10% α-MEM/hABS (I). Scale bars: A, D, G=20  $\mu$ m; B, E, H=10  $\mu$ m; C, F, I=50  $\mu$ m.

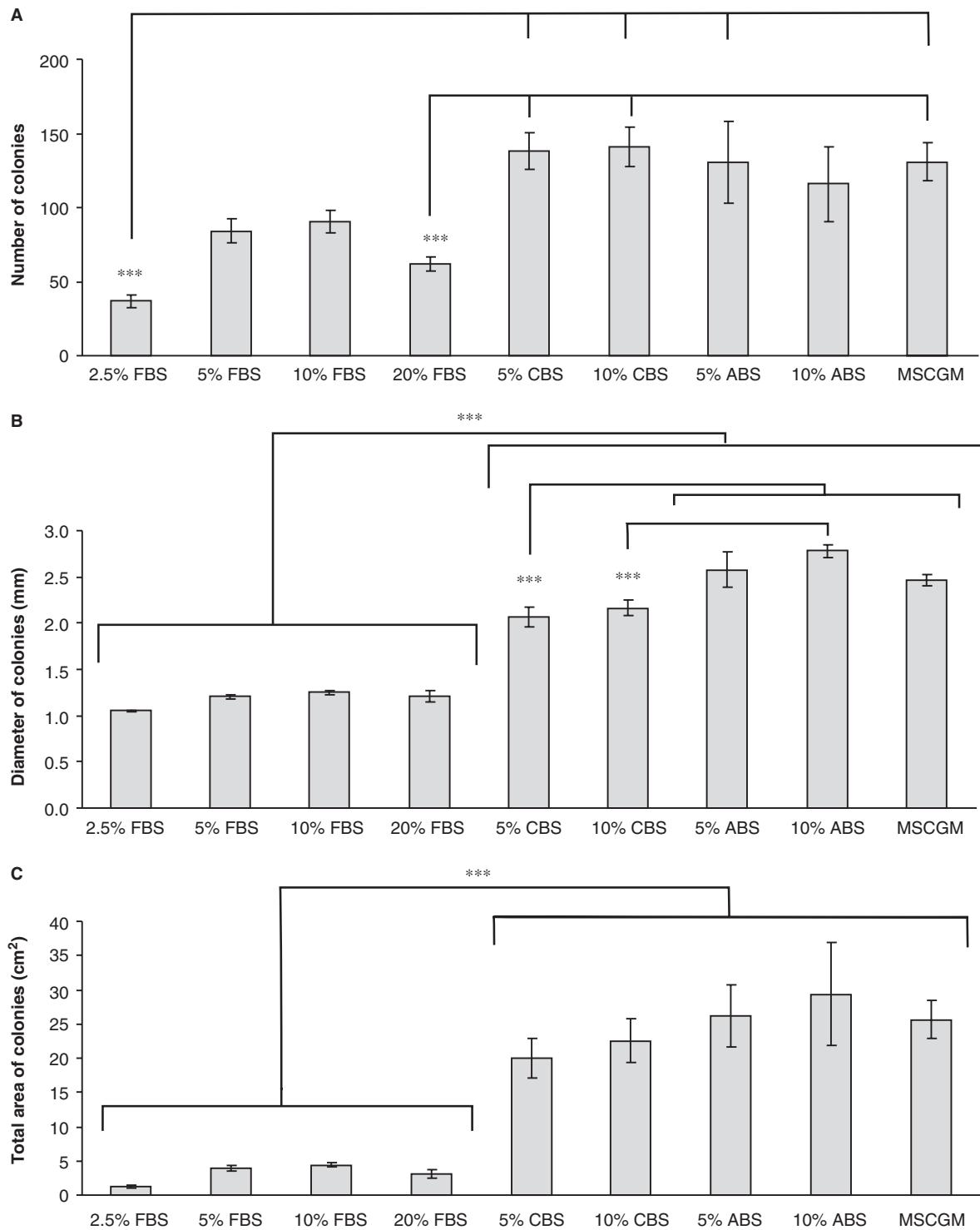
resulted from the influence of several factors, such as time spent in culture, maximal confluence, etc. These results, in conjunction with the PD time, suggested that the number of proliferating cells remained the same but the cells were cycling faster, i.e. the cell cycle was shorter (Figure 4B).

The time required for PD varied between approximately 44 h ( $\alpha$ -MEM/FBS) and 21 h (10% hABS). There was a certain donor variability in PD time; nonetheless, the cells always grew faster in human sera, and there was no correlation between the age of the donor and the PD time. One-way ANOVA revealed highly significant differences among the various media ( $P<0.01$ ; Figure 5).

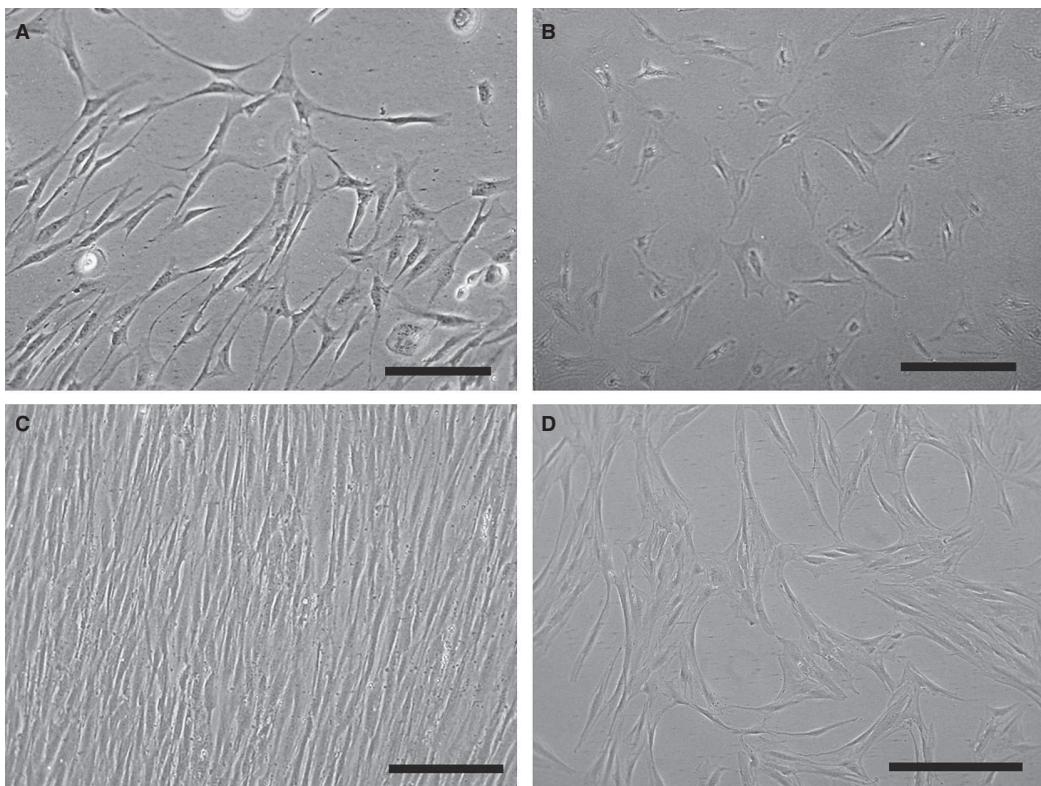
### Expression of 16 surface markers

The expression of CD10, CD29, CD34, CD44, CD45, CD49a, CD51/61, CD71, CD73, CD90, CD105, CD235a, CD271, anti-fibroblast surface marker, HLA-A, -B, -C and

HLA-DR+DP was tested in 5% and 10%  $\alpha$ -MEM/hABS, 5% and 10%  $\alpha$ -MEM/hCBS, 5% and 10%  $\alpha$ -MEM/FBS and MSCGM. In 2.5% and 20%  $\alpha$ -MEM/FBS, we did not obtain a sufficient number of cells to perform FACS analyzes. As expected, CD34, CD45, CD235a and CD271 were negative, while CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and HLA-A, -B, -C were positive in all tested media. Table I shows the relative intensity of surface marker expression in cells cultivated in the different media. In general, all positive markers were up-regulated in  $\alpha$ -MEM/human sera and down-regulated in  $\alpha$ -MEM/FBS; this down-regulation was increased with decreasing concentrations of FBS. In particular, differences in the expression of the adhesion markers CD29, CD44, CD51/61 and CD49a and the ubiquitous metabolic markers CD71, CD73 and CD10 were observed among media enriched with different sera.



**Figure 2.** The number of colonies (A), diameter of colonies (B) and total area of colonies (C) grown in different culture media. Data are expressed as mean+SE. \*\*\*P<0.01.



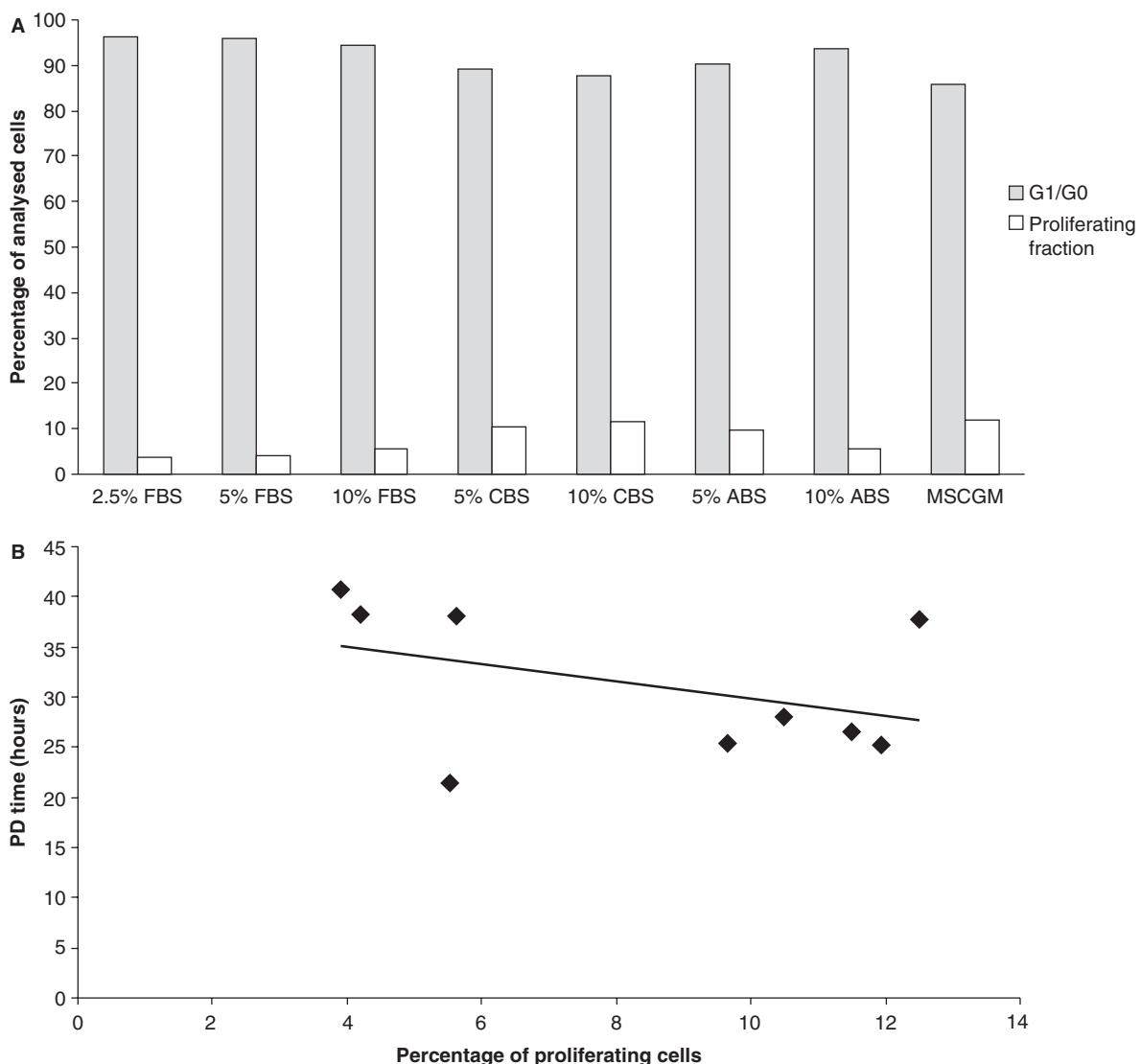
**Figure 3.** Morphology of bMSC grown in 10%  $\alpha$ -MEM/hABS (A) and 5%  $\alpha$ -MEM/FBS (B). Cells cultivated in media supplemented with human sera were spindle-shaped with long processes, in comparison with the small, flat cells found with a low concentration of FBS. bMSC in 10%  $\alpha$ -MEM/hABS reached 100% confluence and were classified as spindle-shaped (C). Cells in 10% FBS were flat and did not reach confluence (D). Scale bars 100  $\mu$ m.

### Cell differentiation

To prove that human serum does not have any negative influence on cell differentiation, we differentiated cells expanded in 10% hABS, 10% hCBS and 10% FBS serum into osteogenic, adipogenic and chondrogenic phenotypes. During adipogenic and osteogenic differentiation we used 10% hCBS and 10% hABS, respectively (Figure 1D, E, G, H). In chondrogenic differentiation medium, the serum was replaced by BDTM ITS + universal culture supplement premix and was not used. Therefore, we only show the differentiation of cells expanded in human sera (Figure 1F, I). None of the human sera had a negative influence on the differentiation potential. The osteogenic potential was enhanced in 10% hCBS; robust calcium deposits were already visible 7 days after differentiation induction (Figure 1D). Similar results were achieved in hABS, where the differentiation into osteoblasts (Figure 1G) took only 11 days, compared with 20 days in 10% FBS (Figure 1A).

### Discussion

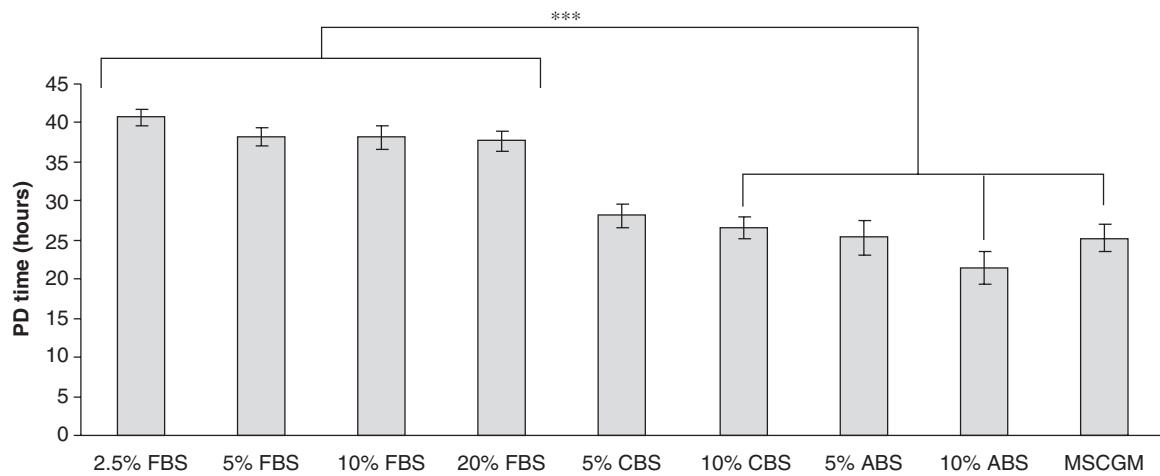
We studied the growth properties and surface marker expression of human MSC cultivated in different media. The aim of our study was to assess various media in terms of their suitability for use in clinical applications. The choice of serum influences hMSC expansion and cell properties. Another important factor that influences the growth of MSC is the seeding density. Neuhuber *et al.* [24] showed, in experiments with rat mesenchymal stromal cells, that the growth patterns of rat MSC depend on the initial plating densities; a density of 200 cells/cm<sup>2</sup> was found to be the best. In our experiments, the seeding density of human MSC was 150/cm<sup>2</sup> for assessing the PD time. This density may be more suitable for the larger human MSC. Independent of the seeding density used in our study for any particular experiment, human sera ( $\alpha$ -MEM/hABS) appeared to be the best alternative for the rapid expansion of hMHC. Our results are in agreement with those of Stute *et al.* [25], who tested the expansion and differentiation of hMSC in



**Figure 4.** (A) Percentage of cells in different phases of the cell cycle, based on DNA content analysis. The largest proliferating fraction was seen in MSCGM (11.90%) followed by  $\alpha$ -MEM/hCBS media (11.50% in 10%  $\alpha$ -MEM/hCBS, 10.48% in 5%  $\alpha$ -MEM/hCBS); the fraction was smaller in all  $\alpha$ -MEM/FBS media and decreased with decreasing serum concentrations. (B) Correlation between PD time and percentage of cells in the S1G2/M phase; these results suggested a slight correlation between PD time and the size of the proliferating fraction, but the degree of correlation was not significant ( $P=0.2$ ).

different concentrations of human autologous serum (hAS) versus FBS. The best proliferation rate and highest osteogenic potential was achieved using 10% hAS. However, the use of 10% FBS gave better results than low concentrations (3% and 1%) of hAS, revealing that a certain level of serum proteins is important for hMSC. In our experiments, a 5% concentration of hABS or hCBS still yielded better results than 10% FBS. Therefore, the threshold for human serum levels seems to be between 3% and 5%. In contrast

to the results of Shahdadfar *et al.* [9], the use of  $\alpha$ -MEM/hABS gave the best results. These authors reported growth inhibition and short culture survival in allogeneic sera, but they used pooled human serum. It is likely that the growth inhibition observed in allogeneic cultures is caused by the amount of hemagglutinins present in pooled human sera. This problem can be overcome by using media enriched with autologous human sera, as the serum and cells are from the same blood group. We speculate that our positive results



**Figure 5.** PD analysis of hMSC grown in different culture media. The PD times achieved in MSCGM and α-MEM enriched with human sera (ABS or CBS) were significantly faster than in α-MEM/FBS media. Data are expressed as mean+SE. \*\*\*P<0.01.

obtained by culturing cells in media enriched with human AB serum or cord blood serum are because of the low concentration of these agglutinins in juvenile blood, in the case of cord blood serum, and the fact that AB blood lacks anti-A and anti-B hemagglutinins. In none of the human sera (ABS or CBS) did we find a significant difference in any

of the evaluated parameters that would depend on the chosen serum concentration. Currently, 10% FBS is the standard condition in which human MSC are expanded for research purposes. Various batches of FBS can differ in their growth support of hMSC. In our pilot studies we tried FBS standard and gold quality from PAA Laboratories, (Linz,

**Table I.** Expression of surface markers in hMSC.

Surface antigens	5% FBS	10% FBS	5% ABS	10% ABS	5% CBS	10% CBS	MSCGM
CD10 CALLA	-	-	+	+	+	+	+
CD29 Integrin, beta 1	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD34 Hematopoietic progenitor cell marker	-	-	-	-	-	-	-
CD44 Hyaluronate binding protein	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD45 Leukocyte common antigen	-	-	-	-	-	-	-
CD49a Integrin, alpha 1	-	-	+	++	+	+	+
CD61/51 Integrin αv/β3	-	-	++	++	+	+	+
CD71 Transferrin receptor	-	-	+++	++	++	++	++
CD73 5'-nucleotidase, ecto (NT5E)	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD90 Thy-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD105 Endoglin, part of the TGF-β receptor complex	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD235a Glycophorin A	-	-	-	-	-	-	-
CD271 NGFR	-	-	-	-	-	-	-
HLA-A, -B, -C	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
HLA-DR + DP	-	-	-	-	-	-	+
Fibroblast-specific antigen	-	-	-	+	-	-	+

-, no expression (<10%); +, weak expression (11–40%); ++, moderate expression (41–70%); +++, strong expression (>71%).

Austria) and certified serum from Gibco-Invitrogen. However, we did not find significant differences in the growth properties of hMSC. It might be possible to obtain better results in terms of growth properties if special batches, pre-screened to guarantee optimal growth, are used.

The study of cell kinetics revealed that the time required for PD was almost twice that for cells cultivated in  $\alpha$ -MEM/FBS compared with cultivation in  $\alpha$ -MEM/hABS. In contrast, cell-cycle analysis showed that only a small population of cells was proliferating (S + G<sub>2</sub> + M); more than 90% of cells were in the G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase. The number of dividing cells, as determined by DNA content analysis, varied within any particular media (data not shown). This suggests that the actual number of reproducing cells depends on other factors, such as time spent in culture or cell confluence. The cell cultures supplemented with hABS or MSCGM achieved greater expansion because of rapid cell division rather than an increase in the number of dividing cells. Our findings are in agreement with those of Conget *et al.* [17], who found that, although only a small fraction of cells (less than 10%) proliferated, this number of cells was sufficient for the maintenance of growth in culture. In experiments simulating clinical settings, starting from the same seeding density we were able to harvest in 3 weeks 6–10 times more cells/cm<sup>2</sup> in media enriched by human sera than in media with 10% FBS (data not shown). Rapid expansion can play a crucial role for patients in whom the cell transplantation window occurs during the acute phase of disease or injury.

MSC from BM can be cultured with a stable phenotype [18]. Unfortunately, there is no single marker that can characterize MSC. Pittenger *et al.* [18] describe them as uniformly positive for CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a and CD124 and negative for CD34, CD45 and CD14. The biotech company Lonza states in its technical datasheet for the characterization of MSC that CD105, CD166, CD29 and CD44 are positively expressed while CD14, CD34 and CD45 are negative. To clarify the definition of hMSC, in 2006 the ISCT decided to publish criteria for defining hMSC [15]. According to these new criteria, hMSC are positive for CD90, CD105 and CD73 and negative for CD45, CD34, CD11b or CD14, CD19 or CD79 $\alpha$  and HLA-DR. We have defined our cells according to the recommended criteria; however, once we excluded CD11b and CD19 from our pilot experiments, we did not add these markers to our panel, as we were interested in positive rather than negative markers. The fact that we do not have any CD11b<sup>+</sup>

or CD19<sup>+</sup> cells in our culture can also be demonstrated by the fact that our cells are negative for CD45 and CD10. This means that, in our cultures, we do not have any nucleated blood cells (CD45<sup>+</sup>) or developing B lymphocytes (CD10<sup>+</sup>). Among the markers widely used to define MSC, we found that CD90, CD73 and CD105 were positive and CD235a, CD34 and CD45 were negative in all tested media, independent of the type of serum. CD271 was negative in our cultured cells; however, surface marker expression can be different between cultured and freshly harvested cells, for example CD271 can be used for MSC-enriched isolation from freshly harvested BM [26,27].

The adhesion markers CD29 and CD44, which were strongly expressed only on cells cultivated in human sera, play a crucial role in cell morphology, adhesion and migration. CD29-deficient cells proliferate and survive normally, but show abnormal processes and shape or lose their polarity. CD29<sup>–/–</sup> mice show severe brain malformations and die prematurely. Schwann cells do not extend and maintain processes around axons [28,29]. This mechanism could explain the morphologic differences among hMSC cultivated in media supplemented with human or bovine sera. In addition, flat cells, which were present in media with bovine serum, are typical of cultures with slow proliferation. Neuhuber *et al.* [24] showed with rat MSC that an increased number of flat cells was dependent on either time in culture or high confluence. CD44-deficient mice are born without any developmental or neurologic deficits, but they show hematologic impairment with an altered distribution of myeloid progenitors; Schmits *et al.* [30] described defective progenitor egress from BM. CD44<sup>–/–</sup> osteoclasts exhibit an enhanced response to tumor necrosis factor (TNF), as a major inducer of chronic inflammation. Hayer *et al.* [31] concluded that CD44 is a critical inhibitor of TNF-induced joint destruction and inflammatory bone loss. This raises the questions of whether BM and tissue MSC play the same role in inflammation and whether the surface expression of CD44 remains the same after implantation of cultured cells into the host organism.

Somemarkers,suchasCD10,CD71,CD51/61andCD49a, were not expressed in FBS-supplemented serum at all, while low or moderate expression was observed in  $\alpha$ -MEM/human sera. CD10 and CD71 are ubiquitous in normal tissues, and their up/down-regulation can correlate with the functional (metabolic) status of cells (not surprisingly in the case of CD71, the transferrin receptor). CD49a and CD61/51 belong among the superfamily of integrins, and their

expression is related to other products of integrin genes (CD29) and other adhesion markers (CD44). CD49d has been shown to play an important role in neural stem cell homing to the stroke area in mice [32].

In a few samples cultured in MSCGM, we observed positivity for HLA-DR+DP. hMSC are generally negative for MHC II antigens; however, these antigens can be expressed after exposure to interferon-gamma or TGF- $\beta$ 1 [33]. We do not know if some compound was present in MSCGM that could induce the expression of HLA-DR+DP. However, in clinical use, any cell batch that is expanded for patient use should be tested to exclude cells showing MHC II positivity.

Finally, a last criterion for hMSC is their potential to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic phenotypes. Our results demonstrate that the differentiation potential of hMSC cultured in human sera is not affected. Osteogenic differentiation was even faster in hCBS, followed by hABS, confirming the results obtained by Jung *et al.* [34] and Stute *et al.* [25].

Another strategy to overcome the problem of the biosafety of FBS is the use of platelet lysate [35,36] or fresh frozen plasma and platelets [37]. These three studies [35–37] described no change in hMSC characteristics (surface markers, differentiation potential and immune regulatory properties) when serum was replaced by platelet lysate or fresh frozen plasma and platelets, and reported the superior proliferative capacity of the cultured hMSC.

To summarize our findings in terms of potential clinical use, adult ABS is generally available in human medicine in sufficient quantities and ready to use, in contrast to CBS. The use of adult ABS is subjected to the same rules as other human blood derivatives, to avoid possible risks of transmitting viruses such as human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis virus B. The main disadvantage of cord blood serum is its limited source and quantity. MSCGM was designed for hMSC expansion, therefore it yielded good results in all the assessed parameters; however, to date it is only produced for research use, its composition is not disclosed and its use in human medicine depends on company policy. There are some phase I clinical trials that use FBS for the expansion of MSC [38]; however, we have shown that cells grown in FBS not only have a slower expansion rate and never reach confluence, but display a down-regulation of some surface markers compared with cells grown in human sera. We conclude from this study that human allogeneic sera from AB adult donors is the most suitable sera for rapid cell expansion and thus for clinical use.

## Acknowledgments

We thank Jarmila Kasparova for technical assistance, James Dutt for critical reading of the manuscript and Marie Hladikova for statistical analysis. This study was supported by the grants AV0Z50390703, 1M0538, LC554, 309/08/H079 and the EC FP6 projects RESCUE (LSHB-CT-2005-518233) and ENINET (LSHM-CT-2005-019063).

**Disclosure of interest:** The authors declare that they have no competing financial interests.

## References

- Urdzíková 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.
- Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2007;15(Suppl 1):S18–26. *Erratum in Wound Repair Regen* 2008;16:582.
- Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009;217:318–24.
- Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 2008;10:223.
- Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol* 2006;198:54–64.
- Lanzoni G, Roda G, Belluzzi A, Roda E, Bagnara GP. Inflammatory bowel disease: moving toward a stem cell-based therapy. *World J Gastroenterol* 2008;14:4616–26.
- van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 2008;47:1634–43.
- Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:169–83.
- Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005;23: 1357–66.
- Liu L, Xia H, Belák S, Baule C. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. *J Virol Methods* 2008;154:82–5.
- Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* 1997;89:776–9.

12. Mackensen A, Dräger R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:152–6.
13. Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002;13:1605–10.
14. Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum* 2008;58:501–10.
15. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95:209–14.
16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.
17. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181:67–73.
18. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
19. Brinchman JE. Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *J Neurol Sci* 2008;265:127–30.
20. Kasten P, Beyen I, Egermann M, Suda AJ, Moghaddam AA, Zimmermann G, et al. Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Eur Cell Mater* 2008;16:47–55.
21. Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;97(Suppl):77–89.
22. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1993;8:1453–8.
23. Schutze N, Noth U, Schneidereit J, Hendrich C, Jakob F. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun Signal* 2005;3:5.
24. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* 2008;36:1176–85.
25. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* 2004;32:1212–25.
26. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002;30:783–91.
27. Bühring HJ, Battula VL, Tremel S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann NY Acad Sci* 2007;1106:262–71.
28. Graus-Porta D, Blaess S, Senften M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, et al. Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 2001;31:367–79.
29. Feltri ML, Graus-Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, et al. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol* 2002;156:199–209.
30. Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T, et al. CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 1997;90:2217–33.
31. Hayer S, Steiner G, Gortz B, Reiter E, Tohidast-Akrad M, Amling M, et al. CD44 is a determinant of inflammatory bone loss. *J Exp Med* 2005;201:903–14.
32. Guzman R, De Los Angeles A, Cheshier S, Choi R, Hoang S, Liauw J, et al. Intracarotid injection of fluorescence activated cell-sorted CD49d-positive neural stem cells improves targeted cell delivery and behavior after stroke in a mouse stroke model. *Stroke* 2008;39:1300–6.
33. Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* 2007;179:1549–58.
34. Jung J, Moon N, Ahn JY, Oh EJ, Kim M, Cho CS, et al. Mesenchymal stromal cells expanded in human allogeneic cord blood serum display higher self-renewal and enhanced osteogenic potential. *Stem Cells Dev* 2009;18:559–71.
35. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 2005;205:228–36.
36. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of *in vitro* expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* 2007;211:121–30.
37. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 2006;8:437–44.
38. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, et al. Stem cell treatment in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2008;265:78–83.

## Flt3 ligand synergizes with granulocyte–colony-stimulating factor in bone marrow mobilization to improve functional outcome after spinal cord injury in the rat

LUCIA URDZIKOVÁ<sup>1</sup>, KATARÍNA LIKAVČANOVÁ-MAŠÍNOVÁ<sup>1</sup>, VÁCLAV VANĚČEK<sup>1,2</sup>, JIŘÍ RŮŽIČKA<sup>1</sup>, JIŘÍ ŠEDÝ<sup>1</sup>, EVA SYKOVÁ<sup>1,2</sup> & PAVLA JENDELOVÁ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, and

<sup>2</sup>Department of Neuroscience and Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Charles University, Second Medical Faculty, Prague, Czech Republic

### Abstract

**Background aims.** The effect of granulocyte–colony-stimulating factor (G-CSF) and/or the cytokine fms-like tyrosin kinase 3 (Flt3) ligand on functional outcome and tissue regeneration was studied in a rat model of spinal cord injury (SCI). **Methods.** Rats with a balloon-induced compression lesion were injected with G-CSF and/or Flt3 ligand to mobilize bone marrow cells. Behavioral tests (Basso-Beattie-Bresnahan and plantar test), blood counts, morphometric evaluation of the white and gray matter, and histology were performed 5 weeks after SCI. **Results.** The mobilization of bone marrow cells by G-CSF, Flt3 ligand and their combination improved the motor and sensory performance of rats with SCI, reduced glial scarring, increased axonal sprouting and spared white and gray matter in the lesion. The best results were obtained with a combination of G-CSF and Flt3. G-CSF alone or in combination with Flt3 ligand significantly increased the number of white blood cells, but not red blood cells or hemoglobin content, during and after the time-course of bone marrow stimulation. The combination of factors led to infiltration of the lesion by CD11b<sup>+</sup> cells. **Conclusions.** The observed improvement in behavioral and morphologic parameters and tissue regeneration in animals with SCI treated with a combination of both factors could be associated with a prolonged time-course of mobilization of bone marrow cells. The intravenous administration of G-CSF and/or Flt3 ligand represents a safe and effective treatment modality for SCI.

**Key Words:** axonal sprouting, bone marrow mobilization, Flt3 ligand, granulocyte–colony-stimulating factor, neuroprotection, spinal cord injury

### Introduction

Stem cell transplantation represents a potentially powerful treatment modality for various types of injuries, including spinal cord injury (SCI), a severe, often life-threatening, and debilitating clinical condition, with an incidence of 40 new cases per million people throughout the world each year, affecting mainly young people with a mean age of 28.6 years. Stem cells can either replace missing populations of cells or rescue cells in the injured spinal cord by production of cytokines (interleukins) and/or neurotrophic factors, which facilitate regeneration or lead to extensive remyelination when transplanted acutely (1,2). The use of autologous bone marrow cells may have ethical and legislative advantages over other types, such as fetal and embryonic stem cells. Adult bone marrow provides a source of circulating blood progenitors derived from hematopoietic stem cells

as well as a source of non-hematopoietic cells that can differentiate into a variety of cell types, including muscle (3), bone (4) and cartilage (5). Most importantly, the transplantation of mesenchymal stromal cells has been shown to improve functional recovery after spinal cord or brain injury (6–10).

Granulocyte–colony-stimulating factor (G-CSF) synergizes with the hematopoietic cytokine fms-like tyrosin kinase 3 (Flt3) ligand to mobilize progenitor cells into the peripheral blood, and thus has the potential to increase the number of available bone marrow stem cells in the blood for repair of central nervous system injury. For example, the administration of G-CSF enhanced the availability of circulating bone marrow stem cells to the brain and also their capacity for neurogenesis and angiogenesis in rats with cerebral ischemia (11). A previous study has shown that bone marrow cell mobilization induced by G-CSF

Correspondence: Pavla Jendelová, PhD, Institute of Experimental Medicine ASCR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. E-mail: jendel@biomed.cas.cz

(Received 1 February 2011; accepted 21 March 2011)

ISSN 1465-3249 print/ISSN 1477-2566 online © 2011 Informa Healthcare  
DOI: 10.3109/14653249.2011.575355

in rats with a SCI improves functional outcome and increases the volume of spared white matter in the lesion site (10). Moreover, G-CSF itself may have anti-apoptotic and anti-inflammatory effects as well as an effect on neovascularization (12).

Flt3 ligand is a non-redundant hematopoietic cytokine able to induce hematopoietic progenitors into the peripheral blood and to promote the survival of progenitors or stem cells in a synergistic manner with other cytokines, including G-CSF (13). Several authors have also speculated on its possible neuroprotective function, based mainly on its anti-apoptotic effect (14,15).

The aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of bone marrow mobilization by G-CSF, Flt3 ligand and a combination of both. The first part of the study evaluated the behavioral outcome after administration of G-CSF, Flt3 ligand and their combination in rats with a balloon-induced spinal cord compression injury. In the second part of the study, the effect of G-CSF, Flt3 ligand and their combination on blood cell numbers was studied. Finally, morphometric evaluation of the gray and white matter was performed, and glial scar formation, axonal sprouting and macrophage infiltration and/or microglia activation in the lesion center were compared.

## Methods

### *Animals*

In total, 83 male Wistar rats (300–330 g) were used. They were housed under standard conditions of temperature, humidity and a 12-h light/dark cycle, with access to food and water *ad libitum*. This study was performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) regarding the use of animals in research, and was approved by the ethics committee of the Institute of Experimental Medicine ASCR (Prague, Czech Republic). All efforts were made to minimize the number of animals used in the study.

### *Design of the study*

In the first part of the study, we studied the effect of G-CSF and/or Flt3 ligand administration on the behavioral outcome of rats with a SCI. The animals ( $n = 60$ ), with a balloon compression SCI (16), were divided randomly into four groups 1 week after SCI: the first group ( $n = 15$ ) received Flt3 ligand [50 µg/kg, intravenously (i.v.); Amgen Inc.], the second group ( $n = 15$ ) was treated with G-CSF (50 µg/kg, i.v.; Neupogen; Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA), the third group ( $n = 15$ ) received a mixture of G-CSF and Flt3 ligand (G-CSF 25 µg/kg + Flt3 ligand 25 µg/kg, i.v.) and

the fourth group, of control animals ( $n = 15$ ), was injected with saline (1 mL/kg, i.v.). In all cases, the administration of the study substance was performed in the morning at the same hour for 5 days. Motor performance was assessed using the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor rating score (17) and hindlimb sensitivity by the plantar test for 7 weeks after SCI (once per week). At the end of the experiment, all animals were killed and their spinal cords were examined histologically.

In the second part of the study, we examined the effect of G-CSF and/or Flt3 ligand on blood cell count. The animals ( $n = 23$ ) were divided randomly into four groups: the first group ( $n = 6$ ) received Flt3 ligand (50 µg/kg, i.v.; Amgen Inc.), the second group ( $n = 6$ ) was injected with G-CSF (50 µg/kg, i.v.; Neupogen; Amgen Inc.), the third group ( $n = 6$ ) received a mixture of G-CSF and Flt3 ligand (G-CSF 25 µg/kg + Flt3 ligand 25 µg/kg, i.v.) and the control group ( $n = 5$ ) was injected with saline (1 mL/kg, i.v.). In all cases, the administration of the study substance was performed in the morning at the same hour for 5 days. Blood samples were taken from the eye orbital sinus of each animal for analysis 1 day before treatment, on the first, second and fourth days of stimulation, and on the second and fourth days post-stimulation.

### *Balloon compression spinal cord lesion*

After the induction of anesthesia with 5% isoflurane in room air (flow 300 mL/min), animals were maintained with 2.5% isoflurane anesthesia (flow 300 mL/min) via a face mask throughout the operation. Lower concentrations of anesthesia were avoided because they promote the development of neurogenic pulmonary edema and impair the neurologic recovery of the animals, as described in detail previously (18). All animals were heated to 37°C, and their body temperature was measured with a rectal thermometer to standardize the procedure and exclude the influence of hypo- or hyperthermia (19,20). To induce an SCI, we used the model of an epidural balloon compression lesion, as described previously (16,18). Briefly, under aseptic conditions, a 2-cm median skin incision at the Th10–L1 level was made. The dorsal muscles were shifted laterally, and the Th10 and Th11 spinous processes were removed. A hole was drilled into the Th10 lamina with a dental drill. Then, a 2F French Fogarty catheter (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA), filled with distilled water and connected to a 50-µL Hamilton syringe, was inserted into the dorsal epidural space 10 mm rostrally, to reach the Th8–Th9 spinal level. Using a micromanipulator, the balloon was inflated rapidly to 15 µL and left in place for 5 min. Subsequently,

the balloon was deflated and removed. The muscles and skin were sutured in anatomical layers.

The balloon was inflated before and immediately after the injury procedure to confirm the inflation of the balloon in the spinal channel. The inflation of the balloon to 15 µL in the spinal channel produced an incomplete lesion, corresponding to a BBB score of 6–8 at 7 weeks post-injury.

#### *Post-operative care*

After the lesioning procedure, the animals developed complete paraplegia for 2–3 days post-injury, followed by a gradual recovery during 5 weeks post-injury. The animals were housed in pairs, to reduce stress from isolation, on a 12-h light/dark cycle with access to standard rat chow and water *ad libitum*. After lesioning, manual bladder expression was performed. Generally, expression of the bladder was performed twice a day during the early post-operative period. With the improvement of the animals' condition, it was performed once a day until the end of the second week, by which time a reflex bladder was usually established. Animals were examined daily for the occurrence of disease or SCI complications.

#### *Evaluation of neurologic outcome*

All rats were tested behaviorally 1 day before (−1 day) and 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 days after surgery in all groups. Animals were first tested using the BBB test then subsequently with the plantar test, with a minimum interval of 30 min between the two tests in order to minimize the occurrence of false negative results. Hindlimb performance was evaluated using the BBB open field locomotor test developed by Basso *et al.* (17). The rats' locomotion was quantified by two observers blinded to the experimental condition, using a BBB scale ranging from 0 to 21, where 0 reflects no locomotor activity and 21 reflects a normal performance.

Hindlimb sensitivity to thermal stimulation was determined according to the latency (in seconds) of hindlimb withdrawal from thermal stimulation using the plantar test (Ugo Basile, Comerio, Italy). The cut-off value of the plantar test was set to 32 s to prevent limb injury. Testing was performed three times on each hindlimb with 5-min intervals between tests. The latencies for each side were averaged, and the average values were used for statistical analysis.

#### *Histologic evaluation*

Animals were deeply anaesthetized with an overdose of pentobarbital administered intraperitoneally, their chests opened and transcardial perfusion performed with phosphate buffer followed by 4% paraformalde-

hyde solution in phosphate buffer. The spinal column was removed and left in paraformaldehyde solution overnight. The spinal cord was then carefully removed from the spinal cord channel and post-fixed in the same solution for at least 1 week.

For histologic and morphologic analysis, a 2-cm long segment of the spinal cord containing the lesioned site was dissected and embedded in paraffin. The whole segment was serially transversely cut, and a series of 20 sections (thickness 5 µm) was collected (1-mm distance between individual sections). The sections were mounted onto gelatin-coated glass slides and then stained with Luxol Fast Blue and Cresyl Violet for morphologic analysis. We used this staining to facilitate discrimination between the gray and white matter at low magnification. For histologic analysis, serial sections were stained with antibodies directed against GAP43 (1:5000; Chemicon, Temecula, CA, USA), GFAP (1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and CD11b (1:400; Abcam, Cambridge, UK). As a secondary antibody, AlexaFluor 488-conjugated anti-mouse IgG (1:200; Molecular Probes) was used, while the anti-GFAP primary antibody was conjugated with Cy3. Every section was imaged using a digital camera (Axiocam; Zeiss, Oberkochen, Germany); high-resolution images were used to delineate the spared white and gray matter, and their areas were measured using image analysis software (SigmaScan Pro 5; Aspire Software International, Leesburg, VA, USA). For statistical analysis, 11 lesion-centered sections were used from each spinal cord. The volume of the spared tissue in the 11-mm long segment was calculated as the sum of cross-sectional areas multiplied by the distance between them. Quantitative image analysis of CD11b<sup>+</sup> cells was performed by counting the number of immunoreactive cells on transverse sections, separated by a 1-mm distance between individual sections, using Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). The number of CD11b<sup>+</sup> cells was summed for every spinal cord sample in each group and multiplied by the distance between the sections to obtain the sum of CD11b<sup>+</sup> cells in the whole spinal cord segment (2-cm long). To calculate the number of CD11b<sup>+</sup> cells/1 mm<sup>3</sup>, we divided these values by the volume of the 2-cm long spinal cord segment. For the analysis of glial scarring, regions of strong GFAP<sup>+</sup> staining were delineated and their areas measured using Axiovision image analysis software from Zeiss. Astrogliosis was expressed as the percentage of scarred tissue (glial scar area/total area multiplied by 100). Mean values were obtained for the control and all treated groups. Axonal sprouting was expressed as the mean number of GAP43<sup>+</sup> axons per section. High magnification images of transverse sections, separated by a 1-mm distance, in all animal groups stained for GAP43

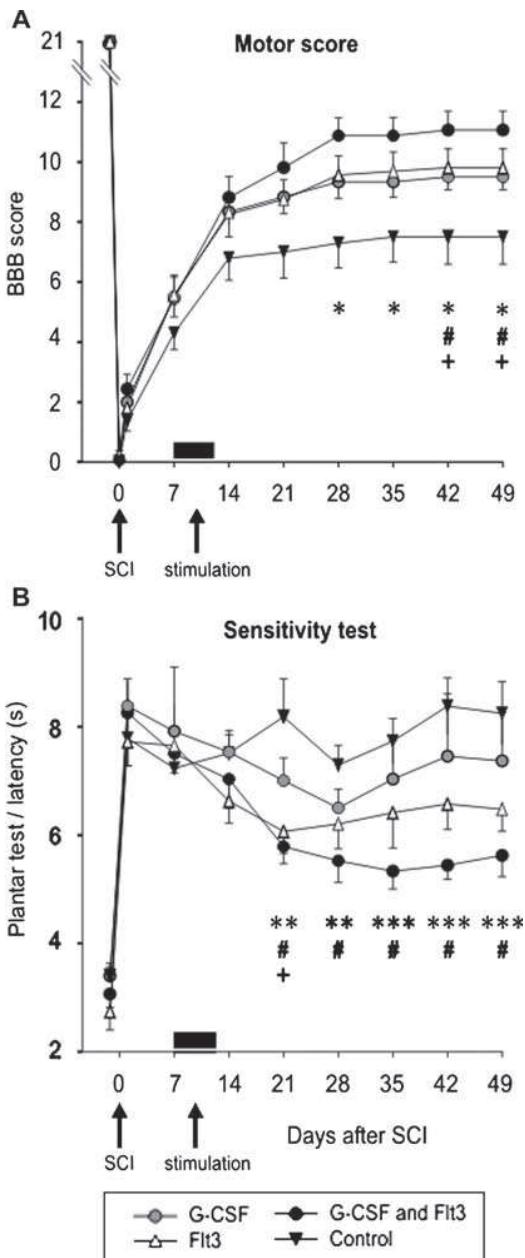


Figure 1. Behavioral outcome after treatment with G-CSF, Flt3 ligand or a combination. (A) In the BBB test of open-field locomotor function, animals treated with a combination of factors showed faster recovery after SCI, while Flt3 ligand or G-CSF alone affected recovery from the sixth week after SCI. (B) The Plantar test measures withdrawal latency in response to a radiant heat source. In rats treated with Flt3 ligand or a combination of Flt3 ligand and G-CSF, the latency time was decreased compared with controls, most markedly in the combined treatment group. G-CSF alone had a significant effect on hindlimb sensitivity only in the third week after SCI. There were no significant differences among the treated groups. Data are averaged between the right and left hindlimbs and expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , G-CSF and Flt3 ligand versus control; # $P < 0.05$ , Flt3 ligand versus control; + $P < 0.05$ , G-CSF versus control.

were taken, and GAP43<sup>+</sup> axons were counted manually. Each counted axon was marked with red color to avoid double counting.

#### Blood cell analysis

Blood samples (0.5 mL) were taken from the eye orbital sinus under isoflurane anesthesia. Samples were taken from each animal 1 day before bone marrow stimulation, on the first, second and fourth days of stimulation, and on the second and fourth days post-stimulation. For cell counting we used an ALcell 871 hematology analyzer (AL-system, Karlsruhe, Germany) with an ALcon9 veterinary modem (AL-system). The blood samples were diluted with Hemasol (Hemax, Brno, Czech Republic) and divided into two parts. One part was used for the determination of red blood cell (RBC) and platelet (PLT) counts and hematocrit (HCT), while the second was used to determine the white blood cell (WBC) count and hemoglobin (HGB) concentration. Qualitative analysis (WBC differential) was done from slides with a blood film fixed by methyl alcohol and stained according to Giemsa-Romanowsky, then viewed under a microscope.

#### Statistical analysis

The relative numbers of neutrophils and lymphocytes were expressed as a percentage of total WBC, and for behavioral tests in individual animals the BBB and plantar scores were averaged across the hindlimbs. Differences between the treated groups compared with the control group at any given time-point were determined using a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (SigmaStat v.3.11; Systat, San Jose, CA, USA). Morphometric measurements were used to construct plots of consecutive cross-sectional areas of the spared tissue at individual levels of the spinal cord, rostral and caudal to the lesion center. The differences at each level compared with the control group were analyzed by two-way ANOVA. To analyze possible synergistic effects, ANOVA repeated measures with two between-subject factors was utilized (SPSS v.17; IBM, Chicago, IL, USA); the  $F$ -ratios from this analysis yielded a  $P$ -value of less than 0.05 for the combination of G-CSF and Flt3. All values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences between groups were considered statistically significant if  $P < 0.05$ .

#### Results

##### Treatment with G-CSF and/or Flt3 ligand improved the behavioral performance of rats with SCI

All animals treated with a combination of G-CSF and Flt3 ligand significantly improved their motor and

sensory performance 3–7 weeks post-injury compared with the control animals. Regarding motor performance, assessed by the BBB test, animals treated with a combination of G-CSF and Flt3 ligand had already improved significantly by 4 weeks post-injury, whereas animals treated with G-CSF or Flt3 ligand alone

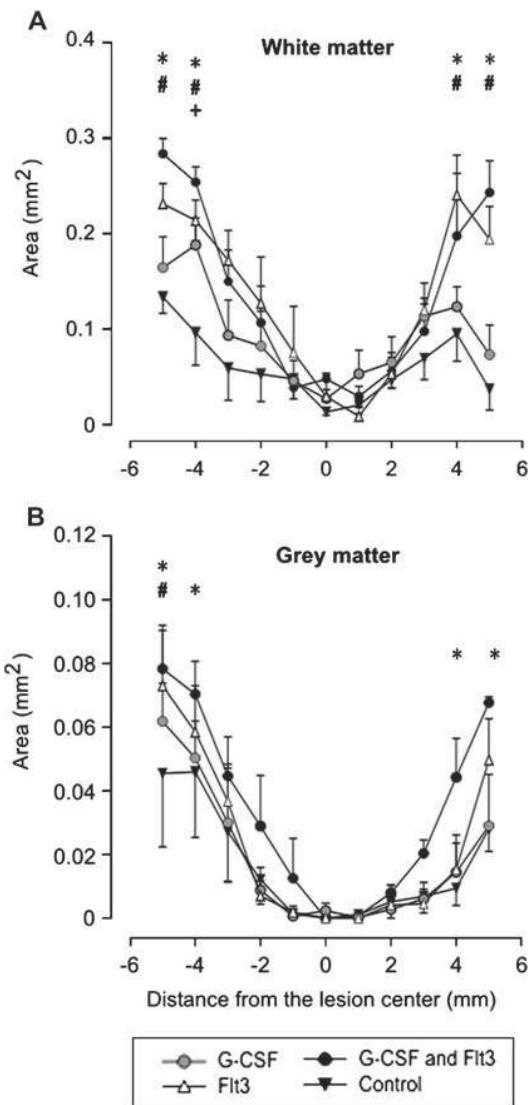


Figure 2. Distribution of the spared white and gray matter. (A) The crano (plus values)-caudal (minus values) distribution of the spared white matter from the lesion center showed a significant effect of Flt3 ligand alone as well as Flt3 ligand combined with G-CSF for a distance of 4–5 mm in both directions. Treatment with G-CSF alone did not significantly affect the extent of spared white matter except 4 mm caudal to the lesion center. (B) Graph of consecutive cross-sectional areas showing the craniocaudal distribution of the spared gray matter. The most pronounced effect could be seen in the spinal cords from rats treated with a combination of Flt3 ligand and G-CSF at the cranial end of the lesion. Data are expressed as mean and  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , G-CSF and Flt3 ligand versus control; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , Flt3 ligand versus control; + $P < 0.05$ , G-CSF versus control.

improved significantly 2 weeks later compared with control animals (Figure 1A). Regarding sensory performance, assessed by the plantar test, animals treated with a combination of G-CSF and Flt3 ligand showed the greatest improvement: their mean plantar test values were significantly different from those of control animals by 3 weeks post-injury (Figure 1B). Similarly, animals treated with Flt3 ligand alone achieved significantly better values than control animals, from the beginning of the third week after injury and continuing to the end of the observation period, while animals treated with G-CSF alone showed significant improvement only during the third week after SCI. There was no significant difference among the treated groups.

#### *Treatment with G-CSF and/or Flt3 ligand resulted in an increased amount of spared gray and white matter*

Histologic analysis of the cross-sectional areas of the white matter revealed a significant increase in the extent of spared white matter in animals treated with Flt3 ligand alone or a combination of Flt3 ligand and G-CSF compared with control rats, 4 and 5 mm caudal as well as cranial from the center of the lesion, and in animals treated with G-CSF alone, 4 mm caudal from the center of the lesion (Figure 2A). A significant effect on the cross-sectional area of the spared gray matter was observed with a combination of G-CSF and Flt3 ligand, 4 and 5 mm caudal as well as cranial from the lesion center. Neither factor alone had an effect on the area of spared gray matter, either caudal or cranial from the lesion center, except for Flt3 ligand alone, 5 mm caudal from the lesion center (Figure 2B). The volume of spared tissue in the center of the lesion was significantly increased in all treatment groups, compared with the controls (Figure 3). Representative images of cross-sections

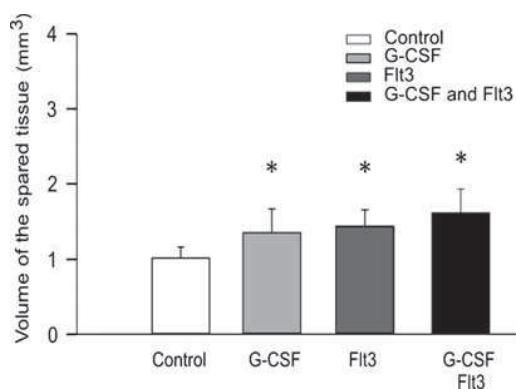


Figure 3. The total volume of the spared spinal cord tissue. The graph shows an analysis of the total volume of spared spinal cord tissue in an 11-mm long segment of the spinal cord; all treatments led to a significant increase in the volume of spared tissue compared with controls. Data are expressed as mean and  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

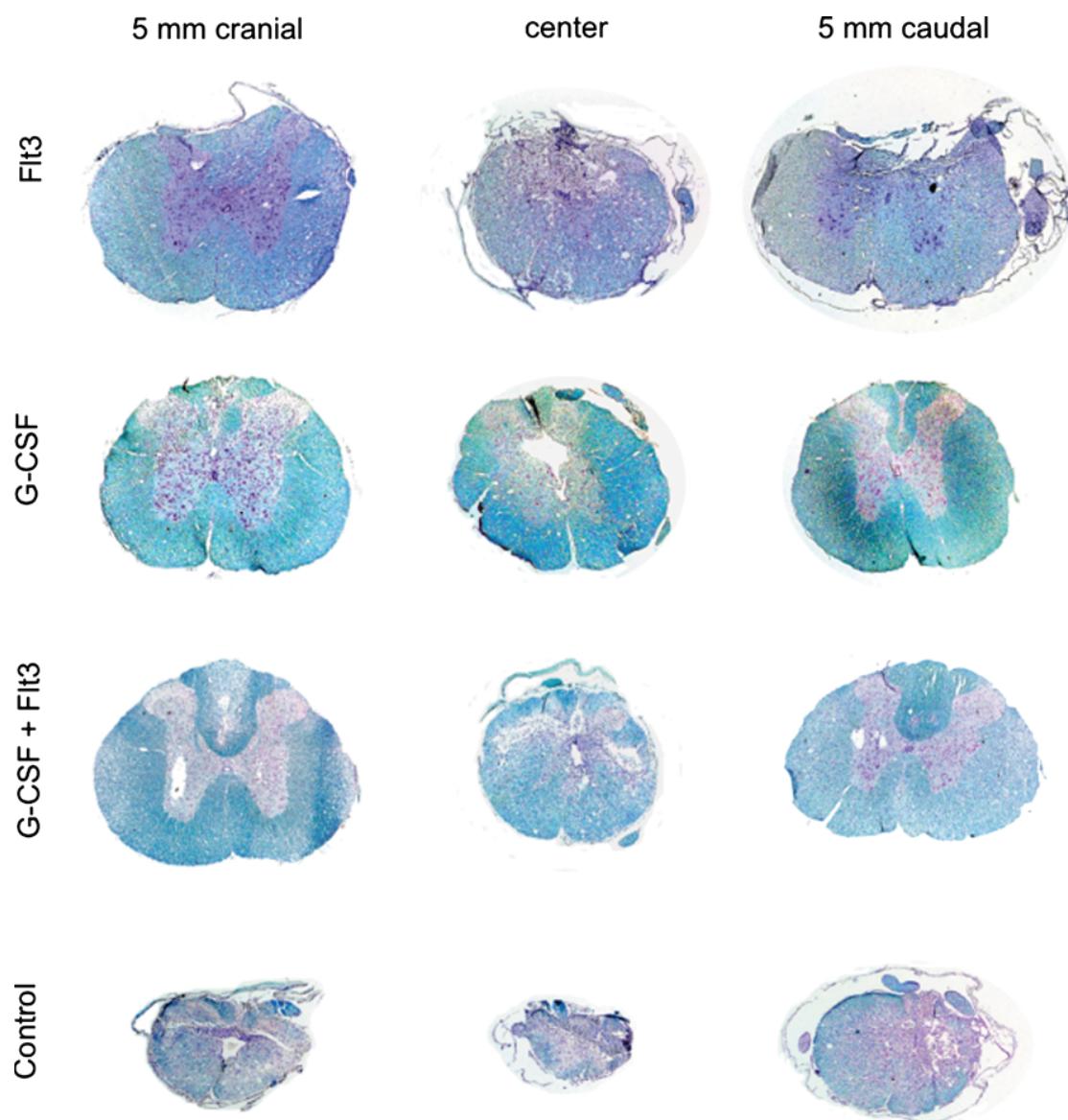


Figure 4. Representative images of spinal cord lesions. Representative cross-sections from the center of the lesion and 5 mm caudally and 5 mm cranially showed totally destroyed gray matter in the center of the lesion in all animal groups. The white matter appeared as a rim, with the greatest amount preserved in the group treated with G-CSF and Flt3 ligand. Five millimeters caudally and cranially from the center of the lesion, white and gray matter were present, along with cavities, in the spinal cord dorsal horns in all treated groups. In the control group, the cavities appeared throughout the whole cross-sectional area.

from the center of the lesion and 5 mm caudally and cranially are shown in Figure 4. In the center of the lesion, the gray matter was totally destroyed and the white matter appeared as a rim, with the greatest amount preserved in spinal cords treated with the combination of G-CSF and Flt3 ligand. These results demonstrated that Flt3 ligand had a beneficial effect on motor function after SCI and that a combination of Flt3 ligand and G-CSF led to significantly better functional recovery than treatment with Flt3 ligand or G-CSF alone.

#### *Treatment with G-CSF and/or Flt3 ligand resulted in increased axonal sprouting and reduced glial scar formation*

Axonal sprouting in the lesion was expressed as the number of GAP43<sup>+</sup> fibers (Figure 5A). The number of GAP43<sup>+</sup> axonal fibers per section was significantly increased in animals treated with G-CSF alone ( $14.84 \pm 3.36$ ) or a combination of Flt3 ligand and G-CSF ( $33.56 \pm 0.89$ ) compared with control rats ( $6.26 \pm 0.94$ ) or Flt3 ligand alone ( $5.04 \pm 0.60$ ; Figure 6A). In animals treated with only Flt3 ligand, the majority of GAP43<sup>+</sup> axons

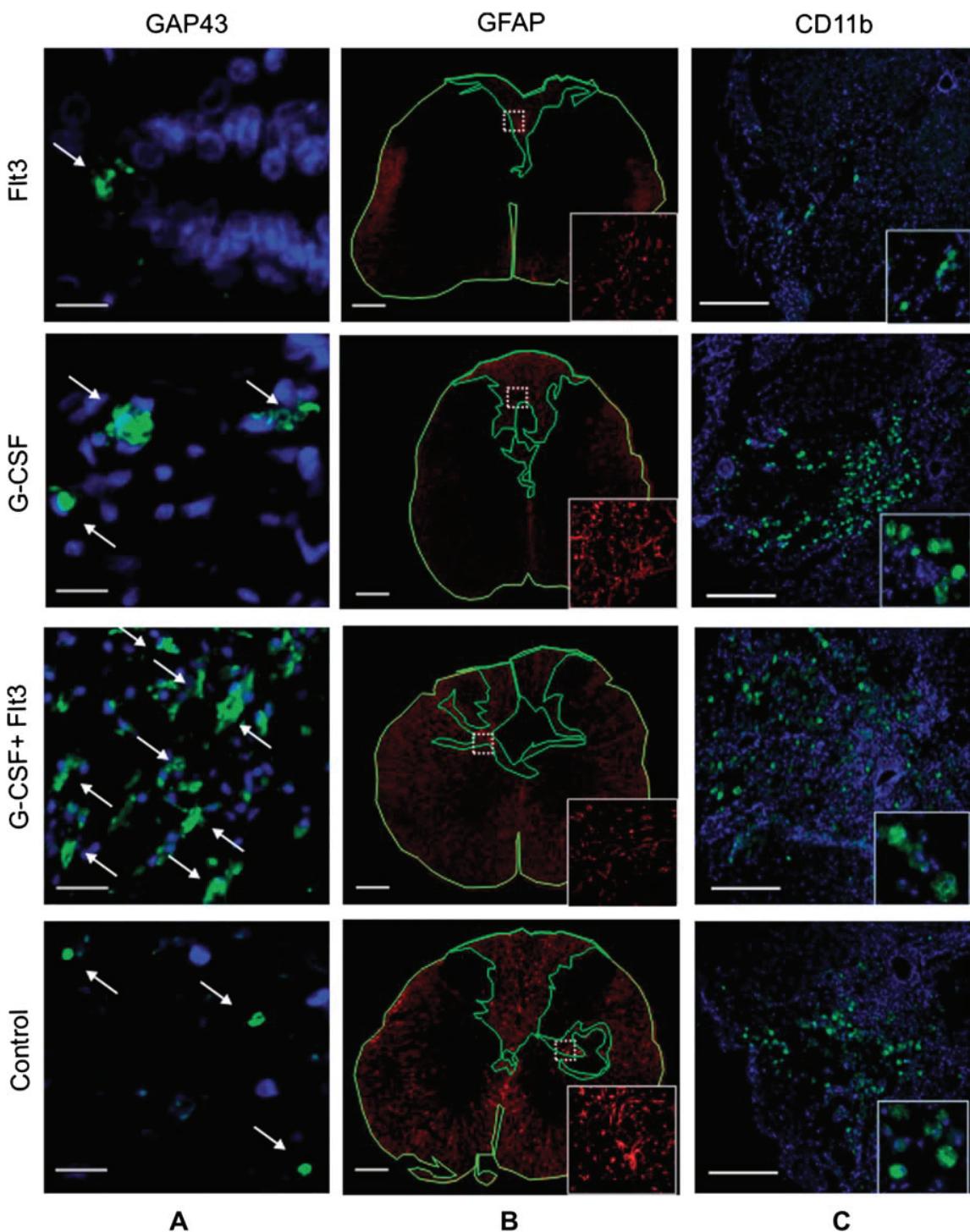


Figure 5. Histologic evaluation. (A) Representative sections from groups treated with Flt3 ligand and G-CSF alone, their combination and control animals showing GAP43<sup>+</sup>fibers (arrows) in the lesion center. Scale bar 20  $\mu$ m. (B) Representative sections from groups treated with Flt3 ligand and G-CSF alone, their combination and control animals showing the delineated GFAP<sup>+</sup>glial scars as well as the whole sections. Inserts are at a higher magnification. White squares show the locations from which the inserts were taken. Scale bar 100  $\mu$ m. (C) Representative sections from groups treated with Flt3 ligand and G-CSF alone, their combination and control animals showing CD11b<sup>+</sup>cells in the lesion center. Inserts are at a higher magnification. Scale bar = 100  $\mu$ m.

were in the close vicinity of the central spinal cord canal; fewer cells were located in the lesioned tissue. In contrast, treatment with G-CSF alone or in combination with Flt-3 ligand resulted in a large

number of GAP43<sup>+</sup> axons in the lesioned tissue. The extent of the glial scar, expressed as the percentage of total tissue area showing strong positive staining for GFAP (Figure 5B), was significantly reduced

in all treated groups (Figure 6B). The greatest reduction was observed in animals treated with Flt3 ligand alone ( $5.74 \pm 0.31$ ), followed by G-CSF treatment ( $10.05 \pm 0.25$ ) and combined treatment ( $11.06 \pm 0.58$ ) compared with control animals ( $15.88 \pm 0.16$ ).

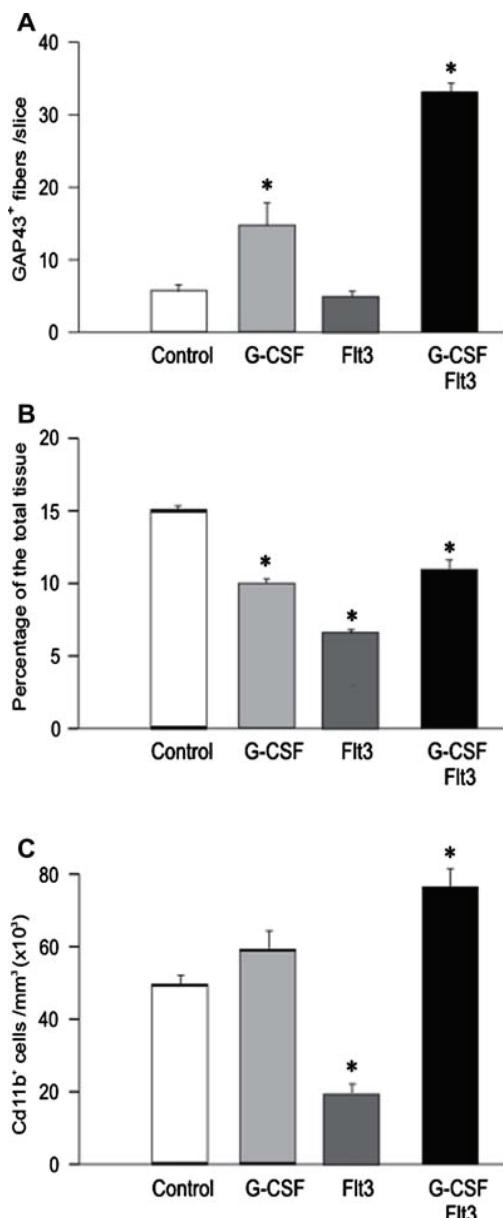


Figure 6. Analyses of axonal sprouting, glial scarring and CD11b<sup>+</sup> cell infiltration. (A) The number of GAP43<sup>+</sup>fibers in controls and animals treated with Flt3, G-CSF and their combination. Numbers represent mean values per section  $\pm$  SEM. \*P < 0.01. (B) Glial scar expressed as a percentage of total tissue in controls and animals treated with Flt3, G-CSF and their combination. \*P < 0.01. (C) Number of CD11b<sup>+</sup>cells in 1 mm<sup>3</sup> of spinal cord tissue of controls and animals treated with Flt3, G-CSF and their combination. \*P < 0.01.

#### *G-CSF and Flt3 ligand synergized in elevating the number of WBC*

The i.v. administration of G-CSF, or a combination of G-CSF and Flt3 ligand, significantly increased the number of WBC during the time-course of bone marrow stimulation with these factors (Figure 7A). These changes were observed in the absolute numbers of neutrophils and lymphocytes, as well as in their numbers relative to the total number of WBC, throughout the whole stimulation and post-stimulation period (Table I). Conversely, RBC counts in all groups were similar to controls, and there were no differences among the groups in the post-stimulation period (Table II). On the first day of treatment, G-CSF significantly increased the total number of WBC, while the neutrophil segment subpopulation was significantly increased in both relative and absolute numbers. The absolute number of lymphocytes remained at control levels, while their number relative to the total WBC count significantly decreased. A similar effect was seen with the combination of G-CSF with Flt3-ligand, but the absolute number of lymphocytes increased significantly compared with the controls, while the relative number decreased. The same effect on both groups of animals could be seen on day 2 of bone marrow stimulation. On the fourth day, lymphocytes were not significantly increased in absolute number, but the trend towards increased numbers of neutrophils remained similar to that of the previous days with the G-CSF and combined G-CSF and Flt3 ligand groups of animals. At 2 days post-treatment, the number of total WBC returned to control levels in all treatment groups, while the relative number of neutrophils was still significantly higher in the group treated with Flt3 ligand alone. On the other hand, the relative number of lymphocytes was decreased. Animals in all groups had an increased relative number of neutrophils 4 days after stimulation compared with controls and, conversely, a decreased relative number of lymphocytes.

To observe the effect of both factors on WBC subpopulations more clearly, the ratio of neutrophils to lymphocytes (N/Ly) was determined (Figure 7B). The N/Ly ratio was increased in animals receiving G-CSF during the bone marrow stimulation period and on the fourth day post-treatment. Moreover, the combination of both factors caused an increase in the N/Ly ratio during the bone marrow stimulation period and on the fourth day post-treatment similarly to the injection of G-CSF alone. The injection of Flt3 ligand alone increased the N/Ly ratio only after the bone marrow stimulation was completed (on the second and fourth days post-treatment). Statistical analysis using ANOVA repeated measures with two between-subject factors showed

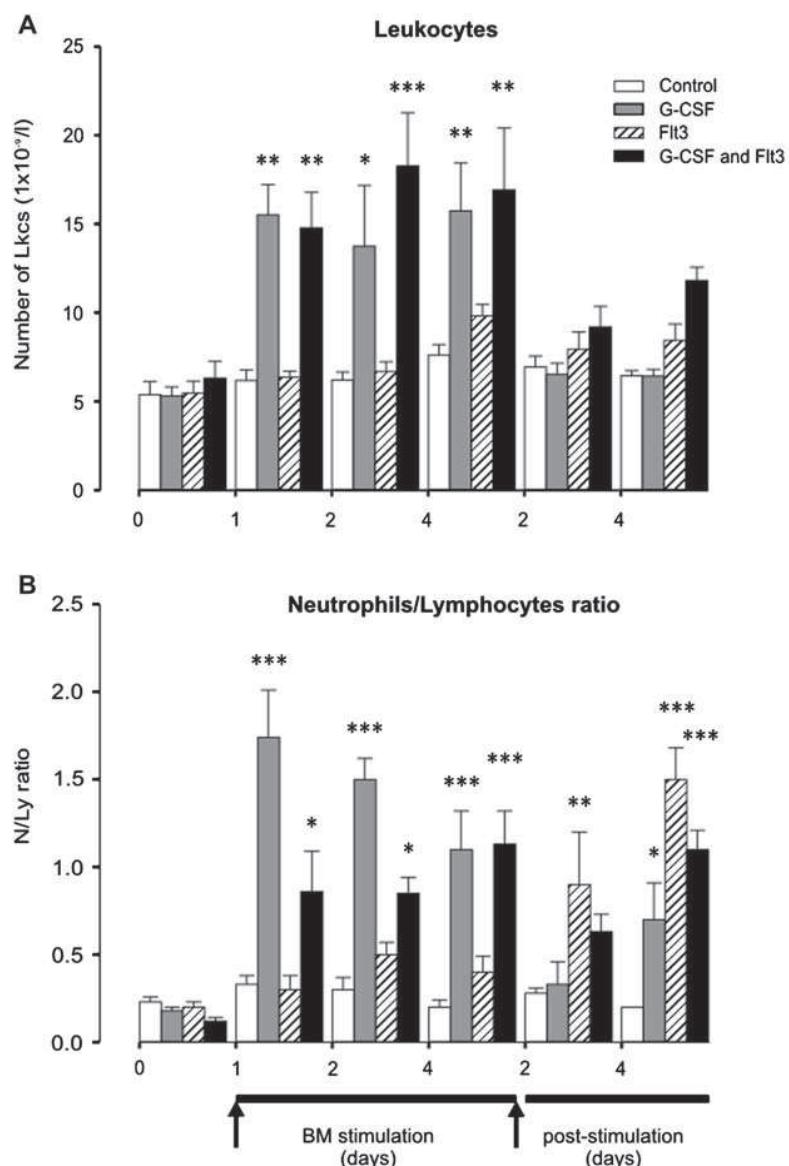


Figure 7. Blood analysis. (A) The absolute numbers of leukocytes in blood samples from rats treated with G-CSF, Flt3 ligand or a combination of both showed that G-CSF, both alone and in combination with Flt3 ligand, significantly increased the absolute number of leukocytes during the treatment period. (B) The leukocyte subpopulation N/Ly ratio showed a significant increase as a result of G-CSF treatment during the time of stimulation and also on the fourth day post-stimulation, with a similar effect seen in combination with Flt3 ligand. Flt3 ligand alone increased the N/Ly ratio after the end of stimulation compared with controls. Data are expressed as mean and  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

that, throughout the experimental time-course, G-CSF and Flt3 ligand had a synergistic effect on the numbers of lymphocytes, both absolute and relative, the relative number of neutrophils and the N/Ly ratio (Table III).

#### *G-CSF with Flt3 ligand elevated the number of CD11b<sup>+</sup> cells in the lesion*

The administration of Flt3 ligand reduced the number of CD11b<sup>+</sup> cells in the lesion ( $19\ 458 \pm 2890$ ) compared with controls ( $49\ 072 \pm 2556$ ), while treatment

with G-CSF alone slightly increased the number of CD11b<sup>+</sup> cells in the lesion ( $59\ 343 \pm 4939$ ). However, the combination of both factors led to the robust infiltration of CD11b<sup>+</sup> cells into the lesion ( $78\ 561 \pm 4943$ ; Figure 6C). Because of their round morphology, these cells represented blood cells that had infiltrated the lesion, rather than activated microglia (Figure 5C).

#### *G-CSF and Flt-3 ligand did not affect RBC parameters*

The administration of G-CSF, Flt3 ligand or their combination did not significantly change the number

Table I. Differential blood count in blood samples from rats treated with G-CSF, Flt3 ligand, a combination of Flt3 and G-CSF or saline (control). NS rel, relative number of neutrophils; NS abs, absolute number of neutrophils; Ly rel, relative number of lymphocytes; Ly abs, absolute number of lymphocytes; BM, bone marrow. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $^1P < 0.05$ ,  $^2P < 0.01$ ,  $^3P < 0.001$  compared to the control group at the same time-point.

Treatment		NS rel	NS abs/mm <sup>3</sup>	Ly rel	Ly abs/mm <sup>3</sup>
Day 0 of BM stimulation	G-CSF	0.14 $\pm$ 0.02	742 $\pm$ 163	0.83 $\pm$ 0.02	4404 $\pm$ 390
	Flt3	0.15 $\pm$ 0.02	821 $\pm$ 120	0.81 $\pm$ 0.01	4448 $\pm$ 581
	Flt3 + G-CSF	0.11 $\pm$ 0.02	775 $\pm$ 229	0.87 $\pm$ 0.02	5442 $\pm$ 722
	Control	0.18 $\pm$ 0.01	968 $\pm$ 109	0.79 $\pm$ 0.01	4235 $\pm$ 595
Day 1 of BM stimulation	G-CSF	0.60 $\pm$ 0.03 <sup>3</sup>	9421 $\pm$ 1338 <sup>3</sup>	0.37 $\pm$ 0.03 <sup>3</sup>	5617 $\pm$ 555
	Flt3	0.22 $\pm$ 0.03	1389 $\pm$ 242	0.73 $\pm$ 0.03	4651 $\pm$ 323
	Flt3 + G-CSF	0.42 $\pm$ 0.07 <sup>1</sup>	6228 $\pm$ 1251 <sup>2</sup>	0.55 $\pm$ 0.07 <sup>1</sup>	8105 $\pm$ 1368 <sup>1</sup>
	Control	0.22 $\pm$ 0.02	1342 $\pm$ 29	0.74 $\pm$ 0.02	4614 $\pm$ 552
Day 2 of BM stimulation	G-CSF	0.57 $\pm$ 0.02 <sup>3</sup>	8011 $\pm$ 2138 <sup>3</sup>	0.38 $\pm$ 0.02 <sup>3</sup>	5276 $\pm$ 1382
	Flt3	0.30 $\pm$ 0.03	1996 $\pm$ 182	0.63 $\pm$ 0.03	4211 $\pm$ 416
	Flt3 + G-CSF	0.42 $\pm$ 0.02 <sup>2</sup>	8449 $\pm$ 1118 <sup>3</sup>	0.50 $\pm$ 0.04 <sup>3</sup>	10136 $\pm$ 1921 <sup>3</sup>
	Control	0.22 $\pm$ 0.04	1409 $\pm$ 321	0.76 $\pm$ 0.03	4657 $\pm$ 304
Day 4 of BM stimulation	G-CSF	0.48 $\pm$ 0.05	8132 $\pm$ 2049 <sup>3</sup>	0.48 $\pm$ 0.05 <sup>3</sup>	7095 $\pm$ 552
	Flt3	0.30 $\pm$ 0.03	2466 $\pm$ 351	0.69 $\pm$ 0.05	6734 $\pm$ 670
	Flt3 + G-CSF	0.48 $\pm$ 0.03 <sup>3</sup>	8546 $\pm$ 2312 <sup>3</sup>	0.47 $\pm$ 0.04 <sup>3</sup>	7462 $\pm$ 873
	Control	0.23 $\pm$ 0.09	1703 $\pm$ 665	0.74 $\pm$ 0.09	5692 $\pm$ 830
Day 2 post-stimulation	G-CSF	0.23 $\pm$ 0.04	1638 $\pm$ 332	0.72 $\pm$ 0.05	4832 $\pm$ 406
	Flt3	0.40 $\pm$ 0.08 <sup>2</sup>	3364 $\pm$ 831	0.53 $\pm$ 0.08 <sup>3</sup>	4252 $\pm$ 858
	Flt3 + G-CSF	0.36 $\pm$ 0.02	3640 $\pm$ 555	0.65 $\pm$ 0.07	5784 $\pm$ 522
	Control	0.19 $\pm$ 0.02	1314 $\pm$ 153	0.79 $\pm$ 0.03	5478 $\pm$ 583
Day 4 post-stimulation	G-CSF	0.40 $\pm$ 0.05 <sup>2</sup>	2794 $\pm$ 505	0.56 $\pm$ 0.05 <sup>3</sup>	3833 $\pm$ 388
	Flt3	0.60 $\pm$ 0.03 <sup>3</sup>	4752 $\pm$ 247	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>3</sup>	3457 $\pm$ 635
	Flt3 + G-CSF	0.46 $\pm$ 0.05 <sup>3</sup>	5530 $\pm$ 768 <sup>1</sup>	0.52 $\pm$ 0.05 <sup>3</sup>	6007 $\pm$ 256
	Control	0.16 $\pm$ 0.01	1043 $\pm$ 75	0.82 $\pm$ 0.02	5250 $\pm$ 204

of RBC, HGB content or HCT during the entire time-course of bone marrow stimulation or on the second or fourth days thereafter (Table III). Interestingly, we observed a significant decrease in PLT content on the second and fourth days post-treatment (Table III), which might be explained by the temporary inability of the bone marrow to produce PLT because of its focus on producing other cell types as a consequence of G-CSF or Flt3 ligand stimulation. The body weights of animals did not change significantly among the groups at particular survival periods (data not shown).

## Discussion

The behavioral performance of rats with a balloon compression SCI was improved by the stimulation of bone marrow cells with a combination of G-CSF and Flt3 ligand. The best results in motor performance were obtained with a combination of G-CSF and Flt3 ligand, followed by stimulation with Flt3 ligand alone. Morphometric measurements confirmed the results obtained by behavioral studies. In addition, we found reduced astrogliosis in all treated groups and increased axonal sprouting in animals treated with G-CSF alone or in combination with Flt3 ligand. The i.v. administration of G-CSF alone or in combination with Flt3 ligand significantly increased the number of WBC, but not the number of RBC or HGB con-

tent, during and after the whole time-course of bone marrow stimulation. CD11b<sup>+</sup> cells were increased in animals treated with G-CSF alone or in combination with Flt3 ligand. Although both factors increased the extent of spared tissue in the lesion (showing a neuroprotective effect) and improved functional outcome after SCI when used alone, their influence on tissue regeneration was different. The administration of Flt3 ligand alone did not alter the number of leukocytes nor did it facilitate axonal sprouting; however, it profoundly reduced the size of the glial scar and the number of CD11b<sup>+</sup> cells in the lesion. In contrast, G-CSF facilitated axonal sprouting and the infiltration of CD11b<sup>+</sup> cells into the lesion, which resulted in less glial scar attenuation. The combination of both factors led to a synergistic effect mainly on axonal sprouting and CD11b<sup>+</sup> cell infiltration, most likely because of the prolonged stimulation of bone marrow cells.

In our experiments, the dose of G-CSF was similar to that used in our (10) and others' (21) previous studies, in order to compare the present results with those from the earlier studies. Moreover, the doses of G-CSF and Flt3 ligand in animals treated with both factors were half the doses used in animals treated with only a single factor; the question underlying such an approach was whether there is a synergistic effect of the factors. Our study clearly answered this question, showing the synergistic effect of treatment

Table II. Differential blood count in blood samples from rats treated with G-CSF, Flt3 ligand, a combination of Flt3 and G-CSF or saline (Control). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $^1P < 0.05$  compared with the control group at the same time-point.

Treatment		RBC, $10^{12}/\text{dm}^3$	HGB, g/dm $^3$	HCT	PLT, $10^9/\text{dm}^3$
Day 0 of BM stimulation	G-CSF	7.9 $\pm$ 0.1	167 $\pm$ 2	0.38 $\pm$ 0.01	852 $\pm$ 48
	Flt3	8.0 $\pm$ 0.2	168 $\pm$ 2	0.38 $\pm$ 0.01	1051 $\pm$ 82
	Flt3 + G-CSF	7.6 $\pm$ 0.9	167 $\pm$ 2	0.39 $\pm$ 0.01	892 $\pm$ 29
	Control	8.4 $\pm$ 0.1	173 $\pm$ 1	0.40 $\pm$ 0.01	891 $\pm$ 87
Day 1 of BM stimulation	G-CSF	7.6 $\pm$ 0.3	161 $\pm$ 8	0.37 $\pm$ 0.02	821 $\pm$ 69
	Flt3	7.8 $\pm$ 0.2	166 $\pm$ 4	0.38 $\pm$ 0.01	1043 $\pm$ 95
	Flt3 + G-CSF	7.5 $\pm$ 0.2	160 $\pm$ 3	0.38 $\pm$ 0.01	1017 $\pm$ 64
	Control	8.0 $\pm$ 0.2	170 $\pm$ 1	0.40 $\pm$ 0.01	1145 $\pm$ 123
Day 2 of BM stimulation	G-CSF	7.5 $\pm$ 0.3	157 $\pm$ 7	0.36 $\pm$ 0.02	724 $\pm$ 68
	Flt3	7.7 $\pm$ 0.1	161 $\pm$ 4	0.36 $\pm$ 0.01	875 $\pm$ 54
	Flt3 + G-CSF	7.1 $\pm$ 0.1	152 $\pm$ 2	0.36 $\pm$ 0.01	909 $\pm$ 107
	Control	7.2 $\pm$ 0.1	163 $\pm$ 5	0.35 $\pm$ 0.01	732 $\pm$ 99
Day 4 of BM stimulation	G-CSF	7.3 $\pm$ 0.2	156 $\pm$ 4	0.34 $\pm$ 0.01	742 $\pm$ 74
	Flt3	7.6 $\pm$ 0.3	157 $\pm$ 6	0.35 $\pm$ 0.00	787 $\pm$ 42
	Flt3 + G-CSF	7.2 $\pm$ 0.1	152 $\pm$ 2	0.37 $\pm$ 0.01	801 $\pm$ 61
	Control	7.3 $\pm$ 0.2	163 $\pm$ 5	0.37 $\pm$ 0.01	1038 $\pm$ 149
Day 2 post-stimulation	G-CSF	6.9 $\pm$ 0.2	156 $\pm$ 6	0.34 $\pm$ 0.01	649 $\pm$ 82 <sup>1</sup>
	Flt3	6.6 $\pm$ 0.3	155 $\pm$ 7	0.32 $\pm$ 0.00	700 $\pm$ 191 <sup>1</sup>
	Flt3 + G-CSF	6.9 $\pm$ 0.1	145 $\pm$ 4	0.36 $\pm$ 0.01	778 $\pm$ 75
	Control	7.3 $\pm$ 0.2	164 $\pm$ 6	0.38 $\pm$ 0.00	1175 $\pm$ 54
Day 4 post-stimulation	G-CSF	6.6 $\pm$ 0.1	153 $\pm$ 7	0.34 $\pm$ 0.01	688 $\pm$ 69
	Flt3	7.1 $\pm$ 0.2	162 $\pm$ 4	0.35 $\pm$ 0.00	824 $\pm$ 148
	Flt3 + G-CSF	6.4 $\pm$ 0.2	138 $\pm$ 7	0.34 $\pm$ 0.01	690 $\pm$ 49
	Control	7.1 $\pm$ 0.2	163 $\pm$ 2	0.37 $\pm$ 0.00	1053 $\pm$ 121

RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; PLT, platelets; BM, bone marrow.

with half doses of G-CSF and Flt3 ligand compared with the effects of G-CSF or Flt3 ligand alone. This synergistic effect was substantially greater than the effect of other treatment combinations, such as in the study of Luo *et al.* (21), in which bone marrow stromal cell transplantation and/or G-CSF administration were used.

Bone marrow cells, including hematopoietic stem cells, macrophages and lymphocytes as well as bone marrow stromal cells, have previously been used successfully in the treatment of different experimental models of SCI (reviewed in 22,23). Sasaki *et al.* (1) reported that transplantation of bone marrow cells into demyelinated spinal cord leads to extensive remyelination, demonstrating that bone marrow cells can differentiate into myelinating phenotype cells *in vivo*. Moreover, the neuroprotective function of mesenchymal stromal as well as hematopoietic stem cells has been shown previously, mainly as a result of the secretion of particular cytokines such as trombopoietin and interleukin-11, known to be essential factors for the survival and differentiation of neuronal precursor cells (24–26). The improvements observed in our study in behavioral and morphologic parameters in animals with SCI treated with a combination of both factors could be associated with the prolonged time-course of the mobilization of bone marrow cells. The results of several clinical trials have sup-

ported the positive effect of freshly prepared bone marrow mononuclear cells on SCI (8,27–29).

The use of hematopoietic factors, with or without the administration of stem cells, in the treatment of SCI is one of the most promising current treatment modalities. For example, there have been several studies examining the role of granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) in the treatment of SCI in experimental animals (30,31) and patients (29,32,33). GM-CSF has been shown to have several positive effects, for example to cross the blood-brain and blood-spinal cord barriers (30), inhibit glial scar formation (34) and inhibit the apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptotic-related proteins (33). Several growth factors reduce astrogliosis, such as insulin-like growth factor 1 (IGF-1), neurotrophin-3 (NT3) as well as G-CSF and Flt3 ligand (35,36). As it has been shown that trauma-induced microglial activation/proliferation precedes astrogliosis (37), and as Flt-3 ligand reduced the number of CD11b<sup>+</sup> cells in the lesion, the biggest reduction in glial scarring was found in the Flt-3 ligand-treated group.

The positive role of G-CSF in the mobilization of bone marrow stem cells and the resulting improvement of neurologic as well as morphologic outcome in experimental animals after SCI has been well documented in our previous study (10) as well as in studies

Table III. Statistical analysis of the synergistic effect of combined G-CSF and Flt3 treatment on WBC numbers. <sup>1</sup>Statistically significant result.

	Source	Sum of square	d.f.	Mean of Square	F-ratio	Significance	Power
NS abs	Intercept	1127883620.074	1	1127883620.074	138.199	0.000	1.000
	G-CSF	33970420.969	1	33970420.969	4.162	0.062	0.472
	Flt3	222083493.811	1	222083493.811	27.212	0.00017 <sup>1</sup>	0.998
	Flt3 + G-CSF	31935.127	1	31935.127	0.004	0.951	0.050
	Error	106097104.658	13	8161315.743			
NS rel	Intercept	10.132	1	10.132	971.470	0.000	1.000
	G-CSF	0.049	1	0.049	4.716	0.049 <sup>1</sup>	0.520
	Flt3	0.364	1	0.364	34.856	0.00005 <sup>1</sup>	1.000
	Flt3 + G-CSF	0.112	1	0.112	10.779	0.006 <sup>1</sup>	0.858
	Error	0.136	13	0.010			
Ly abs	Intercept	2949059842.807	1	2949059842.807	373.986	0.000	1.000
	G-CSF	26333202.149	1	26333202.149	3.339	0.091	0.395
	Flt3	33224365.307	1	33224365.307	4.213	0.061	0.476
	Flt3 + G-CSF	45334320.175	1	45334320.175	5.749	0.032 <sup>1</sup>	0.602
	Error	102511222.417	13	7885478.647			
Ly rel	Intercept	42.013	1	42.013	4023.123	0.000	1.000
	G-CSF	0.079	1	0.079	7.541	0.017 <sup>1</sup>	0.719
	Flt3	0.369	1	0.369	35.321	0.00005 <sup>1</sup>	1.000
	Flt3 + G-CSF	0.150	1	0.150	14.374	0.002 <sup>1</sup>	0.938
	Error	0.136	13	0.010			
NS/Ly	Intercept	38.010	1	38.010	451.849	0.000	1.000
	G-CSF	0.403	1	0.403	4.785	0.048 <sup>1</sup>	0.526
	Flt3	3.391	1	3.391	40.307	0.00003 <sup>1</sup>	1.000
	Flt3 + G-CSF	1.427	1	1.427	16.960	0.001 <sup>1</sup>	0.967
	Error	1.094	13	0.084			

of other groups (38–41). Its positive effect has been shown following intrathecal (39), subcutaneous (41) and direct spinal cord administration (38). There are several studies that have shown that G-CSF promotes the mobilization and migration of bone marrow cells into injured tissue and that the largest part of the mobilized cells are CD34<sup>+</sup> hematopoietic lineage cells (41–44). These cells express vascular endothelial growth factor (VEGF), and their administration stimulates endothelial cell proliferation and increases angiogenesis in damaged tissue (45,46). In other central nervous system (CNS) disorders, such as brain hypoxia and injury in neonatal/newborn animals, the results following the administration of G-CSF are conflicting. Several studies have confirmed its neuroprotective effect (47,48), while the group of Keller described no improvement in long-term outcome after neonatal hypoxic-ischemic brain injury, and even increased apoptosis in the ibotenate-damaged brain (49,50). However, the majority of publications, particularly in stroke models, describe G-CSF as a neuroprotective agent, reducing the volume of the infarct. Meta-analysis (51) of 13 studies investigating the efficacy of G-CSF in animal models of focal cerebral ischemia (stroke) confirmed that G-CSF reduces infarct size and enhances functional recovery. The conclusion from another systematic review (52), which included 19 studies, was that G-CSF significantly reduced motor impairment, mortality and lesion size in transient but not permanent

models of ischemic stroke. This is in agreement with the study of Taguchi *et al.* (53), in which animals with permanent middle cerebral artery occlusion treated with G-CSF displayed cortical atrophy and impaired behavioral function compared with controls. The negative effect of G-CSF on outcome was associated with the induction of an exaggerated inflammatory response. Recently, Bartolini *et al.* (54) produced chimeric animals in which hematopoietic derivatives were tagged genetically. They discovered that G-CSF administration enhanced the proliferation of microglia in the uninjured CNS but had no effect on the number of hematopoietic cells that infiltrated the ischemic tissue, or on the size of the lesion. Despite some negative and conflicting results, the first small clinical trials on patients with stroke are being conducted; so far, the conclusion from these trials is that G-CSF as therapy for acute stroke is safe and feasible and leads to improved neurologic outcomes (55,56).

Flt3 ligand is a cytokine that has been used in clinical studies for two reasons: it mobilizes early hematopoietic progenitor cells and increases the number of dendritic cells (DC) (57), which produce growth factors, including neurotrophin-3, and enhance neurogenesis (58). The hematologic effects of Flt3 ligand have been evaluated in both mouse and non-human primate models. In the mouse model, the administration of Flt3 ligand resulted in increases in colony-forming units (CFU) in the bone

marrow, spleen and peripheral blood (57). Evaluation of Flt3 ligand in non-human primates also revealed significant increases in peripheral blood CFU after 13 days of once-daily subcutaneous administration (59). Total WBC count was increased in non-human primates to approximately two and a half times the normal value. In these experiments, the administration of G-CSF with Flt3 ligand was synergistic in the mobilization of hematopoietic progenitors into the peripheral blood. However, Flt3 ligand has not only hematologic, but also immunologic, effects. Furtado *et al.* (60) showed that Flt3 ligand induces the expansion of monocytes and DC precursors in the circulation. Flt3 ligand administration in tumor-bearing mice has shown significant anti-tumor activity in various models (58,61).

Our study found that the number of WBC was significantly increased in both the group treated with G-CSF alone and the group treated with a combination of G-CSF and Flt3 factor; moreover, the mean number of WBC was slightly higher in animals treated with a combination of G-CSF and Flt3. In animals treated with Flt3 factor alone, the total number of WBC was similar to that in controls. These data indicate that a half dose of G-CSF combined with a half dose of Flt3 have at least a similar effect on the mobilization of leukocytes as treatment with G-CSF alone.

In our experiments, treatment with G-CSF and Flt3 ligand caused the mobilization of bone marrow cells, resulting in an increase in the neutrophil segment subpopulation. This could be seen clearly in the N/Ly ratio, which was increased throughout the whole period of treatment in the groups of animals receiving G-CSF, either alone or in combination with Flt3 ligand; the ratio was also elevated 4 days after bone marrow stimulation was finished. Flt3 ligand alone increased this ratio only when bone marrow stimulation was completed. We have found an increased number of CD11b<sup>+</sup> cells in the lesions of animals treated with G-CSF alone and an even greater number in animals treated with both factors. CD11b is expressed on monocytes/macrophages and granulocytes (neutrophils) and is a marker for activated microglia; 44% of bone marrow cells express CD11b. It is obvious that prolonged stimulation of the bone marrow resulted in a greater accumulation of CD11b<sup>+</sup> cells in the spinal cord lesion. Based on their morphology, these cells were blood cells rather than activated microglia. This is in agreement with findings that SCI is mainly populated by macrophages from the bone marrow (62). There is abundant evidence that neutrophils may help recovery by removing damaged tissue and also by summoning macrophages into the damaged tissue (63–65). They can also help with the regeneration of peripheral

axons by storing cholesterol from the myelin they ingest, then using this stored cholesterol during the remyelination of regenerating axons (66). Although it was assumed that neutrophils produce reactive oxygen species (ROS) responsible for the secondary damage of injured tissue (67–70), de Castro *et al.* (71) showed that neutrophils found at the site of injury do not release substantial quantities of ROS following SCI. They even found that neutrophils remove oxidized proteins following SCI, perhaps in conjunction with phagocytosis.

To our knowledge, this is the first systematic study showing a positive impact of Flt3 ligand administration on neurologic recovery as well as on the sparing of white and gray matter after SCI. The main advantages of the factors used in our study are that both of them have been approved for clinical studies, they have been tested in humans and they have been proven to have no negative side-effects. Importantly, animals receiving a combination of G-CSF and Flt3 ligand showed better behavioral recovery, as well as more spared white and gray matter, than animals receiving G-CSF or Flt3 ligand alone, when both substances were tested under the same experimental conditions. Our results show that a combination of both factors prolong bone marrow cell mobilization, mainly neutrophils, which probably plays an important role in recovery and regeneration processes, such as reduced astrogliosis and increased axonal sprouting. Moreover, our study clearly demonstrates that a combination of G-CSF and Flt3 ligand administration is a safe treatment method with the greatest beneficial impact upon neurologic recovery as well as on the amount of spared white and gray matter.

## Acknowledgments

We thank James Dutt for critical reading of the manuscript. We thank Amgen Inc. for providing us with Flt3 ligand and LABVET laboratory (Prague, Czech Republic) for the evaluation of blood samples. We acknowledge the support provided by grants GAAV IAA500390902, LC554, 1M0538 and AVOZ 503905703.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

1. 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.
2. Inoue M, Honmou O, Oka S, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and

- intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia*. 2003;44:111–18.
3. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279:1528–30.
  4. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol*. 1994;161:218–28.
  5. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*. 1980;151:294–307.
  6. Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 2000;11:3001–5.
  7. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:2199–204.
  8. Syková E, Jendelová P, Urdziková L, Lesný P, Hejčl A. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels: two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol*. 2006;26:1113–29.
  9. Syková E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konrádová SL, Kobylka P, et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2006;15:675–87.
  10. Urdziková 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. *J Neurotrauma*. 2006;23:1379–91.
  11. Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, et al. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation*. 2004;110:1847–54.
  12. Kim BR, Shim JW, Sung DK, Kim SS, Jeon GW, Kim MJ, et al. Granulocyte stimulating factor attenuates hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting apoptosis in neonatal rats. *Yonsei Med J*. 2008;49:836–42.
  13. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Manz MG. Flt3 in regulation of type I interferon-producing cell and dendritic cell development. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1106:253–61.
  14. Timeus F, Ricotti E, Crescenzi N, Garelli E, Doria A, Spinelli M, et al. Flt-3 and its ligand are expressed in neural crest-derived tumors and promote survival and proliferation of their cell lines. *Lab Invest*. 2001;81:1025–37.
  15. Ilzecka J. Cerebrospinal fluid Flt3 ligand level in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2006;114:205–9.
  16. Vanický I, Urdziková L, Saganová K, Čížková D, Gálík J. A simple reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma*. 2001;18:1399–407.
  17. 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.
  18. Šedý J, Urdziková L, Hejčl A, Burian M, Likavčanová K, Jendelová P, et al. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma*. 2007;24:1487–501.
  19. Cambria RP, Davison JK, Zannetti S. Clinical experience with epidural cooling for spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg*. 1997;25:234–41.
  20. Urdziková L, Vanický I. Post-traumatic moderate systemic hyperthermia worsens behavioural outcome after spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord*. 2006;44:113–19.
  21. Luo J, Zhang H, Jiang X, Xue S, Ke Y. Combination of bone marrow stromal cell transplantation with mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes functional recovery after spinal cord transection. *Acta Neurochir*. 2009;151:1483–92.
  22. Kim BG, Hwang DH, Lee SI, Kim EJ, Kim SU. Stem cell-based cell therapy for spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2007;1:355–64.
  23. Syková E, Jendelová P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res*. 2007;161:367–83.
  24. Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, Wang L, Zhang L, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res*. 2002;69:687–91.
  25. Chong ZZ, Kang JQ, Maiesse K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:503–14.
  26. Dame C, Wolber EM, Freitag P, Hofmann D, Bartmann P, Fandrey J. Thrombopoietin gene expression in the developing human central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003;143:217–23.
  27. Callera F, do Nascimento RX. Delivery of autologous bone marrow precursor cells into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with spinal cord injury: a preliminary safety study. *Exp Hematol*. 2006;34:130–1.
  28. Chernykh ER, Stupak VV, Muradov GM, Sizikov MY, Shevela EY, Leplina OY, et al. Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. *Bull Exp Biol Med*. 2007;143:543–7.
  29. Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, et al. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: phase I/II clinical trial. *Stem Cells*. 2007;25:2066–73.
  30. McLay RN, Kimura M, Banks WA, Kastin AJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor crosses the blood-brain and blood-spinal cord barriers. *Brain*. 1997;120:2083–91.
  31. Bouhy D, Malgrange B, Multon S, Poirrier AL, Scholtes F, Schoenen J, et al. Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages. *FASEB J*. 2006;20:1239–41.
  32. Park HC, Shim YS, Ha Y, Yoon SH, Park SR, Choi BH, et al. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Eng*. 2005;11:913–22.
  33. Huang X, Choi JK, Park SR, Ha Y, Park H, Yoon SH, et al. GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins. *Neurosci Res*. 2007;58:50–7.
  34. Huang X, Kim JM, Kong TH, Park SR, Ha Y, Kim MH, et al. GM-CSF inhibits glial scar formation and shows long-term protective effect after spinal cord injury. *J Neurol Sci*. 2009;277:87–97.
  35. Fortun J, Puzis R, Pearse DD, Gage FH, Bunge MB. Muscle injection of AAV-NT3 promotes anatomical reorganization of CST axons and improves behavioral outcome following SCI. *Neurotrauma*. 2009;26:941–53.
  36. Miltiadous P, Stamatakis A, Stylianopoulou FJ. Neuroprotective effects of IGF-I following kainic acid-induced hippocampal degeneration in the rat. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30:347–60.
  37. Tian DS, Dong Q, Pan DJ, He Y, Yu ZY, Xie MJ, Wang W. Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model. *Brain Res*. 2007;1154:206–14.

38. Pan HC, Cheng FC, Lai SZ, Yang DY, Wang YC, Lee MS. Enhanced regeneration in spinal cord injury by concomitant treatment with granulocyte colony-stimulating factor and neuronal stem cells. *J Clin Neurosci.* 2008;15:656–64.
39. Chen WF, Jean YH, Sung CS, Wu GJ, Huang SY, Ho JT, et al. Intrathecally injected granulocyte colony-stimulating factor produced neuroprotective effects in spinal cord ischemia via the mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *Neuroscience.* 2008;153:31–43.
40. Divani AA, Hussain MS, Magal E, Heary RF, Qureshi AI. The use of stem cells' hematopoietic stimulating factors therapy following spinal cord injury. *Ann Biomed Eng.* 2007;35:1647–56.
41. Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res.* 2007;1149:223–31.
42. Toth ZE, Leker RR, Shahar T, Pastorino S, Szalayova I, Asemenew B, et al. The combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow-derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood.* 2008;111:5544–52.
43. Cheng Z, Liu X, Ou L, Zhou X, Liu Y, Lia X, et al. Mobilization of mesenchymal stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in rats with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2008;22:363–71.
44. Pan HC, Wu HT, Cheng FC, Chen CH, Sheu ML, Chen CJ. Potentiation of angiogenesis and regeneration by G-CSF after sciatic nerve crush injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 382:177–82.
45. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol.* 2007;204:443–53.
46. Jeong JO, Kim MO, Kim H, Lee MY, Kim SW, II M, et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects on bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation.* 2009;119:699–708.
47. Yata K, Matchett GA, Tsubokawa T, Tang J, Kanamaru K, Zhang JH. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res.* 2007;1145:227–38.
48. Fathali N, Lekic T, Zhang JH, Tang J. Long-term evaluation of granulocyte-colony stimulating factor on hypoxic-ischemic brain damage in infant rats. *Intensive Care Med.* 2010;36:1602–8.
49. Schlager GW, Griesmaier E, Wegleiter K, Neubauer V, Urbaneck M, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. Systemic G-CSF treatment does not improve long-term outcomes after neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Exp Neurol.* 2010 [Epub ahead of print].
50. Keller M, Simbruner G, Górná A, Urbanek M, Tinhofer I, Griesmaier E, et al. Systemic application of granulocyte-colony stimulating factor and stem cell factor exacerbates excitotoxic brain injury in newborn mice. *Pediatr Res.* 2006;59:549–53.
51. Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schabitz WR. Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia stroke. 2008;39:1855–61.
52. England TJ, Gibson CL, Bath PM. Granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke and its effects on infarct size and functional outcome: a systematic review. *Brain Res Rev.* 2009;62:71–82.
53. Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, et al. Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur J Neurosci.* 2007;26:126–33.
54. Bartolini A, Vigliani MC, Magrassi L, Vercelli A, Rossi F. G-CSF administration to adult mice stimulates the proliferation of microglia but does not modify the outcome of ischemic injury. *Neurobiol Dis.* 2010;41:640–9.
55. Shyu WC, Lin SZ, Lee CC, Liu DD, Li H. Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *Canadian Medical Association Journal.* 2006;174:927–33.
56. Schabitz WR, Laage R, Vogt G, Koch W, Kollmar R, Schwab S, et al. AXIS: a trial of intravenous granulocyte colony-stimulating factor in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2010;41:2545–51.
57. Brasel K, McKenna HJ, Morrissey PJ, Charrier K, Morris AE, Lee CC, et al. Hematological effects of flt3-Ligand in vivo in mice. *Blood.* 1996;88:2004–12.
58. Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, et al. Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *J Neurosci. Res.* 2004;76:453–65.
59. Papayannopoulou T, Nakamoto B, Rews RG, Lyman SD, Lee MY. In vivo effects of flt3/flk2-ligand on mobilization of hematopoietic progenitors in primates and potent synergistic enhancement with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1997;90:620–9.
60. Furtado GC, Pina B, Tackle F, Gaupp S, Rooijen N, Moran T, et al. A novel model of demyelinating encephalomyelitis induced by monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2006; 177:6871–9.
61. Marroquin CE, Westwood JA, Lapointe R, Mixon A, Wunderlich JR, Caron D, et al. Mobilization of dendritic cell precursors in patients with cancer by Flt3 ligand allows the generation of higher yields of cultured dendritic cells. *J Immunother.* 2002;25:278–88.
62. Longbrake EE, Lai W, Ankeny DP, Popovich PG. Characterization and modeling of monocyte-derived macrophages after spinal cord injury. *J Neurochem.* 2007;102:1083–94.
63. Blight AR. Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *Cent Nerv Syst Trauma.* 1985;2:299–315.
64. Blight AR. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1992;9:83–91.
65. Strein WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol.* 1998;152:74–87.
66. Boyles JK, Zoeliner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH, et al. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest.* 1989;83:1015–31.
67. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1998;330:365–76.
68. Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J Neurosci.* 2002;22:7526–35.
69. Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yezierski RP. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci.* 1998;18:3251–60.
70. Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 2004;6:712–24.
71. De Castro Jr R, Hughes MG, Xu GY, Clifton C, Calingasan NY, Gelman BB, et al. Evidence that infiltrating neutrophils do not release reactive oxygen species in the site of spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2004;190:414–24.