

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-15-0766**Aplikácia kombinovanej terapie na potlačenie sekundárneho poškodenia miechy po traume**Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Nadežda Lukáčová, DrSc.**Príjemca **Biomedicínske centrum SAV - Neurobiologický ústav**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra Slovenskej akadémie vied

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Department of Cellular Signaling, Mossakowski Medical Research Centre Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland - (prof. Joanna Strosznajder - neurozápal a neurodegenerácia)

Neuroregeneration Laboratory, Department of Anesthesiology, University of California, San Diego, United States - (prof. Martin Marsala - subpiálna aplikácia)

Józef Piłsudski University of Physical Education in Warsaw Faculty in Białá Podlaska, Poland - (prof. Malgorzata Chalimoniuk - vplyv cvičenia/tréningu na neurodegeneratívne ochorenia)

Department of Molecular Biophysics, Bogomoletz Institute of Physiology Kiev, Ukraine - (prof. Nana Vojtenko - funkčná charakterizácia neurónov)

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Počas riešenia projektu neboli udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu. Počas riešenia projektu bol vyvinutý miniatúrny stimulátor (50 μ A) s oscilujúcim elektrickým poľom (OSF), ktorý dokáže meniť polaritu elektrického poľa každých 15 minút po dobu 8 týždňov. Elektrické obvody stimulátora boli obalené biokompatibilným silikónovým materiálom (Duosil Express, SHERA), ktorý chráni stimulátor pred poškodením. Uskutočnené bolo testovanie bezpečnosti, biokompatibility a funkčnosti stimulátora. V teste teplotnej závislosti bol izolovaný stimulátor vystavený pôsobeniu vysokých a nízkych teplôt. OSF stimulátor s prídavnými vodičmi, pripojenými k obvodom stimulátora, ktoré boli subkutánne externalizované na chrbtovej strane experimentálnych zvierat tak, aby na ne zviera nemohlo dosiahnuť, bol implantovaný a otestovaný v podmienkach in vivo. Snímaním napätových zmien z týchto vodičov bola v priebehu 8 týždňového intervalu sledovaná funkčnosť a spoľahlivosť OSF stimulátora. V skupine intaktných zvierat s implantovaným stimulátorom boli zvieratá po operačnom zásahu monitorované, aby sa vylúčilo poškodenie miechy spôsobené zavedením elektród do epidurálneho priestoru. Takto izolovaný stimulátor je schopný dodávať elektrický prúd do oblasti poškodenej miechy prostredníctvom dvoch Ir/Pt elektród implantovaných do epidurálneho priestoru dva segmenty kraniálne a kaudálne od miesta experimentálne navodenej kompresie miechy (Th9 segment). Tento metodický prístup je súčasťou

publikácie, ktorá bola uverejnená v karentovanom časopise J Neurosci Methods, vol. 311, p. 102-110, 2019.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Najvýznamnejšie publikácie:

Bimbova K, Bacova M, Kisucka A, Pavel J, Galik J, Zavacky P, Marsala M, Stropkovska A, Fedorova J, Papcunova S, Jachova J, Lukacova N. A Single Dose of Atorvastatin Applied Acutely after Spinal Cord Injury Suppresses Inflammation, Apoptosis, and Promotes Axon Outgrowth, Which Might Be Essential for Favorable Functional Outcome. Int J Mol Sci. 2018 Apr 7;19(4). pii: E1106. (3.687 – IF2017). doi: 10.3390/ijms19041106, (cit: 6).

Bačová M, Bimbová K, Fedorová J, Lukáčová N, Gálik J. Epidural oscillating field stimulation as an effective therapeutic approach in combination therapy for spinal cord injury. J Neurosci Methods, vol. 311, p. 102-110, 2019, (2,668 – IF2018). doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.10.020.

Lukáčová, N - Hricová, Ľ - Kisucká, Aa - Papcunová, Š - Bimbová, K - Bačová, M - Pavel, J - Maršala, M - Vanický, I - Dzurjašková, Z - Matéffy, S - Lukáčová, V - Stropkovská, A - Gálik, J. Is Innervation of the Neuromuscular Junction at the Diaphragm Modulated by sGC/cGMP Signaling? Frontiers in Physiology, vol.11, art.700, p.1-13, 2020. (3.367 – IF2019). doi: 10.3389/fphys.2020.00700

Najvýznamnejšie prednášky:

Lukacova N., Bimbova K., Stropkovska A., Bacova M., Galik J. Benefit statins in spinal cord injury. Oral presentations - Neurochemical Conference 2017“Advances in molecular and epigenetic mechanisms in neurodegeneration and neuroinflammation: novel therapeutic approaches“ October 19-20, 2017 Warsaw, Poland, p. 13, 2017, <http://neuroconf2017.com.pl/lib/fkf3xk/LECTURES---abstracts-in-alphabetical-order-j84nbn5k.pdf>, (pozvaná prednáška).

Významné medzinárodné sympózia:

Zorganizovanie medzinárodného sympózia „8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology“, ktorého sa zúčastnilo takmer 100 účastníkov z 11 krajín (Košice, 18.-21.6.2017). Sympóziu bolo podporené medzinárodnými organizáciami (ESN, IBRO-PERC). Poskytuje širokú platformu pre stretávanie sa odborníkov z oblastí experimentálneho a klinického neurovedného výskumu. Hlavný organizátor: RNDr. Ján Gálik, CSc. Na sympóziu odznali tri prednášky z výsledkov, získaných v rámci riešenia projektu (Lukáčová, Gálik, Pavel).

V r. 2019/20 prebiehala intenzívna príprava „9th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology“, ktoré sa malo konať v dňoch 21.-24.6.2020. Vzhľadom na zložitú celosvetovú pandemickú situáciu bolo konanie sympózia preložené na jún 2021 <http://www.neurobiology.sk/symposium/>.

Riešiteľský kolektív prezentoval svoje výsledky na významných svetových a európskych sympóziách. Abstrakty boli uverejnené v karentovanom časopise IBRO Reports a v Abstract Books z jednotlivých sympózií:

FENS regional meeting (Pécs, Maďarsko) 20.-23.9.2017 (Stropkovská et al., Bačová et al.).

11th FENS Forum of Neuroscience: The 20th Anniversary of FENS - Berlin, Germany:

FENS, 7-11 jul 2018 (Bimbová et al.).

FENS Regional Meeting : Abstract Book [elektronický zdroj]. - Belgrade, Serbia : FENS, 10. - 13. July 2019 (Bačová et al., Bimbová et al.).

10th IBRO World Congress of Neuroscience IBRO 2019. - DEAGU, KOREA, 21. – 25. September. 2019 (Lukáčová et al, IBRO Reports, 2019, vol. 6, p. S532–S533, (1,08-IF2018).

Riešiteľský kolektív získal počas riešenia projektu dva nové APVV projekty a tri VEGA projekty, ktoré priamo nadväzujú na riešený projekt.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky získané v rámci riešenia projektu majú viaceré možnosti uplatnenia:

1) Atorvastatín je statín, ktorý sa v klinike užíva na zníženie rizika kardiovaskulárnych príhod. Doposiaľ sa v liečbe traumatického poranenia miechy nepoužíva. V experimentálnej medicíne sa dokázalo, že Atorvastatín aplikovaný po dobu niekoľkých dní pred traumatickým poranéním miechy, prípadne po traumatickej lézii má protizápalový, anti-

apoptotický a anti-adhézny efekt. V našich experimentoch bola štyri hodiny po Th9 kompresii pozorovaná 12-násobne zvýšená koncentrácia prozápalového interleukínu (IL-1 β) v krvnom sére. Atorvastatín (5mg/kg, i.p.) aplikovaný ihneď po traumatickej lézii znížil uvoľňovanie pro-zápalového cytokínu IL-1 β takmer na kontrolné hodnoty, redukoval infiltráciu deštruktívnych M1 makrofágov a aktiváciu rezidentných buniek (astrocyty/mikroglia), a potlačil aktivitu pro-apoptotického markera (kaspáza-3) v neurónoch, astrocytoch a oligodendrocytoch v mieste lézie 1 deň po Th9 kompresii. Šesť týždňov po jednorázovej aplikácii Atorvastatínu bolo pozorované prerastanie Gap-43- a NF-h- imunoreaktívnych axónov v najviac poškodených dorzo-laterálnych povrazcoch a tiež sa zaznamenalo výrazné zlepšenie neurologického skóre. Ukázalo sa, že načasovanie podania tohto lieku po traume miechy hrá kľúčovú úlohu. Výsledky tejto štúdie sú vhodné pre predklinické štúdie na veľkých experimentálnych zvieratách. Potvrdenie našich výsledkov môže viesť k doporučeniu na použitie atorvastatínu ako lieku prvej línie na liečbu akútneho traumatického poranenia miechy.

2) Za účelom aplikácie slabého elektrického gradientu k miestu traumatického poranenia bol počas riešenia projektu vyvinutý miniatúrny stimulátor (50 μ A) s oscilujúcim elektrickým poľom (OSF), ktorý dokáže meniť polaritu elektrického poľa každých 15 minút po dobu 8 týždňov. Stimulátor dodáva elektrický prúd do oblasti poškodenej miechy prostredníctvom dvoch Ir/Pt elektród implantovaných do epidurálneho priestoru dva segmenty kraniálne a kaudálne od miesta traumatickej lézie. Zistili sme, že implantácia OSF stimulátora predstavuje bezpečnú, stabilnú a vhodnú metódu, ktorá môže nájsť uplatnenie v regeneračnej medicíne. Tento terapeutický prístup je vhodný pre kombinovanú terapiu, ktorá je kľúčová pre funkčnú obnovu.

3) V rámci projektu bola zavedená nová metóda (subpiálna aplikácia), ktorá umožňuje aplikáciu liečivých látok priamo pod pia mater, pričom nedochádza k porušeniu samotného parenchýmu miechy. Táto metóda bola primárne vyvinutá za účelom doručenia liečivých látok do CNS pomocou adenovírusov. V rámci riešiteľského kolektívu bola metóda úspešne zvládnutá (Dr. Bimbová, Dr. Kisucká) a použitá v experimentoch na subpiálnu aplikáciu ChABC.

4) S prednostom Neurochirurgickej kliniky LF UPJŠ prof. MUDr. Miroslavom Gajdošom, PhD. prebieha intenzívna komunikácia o prínose výsledkov, získaných v rámci projektu. Zhodnotenie dielčich výsledkov (aplikácia atorvastatínu, elektická stimulácia, aplikácia Rho-Rock inhibítora) vyústilo do prípravy projektu- APVV-19-0324 s názvom „Vývoj translačne relevantných regeneračných a reparačných stratégií po traumatickom poranení miechy potkanov“. Neoddeliteľnou súčasťou žiadosti je originál alebo úradne overená kópia Zmluvy o budúcej zmluve o využití výsledkov riešenia projektu v praxi medzi žiadateľom a odberateľom výsledkov riešenia projektu. Neurochirurgická klinika LF UPJŠ je odberateľom výsledkov získaného projektu, ktorý je zameraný na výskum zápalovej odpovede po experimentálne navodenom traumatickom poranení miechy.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Cieľom projektu bolo navrhnuť súbor terapeutických opatrení, ktoré sú kľúčové pre obnovu funkčných spojení po traumatickom poranení miechy (SCI). Atorvastatín (ATR, 5 mg/kg; i.p.). podaný jednorázovo ihneď po SCI účinne moduloval zápalovú odpoveď. Tento liek výrazne znížil uvoľňovanie IL-1 β 4 a 24 hodín po SCI, zabránil nadmernej infiltrácii makrofágov do sivej a bielej hmoty a významne znížil aktiváciu rezidentných buniek deň po poranení. Zdá sa, že modulácia zápalovej odpovede cez vplyv na M1/M2 makrofágy a expresiu kaspázy-3 môže byť rozhodujúca pre zlepšenie regenerácie tkaniva. Šesť týždňov po SCI, ATR podporil regeneráciu v mieste lézie, kraniálne a kaudálne od epicentra a významne zlepšil neurologický stav od 30. do 42. dňa. Tieto výsledky podporujú použitie ATR, i keď len v jednorázovej dávke, ako jedného z terapeutických liekov prvej línie na liečbu akútnych traumatických poranení miechy. Na podporu regenerácie tkaniva a navigáciu prerastajúcich axónov po SCI sme navrhli miniatúrny stimulátor oscilačného poľa (OFS) a popísali spôsob jeho epidurálnej implantácie ihneď po SCI. Histologické, imunohistologické, WB a behaviorálne analýzy odkryli, že OFS významne zvýšil expresiu neurofilamentov a s rastom spojeného proteínu GAP-43, masívne potlačil tvorbu aktivovaných astrocytov, zvýšil integritu tkaniva v najviac postihnutých dorzolaterálnych stĺpoch miechy a významne podporil funkčný stav osem týždňov po SCI. Naše zistenia

potvrdzujú, že implantácia OFS je bezpečná a vhodná pre kombinovanú liečbu, ktorá môže účinne podporovať a urýchľovať regeneráciu a funkčnú obnovu.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The aim of the project was to design a set of therapeutic interventions that are key for the recovery of functional connections after traumatic spinal cord injury (SCI). Atorvastatin (ATR, 5mg/kg; i.p.) applied in a single dose immediately after SCI considerably modified the course of inflammatory response. This drug strongly reduced the IL-1 β release at 4 and 24 hours, prevented excessive infiltration of macrophages into the gray and white matter, and significantly reduced activation of resident cells at one day post-injury. It seems that modulation of inflammatory response via effects on M1/M2 macrophages, and caspase-3 expression could be crucial for improvement of tissue regeneration. Six weeks post SCI, ATR promoted regeneration at the lesion site and cranially and caudally from the epicenter, and significantly improved the neurological outcome from day 30 to 42. These results strongly support the use of ATR, even in a single dose, as one of the first-line therapeutic drugs to treat acute traumatic SCI. To promote tissue regeneration and navigation of outgrowing axons after SCI we designed a miniature oscillating field stimulator (OFS) and described method of its epidural implantation immediately after SCI. Histological, immunohistological, WB and behavioral analyses revealed that OFS significantly increased the expression of neurofilaments and growth associated protein GAP-43, massively suppressed formation of activated astrocyte, increased the tissue integrity in the most affected dorsolateral spinal cord columns and significantly promoted functional outcome eight weeks after SCI. Our findings confirm that implanting of OFS is safe and suitable for combined therapy which could effectively promote and accelerate regeneration and functional restoration.