



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## HYDROGELOVÉ MATRICE A REGENERACE NERVŮ

HYDROGEL MATRICES AND NERVE REGENERATION

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Matej Šindel

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2021

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1672/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Matej Šindel**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

### Název bakalářské práce:

Hydrogelové matrice a regenerace nervů

### Zadání bakalářské práce:

1. Provést rešerši na téma využití hydrogelových matic v regenerativní medicíně, se zaměřením na regeneraci nervů, nervové tkáně.
2. Z rešerše vyvodit otevřené problémy zadané tematiky, výzkumné úkoly, které je v ní potřeba řešit.
3. Na základě předchozích bodů navrhnout základní experimenty spočívající v přípravě a charakterizaci vybraných hydrogelů vhodných pro regeneraci nervů, realizovatelné v podmínkách FCH VUT.
4. Zhodnotit experimentální zkušenosti a vytýčit další směr bádání v dané oblasti zejména z hlediska fyzikálně–chemického a materiálového.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Matej Šindel  
student(ka)

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Bakalárska práca sa zaoberá hydrogélovými materiálmi vhodnými pre využitie pri regenerácii nervových tkanív alebo v inžinierstve nervových tkanív. Obsahuje dve hlavné časti. Prvá zhŕňa výsledky literárneho prieskumu, ktorý poukazuje na komplexnosť celého systému a hovorí o rôznych potrebách jednotlivých častí nervovej sústavy. Druhá popisuje jednoduché experimenty, v ktorých bola skúmaná možnosť prípravy hydrogélom pomocou šablóny s lineárnymi kanálkami. Tieto lineárne kanáliky by mohli byť vyplnené hydrogélom s odlišnými vlastnosťami. Ďalej bola vizuálne pozorovaná difúzia modelových farbív v pripravených hydrogélach s kanálkami.

## **Kľúčové slová**

hydrogél, agaróza, šablónové konštrukcie, inžinierstvo nervových tkanív, rast axónov, biomateriály

## **Abstract**

Bachelor's Thesis is dealing with hydrogel materials appropriate for regeneration of neural tissue or neural tissue engineering. Contains two main parts. First part summarize results of literature research, which points out the complexity of neural system and reveals different demands of individual parts inside neural system. Second part describe simple experiments, where ability of preparation hydrogels using template with linear channels was checked. These linear channels could be filled with another hydrogel, but with different properties. Furthermore, the diffusion of model dyes in prepared linear channels was observed.

## **Keywords**

hydrogel, agarose, templated scaffolds, neural tissue engineering, axonal growth, biomaterials

## **Bibliografická citace**

ŠINDEL, Matej. *Hydrogelové matrice a regenerace nervů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131352>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce: prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

## **Prehlásenie**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

V Brně dne: 26. júla 2021

-----  
podpis autora

## **Pod'akovanie**

Ďakujem vedúcemu bakalárskej práce prof. Ing. Miloslavovi Pekařovi, CSc. za cenné rady, umožnenie vytvorenia novej témy a zhovievavosť pri vedení bakalárskej práce, tak aj za aktívnu pomoc pri skúmaní a bádani v tejto problematike. Chcel by som poďakovať aj Mgr. Radkovi Prikrylovi, PhD. a Ing. Přemyslovi Menčíkovi, PhD. z Ústavu chemie materiáľů, za ochotu a rýchle vytvorenie foriem potrebných na experimentálnu časť mojej práce a v neposlednom rade by som chcel poďakovať aj Ing. Natalii Zinkovskej, za odborné konzultácie.

V Brne dňa: 26. júla 2021

-----  
podpis autora

# Obsah

ÚVOD .....	8
<b>1. TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>9</b>
1.1 INŽINIERSTVO NERVOVÝCH TKANÍV .....	9
1.2 FAKTORY OVPLYVŇUJÚCE VÝVOJ A RAST V HYDROGÉLOCH.....	10
1.2.1 <i>Mechanické vlastnosti</i> .....	10
1.2.2 <i>Dynamika neurónového cytoskeletu v hydrogélových konštrukciách</i> .....	11
1.2.3 <i>Schopnosť mechanickej citlivosti neurónov</i> .....	12
1.3 KONTROLOVANÉ UVOĽNOVANIE BIOMOLEKÚL Z HYDROGÉLOVÝCH SYSTÉMOV .....	12
1.3.1 <i>Uvoľňovanie neurotrofických faktorov</i> .....	12
1.3.2 <i>Uvoľňovanie faktorov blokujúcich inhibítory regenerácie nervových tkanív</i> .....	13
1.3.3 <i>Uvoľňovanie liečiv z hydrogélou</i> .....	13
1.3.4 <i>Uvoľňovanie zapúzdrených buniek v hydrogélou</i> .....	14
1.4 ELEKTRICKÁ VODIVOSŤ HYDROGÉLOV PRE NERVOVÉ TKANIVÁ .....	14
1.5 NERVOVÝ SYSTÉM.....	14
1.5.1 <i>Neurón</i> .....	14
1.5.2 <i>Glia</i> .....	17
1.6 PROBLEMATIKA CENTRÁLNEJ NERVOVEJ SÚSTAVY .....	19
1.6.1 <i>Dnešné stratégie v boji s poraneniami centrálnej nervovej sústavy</i> .....	19
1.6.2 <i>Prírodné hydrogély vhodné na tvorbu 3D konštrukcií</i> .....	20
1.6.3 <i>Syntetické hydrogély</i> .....	22
1.6.4 <i>Výroba hydrogélou 3D konštrukcií určených na zranenia miechy</i> .....	22
1.6.5 <i>Štúdie in vivo a klinické testy</i> .....	25
1.7 PROBLEMATIKA PERIFÉRNEJ NERVOVEJ SÚSTAVY .....	25
1.7.1 <i>Dnešné stratégie liečby pri zranení periférnej nervovej sústavy</i> .....	26
1.7.2 <i>Odozva tela na poranenie v oblasti periférnej nervovej sústavy</i> .....	27
1.8 IDEÁLNE HOJENIE A SÚČASNÉ LIMITÁCIE .....	28
<b>2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>30</b>
2.1 VÝBER METÓDY A MATERIÁLU .....	30
2.1.1 <i>Návrh a tvorba formy</i> .....	30
2.1.2 <i>Výber materiálu</i> .....	30
2.2 POSTUP PRÍPRAVY HYDROGÉLU .....	31
2.2.1 <i>Chemikálie</i> .....	31
2.2.2 <i>Prístroje a pomôcky</i> .....	31
2.2.3 <i>Príprava hydrogélou</i> .....	31
2.2.4 <i>Postup pri injekčnom vstreknutí vodného roztoku alebo hydrogélou</i> .....	36
<b>3. ZÁVER.....</b>	<b>40</b>
<b>LITERATÚRA.....</b>	<b>41</b>
<b>PRÍLOHA A.....</b>	<b>47</b>

## ÚVOD

Nervová sústava u cicavcov je rozdelená na centrálnu a periférnu. Centrálna nervová sústava zahŕňa mozog a miechu. Táto časť nervovej sústavy je často zasiahnutá nervovými poruchami ako neurodegeneratívna porucha, demyelizačné ochorenia alebo rôznymi ischemickými poraneniami. Liečba takýchto ochorení je náročná v dôsledku mnohých líšiacich sa faktorov. Výsledkom je veľmi nízky počet pacientov, ktorí sa plne zotavia.

V súčasnosti sa liečba rozdeľuje na dva rôzne prístupy a to na zamedzenie rozšíreniu zranenia alebo ochorenia, po ktorom nasleduje dlhodobá prevencia, ktorá sa zameriava na zastavenie sekundárneho poškodenia okolitých, ale aj nervových tkanív. Druhým prístupom, ktorý je v súčasnosti skôr experimentálny, je snaha o nahradenie poškodeného nervového tkaniva alebo o regeneráciu existujúceho, ale poškodeného nervového tkaniva.

Mozog, je chránený pavúčnicou, ktorá zabraňuje akémukoľvek prístupu liečiv do nervového tkaniva. Práve preto je regenerácia nervových tkanív v centrálnej nervovej sústave neobyčajnou výzvou pre tkanivové inžinierstvo. Dospelá nervová sústava je masívne inhibovaná voči deleniu a regenerácii. Masívna inhibícia je však zjavná najmä pri centrálnej nervovej sústave, zatiaľ čo periférna nervová sústava vykazuje lepšie regeneratívne schopnosti, hlavne kvôli nedostatku inhibičných faktorov. Tento fakt nám potvrdzuje, že regenerácia je možná, len inhibovaná a našim cieľom je inhibíciu čo najviac zmierniť. Napriek mnohým prekážkam, vedci navrhujú rôzne prístupy, ktoré majú pomôcť regenerácii a deleniu nervových buniek. Takto komplexný systém vyžaduje pomalé a rozvážne rozhodnutia a závery, ktoré budú posúvať naše vedomosti o tejto problematike vpred [1].

V tejto práci preto budeme rozoberať rôzne prístupy a materiály, ktoré by práve v prípade nervovej sústavy mali byť kľúčové pre ďalšie pokroky v tomto odvetví. Pričom v experimentálnej časti vyberieme z týchto mnoha metód a materiálov a vyskúšame ich realizovateľnosť a vyhodnotíme ich modifikovateľnosť.



# 1. TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Inžinierstvo nervových tkanív

Inžinierstvo nervových tkanív je rýchlo sa vyvíjajúci obor, ktorý sľubuje riešenia pre vážne neurologické problémy, ktoré sú momentálne značne náročné na liečbu. Cieľom odboru je výber správneho konštrukčného materiálu, ktorý podporí, ako rast nervových buniek, tak aj rast axónov. V porovnaní s ostatnými konštrukčnými materiálmi, hydrogély vyzerajú ako excelentní kandidáti na rast a vývoj nervových tkanív [1].

Nervový systém však samovoľne nepodporuje vlastnú regeneráciu. Vďaka svojej variabilite sú hydrogély využívané vo veľkom množstve na aplikácie, ktoré zmierňujú tento odpor rastu nervových tkanív. Momentálne sa hydrogély používajú na poskytovanie výživy a ochrany pri liečbe nervov.

V tejto práci teda budeme diskutovať o rôznom využití hydrogélom, pre špecifické problémy pri aplikácií a následne aj uvedieme silné a slabé stránky týchto konštrukcií z hydrogélom.

Treba povedať, že termín nervové tkanivá v kontexte tkanivového inžinierstva, je mierne mätúci, pretože poskytuje dojem, že sa zaoberá len nervami. Pravdou je, že inžinierstvo nervových tkanív sa zaoberá výskumom ako nervových, tak aj gliových buniek na tvorbu plne funkčného nervového tkaniva [1].

V súčasnosti sa tkanivové inžinierstvo, ktoré sa zaoberá regeneráciou nervových tkanív rozdeľuje do štyroch kategórií. A teda,

- faktory ovplyvňujúce vývoj a rast,
- faktory ovplyvňujúce adhéziu a proliferáciu nervových tkanív,
- kontrolované uvoľňovanie látok
- elektrická vodivosť tkanív podporujúca matrice.

Napriek mnohým dostupným biomateriálom, hydrogély poskytujú najvyššiu flexibilitu a jednoduchú modifikáciu ich charakteristických vlastností. To nám umožňuje pripraviť podmienky, ktoré sú nevyhnutné na regeneráciu nervových tkanív.

Hydrogély sú kategóriou polymérom, ktoré disponujú fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami, ktoré umožňujú rast buniek. Je známe, že podmienkou vývoja tkanív sú konštrukčné platformy, ktoré poskytujú formu pre kopírovanie extracelulárneho matrixu. Hydrogély disponujú taktiež veľmi podstatnou vlastnosťou a tou je 3D konštrukcia, ktorá je primárnou podmienkou pre regeneráciu nervových tkanív. Prispôsobivosť hydrogélom umožňuje ich aplikáciu pri regenerácií tkanív v rozsahu od hustých kostí, po veľmi mäkké tkanivá ako pečeň. A práve táto vlastnosť ich predurčuje aj na použitie v inžinierstve nervových tkanív [1].

## 1.2 Faktory ovplyvňujúce vývoj a rast v hydrogélach

Neurón zahŕňa bunku aj jej výstupy, ktoré sa nazývajú axóny a dendrity, ktoré vedú akčný potenciál na dlhšie vzdialenosti. Axóny využívajú prichádzajúce podnety, alarmujú najbližšie okolie a nútia ho ku stiahnutiu alebo natiahnutiu. Takéto reakcie môžeme pozorovať pri 3D konštrukciách, kde axón upravil svoj rast v smere vyhovujúcejšieho prostredia.

Bolo pozorované, že vrchol rastúceho axónu, ktorý sa nazýva rastový kužeľ, prilieha k substrátu a tým mení štruktúrne preskupenie mikrotubúl a F-aktínových proteínov vnútri axónu, čím umožňuje jeho natiahnutie.

V prípade, keď by sa jednalo o poranenie miechy a amyotrofickú laterálnu sklerózu, pri ktorej dochádza ku degenerácii axónov a postupné ochrnutie. Hydrogély ukázali možnosť rastu axónov, opravy a obnovenia funkcií v určitom rozsahu, čiastočne aj vďaka povrchu, na ktorý axóny priliehajú [1].

Pozorovania rastu axónov a vývoj v hydrogélach primárne závisí od vnútorných faktorov, ktorými sú:

- mechanické vlastnosti,
- dynamika neurónového cytoskeletu vnútri hydrogélových konštrukcií,
- schopnosť mechanickej citlivosti neurónov.

### 1.2.1 Mechanické vlastnosti

Mechanický stres, ktorý je kladený na nervové tkanivá na povrchu hydrogélmu určuje veľkosť rozsahu rastu a smeru daného neurónu. Je dôležité podotknúť, že mechanický stres ovplyvňujú aj filopódia, ktoré pozostávajú hlavne z aktínu, a tým umožňujú kontrakcie celého systému, čím tlačia na cytoplazmu a cytoskelet [1].

Nárast viskozity a elasticity bol tiež zistený pri axónoch. Vďaka mikrotubulom sme mohli pozorovať predĺženia axónov.

Netreba prehliadnuť ani tak významný faktor, akým je tuhosť hydrogélmu. Pozorovania zistili, že miechové nervy, ktoré rástli v syntetických a prirodzene sa vyskytujúcich hydrogélach, akými sú napríklad akrylamidové gély a fibrín, mali vyššiu úspešnosť pri prežití bunky ako hydrogély, ktoré boli bližšie tým, ktoré sa tuhosťou približovali ku extracelulárnemu matrixu.

Rast F-aktínových reťazcov nebol ovplyvnený tuhosťou hydrogélmu, mäkkšie hydrogély inklinovali k zvýšenej hustote nervových tkanív v porovnaní s tuhšími hydrogélmi.

Zaujímavosťou je však, že astrocytom sa darilo oveľa lepšie v tuhšom prostredí hydrogélmu ku ktorému mohli lepšie prilahnúť narozdiel od neurónov.

Podobné pozorovanie bolo aj pri hydrogélach obsahujúcich rôzne koncentrácie alginátu a vápnika, do ktorého bola bunka zapúzdrená spolu s 3D konštrukciou. Nervové kmeňové bunky, ktoré boli vyvíjané v tomto type hydrogélmu s nižšou tuhosťou vykazovali nárast výskytu  $\beta$ -III tubulínu, ktorý je indikátorom rastu nervov. Tieto zistenia priamo poukazujú na závislosť medzi rastom a delením nervových tkanív a tuhosťou hydrogélmu.

Ďalším zaujímavým pozorovaním, ktoré môže súvisieť s mechanickými vlastnosťami je, že axóny sú náchylnejšie k nasledovaniu záhybov na konštrukcií hydrogélmu. Rast

axónov dospelých neurónov, ktoré boli vyvíjané v syntetických hydrogélach, akými sú polymetylmakrylát spolu s nanotlačeným vzormi, závisel od týchto topografických vlastností materiálu. Boli pozorované rôzne preferencie rozšírenia a príľnutia ku záhybom konštrukcie hydrogélom. Avšak mechanizmus, alebo dôvody samotnej preferencie ostávajú nejasné [1].

Špičky axónov sa vyvíjali taktiež rýchlejšie na mäkkších substrátoch a snažili sa vyhybať tuhším častiam konštrukcie hydrogélu.

Zhrnutím zistení o mechanických vlastnostiach je, že čím je hydrogélová konštrukcia tuhosťou bližšia tuhosti tkaniva v okolí špecifických nervových buniek, tým majú nervové bunky tendenciu k funkcií a rastu. Tento fenomén môže byť, ale spôsobený aj rôznymi inými faktormi, najvyššiu pozornosť priťahujú mechanickosenzitivne iontové kanály, nazývané *piezo 1* [1].

### **1.2.2 Dynamika neurónového cytoskeletu v hydrogélomých konštrukciách**

Cieľom by malo byť vytvorenie neurónov, ktorých neurity sa neskôr rozdelia na dendrity a axóny.

Aktínové mikrotubuly a neurofilamenty sú hlavné proteinové formy na vybudovanie základnej štruktúry nervových vlákien. Aktínové vlákna sú tenké, flexibilné a dvojstranne štrukturované, pozostávajúce z dvojlaločného proteínu nazývaného aktín. Aktínové vlákna poskytujú oporu a stabilizáciu systému. Rast neuritov je závislý na dynamickom skracovaní a predlžovaní sa aktínových vlákien, závisiacom od polymerizačného mechanizmu aktínu [1].

Mikrotubuly sú narozdiel od aktínových vlákien duté, ich tuhosť je oveľa vyššia ako pri aktínových vláknach, a teda sú schopné odolávať tlaku.

Tuosť a mechanická flexibilita axónu závisí na rozmiestnení aktínových vlákien a mikrotubúl. K tomu všetkému prebieha vnútri bunky samovoľná reorganizácia týchto štruktúr v závislosti na potrebe bunky. Vďaka rôznym indikátorom a signálovým proteínom, ktoré fungujú ako „molekulárna spojka“, ktorá presúva intezitu polymerizácie aktínu smerom kde je potrebné pre posilnenie a rast axónu. Treba dodať, že rastúce aktínové vlákna sú však regulované myozínom II, ktorý je dynamickým proteínom, ktorý oddeľuje aktínové zväzky od seba a spôsobuje ustupovanie aktínových vlákien [1].

Zaujímavosťou je, že vláknitý aktín tvoril dlhšie sieťovité obvody a dlhšie rastové kužele a neuritové špičky, keď sa povrch hydrogélom podobal tkanivu v mozgu, zatiaľ čo priemerná dĺžka F-aktínových zväzkov bola výrazne redukovaná pri bunkách vyvíjaných v mäkkších hydrogélom [1].

V mnohých štúdiách, ktoré mali za úlohu zistiť faktory zmien vplyvajúcich na neurónový cytoskelet, sa ukázalo, že je dôležité rozlišovať 2D štruktúry od 3D štruktúr, ktoré poskytujú väčšiu možnosť napodobniť a vynútiť si fyziologicky relevantné výsledky, ako pri konvenčných 2D konštrukciách.

Rozdiely v správaní nervových tkanív sú drasticky odlišné, už len kvôli vplyvom síl, ktoré umožňujú odlišný pohyb a rast. Tieto rozdiely sú spôsobené rozdielmi v buncenej adhézií, topografiou povrchu a schopnosťou začleniť sa do 3D konštrukcie [1].

### **1.2.3 Schopnosť mechanickej citlivosti neurónov**

Snaha o vytvorenie nervového systému zahŕňa komplexné vzory signálov v čase aj priestore, ktoré regulujú rast axónov a formáciu synapsí. Zaujímavosťou je, že zmeny prostredia, ako zmena povrchu, tuhosti, hydratácie a povrchového náboja, môžu začať dynamické zmeny v bunecnom vývoji a vyvolať odpoveď neurónu.

Neuróny menia fyzikálne sily na biochemické signály, vďaka prítomnosti špecializovaných kanálikov, ktoré nazývame mechanicky aktivované iónové kanály. Disponujeme však s veľmi málo informáciami o týchto mechano-senzitívnych ionových kanáloch, použitých v hydrogélových platformách. Je potrebné vykonať ďalšie štúdie, ktoré prinesú jasnejší pohľad na túto problematiku [1].

### **1.3 Kontrolované uvoľňovanie biomolekúl z hydrogélových systémov**

Popri mechanickej opore a poskytnutí vhodných podmienok na regeneráciu nervov, hydrogely môžu poskytnúť aj kontrolované uvoľňovanie biomolekúl. Prostým začlenením týchto biomolekúl do hydrogélových matric.

Hydrogely boli mnohokrát využité, práve kvôli svojej schopnosti začleniť do nich liečivá, malé molekuly, bielkoviny a dokonca aj sekrečné bunky, ktoré mali prospieť nervovej regenerácii [1].

Princípom celého uvoľňovania požadovaných látok je degradačná vlastnosť hydrogél. Degradácia hydrogél môže byť kontrolovaná zmenami v zložení, molekulárnej hmotnosti, hustote pórov a stupňa sieťovania, ktoré ovplyvňuje spôsoby uvoľňovania požadovaných látok.

Kontrolovanie prirodzenej degradácie hydrogél, je kľúčové pri vývoji a návrhoch určených pre inžinierstvo nervových tkanív. Zlúčením fyzikálnych vlastností a biomolekúl, môžu byť hydrogely dizajnované pre účinnejšie a prijateľnejšie prostredie, ktoré umožní lepší rozvoj funkcií nervových tkanív [1].

#### **1.3.1 Uvoľňovanie neurotrofických faktorov**

Neurotrofické faktory sú skupinou biomolekúl, ktoré si vyžadujú špeciálnu pozornosť pri inžinierstve nervových tkanív. Sú známe kvôli svojej jedinečnej schopnosti regulovať rast, proliferáciu a celkové prežitie nervových buniek [1]. Niektoré dobre známe neurotrofické faktory sú:

- faktor rastu nervov,
- mozgový neurotrofický faktor,
- neurotrophin-3 alebo -4,
- neurotrofický faktor gliových buniek.

Tyrozínkinázové receptory a p75 neurotrofické receptory sú častým cieľom štúdií vďaka svojmu bežnému výskytu.

Pri zraneniach nervov boli zaznamenané zvýšené prejavy mozgového neurotrofického faktoru a faktoru rastu nervov, spolu s ich receptormi, zatiaľ čo faktory ovplyvňujúce výživu a obnovu nervu boli zregulované. Takéto zmeny faktorov ovplyvňujúcich výživu spôsobujú mnohé nepriaznivé účinky počas regenerácie axónov [1].

Hydrogély, vďaka svojej jednoduchej syntéze a schopnosti doručiť požadované biomolekuly, sú vhodným kandidátom na doplnenie prísunu neurotrofických faktorov na požadované miesto. Avšak, toto uľahčenie doručenia neurotrofických faktorov prichádza aj s vlastnou sériou prekážok.

Regenerácia nervových buniek vyžaduje špecifické koncentrácie týchto faktorov v jednotlivých fázach rastu, preto je nevyhnutný vývoj hydrogél, ktorý bude vyhovovať základným podmienkam, ktoré boli uvedené na začiatku tejto kapitoly [1].

### **1.3.2 Uvoľňovanie faktorov blokujúcich inhibitory regenerácie nervových tkanív**

Výzvou pri opravovaní nervových tkanív je nehostinné prostredie, vytvorené na mieste zranenia z dôvodu vylúčenia inhibítorov. Gliové jazvy, ktoré pozostávajú z astrocytov a spojivových vlákien sú hlavnou prekážkou pri regenerácii axónov. Inhibitory vnútri jaziev výrazne bránia regeneračnému procesu.

Aby sme zabránili procesu vnútorného bránenia v raste a regenerácii, boli navrhnuté rôzne látky, ktoré by túto reakciu ukľudnili. Následne boli začlenené do hydrogél a použité lokálne, aby uvoľnili látky na mieste jazvy.

Chondroitináza ABC, je bakteriálny enzým, vykazovala zlepšenie rastu axónov v modelových úrazoch nervov. Nanešťastie tento enzým má vysokú mieru degradácie a má zlú tepelnú stabilitu, takže je ďalším predmetom výskumu a snahy zvýšiť jeho stabilitu a zlepšenie funkcií [1].

### **1.3.3 Uvoľňovanie liečiv z hydrogél**

Injekčné hydrogélvé systémy boli rozsiahlo využívané na doručenie liečiv pri rôznych neurologických poruchách, obzvlášť pri liečení tumorov rastúcich v nervovom systéme. Napríklad pri tumore akým je multiformný glioblastóm, ktorý je najagresívnejším a rýchlo rastúcim tumorom s vysokou mortalitou.

Cieľom je zabezpečiť relevantné koncentrácie liečiv v danej oblasti z dvoch dôvodov, a teda prevencia opakovania sa tumoru a zároveň redukovať toxicitu v systéme. Kľúčová je vlastnosť systému, ktorá dokáže dané liečivo uvoľňovať po dlhšie časové obdobie.

Polyetylén glykol dimetakrylát je injekčný hydrogél, ktorý v spojení s temozolomidom, chemoterapeutickým liekom používaným na liečbu špecifických foriem nádorov mozgu, vykazoval vypúšťanie liečiva po dlhšiu dobu.

Podobné účinky mali hydrogély, ktoré uvoľňovali neurotransmitery v zvieracích modeloch podobných Parkinsonovej chorobe. Hydrogél pozostávajúci z dextrán dialdehydu a želatíny, zlúčený s dopamínom, po doručení do prúžkovaného telesa (*striatum*) myši s dopamínovým deficitom, zaznamenal obnovenie motoriky.

Napriek týmto výsledkom, niektoré hydrogély zastavila pavučnica a uvoľnený neurotransmitter bol uvoľnený do mozgového parenchýmu. Problémom však je stále degradácia hydrogél a jeho vlastnosti, ktoré si pre rôzne zranenia vyžadujú špecifické podmienky a prístup [1].

### 1.3.4 Uvoľňovanie zapúzdrených buniek v hydrogélach

Transplantácia buniek a proces, pri ktorom vyvinuté bunky *in vitro* sú implantované do zranenej alebo chorej oblasti, je tiež rozvíjajúca sa oblasť inžinierstva nervových tkanív. Nápad spočíva vo vytvorení buniek, ktoré budú produkovať liečivá a pomôžu tak regenerácií nervov alebo v jednoduchom nahradení poškodených, alebo odumretých buniek [1].

### 1.4 Elektrická vodivosť hydrogélom pre nervové tkanivá

Stimulácia poškodených nervových tkanív elektrickým prúdom viedla ku zmenám v regenerácií aj v oprave buniek. Experimenty *in vitro* aj *in vivo* poukázali na fakt, že prúd aplikovaný v blízkosti poškodených axónov mal výrazný pozitívny vplyv na delenie a regeneráciu.

Dôvod, prečo stimulácia elektrickým prúdom má pozitívne výsledky, nie je známy. Zameranie pôsobí sľubne, aj napriek tomu sú tu výzvy, ktoré je nutné prekonať. Komplikáciou je, že niektoré tkanivá reagujú na tieto vodivé komponenty ako na toxické. Rozdiely nachádzame aj v kvalite prenosu signálu, keďže hydrogély časom degradujú.

Preto z dlhodobého hľadiska je nutné prostredie prispôbiť, aby sa nesprávalo nepriateľsky *in vivo* a je nevyhnutné zamedziť rýchlej degradácii hydrogélu [1].

### 1.5 Nervový systém

Tkanivá nervového systému sú tvorené dvoma typmi buniek, neurónmi a gliovými bunkami. Neuróny zabezpečujú tvorbu, spracovanie a prenos signálov. V nervovom systéme sa nachádzajú rôzne typy neurónov, ktoré sú navzájom prepojené a spoločne tvoria nervové okruhy. V mozgu človeka sa nachádza asi  $(100-200) \cdot 10^9$  neurónov.

Fyziologické podmienky nevyhnutné pre činnosť neurónov zabezpečujú gliové bunky. Gliové bunky slúžia ako podporný systém, zabezpečujú tvorbu obalov na neurónoch a výbežkoch z nich, taktiež uvoľňujú rastové faktory, napomáhajú k udržiavaniu homeostázy a odstraňujú z okolitého prostredia toxické látky a odpadné produkty. Podieľajú sa taktiež na tvorbe bariér a ich udržiavaní medzi neurónmi a okolitými tkanivami [2].

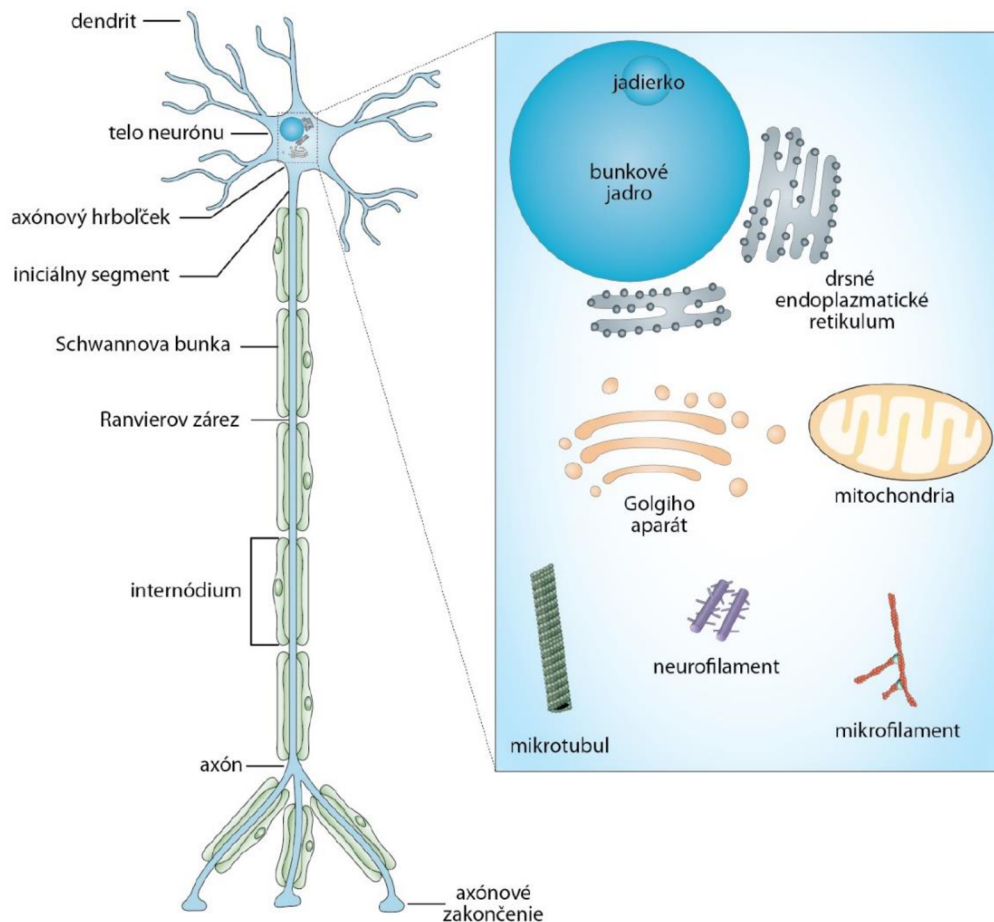
#### 1.5.1 Neurón

Neurón je základnou funkčnou a morfológickou jednotkou nervového systému. V nervovom systéme človeka nachádzame viac ako 50 rôznych typov neurónov, ktoré sa navzájom odlišujú tvarom a funkciami, ktoré zabezpečujú. Aj napriek tomu všetky neuróny majú spoločné vlastnosti, ktorými sa odlišujú od buniek iných tkanív.

Príkladom môže byť polarizácia tela neurónu a kompartmentalizácia funkcií, ktorá odráža ich špecializáciu na tvorbu, spracovanie a prenos elektrických signálov [2].

Neurón je tvorený viacerými štrukturálne a funkčne odlišnými kompartmentmi (*Obrázok 1*):

- bunkovým telom, ktoré predstavuje genomické a metabolické centrum neurónu,
- dendritmi, väčšinou reaktívne krátkymi výbežkami tela neurónu, ktoré predstavujú hlavnú oblasť prijímajúcu signály,
- axónom, ktorý vybieha z tela neurónu aj na väčšiu vzdialenosť a prenáša nervové vzruchy k axónovým zakončeniam, prostredníctvom ktorých vytvára synaptické väzby s ďalšími neurónmi alebo s efektorovými bunkami.



*Obrázok 1: Znáznornenie neurónu a vybraných organel [2]*

Vysoká špecializácia na prenos signálov podmieňuje to, že neuróny nie sú schopné deliť sa a vykazujú zároveň vysokú citlivosť na pôsobenie poškodzujúcich faktorov. Napríklad v prípade, že dôjde k obmedzeniu prísunu kyslíka a energetických substrátov len na niekoľko minút dohádza k ich ireverzibilnému poškodeniu a následne k zániku [2].

### **1.5.1.1 Dendrity**

Dendrity sú krátke, bohato sa vetviace nervové výbežky. Dĺžka dendritov iba zriedka presahuje 1 mm. Na základe vzdialenosti od tela neurónu sa rozlišujú na proximálne a distálne úseky.

Z tela neurónu typicky vystupuje väčší počet dendritov, pri niektorých neurónoch sú prítomné špecializované typy dendritov, napríklad pyramídové bunky, z ktorých odstupuje jeden veľký dendrit vyrastajúci z neurónu, jeho telo pripomína tvarom pyramídu [2].

### 1.5.1.2 Axóny

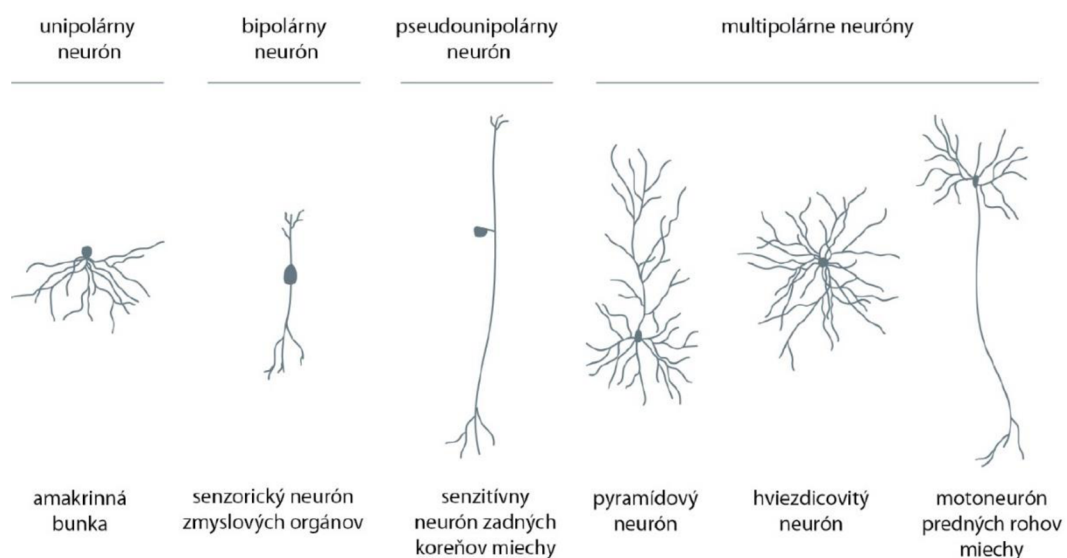
Axón je špecializovaný na prenos signálov na veľké vzdialenosti. Zvyčajne býva najdlhším výbežkom neurónu, pričom môže dosahovať dĺžku od 1 mm až po 1 m. Axón odstupuje z neurónu zo štruktúry, ktorá sa označuje ako axónový hrbolček.

Axón sa väčšinou na distálnom konci rozvetvuje na viacero vetiev. Vetvy axónu môžu vytvárať dva typy rozšírení obsahujúcich vezikuly s neurotransmitermi. Vetvy sú väčšinou zakončené nervovým zakončením, ktoré vytvára synaptický kontakt s príslušným dendritom, bunkovým telom alebo axónom ďalšieho neurónu [2].

### 1.5.1.3 Typy neurónov

Podľa počtu axónov a dendritov sa rozdeľujú na:

- unipolárne neuróny, ktoré majú len jeden výbežok, nachádzajú sa napríklad v sietnici,
- bipolárne neuróny, ktoré majú dva výbežky, nachádzajú sa taktiež v sietnici, ale aj vnútornom uchu a chuťových pohárikoch, tvoria asi 0,05 % z celkového počtu neurónov,
- pseudounipolárne neuróny, majú len jeden výbežok, ktorý sa, ale po odstupe z tela neurónu delí na dva výbežky, nachádzajú sa prevažne v gangliách zadných koreňov miechy a v hlavových nervoch, tvoria približne 0,5 % z celkového počtu neurónov,
- multipolárne neuróny, ktoré vysielajú veľký počet výbežkov; nachádzajú sa v mozgu, mieche (približne 98,95 % z celkového počtu neurónov) a autonómnych gangliách (asi 0,5 % z celkového počtu neurónov) (Obrázok 2).



Obrázok 2: Vybrané typy neurónov, ktoré sa líšia tvarom, počtom výbežkov, vetvením a veľkosťou [2]



Väčšina neurónov v centrálnom nervovom systéme je multipolárnych a vykazujú komplexné tvary, ktoré sú charakteristické pre daný typ neurónu. Uvedené morfológické rozdiely medzi jednotlivými typmi neurónov podmienené rozdielmi v dendritickom vetvení a vetvení axónov často súvisia s rozdielmi v ich zapojení v neuronálnych okruhoch a tým aj s ich funkciami [2].

Klasifikácia založená na charaktere vetvenia dendritov je špecifická pre rôzne oblasti nervového systému. V mozgovej kôre sa rozlišujú:

- hviezdicovité neuróny, ktorých dendrity odstupujú a vetvia sa všetkými smermi,
- pyramídové neuróny, obsahujú jeden veľký dendrit a viacero z neho vystupujúcich z bázy neurónu.

Na základe dĺžky axónu sa rozlišujú:

- projekčné neuróny, ktoré vysielajú axóny na väčšiu vzdialenosť, nazývané aj neuróny typu *Golgi I*,
- interneuróny, ktoré vysielajú axóny iba na krátke vzdialenosti, v oblasti kde sa nachádza aj ich bunkové telo, nazývané aj neuróny typu *Golgi II*.

Na základe ich umiestenia v nervových okruhoch, pričom sa rozlišujú na:

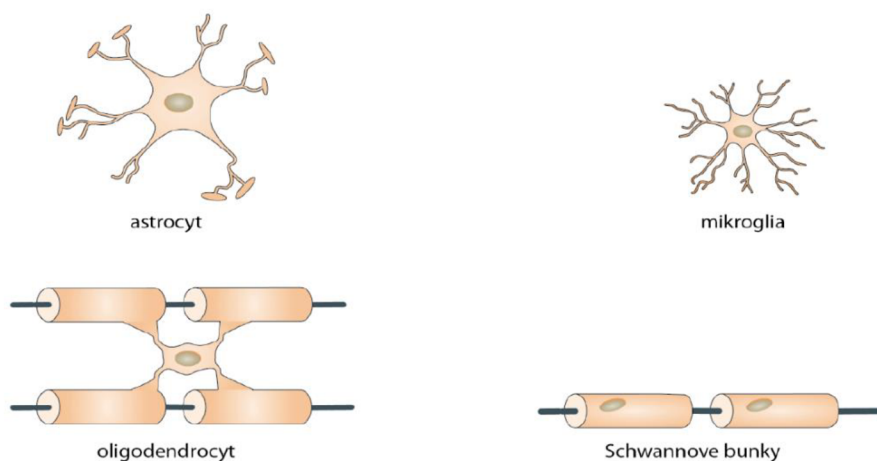
- primárne senzitivné, alebo teda senzorické neuróny, ktorých senzitivný výbežok sa nachádza v periférnych tkanivách, napríklad koža a sietnica, tieto neuróny sa tiež označujú ako aferentné, keďže prenášajú signály do centrálného nervového systému,
- motorické neuróny, inervujú efektorové bunky, napríklad kostrové alebo hladké svaly a bunky žliaz, tieto neuróny sa označujú ako eferentné, nakoľko prenášajú signály z centrálného nervového systému k efektorovým bunkám v periférnych tkanivách,
- interneuróny, ktoré v nervovom systéme tvoria väčšinu neurónov a zabezpečujú prenos signálov medzi ďalšími neurónmi.

Na základe primárneho neurotransitera, ktorý daná populácia neurónov syntetizuje a uvoľňuje, sa rozlišuje celé spektrum odlišných typov neurónov, napríklad glutamatergické, glycinergické, dopaminergické, sérotoninergické [2].

### 1.5.2 Glia

Neuroglia sa označujú ako neneuronálne bunky s podpornými funkciami, ktoré sa nachádzajú v centrálnom a periférnom nervovom systéme (*Obrázok 3*). Gliové bunky sú prítomné v okolí bunkových tiel neurónov, ako aj ich výbežkov. Podporné funkcie buniek glie sú významné aj preto, že na rozdiel od periférnych orgánov, centrálny nervový systém neobsahuje kolagénové spojivé tkanivo. V centrálnom nervovom systéme sú bunky glie a neuróny navzájom oddelené 10 až 20 nm širokým intercelulárnym priestorom vyplneným extracelulárnou tekutinou. Tento priestor tvorí asi 15 % až 20 % celkového objemu mozgu. Uvádza sa, že u cicavcov bunky glie prevyšujú počet neurónov približne 10 až 50-násobne, a to v závislosti od konkrétnej oblasti centrálného nervového systému, pričom glia tvorí asi polovicu celého objemu mozgu [2].

Novší výskum, ale naznačuje, že v mozgu človeka je počet neurónov približne rovnaký ako počet buniek glie.



Obrázok 3: Jednotlivé typy gliových buniek [2]

Na základe funkcií a lokalizácie sa rozlišuje viacero typov gliových buniek. V centrálnom nervovom systéme sú prítomné:

- astrocyty (astroglia),
- oligodendrocyty (oligodendroglia),
- mikroglia,
- ependymálne bunky.

Astroglia a oligodendroglia sa označujú aj ako makroglia.

Gliové bunky v periférnej nervovej sústave obsahujú:

- Schwannove bunky, ktoré obklopujú nervové vlákna,
- perineuronálne satelitné bunky, ktoré obklopujú telá neurónov.

Bunky glie sa na rozdiel od neurónov môžu deliť mitózou počas celého života jedinca [2]. Pôvodne sa predpokladalo, že bunky neuroglie majú reaktívne pasívnu úlohu a v centrálnom nervovom systéme zabezpečujú iba obmedzený rozsah funkcií. Tomu zodpovedalo aj ich označenie, neuroglia t.j. „nervové lepidlo“. V súčasnosti je zrejmé, že funkcie glie sú omnoho rozsiahlejšie:

- glia vytvára vysoko organizovanú oporu, ktorá poskytuje centrálnemu nervovému systému štrukturálnu podporu pre neuróny a neuronálne okruhy,
- počas vývinu neuroglia navádza migrujúce prekursor neurónov z neuroepitelu do určených cieľových oblastí, v ktorých sa vytvárajú definitívne usporiadania nervových okruhov, bunky glie určujú smer rastu axónov, a tak determinujú vznik nervových dráh,
- glia tvorí rastové faktory, ktoré bránia neurónom prejsť do apoptózy, rastové faktory sú nevyhnutné pre procesy regenerácie a plasticity neurónov,
- oligodendrocyty a Schwannove bunky tvoria myelín, ktorý významnou mierou zvyšuje rýchlosť prenosu nervových vzruchov axónmi,
- mikroglia slúži na odstraňovanie odpadového materiálu, ktorý vzniká po poškodení alebo zániku neurónov a taktiež sa podieľa na imunitných procesoch prebiehajúcich v centrálnom nervovom systéme,

- astrocyty sa výraznou mierou podieľajú na udržiavaní homeostázy mikroprostredia tvoreného extracelulárnou tekutinou, a to prostredníctvom prenášania živín a kyslíka z kapilár k neurónom,
- bunky glie sa podieľajú na tvorbe cerebrospinálnej tekutiny a extracelulárnej tekutiny, ktorá obklopuje, vyživuje a chráni neuróny,
- v reakcii na poranenie nervového tkaniva sú aktivované reparačné procesy, pričom bunky glie proliferujú a podmieňujú vznik astrocytarnej jazvy [2].

## **1.6 Problematika centrálnej nervovej sústavy**

Zranenia miechy sú najčastejšie spôsobené stlačením, prenutím (transekciou) alebo pomliaždením miechy. Vedú k vážnym patologickým stavom a strate motoriky a senzoriky, ktoré potenciálne môžu viesť k finančným ťažkostiam pacientov [3].

Po primárnom zranení nervového systému nastáva sekundárne zhoršenie stavu pacienta zápalom a postupným odumieraním nervových a gliových buniek (apoptózou), pričom sa postupne formuje gliálne zjazvenie [4]. Kvôli týmto následným udalostiam sa nemôže centrálna nervová sústava regenerovať alebo vyliečiť neuróny, kvôli mikroenvironmentálnej inhibícií za ktorú zodpovedajú najmä molekuly inhibujúce rast axónov ako napríklad chondroitín sulfátové proteoglykány, ktoré sú zodpovedné za tvorbu gliálnych jaziev. Ďalej molekuly inhibujúce myelinizáciu a taktiež nedostatok dostatočnej mechanickej alebo trofickéj opory, ktorá by poskytla stabilitu a výživu [5], [6], [7], [8]. Postupom času apoptóza pokračuje s demyelizáciou a formovaním cýst [4]. Všetky tieto mechanizmy vyvrcholia do biochemickej a fyzikálnej bariéry, ktorá zabraňuje regenerácií axónov.

### **1.6.1 Dnešné stratégie v boji s poraneniami centrálnej nervovej sústavy**

Prvou stratégiou pri liečbe zranení miechy je použitie protizápalových liečiv, kvôli minimalizácií sekundárneho zhoršenia stavu pacienta. Používaný je methylprednisolone, ktorý je syntetický kortikosteroid, podávaný vo vysokých dávkach do doby 8 hodín od zranenia a poskytuje významnú neurologickú regeneráciu pacientov [9]. Druhou stratégiou je bunková terapia s cieľom obnoviť zranenú miechu a jej funkcie [10], [11], [12]. Rôzne typy buniek nervovej sústavy ako napríklad Schwannove bunky alebo kmeňové bunky sú dodávané do zranenia s cieľom uvoľniť bioaktívne faktory, ktoré majú pomôcť regenerácií, remyelinizácií a redukovať zápal či prípadnú stratu nervových tkanív [13], [14], [15], [16], [17].

Avšak mnoho výziev v prípade bunkovej terapie ostáva nevyriešených. Jednými z nich sú prežitie buniek v mozgomiechovom moku, migrácia na presne stanovené miesto, prilnutie na povrch miechy [18].

Aktuálne pokroky v biomateriáloch a tkanivovom inžinierstve priniesli aplikáciu 3D konštrukcií vo forme implantátov alebo injekcií, ktoré vyzerajú byť sľubnou stratégiou v liečbe poranení miechy. 3D konštrukcie poskytujú bunkám možnosť prilnutia, migrácie a diferenciácie [19]. Taktiež slúži ako matrica pre ciele umiestnenie buniek a liečiv,

pričom dokáže poskytnúť mechanickú a chemickú podporu nevyhnutnú pre rast axónov a stimuláciu regenerácie okolných tkanív [20], [21].

Najatraktívnejším materiálom na tvorbu 3D konštrukcií sú hydrogély, ktoré poskytujú vhodné mikroprostredie pre podporu a rast axónov [22], [23].

Aby bol dizajn 3D konštrukcie úspešný musíme navrhnúť konštrukciu, ktorá bude štruktúrne a mechanicky schopná podpory rastu axónov a zároveň bude poskytovať dostatok živín. Taktiež plne vyplní vzniknuté prerušenie a komplexne bude napodobňovať stabilitu a prostredie potrebné pre regeneráciu nervov [24].

### **1.6.2 Prírodné hydrogély vhodné na tvorbu 3D konštrukcií**

Prírodné hydrogély delíme na proteínové a polysacharidové. Vynikajú predovšetkým charakteristikami ako sú biokompatibilita, bunková interakcia, hydrofilnosť, permeabilita, biodegradácia. Všetky tieto faktory ich predurčujú k správnej voľbe pre napodobňovanie prostredia telu vlastných tkanív. Majú však aj nevýhody a tými sú nízka mechanická stabilita, cena, imunogenita a s tým súvisiaca potreba očistných procesov [3], [25].

Proteínové hydrogély obsahujúce kolagén, želatínu, Matrigel® a sú odvodené od proteínov extracelulárnej matrix [3].

#### **1.6.2.1 Proteínové hydrogély**

##### ***Kolagén***

Kolagén tvorí najväčšiu časť proteínov v extracelulárnej matrix, pozostáva z troch  $\alpha$ -polypeptidových reťazcov spletených navzájom [3]. Kolagén preukázateľne podporuje myelinizáciu, rast axónov a tvorbu nových krvných kapilár (angiogénu) v poškodených nervoch [26].

3D konštrukcie založené na kolagénovom základe, určené na liečbu a regeneráciu poškodenia nervových tkanív, sú často kombinované s inými proteínami a rastovými faktormi pre vylepšenie ich interakcií s bunkami, napríklad hlavne s heparan sulfátom s cieľom vylepšiť mechanické vlastnosti [27].

##### ***Želatína***

Želatína odvodená z kolagénu má podobné vlastnosti, ale nižšiu imunogenitu ako kolagén [3]. Zahnutie želatíny do hydrogélu malo za následok zvýšenú axónovú elongáciu v porovnaní s bezželatínovými hydrogélmi. Taktiež hydrogély obsahujúce želatínu poskytujú vyššiu adhéziu, ktorá poskytuje vhodnejšie podmienky pre rast axónov [28].

##### ***Matrigel***

Matrigel je predajný hydrogélový produkt s komplexnou zmesou extracelulárnych proteínov. Je vylučovaný bunkami z myších tumorov a je vhodným substrátom pre bunecnú kultúru. Umožňuje spojenie buniek a následný axonálny rast skrz medzeru vzniknutú zranením [3], [29]. Taktiež sa používa do 3D tlačiarň [30].

### ***Zhrnutie hydrogéllov na proteínovom základe***

Hydrogély na proteínovom základe obsahujú nevyhnutné peptidy a rastové faktory, ktoré umožňujú rast buniek a adhéziu v 3D matici, avšak ich zlé mechanické vlastnosti tvoria limity pri ich využití. Mnohé štúdie sa preto zameriavali na vylepšovanie mechanických vlastností hlavne formou prepojenia a kombinácie s rôznymi polymérmi alebo prídavkami chemikálií [31].

Na zlepšenie biologickej aktivity a schopnosti bunky prežiť v hydrogélloch s proteínovým základom boli často pridávané aj rastové faktory [27].

#### ***1.6.2.2 Polysacharidové hydrogély***

##### ***Chitosan***

Chitosan, ktorý nájdeme napríklad v krabích pancieroch tvorí hydrogély, v ktorých boli kmeňové bunky úspešne transplantované na liečbu poškodených nervov [32].

##### ***Alginát***

Alginát je hydrofilný, biodegradabilný, biokompatibilný a hlavne neimunogénny polysacharid, z ktorého hydrogély boli použité na vytvorenie 3D konštrukcie určenej na regeneráciu a liečbu miechy [33]. Alginátový hydrogél dokáže transportovať kmeňové bunky, rastové faktory a neurotrofické faktory [34]. Implantovanie alginátového hydrogélu do kompletne pretnutej časti miechy uľahčuje axonálny rast a redukuje tvorbu gliových jaziev [35].

##### ***Agaróza***

Agaróza je polysacharid z červených rias. Jej hydrogél poskytuje optimálnu tuhosť a porozitu výhodou je tiež biokompatibilita. Vo všeobecnosti poskytuje dobré výsledky aj z pohľadu adhézie, pričom jej vlastnosti vieme ovplyvniť pridaním polymérov alebo prídavkom chemikálií [36].

Agaróza nedegraduje, ale môže byť použitá na tvorbu premostení, doručenie liečiv a génov do miesta poranenia. Prípadne ako nosič pre zapúzdrené bunky podporujúce regeneráciu nervových tkanív. Mikroštruktúrne a mechanické podmienky sú ľahko prispôsobiteľné pre špecifické potreby tkanivového inžinierstva [37].

V roku 2006 Stokols a kolektív dokázali vyprodukovať hydrogél z agarózy za pomoci šablóny s vytvorenými lineárnymi kanálkami, ktoré preukázateľne podporili rast axónov [38]. Na základe tejto štúdie sme sa rozhodli vyskúšať vytvoriť vlastnú šablónu a určiť správnu koncentráciu agarózy, ktorá dokáže udržať lineárne kanáliky stabilné.

##### ***Kyselina hyaluronová***

Kyselina hyaluronová je prítomná v extracelulárnej matrix a zohráva teda dôležitú rolu v pochopení jednotlivých väzieb medzi bunkami, prítomnými aj v centrálnej nervovej sústave [3]. Thiol modifikovaná kyselina hyaluronová bola spojená s polyetylén glykolom aby bola vytvorená 3D konštrukcia, ktorá podporuje rast neuritov [39]. V kombinácii s metylcelulózou má nastaviteľné mechanické vlastnosti pričom životaschopnosť buniek narastá s vyššou tuhosťou konštrukcie, taktiež tento typ hydrogélu rýchlejšie gelovatie pri dosiahnutí 37 °C [31].

Pri použití kyseliny hyaluronovej ako výplne do zranení spôsobených v oblasti periférnej nervovej sústavy bolo preukázané, že dochádzalo k lepšiemu hojeniu. Tvorbe väčšieho množstva axónov, nižšiemu prilnutiu nervov ku okolnému tkanivu, spojenou s väčšou vrstvou myelínu a minimálnym formovaním jaziev [40]. Zároveň je stabilný, možná je aj injekčná aplikácia tohto hydrogélmu. Ďalšou výhodou je silné synaptické spojenie a dlhotrvajúci účinok umožňujúci použitie aj pri dlhodobej liečbe [41].

### ***Zhrnutie polysacharidových hydrogélmu***

Polysacharidové hydrogély obsahujúce chitosan, alginát, agarózu, kyselinu hyaluronovú sú rozsiahlo používané v inžinierstve nervových tkanív [3].

Tieto hydrogély sú limitované nedostatkom esenciálnych proteinových komponentov na bunečnú adhéziu, preto musia byť často modifikované a kombinované s proteinovými variantami [42]. Dokonca pri hydrogélmu z chitosanu dochádzalo k imunologickej reakcii makrofágov, čo môže spôsobiť zápalovú reakciu pacienta a tým narážame na veľkú limitáciu pri aplikácii chitosanu práve pri centrálnej nervovej sústave [43]. Taktiež najväčším problémom pri použití agarózy je, že vytvorená 3D konštrukcia nie je biodegradabilná [36].

### **1.6.3 Syntetické hydrogély**

Syntetické hydrogély sú vytvorené z umelých materiálov ako napríklad metakrylát alebo polyetylén glykol. Ich chemické a fyzikálne vlastnosti môžu byť početne modifikované [44]. Boli vytvorené hlavne na modelové situácie, kde dochádza ku kompresii miechy, kde sa mala daná hydrogélmu konštrukcia prispôbiť mieche [45]. Nevýhodou týchto materiálov je však nedostatok bioaktívnych zložiek a bunečnej adhézie. To vyústilo do vylepšenia ich biologických vlastností pomocou biomateriálov alebo zakomponovaním do prírodných hydrogélmu [3], [44].

### ***Polyetylén glykol***

Polyetylén glykol je netoxický, hydrofilný syntetický polymér, ktorý vyvoláva nízku imunogénnu a zápalovú odozvu a spomaľuje tvorbu lokálnych gliálnych jaziev čím pomáha hlavne pacientom v akútnom stave tesne po zranení [46]. Taktiež bol v spojení s prírodnými hydrogélmi schopný niesť neurotrofické a rastové faktory, ako napríklad nervový rastový faktor, spolu s bunkami podporujúcimi rast nervov, ako pôvodné nervové bunky [3], [47].

### **1.6.4 Výroba hydrogélmu 3D konštrukcií určených na zranenia miechy**

Nakoľko dvojrozmerné bunečné kultúry nedostatočne kopírujú prostredie, ktoré môžeme pozorovať v oblasti centrálnej nervovej sústavy, inžinierstvo nervových tkanív sa muselo zamerať na technologickú výrobu 3D konštrukcií. Konštrukcií, ktoré majú nahradiť a podporiť regeneráciu poškodených tkanív. V prípade 3D konštrukcií musíme počítať ako s povrchovou architektúrou tak s vnútornou, ktorá ovplyvňuje rast axónov a smer ich rastu, bunkovú migráciu a tvorbu nového tkaniva (proliferáciu) [48].

Ideálne podmienky vytvorených konštrukcií pre nervovú regeneráciu vyžadujú našu schopnosť navrhnuť 3D maticu s vhodnými mechanickými vlastnosťami podobnými extracelulárnej matrix a zároveň dostatočnou porozitou pre angiogézu a migráciu buniek. Mechanické vlastnosti priamo ovplyvňujú diferenciáciu buniek, napríklad nižšia tuhosť hydrogélmu ako 1 kPa má za následok diferenciáciu buniek z dospelého nervového kmeňa na neuróny a astrocyty, zatiaľ čo pri vyššej tuhosti hydrogélmu ako 7 kPa, bola podmienená diferenciácia na oligodendrocyty. Konštrukcia musí taktiež vydržať jej namáhanie počas regenerácie tkanív bez poškodení [3].

#### **1.6.4.1 Biotlačené konštrukcie**

Biotlač otvára nové možnosti konštrukcie a 3D architektúry tvorby matic pre podporu nervov. Disponuje výnimočnou schopnosťou meniť a vkladať rôzne materiály, molekuly a žijúce bunky v procese tvorby konštrukcie. Umožňuje široké množstvo dizajnov od tvorby komôrok pre bunky až po tvorbu mikrodrážok určených na vyrovnávanie axónov [49].

Táto prelomová technológia je zároveň najlepším spôsobom ako kontrolovať tvar pórov, veľkosť a rozloženie, čož umožňuje presnejšie kopírovanie mikroprostredia nervových tkanív oproti ostantým konvenčným technikám. Niektoré štúdie spozorovali, že konštrukcie, ktoré sú viac uniformné z hľadiska distribúcie pórov, viedli ku zlepšeniu mechanických vlastností samotnej konštrukcie [50]. Ďalej toto zlepšenie mechanických vlastností ovplyvňuje aj tuhosť konštrukcie, ktorá priaznivo pôsobí na diferenciáciu kmeňových buniek a zároveň reguluje ich správanie [3], [51]. Pre porovnanie, 3D vytlačená konštrukcia z kolagénu a chitosanu mala lepšie výsledky v pevnosti a stlačení ako konštrukcia pripravená z kolagénu a chitosanu, ale technikou mrazu a sušenia. Čo viedlo ku celkovému zlepšeniu schopnosti podpory regenerácie nervových tkanív, len použitím rozdielnej techniky pri použití rovnakých materiálov [50]. Avšak, vytvorenie žiadúcej konštrukcie, spolu so zachovanými mechanickými vlastnosťami, v niekoľkých vrstvách bez zrútenia je stále pretrvávajúcou výzvou pre túto metódu tvorby 3D konštrukcií. Konštrukcia musí byť plne stabilná, kvôli poskytovaniu fyzickej podpory a umožneniu rastu axónov a ich regenerácie, aspoň 4 týždne. Pre uvedenie príkladu, kyselina hyaluronová v konštrukcií spôsobuje štruktúrny kolaps po 4 týždňoch *in vivo* v dôsledku vysokého pomeru degradácie, zatiaľ čo polyetylén glykol diakrylát použitý v 3D konštrukcií udrží stabilnú architektúru až šesť mesiacov po implantácii, pričom dokáže udržiavať elastické vlastnosti veľmi blízke nepoškodenej mieche [47].

Podstatným je výber náplne, kde sa ponúka mnoho možností, pre podporu buniek a ostatné biologické procesy. Spolu s kontrolou štruktúry sa jedná o dôležitý krok pre úspešnú tlač danej konštrukcie [30], [52]. Ideálna náplň by mala splňovať chemické, biologické a reologické vlastnosti s prihliadnutím na celkové mechanické vlastnosti pre uspokojivý výsledok a zároveň by mala byť cenovo dostupná [52]. Vhodným kandidátom sa zdajú byť hydrogély prírodné, ktoré vieme spojením so syntetickými hydrogélmi upraviť priamo pre potreby pacienta [30], [47]. Takéto semisyntetické hydrogély majú podobný obsah vody a schopnosť permeability ako nervové tkanivá [3].

Pre porovnanie, v agarózovej konštrukcii sa vytvorila vrstva astrocytov na rozhraní zranenia a konštrukcie pripomínajúca stenu, zatiaľ čo pri použití kombinácie želatíny s metakrylátmi v konštrukcii sa astrocyty rozložili rovnomerne bez vyformovania súvislej vrstvy. Kombinácia želatíny s metakrylátmi spôsobila aj lepšie prenikanie do vytvorených kanálikov [47]. Treba, ale vziať do úvahy, že konštrukcie zo želatíny s metakrylátmi alebo Matrigelu sú pre motorické neurónové progenitorové bunky toxické a vyžadujú ďalšiu optimalizáciu pre udržanie životaschopnosti buniek [53].

#### **1.6.4.2 Šablónové konštrukcie**

Pokiaľ zvažíme ako porozita komôrok, lineárne kanáliky a rôzne smerom orientované štruktúry podporujú vniknutie buniek a tým aj stimulujú a vytvárajú oporu potrebnú pre rast axónov v paralelnom smere pozdĺž miesta zranenia, tak sa ukazuje možnosť použitia jednoduchých šablónových konštrukcií [54]. Šablónové konštrukcie dokážu podporiť orientáciu rastu axónov cez medzeru vzniknutú zranením a zároveň poskytnúť aj v spojení s podpornými látkami aj dostatok výživy pre regeneráciu a liečbu [55].

Najpodstatnejším prvkom pri šablónových konštrukciách sa zdá byť veľkosť mikrokanálikov. Čím menší priemer mikroštruktúr dokážeme vytvoriť tým rovnejšie axóny a astrocyty budú vznikať v lineárnych štruktúrach mikrokanálikov. Pokiaľ priemer mikroštruktúr začneme zväčšovať tak zaznamenáme značný pokles nami požadovanej orientácie. Na druhú stranu, angiogenéza potrebuje dostatočne veľký priestor na rozvinutie, takže optimalizácia veľkosti kanálikov je kľúčová. Tiež môžeme využiť rôzny priemer kanálikov a aj rôznu hustotu v okolí kanálikov spôsobenú spojením s iným typom hydrogélom [56].

#### **1.6.4.3 Mrazom tvorené konštrukcie**

Jedná sa o metódu pri ktorej nastáva rýchle schladenie na vytvorenie termodynamickkej nestability a následne fázové oddelenie hydrogélom, ktoré vytvára dva typy pórov. Náhodné a jednosmerné, závisiace na samotnom procese zamrzenia [3]. Absolútne náhodnú porozitu môžeme získať pri zmrazení dusíkom a to úplným ponorením a následnom sušení vo vákuu. Počas jednosmerného procesu tvorby pórov, látka stuhne pomocou prenosu tepla v dôsledku jednosmerného teplotného gradientu, ktorý zapríčini tvorbu pozdĺžne orientovaných mikrokanálikov vnútri konštrukcie. Tieto navzájom a navzájom prepojené mikrokanáliky spôsobujú jednoduchšiu penetráciu axónov, a zároveň ich lineárne predĺženie spolu s bunkami. Čo znamená, že sú vhodnejšie pre použitie pri nervových tkanivách, ako konštrukcie, ktoré sú len náhodne zamrzené, nakoľko z porozity vyplýva aj zmena mechanických vlastností mikrokanálikov a celej konštrukcie hydrogélom [57]. Aby sme mali väčšiu kontrolu nad samotnou porozitou, využívame najmä koncentráciu gélu v spojení so sieťovacím činidlom, ktoré priamo ovplyvňuje pevnosť a absorpciu vody konštrukcie hydrogélom [58]. Touto technikou sme schopný vytvoriť póry v rozsahu od 23  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$  pričom nevieme presne kontrolovať veľkosť a tvar [58]. Avšak možnosť kontroly sa naskytá pri použití emulzií a následnom zamrzení a vysušení v porovnaní len s obyčajným zamrzeným



a vysušením samotného polyméru [59]. Výsledky tejto stratégie prinášajú redukcii zápalovej odozvy tela pacienta. Vďaka usmerneniu migrácie astrocytov a reaktivity mikroglia, vyvolanie nervového pripojenia. Vznikajú lineárne rastúce axóny popri pozdĺžnych kanálikoch, prebieha angiogenéza, vďaka ktorej sa zvyšuje možnosť funkčného zotavenia [60]. Niektoré štúdie používali materiály odvodené z grafénu pri sušení mrazom, kvôli ich schopnosti zvýšiť nervovú diferenciáciu a axonálne predĺženie [3], [61].

### **1.6.5 Štúdie *in vivo* a klinické testy**

Existuje pár preklinických štúdií zameraných na hydrogélové konštrukcie určené na liečbu zranení nervovej sústavy. Aktuálne sa uskutočňujú testy pozorujúce chovanie zvierat zamerané na ich senzorické a motorické funkcie pri bežných situáciách, ale po nervovom zranení [62]. Testy zahrňujú pozorovanie hyperaktívnej reakcie kvôli prítomnosti bolesti, tepla, chladu [63]. Skúšky prebiehajú na potkanoch pričom pri teste na teplo sa používa výhrevná platňa na zistenie odozvy hmatu z labiek [64]. Cítienie chladu overujeme použitím etyl chloridu alebo acetónu v spreji použitom na telo zvierat'a. Zároveň sa preskúmajú aj celkové motorické funkcie inicovaním pohybu [65]. Ďalším predmetom pozorovania je aj schopnosť lezenia po rebríku [66], chôdza po mriežke [67] a plávanie [68].

Bolo zistené, že fibrín z lososa funguje pri potkanoch lepšie, pretože je menej infekčný v porovnaní s cicavčím fibrínom alebo komerčným Matrigelom [69]. Avšak vedci upozorňujú, že hlodavce sú veľmi nepresným modelom pre výskum regenerácie a liečby nervovej sústavy, kvôli rozlišnej regenerácii tkanív a neurobiologickej stavbe tela v porovnaní s človekom. Presnejší model by poskytli primáty alebo ovce, najmä kvôli veľkosti a podobnejšej anatómii, ale na druhú stranu tu platia určité etické obmedzenia nehovoriac o vyššej finančnej náročnosti [70].

Budúca generácia konštrukcií z hydrogélou bude namieru upravená pacientovi a mala by kombinovať molekulárne a farmakologické liečivá spolu s kmeňovými bunkami. Je dokázané, že po zranení vnútrospinálny tlak vzrastie z pôvodných 240 Pa na 1186 Pa, pričom samotné zvýšenie tlaku vedie k rozšíreniu pôvodného zranenia a tým vytvára priestor aj pre sekundárne zranenie [71].

## **1.7 Problematika periférnej nervovej sústavy**

Periferná nervová sústava spája centrálnu nervovú sústavu (mozog a miechu) s celým zvyškom ľudského tela, pričom využíva motorických a senzorických nervov. V porovnaní s centrálnou nervovou sústavou, ktorá je uzavrená v stavcoch chrbtice alebo lebke, periferná nervová sústava nie je chránená kosťami a o to viac je náchylná na možné poranenia [72]. Poškodenie periférnej nervovej sústavy môže nastať rôzne. Príkladom môže byť zranenie, infekcia, autoimunitné ochorenie, alkohol, toxíny, dokonca aj užívanie medikamentov. Narušenie periférnej nervovej sústavy môže viesť ku permanentnej dysfunkcii zasiahnutej časti alebo ku vyššej náchylnosti na ochorenia, kvôli neschopnosti komunikácie s centrálnou nervovou sústavou [73], [74].

Do konca 18. storočia sa neuvažovalo nad možnosťou regenerácie periférnej nervovej sústavy, predpokladalo sa, že regenerácia nie je možná. Odvtedy sa naše chápanie a znalosti týkajúce sa regenerácie a obnovy periférnej nervovej sústavy rozšírili. Dnes vieme, že proces liečby závisí na niekoľkých faktoroch, ktoré spolu komplexne súvisia [74].

### **1.7.1 Dnešné stratégie liečby pri zranení periférnej nervovej sústavy**

Hlavnými faktormi sú správna diferenciácia buniek, rastové faktory a na možnosti prenášať signál. Dodnes však niektoré problémy sú veľkou výzvou pre celé odvetvie inžinierstva nervových tkanív. Jedným z nich je ako pri centrálnej nervovej sústave správna rekonštrukcia pomocou 3D konštrukcií, ktorá zaručí prijateľné fungovanie postihnutej oblasti [74]. Ďalším kľúčovým faktorom, na ktorom závisí úspešnosť liečby je typ a rozsah poškodenia. Pri ľahkom poškodení nedochádza ku vytvoreniu medzery medzi nervami, zatiaľ čo pri väčšom poškodení dochádza ku tvorbe medzery medzi jednotlivými nervami. Pri malej medzere je častým riešením zošitie so snahou spojiť oddelené konce, avšak toto spojenie môže viesť ku zhoršeniu elasticity a zjazvením na konci poškodeného nervu, čo spôsobuje problémy pri ďalšej liečbe. Na druhú stranu sa často stretávame s predĺžením axónov a prekonaním vzniknutej medzery a opätovným spojením odseparovaných zakončení [75]. Pri rozsiahlejšom poškodení táto metóda zlyháva kvôli dislokácií z pôvodnej pozície, ktorá vedie k funkčnému poškodeniu poraneného miesta. Tieto poškodenia vyžadujú už aplikáciu podporných matierálov pre správne premostenie vzniknutej medzery a zároveň zabráni vzniku zjazvenia [76]. Existujú záznamy o sponátnom zahojení malej nervovej medzery menšej ako 5 milimetrov. Spontánne hojenie ostáva skôr výnimkou a nakoniec si môže vynútiť aj operáčny zákrok [77].

Existujú dva hlavné typy aplikovateľných biomateriálov, ktoré sú schopné správneho premostenia vzniknutého poškodenia. Tými sú transplantácia nervu priamo od poraneného a umelo pripravené biomateriály. Pri transplantácií môžu byť pridané aj časti obehovej sústavy prípadne podporné látky [74].

Transplantácia je zlatým štandardom a spĺňa podmienky celkovej komplexity systému a zároveň správnej biokompatibility s ľudským telom. Problémom však je limitované množstvo, možnosť vzniku jazvy, prípadne zlé hojenie spojené s nedostatočnou regeneráciou [78]. Kvôli týmto problémom začali vznikať inžinierske riešenia s použitím biomateriálov a tvorenia konštrukcií z nich. Celou problematikou sa zaoberá tkanivové inžinierstvo, ktoré študuje kľúčové elementy potrebné k regenerácii a prípadnej náhrade poškodeného tkaniva alebo orgánu. V tomto konkrétnom prípade inžinierstvo nervových tkanív sa zaoberá tvorbou konštrukcií, ktoré poskytnú nie len mechanickú podporu potrebnú pre rast, ale aj ďalšie dôležité látky ako lieky a podporné faktory nevyhnutné pre správnu regeneráciu [79].

Materiály, ktoré pripadajú do úvahy sa vo veľkej miere zhodujú s materiálmi, ktorých použitie zohráva dôležitú úlohu pri regenerácii centrálnej nervovej sústavy, aj napriek tomu, že vyžadujú odlišné podmienky pre správne fungovanie liečebného procesu. Rôzne

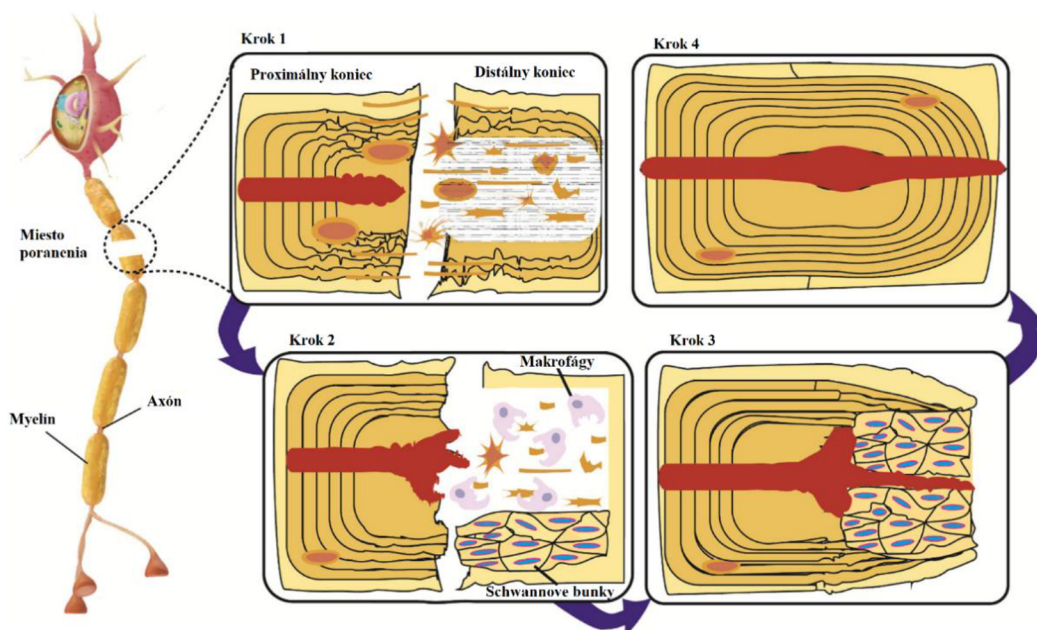
štúdie pozorovali remyelinizáciu a regeneráciu axónov práve po použití prírodných hydrogélův na poranenia v oblasti periférnej nervovej sústavy. Hlavne najmä ich schopnosti simulovať nervom prirodzené podmienky [80].

### **1.7.2 Odozva tela na poranenie v oblasti periférnej nervovej sústavy**

Za najčastejší dôvod vzniku zranenia periférnej nervovej sústavy sa považuje narušenie mäkkých tkanív spôsobených buď predĺžením alebo tržnou ranou spojenou s fraktúrou [74], [81].

Po zranení vzniká proximálny a distálny nerv (*Obrázok 4 Krok 1*). V poškodenej časti nastáva reakcia buniek, ktorá vedie ku snahe zregenerovať oddelený axón. Zatiaľ čo proximálna strana je stále vyživovaná, distálna strana odumiera a podlieha Wallerianskej degenerácii. Tento proces začína odstraňovaním odumretých častí poškodenej časti, fagocytózou neurofilamentov a mikrotubúl, narušených nervových vlákien pomocou migrácie makrofágov [82]. Po kompletnom odstránení nežiadúceho zväčša mŕtveho tkaniva prichádzajú na rad Schwannove bunky a ich rast. Produkujú Büngerove pásma, teda lineárne usporiadané a vzájomne komunikujúce Schwannove bunky kryté bazálnou laminou, ktorá je tenkou a vláknitou extracelulárnou vrstvou. Takto pripravený distálny nerv očakáva regenerujúce sa axóny z proximálnej časti (*Obrázok 4 Krok 2*). Schwannové bunky v distálnej časti vylúčia myelín a začnú produkovať faktory ovplyvňujúce rast a regeneráciu nervov, najmä nervový rastový faktor a neurotrofín 3 a 4 [83], [84]. Zatiaľ čo v proximálnej časti nervové vlákna začnú tvoriť rastový kužeľ z poškodeného miesta. Rastový kužeľ vychádza zo štruktúry aktínu a je schopný „cítiť“ okolité prostredie a naviesť smer regenerácie priamo ku distálnej časti axónu a Büngerovmu pásmu (*Obrázok 4 Krok 3*).

Pri optimálnych podmienkach je regenerácia kompletná a axón si opäť vytvorí myelínovú vrstvu (*Obrázok 4 Krok 4*). Zvýšená šanca správneho hojenia je spojená s bezodkladným riešením problému. V opačnom prípade distálna časť nervu sa zapuzdrí a vznikne zjazvenie, ktoré spôsobí už trvalé poškodenie na poranenom mieste periférnej nervovej sústavy [77].



Obrázok 4: Progress Wallerianskej degenerácie a regenerácia nervu po zranení periférnej nervovej sústavy, na obrázku vybraný jediný axón a remyelinizáciou pomocou Schwannových buniek pre objasnenie procesu [74]

### 1.8 Ideálne hojenie a súčasné limitácie

Štúdie syntetických alternatív začali prekonávať limitácie zastaralých transplantačných procesov a umožnili širšie porozumenie inžinierstvu nervových tkanív. Hlavným cieľom inžinierstva nervových tkanív je teda vyvinutie bioaktívnych konštrukcií s čo najväčšou podobnosťou prirodzeným podmienkam v ľudskom tele, ktoré je schopné liečby zranení periférnej nervovej sústavy [74].

Vyrobené 3D konštrukcie by mali prejsť aj veľkým zjednodušením pri ich výrobnom procese aby mohli byť zaradené medzi ľahko dostupné riešenia. Rôzne druhy biomateriálov ako napríklad hydrogély, ktoré boli prispôbené na zranenia periférnej nervovej sústavy boli schopné prekonať a zregenerovať aj vzniknuté medzery o veľkosti 3 až 10 milimetrov [85]. Ako bolo už spomenuté veľkosť a rozsah zranenia sú kľúčové pre hojenie a regeneráciu, pretože pri prekonaní kritickej hranice už vytvorené fibrínové vlákna nie sú schopné vyplniť celý priestor a vytvoriť štruktúru, ktorá je hlavnou podmienkou pre započatie hojenia rany. V takom prípade, neúplná formácia extracelulárnej matrix zabraňuje migrácií Schwannových buniek do miesta defektu, čo je kľúčové pre celý proces vysvetlený pri odovzde tela na poranenie s medzerou menšou ako 5 milimetrov [86].

Efektívna 3D konštrukcia vytvorená na základe vedomostí z inžinierstva nervových tkanív by mala spĺňať nasledujúce podmienky a charakteristiky. Mala by byť biokompatibilná, neimunnogénna, hemokompatibilná. Poskytovať optimálnu porozitu o veľkosti od 5 do 30 mikrometrov, ideálne len v intervale od 10 mikrometrov do 20 mikrometrov aby nutrienty mohli vyživovať potrebné časti a zároveň odpadové látky mohli byť vypudené zo štruktúry. Mala by zabráňovať infiltrácií buniek, ktoré tvoria

zjazvenie, zároveň poskytovať oporu a pomáhať udržiavať smer proximálnej časti k distálnej časti nervu. Mala by byť odolná voči mechanickému poškodeniu počas regenerácie nervu a zároveň byť aj dostatočne flexibilná aby sa zabránilo neželanej kompresii nervového tkaniva. V neposlednom rade by mala byť jednoducho skladovateľná a zároveň stabilná počas sterilizačného procesu [74].

## 2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 2.1 Výber metódy a materiálu

Na základe prechádzajúcich štúdií sme sa rozhodli vyskúšať šablónovú tvorbu hydrogélových matric, s kanálkami o rôznych priemeroch a zistiť minimálnu hmotnostnú koncentráciu pevnej zložky, pri ktorých kanálky ostanú stabilné viac ako 24 hodín.

V prípade úspechu sme chceli injekčne vstrekať do vytvorených a stabilných kanálikov vodné roztoky alebo hydrogély o nižšej koncentrácii ako pôvodný hydrogél. Z dôvodu lepšej pozorovateľnosti sme používali vodné roztoky a hydrogély zafarbené farbivom.

#### 2.1.1 Návrh a tvorba formy

Prvým krokom bolo navrhnutie formy, ktorá by spĺňala podmienky pre naše požiadavky a to najmä z hľadiska času výroby samotnej formy nakoľko na experimentálnu časť z dôvodu pandémie nebol poskytnutý plnohodnotný čas. Samozrejme aj s prihliadnutím na cenu materiálu a odolnosť voči vyšším teplotám, keďže hydrogél sme vlievali do formy horúci. Z čoho vyplývala prijateľná teplota deformácie až nad 70 °C. Materiál bol stanovený na polyetyléntereftalát-glykol určený na 3D tlač. Prvotný návrh teda bola prostá forma, ktorá po zaliatí vytvorila kváder hydrogélú o rozmeroch 3,5 cm na dĺžku, 2,5 cm na šírku a 1,6 cm na výšku. Túto formu nám vytvorili pán Mgr. Radek Příkryl, PhD. a pán Ing. Přemysl Menčík, PhD. z Ústavu chemie materiálov.

Forma disponovala pôvodne piatimi kanálkami, z toho tri kanálky vedené jedným smerom a dva vedené kolmo na ne. Kanálky boli vytvorené pomocou akupunktúrnych ihli o priemere 0,2 mm, ktoré boli vsunuté do formy ešte pred samotným vyliatím hydrogélú do formy. Akupunktúrne ihly po zatuhnutí hydrogélú vytvorili sieť kanálikov, ktoré boli navzájom prepojené.

#### 2.1.2 Výber materiálu

Ďalej nasledoval výber látky z ktorej hydrogél budeme tvoriť. Podľa štúdií jasným favoritom bola kyselina hyaluronová, no kvôli vysokým nákladom bola uprednostnená agaróza a želatína, ktoré mali poskytovať uspokojivé výsledky a ich dostupnosť bola bezproblémová. Pokus prebiehal s 3 typmi agarózy a 1 typom želatíny. Želatína však bola kvôli žltému sfarbeniu z pokusu vyradená, keďže prvotné použité farbivo bolo z komplexu vitamínov B, ktoré vodné roztoky farbili do svetlo-žltá.

Typmi agarózy boli typ E, D-5 a LM, ktoré sa navzájom líšili v rozlišnom spôsobe určeného použitia.

- Agaróza typu E bola určená na rutinné elektroforézne techniky a jej bod topenia bol stanovený na  $88 \pm 1,5$  °C a bod gelovania stanovený na  $36 \pm 1,5$  °C.
- Agaróza typu D-5 bola určená na techniky pulzného poľa a jej bod topenia bol stanovený rovnako na  $88 \pm 1,5$  °C a bod gelovania stanovený na  $36 \pm 1,5$  °C.

- Agaróza typu LM bola určená na tvorbu gélov, z ktorých je formovaná štruktúrna opora, zároveň táto agaróza je nízkoteplotná a jej bod topenia bol stanovený na <math>65,5\text{ }^\circ\text{C}</math> a bod gelovania stanovený na teplote 24 až 28 °C.

## 2.2 Postup prípravy hydrogélů

### 2.2.1 Chemikálie

- Agarose LM, Condalab, Laboratorios Canda S.A., Madrid, Spain, Č. šarže:M00044
- Agarose D-5, Condalab, Laboratorios Canda S.A., Madrid, Spain, Č. šarže:D00232
- Agarose E, Condalab, Laboratorios Canda S.A., Madrid, Spain, Č. šarže:D00186
- Želatína, PENTA, Ing. Petr Švec, Praha 6, Česká republika, Č. šarže:1511020610F
- Deionizovaná voda, prístroj PURELAB Classic, VUT FCH

### 2.2.2 Prístroje a pomôcky

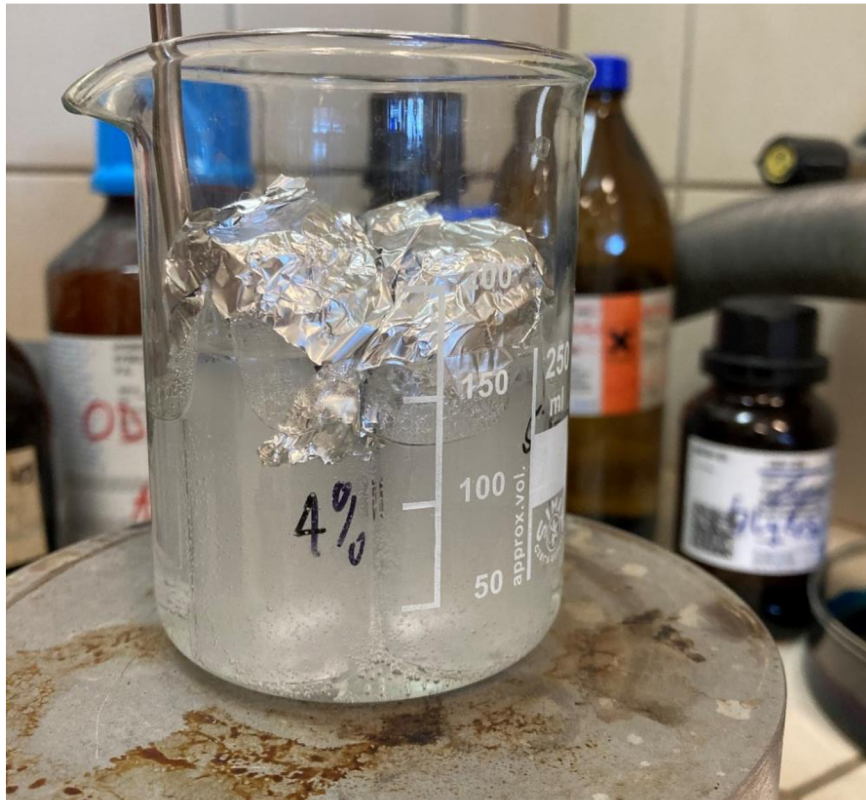
- Laboratórne sklo
- Sterilné injekčné ihly BD Microlance™ 3; 0,4 mm × 19 mm
- Sterilné injekčné ihly BD Microlance™ 3; 0,3 mm × 13 mm
- Sterilné injekčné ihly BD Microlance™ 3; 0,9 mm × 40 mm
- Sterilné injekčné ihly BD Microlance™ 3; 1,2 mm × 40 mm
- Sterilné akupunktúrne ihly, Huanqiu, 0,2 mm × 0,25 mm
- Sterilné akupunktúrne ihly, Huanqiu, 0,2 mm × 0,4 mm
- Sterilné injekčné striekačky BD Discardit™ II; 2 ml
- Sterilné injekčné striekačky BD Discardit™ II; 5 ml
- Analytické váhy, Denver Instrument
- Varná doska s magnetickým miešadlom, Heidolph MR Hei-Standard
- Chladnička, Liebherr Profi Line
- Teplomer

### 2.2.3 Príprava hydrogélů

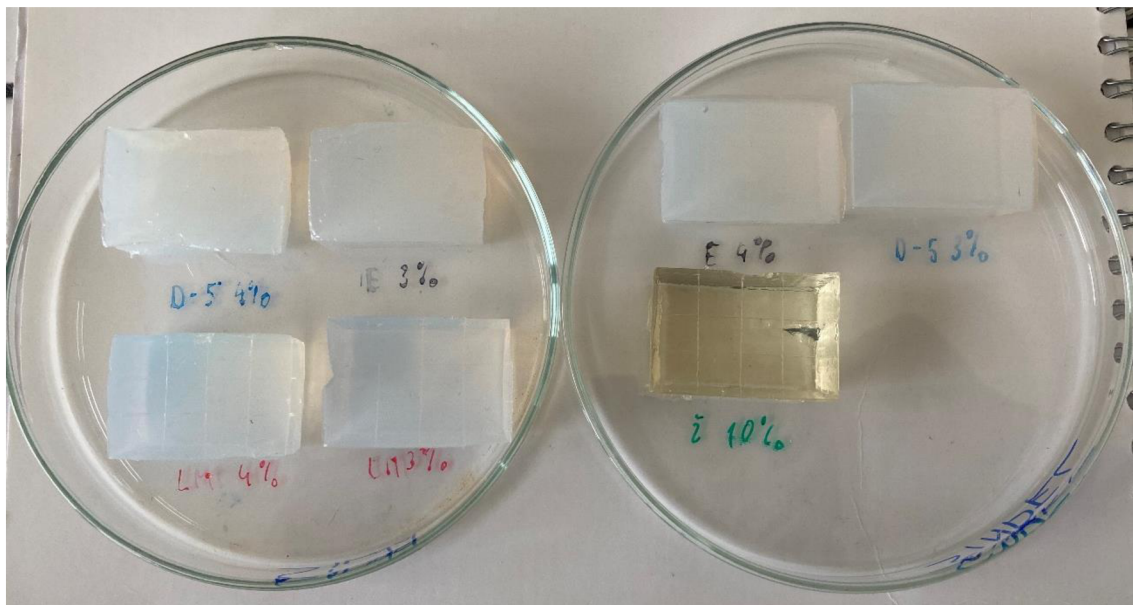
Bolo navážené potrebné množstvo agarózy alebo teda želatíny na analytických váhach. Toto množstvo bolo prevedené do vialky spolu s 20 ml destilovanej vody. Bolo pridané miešadielko a viečko vialky bolo prekryté alobalom.

Príprava hydrogélů prebiehala vo vialke ponorenej vo vodnom kúpeli zohriatom na teplotu 70 °C pri agaróze typu LM a 90 °C pri agarózach typu D-5 a E a pri želatíne, za stáleho miešania miešadielkom na 750 otáčok za minútu. Všetko pomocou varnej dosky s magnetickým miešadlom (*Obrázok 5*). Zmes bola miešaná až do absolútneho rozpustenia agarózy, teda vznikom číreho roztoku bez viditeľných častíc alebo zakalenia. Po úplnom rozpustení bol z vialky odňatý alobal. Hydrogél bol vliaty do formy v ktorej boli umiestnené ihly a vložený do chladničky na zatuhnutie do druhého dňa. Po zatuhnutí boli odobrané ihly a následne hydrogél vyklepnutý z formy (*Obrázok 6*). Nasledovalo pozorovanie po 4 hodinách a 24 hodinách, zamerané na stabilitu a prípadnú deformáciu až zánik vytvorených kanálikov (*Obrázok 7*), (*Obrázok 8*), ktorého výsledky sa nachádzajú v (*Tabuľka 1*). Kvôli nemožnosti skladovať

zásobné roztoky želatíny, agarózy typu D-5 a E sme sa rozhodli pokračovať naďalej už len s agarózou typu LM, ktorej zásobný roztok sme mohli skladovať bez nutnosti vždy čerstvej prípravy hydrogélu. Agaróza typu LM nám umožňuje, vďaka svojej schopnosti gelovania až pri nižších teplotách, skladovanie pri teplote nad hranicou gelovania v sušiarňach, a teda po príchode do laboratória umožňuje takmer okamžité zaliatie foriemi (Obrázok 9),(Obrázok 10).

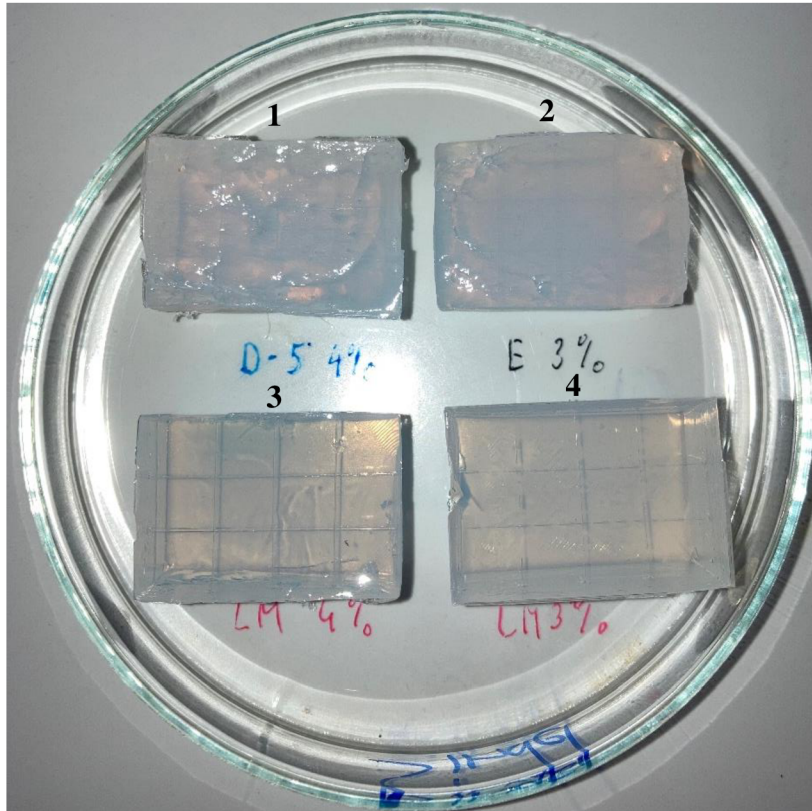


Obrázok 5: Rozpúšťanie hydrogélu na varnej doske s magnetickou miešačkou

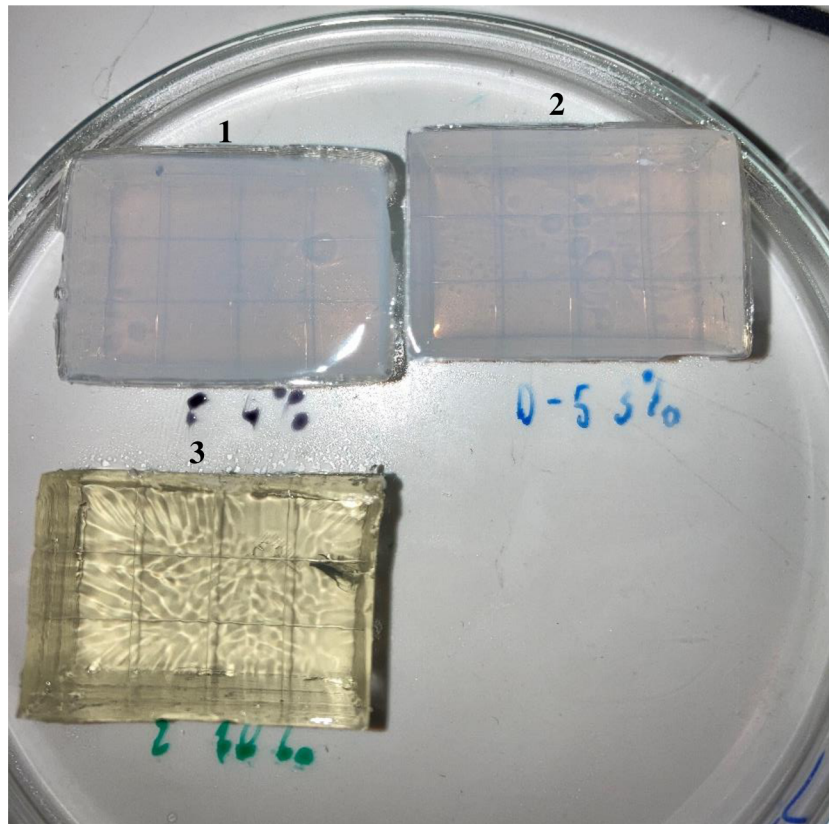


Obrázok 6: Pripravené hydrogély agarózy typu LM,D-5,E a želatíny o rôznych hmotnostných koncentráciách

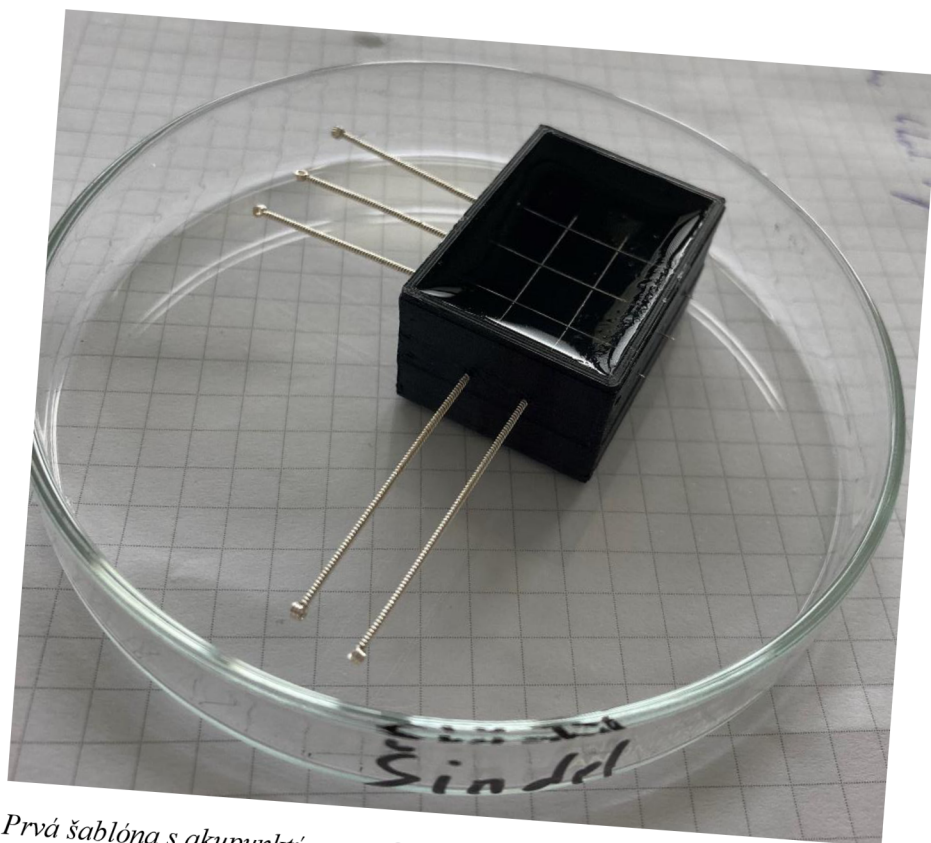




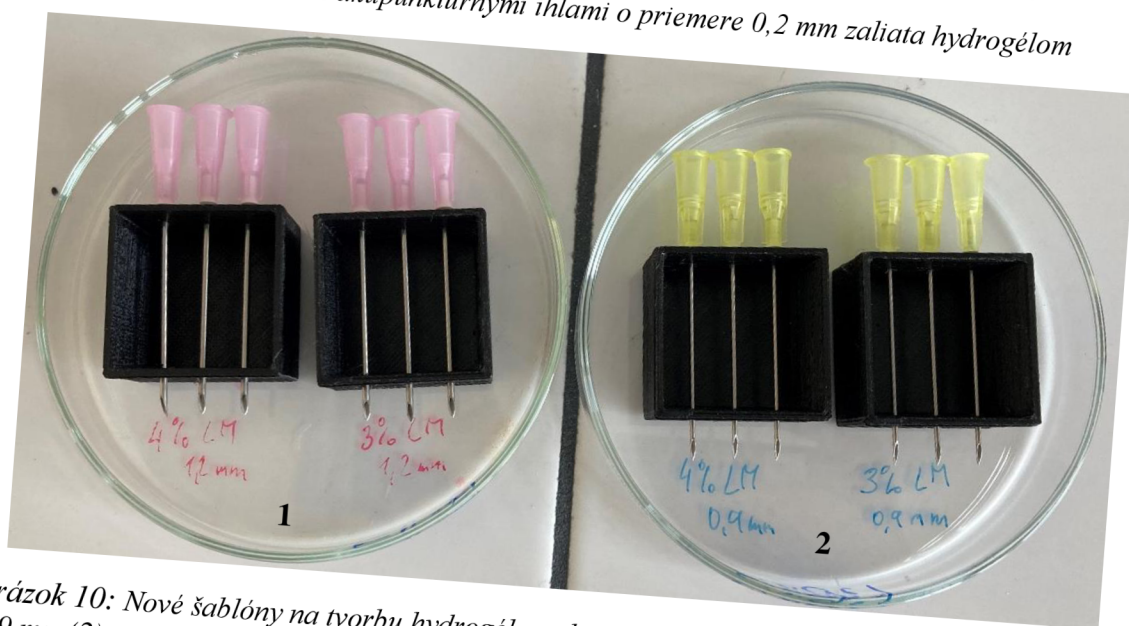
Obrázok 7: Detail na hydrogély z agarózy typu LM 4 hm. % (3) a 3 hm. % (4) ,D-5 4 hm. % (1), E 3 hm. % (2)



Obrázok 8: Detail na hydrogély z agarózy typu E 4 hm. % (1), D-5 3 hm. % (2) a želatínu 10 hm. % (3)



Obrázok 9: Prvá šablóna s akupunktúrnymi ihlami o priemere 0,2 mm zaliata hydrogélom



Obrázok 10: Nové šablóny na tvorbu hydrogélom s lineárnymi kanálkami o priemere 1,2 mm (1) a 0,9 mm (2)

Tabuľka 1: Výsledky prípravy hydrogéllov

Látka	Chm. cieľová [hm. %]	mnavážené [g]	V <sub>dest.vody</sub> [ml]	Chm. skutočná [hm. %]	Stabilita kanálikov po 4 hod.	Stabilita kanálikov po 24 hod.	Poznámka
<i>Agaróza LM</i>	1,00	0,2034	20	1,02	✗	✗	číry malé zakalenie
	2,00	0,4025		2,01	✗	✗	
	3,00	0,6021		3,01	✓	✓	
	4,00	0,8051		4,03	✓	✓	
<i>Agaróza D-5</i>	1,00	0,2013		1,01	✗	✗	zakalenie, kanáliky pozorovateľné len bleskom výrazné zakalenie, kanáliky len s bleskom
	2,00	0,4033		2,02	✗	✗	
	3,00	0,6019		3,01	✓	✓	
	4,00	0,8005		4,00	✓	✓	
<i>Agaróza E</i>	1,00	0,2015		1,01	✗	✗	mierne zakalenie mierne zakalenie
	2,00	0,4005		2,00	✗	✗	
	3,00	0,6035		3,02	✓	✓	
	4,00	0,8021		4,01	✓	✓	
<i>Želatína</i>	10,00	2,0061	10,03	✓	✓	číry, žlté sfarbenie	

#### 2.2.4 Postup pri injekčnom vstreknutí vodného roztoku alebo hydrogélu

V prípade akupunktúrnych ihliel o rozmere 0,2 mm v priemere (*Obrázok 11*) nebolo možné zaviesť ihlu o priemere 0,3 mm priamo do vytvoreného kanáliku, inak by samotná ihla kanálik zväčšila na svoj priemer. Preto sme vytvorili kanáliky väčšie, ale za použitia už zistených hmotnostných koncentrácií, ktoré nám zaručovali stabilný kanálik bez deformácie alebo zániku.

V prípade akupunktúrnych ihliel bol pripravený zásobný vodný roztok z farbiva Rhodaminu 6G o koncentrácií  $0,0152 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , ktorý bol kvapkaný injekčnou striekačkou na povrch kanáliku. Rovnakým spôsobom bol pripravený zásobný vodný roztok metylénovej modrej o koncentrácií  $0,0120 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , ktorý bol taktiež kvapkaný injekčnou striekačkou na povrch kanáliku.

Následne bol uskutočnený aj vpich vodných roztokov do kanáliku, ktorý ale kanálik zväčšil a tým ho poškodil, no farbivá boli viditeľné na mieste vpichu. V prípade vpichnutia gélov o nižšej hmotnostnej koncentrácií sa pri kanálikoch vytvorených akupunktúrnymi ihlami nepodarilo dopraviť pripravený hydrogél do gélu pôvodného vo forme. Hydrogél pozostávajúci z 1 hm. % agarózy zafarbený Rhodaminom 6G bol prakticky okamžite vytlačený na povrch.

##### 2.2.4.1 Tvorba a použitie formy určenej na lepšiu injekčnú aplikovateľnosť

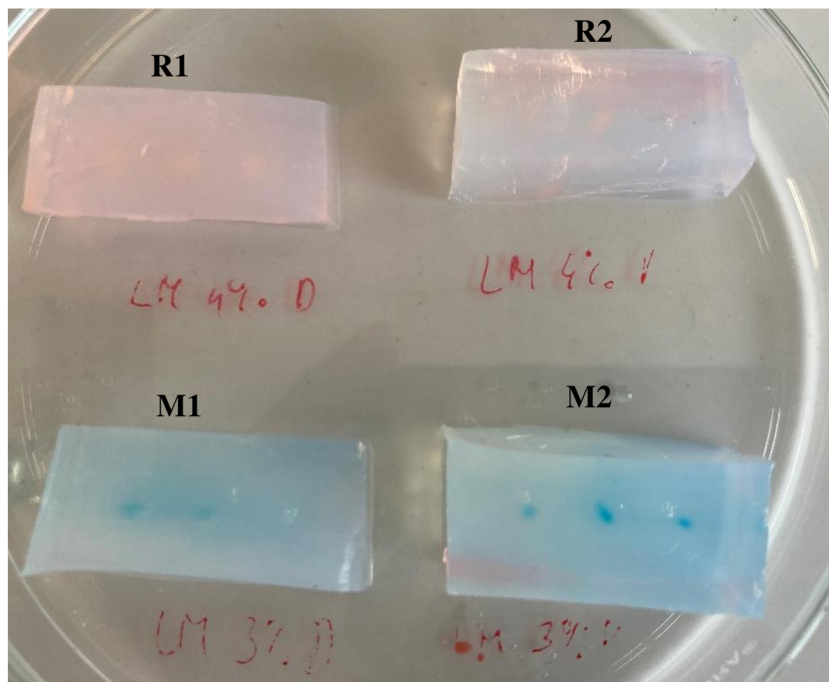
Na základe predchádzajúcich poznatkov boli navrhnuté nové formy (*Obrázok 10*) o rozmeroch 3 cm na dĺžku, 3 cm na šírku a 1,6 cm na výšku, ktoré tiež pripravili a vytlačili pán Mgr. Radek Příkryl, PhD. a pán Ing. Přemysl Menčík, PhD. z Ústavu chemie materiálov, vďaka ktorým sme mohli použiť ihly o rozmere 0,9 mm a 1,2 mm čo nám umožnilo vytvoriť širší kanálik do ktorého vpich ihlou o rozmere 0,3 mm prebiehal bez väčších problémov. Z čoho vyplynuli nasledovné výsledky, ktoré nájdeme v (*Tabuľka 2*).

Kanáliky o priemere 0,9 mm vytvorené z ihliel boli dostatočne stabilné. Zároveň bolo možné do nich zaviesť ihlu o priemere 0,3 mm a teda priamo do kanáliku aplikovať vodný roztok metylénovej modrej a vodný roztok Rhodaminu 6G. Gély o nižšej hmotnostnej koncentrácií bolo taktiež možné aplikovať do vytvorených kanálikov a to pri teplote aplikovaného gélu  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

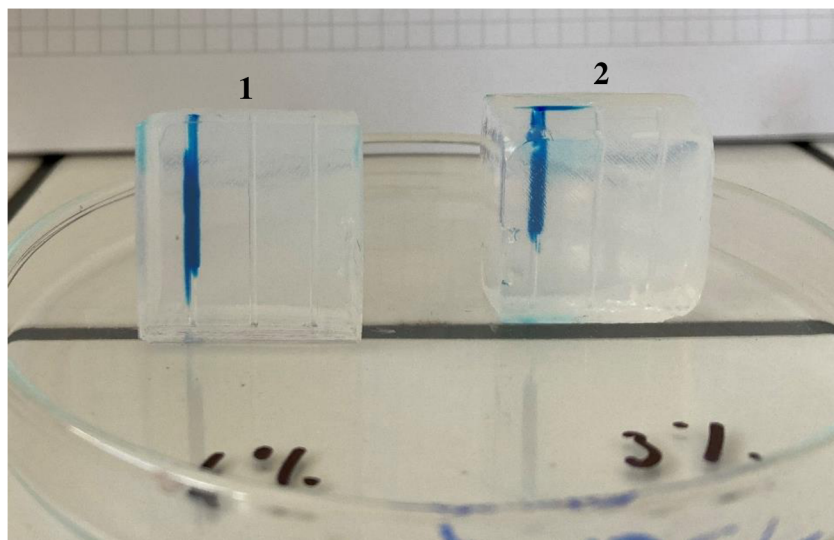
Pri kanálikoch o priemere 1,2 mm vytvorených z ihliel boli síce dostatočne stabilné, ale pri vpichu vodných roztokov a rovnako aj gélov o nižšej hmotnostnej koncentrácií tieto látky unikli kanálikom von na opačnej strane a neboli schopné vyplniť kanálik po celej dĺžke.

Pre lepšie pozorovateľný výsledok boli pripravené gély s kanálikmi o priemere 0,9 mm opätovne (*Obrázok 12*), ale s vpichnutím metylénovej modrej o zvýšenej koncentrácií na  $43,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pričom viditeľnosť kanálika a vpichu sa výrazne zlepšila, difúzia bola výraznejšia.

Po 24 hodinách metylénová modrá difundovala do hydrogélu a zároveň kanáliky ostali stabilné (*Obrázok 13*), čo znamená zdárny výsledok experimentálnej časti tejto práce.



Obrázok 11: Zafarbovanie 0,2 mm kanálikov vodnými roztokom Rhodaminu 6G o koncentrácii  $0,0152 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (R) a metylénovej modrej o koncentrácii  $0,012 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (M), vzorky kde boli kvapky farbiva aplikované pokvapkaním na kanáliky (1) a vzorky kde bolo farbivo injekčne vpichnuté (2)



Obrázok 12: Injekčný vpich do kanálikov o veľkosti 0,9 mm pomocou vyššej koncentrácie vodného roztoku metylénovej modrej do hydrogélu vytvoreného z agarózy typu LM 4 hm. % (1) a 3 hm. % (2)



*Obrázok 13: Farbivo difundovalo úspešne do celého hydrogélu typu LM 4 hm. % (vľavo) aj 3 hm. % (vpravo), zároveň kanáliky zostali stabilné aj po difúzii a 24 hodinách*

Tabuľka 2: Výsledky injekčných aplikácií do kanálikov o rôznej veľkosti

Látka	Veľkosť kanáliku [mm]	Chm. cieľová [hm. %]	Vpichovaná látka	Vyplnenie kanáliku	Poznámka
<i>Agaróza LM</i>	0,2	3	metylénová modrá (0,012 g·l <sup>-1</sup> )	×	Kvapkanie na povrch
		4	Rhodamin 6G (0,0152 g·l <sup>-1</sup> )	×	Priamy vpich, poškodenie kanáliku Kvapkanie na povrch
	0,9	3	metylénová modrá (43,6 g·l <sup>-1</sup> )	✓	Priamy vpich
			metylénová modrá (0,012 g·l <sup>-1</sup> ) 1 hm. % agaróza + Rhodamin 6G (0,01 g·l <sup>-1</sup> )	✓	Priamy vpich Priamy vpich, teplota 50 °C
		4	metylénová modrá (43,6 g·l <sup>-1</sup> )	✓	Priamy vpich
			metylénová modrá (0,012 g·l <sup>-1</sup> ) 1 hm. % agaróza + Rhodamin 6G (0,01 g·l <sup>-1</sup> )	✓	Priamy vpich Priamy vpich, teplota 50 °C
	1,2	3	metylénová modrá (0,012 g·l <sup>-1</sup> ) 1 hm. % agaróza + Rhodamin 6G (0,01 g·l <sup>-1</sup> )	×	Vytečenie z kanáliku Vytečenie z kanáliku
		4	metylénová modrá (0,012 g·l <sup>-1</sup> ) 1 hm. % agaróza + Rhodamin 6G (0,01 g·l <sup>-1</sup> )	×	Vytečenie z kanáliku Vytečenie z kanáliku

### 3. ZÁVER

Pri pohľade na komplexnosť nervového systému nejde uvažovať o veľkých krokoch v oblasti regenerácie alebo obnovy nervových tkanív. Táto práca je môj prvý krok v bádani a snahe porozumieť procesom, ktoré ovplyvňujú regeneráciu nervovej sústavy, a jej špecifickým potrebám, ktoré by mohli viesť k pokroku.

Cieľom práce bolo pochopiť základné potreby nervových tkanív pre ich úspešnú regeneráciu a liečbu. Zameranie teda smerovalo ku tvorbe hydrogélu so stabilnými kanálíkmi, do ktorých môžeme injekčne vstrekať látky, ktoré sú schopné z kanálikov difundovať a tým bližšie simulovať komplexné prostredie nevyhnutné ku samotnému rastu či regenerácii. Zároveň však vpichnúť aj gély, ktoré môžu tvoriť vhodnejšie podmienky pre určité typy buniek, ktoré nevyhnutne pre svoj rast a regeneráciu potrebujú prostredie odlišné od samotného hydrogélu. Nezabúdajúc na vpichnutie gélov s medikamentami, ktoré by podporili výživu tkanív a tým aj rast samotný. Tieto kanáliky s možnosťou injekčného vyplnenia boli vytvorené pomocou šablónovej konštrukcie, ktorá sa zalievala horúcim hydrogélom, ktorý po zatuhnutí bol vybraný z formy.

Experimentálnou časťou práce bolo zistené, že pri použití agarózy typu LM, ktorá tuhne až pri nižších teplotách, dokážeme vytvoriť stabilné kanáliky už od koncentrácie 3 hm. %. Pri použití kanálikov o priemere 0,9 mm sme mohli pohodlne injekčne vpichovať do takto upraveného hydrogélu farbivá, ktoré nám zvýraznili a potvrdili priechodnosť kanálikov. Taktiež preverili ich stabilitu v prípade vodných roztokov, ktoré ju mohli narušiť. Pri injekčnej aplikácii hydrogélom o nižšej hmotnostnej koncentrácii, v kanáliku hydrogély zostali bez vytečenia. To znamená, že dokážeme v prípade potreby vytvoriť hydrogély o rôznych koncentráciách s obsahom podporných látok, ktoré vieme umiestniť na špecifické miesto.

V budúcnosti by som rád pokračoval v tejto práci, pričom by sa do kanálikov vpichoval hydrogél z kyseliny hyaluronovej, ktorá vykazuje podľa vedeckých publikácií najlepšie výsledky v oblasti regenerácie nervových tkanív. Takisto by som rád zakomponoval do hydrogélu aj syntetické časti, ktoré by pomohli spevniť celú štruktúru. Čo by mohlo znamenať, že by stačila nižšia hmotnostná koncentrácia samotnej agarózy, v dôsledku spevnenia kanálikov syntetickými časťami, ktoré by dokázali udržať tvar kanálika stabilným a zároveň, nižšia hmotnostná koncentrácia by mohla vytvoriť lepšie podmienky pre špecifické bunky. Práca by sa mala zaoberať snahou vytvoriť komplexne vyhovujúce prostredie vytvorené za pomoci rôznych metód a komponent, sprevádzaných meraním elasticity, porozity a pevnosti.



## LITERATÚRA

- [1] MADHUSUDANAN, Pallavi, Gayathri RAJU a Sahadev SHANKARAPPA, 2020. Hydrogel systems and their role in neural tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface*. 17(162). ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2019.
- [2] MRAVEC, Boris, 2013. Nervový Systém I. 1. Bratislava: FABER 2013. ISBN 978-80-89607-10-5. Dostupné z: [https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sluzby/akademicka\\_kniznica/PDF/Elektronicke\\_knihy\\_LF\\_UK/Nervovy\\_system\\_I.pdf](https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sluzby/akademicka_kniznica/PDF/Elektronicke_knihy_LF_UK/Nervovy_system_I.pdf)
- [3] GHANE, N., M.-H. BEIGI, S. LABBAF, M.-H. NASR-ESFAHANI a A. KIANI, 2020. Design of hydrogel-based scaffolds for the treatment of spinal cord injuries. *Journal of Materials Chemistry B*. 8(47), 10712-10738. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/D0TB01842B
- [4] HULSEBOSCH, C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord i injury, *Adv. Physiol. Educ.*, 2002, 26(4), 238–255.
- [5] KLAPKA N. a H. W. MÜLLER, Collagen matrix in spinal cord injury, *J. Neurotrauma*, 2006, 23(3–4), 422–436.
- [6] SILVER, J. a J. H. MILLER, Regeneration beyond the glial scar, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2004, 5(2), 146.
- [7] GILBERT, R. J., *et al.*, CS-4, 6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension, *Mol. Cell. Neurosci.*, 2005, 29(4), 545–558
- [8] FAWCETT, J. W., Overcoming inhibition in the damaged spinal cord, *J. Neurotrauma*, 2006, 23(3–4), 371–383.
- [9] BRACKEN, M. B., Steroids for acute spinal cord injury, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2012, (1), Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD001046
- [10] RASPA, A., *et al.*, Recent therapeutic approaches for spinal cord injury, *Biotechnol. Bioeng.*, 2016, 113(2), 253–259.
- [11] VOLAREVIC, V., *et al.*, Stem cell-based therapy for spinal cord injury, *Cell Transplant.*, 2013, 22(8), 1309–1323.
- [12] TETZLAFF, W., *et al.*, A systematic review of cellular transplan-tation therapies for spinal cord injury, *J. Neurotrauma*, 2011, 28(8), 1611–1682.
- [13] XU, X.-M. a S. M. ONIFER, Transplantation-mediated strategies to promote axonal regeneration following spinal cord injury, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2009, 169(2), 171–182.
- [14] COUTTS, M. a H. S. KEIRSTEAD, Stem cells for the treatment of spinal cord injury, *Exp. Neurol.*, 2008, 209(2), 368–377.
- [15] AMEMORI, T., *et al.*, Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat, *Cytotherapy*, 2010, 12(2), 212–225.
- [16] TAGHIPOUR, Z., *et al.*, Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model, *Stem Cells Dev.*, 2012, 21(10), 1794–1802.

- [17] NIAPOUR, A., *et al.*, Cotransplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors and schwann cells in a rat spinal cord contusion injury model elicits a distinct neurogenesis and functional recovery, *Cell Transplant.*, 2012, 21(5), 827–843.
- [18] OLIVEIRA, J. M., *et al.*, Hydrogel-based scaffolds to support intrathecal stem cell transplantation as a gateway to the spinal cord: clinical needs, biomaterials, and imaging technologies, *npj Regener. Med.*, 2018, 3(1), 8.
- [19] STRALEY, K. S., C. W. P. FOO a S. C. HEILSHORN, Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries, *J. Neurotrauma*, 2010, 27(1), 1–19.
- [20] CHAN, G. a D. J. MOONEY, New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response, *Trends Biotechnol.*, 2008, 26(7), 382–392.
- [21] DUTTA, R. C. a A. K. DUTTA, Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications, *Biotechnol. Adv.*, 2009, 27(4), 334–339.
- [22] KUBÍNOVÁ, Š., Soft and rigid scaffolds for spinal cord injury regeneration, *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies*, Elsevier, 2020, pp. 105-127.
- [23] GEORGE, J., *et al.*, Neural tissue engineering with structured hydrogels in CNS models and therapies, *Biotechnol. Adv.*, 2019, 42, 107370.
- [24] GUAN, X., *et al.*, Development of hydrogels for regenerative engineering, *Biotechnol. J.*, 2017, 12(5), 1600394.
- [25] BRAMANTI, P. a E. MAZZON, The combined strategy of mesenchymal stem cells and tissue-engineered scaffolds for spinal cord injury regeneration, *Exp. Ther. Med.*, 2017, 14(4), 3355–3368.
- [26] KEMP, S. W., *et al.*, Collagen nerve conduits promote enhanced axonal regeneration, schwann cell association, and neovascularization compared to silicone conduits, *Tissue Eng., Part A*, 2009, 15(8), 1975–1988.
- [27] LEE, Y.-B., *et al.*, Bio-printing of collagen and VEGF- releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture, *Exp. Neurol.*, 2010, 223(2), 645–652.
- [28] PAWAR, K., *et al.*, Increasing capillary diameter and the incorporation of gelatin enhance axon outgrowth in alginate-based anisotropic hydrogels, *Acta Biomater.*, 2011, 7(7), 2826–2834.
- [29] HART, G. E., Preliminary study on the effects of Matrigel on Gallus gallus growth cones treated with amyloid beta, *Wheaton Journal of Neurobiology Research*, 2019, (12), 1–12.
- [30] JOUNG, D., *et al.*, 3D Printed Stem-Cell Derived Neural Progenitors Generate Spinal Cord Scaffolds, *Adv. Funct. Mater.*, 2018, 28(39), 1801850.
- [31] LAW, N., *et al.*, Characterisation of hyaluronic acid methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2018, 77, 389–399.
- [32] WANG, G., X. WANG a L. HUANG, Feasibility of chitosan- alginate (Chi-Alg) hydrogel used as scaffold for neural tissue engineering: a pilot study in vitro, *Biotechnol. Bio- technol. Equip.*, 2017, 31(4), 766–773.
- [33] GRIJALVO, S., *et al.*, Alginate Hydrogels as Scaffolds and Delivery Systems to Repair the Damaged Spinal Cord, *Biotechnol. J.*, 2019, 14(12), 1900275.

- [34] DE LA VEGA, L., *et al.*, 3D Bioprinting Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Tissues Using a Novel Lab-on-a-Printer Technology, *Appl. Sci.*, 2018, 8(12), 2414.
- [35] KATAOKA, K., *et al.*, Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, 54(3), 373–384.
- [36] CARON, I., *et al.*, A new three dimensional biomimetic hydrogel to deliver factors secreted by human mesenchymal stem cells in spinal cord injury, *Biomaterials*, 2016, 75, 135–147.
- [37] ROACH, Brendan L., Adam B. NOVER, Gerard A. ATESHIAN a Clark T. HUNG, 2016. Agarose Hydrogel Characterization for Regenerative Medicine Applications: Focus on Engineering Cartilage. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*. Hoboken, New Jersey, 2016-10-21, 258-273. ISBN 9781119126218. Dostupné z: doi:10.1002/9781119126218.ch16
- [38] STOKOLS, Shula, Jeff SAKAMOTO, Chris BRECKON, Todd HOLT, James WEISS a Mark H. TUSZYNSKI, 2006. Templated Agarose Scaffolds Support Linear Axonal Regeneration. *Tissue Engineering*. 12(10), 2777-2787. ISSN 1076-3279. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2006.12.2777
- [39] HORN, E. M., *et al.*, Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury, *J. Neurosurg.*, 2007, 6(2), 133–140.
- [40] LI, R., H. LIU, H. HUANG, W. BI, R. YAN, X. TAN, W. WEN, C. WANG, W. SONG, Y. ZHANG, Chitosan conduit combined with hyaluronic acid prevent sciatic nerve scar in a rat model of peripheral nerve crush injury, *Mol. Med. Rep.* 17 (3) (2018) 4360–4368. Dostupné z: [http://refhub.elsevier.com/S0141-8130\(20\)31521-X/rf1085](http://refhub.elsevier.com/S0141-8130(20)31521-X/rf1085)
- [41] BROGUIERE, Nicolas, Emma CAVALLI, Gian M. SALZMANN, Lee Ann APPLGATE a Marcy ZENOBI-WONG, 2016. *Factor XIII Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering*. 2(12), 2176-2184. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00378
- [42] FAN, R., *et al.*, Bio-printing cell-laden Matrigel–agarose constructs, *J. Biomater. Appl.*, 2016, 31(5), 684–692.
- [43] NISHIMURA, K., *et al.*, Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1986, 20(9), 1359–1372.
- [44] DE LA VEGA, L., *et al.*, 3D bioprinting models of neural tissues: the current state of the field and future directions, *Brain Res. Bull.*, 2019, 150, 240–249.
- [45] BAKSHI, A., *et al.*, Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury, *J. Neurosurg.*, 2004, 1(3), 322–329.
- [46] KONG, X.-B., *et al.*, Polyethylene glycol as a promising synthetic material for repair of spinal cord injury, *Neural Regener. Res.*, 2017, 12(6), 1003.
- [47] KOFFLER, J., *et al.*, Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair, *Nat. Med.*, 2019, 25(2), 263.

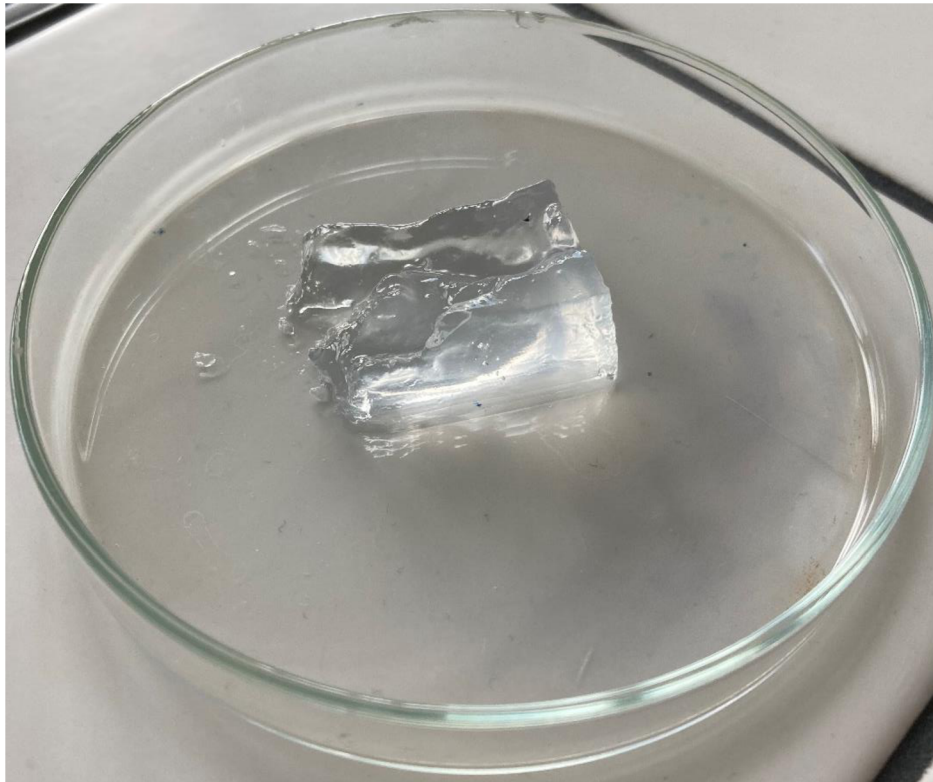
- [48] PAWAR, K., *et al.*, Intrinsic and extrinsic determinants of central nervous system axon outgrowth into alginate-based anisotropic hydrogels, *Acta Biomater.*, 2015, 27, 131–139.
- [49] OSIDAK, E. O., *et al.*, Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2019, 30(3), 31.
- [50] SUN, Y., *et al.*, 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2019, 107(9), 1898–1908.
- [51] DISCHER, D. E., P. JANMEY a Y.-L. WANG, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science*, 2005, 310(5751), 1139–1143.
- [52] HOSPODIUK, M., *et al.*, The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials, *Biotechnol. Adv.*, 2017, 35(2), 217–239.
- [53] NEITZKE, C. C., Development of Fibrinogen-based Bioinks for 3D Bioprinting Motor Neuron Progenitor Cells, 2017, Dostupné z: <https://conservancy.umn.edu/handle/11299/189536>, <http://hdl.handle.net/11299/189536>.
- [54] DUMONT, C. M., *et al.*, Aligned hydrogel tubes guide regeneration following spinal cord injury, *Acta Biomater.*, 2019, 86, 312–322.
- [55] PRANG, P., *et al.*, The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels, *Biomaterials*, 2006, 27(19), 3560–3569.
- [56] GUENTHER, M. I., *et al.*, Cell-seeded alginate hydrogel scaffolds promote directed linear axonal regeneration in the injured rat spinal cord, *Acta Biomater.*, 2015, 27, 140–150.
- [57] SAGLAM, A., *et al.*, Angioneural crosstalk in scaffolds with oriented microchannels for regenerative spinal cord injury repair, *J. Mol. Neurosci.*, 2013, 49(2), 334–346.
- [58] WU, X., *et al.*, Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method, *Acta Biomater.*, 2010, 6(3), 1167–1177.
- [59] RIBEIRO-SAMY, S., *et al.*, Development and Characterization of a PHB-HV-based 3 D Scaffold for a Tissue Engineering and Cell-therapy Combinatorial Approach for Spinal Cord Injury Regeneration, *Macromol. Biosci.*, 2013, 13(11), 1576–1592.
- [60] WEN, Y., *et al.*, Spinal cord injury repair by implantation of structured hyaluronic acid scaffold with PLGA microspheres in the rat, *Cell Tissue Res.*, 2016, 364(1), 17–28.
- [61] TAN, X., *et al.*, Functionalization of graphene oxide generates a unique interface for selective serum protein interactions, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, 5(4), 1370–1377.
- [62] PEDROSA, S. S., *et al.*, Scaffolds for peripheral nerve regeneration, the importance of in vitro and in vivo studies for the development of cell-based therapies and biomaterials: state of the art, in *Scaffolds in Tissue Engineering-Materials, Technologies and Clinical Applications*, IntechOpen, 2017, 9(12), 179.

- [63] DETLOFF, M. R., *et al.*, Acute and chronic tactile sensory testing after spinal cord injury in rats, *J. Visualized Exp.*, 2012, 62, e3247.
- [64] CARTER, M. a J. SHIEH, Chapter 2-animal behavior, *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, Academic Press, San Diego, 2nd edn, 2015, p. 39e71.
- [65] ALAM, M., *et al.*, Electrical neuromodulation of the cervical spinal cord facilitates forelimb skilled function recovery in spinal cord injured rats, *Exp. Neurol.*, 2017, 291, 141–150.
- [66] METZ, G. A. a I. Q. WHISHAW, The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application, *J. Visualized Exp.*, 2009, 28, e1204.
- [67] CHAO, O., *et al.*, The grid-walking test: assessment of sensorimotor deficits after moderate or severe dopamine depletion by 6-hydroxydopamine lesions in the dorsal striatum and medial forebrain bundle, *Neuroscience*, 2012, 202, 318–325.
- [68] SMITH, R. R., *et al.*, The Louisville Swim Scale: a novel assessment of hindlimb function following spinal cord injury in adult rats, *J. Neurotrauma*, 2006, 23(11), 1654–1670.
- [69] SHARP, K. G., *et al.*, Salmon fibrin treatment of spinal cord injury promotes functional recovery and density of serotonergic innervation, *Exp. Neurol.*, 2012, 235(1), 345–356.
- [70] GHANE, N., *et al.*, Regeneration of the Peripheral Nerve via Multifunctional Electrospun Scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2020, 1–16.
- [71] KHAING, Z. Z., *et al.*, Temporal and spatial evolution of raised intraspinal pressure after traumatic spinal cord injury, *J. Neurotrauma*, 2017, 34(3), 645–651.
- [72] GERSHON, Michael D. a Hiroki NAKAMURA, 2019. Functional Anatomy of the Enteric Nervous System. *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders*. Cham: Springer International Publishing, 2019-05-24, 31-76. ISBN 978-3-030-15646-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-15647-3\_3
- [73] FARONI, A., S.A. MOBASSERI, P.J. KINGHAM, A.J. REID, Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 82 (2015) 160–167. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2014.11.010.
- [74] SAMADIAN, Hadi, Hassan MALEKI, Anwar FATHOLLAHI, Majid SALEHI, Shayan GHOLIZADEH, Hossein DERAKHSHANKHAH, Zahra ALLAHYARI a Mehdi JAYMAND, 2020. Naturally occurring biological macromolecules-based hydrogels: Potential biomaterials for peripheral nerve regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 154, 795-817. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.155
- [75] EVANS, Peter J., James R. BAIN, Susan E. MACKINNON, Akira P. MAKINO a Daniel A. HUNTER, 1991. Selective reinnervation: a comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Research*. 559(2), 315-321. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/0006-8993(91)90018-Q
- [76] CHAKRAVARTHY, K., A. NAVA, P.J. CHRISTO, K. WILLIAMS, Review of recent advances in peripheral nerve stimulation (PNS), *Curr. Pain Headache Rep.* 20 (11) (2016) 60. Dostupné z: [http://refhub.elsevier.com/S0141-8130\(20\)31521-X/rf0030](http://refhub.elsevier.com/S0141-8130(20)31521-X/rf0030)

- [77] TRUMBLE, Thomas E. a Floyd G. SHON, 2000. THE PHYSIOLOGY OF NERVE TRANSPLANTATION. *Hand Clinics*. 16(1), 105-122. ISSN 07490712. Dostupné z: doi:10.1016/S0749-0712(21)00505-9
- [78] FARZAMFAR, Saeed, Mahdi NASERI-NOSAR, Ahmad VAEZ, et al., 2018. Neural tissue regeneration by a gabapentin-loaded cellulose acetate/gelatin wet-electrospun scaffold. *Cellulose*. 25(2), 1229-1238. ISSN 0969-0239. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-017-1632-z.
- [79] BELANGER, Kayla, Tony M. DINIS, Sami TAOURIRT, Guillaume VIDAL, David L. KAPLAN a Christopher EGLES, 2016. Recent Strategies in Tissue Engineering for Guided Peripheral Nerve Regeneration. *Macromolecular Bioscience*. 16(4), 472-481. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201500367.
- [80] WU, Y., Y. XIANG, J. FANG, X. LI, Z. LIN, G. DAI, J. YIN, P. WEI, D. ZHANG, The influence of the stiffness of GelMA substrate on the outgrowth of PC12 cells, *Biosci. Rep.* 39 (1) (2019), BSR20181748. Dostupné z: [http://refhub.elsevier.com/S0141-8130\(20\)31521-X/rf0090](http://refhub.elsevier.com/S0141-8130(20)31521-X/rf0090)
- [81] CUNHA, Carla, Silvia PANSERI a Stefania ANTONINI, 2011. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 7(1), 50-59. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2010.07.004
- [82] SHEN, Ying Jing, Maria Elena DEBELLARD, James L. SALZER, John RODER a Marie T. FILBIN, 1998. Myelin-Associated Glycoprotein in Myelin and Expressed by Schwann Cells Inhibits Axonal Regeneration and Branching. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 12(1-2), 79-91. ISSN 10447431. Dostupné z: doi:10.1006/mcne.1998.0700.
- [83] VILARIÑO-FELTRER, G., C. MARTÍNEZ-RAMOS, A. MONLEÓN-DE-LA-FUENTE, A. VALLÉS-LLUCH, D. MORATAL, J.A. BARCIA ALBACAR a M. MONLEÓN PRADAS, 2016. Schwann-cell cylinders grown inside hyaluronic-acid tubular scaffolds with gradient porosity. *Acta Biomaterialia*. 30, 199-211. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2015.10.040.
- [84] GORDON, Tessa, 2014. Neurotrophic factor expression in denervated motor and sensory Schwann cells: Relevance to specificity of peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology*. 254, 99-108. ISSN 00144886. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2014.01.012.
- [85] DIXON, A.R., S.H. JARIWALA, Z. BILIS, J.R. LOVERDE, P.F. PASQUINA, L.M. ALVAREZ, Bridging the gap in peripheral nerve repair with 3D printed and bioprinted conduits, *Biomaterials* (2018).
- [86] KOH, H., T. YONG, W. E. TEO, et al., 2010. In vivo study of novel nanofibrous intra-luminal guidance channels to promote nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering*. 7(4). ISSN 1741-2560. Dostupné z: doi:10.1088/1741-2560/7/4/046003.

## PRÍLOHA A – Fotografie experimentálnej časti

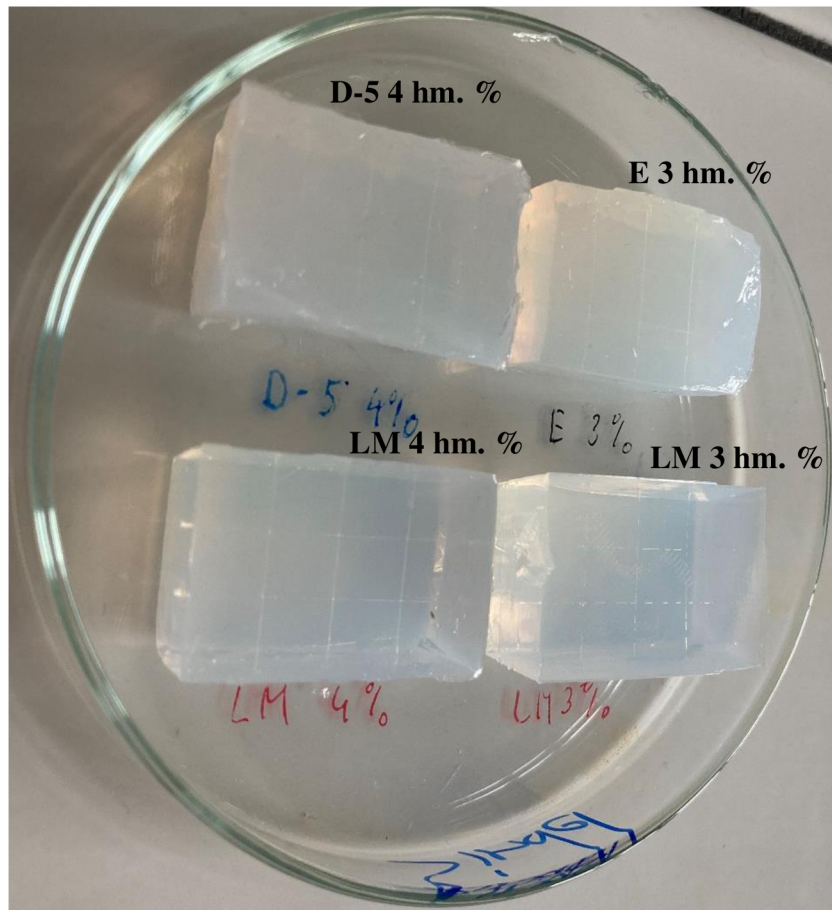
### A.1 Fotografie z prípravy hydrogélův



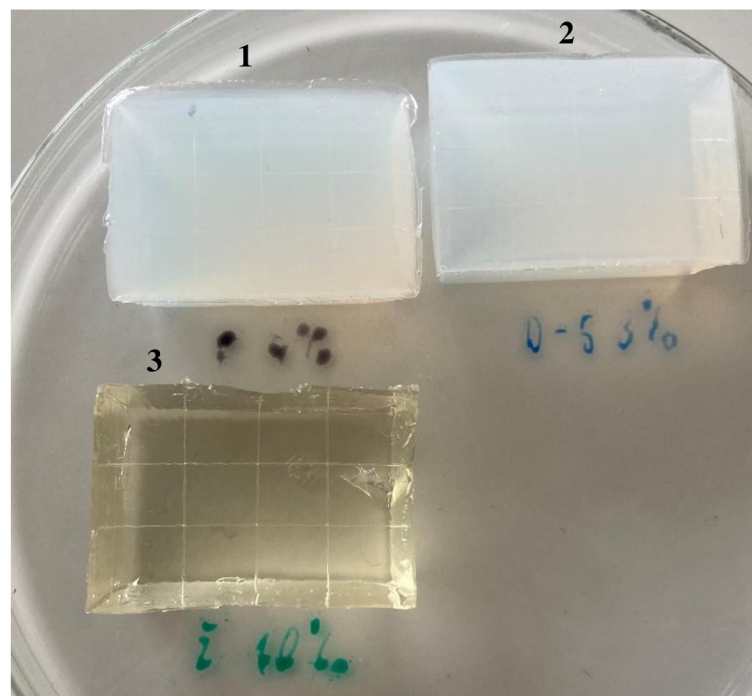
Obrázok 14: Deformácia hydrogélu z agarózy typu LM 1 hm. % prakticky okamžite po vybraní z formy



Obrázok 15: Zánik kanálikov o priemere 0,2 mm pri hydrogely z agarózy typu LM 2 hm. %



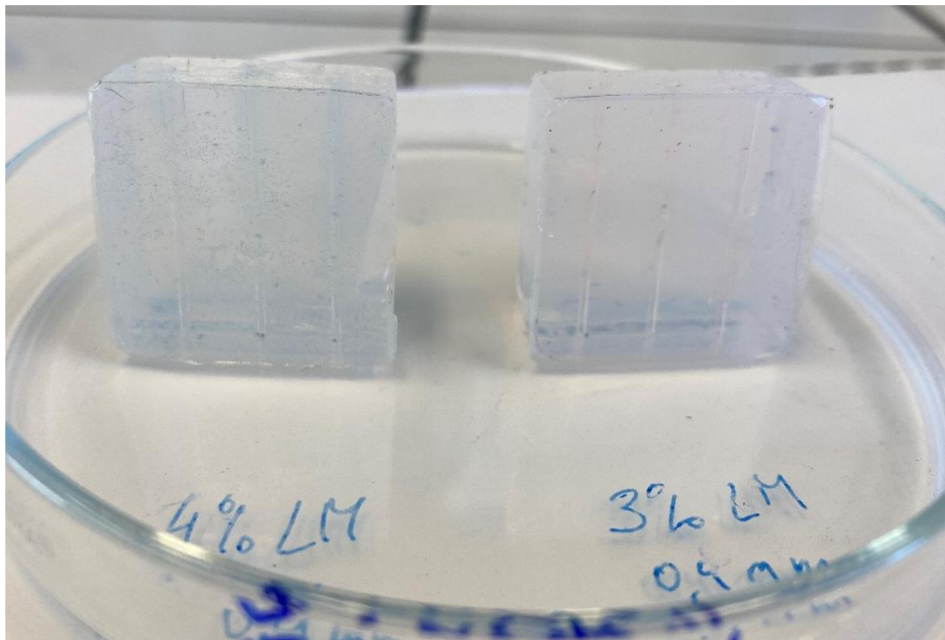
Obrázok 16: Viditeľnosť kanálikov o priemere 0,2 mm pri rôznych typoch agarózy, viditeľné zakalenie typu E a D-5 v porovnaní s LM vzorkami



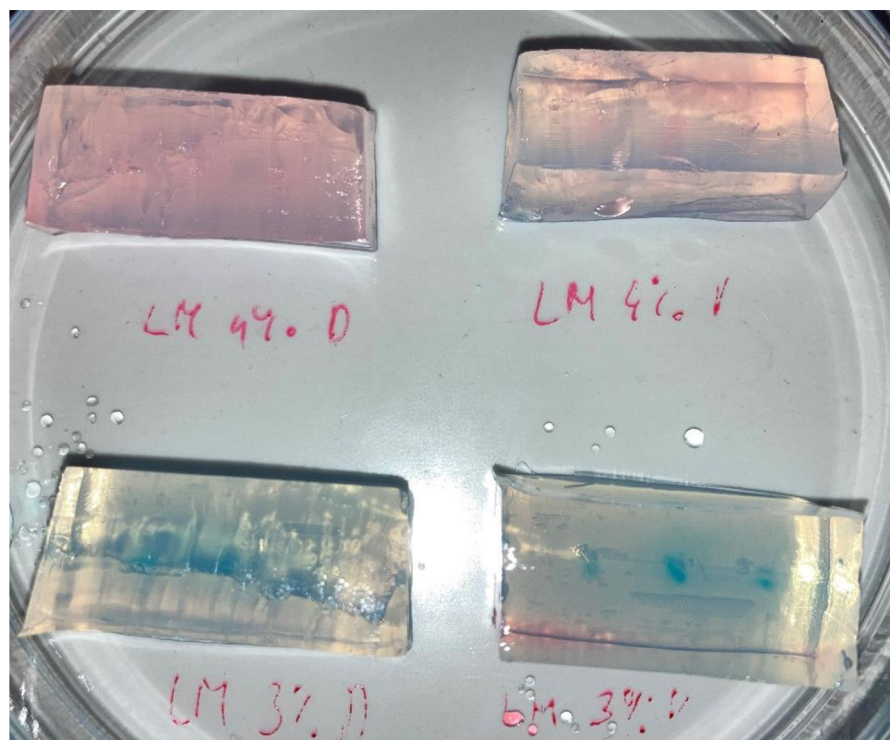
Obrázok 17: Viditeľné zakalenie pri hydrogél z agarózy typu E 4 hm. % (1), rovnako výrazné zakalenie aj pri D-5 3 hm. % (2), žlté sfarbenie želatíny 10 hm. % (3)



## A.2 Fotografie z injekčných vpichov do hydrogélů



Obrázok 18: Hydrogély z agarózy typu LM 4 hm. % s vstreknutým vodným roztokom metylénovej modrej o koncentrácii  $0,012 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (vľavo) a 3 hm. % s vstreknutým gélom agarózy typu LM 1 hm. % zafarbené Rhodaminom 6G o koncentrácii  $0,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (vpravo)



Obrázok 19: Pohľad zhora po odľótení s bleskom pre lepšiu pozorovateľnosť vyplnenia kanálikov o veľkosti  $0,2 \text{ mm}$ , hydrogély z agarózy typu LM 4 hm.% kvapkanie Rhodaminu 6G o koncentrácii  $0,0152 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  na povrch kanáliku (prvý rad, vľavo) a LM 4 hm.% priamy vpich (prvý rad, pravo). Hydrogély z agarózy typu LM 3 hm.% kvapkanie metylénovej modrej o koncentrácii  $0,012 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (druhý rad, vľavo) a 3 hm.% priamy vpich (druhý rad vpravo).