

ANNA LIS^{1, B–D}, DARIUSZ SZAREK^{2, 3, E, F}, JADWIGA ŁASKA^{1, E, F}

Perspektywy wykorzystania polimerowych rusztowań w rekonstrukcji oraz stymulacji regeneracji pourazowych uszkodzeń mózgu

The Outlook for the Use of Polymeric Scaffolds in the Reconstruction and the Regeneration Stimulation of Traumatic Brain Injuries

¹ Katedra Biomateriałów, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Kraków, Polska

² Katedra Neurochirurgii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław, Polska

³ Oddział Neurochirurgii, Szpital im. T. Marciniaka, Centrum Medycyny Ratunkowej we Wrocławiu, Wrocław, Polska

A – koncepcja i projekt badania; B – gromadzenie i/lub zestawianie danych; C – analiza i interpretacja danych;
D – napisanie artykułu; E – krytyczne zrecenzowanie artykułu; F – zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Streszczenie

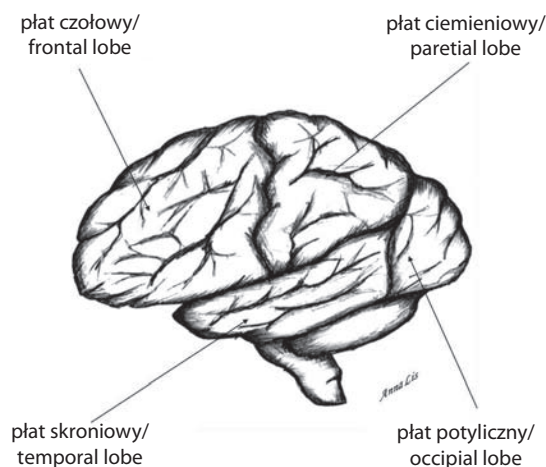
Schorzenia neurologiczne, takie jak udary krwotoczne lub niedokrwienne mózgu czy urazy powodują przeważnie przerwanie ciągłości struktur mózgu i w związku z tym utratę wielu funkcji neurologicznych. Aktualne kliniczne strategie leczenia skutków uszkodzeń tkanki nerwowej mózgu są ograniczone. Można wprawdzie ograniczyć proces degeneracji lub łagodzić objawy, ale nie zmienia to faktu, że wiele poszkodowanych osób nigdy nie powraca do stanu sprzed zachorowania oraz wymaga długotrwałej rehabilitacji. Strategie regeneracyjne oparte na terapiach komórkowych oraz rusztowaniach polimerowych są nadzieją dla wielu pacjentów. Rusztowania polimerowe mogą wzmocnić prawdopodobieństwo sukcesu terapii komórkowych poprzez stworzenie sztucznej macierzy pozakomórkowej, która ułatwi przeżycie, proliferację, różnicowanie oraz spójność przeszczepionych i endogennych komórek. Niniejszy artykuł prezentuje wyselekcjonowane formy polimerowych rusztowań, które zostały zbadane pod kątem możliwości wspomagania procesów naprawczych w tkance nerwowej mózgu oraz ich potencjalne zastosowania kliniczne w leczeniu ubytków pourazowych oraz chorób neurodegeneracyjnych (**Polim. Med. 2013, 43, 4, 302–312**).

Słowa kluczowe: polimery, ośrodkowy układ nerwowy, mózg, tkanka nerwowa, regeneracja.

Abstract

Neurological disorders and injuries such as ischemic or haemorrhagic strokes or traumatic brain injuries result in the damage of cerebral parenchyma structures and in consequence, the loss of neurological functions. The current clinical strategies for the treatment of the brain nervous tissue disruptions are limited. The aforementioned methods can reduce the tissue degeneration or mitigate the subsequent symptoms, but do not alter the fact that many of the affected people are incapable of returning to the condition before the accident and they need long-lasting rehabilitation. Regenerative strategies based on the cell therapies and the use of polymeric scaffolds seem to be very promising for many patients. Polymer scaffolds may provide an opportunity to enhance the probability of cell therapy success by creating an artificial extracellular matrix which further facilitates cell survival, proliferation, differentiation, and promotes integrity of transplanted as well as endogenous cells. This paper presents selected forms of the polymeric scaffolds, which have been tested for the restoration processes within brain tissue and their potential clinical applications of scaffolds in both the treatment of posttraumatic neuronal loss and the neurodegenerative disorders (**Polim. Med. 2013, 43, 4, 302–312**).

Key words: polymers, central nervous system, brain, nerve tissue, regeneration.



Ryc. 1. Ogólna budowa mózgu – widok boczny

Fig. 1. General structure of brain – lateral aspect

Dojrzała tkanka nerwowa ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.), w szczególności mózgu (ryc. 1) ze względu na wielopłaszczyznową strukturę anatomiczną oraz histologiczną ma ograniczone zdolności regeneracji [1–5]. Uszkodzenia tkanki nerwowej mózgu mogą ponadto mieć różny charakter i nasilenie w zależności od rodzaju mechanizmu go powodującego. Większość symptomów pojawia się krótko po urazie, incydentalnie po pewnym czasie. Uszkodzenia mózgu powstałe na skutek chorób neurologicznych lub urazów mogą spowodować wiele różnorodnych objawów. Do typowych objawów uszkodzenia mózgu wlicza się zaburzenia poznawcze (zaburzenia pamięci i procesów myślowych), ruchowe, zaburzenia psychiczne (nieodpowiednie reakcje emocjonalne, np. agresja, depresja, urojenia itp.) [1]. Bezpośrednio po urazie/zachorowaniu mogą się pojawić bóle i zawroty głowy, drgawki, wymioty, objawy ogniskowe, takie jak: uszkodzenia słuchu i widzenia, niedowłady; zaburzenia psychiczne oraz kognitywne, których utrwalenie jest bardzo prawdopodobne. Może wystąpić chwilowa lub długookresowa utrata przytomności, a nawet stan śpiączki w przypadku poważniejszych urazów.

Szczególnie niebezpieczne są urazy mózgu związane z uszkodzeniem czaszki. Urazy te wiążą się zwykle z dużą śmiertelnością (wliczając zgony na miejscu wypadku oraz podczas leczenia szpitalnego). Liczna grupa poszkodowanych z poważnymi uszkodzeniami mózgu, którym towarzyszą złamania kości czaszki wymaga natychmiastowej interwencji chirurgicznej w celu usunięcia fragmentów czaszki oraz powstałych krwiaków. Obecnie stosowane strategie leczenia klinicznego, należące do działań o charakterze bardziej kompensacyjnym niż regeneracyjnym, koncentrują się na minimalizowaniu dalszej degeneracji tkanki nerwowej i/lub łagodzeniu skutków uszkodzenia poprzez podawanie środków farmakologicznych, a także utrzymanie funkcji organi-

zmu dzięki odpowiedniej rehabilitacji. Wyżej wymienione zabiegi mają jednak ograniczoną efektywność.

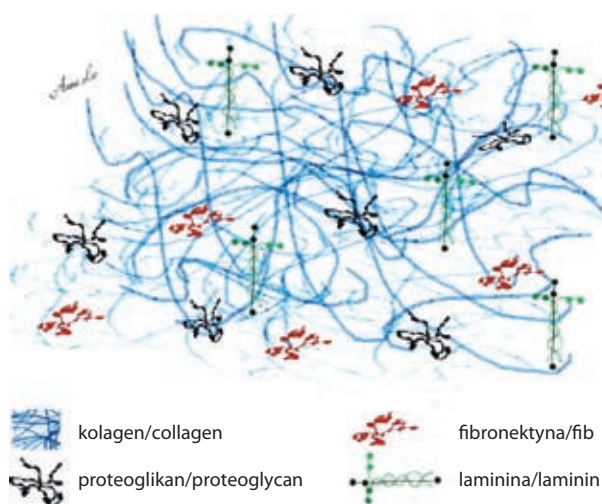
W przypadku tkanki nerwowej mózgu wyzwaniem dla inżynierii tkankowej jest rekonstrukcja oraz regeneracja tkanki w obszarach uszkodzonych w celu przywrócenia funkcjonalności mózgu zarówno na poziomie komórkowym, tkankowym, jak i całego organu. Terapie wykorzystujące linie komórkowe [1] wraz z rusztowaniami polimerowymi [2–4] mogą stworzyć możliwości zastąpienia utraconych komórek nerwowych oraz macierzy pozakomórkowej ECM (*extracellular matrix*) [3, 5]. Zaprojektowanie oraz stworzenie sztucznej macierzy pozakomórkowej wpierającej żywotność komórek nerwowych endogennych lub komórek przeszczepionych, jak również zapewnienie ich integracji jest niezbędne zarówno z punktu widzenia regeneracji komórek, jak i zapobiegania dalszym uszkodzeniom w sąsiadujących tkankach, np. poprzez odpowiednią formę architektoniczną rusztowania [1–4]. W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań eksperymentalnych poświęconych możliwości wykorzystania konstrukcji polimerowych oraz ich optymalizacji biofizycznej i biochemicznej do zastosowań w rekonstrukcji/regeneracji tkanki mózgu. Wiele z przebadanych rusztowań polimerowych stanowiły włókna wytworzone metodą elektroprzędzenia [2–4, 6–13] oraz wstrzykiwane rusztowania w postaci hydrożeli lub gotowych form do implantacji w miejscu uszkodzenia tkanki mózgu [14–40].

Rusztowania polimerowe do regeneracji tkanki mózgu

Wiele konstrukcji polimerowych zostało przebadanych jako rusztowania dla inżynierii tkanki nerwowej mózgu m.in. formy nanowłókniste otrzymane metodą elektroprzędzenia [2–4, 6–13], hydrożele na bazie polimerów naturalnych oraz syntetycznych [14–40], a także samoorganizujące się peptydy (nieuwzględnione w niniejszym artykule). Różne materiały polimerowe, np. o zróżnicowanej morfologii, w odmienny sposób wspierały procesy naprawy tkanki nerwowej mózgu. Najważniejsze jest jednak, by architektura rusztowania zapewniła właściwy ukierunkowany wzrost wypustek nerwowych [6]. Projektując rusztowania należy dobrać parametry mechaniczne właściwe dla biomechaniki niezwykle wrażliwej tkanki mózgu [6]. Istotne jest, by powierzchnia rusztowania wzmacniała adhezję komórek endogennych lub wszczepionych. W przypadku materiałów polimerowych bioinertnych powierzchnie rusztowania można zmodyfikować poprzez jej biofunkcjonalizację lub nanoszenie powłok w celu poprawy rozpoznania przez komórki, jednocześnie eliminując konieczność zmiany materiału konstrukcyjnego lub architektury rusztowania i tym samym omijając problem ponownego doboru odpowiednich właściwości mechanicznych.

Polimerowe rusztowania nanowłókniste

Zainteresowanie rusztowaniami nanowłóknistymi [3, 4, 6] dla zastosowań w inżynierii tkankowej dotyczy strukturalno-wymiarowego podobieństwa do hierarchicznego układu włókien kolagenu, lamininy i innych elementów występujących w naturalnej macierzy pozakomórkowej [3, 4] (ryc. 2). Nadmienić jednak należy, że substancja międzykomórkowa (śródmiażdżowa) (*neural extracellular [interstitial] matrix*) ośrodkowego układu nerwowego ma odróżnialną strukturę oraz skład chemiczny zdominowany przez kwas hialuronowy oraz proteoglikany (ryc. 3) [5].



Ryc. 2. Uproszczony schemat macierzy pozakomórkowej

Fig. 2. Simple scheme of extracellular matrix

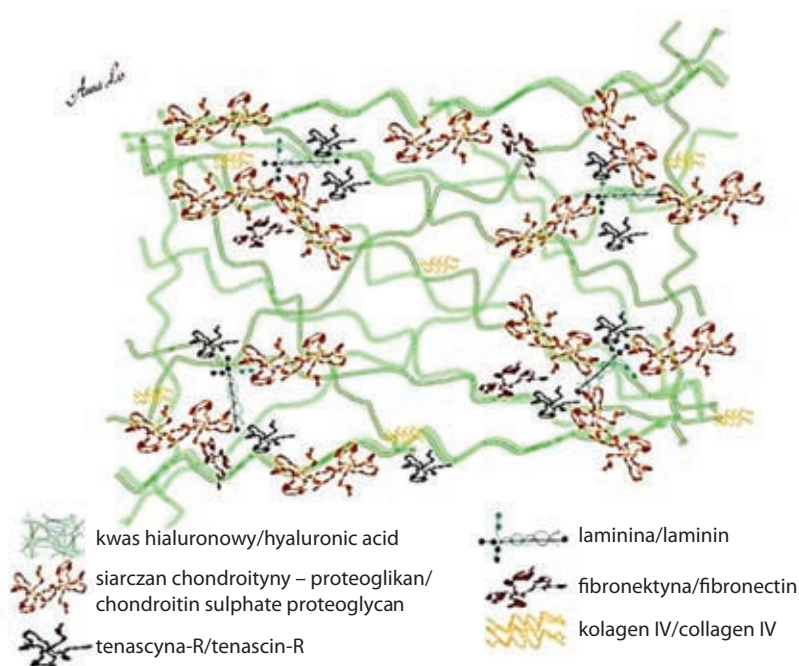
Nanowłókniste rusztowania polimerowe można otrzymywać różnymi metodami, najczęściej techniką elektroprzędzenia z roztworu lub z formy stopionej polimeru. Technika produkcji włókienek oraz wskaźniki elektroprzędzenia bezpośrednio wpływają na formę otrzymanego rusztowania (np. kształt, średnicę włókienek) [2–4] i tym samym pośrednio na odpowiedź komórkową oraz procesy naprawcze tkanki nerwowej w mózgu.

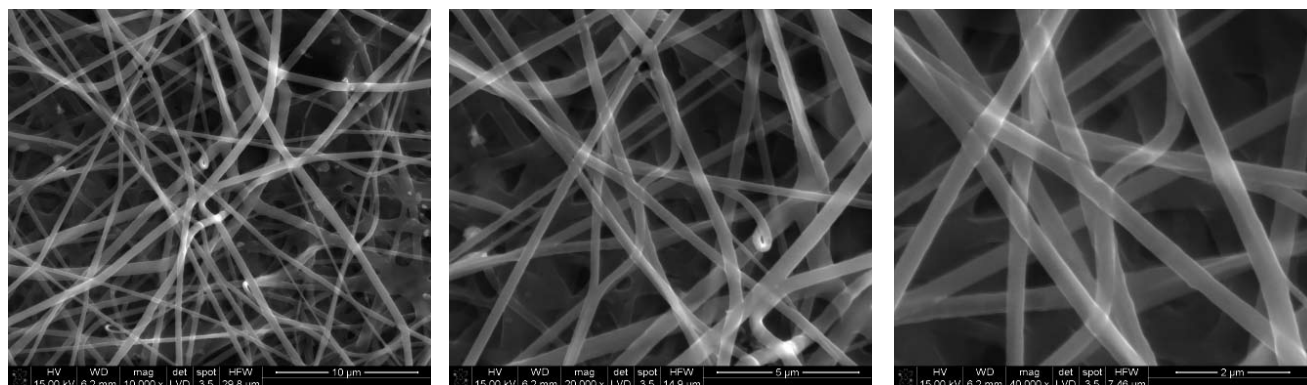
Średnice włókien zwykle są zróżnicowane i wahają się od kilku nanometrów do jednego mikrometra (ryc. 4). Nanowłókna również naśladują inne atrybuty naturalnej ECM, m.in. dużą powierzchnię właściwą, znaczną porowatość i właściwości mechaniczne [3, 4]. Znaczna porowatość oraz cechy włóknistej struktury ułatwiają adhezję, migrację komórek, przerost aksonów i orientację wzrastających włókien nerwowych, a także dyfuzję substancji odżywczych oraz produktów ubocznych procesów metabolicznych. Taka porowata włóknista struktura zwiększa ponadto integrację rusztowania z tkanką biorcy. Warto również zaznaczyć, że ukierunkowanie włókien w rusztowaniu przyczynia się do zorientowanego wzrostu aksonów wzdłuż włókien, co jest istotne dla regeneracji tkanki nerwowej OUN [4, 6–8].

Różnorodne polimery syntetyczne zostały wykorzystane do elektroprzędzenia nanowłókienek do zastosowań z inżynierii tkanki nerwowej, m.in. poli(ϵ -kapolakton) (PCL) [2, 7–11], polilaktyd (PLLA) [6], poli(laktyd-ko-glikolid) (PLGA) [12, 13]. PCL, PLA oraz PLGA są powszechnie stosowanymi polimerami biomedycznymi, ulegającymi biodegradacji w wyniku hydrolizy wiązań estrowych. Obecność wiązań estrowych w łańcuchu polimerowym zapewnia możliwość biofunkcjonalizacji powierzchni oraz łączenia z różnymi

Ryc. 3. Uproszczony schemat macierzy pozakomórkowej ośrodkowego układu nerwowego

Fig. 3. Simple scheme of extracellular matrix of the central nervous system





Ryc. 4. Przykładowe poliuretanowo-polilaktydowe nanowłókniste rusztowania: a) SEM, pow. 10 000 ×, b) SEM, pow. 20 000 ×, c) SEM, pow. 40 000 ×

Fig. 4. Examples of polyurethane-polylactide nanofibrous matrices. a) SEM, Magn. 10 000 ×, b) SEM, Magn. 20 000 ×, c) SEM, Magn. 40 000 ×

biomolekułami [7–13]. Polipirole (PPy), które są polimerami przewodzącymi mogą być wykorzystywane ze względu na właściwości elektryczne do stymulowania transdukcji sygnałów w komórkach nerwowych [13].

Ocena wzrostu aksonów oraz ich orientacja w rusztowaniu dla inżynierii tkanki nerwowej oraz charakterystyka reakcji zapalnej mają kluczowe znaczenie w określaniu potencjału takiego rusztowania jako pomostu ułatwiającego naprawę i stymulację regeneracji tkanki nerwowej. Nisbet [2] w swoich badaniach nad rozciągliwością mikrogleju oraz astrocytów wykorzystał nanowłókniste rusztowania z poli(ε-kaprolaktonu), które wszczepione dorosłym szczurom do jąder podstawy mózgu (skorupa) wywoływały stany zapalne i procesy naprawcze. Największy stan zapalny dla mikrogleju został zauważony po 4 dniach, dla astrocytów natomiast po około 7 dniach po implantacji. Następnie stan zapalny powoli ustępował utrzymując się przez czas dwóch miesięcy na poziomie homeostazy. Podczas reakcji zapalnej obserwowano wpływ stopnia ukierunkowania włókienek w rusztowaniu na odpowiedź immunologiczną oraz na wzrost wypustek nerwowych [2]. Duża porowatość rusztowania w przypadku włókienek polimerowych zorientowanych wielokierunkowo wspomagała infiltrację rusztowania przez wypustki. Wypustki nerwowe przerastały rusztowania PCL, co dowodzi, że istnieje możliwość dobrej integracji na granicy rusztowanie–tkanka nerwowa. W przypadku rusztowań, w których włókna zostały tylko częściowo zorientowane jednokierunkowo procesy wzrostu neuronalnego były jednak mniej efektywne. Niespodziewanie ukierunkowanie włókienek, zamiast korzystnie wpływać na infiltrację rusztowania, powodowało prostopadły do włókienek wzrost tkanki na granicy rusztowanie–tkanka. Nie było ponadto żadnych oznak, że mikroglej został w jakiś sposób odseparowany. Badania Nisbeta wykazały jednak, że rusztowania nanowłókniste z PCL są zgodne z tkanką mózgu, a wstępne spostrzeżenia dotyczące oddziaływania z mikroglejem i astrocytami oraz

integracji tkanki z rusztowaniem muszą być jeszcze dokładniej przeanalizowane [2].

Wielokierunkowo oraz jednokierunkowo zorientowane włókna w rusztowaniach wykonanych z poli(ε-kaprolaktonu) zostały wykorzystane również do opracowania systemu symulującego migrację komórek nowotworowych (guza mózgu) w warunkach *in vitro* [9]. Strategie terapeutyczne ukierunkowujące migrację glejaka od centrum guza są utrudnione ze względu na problem z odtworzeniem ich migracji w mięszu mózgu w warunkach *in vivo*. W tym celu wykorzystano inżynierię tkankową do opracowania odpowiedniego modelu fizjologicznego migracji komórek glejaka. Badania Johnsona [9] wykazały, że komórki nowotworowe wykazują znaczące różnice pod względem zdolności migracyjnych w zależności od ułożenia włókienek w rusztowaniu wykonanego z PCL (nanowłókna zorientowane przypadkowo oraz jednokierunkowo). Na rusztowaniach z włókienkami ukierunkowanymi komórki migrowały znacznie szybciej (z prędkością $4,2 \pm 0,39 \mu\text{m/h}$) w porównaniu do rusztowań, gdzie włókna były zorientowane losowo (prędkość $0,8 \pm 0,08 \mu\text{m/h}$). Komórki na krętych włókienkach rozprzestrzeniały się wzdłuż wielu osi, które uniemożliwiły szybki ruch po powierzchni siatki polimerowej. Natomiast komórki na ukierunkowanych włókienkach migrując wzdłuż włókien, formowały wrzecionowatą morfologię, tym samym wspomagając lepszą infiltrację rusztowania. Badania mikroskopowe wykazały, że ruch poszczególnych komórek nowotworowych jest złożony oraz uzależniony od cyklu komórkowego i miejscowej topografii rusztowania [9]. Badania *in vitro* oraz wcześniejsze obserwacje glejaka rozprzestrzeniającego się w istocie szarej i białej mózgu ściśle określają ewentualne modele do przyszłych badań *in vivo*. Dotychczasowe niespójne wyniki badań stwarzają jednak podwójny problem podczas projektowania rusztowania w kontekście ułatwienia szybszej migracji komórkom oraz penetracji rusztowania przez wypustki [9]. Różnice w odpowiedzi

komórkowej odzwierciedlają odmienność w ułożeniu włókienek i tym samym uwydatniają niezdolność precyzyjnej oceny jak rusztowania wpłyną na zachowanie się np. komórek endogennych po implantacji.

Analizie laboratoryjnej zostały także poddane elektroaktywne rusztowania, które potencjalnie mogą ułatwić komunikację między komórkami nerwowymi w mózgu. Przewodzące włókniste maty o zorientowanych i przypadkowo ułożonych włókienkach z poli(laktydu-ko-glikolidu) (PLGA) i polipirolu (PPy) wykazały biokompatybilność. Rusztowania PLGA-PPy wspierały wzrost oraz różnicowanie szczurzych komórek chromochłonnych 12 (PC₁₂) i embrionalnych komórek nerwowych hipokampa w porównaniu do włóknistych rusztowań z PLGA w warunkach *in vitro* [13]. Elektrostymulacja komórek nerwowych na przewodzących rusztowaniach włóknistych poprawiała zdolność wzrostu wypustek nerwowych w porównaniu do komórek, które nie były poddane elektrostymulacji. Komórki nerwowe poddane dodatkowej elektrostymulacji w kontakcie z przewodzącymi matami wytwarzały wypustki zarówno na wielo-, jak i jednokierunkowo zorientowanych włókienkach. Warto jednak zaznaczyć, że długości wypustek nerwowych były różne w zależności od orientacji włókienek. Na zorientowanych włókienkach wrastające wypustki były dłuższe niż w przypadku losowo ułożonych. Taka samą tendencję obserwowano podczas badań interakcji komórek niepoddanych elektrostymulacji zasiedlonych na rusztowaniach z PLGA-PPy. Długość wrastających wypustek ogólnie była jednak większa dla komórek poddanych elektrostymulacji. W zależności od doboru wartości potencjału elektrycznego obserwowano ponadto różnice dotyczące wzrostu wypustek nerwowych. Niższy potencjał elektryczny wspierał znacznie lepiej wzrost wypustek nerwowych (większa liczba zaobserwowanych wypustek) w porównaniu do zastosowanego wyższego potencjału elektrycznego [13]. Wyniki te potwierdzają zasadność zastosowania podobnych materiałów przewodzących w stymulacji regeneracji uszkodzonej tkanki mózgu.

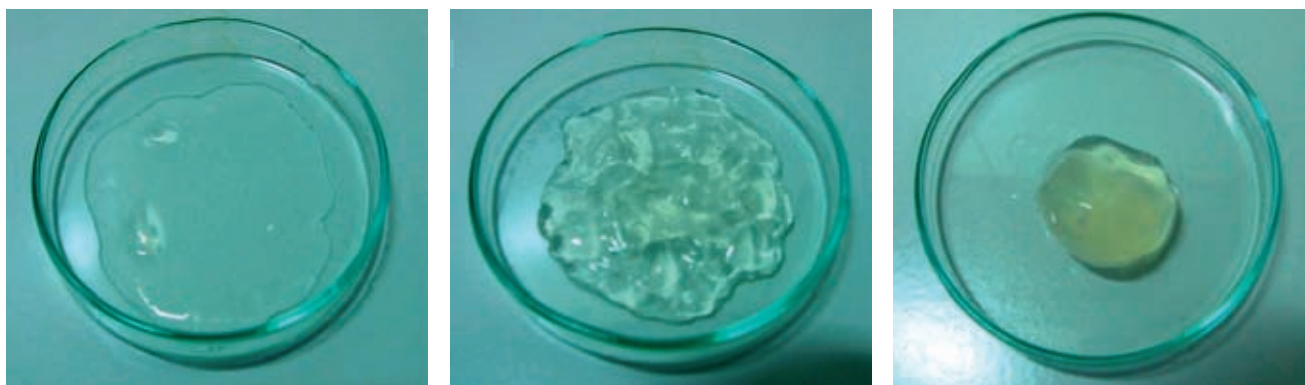
Skuteczne leczenie zapaleń mózgu wymaga usunięcia stanów ropnych, a następnie długoterminowego leczenia antybiotykami. Tseng et al. [12] opracowali biodegradowalny system dostarczania wankomycyny w postaci nanowłóknistych mat z poli(laktydu-ko-glikolidu). Dostępność farmaceutyczną wankomycyny scharakteryzowano metodą chromatograficzną zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* po implantacji rusztowań w szczurzej tkance mózgu. Wyniki badań sugerują, że biodegradowalne nanowłókniste rusztowania polimerowe pozwalają na dostarczanie antybiotyku w odpowiednio dużych stężeniach przez ponad 8 tygodni. Rusztowania polimerowe umożliwiły ponadto uzupełnienie przestrzeni powstałych po usunięciu stanów ropnych oraz zwiększyły skuteczność dostarczania leków. Badania histologiczne wykazały również brak reakcji zapalnych tkanek w mózgu [12]. Biodegradowalne

rusztowania nanowłókniste, dostarczające długoterminowo antybiotyki lub inne farmaceutyki do zainfekowanych lub uszkodzonych tkanek, mogą zwiększyć skuteczność leczenia stanów zapalnych lub innych zmian chorobowych powstałych w mózgu.

Rusztowania hydrożelowe

Zastosowanie polimerów w postaci rusztowań hydrożelowych, jako nośników komórek nerwowych lub innych czynników neurotroficznych jest coraz bardziej powszechne w obszarach badań nad regeneracją tkanki nerwowej o.u.n. uszkodzonej podczas udarów lub urazowych uszkodzeń mózgu oraz innych chorób neurodegeneracyjnych, a także uszkodzeń rdzenia kręgowego [14]. Hydrożele należą do grupy materiałów polimerowych o dużej hydrofilowości (zawierają w swej strukturze nawet ponad 90% wody) [14]. Zintegrowana sieć hydrożeli powstaje zwykle na skutek sieciowania fizycznego lub chemicznego. Hydrożele izotropowe tworzą sieć o małej organizacji struktury, w której puste przestrzenie są ograniczone, co uniemożliwia swobodną migrację komórek. Hydrożele mogą jednak charakteryzować się strukturą mikro- lub makroporowatą. Pory o większych rozmiarach pozwalają na naciek komórek i penetrację aksonów [14]. Struktura siatki hydrożelowej o znacznej porowatości oraz duża zawartość wody umożliwiają szybką dyfuzję substancji odżywczych oraz metabolitów do i z komórek [14, 15]. Zaletą hydrożeli jest to, że mogą być giętkie i elastyczne jak tkanki miękkie, elastyczne jak skóra lub naczynia krwionośne, sztywne jak tkanka chrzęstna czy kostna [14]. Właściwości mechaniczne hydrożeli można więc dostosować tak, by były zbliżone do właściwości mechanicznych niezwykle delikatnej tkanki nerwowej mózgu. Może to ułatwić transfer bodźców mechanicznych do komórek z rodzimej tkanki nerwowej oraz zapewnić integrację materiału zaimplantowanego z otaczającą tkanką. Ogólnie właściwości mechaniczne hydrożeli mogą być optymalizowane poprzez różne procesy sieciowania, od których jest uzależniona gęstość mikrostruktury żelu [16] (ryc. 5). Chociaż wymienione cechy czynią hydrożele kompatybilnymi z otaczającą tkanką, to ich słaba wytrzymałość mechaniczna oraz bardzo duża podatność na degradację *in vivo* ogranicza możliwości ich stosowania.

Niektóre hydrożele charakteryzują się specyficznymi właściwościami w tzw. temperaturach krytycznych roztworu, niższej (LSCT) oraz wyższej (UCST) (*lower critical solution temperature* i *upper critical solution temperature*), w których zachodzi żelowanie lub separacja faz [14, 17, 18]. Cechy te mogą być wykorzystane podczas implantacji, np. ułatwią wprowadzenie hydrożelu podczas implantacji w formie iniekcyjnej w miejsce uszkodzenia, zapewniając mało inwazyjną technikę wszczepiania. Uproszczą ponadto dostosowanie



Ryc. 5. Przykładowe hydrożele z alginianów sodowo-wapniowych o różnych właściwościach mechanicznych i reologicznych

Fig. 5. Examples of sodium-calcium alginate hydrogels with different mechanical and rheological properties

kształtu żelu do nieregularnych oraz małych ubytków powstałych w tkance, zwłaszcza pofałdowanych strukturach mózgu. Takie hydrożele są także dobrym rozwiązaniem przy zastępowaniu komórek uszkodzonych poprzez transplantację komórkowe. Komórki są dostarczane w sposób kontrolowany z rusztowań tworzących dla nich mikrośrodowisko do przetrwania, proliferacji i różnicowania, a ich zdolność do zmiany charakteru wraz ze zmianą temperatury ułatwia ich hermetyzację oraz dystrybucję [14, 19–21]. Hydrożele polimerowe mogą być nie tylko narzędziem do transplantacji komórek, ale również systemami dostarczającymi leki, struktury inżynierii genetycznej, takie jak wirusy czy DNA, czynniki wzrostu oraz innych medykamentów dostarczanych do zdefiniowanych obszarów w mózgu wraz z określonym czasem ich uwalniania [14].

Hydrożele pochodzenia naturalnego

Polimery pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego mają zwiększoną biokompatybilność ze względu na podobieństwo do biopolimerów znajdujących się w organizmie żywym [20, 21]. Najbardziej znanymi polimerami pochodzenia biologicznego tworzącymi hydrożele są białka, polisacharydy i glikozaminoglikany, które występują np. jako składniki budujące ECM, m.in. kolagen oraz kwas hialuronowy (HA) występujący w o.u.n. [14, 20, 21]. Naturalne polimery mogą charakteryzować się bioaktywnością, która eliminuje problem z funkcjonalizacją rusztowania za pomocą biomolekuł w celu osiągnięcia lepszych interakcji na granicy komórka/tkanka-rusztowanie. Ze względu na ich naturalne pochodzenie polimery te są również potencjalnie podatne na biodegradację enzymatyczną, w wyniku której uzyskuje się korzystne warunki do infiltracji komórkami i penetrację hydrożelu przez wypustki nerwowe [22], jednocześnie jednak stwarza to groźbę szybkiego pogorszenia wytrzymałości mechanicznej.

Najbardziej powszechnymi polimerami naturalnymi w inżynierii tkanki nerwowej są kolagen [23–26] oraz kwas hialuronowy [14, 20, 21, 27, 28]. Kolagen naturalnie niewystępujący w mózgu wspiera adhezję komórek oraz ich proliferację. Rusztowania z kolagenu sprzężone z czynnikami wzrostu komórek nerwowych są w stanie znacznie poprawić żywotność komórek w warunkach *in vitro* [23, 24]. Komórki nerwowe zasiedlone w kolagenowym hydrożelu zachowywały ponadto zdolność do spontanicznego generowania potencjałów postsynaptycznych poprzez tworzenie funkcjonalnych synaps [26]. Te właściwości elektrofizjologiczne, szczególnie pod względem liczby oraz częstotliwości wytwarzania synaps, trzeba jednak jeszcze potwierdzić w badaniach *in vivo*. Interesujące jest to, że implantacja rusztowania kolagenowego zasiedlonego ludzkimi komórkami mezyneuralnymi (hMSCs) w uszkodzonej korze mózgu szczurów wspomagała naciek komórek, poprawiała ich orientację w przestrzeni oraz zmniejszała wielkość obszaru uszkodzenia, a także przyczyniała się do przywrócenia funkcji sensomotorycznych [25]. Badania pokazują potencjał rusztowań kolagenowych jako systemów dostarczających komórki w leczeniu skutków urazowych uszkodzeń mózgu, gdzie w wyniku implantacji konstrukcji polimerowych będzie można zapewnić wsparcie komórkom, poprawić ich żywotność oraz ruchliwość między granicą strefy nieuszkodzonej tkanki i tej wymagającej regeneracji.

Kwas hialuronowy (HA) jest wysokocząsteczkowym glikozaminoglikanem, który stanowi podstawowy składnik strukturalny ECM współtworzącej makroskopową architekturę tkanki mózgu wspierającą żywotność, proliferację, migrację oraz różnicowanie się komórek nerwowych [14, 20, 21]. Hydrożele z kwasu hialuronowego zmodyfikowane chemicznie oraz fizycznie polilizyną, homopeptydami i anty-NgR (inhibitorem kompleksów z grupy NOGO związanych z białkami mielinowymi MAP (*myelin associated proteins*)) inhibitującymi zdolność regeneracji tkanki nerwowej mózgu oraz rdzenia kręgowego wykorzystano w ba-

daniach nad neuroregeneracją tkanki o.u.n. [21, 27]. Taka modyfikacja hydrożeli polepszyła adhezję nerwowych komórek progenitorowych [21] i wspomagała uzyskanie komórek nerwowo-podobnych, będących podstawowymi komórkami hipokampa [27]. Wyniki niezależnie przeprowadzonych badań nie są jednak jednoznaczne i wskazują, że polilizyna zarówno promuje [21], jak i inhibituje różnicowanie się komórek w zależności od jej stężenia. Hydrożelowe rusztowania z kwasu hialuronowego modyfikowane polilizyną i anty-NgR synergistycznie polepszały jednak proliferację komórek nerwowych około sześciokrotnie w porównaniu z hydrożelami z kompozycji HA-polilizyna oraz HA-anty-NgR [27]. Implantacja rusztowań na bazie HA z sekwencją peptydów RGD w miejscu ubytku kory mózgu szczurów wspierała infiltrację komórkową, angiogenezę, rozrost wypustek oraz minimalizowała rozrost blizny gлевой [28]. Duża biogodność z tkanką nerwową mózgu stwierdzono także dla hydrożeli na bazie HA modyfikowanych żelatyną [29].

Inne polimery naturalne lub naturalnie modyfikowane stosowane w inżynierii tkanki nerwowej o.u.n. to alginiany, agarozę, chitozan, fibrynę, metylocelulozę. Metyloceluloza [17] wykazała bioaktywność w wyniku modyfikacji lamininą i wspomogła adhezję komórek pochodzących z kory mózgu [30]. W blendzie hydrożelowej z kompozycji agarozę-chitozan zaobserwowano większą zdolność do adhezji komórek nerwowych w porównaniu do samej agarozy. Zwiększenie adhezji komórek nerwowych na powierzchni blendy było rezultatem specyficznych interakcji elektrostatycznych między chitozaniem a błonami komórkowymi. Stężenie chitozanu w blendzie polisacharydowej miało znaczący wpływ na morfologię komórek nerwowych oraz wzrost wypustek nerwowych. Zakres optymalnego stężenia chitozanu w blendzie agarozę-chitozan określono na $0,66 \div 1,5\%$ wag. Hydrożele z większym stężeniem agarozy promowały liniową ekspresję wypustek, podczas gdy przy wyższych stężeniach chitozanu wzrost wypustek był bardziej nieliniowy (liczne rozgałęzienia) [31]. Hydrożele agarozę-chitozan tworzą jednorodną mieszaninę w warunkach kwaśnych ze względu na efekty elektrostatyczne protonowanych grup aminowych w chitozanie i tym samym mieszaniny podlegały procesowi separacji faz w środowisku płynów fizjologicznych ze względu na deprotonowanie grup aminowych. Warto również zauważyć, że dodatek chitozanu do agarozy nie wpłynął znacząco na wcześniej określone właściwości reologiczne hydrożelu agarozowego [31].

Biodegradowalne porowate rusztowania metakrylamidowo-chitozanowe (MC), wytworzone w procesie sieciowania przez polimeryzację rodnikową bezwodnego metakrylamidu z grupami aminowymi chitozanu, pozwoliły na penetrację konstrukcji przez wypustki szczurzych komórek nerwowych zwojów szyjnych górnych. Dodatkowa modyfikacja kowalencyjna rusztowań z wykorzystaniem peptydów adhezyjnych znacząco

poprawiła adhezję i wzrost wypustek komórek nerwowych. Wzrastające wypustki w rusztowaniu MC miały ponadto zbliżone długości [32]. W innym badaniu analizowano żywotność komórek w termicznie żelowanym hydrożelu z chitozanu zoptymalizowanym poprzez immobilizację poli-D-lizyny. Rusztowanie wspierało wzrost neuronów charakteryzujących się większymi perykarionami, rozbudowę pojedynczych wypustek oraz zwiększały żywotność komórek [18].

Hydrożele biologiczne są powszechnie stosowane do hodowli komórek. Matrigel® jest komercyjnym wielobiałkowym hydrożelem pochodzącym z przesączu z hodowli komórkowych Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) zawierający lamininę, fibronektynę i proteoglikany. Badania *in vitro*, podczas których zasiedlono na wielobiałkowym hydrożelu komórki nerwowe wraz z astrocytami przyniosły pozytywne rezultaty. Obserwowano duży wzrost aksonów oraz ekspresję specyficznych białek dla cytoskieletu komórek nerwowych oraz wytworzenie sieci funkcjonalnych synaps [33]. Matrigel® dodany do kolagenowego rusztowania wspierał także proliferację komórek Schwanna oraz formowanie wypustek [34]. Gdy wielobiałkowy żel był testowany z użyciem progenitorowych komórek nerwowych człowieka, zdolność tych komórek do różnicowania jednak wyraźnie się zmniejszała [35]. Matrigel® odzwierciedlającego pochodzenia stwarza jednak zagrożenie przenoszenia chorób i inicjowania niepożądanych reakcji immunologicznych, jest to ponadto linia komórek nowotworowych.

Hydrożele syntetyczne

Syntetyczne polimery/hydrożele w porównaniu do naturalnych, takich jak agarozę czy Matrigel® są lepiej zdefiniowane chemicznie, są jednak biologicznie inerte i dlatego mają słabe interakcje z komórkami. W porównaniu z hydrożelami z materiałów naturalnych, syntetyczne hydrożele mogą być stosunkowo łatwo modyfikowane w celu uzyskania rusztowania o odpowiednich właściwościach chemicznych, fizycznych oraz mechanicznych, a także architektoniczne zbliżone do naturalnej ECM [14]. Syntetyczne hydrożele są chemicznie stabilne oraz mogą być w szerokim zakresie przetwarzane i modyfikowane pod kątem aplikacji w inżynierii tkanki nerwowej. Odpowiednia modyfikacja hydrożeli syntetycznych może pozwolić na uniknięcie problemów związanych z polimerami naturalnymi. Liczne metody syntezy i przetworstwa polimerów syntetycznych stwarzają większe możliwości sterowania właściwościami mechanicznymi. Dodatkowo, gdy brak biofunkcjonalności w hydrożelach syntetycznych, można je uzupełnić komórkami, sfunkcjonalizować biomolekułami, czynnikami neurotroficznymi oraz farmaceutykami. Można je także łączyć z polimerami naturalnymi w postaci blend lub kompozytów [5].

Do naprawy uszkodzeń tkanki mózgu zostało wykorzystanych kilka syntetycznych hydrożeli m.in. na

bazie poly(N-2-(hydroksypropylo) metakrylamidu) (pHPMA), poly(hydroksyetyloetakrylanu) [15] (pHEMA) [36]. Hydrożele powstałe z pHPMA oraz pHEMA nieżelowanie *in situ*, lecz *ex situ* muszą być wszczepiane w gotowej formie, która wymaga operacji inwazyjnej [14]. Niektóre z hydrożeli akrylanowych mogą natomiast ulegać żelowaniu w organizmie (metoda *in situ*). Nieresorbowalne biokompatybilne makroporowate hydrożele otrzymane przez sieciowanie pHEMA oraz pHPMA zaimplantowano w korze szczurów w celu oceny zdolności komórek do infiltracji żelu. Hydrożele były zdolne do pomostowania uszkodzonej tkanki mózgu jako sztuczna substancja pozakomórkowa. Zmniejszały ponadto formowanie się blizny glejowej oraz wspomagały regenerację tkanki nerwowej. Komórki gwiaździste (astrocyty) infiltrowały hydrożele, które wspierały proces angiogenezy i wzrost aksonów [15, 36]. W hydrożelach pHPMA zauważono ponadto wzrost elementów strukturalnych tkanki łącznej [36]. Natomiast po implantacji pHEMA w uszkodzonym mózgu tylko astrocyty penetrowały strukturę hydrożelu [36], wykazując zarazem różnorodność właściwości neuroregeneracyjnych tych polimerów syntetycznych. Przebadane przewodzące hydrożele wykonane z mieszaniny pHEMA z polianiliną i polipirolem również zostały przebadane [37]. Takie przewodzące hydrożele potencjalnie mogą być stosowane w inżynierii tkanki nerwowej, gdzie jest wymagana elektrostymulacja komórek nerwowych.

Innym przykładem mieszaniny polimerowej wykorzystywanej w inżynierii tkanki nerwowej jest glikol polietylenowy (PEG) oraz jego kompozycje z polilizyną i heparyną [38–40]. PEG jest polimerem o małej toksyczności często stosowanym jako polimer biomedyczny w regeneracji tkanki nerwowej w mózgu [38] i ochrony komórek po uszkodzeniach rdzenia kręgowego. Wyniki badań Li i jego zespołu dowiodły, że rusztowania z kompozycji PEG/poli-L-lizyna są bezpieczne w użyciu i dają możliwość nieinwazyjnej metody dostarczania genów poprzez barierę krew–mózg [38]. Kompozycja PEG-polilizyna może również służyć jako rusztowanie do hodowli lub system dostarczający linie komórkowe. Hydrożele PEG-polilizyna o różnej sprężystości wywoływały różne zachowanie się komórek macierzystych. Żele o niskim module między 3,5 ÷ 5,5 kPa ułatwiały migrację komórek oraz proces różnicowania [39]. Użyteczność w procesach neuroregeneracji potwierdzono również dla hydrożelu biohybrydowego otrzymanego poprzez kowalencyjne sieciowanie glikolu polietylenowego z heparyną oraz dodatkową funkcjonalizację sekwencją peptydową RGD i czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF-2) w wyniku powtórnej konwersji heparyny [40]. W tym wypadku również zaobserwowano wpływ właściwości rusztowania, takich jak morfologia, pęcznienie oraz sprężystość na zachowanie się komórek.

Pozytywnie na formowanie się wypustek nerwowych wpływał hydrofilowy hydrożel poliakrylamidowy funkcjonalizowany fibronektyną. Taki miękki żel

(moduł Younga ~10 Pa) powodował rozwój krótkich nierozgałęzionych wypustek, a sztywniejsze podłoża hydrożelowe (moduł Younga od 1 ÷ 100 kPa) bardziej rozgałęzione wypustki. Powyższe wyniki badania dwuwymiarowego indukowania mechanicznego regeneracji dają jakiś pogląd dla rozwoju inżynierii tkanki mózgu. Większość prowadzonych obecnie obserwacji komórkowych jest prowadzona na modelach 2D, jednak modele 3D mogą przynieść inne rezultaty i sugestie co do struktury oraz formy implantów [16].

Hydrożele dają możliwość immobilizacji komórek, wpływu na ich zachowania poprzez np. ułatwienie ich migracji oraz integracji z tkanką gospodarza. Należy jednak przyznać, że badania w tej dziedzinie wciąż są w fazie początkowej. Dalsza modyfikacja hydrożeli w celu wzmocnienia interakcji z komórkami oraz umożliwienia penetracji przez biocząsteczki jest konieczna, zanim zostaną wdrożone do dalszych badań *in vivo* w celu regeneracji tkanki nerwowej. W przyszłości hydrożele należy również ocenić pod kątem możliwości uzyskania takiej formy terapii, która oferuje w ostatecznym rezultacie nie tylko odtworzenie uszkodzonej tkanki mózgu, ale również przywrócenie utraconych funkcji poznawczych, sensorycznych oraz motorycznych.

Potencjalne zastosowania kliniczne

Strategie leczenia wielu chorób neurodegeneracyjnych lub urazów mechanicznych tkanki nerwowej mózgu są ograniczone i opierają się najczęściej na leczeniu farmakologicznym, interwencji chirurgicznej oraz fizjoterapii. Niestety wiele z tych zabiegów ma niewielki wpływ na zmiany chorobowe i pourazowe. W tym względzie terapie polegające na transplantacji komórek w celu zastąpienia utraconych komórek nerwowych przynoszą nadzieję dla poszkodowanych osób. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że sztuczna trójwymiarowa substancja pozakomórkowa utworzona z polimerów biomedycznych ułatwi adhezję komórkom, ich organizację przestrzenną oraz wspomogą procesy neurogenezy, przyczyni się do poprawy integracji z komórkami biorcy. Poza tym immobilizacja w rusztowaniach czynników neurotroficznych oraz antyapoptycznych może wspomóc przetrwanie, proliferację oraz różnicowanie macierzystych komórek nerwowych, ułatwiając procedurę transplantacji lub proces endogennej naprawy tkanki. Wykorzystanie materiałów o właściwościach przewodzących może ponadto być dodatkowym czynnikiem wspomagającym terapię poprzez elektrostymulację. W celu rozwiązania problemu biofunkcjonalności obecnie projektowane rusztowania, wykonane i oceniane jako rusztowania do neuroregeneracji tkanki mózgu, mogą być uzupełniane w odpowiednie czynniki biologiczne nieopisane w niniejszym artykule.

Podsumowanie

Złożoność anatomiczna i funkcjonalna mózgu wraz z niezliczonymi procesami bimolekularnymi oraz sygnałowymi powiązanymi z patologią zaburzeń neurologicznych prezentują wieloaspektowe wyzwanie do opracowywania strategii leczenia urazów mózgu. Terapie komórkowe są podważalną do zainicjowania odbudowy uszkodzonych komórek nerwowych, ale w ograniczonym zakresie, by ułatwić powrót funkcji poznawczych. Rusztowania zaprojektowane dotychczas miały na ogół za zadanie zapewnić sztuczną ECM niezbędną do przetrwania komórek i w różny sposób wpływały na proliferację oraz migrację. Zaobserwowano, że różne rusztowania w różny sposób wpływały na poszczególne procesy. Nanowłókna oraz hydrogele zostały przeanalizowane jako potencjalne materiały do zastosowań *in vivo* w celu rekonstrukcji, stymulacji regeneracji tkanki uszkodzonego mózgu oraz restytucji utraconych funkcji sensomotorycznych. Każdy z wyżej przytoczonych polimerów oraz typów rusztowań ma korzystne cechy, ale nie jest pozbawiony cech negatywnych, które ograniczają jego zastosowanie. Polimery konstrukcyjne

i rusztowania muszą być dostosowane strukturalnie, mechanicznie oraz biologicznie, by promować infiltrację komórek i tkanki biorcy oraz jej integrację z materiałem. Bioaktywność rusztowania jest niezbędna do umożliwienia interakcji komórki/tkanka–rusztowanie oraz komórka–komórka. Bioaktywność rusztowania można osiągnąć poprzez jego modyfikację biomolekułami naturalnej ECM, m.in. białkami i czynnikami troficznymi dla rozwoju komórek i ich namnażania. Niezaprzeczalne jest, że rusztowania muszą wykazywać kluczowe właściwości do promowania przetrwania komórek transplantowanych oraz integracji z komórkami gospodarza, jak również indywidulanie współgrać ze zmianami patologicznymi wynikającymi z rodzaju zaburzenia czy urazu. Rozwój badań nad rusztowaniami polimerowymi w dalszym ciągu znajduje się na etapie eksperymentalnym *in vitro*, rzadziej *in vivo* na modelach uszkodzenia tkanki nerwowej mózgu zwierząt doświadczalnych. Skonstruowanie zaawansowanych modeli rusztowania o charakterze hybrydowym może być kluczowe do stymulowania regeneracji oraz w ostateczności doprowadzenia do restytucji utraconych funkcji tkanki nerwowej mózgu.

Piśmiennictwo

- [1] Delcroix G.J.-R., Schiller P.C., Benoit J.-P., Montero-Menei C.N.: Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials* 2010, 31(8), 2105–2120.
- [2] Nisbet D.R., Rodda A.E., Horne M.K., Forsythe J.S., Finkelstein D.I.: Neurite infiltration and cellular response to electrospun polycaprolactone scaffolds implanted into the brain. *Biomaterials* 2009, 30, 4573–4580.
- [3] Baigera S., Del Gaudio C., Lucatelli E., Kuveda E., Boieri M., Mazzanti B., Bianco A., Macchiarini P.: Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. *Biomaterials* 2014, 35, 1205–1214.
- [4] Rao S.S., Nelson T.M., Xue R., DeJesus J.K., Viapiano M.S., Lannuti J.J., Sarkar A., Winter J.O.: Mimicking white matter tract topography using core-shell electrospun nanofibers to examine migration of malignant brain tumors. *Biomaterials* 2013, 34, 5181–5190.
- [5] Zimmermann D.R., Dours-Zimmermann M.T.: Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem. Cell Biol.* 2008, 130, 635–653.
- [6] Wang H.B., Mullins M.E., Cregg J.M., Hurtado A., Oudega M., Trombley M.T., Gilbert R.J.: Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications. *J. Neural Engineer.* 2009, 6(1), 1–15.
- [7] Gupta D., Venugopal J., Prabhakaran M., Dev V., Low S., Choon A.: Aligned and random nanofibrous substrate for the *in vitro* culture of Schwann cells for neural tissue engineering. *Acta Biomaterial.* 2009, 5(7), 2560–2569.
- [8] Ghasemi-Mobarakeh L., Prabhakaran M., Morshed M., Nasr-Esfahani M., Ramakrishna S.: Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2008, 29(34), 4532–4539.
- [9] Johnson J., Nowicki M., Lee C., Chiocca E., Viapiano M., Lawler S.: Quantitative Analysis of Complex Glioma Cell Migration on Electrospun Polycaprolactone Using Time-Lapse Microscopy. *Tiss. Engineer. Part C Meth.* 2009, 15(4), 531–540.
- [10] Low W.Ch., Rujitanaroj P.-O., Lee D.-K., Messersmith P.B., Stanton L.W., Goh E., Chew S.Y.: Nanofibrous scaffold-mediated REST knockdown to enhance neuronal differentiation of stem cells. *Biomaterials* 2013, 34, 3581–3590.
- [11] Horne M.K., Nisbet D.R., J.S. Forsythe J.S., Parish C.L.: Three Dimensional Nanofibrous Scaffolds Incorporating Immobilized BDNF Promote Proliferation and Differentiation of Cortical Neural Stem Cells. *Stem Cells Develop.* 2010, 19(6), 843–852.
- [12] Tseng Y.-Y., Hao Y.-Ch., Liao J.-Y., Chen W.-A., Liu S.-J.: Biodegradable Drug-Eluting Poly(lactic-glycol acid) Nanofibers for the Sustainable Delivery of Vancomycin to Brain Tissue: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *ACS Chem. Neurosci.* 2013, 4(9), 1314–1321.
- [13] Lee J., Bashur C., Goldstein A., Schmidt C.: Polypyrrole-Coated Electrospun PLGA Nanofibers for Neural Tissue Applications. *Biomaterials* 2009, 30(26), 4325–4335.
- [14] Aurand E.R., Lampe K.J., Bjugstad K.B.: Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering. *Neurosci. Res.* 2012, 72, 199–213.
- [15] Woerly S., Petrov P., Sykova E., Roitbak T., Simonova Z., Harvey A.R.: Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies. *Tiss. Engineer.* 1999, 5, 467–488.

- [16] Leach J., Brown X., Jacot J., DiMilla P., Wong J.: Neurite outgrowth and branching of PC12 cells on very soft substrates sharply decreases below a threshold of substrate rigidity. *J. Neural Engineer.* 2007, 4(2), 26–34.
- [17] Stabenfeldt S., Garcia A., LaPlaca M.: Thermoreversible laminin-functionalized hydrogel for neural tissue engineering. *J. Biomed. Materials Res. Part A* 2006, 77(4), 718–725.
- [18] Crompton K.E., Goud J.D., Bellamkonda R.V., Gengenbach T.R., Finkelstein D.I., Horne M.K., Forsythe J.S.: Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials* 2007, 28, 441–449.
- [19] Banerjee A., Arha M., Choudhary S., Ashton R.S., Bhatia S.R., Schaffer D.V., Kane R.S.: The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials* 2009, 30(27), 4695–4699.
- [20] Wang T.W., Spector M.: Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering. *Acta Biomaterial.* 2009, 5(7), 2371–2384.
- [21] Pan L., Ren Y., Cui F., Xu Q.: Viability and differentiation of neural precursors on hyaluronic acid hydrogel scaffold. *J. Neurosci. Res.* 2009, 87(14), 3207–3220.
- [22] Namba R., Cole A., Bjugstad K., Mahoney M.: Development of porous PEG hydrogels that enable efficient, uniform cell-seeding and permit early neural process extension. *Acta Biomaterial.* 2009, 5, 1884–1897.
- [23] Mahoney M., Krewson C., Miller J., Saltzman W.: Impact of cell type and density on nerve growth factor distribution and bioactivity in 3-dimensional collagen gel cultures. *Tiss. Engineer.* 2006, 12(7), 1915–1927.
- [24] Bhang S.H., Lee T.J., Lim J.M., Han A.M., Choi C.Y., Kwon Y.H., Kim B.S.: The effect of the controlled release of nerve growth factor from collagen gel on the efficiency of neural cell culture. *Biomaterials* 2009, 30(1), 126–132.
- [25] Lu D., Mahmood A., Qu C., Hong X., Kaplan D., Chopp M.: Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury. *Neurosurg.* 2007, 61(3), 596–602.
- [26] Xu T., Molnar P., Gregory C., Das M., Boland T., Hickman J.: Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. *Biomaterials* 2009, 30(26), 4377–4383.
- [27] Wei Y.T., Sun X.D., Xia X., Cui F.Z., He Y., B. Liu B.F.: Hyaluronic acid hydrogel modified with Nogo-66 receptor antibody and poly(L-lysine) enhancement of adherence and survival of primary hippocampal neurons. *J. Bioact. Compatible Polym.* 2009, 24, 205–219.
- [28] Cui F.Z., W. Tian W.M., Hou S.P., Xu Q.Y., Lee I.S.: Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering. *J. Material Sci.: Materials Med.* 2006, 17(12), 1393–1401.
- [29] Zhang T., Yan Y., Wang X., Xiong Z., Lin F., Wu R.: Three-dimensional gelatin and gelatin/hyaluronan hydrogel structures for traumatic brain. *Injury J. Bioactive Compatible Polym.* 2007, 22, 19–29.
- [30] Tate M.C., Shear D.A., Hoffman S.W., Stein D.G., LaPlaca M.C.: Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury. *Biomaterials* 2001, 22(10), 1113–1123.
- [31] Cao Z., Gilbert R.J., He W.: Simple agarose-chitosan gel composite for enhanced neuronal growth in three dimensions. *Bio-macromol.* 2009, 10(10), 2954–2959.
- [32] Yu L., Kazazian K., Shoichet M.: Peptide surface modification of methacrylamide chitosan for neural tissue engineering applications. *J. Biom. Mater. Res. Part A* 2007, 82(1), 243–255.
- [33] Irons H., Cullen D., Shapiro N., Lambert N., Lee R., LaPlaca M.: Three-dimensional neural constructs: a novel platform for neurophysiological investigation. *J. Neural Engineer.* 2008, 5(3), 333–341.
- [34] Dewitt D.D., Kaszuba S.N., Thompson D.M., Stegemann J.P.: Collagen I-matrigel scaffolds for enhanced Schwann cell survival and control of three-dimensional cell morphology. *Tiss. Engineer. Part A* 2009, 15(10), 2785–2793.
- [35] Thonhoff J.R., Lou D.I., Jordan P.M., Zhao X., Wu P.: Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials *in vitro*. *Brain Res.* 2008, 1187, 42–51.
- [36] Lesný P., De Croos J., Pradny M., Vacik J., Michalek J., Woerly S., Syková E.: Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. *J. Chem. Neuroanat.* 2002, 23(4), 243–247.
- [37] Guiseppi-Elie A.: Electroconductive hydrogels: synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials* 2010, 31(10), 2701–2716.
- [38] Liu Y., Li J., Shao K., Huang R., Ye L., Lou J., Jiang C.: A leptin derived 3-amino-acid peptide modified pegylated poly-L-lysine dendrigraft for brain targeted gene delivery. *Biomaterials* 2010, 31, 5246–5227.
- [39] Hynes S., Rauch M., Bertram J., Lavik E.: A library of tunable poly(ethylene glycol)/poly(L-lysine) hydrogels to investigate the material cues that influence neural stem cell differentiation. *J. Biomed. Material Res. Part A* 2009, 89(2), 499–509.
- [40] Freudenberg U., Hermann A., Welzel P., Stirl K., Schwarz S., Grimmer M.: A star-PEG-heparin hydrogel platform to aid cell replacement therapies for neurodegenerative diseases. *Biomaterials* 2009, 30, 5049–5060.

Adres do korespondencji

Anna Lis
Akademia Górniczo-Hutnicza
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów
al. Mickiewicza 30
30-059 Kraków
tel: 12 617 47 44
e-mail: annal@agh.edu.pl

Konflikt interesów: nie występuje.

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.12.2013 r.
Po recenzji: 15.01.2014 r.
Zaakceptowano do druku: 27.01.2014 r.

Received: 10.12.2013
Revised: 15.01.2014
Accepted: 27.01.2014