

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: neurovědy



MUDr. Petr Lesný

Využití makroporézních hydrogelů na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu
k přemostění míšní léze

Utilization of biocompatible hydrogels based on 2-hydroxyethylmethacrylate
to bridge the spinal cord lesion

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., FCMA

Praha, 2016

Prohlášení:

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

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

V Praze, 24. 9. 2015

PETR LEŠNÝ

Postgraduální doktorské studium biomedicíny
Akademie věd České Republiky a Univerzita Karlova v Praze

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Školitel: Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., FCMA

Autor: MUDr. Petr Lesný

Oponenti:

Obhajoba se koná dne: 2016 v hod. v

S disertací je možno se seznámit v Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat své školitelce, **Prof. MUDr. Evě Sykové, DrSc., FCMA** vedoucí Ústavu neurověd UK 2. LF, vedoucí Oddělení neurověd Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. za odborné vedení, pomoc při experimentální práci a cenné připomínky při přípravě mé disertační práce. Můj dík patří rovněž všem kolegům z Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Ústavu neurověd UK 2. LF a Centra pro buněčnou terapii a tkáňové náhrady, kteří se spolupodíleli na experimentální části této práce a všem, kteří mi pomáhali při korekturách textu. Na závěr bych rád vyjádřil své díky spolupracovníkům z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, kteří se mnou spolupracovali na vývoji biomateriálů a bez kterých by tato práce nebyla mohla vzniknout.

Děkuji také paní Jarmile Kašparové, paní Dominice Duškové, panu Jamesi Duttovi, paní Lence Kohoutové, paní Svatavě Vackové a paní Aleně Veselé za skvělou technickou spolupráci.

Velký dík patří všem členům mé rodiny, zejména mým rodičům a mé ženě, za neustávající podporu během studia.

Seznam použitých zkratk

AMPA	a-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
ATP	adenosin trifosfát
BBB skóre	škála hodnocení neurologických funkcí u potkanů po míšní lézi pojmenovaná podle počátečních písmen příjmení autorů: Basso D.M., Beattie M.S. a Bresnahan J.C. (Basso et al., 1995)
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
bFGF	Bazický fibroblastový růstový faktor
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenáza
CSPG	chondroitin sulfát proteoglykan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMHA	N,O-dimethakryloylhydroxylamin
ECM	extracelulární matrix
ECP	extracelulární prostor
EDMA	etyléndimethakrylát
EGF	Endoteliální růstový faktor
EOEMA	etoxyethyl methakrylát
ESEM	environmentální rastrovací elektronová mikroskopie
G-CSF	Faktor stimulující růst kolonií granulocytů (Granulocyte Colony Stimulating Factor)
GDNF	Glial cell line Derived Neurotrophic Factor
GFAP	gliální fibrilární astrocytický protein
GMA	glycidyl methakrylát
HEMA	2-hydroxyethylmethakrylát
HPMA	N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid
i.m.	intramuskulární podání
i.p.	intraperitoneální podání
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
IU	mezinárodní jednotka
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MA	kyselina methakrylová

MAG	Myelin Associated Glycoprotein
MOETACl	methakryloyloxyethyltrimethylamonium chlorid
MRI	Magnetic Resonance Imaging; zobrazení magnetickou rezonancí
MSC	mezenchymové kmenové buňky
NF160	neurofilamenta 160 kD
NMDA	N-methyl-D-aspartát
Nogo	Neurite Outgrowth Inhibitor
NOS	enzym syntáza oxidu dusného
NSF	US National Science Foundation
NT-3	neurotropin-3
ONOO ⁻	peroxynitritový anion
PBS	Phosphate Buffer Saline; fosfátový pufr obohacený o NaCl
PDGF	růstový faktor z krevních destiček
PEG	polyethylen glykol
PMN	polymorfonukleární leukocyty
RECA	Protilátka proti endoteliálním buňkám
RGD	tripeptid: arginin, glycín, kyselina aspartamová
s.c.	subkutánní podání
SCI	Spinal Cord Injury; míšní poranění
IKVAV	pentapeptid; izoleucin, lysin, valin, alanin, valin
siRNA	Small interfering RNA; malá interferující RNA
Th1, 2, ...	hrudní obratel
TMA ⁺	ionty tetramethylamonia
YIGSR	pentapeptid: tyrosin, leucin, glycín, serin, arginin

Uvádění chemických názvů

V souladu s doporučením pravidel českého pravopisu (Juláková, 2005) není v této práci použita fonetizace chemické nomenklatury a je rozlišováno mezi názvy chemických sloučenin obsahujících písmena tau (přepisováno jako t) nebo théta (přepisováno jako th).

Obsah

1	Přehled současných poznatků	1
1.1	Úvod.....	1
1.1.1	Epidemiologie úrazů míchy	1
1.1.2	Historický vývoj léčby míšního poranění.....	2
1.1.3	Anatomie míchy	4
1.2	Míšní poranění.....	5
1.2.1	Klinický obraz poranění míchy	6
1.2.2	Patofyziologie poranění míchy	7
1.2.3	Experimentální modely míšního poranění.....	11
1.2.4	Posttraumatická syringomyelie.....	11
1.3	Tkáňové inženýrství	12
1.3.1	Autologní a alogenní tkáňové náhrady	13
1.3.2	Kmenové buňky.....	14
1.3.3	Biomateriály	15
1.4	Tkáňové inženýrství při léčbě míšního poranění	19
1.5	Přemostění míšního poranění biologickým materiálem.....	20
1.5.1	Implantace periferních nervů do míšního poranění	22
1.5.2	Intraspinální transplantace fetální tkáně	22
1.5.3	Mezenchymové kmenové buňky v léčbě míšního poranění.....	23
1.6	Přemostění míšního poranění inertními implantáty	25
1.7	Biodegradovatelné implantáty.....	26
1.8	Využití makroporézních hydrogelů k terapii míšního poranění.....	27
1.8.1	Makroporézní hydrogely na bázi HEMA	28
1.8.2	Moderní trendy v oblasti hydrogelů pro léčbu míšního poranění	29
2	Hypotézy a cíle práce	32
3	Metodika	34
3.1	Příprava kopolymerů HEMA-MA	34
3.2	Příprava kopolymerů s kladným elektrickým nábojem.....	35
3.3	Příprava biodegradovatelných hydrogelů.....	36
3.4	Příprava nanovláken	37
3.5	Měření difúzních vlastností hydrogelů in vitro	37

3.6	Příprava buněčných kultur mezenchymových buněk.....	38
3.7	Hodnocení růstu buněk v hydrogelu	39
3.8	Implantace hydrogelů do kortexu laboratorního potkana	40
3.9	Měření difúzních vlastností hydrogelů in vivo v kortexu laboratorního potkana	41
3.10	Implantace hydrogelů do míchy laboratorního potkana.....	42
3.11	Histologie a imunohistochemie	43
3.12	Zobrazování míchy magnetickou rezonancí	44
3.13	Obrazová analýza	44
3.14	Zobrazení hydrogelů v konfokálním mikroskopu	46
3.15	Statistické metody	47
4	Výsledky	48
4.1	Makroporézní hydrogely na bázi kopolymerů HEMA-MA.....	48
4.2	Difúzní vlastnosti hydrogelů HEMA-MA a HPMA	53
4.3	Elektronová mikroskopie hydrogelů HEMA-MA.....	55
4.4	Konfokální mikroskopie hydrogelů HEMA-MA a HPMA.....	56
4.5	Porozimetrie pomocí konfokálního mikroskopu	58
4.6	Růst MSC v hydrogelu na bázi kopolymeru HEMA-MA.....	60
4.7	Implantace hydrogelů HEMA-MA a HPMA do kortexu laboratorního potkana.....	62
4.8	Difúzní vlastnosti implantovaných hydrogelů HEMA-MA a HPMA in vivo	65
4.9	Hydrogely na bázi kopolymerů HEMA s kladným elektrickým nábojem.....	67
4.10	Elektronová a konfokální mikroskopie hydrogelů s kladným elektrickým nábojem....	69
4.11	Růst MSC v hydrogelech s kladným elektrickým nábojem	71
4.12	Difúzní charakteristiky hydrogelů s kladným elektrickým nábojem	74
4.13	Implantace hydrogelů s elektrickým nábojem do hemisekce míchy.....	75
4.14	Růst buněk na mikrovlákních a nanovlákních	78
4.15	Implantace nanovláknenných nosičů do míchy	80
4.16	Hydrolyticky biodegradovatelné hydrogely	82
4.17	Růst MSC na nebiodegradovatelných kopolymerech HPMA-EOEMA	84
4.18	Implantace biodegradovatelných hydrogelů do míchy	85
4.19	Implantace biodegradovatelných hydrogelů ve fázi maximální hydratace	88
4.20	Akutní a subakutní implantace hydrogelu do chronické míšní léze.....	90
5	Diskuse.....	93
5.1	Příprava a charakterizace hydrogelů	93

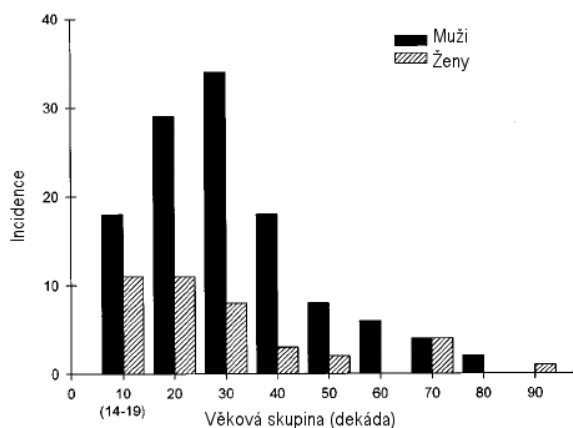
5.2	Implantace hydrogelů do akutního poranění	96
5.3	Růst buněk na polymerních nanovlákních.....	97
5.4	Implantace hydrogelů v léčbě míšního poranění.....	99
5.5	Limity práce	101
6	Závěry a splnění cílů práce.....	102
6.1	Hypotézy práce.....	102
6.2	Plnění cílů práce – souhrnný závěr	Chyba! Záložka není definována.
7	Souhrn	107
8	Summary	108
9	Související publikace autora.....	109
9.1	Publikace, které jsou podkladem disertační práce	109
9.2	Publikace související s tématem, které nejsou podkladem disertační práce	111
9.3	Ostatní články autora v recenzovaných periodících.....	111
10	Literatura.....	114
11	Přílohy	138

1 Přehled současných poznatků

1.1 Úvod

1.1.1 Epidemiologie úrazů míchy

Výskyt vážného poranění míchy je celosvětově odhadován v širokém epidemiologickém pásmu na 12.5 až 53 případů ročně na 1 milion obyvatel (Drábková, 2003). V současné době je celkový počet postižených se spinálním traumatem odhadován v USA kumulativně na 200 000 pacientů, resp. 27 až 93 nových případů na 1 milion obyvatel s významným rozdílem incidence mezi jednotlivými státy (Burke et al., 2001; Surkin et al., 1998). V Evropě jsou údaje nižší: ve Francii je udáván počet úrazů míchy 2000 ročně na 60 milionů obyvatel (cca 33 na 1 milion obyvatel) (Saillant et al., 2005), pro Spojené království udává Papadopoulos (Papadopoulos, 1992) 750 nových případů spinálního traumatu ročně na zhruba stejný počet obyvatel (cca 12.5 na 1 milion obyvatel). Poslední publikovaná metaanalýza (Singh et al., 2014) uvádí pro jednotlivé země Evropy publikovanou incidenci v desítkách případů na milion obyvatel s tím, že jsou značné rozdíly mezi jednotlivými zeměmi i mezi sledovanými obdobími; nejvíce v ní citovaných prací však vzniklo před rokem 2002.



Obr. 1.1. Incidence míšního poranění v závislosti na věku a pohlaví, převzato z Burke et. al. (Burke et al., 2001).

Přesná čísla v ČR nejsou k dispozici. Dle statistiky České spondylochirurgické společnosti činila v roce 2000 incidence traumatických míšních lézí v ČR 335 nových případů. Fakt, že ročně v ČR přibývá kolem 300 poranění, odpovídá evropskému průměru (Doležel, 2004). Za hlavní příčinu míšního poranění (SCI) jsou v západním světě považovány automobilové nehody (Burke et al., 2001); o druhé místo se dělí střelná zranění (převažující

ve Spojených státech amerických) se sportovními úrazy (Evropa). Vzhledem k všeobecnému nárůstu počtu vážných úrazů, především způsobených dopravními nehodami, lze očekávat další zvyšování incidence SCI. Dvě třetiny postižených jsou muži ve věku 15 až 30 let (Burke et al., 2001), mužů je mezi poraněnými více, než žen (Obr. 1.1). Poslední epidemiologické studie (Bellucci et al., 2015) uvádí celosvětový trend vzrůstání průměrného věku SCI (26 let před rokem 2008 versus 38 let po roce 2009) a vzrůstání četnosti dopravních nehod jako příčiny SCI a pokles četnosti střelných poranění jako příčiny SCI v řadě regionů.

Přerušení motorických a senzorických drah, které následuje po SCI má pro postižené devastující následky. Fyzické i psychologické důsledky poranění míchy dopadají nejen na postižené jedince, ale i na jejich rodiny a společnost. Časná rehabilitace a multidisciplinární přístup se ukázal pro pacienty přínosný, zejména s ohledem na snížení počtu komplikací, nižší mortalitu a kratší dobu hospitalizace (DeVivo et al., 1990); vzhledem ke zlepšující se zdravotní péči a zvyšující se prevalenci míšního poranění tak dochází k nárůstu celkových výdajů na péči o tyto pacienty.

1.1.2 Historický vývoj léčby míšního poranění

Nejstarší dochovanou písemností popisující poranění míchy je Papyrus Edwarda Smithe, jehož autorství je připisováno Imhotepovi (lékař a ministr egyptského faraóna Džósera – 2650-2600 př.n.l.). Dva ze 48 chirurgických stavů, které jsou popsány v této písemnosti, se týkají poranění míchy; autor se o nich vyjadřuje jako o nemoci, která nemůže být vyléčena. Další historické zmínky o míšní lézi pocházejí od řeckých lékařů Hippokrata (460-370 př.n.l.) a Galéna (131-201 př.n.l.); Galén je obecně považován za prvního lékaře, který rozeznával příznaky poranění míchy podle výšky a který experimentálně přetínal míchu. Dále však přetrvával konzervativní přístup k léčbě poranění míchy a pacienti, kteří byli považováni za neléčitelné, umírali na přidružené komplikace.

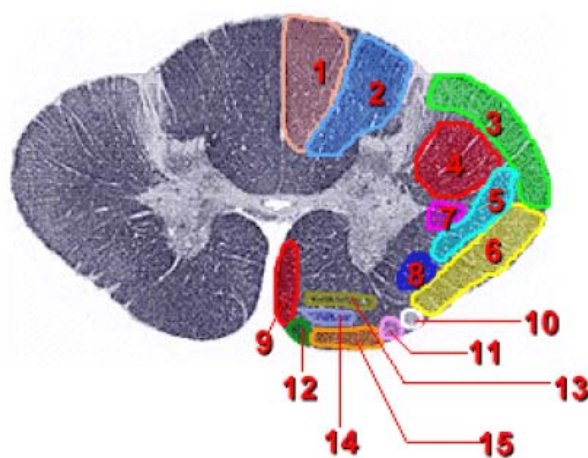
S rozvojem chirurgie v 19. století byl obnoven zájem o léčbu poranění míchy. První laminektomií, sloužící k uvolnění stlačené míchy, provedl Henry Cline v roce 1814 v Londýně (Williard, 1871). Operovaný pacient zemřel o 9 dnů později, operace však dala základ rozsáhlým diskusím o vhodnosti provádění laminektomie u fraktur obratlů. Na českém území se o rekonstrukci přerušené míchy pokusil Maydl již v roce 1884, kdy navrhnul resekci fibrózních míšních pahýlů a jejich sešití, jak popisuje Beneš (Beneš, 1961). K výraznému pokroku došlo na konci 19. století, kdy zavedl francouzský neurochirurg Bontecou do léčby míšního poranění úspěšně trakci (1887) a německý fyzik Röntgen vyvinul zobrazovací metodu, která umožnila zobrazit poraněnou páteř.

Terapeutický postup	Příklady
Ochranné neuroprotektivní faktory, které zmenšují následky míšního poranění	• Vysoké dávky methylprednisolonu • Inhibice zánětu v místě poranění inhibitory cyklooxygenázy • Inhibice volných radikálů v místě léze • Podávání Erytropoetinu • Antagonisté receptoru P2X7R • Podávání Minocyklinu • Blokáda toxických efektů excitace zprostředkovaných glutamátem
Obnovení vodivosti nervových vláken v místě poranění	• Blokátory napětově závislých K⁺ kanálů • Transplantace prekursorů gliálních buněk • Inhibice apoptózy buněk v místě léze
Růstové a diferenciační faktory	• Neurotropní faktory (NGF, BDNF, NT-3, GDNF, LIF) • Monogangliosid GM1 • Transplantace kmenových buněk nebo fibroblastů produkujících růstové faktory
Působení na mechanismy bránící regeneraci	• Blokáda produktů degradace myelinu (Nogo-A, MAG) • Degradace chondroitin sulfát proteoglykanů (CSPG) a dalších inhibičních faktorů přítomných v gliové jizvě • Zpoždění syntézy bazální laminy působením chelátorů Fe²⁺ • Blokování Rho-GTPáz v axonech • Imunizace proti inhibitorům regenerace • Implantace aktivovaných makrofágů
Implantace biomateriálů přemostňujících míšní tkáň	• Homogenní gely z umělých nebo biogenních polymerů • Makro a superporézní biomateriály, např. hydrogely • Materiály na bázi samoorganizujících se polypeptidů • Hydrogely s orientovanými póry • Biomateriály uvolňující léčivé látky (např. neurotropní faktory, rolipram, Sonic hedgehog protein) • Biomateriály pro genovou terapii – obsahující DNA nebo siRNA • Decelularizovaná tkáň
Využití buněk k regeneraci míšní tkáně – samotných nebo v kombinaci s biomateriály	• Embryonální a fetální kmenové buňky • Endogenních kmenové buňky (neurální, mezenchymální) • Geneticky modifikované buňky produkující růstové faktory • Transplantace gliových buněk (Schwannovy buňky, buňky olfaktorické glie)
Elektronické implantáty	• Elektrovedivé biomateriály • Neuroprotetika

Tabulka 1.1. Přehled současných možností terapeutického ovlivnění míšního poranění, zpracovaný dle (Schwab et al., 2006) a (Kubinová a Syková, 2012).

Jen málokterá oblast neurověd je sledována tak pečlivě, jako výzkum patofyziologie a možností terapeutického ovlivnění míšního poranění. Stručný přehled v současnosti zkoumaných experimentálních terapeutických postupů (Schwab et al., 2006) je v tabulce 1.1.

Přesto, že incidence SCI není vysoká, jsou tato poranění velmi závažná, zejména proto, že zanechávají celoživotní následky v podobě trvalé nebo částečné invalidity. Ačkoliv náklady, vynaložené každoročně na výzkum možností terapie SCI jsou vysoké, žádný z dosavadních směrů výzkumu nepřinesl dosud jednoznačné výsledky. Jedním ze slibných experimentálních postupů je přemostění míšního defektu uměle vytvořeným implantátem, který poskytne vhodné podmínky pro regeneraci.



Obrázek 1.2. Topografie významných míšních drah u člověka: 1. *fasciculus. gracilis*, 2. *fasciculus. cuneatus*, 3. *tractus. spinocerebellaris dorsalis*, 4. *tractus corticospinalis lateralis*, 5. *tractus spinothalamicus lateralis*, 6. *tractus spinocerebellaris ventralis*, 7. *tractus rubrospinalis*, 8. *tractus spinotectalis*, 9. *tractus corticospinalis anterior*, 10. *tractus olivospinalis*, 11. *tractus spinoolivaris*, 12. *tractus tectospinalis*, 13. *tractus reticulospinalis*, 14. *tractus vestibulospinalis*, 15. *tractus spinothalamicus anterior*.

1.1.3 Anatomie míchy

Mícha se nachází v páteřním kanálu počínaje od baze lební až po dolní okraj prvního bederního obratle. U člověka je složena z 31 segmentů; z každého segmentu vychází v přední části přední kořen míšní, obsahující převážně motorická vlákna, a v zadní části zadní kořen míšní, jehož obsahem jsou převážně vlákna senzorická. Vnitřní uspořádání segmentů je velmi podobné a obsahuje centrálně umístěnou šedou hmotu a periferně lokalizovanou bílou hmotu. Šedou hmotu tvoří těla neuronů, nacházejících se v míše. Bílá hmota obsahuje přibližně 2×10^7

nervových vláken (Blinkov a Gletze, 1968), která tvoří sestupné (motorické) a vzestupné (senzorické) dráhy (obr. 1.2).

Z hlediska symptomatologie poranění míchy je nutné zmínit podrobněji několik významných míšních drah. Kortikospinální dráha (*tractus corticospinalis*) je sestupná dráha, která vede informace z motorické oblasti mozkové kůry k motoneuronům v předních rožích míchy. Část vláken se před vstupem do míchy kříží (*tractus corticospinalis lateralis*), část se kříží až na úrovni jednotlivých segmentů, ve kterých vlákna končí (*tractus corticospinalis anterior*).

V dorsální části bílé hmoty se nachází vzestupné senzorické dráhy zadních provazců (*fasciculi gracilis et cuneatus; lemniskální systém*), které vedou informace o doteku, vibracích a propriocepci do senzorické oblasti mozkové kůry. Bolest a vnímání tepla a chladu jsou vedeny boční spinothalamickou drahou (*tractus spinothalamicus lateralis; součást anterolaterálního systému*). Tato dráha se kříží zhruba v oblasti jednoho až dvou předcházejících segmentů. Informace o jemném doteku je vedena i přední spinothalamickou drahou (*tractus spinothalamicus anterior*).

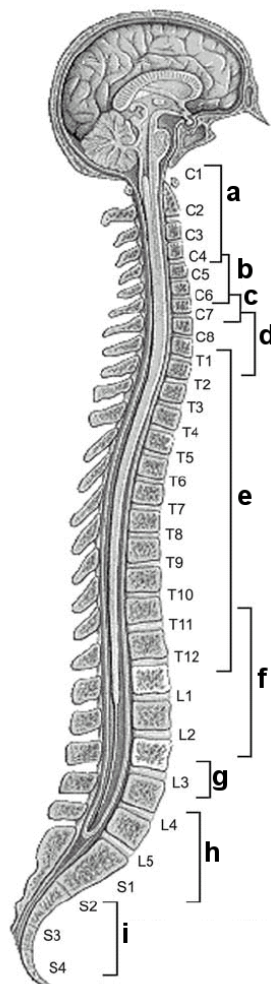
Přední sloupce míšní: obsahují motoneurony α tvoří 5 jader (v mediálních jádrech neurony pro svaly trupu, laterální neurony pro končetiny), γ – motoneurony – inervují intarfusální vlákna svalových vřetének. Postranní sloupce míšní obsahují motoneurony viscerální, tvoří *nucleus intermediolateralis* – v rozsahu C7-L2 buňky tohoto jádra jsou zdrojem vzruchů sympatiku, v rozsahu S2-S4 - parasympaticus, *nucleus intermediomedialis*. Míšní jádra parasympatiku jsou obdobně umístěná v sakrální oblasti. Ohraničení jader v šedé hmotě není přesné, a proto se šedá hmota míšní dělí na Rexedovy zóny I - X. Tyto zóny jsou definovány tvarem, velikostí, hustotou buněk; jsou číslovány v dorsoventrálním pořadí.

1.2 Míšní poranění

Uzavřená míšní poranění vznikají při luxaci či fraktuře páteře nebo diskopatiích, mohou však vzniknout i bez postižení kosti při náhlých nadměrných flexích páteře. Otevřená míšní poranění mohou být způsobena střelnými nebo bodnými ranami. Jen zřídka dochází ke kompletnímu přerušení míchy; u většiny poranění je zachována alespoň část drah bílé hmoty; v řadě případů jsou obaly nepoškozené. U vertebrospinalních poranění je současně poraněna i páteř, mohou se vyskytnout i přenesená poranění míchy bez narušení páteře.

Současný, všeobecně přijímaný postup terapie míšního poranění (Hurlbert, 2006) zahrnuje vysoké dávky methylprednisolonu, časnou redukci, dekompresi a stabilizaci (Blight a Tuszynski, 2006; Bracken et al., 1990; Fehlings a Perrin, 2005; Fehlings a Tator, 1999).

Tyto intervence jsou zacílené zejména na prevenci dalšího neurologického postižení a nenabízejí příliš mnoho naděje na podstatné zlepšení neurologického deficitu, který se rozvíjí po míšním poranění (Fehlings a Baptiste, 2005; Sipiski a Pearse, 2006). Významnou součástí léčby je i rehabilitace pacientů, která by měla být zahájena co nejdříve.



Obrázek 1.3. Rozsah funkčního postižení v závislosti na výšce poškození páteře: a. dýchání (C1-C4), pohyby hlavy a krku b. srdeční rytmus (C4-C8), hybnost v ramenou c. hybnost v zápěstí a v lokti (C5) d. hybnost hlavy a prstů (C7-Th1) e. tonus sympatiku (Th1-Th12), stabilita trupu (Th2-Th12) f. ejakulace (Th11-L2), pohyb kyčlí (L2) g. extenze v koleni (L3) h. pohyby nohy (L4-S1), flexe v koleni (L5) erekce (S2-S4), kontrola střev a močového měchýře (S2-S3) dle (Verma a Fawcett, 2005).

1.2.1 Klinický obraz poranění míchy

Při popisu klinického obrazu poranění míchy musíme brát zřetel jak na výšku poranění, tak na jeho rozsah. Podle *rozsahu* poškození rozlišujeme kompletní a částečné poranění míchy; symptomatologie poranění míchy závisí zejména na *výšce* léze, v menší míře

na její lokalizaci. Postižení předních provazců míchy dominuje ztráta motorických funkcí a cití pro bolest. Postižení drah zadních provazců vede k poruše citlivosti na vibrace a ztrátu kontroly proprioreceptorů. Vnímání jemného doteku, které je vedeno i přední spinotalamickou drahou, zůstává zachováno.

Při Brown-Séquardově syndromu je poškozena celá jedna polovina míchy, což způsobí ztrátu motorické funkce a proprioceptivního cití na postižené straně a ztrátu cití pro bolest a tepelné podněty na straně opačné. Je-li poškozena šedá hmota míšní v oblasti, kde se nacházejí jádra autonomního systému, projevují se ztráta autonomní regulace jako bradykardie, hypotenze, periferní vazodilatace a hypotermie.

Prvním následkem poranění míchy je akutní stav, označovaný jako **míšní šok** (Atkinson a Atkinson, 1996). Jedná se o stav hypotonické paralýzy končetin, areflexie a kompletní ztráty citlivosti pod úrovní léze. Doba trvání míšního šoku je proměnlivá a závisí na rozsahu a typu poranění i na jeho výši; obvykle se pohybuje v rozmezí několika hodin, některé symptomy však mohou trvat až 12 týdnů (Nankovic et al., 1995). Při odeznívání míšního šoku se obnovují nejprve vegetativní a poté i somatické reflexy.

Rozsah postižení jednotlivých svalových skupin závisí na postiženém míšním segmentu (Obr. 1.3). Nejčastějším místem postižení je oblast C6-C7; pacienti s tímto postižením ztrácí schopnost používat ruce, ačkoliv hybnost v ramenou zůstává zachována. Kompletní postižení nad úrovní C4-C5 nazýváme kvadruplegie, při postižení nižším, například v oblasti hrudní páteře, mluvíme o paraplegii.

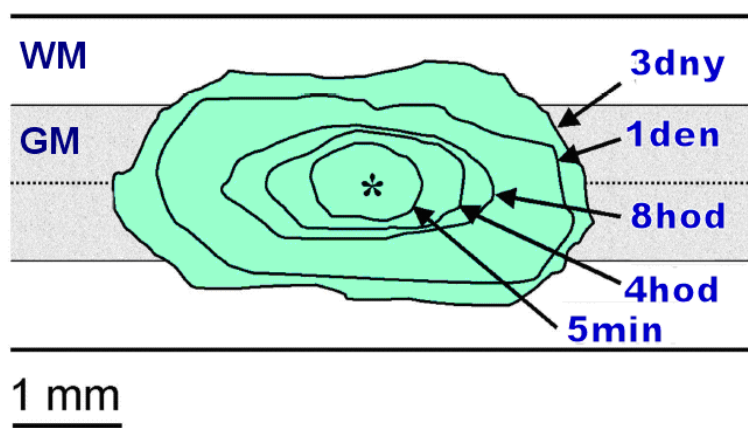
1.2.2 Patofyziologie poranění míchy

Mícha je před poškozením chráněna svým uložením v páteřním kanálu; obratle jsou stabilizovány vazivovým aparátem. Při úrazu páteře – flexí, extenzí nebo rotací – dojde v řadě případů i k poškození míchy. Při traumatické míšní lézi se energie způsobující úraz přenáší na míchu současně dvěma způsoby:

- Přímý: mícha je prudce napnutá nebo rotovaná. Jen zřídka dochází k jejímu úplnému přerušení.
- Nepřímý: stlačením míchy kostním úlomkem nebo fragmentem intervertebrálního disku; mohou být narušeny obaly i míšní tkáň.

Výsledné traumatické poškození míchy je důsledkem procesů, které je možné rozdělit do dvou po sobě následujících patofyziologických mechanismů: primární a sekundární poškození míchy (Taoka a Okajima, 1998).

Bezprostředně po traumatu mícha prodělává sekvenci patologických změn, které se koncentricky šíří od místa poranění (Obr. 1.4). Během prvních minut se v poraněné tkáni objeví krvácení (nejprve v šedé, potom i v bílé hmotě), poruchy mikrocirkulace a vazospazmy. Objevuje se edém míšní tkáně a v okamžiku, kdy tlak v uzavřeném prostoru páteřního kanálu překoná žilní tlak, je původní poranění dále zhoršeno dalším omezením cévního zásobování a rozvojem nekróz v oblastech sníženého cévního zásobení. Krevní tlak po experimentálně indukovaném míšním poranění u potkanů klesá (Westergren et al., 2001) a takto vyvolaná systémová hypotenze může přispět k dalšímu zhoršení krevního zásobení míchy.



Obrázek 1.4. Časový vývoj patologických změn v míšní tkáni u potkana se středně těžkou míšní lézí, ilustrující rozsah léze po 5 minutách, 4 a 8 hodinách, jednom dnu a třech dnech.

WM = bílá hmota, GM = šedá hmota, hvězdičkou je označeno místo impaktu

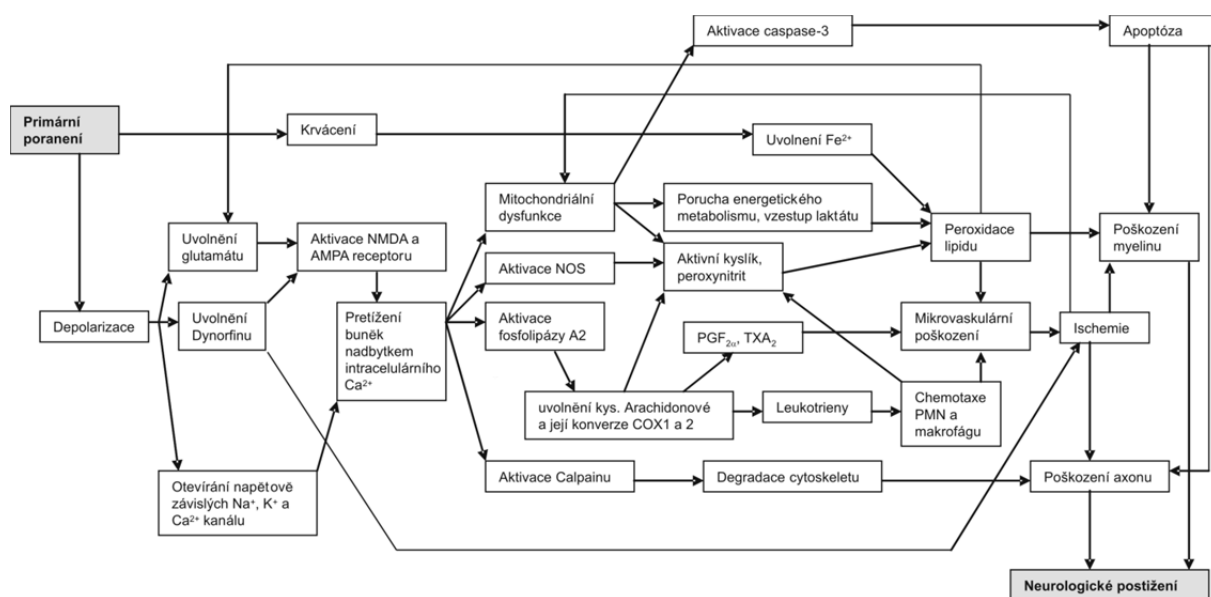
(Becker et al., 2003).

Na primární poranění navazuje sekundární poškození, které je výsledkem kaskády navazujících dějů na buněčné a molekulární úrovni. Celkový rozsah poškození míchy a výsledný klinický obraz závisí právě na rozsahu sekundárního poškození míšní tkáně, tedy na výsledku série buněčných a molekulárních dějů iniciovaných primárním mechanickým traumatem. Mezi sekundární procesy můžeme zahrnout krvácení, edém, poruchy iontové homeostázy, zejména uvolnění iontů K^+ , neurotoxické účinky uvolněného glutamátu, axonální a neuronální nekrózu a demyelinizaci, následovanou poruchami krevního zásobení, tvorbou cyst (Blight, 1983; Bresnahan et al., 1976; Kakulas, 1984; Wallace et al., 1987) a navazující neurologické poruchy.

Na histopatologické úrovni pozorujeme po akutním poškození míchy zejména hemoragie, edém, axonální a neuronální nekrózu a demyelinizaci s následným vytvářením cyst a infarktů (Blight, 1983; Bresnahan et al., 1976; Kakulas, 1984). Na rozvoj těchto změn u psů nejprve upozornil Allen (Allen, 1911). Patnáct minut po stlačení míchy se objevuje drobné krvácení v šedé hmotě a edém v bílé hmotě. Venuly s muskulární složkou se v šedé hmotě rozšiřují v důsledku jejich naplnění erytrocyty (Dohrmann et al., 1971); po 15 až 30 minutách je možné pozorovat únik erytrocytů do perivaskulárního prostředí postkapilárních a muskulárních venul. Současně se objevují první axonové změny: rozpad myelinových pochev a degenerace axonů (Bunge et al., 1994).

Během následujících dvou hodin se krvácení v bílé hmotě zvětšuje a po čtyřech hodinách můžeme pozorovat velké množství cylindricky rozšířených edematózních axonů. Popisované změny, označované někdy jako „míšní posttraumatický infarkt“, vyústí po šesti dnech do nekrózy míšní tkáně (Ducker, 1987).

Čtyři hodiny po poškození míchy se v experimentálním modelu objevují první apoptotické změny; apoptóza nervových buněk vrcholí 8 hodin po inzultu a apoptóza gliových buněk vrcholí 24 hodin po inzultu (Li et al., 1996). Po této první vlně následuje druhá vlna apoptózy v bílé hmotě v okolí degenerovaných axonů (Crowe et al., 1997). Po dobu následujících sedmi dní probíhá redukce populace neuronů a gliových buněk (prostřednictvím nekrózy i apoptózy) a dochází k tvorbě kavít a progresi počáteční léze. Angličtí autoři (Emery et al., 1998) potvrdili apoptotický proces i u člověka.



Obrázek 1.5. Přehled sekundárních procesů po poškození míchy probíhajících na molekulární úrovni. Zpracováno volně dle (Hall a Springer, 2004).

Současné poznatky o komplexních dějích na molekulární úrovni, které doprovázejí míšní poranění, jsou shrnuty na obrázku 1.5. K těmto dějům dochází v časovém intervalu minut, hodin až dní po traumatu míchy.

Bezprostředně po poranění následuje mechanicky indukovaná depolarizace a otevření napětově závislých iontových kanálů. Následuje masivní uvolnění neurotransmiterů včetně glutamátu, který může otevřít glutamátové iontové kanály (typů NMDA a AMPA). Pravděpodobně nejvýznamnější následek těchto rychle se vyvíjejících iontových poruch je nadměrná akumulace intracelulárního vápníku, která vede k několika navazujícím patologickým dějům:

- Projevu se mitochondriální dysfunkce, vedoucí k další poruše aerobního mechanismu buněk a k akumulaci laktátu.
- Dochází k aktivaci mitochondriální a cytoplasmatické syntázy oxidu dusnatého (NOS) a produkci oxidu dusnatého.
- Aktivuje se fosfolipáza A₂, která uvolní z membrány kyselinu arachidonovou; ta je cyklooxygenázami (COX1 a 2) přeměněna na řadu škodlivých prostanoidů (např. silně vazokonstrikčně působící prostaglandin F_{2α} a vazokonstrikci a agregaci destiček způsobující tromboxan A₂), kyselina arachidonová je dále lipooxygenázami přeměněna na leukotrieny, jejichž část působí pozitivní chemotaxi polymorfonukleárních leukocytů (PMN) a aktivovaných makrofágů.
- Objevuje se aktivace cysteinové proteázy Calpainu, která rozkládá řadu substrátů, včetně cytoskeletálních proteinů.

Jedním z důsledků poruchy funkce mitochondrií, aktivity cyklooxygenáz a lipooxygenázy a aktivace NOS je tvorba reaktivních kyslíkových radikálů, včetně peroxynitritového anionu (ONOO⁻), který je produktem reakce superoxidového radikálu a oxidu dusnatého. Ačkoliv peroxynitrit může způsobit poškození buňky řadou mechanismů, jako klíčový z nich byla demonstrována peroxidace membránových fosfolipidů (Liu et al., 2005). Tato reakce je katalyzována železem, kterého je v místě poškození tkáně nadbytek (Liu et al., 2004).

Trauma dále indukuje uvolnění endogenních opioidů (zejména dynorfinu A), které dále zhoršují proces poškození míšní tkáně stimulací NMDA receptorů a aktivací opioidních receptorů, které přispívají k cévní dysfunkci a dalším cévním a iontovým poruchám v místě léze.

1.2.3 Experimentální modely míšního poranění

V současnosti existuje řada metod využívaných ke studiu patofyziologických mechanismů traumatického poškození míchy u experimentálních zvířat. Mezi požadavky na dobrý experimentální model patří zejména jednoduchost provedení, reprodukovatelnost, kvantifikovatelnost a maximální anatomická a patofyziologická podobnost s klinickou situací. Ne vždy je možné všechny tyto požadavky splnit; někteří hovoří dokonce o tom, že díky současnému působení kompresivních, angulačních a distrakčních sil, při přihlédnutí k anatomické variabilitě (dokonce i mezi jedinci téhož inbredního kmene) je vytvoření ideálního modelu, který by věrně kopíroval klinickou situaci, prakticky nemožné (Hitchon et al., 1988). Experimentální modely SCI můžeme zhruba rozdělit na „ostré“, které předpokládají částečné nebo úplné přetětí míchy, „neostré“, které využívají kompresi míšní tkáně a modely chemického poškození míšní tkáně.

Nejčastěji jsou využívány modely „neostré“, které přesněji odráží klinickou příčinu nejčastějších typů míšních lézí, zejména pak klasický weight-drop model (Allen, 1911) případně v modifikaci jako NYU impaktor (Gruner, 1992), komprese aneurysmální svorkou (Rivlin a Tator, 1978), elektromagnetický model (Behrmann et al., 1992; Hiruma et al., 1999; Stokes a Jakeman, 2002), nebo balónková kompresní léze (Vanický et al., 2001).

Ostré modely poranění zahrnují hemisekci a transekci míchy (Hultborn a Malmsten, 1983; Zingale, 1989); tyto modely jsou vhodné zejména pro sledování axonální regenerace. Problémem těchto modelů je jejich horší reprodukovatelnost, u transekce je problémem i retrakce pahýlů míchy, u dlouhodobých modelů způsobená také zpomalením růstu přerušené míchy do délky.

Modely chemické míšní léze zahrnují intraspinální injekce excitotoxické quisqualové kyseliny (Yeziarski et al., 1998) a zejména fotochemickou míšní lézi (Verdu et al., 2003), která umožňuje vytvořit míšní poranění bez nutnosti operačního vstupu do páteřního kanálu.

1.2.4 Posttraumatická syringomyelie

U zhruba 25% pacientů s míšním poraněním se vyvine centrálně umístěná cysta, která progresivně expanduje a roztlačuje okolní tkáně (Bunge et al., 1993). Cysta se může vyvinout jak v souvislosti s míšním kanálem, tak i v míšní tkáni. Tento stav se nazývá posttraumatická syringomyelie a je považován za jednu z nejzávažnějších komplikací míšního poranění (Jaksche et al., 2005).

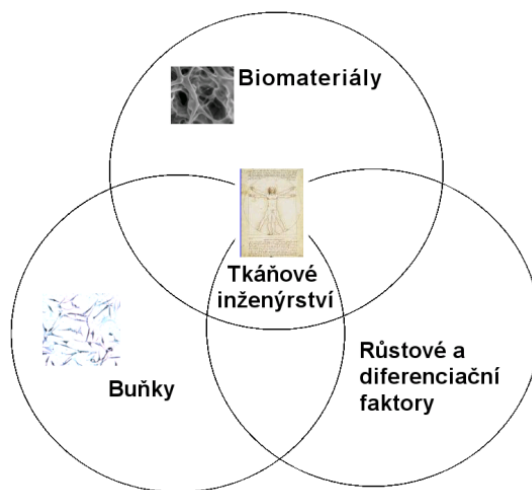
Patofyziologie mechanismů, které způsobují posttraumatickou syringomyelii, není dosud plně popsána; ví se, že na jejím rozvoji se podílejí jak tlakové změny přenášené

mozkomíšním mokem (Greitz, 2006) tak i určité predispoziční faktory, zejména stav míšních obalů (Vannemreddy et al., 2002). Syringomyelii je možné vyvolat souběžnou injekcí excitotoxické quisqualové kyseliny do míchy; rozsah cyst je zvýšen pomocí blokády prostupu tekutinou subarachnoidálním prostorem kaolinem (Yang et al., 2001).

Současné terapeutické postupy zahrnují dekompresivní laminektomii, implantaci syringosubarachnoidální a syringopleurální spojky, míšní transektci, transpozici omenta, rekonstrukci subarachnoidálního prostoru a umělé chirurgické vytvoření meningokély (Sgouros a Williams, 1996). Intraspinální implantáty připravené z fetální nervové tkáně zbrzdily rozvoj posttraumatické syringomyelie u více než poloviny pacientů (Reier, 2004; Thompson et al., 2001).

1.3 Tkáňové inženýrství

Lékařství antiky a středověku, včetně léčby pacientů s míšním poraněním, bylo založeno převážně na paliativním přístupu k bolesti a utrpení. Teprve v osvícenství se setkáváme se systematickým „vědeckým“ přístupem, který v medicíně pomohl rozvoji chirurgie a farmakoterapie. Až do druhé poloviny 20. století byla rozšířená víra, že jediným způsobem jak nahradit poškozenou nebo chybějící tkáň je transplantace. Tkáňové inženýrství dnes slibuje pokročilejší přístup, v rámci kterého mohou být orgány nebo jejich části opraveny, nahrazeny nebo cíleně regenerovány.



Obrázek 1.6. Klasická „triáda tkáňového inženýrství“, zahrnující biomateriály, buňky a růstové a diferenciační (obecně signalizační) faktory; zpracováno podle (Lanza et al., 2000).

Termín „tkáňové inženýrství“ (*tissue engineering*) byl poprvé uveden na konferenci US National Science Foundation (NSF) v roce 1987 jako „**aplikace technologických a**

biomedicínských principů a metod s cílem dosáhnout hlubšího porozumění závislosti funkce a struktury ve zdravé a patologické tkáni, spojená s vývojem biologických náhrad, které obnovují, udržují nebo nahrazují funkci tkáně“. Existují i jiné definice. V publikaci (Langer a Vacanti, 1993) definovali autoři Langer a Vacanti tkáňové inženýrství jako „interdisciplinární obor, který využívá technologických a biomedicínských znalostí pro vývoj biologických náhrad, které obnovují, udržují nebo nahrazují funkci tkáně“; další autoři (Galletti et al., 1995) rozšířili definici na „základní a aplikovaný výzkum biologických náhrad určených k implantaci do organismu nebo ovlivnění tkáňové remodelace za účelem náhrady, korekce, regenerace, rekonstrukce nebo zvýšení funkce.“ S definicemi tkáňového inženýrství se překrývají i popisy dalších v současnosti populárních odborných termínů – *regenerativní medicíny* (Stocum, 2004), *bioinženýrství* (Cooper, 2004) nebo *reparativní biologie* (Lanza et al., 2000). Základní princip tkáňového inženýrství je na obrázku 1.6.

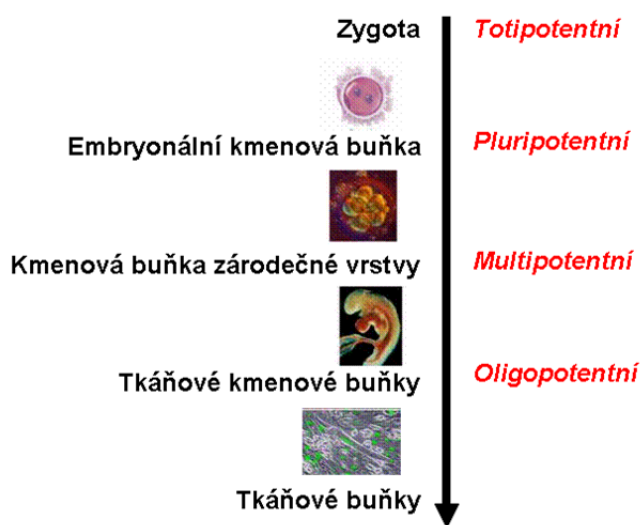
1.3.1 Autologní a alogenní tkáňové náhrady

Vytvoření tkáňové náhrady - například míšní tkáně - v prostředí *in vitro*, vyžaduje nejprve najít zdroj buněk, které budou tvořit její funkční základ. Nejběžnější je využití **autologních buněk** (buněk získaných od příjemce tkáňové náhrady); jejich použití navíc odstraňuje nutnost dlouhodobé imunosuprese. Řada postupů, přehledně dokumentovaných například v (Atala a Lanza, 2002) využívá izolaci a pomnožení různých tkáňově specifických buněk, získaných z biopsií. Nevýhodou využití autologních buněk jsou jednak obtíže při jejich získávání, nezřídka vyžadující operační zákrok, jednak nutnost jejich pomnožení *in vitro*, které je dlouhodobou záležitostí (v řádu měsíců) a v řadě případů vylučuje jejich použití pro řešení akutních klinických situací. Implantace tkáňových náhrad z **alogenních buněk** (buněk dárce) se zvažuje například u genetických onemocnění (Hasegawa et al., 2004). Podobně jako u alogenní transplantace orgánů může být nutná imunosuprese; vhodnými zásahy lze však imunogenicitu buněk výhodně snížit (Sotiropoulou et al., 2006), nebo v buňkách genetickými mechanismy indukovat syntézu žádoucích proteinů, například růstových faktorů (Setoguchi et al., 2004). **Xenogenní buňky** (buňky dárce pocházejícího z odlišného biologického druhu) se uplatňují například v bioartifciálních přístrojích (bioreaktorech) pro podporu funkce jater, kde je typicky využita suspenze porcinních hepatocytů (Ambrosino et al., 2002); mnohem častější je xenogenní dárcovství acelulární tkáně, například srdečních chlopní (Grauss et al., 2005).

1.3.2 Kmenové buňky

Nejsou-li požadované buňky dostupné nebo chceme-li mít lepší kontrolu nad jejich růstem a vývojem, můžeme využít buňky kmenové, které se mohou diferencovat do více druhů tkáňových buněk. Z hlediska rekonstrukce míšní tkáně připadají do úvahy zejména neurony a gliové buňky, které jsou nutné pro vytvoření funkčních nervových obvodů, a které je možné získat diferenciací kmenových buněk *in vitro* (Long et al., 2005). Kmenové buňky jsou uspořádány v hierarchii (obr. 1.7) na jejímž vrcholu stojí oplozené vajíčko (*zygota*), ze kterého vzniká celý jedinec. Pod zygotou jsou v hierarchii buňky *blastocysty* (embryonální kmenové buňky), ze kterých může vzniknout libovolná tkáň v lidském těle. Oproti tomu z tkáňově specifických kmenových buněk může vzniknout jen taková buňka, která se v dané tkáni vyskytuje.

Získání embryonálních a fetálních kmenových buněk je spojeno s řadou komplikací nejen technických, ale i etických (Boer, 1994). Přes úspěch počátečních experimentů s terapií míšní léze embryonálními buňkami (Akesson et al., 2001, 1998) je transplantace embryonálních buněk stále spojena s vysokým rizikem neoplázií, zejména teratomů (Hentze et al., 2009).



Obrázek 1.7. Hierarchie kmenových buněk.

Tkáňově specifické kmenové buňky byly již nalezeny ve většině tkání, včetně nervové (Tarnowski a Sieron, 2006) a vzhledem k tomu, že jejich získání i zpracování není spojeno s etickými komplikacemi, jsou dnes často používány v experimentální terapii neurologických onemocnění. Příkladem tkáňově specifických kmenových buněk mohou být mezenchymové kmenové buňky (Pittenger et al., 1999), nervové kmenové buňky (Podgornyi et al., 2005),

dnes se do této kategorie řadí i kmenové buňky izolované z čichového epitelu (Marshall et al., 2006).

Genetickým reprogramováním buněk dospělého organismu, využívajícím klíčové geny, jejichž aktivace podmiňuje pluripotenci (Oct-3/4, SOX2, c-Myc, a Klf4) se podařilo týmu Prof. Yamanaky v roce 2006 vytvořit pluripotentní buňky z buněk dospělého organismu (Takahashi a Yamanaka, 2006). Tyto buňky se nazývají indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) a jsou dnes slibnou náhradou fetálních a embryonálních kmenových buněk. Po počátečním úspěchu na laboratorních myších byla v roce 2007 pluripotence indukována i u lidských fibroblastů (Takahashi et al., 2007).

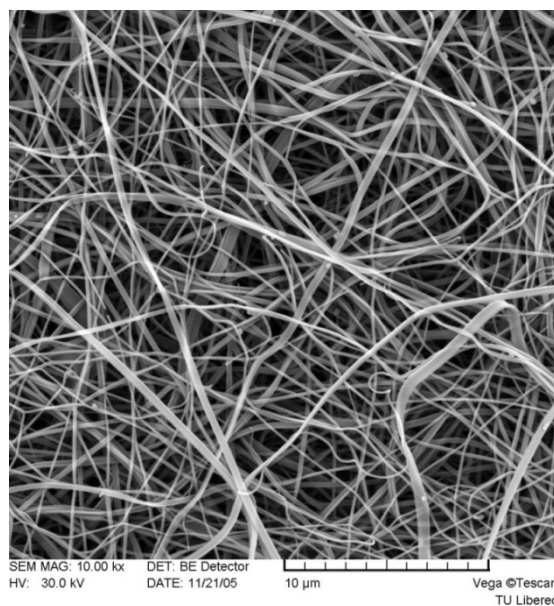
V prostředí *in vitro* roste většina buněčných kultur v jednoduché vrstvě nebo v suspenzi. Jen velice málo buněčných kultur je schopno se samo organizovat ve trojrozměrném prostoru, a pokud k tomu dojde, jako třeba při vzniku neurosfér (Podgornyi et al., 2005), jedná se o růst, který je při absenci regulačních mechanismů velmi špatně organizován. Chceme-li buňky *in vitro* začlenit do trojrozměrné struktury, musíme využít vhodně uspořádané biomateriály, které dovolí prostorový růst buněk.

1.3.3 Biomateriály

Biomateriály mohou být definovány například jako „přírodní i syntetické materiály v kontaktu s tkání, krví nebo tělními tekutinami, mající funkci protetickou, diagnostickou, terapeutickou nebo zásobní, aniž by negativně ovlivňovaly živý organismus nebo jeho součásti“ (Bruck, 1980). V medicíně jsou biomateriály rutinně používány v řadě oborů, zejména v chirurgii. Materiály, které jsou v současnosti využívány nejčastěji, zahrnují jednak **syntetické biomateriály** – kovy (kloubní endoprotézy, kostní šrouby), **keramické biomateriály** (dentální protetika, kloubní náhrady), **kompozity** (kloubní náhrady, protézy srdečních chlopní), **polymery** (chirurgické stehy, náplasti, cévní protézy, kontaktní a nitrooční čočky, infuzní sety, nosiče léčiv aj.) a **biomateriály na bázi biogenních makromolekul**, označované také jako „přírodní biomateriály“ (fibrinové lepidlo, kolagenová pěna).

Semisyntetické biomateriály vznikají úpravami přírodních biomateriálů – vytvořením směsi ve vhodném poměru [Matrigel® (Novikova et al., 2006)], kopolymerizací přírodních a syntetických podjednotek, například chitosanu a polykaprolaktonu (Mei et al., 2005) nebo modifikacemi postranních řetězců biogenních makromolekul: například příprava esterů kyseliny hyaluronové pro tkáňové inženýrství chrupavek (Grigolo et al., 2002).

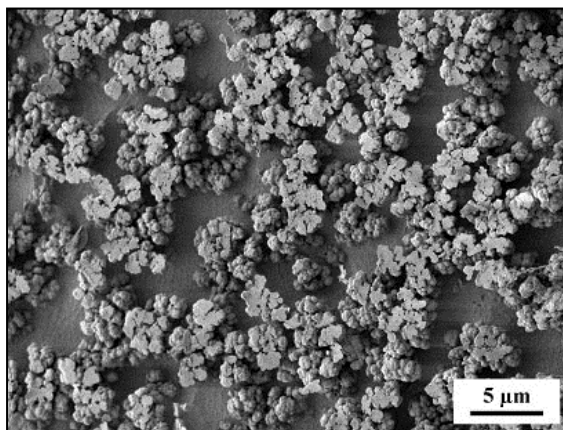
Ve tkáňovém inženýrství jsou nejčastěji využívány biomateriály na bázi syntetických nebo semisyntetických polymerů, jejichž mechanické a chemické vlastnosti je možné regulovat v širokém rozmezí a jejichž příprava je jednodušší, než příprava keramických, kovových nebo kompozitních biomateriálů. Polymery vznikají spojením malých molekul (monomerů) do dlouhých řetězců za použití vhodné látky (iniciátoru), jejímž účinkem lze růst polymerního řetězce „nastartovat“. Polymerní řetězce navíc mohou být navzájem propojeny prostřednictvím fyzikálních nebo kovalentních vazeb za vzniku fyzikální nebo chemické sítě. Příkladem je síťující polymerizace nebo kopolymerizace monomeru (monomerů) za přítomnosti síťujících činidel, tedy látek, které obsahují nejméně dvě polymerizovatelné funkční skupiny. Požadované fyzikální (pevnost, pružnost, hydrofilicita, teplota tání, teplota skelného přechodu) a chemické (přítomnost funkčních skupin a s tím spojená reaktivita, schopnost a rychlost biodegradace) vlastnosti polymerů jsou nastavitelné s dostatečnou přesností a zároveň v relativně širokých mezích. Toho lze docílit například vhodnou volbou monomeru (monomerů), síťovačů, jejich vzájemným poměrem, podmínkami polymerizace, jejím typem (radikálová, aniontová, kationtová, polykondenzace, „ring opening“ polymerizace).



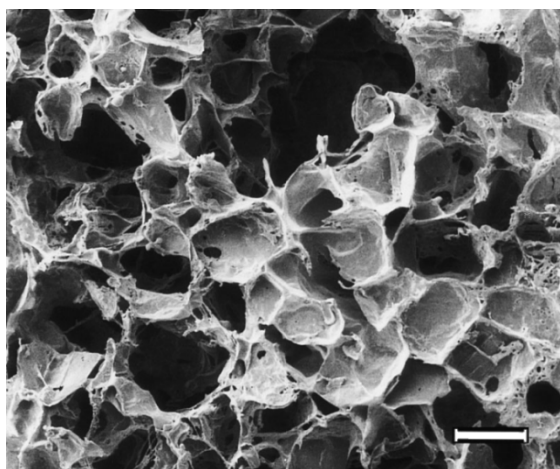
Obr. 1.8. Nanovláknna z EOEMA – příklad dosahování makroporézní struktury pomocí zvláknění polymeru.

Jiný způsob požadované úpravy vlastností polymerů je možnost jejich následné modifikace, nejčastěji povrchové, pomocí vhodných chemických reakcí nebo fyzikálních

postupů. Podstatnou vlastností polymerních biomateriálů určených pro vrůstání buněk z tkáně je jejich porozita, přičemž velikost pórů se musí pohybovat v řádech jednotek až stovek mikrometrů, podle typu vrůstajících buněk (makroporozita). Přitom je nutnou podmínkou, aby póry byly navzájem propojené (komunikující). Postupy, jak dosáhnout porozity lze zahrnout do pěti základních kategorií (Přádný et al., 2009) Jedná se o zvláknění polymeru za vzniku nanovláken nebo mikrovláken (Obr. 1.8), srážecí síťující polymerizaci (obr. 1.9), síťující polymerizaci za přítomnosti pevných, rozpustných částic, které se po polymerizaci z trojrozměrné polymerní struktury vymyjí (obr. 1.10), síťující polymerizaci za přítomnosti látek uvolňujících v jejím průběhu plyny a lyofilizací rovnovážně zbotnalého hydrogelu. S výjimkou nanovláken všechny makroporézní hydrogely obsahují jistou frakci nekomunikujících pórů.



Obr. 1.9. Makroporézní hydrogel na bázi HPMA. Příklad makroporézního hydrogelu vytvořeného srážecí síťující polymerací.



Obr. 1.10. Hydrogel, ve kterém bylo makroporézní struktury dosaženo polymerací v přítomnosti pevného porogenu (krystalků soli). Měřítko = 200 μm.

Na polymery, které mohou přijít do kontaktu s vnitřním prostředím organismu, jsou kladeny vysoké nároky, které jsou v současnosti shrnuty do mezinárodní normy ISO 10993: polymery používané pro lékařské účely musí být zejména netoxické, nekarcinogenní, apyrogenní a nealergizující. Tyto vlastnosti shrnujeme pod pojem biokompatibilita (Tabulka 1.2); další požadované vlastností je například možnost snadné a účinné sterilizace (například v parním autoklávu, v biomateriálech nesmí zůstat nežádoucí rezidua po sterilizaci etylénoxidem apod.).

Oddíl normy	Obsah
ISO 10993-1:2003	Obecné požadavky na evaluaci a testování
ISO 10993-2:2006	Požadavky na péči o experimentální zvířata
ISO 10993-3:2003	Testy na genotoxicitu, karcinogenicitu a reprodukční toxicitu
ISO 10993-4:2002/Amd 1:2006	Výběr vhodných testů interakce biomateriálu s krví
ISO 10993-5:1999	Testy <i>in vitro</i> cytotoxicity
ISO 10993-6:2007	Lokální efekt po implantaci
ISO 10993-7:1995	Rezidua po sterilizaci ethylénoxidem
ISO 10993-9:1999	Základní rámec pro identifikaci a kvantifikaci produktů biodegradace
ISO 10993-10:2002/Amd 1:2006	Testy iritace a pozdního typu hypersenzitivity
ISO 10993-11:2006	Testy systémové toxicity
ISO 10993-12:2002	Příprava vzorků a referenčních materiálů
ISO 10993-13:1998	Identifikace a kvantifikace degradačních produktů polymerů
ISO 10993-14:2001	Identifikace a kvantifikace degradačních produktů keramiky
ISO 10993-15:2000	Identifikace a kvantifikace degradačních produktů kovů a slitin
ISO 10993-16:1997	Zásady toxikokinetických studií pro hodnocení produktů degradace a vymývaných látek
ISO 10993-17:2002	Stanovení povolených limitů pro vymývané látky
ISO 10993-18:2005	Chemické charakteristiky materiálů
ISO/TS 10993-19:2006	Fyzikálně chemické, morfologické a topografické charakteristiky biomateriálů
ISO/TS 10993-20:2006	Principy a metody imunotoxikologického testování

Tabulka 1.2. Základní součásti normy ISO 10993 pro hodnocení implantovatelných biomateriálů (při předpokladu implantace na dobu delší než 30 dní).

Jednou z možných vlastností biomateriálů je **biodegradace**: schopnost rozložit se v organismu, ať už nespecifickými mechanismy (nejčastěji hydrolyticky), nebo působením enzymů, či jiných komponent extracelulární tekutiny. Biodegradovatelné (někdy též nazývané

„vstřebatelné“, „resorbovatelné“ apod.) materiály se postupně dostávají do popředí zájmu a již dnes jsou v řadě lékařských oborů s výhodou využívány (nosiče léčiv, chirurgické šicí materiály).

První výhodou biodegradovatelných materiálů je jejich postupný rozklad a absorpce spojená s transportem rozpadových produktů z místa implantace, na kterém díky tomu nedochází ke vzniku permanentního chronického zánětu. Druhou výhodou je možnost jejich využití ve tkáňovém inženýrství: vhodně načasovaný rozpad vnitřní struktury biomateriálu usnadňuje vrůstajícím buňkám postupnou regeneraci tkáně v místě implantátu. Jedním z prvních úspěšných použití biodegradovatelných materiálů byly resorbovatelné chirurgické šicí materiály na bázi lineárních alifatických polyesterů (polylaktid a polyglykolid; například Vicryl®). Tyto biomateriály patří dnes mezi nejznámější a jejich vlastnosti jsou nejlépe prostudované (Andriano et al., 1999; Blacher et al., 2003; Wang et al., 2005).

1.4 Tkáňové inženýrství při léčbě míšního poranění

Selhání axonální regenerace v CNS je z velké části připisováno neprostupnému prostředí, které se vytváří v místě léze. Ačkoliv řada gliových buněk podporuje regeneraci axonů (Duncan et al., 1981; Ramon-Cueto et al., 1998) a v míše se nachází řada specifických molekul, které podporují růst axonů, případně poskytují vodítka pro jejich směřovaný růst (Walsh a Doherty, 1997); souhrnný efekt všech faktorů, které se v místě léze nacházejí, brání úspěšné regeneraci.

Nachází se zde jak mechanické překážky pro regeneraci axonů (posttraumatické pseudocysty, gliová jizva tvořená aktivovanými astrocyty), tak i řada molekul extracelulární matrix, které inhibují regeneraci axonů. Příkladem inhibičních molekul jsou CSPG (Jones et al., 2003), inhibiční proteiny derivované z myelinu – MAG (McKerracher et al., 1994), peptid NI35 (GrandPre et al., 2000) a Nogo (Chen et al., 2000; Schwab, 2002) nebo semaforiny (Pasterkamp a Verhaagen, 2001; Shifman a Selzer, 2007).

Úspěšná strategie pro regeneraci axonů přes místo SCI musí zahrnovat využití neuroprotektivních faktorů, pozitivních regeneračních podnětů (implantace vhodných buněk, růstové faktory) i překonání negativních vlivů ovlivňujících regeneraci (gliová jizva, pseudocysty, inhibiční molekuly) (Schwab et al., 2006). Technologie tkáňového inženýrství (Samadikuchaksaraei, 2007; Tresco, 2000) nám poskytuje příležitost využít naše znalosti o regenerativních procesech při experimentální terapii míšního poranění, která kombinuje jednotlivé dílčí prvky (například řízené uvolňování neuroaktivních látek, podpůrné buněčné typy a přemostění léze) s cílem vytvořit komplexní terapeutickou strategii.

Ke kompletní transekcii míchy dochází pouze v jedné třetině případů, ale i pokud je mícha v místě poranění nepřerušena, stále je relativně velký rozsah poškození tkáně a jizvení překážkou pro regeneraci dostatečného množství axonů. Chceme-li dosáhnout podstatného zlepšení neurologické funkce, resp. zajistit dostatek axonů regenerujících přes místo poranění, bude ve většině případů nezbytné přemostit poraněnou tkáň takovým materiálem, kterým mohou axony prorůst. Tento materiál může být implantován do cyst, vytvářených při posttraumatické syringomyelii (Wirth et al., 2001) nebo jím může být chirurgicky nahrazena zjizvená míšní tkáň, u které již není možné očekávat, že axony regenerují (Woerly et al., 2001). Materiál použitý k přemostění musí být modifikovatelný například tak, aby mohl být využit k řízenému uvolňování léčiv nebo k transportu vhodných buněk do míšní léze. Počítáme-li s možným využitím i u člověka, musí použité technologie dovolit přípravu implantátů o velkém objemu (až několik cm³) a splňovat normy kladené na zdravotnické prostředky v rámci EU.

Metody tkáňového inženýrství v neurochirurgii, určené k přemostění míšního poranění, zahrnují implantaci biologického materiálu, inertního implantátu nebo kombinaci obojího (Geller a Fawcett, 2002). Největší úsilí bylo investováno do buněčných implantátů přemostujících místo poranění (David a Aguayo, 1981; Duncan et al., 1981; Hofstetter et al., 2002; Cheng et al., 1996; Li et al., 1998). Počáteční úspěchy experimentů se Schwannovými buňkami demonstrovaly, že poškozené axony CNS mohou růst ve vhodném prostředí (David a Aguayo, 1981), později byly tyto experimenty rozšířeny o použití olfaktorických gliových buněk (Garcia-Alias et al., 2004; Li et al., 1998; Marshall et al., 2006; Ramon-Cueto et al., 1998), geneticky modifikovaných fibroblastů (Liu et al., 2000) nebo fetální míšní tkáň (Akersson et al., 2001). Řada jiných výzkumníků se soustředila na použití acelulárních implantátů, vytvořených z biokompatibilních materiálů (Plant et al., 2001; Woerly et al., 2004), případně na kombinaci biokompatibilního nosiče a vhodné buněčné populace (Bamber et al., 1999; Rochkind et al., 2002; Rochkind et al., 2006; Teng et al., 2002; Xu et al., 1999).

1.5 Přemostění míšního poranění biologickým materiálem

Prvními historicky zaznamenanými experimenty s přemostěním míšní léze byly pokusy napodobující podmínky transplantace nebo autotransplantace. V Kanadě Shirres (1905) implantoval mezi míšní pahýly člověka psí míchu a v USA Wolsey a spol. (1944) implantovali formalinizovanou míchu lidskou. Při transplantaci biologického materiálu do míšního poranění je však nutné zvážit několik základních podmínek, které ovlivňují úspěšnost zvolené implantační strategie:

- Vývojové stádium implantované tkáně; nezralá tkáň je schopna přežít déle, než její plně vyzrálý protějšek. Řada obecných charakteristik nezralé, zejména fetální, tkáně ji činí velmi vhodným implantačním materiálem (Auerbach, 1988): (1) buňky fetální tkáně se rychle replikují a mohou se diferencovat do fungujících zralých buněk, (2) výživa, zajišťovaná vrůstáním kapilár hostitele, je dobře přijímána a pravděpodobně je vrůstání hostitelských kapilár aktivně podporováno, (3) fetální tkáň je možné kryoprezervovat, immortalizovat, skladovat a kultivovat. Tyto vlastnosti, které činí fetální tkáň zvláště výhodnou pro implantace do míšního poranění, ubývají během jejího vyžívání.
- Imunitní systém hostitele tvoří jednu z hlavních překážek pro transplantaci tkání nebo orgánů. S výjimkou transplantace vlastní tkáně (autograft), nebo imunologicky totožné tkáně jednovaječného dvojčete (isograft) dochází u imunologicky kompetentních hostitelů k odmítnutí (reakci) transplantované tkáně dárce; míra reakce je ovlivněna jednak stupněm tkáňové kompatibility mezi dárce a hostitelem a jednak přítomností látek s imunosupresivním účinkem. Ačkoliv se dlouho předpokládalo, že CNS má v organismu imunoprivilegovanou roli (Lund et al., 1987; Widner et al., 1988), poslední výzkumy ukazují, že ačkoliv implantáty jedince stejného druhu (allografty) ve tkáni CNS přežívají, aniž by indukovaly reakci, implantáty od dárce odlišného druhu (xenografty) vyvolávají reakci (Borlongan et al., 1996). Předpokládá se tedy, že ačkoliv určitá imunologická výlučnost tkáně CNS existuje, funkce imunitního systému v CNS musí být stále studovány.
- Implantace naruší na několik dní hematoencefalickou bariéru (Broadwell, 1988; Broadwell et al., 1989) a rozvoj hematoencefalické bariéry v implantátu dále ovlivňuje vlastnosti implantovaného materiálu.
- Schopnost implantátu zajistit si dostatečně rychle přísun živin a kyslíku z hostitelské tkáně je – zejména v případě jeho větších rozměrů – důležitá pro jeho přežití. Postupný rozvoj krevního zásobení implantátu může probíhat až 1 týden (Broadwell et al., 1991). Neúspěch při implantaci může být v některých případech způsoben právě neschopností implantovaného materiálu „napojit“ se na krevní řečiště hostitele (Bjorklund et al., 1983). Řešením může být implantace blízko bohatě prokrvené oblasti při povrchu nervové tkáně, nebo indukce novotvorby krevních cév v blízkosti

implantátu, v případě implantátů vytvořených metodami tkáňového inženýrství můžeme zvažovat obohacení implantátu buňkami zakládajícími krevní řečiště.

- V řadě případů jsou výběžky nervových buněk schopny prorůst do implantátu, nejsou však schopné jej opustit a vrůst zpět do míšní tkáně. Tento problém se v literatuře označuje jako „*off-ramp*“ (Geller a Fawcett, 2002) a pro jeho překonání je dnes zvažována řada strategií, včetně např. implantace buněk olfaktorické glie (Garcia-Alias et al., 2004; Marshall et al., 2006).

Jako materiály dovolující axonální regeneraci již byly experimentálně transplantovány periferní nervy, tkáň fetálního CNS, případně implantáty vytvořené z pomnožených Schwannových buněk nebo jiných buněčných linií.

1.5.1 Implantace periferních nervů do míšního poranění

Při poranění periferních nervů dochází k strukturální a funkční regeneraci, která již byla mnohokrát popsána a je rutinně využívána v neurochirurgii. Při poranění neuronů v CNS však je již dlouho známo, že nedochází k jejich regeneraci na větší vzdálenosti (Ramon y Cajal, 1928). Hranice mezi periferním a centrálním nervovým systémem (resp. mezi myelinizací oligodendrocyty a Schwannovými buňkami, Redlich-Obersteinerova zóna) je v současnosti považována za hranici schopností regenerace nervové tkáně (Aguayo et al., 1981). Tato pozorování naznačují, že okolní prostředí periferních nervů je stejně důležité pro úspěšnou regeneraci, jako vrozená schopnost neuronů regenerovat, a že složení dospělé CNS hraje značnou roli při omezování regenerace axonů na větší vzdálenosti.

Klasické experimenty (Benfey a Aguayo, 1982; David a Aguayo, 1981; 1985; Richardson et al., 1982), při kterých byly k přemostění míšní léze využity transplantáty periferních nervů (Wilson, 1984) prokázaly schopnost axonální regenerace dospělých neuronů nacházejících se v CNS, jsou-li vystaveny prostředí obdobnému v periferních nervech. Zatímco vrůstání axonů do transplantátů z periferních nervů bylo pozorováno opakovaně a ve značné míře, jen malý počet axonů byl schopen opustit transplantát a vytvořit synaptická spojení s jinými neurony v CNS (Carter et al., 1989; Keirstead et al., 1989; Vidal-Sanz et al., 1987).

1.5.2 Intraspinální transplantace fetální tkáně

Zhruba ve stejné době, ve které byly provedeny počáteční studie transplantátů na bázi periferních nervů, oznámilo několik výzkumných skupin povzbuzující výsledky dosažené po

transplantaci fetální míšní tkáně do kavity vzniklé po akutní lézi (Das, 1983; Reier et al., 1986). Transplantáty srostly s přilehlou hostitelskou míšní tkání a zabránily degeneraci poraněných supraspinálních neuronů v mozковém kmeni (Bregman a Reier, 1986). Pokud byly implantáty v modelu míšního poranění vloženy do posttraumatické pseudocysty, výrazně zmenšily její velikost, jak bylo opakovaně potvrzeno histologicky (Anderson et al., 1995; Bernstein et al., 1984; Stokes a Reier, 1992). Samotné transplantáty z fetální míšní tkáně však byly jen málo efektivní pro vyvolání regenerace přilehlé míšní tkáně; vrůstalo do nich jen málo axonů okolních neuronů a tyto axony nebyly schopné implantátem prorůst na opačnou stranu (Jakeman a Reier, 1991).

Lidská fetální tkáň byla využita v několika klinických studiích malého rozsahu (Akesson et al., 1998; Blagodatskii et al., 1994; Falci et al., 1997; Wirth et al., 2001), které prokázaly bezpečnost tohoto postupu; u pacientů však nedošlo ke konzistentnímu zlepšení neurologických funkcí a přes podávanou imunosupresi nebylo prokázáno přežití transplantované fetální tkáně. Implantace fetální míšní tkáně u pacientů s posttraumatickou syringomyelií vedla u několika pacientů ve studiích k částečné obliteraci kavit potvrzené MRI (Reier, 2004). Společnost Neuralstem experimentálně ověřuje implantaci buněčné linie NSI-566 získané z lidské fetální míchy do míšního léze (van Gorp et al., 2013).

Alternativním přístupem k léčbě onemocnění CNS je využití buněčné linie z fetálního mozku immortalizované například vložením genu c-mycER(TAM), který podmiňuje masivní proliferaci buněk v přítomnosti syntetické látky 4-hydroxy-tamoxifenu. Takto immortalizované buňky byly úspěšně využity v léčbě ischemické léze mozku (Pollock et al., 2006) a po rozsáhlých preklinických testech (Stroemer et al., 2008; Stroemer et al., 2009) vstoupil jejich výrobce, anglická společnost ReNeuron do fáze klinického hodnocení (první výsledky klinických hodnocení PISCES a PISCES-II jsou očekávány v roce 2015).

1.5.3 Mezenchymové kmenové buňky v léčbě míšního poranění

Poznatek že kostní dřeň dospělého člověka obsahuje populaci kmenových buněk, není nový. Hematopoetické kmenové buňky, které jsou zodpovědné za tvorbu trombocytů a buněk červené i bílé krevní řady byly popsány před více než 40 lety (Becker et al., 1963; Till a McCulloch, 1961). Stromální (mezenchymové) multipotentní kmenové buňky kostní dřeně – heterogenní buněčná populace schopná diferenciace do kostní, chrupavčité, tukové a vazivové tkáně – byly popsány krátce po objevu hematopoetických kmenových buněk (Friedenstein et al., 1970; Friedenstein et al., 1966; Owen a Friedenstein, 1988). Během posledních let byla prokázána diferenciace mezenchymových kmenových buněk do řady buněčných typů,

pocházejících nejen z mezodermu, ale také z ektodermu – z tohoto hlediska by byla významná možnost jejich transdiferenciace na neurony a glie. Tato transdiferenciace byla poprvé popsána v roce 2002 (Zhao et al., 2002); v pozdějších letech ji některé výzkumné skupiny potvrdily (Darabi et al., 2013; Jiang et al., 2012); některé analýzy však známky transdiferenciace mezenchymových kmenových buněk zpochybňují (Montzka et al., 2009).

Mezenchymové kmenové buňky (MSC) jsou vřetenovité buňky morfologicky podobné fibroblastům, které při počátečním růstu *in vitro* tvoří před první trypsinizací kolonie. Na svém povrchu neexprimují hematopoetické povrchové znaky (CD14, CD31, CD34, CD45 a CD133), naopak exprimují povrchové znaky CD13, CD44, CD54, CD55, CD73, CD90, CD105 a CD166 (Pittenger et al., 1999). *In vitro* se diferencují nejen do mezodermálních buněčných typů – osteocytů (Justesen et al., 2002; Kassem et al., 1993), adipocytů (Justesen et al., 2002) a chondrocytů (Johnstone et al., 1998), ale i do linií jiných než mezodermálních – hepatocytů (Avital et al., 2001) nebo buněk neurálního typu (Koshizuka et al., 2004; Long et al., 2005; Yang et al., 2006; Zhao et al., 2002). V roce 2006 byla definována minimální kritéria pro klasifikaci MSC buněk dokumentem Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii (Dominici et al., 2006).

V současné době existuje více metod izolace mezenchymových kmenových buněk. Tyto metody jsou založeny na biologických vlastnostech MSC, zejména na jejich selektivní adhezi k plastu pro tkáňové kultury (Kassem et al., 1993), nebo na jejich imunologických vlastnostech (Reyes et al., 2001; Simmons a Torok-Storb, 1991).

Preklinické experimenty s transplantací mezenchymových kmenových buněk do místa míšní léze ukázaly, že transplantované buňky mohou napomáhat tvorbě funkčních okruhů v CNS (Čížková et al., 2006; Deng et al., 2006; Hofstetter et al., 2002; Koshizuka et al., 2004; Mansilla et al., 2005). Nejnovější výzkumy ukazují, že na efektu intratekálně podaných MSC se významně podílí modulace cytokinové pro a protizánětlivé odpovědi v míše (Urdziková et al., 2014).

V posledních několika letech se rovněž začínají objevovat práce popisující klinické zkušenosti s buněčnou terapií u pacientů po míšním traumatu. Většinou se jedná o lokální nebo systémové podání kmenových buněk kostní dřeně, které je v některých případech spojené se stimulací uvolňování kmenových buněk z kostní dřeně vyvolané podáním G-CSF (Kim et al., 2006; Koda et al., 2007; Park et al., 2005; Syková a Jendelová, 2006; Urdziková et al., 2006). Všechny dosud publikované klinické studie se týkaly malého počtu pacientů a byly zaměřeny zejména na ověření bezpečnosti navrženého postupu buněčné terapie. Přestože v řadě těchto prací je popisováno zlepšení neurologického deficitu po prodělané buněčné

terapii, budou pro ověření statistické významnosti účinnosti této terapie zapotřebí další studie s větším počtem pacientů.

1.6 Přemostění míšního poranění inertními implantáty

Dalším přístupem pro rekonstrukci míšního defektu je jeho přemostění s využitím inertních biomateriálů. První pokusy v tomto směru zahrnovaly přemostění míšního defektu pomocí uhlíkových vláken (Chauhan et al., 1999) nebo nitrocelulózových membrán obohacených o růstové faktory (Houle a Johnson, 1989; Houle a Ziegler, 1994). Biomateriály určené pro implantaci do míšní tkáně musí však splňovat několik základních předpokladů (Geller a Fawcett, 2002):

- Materiál, ze kterého je implantát vytvořen musí poskytovat substrát pro adhezi a růst axonů a dalších komponentů tkáně CNS; nesmí vyvolávat reakci na cizí těleso ani iritovat míšní tkáň.
- Biomechanické vlastnosti použitého materiálu – zejména modul pružnosti v tlaku a v tahu – musí být co nejpodobnější tkáni CNS, do které je biomateriál implantován.
- Vnitřní prostory biomateriálu musí poskytovat dostatek prostoru pro vrůstání elementů, jejichž velikost je v řádech desítek mikrometrů: perikaryí neuronů, gliových buněk a kapilár.
- Biomateriál nebo jeho degradační produkty nesmí být toxické a nesmí stimulovat imunitní odpověď.
- Povrchové vlastnosti biomateriálu musí být možné široce modifikovat tak, aby jeho povrch mohl být obohacen o molekuly podporující růst buněk (v nejlepším případě převážně nervových a gliových buněk), elongaci a směrování axonů. Výhodou je také schopnost potlačit růst buněčných populací, které mají inhibiční účinek na regeneraci.

Z hlediska původu používaných materiálů je možné rozdělit biomateriály využívané k terapii míšního poranění na **biodegradovatelné** materiály, připomínající strukturu extracelulární matrix (nejčastěji na bázi biogenních makromolekul – agarózy, kolagenu, fibrinu, fibronektinu, kyseliny hyaluronové) nebo syntetické (cukerné polymery, polyaminokyseliny nebo polyanhydridy) a materiály **nebiodegradovatelné**, nejčastěji na bázi polymerních hydrogelů.

1.7 Biodegradovatelné implantáty

Tkáň CNS je složena z buněk a extracelulární matrix (ECM), která je buňkami syntetizována. V organismu představuje růst neustálou obměnu buněk, které vytvářejí ECM, a ta pak slouží jako strukturální základ pro růst dalších buněk; ECM prodělává tedy během života jedince kontinuální přestavbu (Lindstedt a Prockop, 1961). Regulace růstu buněk a syntézy ECM je řízena složitými mechanismy, které nejsou zatím zcela poznány. ECM nervové tkáně obsahuje některé specifické strukturální proteiny a glykoproteiny zejména laminin (Sephel et al., 1989) a fibronectin (Horáček et al., 1993) a tenasciny (Chiquet-Ehrismann, 1995); v rámci ECM tvoří tyto molekuly komplexní pericelulární síť například s hyaluronovou kyselinou (Asher et al., 1991) nebo proteoglykany (například CSPG (Celio a Blumcke, 1994)). Uváděné proteiny nebo jejich specifické domény (RGD, IKVAV, YIGSR) se často stávají základní stavební složkou biodegradovatelných implantátů.

Tkáň CNS obsahuje také řadu biodegradačních enzymů (Romanic a Madri, 1994), mezi kterými převažují mikroglií a astrocyty produkované metaloproteinázy (Maeda a Sobel, 1996) a nespecifické serinové proteázy (Scarlsbrick et al., 2001). V období po poranění prodělává extracelulární matrix přestavbu, objevují se vysoké koncentrace některých metaloproteináz (Buss et al., 2007) a proteoglykanů, které inhibují regeneraci axonů (Monnier et al., 2003).

Po implantaci biodegradovatelného biomateriálu (například chirurgického šicího materiálu na bázi polylaktidů nebo kolagenové matrice) začne docházet k jeho postupnému rozkladu. Základní dva procesy, které jsou součástí biodegradace, jsou **hydrolýza** – nespecifický rozklad materiálu ve vodném prostředí a **proteolýza** – biodegradace působením výše uvedených tkáňových enzymů.

Implantáty simulující strukturu extracelulární matrix, které byly připraveny z agarózy samotné nebo obsahující proteiny ECM (laminin) stimulovaly trojrozměrný růst neuritů buněk dorsálních ganglií (Dillon et al., 1998; Yu et al., 1999). Agarózové hydrogely je snadné získat a modifikovat jejich biomechanické vlastnosti; jejich nevýhodou je některými autory uváděné riziko zánětlivé reakce (Cadic-Amadeuf et al., 1992; Kao et al., 1999) v okolí agarózového implantátu.

V roce 1990 začaly experimenty s implantáty na bázi samotného kolagenu (de la Torre a Goldsmith, 1990; Gelderd, 1990; Marchand et al., 1993), kolagenu obsahujícího neuroaktivní látky (Goldsmith a de la Torre, 1992) nebo síťovaného *in situ* glyoxalem (Marchand a Woerly, 1990). Při implantaci do míchy po transekcii došlo u kočky ke zlepšení

regionálního krevního průtoku, vrůstání neuronálních výběžků a v jednom experimentu i k prokázané novotvorbě synapsí (Goldsmith a de la Torre, 1992). K regeneraci míšní tkáně nedocházelo, byl-li kolagen před implantací do míchy síťován (Joosten et al., 1995). Další molekuly ECM, které se staly základem implantovaných biodegradovatelných hydrogelů, jsou kyselina hyaluronová (Horn et al., 2007), fibronektin (King et al., 2006) nebo purifikované proteiny bazální laminy (Matrigel®, BD Biosciences) (Novikova et al., 2006).

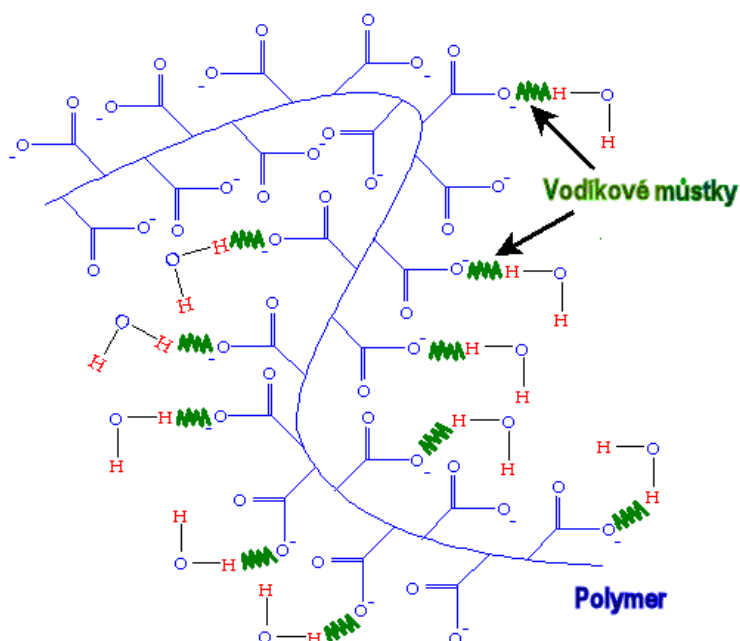
Přesto, že samotná adheze zprostředkovaná in situ síťovaným fibrinogenem využívaným k „lepení“ tkání (např. Tissucol®, Baxter) nestačí k plné obnově funkce přerušené míchy (Li a Zhao, 2008), je fibrinové lepidlo často využíváno v experimentální terapii míšních lézí jako nosič buněk (Iwakawa et al., 2001) nebo růstových faktorů (Iwaya et al., 1999).

Do skupiny biodegradovatelných implantátů patří i biomateriály na bázi polymerních polyesterů alfa hydroxykyselin (zejména polylaktidu, polyglykolidu a polykapronolaktonu). Tyto biomateriály jsou hydrolyticky biodegradovatelné i ve tkáni CNS (Stendel et al., 2001) a jejich štěpením vznikají netoxické rozpustné nízkomolekulární degradační produkty (například kyselina mléčná). Na rozdíl od biomateriálů na bázi biogenních makromolekul, které mají homogenní gelovitou strukturu, musí být tyto implantáty připraveny jako makroporézní (Blacher et al., 2003; Patist et al., 2004; Wang et al., 2005).

1.8 Využití makroporézních hydrogelů k terapii míšního poranění

Požadavek na zajištění vysokého stupně biokompatibility, vhodných mechanických parametrů a dostatečného vnitřního prostoru, ve kterém mohou probíhat regenerativní procesy tkáně CNS vedl řadu autorů k využití makroporézních hydrogelů na bázi vhodných biokompatibilních polymerů.

Hydrogely jsou hydrofilní sloučeniny, jejichž chemická struktura umožňuje vazbu určitého množství molekul vody (Obr. 1.11). Vlastnosti hydrogelů se přibližují vlastnostem živé tkáně (Corkhill et al., 1989). Průkopníkem použití hydrogelů v biomedicíně byl český chemik Otto Wichterle (Dreifus a Wichterle, 1964; Wichterle et al., 1961), který syntetizoval hydrogel na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) síťovaného ethylendimethakrylátem (EDMA), a vyrobil z něj první měkké kontaktní čočky. Úspěchem kontaktních čoček začal celosvětový zájem o lékařské aplikace hydrogelů, které jsou dnes využívány také k řízenému uvolňování léků (Teijon et al., 1997; Wheeler et al., 1996), jako kryty ran (Tsou et al., 2005; Wheeler et al., 1996) i jako tkáňové náhrady (Belkas et al., 2005).



Obr. 1.11. Struktura polymerního hydrogelu s příkladem vazby molekul vody

Pro dosažení tkáňové regenerace CNS v polymerním makroporézním hydrogelu je obvykle nutné použít materiál s komunikujícími póry, aby byl propustný pro růst buněk a nervových vláken (Woerly et al., 1990).

S rostoucím obsahem vody v rovnovážně zotlnalém hydrogelu postupně klesají hodnoty mechanických vlastností až do té míry, že při určitém kritickém stupni nabotnění už nelze se vzorkem manipulovat bez porušení jeho celistvosti. Zároveň se snižuje adheze buněk k polymeru (Nagaoka et al., 1990).

Homogenní neporézní hydrogely, zpravidla ve formě tenkých plošných fólií, jsou jako kultivační podložky spojeny převážně s plošným růstem buněk. Pro trojrozměrný růst buněk, např. pro tkáňovou regeneraci v hydrogelu, je nezbytné vytvoření porézní struktury. Pokud je velikost pórů (porozita) srovnatelná s velikostí buněk [10 až 40 μm (Woerly et al., 1990)] a pokud jsou póry propojené (komunikující), mohou v nich buňky růst ve všech třech rozměrech. Takovýmto hydrogelům říkáme „makroporézní hydrogely“ (někteří autoři také používají termín „hyperporézní“ nebo „superporézní“). V řadě experimentů byly jako implantáty do CNS využity makroporézní polymerní hydrogely na bázi HEMA (Giannetti et al., 2001; Mokřý et al., 2000), GMA (Woerly et al., 1992; Woerly et al., 1990) nebo HPMa.

1.8.1 Makroporézní hydrogely na bázi HPMa

V roce 1990 byly položeny teoretické základy nezbytné pro přípravu polymerních hydrogelů implantovatelných do nervové tkáně (Woerly et al., 1990). Jako základní materiál

pro přípravu implantátů byly ve všech zde popisovaných pracích zvoleny hydrogely na bázi derivátů methakrylové kyseliny syntetizované na pracovišti Ústavu makromolekulární chemie AV ČR.

Při první implantaci makroporézních hydrogelů na bázi kopolymerů HEMA a GMA, s porozitou v řádu jednotek mikrometrů (Woerly et al., 1990), byla pozorována dobrá tkáňová kompatibilita všech implantovaných materiálů. Ke vrůstání tkáně však došlo pouze u makroporézních hydrogelů, jejichž póry byly vyplněny kolagenem. Další experimenty prokázaly, že v negativně nabitých hydrogelech na bázi GMA (tj. hydrogelech připravených z GMA a MA) vrůstají astrocytické výběžky do hydrogelu a tvoří se gliální síť v okrajových oblastech hydrogelu (Woerly et al., 1992).

Mezi polymery s potenciálem vytvořit implantovatelnou matici pro regeneraci tkáně CNS patří i polymery na bázi N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA). Růst buněk zachycených v polymerní struktuře po dobu 6 dnů prokázal jeho vysokou biokompatibilitu (Woerly et al., 1996). Po implantaci do optického traktu laboratorního potkana docházelo k dobré adhezi hydrogelů na bázi HPMA k nervové tkáni; počet vrůstajících výběžků nervových buněk byl nejvyšší u hydrogelů, jejichž povrch byl modifikován RGD sekvencemi na diglycinovém spaceru (Plant et al., 1997).

Společné experimenty Dr. Woerlyho a Prof. Sykové prokázaly vrůstání elementů nervové tkáně do hydrogelů na bázi HPMA obsahujících RGD sekvence a implantovaných do transekované míchy laboratorního potkana (Woerly et al., 1999; Woerly et al., 1998). V těchto experimentech byla pro hodnocení vnitřního prostoru hydrogelu použita společně se rtuťovou porozimetrií také metoda hodnocení difúze iontů TMA^+ , která byla popsána Nicholsonem (Nicholson a Phillips, 1981) a modifikována Sykovou pro hodnocení v nervové tkáni (Nicholson a Syková, 1998; Syková a Nicholson, 2008).

1.8.2 Moderní trendy v oblasti hydrogelů pro léčbu míšního poranění

Inovace v biomedicině urychlují vývoj nových biomateriálů pro experimentální terapie míšní léze. Tyto nové materiály jsou velmi často založeny na polymerních hydrogelech, jejichž vlastnosti jsou modifikovány novými postupy pro zvýšení regeneračního potenciálu po implantaci.

Implantovaný biomateriál musí umožnit a facilitovat prorůstání zejména axonálních vláken vedoucích motorické a senzitivní signály. Z tohoto hlediska byla navržena řada komplexních vnitřních architektur implantovatelných biomateriálů, zahrnujících vodící struktury ve směru vláken, v některých případech kombinovaných s gradienty signalizačních

látek (Alsmadi et al., 2015). Původní experimenty využívající orientovaná vlákna (Flynn et al., 2003; Mo et al., 2004) nahrazují technologie vytvářející v hydrogelu orientované póry vzniklé například krystalizací oxalátu (Kubinová et al., 2013; Kubinová et al., 2014) nebo ledových krystalů (Francis et al., 2013). Výzkum dnes jednoznačně směřuje k metodám založeným na 3D tisku, který umožňuje vytvořit požadovanou vnitřní morfologii hydrogelů s vysokou přesností (Hsieh et al., 2015).

Komplikací při experimentální léčbě míšní léze je požadavek na otevřenou operační metodu, která je nezbytná k implantaci biomateriálu do cysty nebo mezi pahýly míchy. Tento nedostatek odstraňují injikovatelné biomateriály na bázi samoorganizujících se polypeptidů (Chen, 2014) nebo hydrogelů (Li et al., 2013; Yamanaka et al., 2015). Tyto materiály mohou být vpraveny do místa léze mikrooperačními technikami (Li et al., 2013; Pakulska et al., 2012), které způsobují jen minimální trauma v okolní tkáni (například injekčně).

Samotné polymerní hydrogely jsou biokompatibilní, ale inertní: neposkytují buňkám žádná vodítka k růstu. Navigace buněk po jejich povrchu může být usnadněna a modifikována prostřednictvím modifikace jejich povrchů. Podpora buněčné adheze a diferenciace a růstu neuritů může být zvýšena prostřednictvím vybraných signalizačních domén fibronektinu a lamininu, jako jsou RGD, YIGST a novější IKVAV (Kubinová et al., 2013). Hydrogely mohou být obohaceny o neurotropní látky s řízeným uvolňováním (Schurig et al., 2015) nebo v gradientu umožňujícím směrovaný růst vláken (Alsmadi et al., 2015; Horn-Ranney et al., 2013).

Novým přínosem jsou elektricky vodivé biomateriály, které patří do polymerů nové generace a mohou být využívány jak samostatně pro vedení vzruchů, tak i v kombinaci s jinými polymery a bioaktivními molekulami k vytváření základů pro neuroprotektiku. Dnes je již popsáno přes 25 podobných systémů (Balint et al., 2014); nejvíce zkoumaný je polyanilin, poly(3,4-ethyldioxythiophen) a zejména polypyrrol (Huang et al., 2010; Park et al., 2014). Elektrická stimulace buněk prostřednictvím kombinovaného polypyrrol-chitosanového nosiče zvýšila sekreci růstových faktorů kmenových buněk a buněk olfaktorické glie (Huang et al., 2010; Qi et al., 2013). Implantáty na bázi polypyrrolu v experimentu napomohly k obnově motorické funkce potkanů po transekcii míchy (Cruz et al., 2012).

Obecně je přijímáno, že budoucí způsob terapie míšní léze bude využívat kombinaci více faktorů (Kubinová a Syková, 2012; McCall et al., 2012) – vhodný nosič (například na bázi polymerních hydrogelů) v kombinaci s neurotrofními faktory, neutralizací inhibičních faktorů a transplantací vybraných buněk. Příkladem může být studie (Guo et al., 2012), ve které autoři použili neurální progenitorové buňky v kombinaci s chitosanovým hydrogelem

potaženým lamininem. Biomateriál navíc řízeně uvolňoval rozpustnou formu Nogo-66 receptorového proteinu, bFGF, EGF a PDGF s cílem zablokovat inhibiční efekt myelinu, podpořit růst axonů a prodloužit přežívání transplantovaných buněk. Studie ukázala, že kombinace uvedených faktorů měla synergistický efekt na přemostění míšní tkáně, nicméně nepodařilo se zatím dosáhnout funkčního propojení. Kombinace různých faktorů a dosahování jejich synergie je stále považováno za nejefektivnější cestu k léčbě míšní léze (Kubinová a Syková, 2012; McCreedy a Sakiyama-Elbert, 2012).

2 Hypotézy a cíle práce

Cílem mé disertační práce bylo přispět k prohloubení poznatků o možnostech regenerace tkáně centrálního nervového systému. Hlavní pozornost jsem věnoval regeneraci míšní tkáně s využitím makroporézních hydrogelů. Vycházel jsem přitom z následujících hypotéz:

1. Je tkáň CNS (mozku, míchy) včetně výběžků nervových a gliových buněk, schopna vrůstat do implantovaných makroporézních polymerních hydrogelů na bázi HEMA?
2. Rostou v hydrogelech na bázi HEMA *in vitro* mezenchymové kmenové buňky?
3. Závisí míra vrůstání jednotlivých tkáňových elementů *in vivo* a růst buněk *in vitro* do polymerních hydrogelů na elektrickém náboji povrchu polymeru?
4. Zvýší se zvlákněním polymerního hydrogelu do podoby nanovláken pomocí elektrospinningu míra adheze buněk *in vitro*?
5. Závisí efekt implantace biodegradovatelných materiálů do míšní léze na kinetice biodegradace těchto biomateriálů?

Pro testování výše uvedených hypotéz o vlastnostech hydrogelů na bázi HEMA a mechanismech regenerace míšní tkáně jsem zvolil následující cíle práce:

1. Připravit biokompatibilní makroporézní hydrogely na bázi kopolymerů HEMA, vhodné k implantaci do defektů tkáně CNS. Vytvořit fyzikální model, který umožní upřesnit parametry výsledného materiálu – celkovou plochu, objem pórů apod. Ověřit, že připravený hydrogel umožňuje difúzi nízkomolekulárních sloučenin a obsahuje komunikující póry.
2. Ověřit biokompatibilitu připraveného materiálu na modelu *in vivo*. Po implantaci hydrogelu do kortexu laboratorního potkana porovnat připravený hydrogel s materiálem NeuroGel™ (hydrogelem na bázi HPMA připraveným srážecí

polymerizací). Na základě zjištěných výsledků modifikovat návrh biomateriálu tak, aby byl efekt jeho implantace srovnatelný s hydrogelem na bázi HPMA.

3. Zjistit závislost růstu buněk v hydrogelu na elektrickém náboji, vnitřní struktuře biomateriálu a morfologii jeho povrchu. Implantovat připravené biomateriály do hemisekce míchy laboratorního potkana a sledovat regeneraci míšní tkáně v hydrogelu. Vyhodnotit závislost růstu jednotlivých elementů nervové tkáně v hydrogelu na elektrickém náboji a morfologii jeho povrchu. Porovnat různé morfologie biomateriálů (porézní hydrogely, nanovlákná) z hlediska jejich biologických vlastností.

4. Modifikovat biomateriál, ze kterého je makroporézní hydrogel složen tak, aby byl hydrolyticky biodegradovatelný. Vyhodnotit závislost regenerace míšní tkáně v hydrogelu na době biodegradace hydrogelu. Upravit průběh biodegradace hydrogelu takovým způsobem, aby se maximalizovalo vrůstání elementů míšní tkáně do hydrogelu a vyhodnotit implantaci takto připraveného hydrogelu do míšní tkáně.

5. Implantovat vhodný hydrogel u laboratorního potkana 1 týden po transekcii míchy a ověřit regeneraci tkáně míchy v hydrogelu jako metodu experimentální terapie míšní léze.

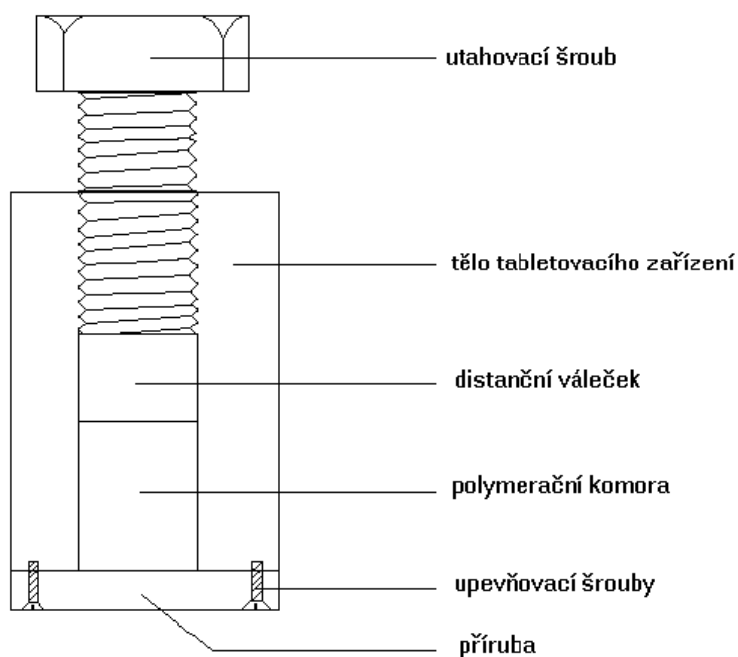
3 Metodika

3.1 Příprava kopolymerů HEMA-MA

Makroporézní hydrogely byly připraveny v tabletovacím zařízení podle obrázku 3.1. přičemž byly použity následující směsi, lišící se koncentrací kyseliny methakrylové:

2-hydroxyethylmethakrylát	0.67 g
azobis(isobutyronitril)	0.0067 g
chlorid sodný	10.02 g
1,2-ethylendimethakrylát	0.019 g
polyethylenglykol, Mw = 400	3.79 g
kyselina methakrylová	0-17.9% vztaženo na hmotnost polymeru

Tab. 3.1. Polymerizační směs pro přípravu hydrogelů HEMA-MA.



Obr. 3.1. Tabletovací zařízení pro přípravu hydrogelů

Použitý chlorid sodný byl frakcionován sítí na 3 frakce o velikosti zrn do 30 μm , 30 – 50 μm a 50 – 90 μm . Po důkladném promísení komponent vznikla pasta, která byla

vpřavena do polymerizační komory tabletovacího zařízení, komora uzavřena přírubou s upevňovacími šrouby a utahovací šroub byl utažen standardní silou 10 Nm. Celé tabletovací zařízení jsme zahřáli na teplotu 80 °C po dobu 8 hodin a po vychladnutí byla tvrdá tableta vyňata a zvážena. Poté byla tableta promyta 1% roztokem hydroxidu sodného (5× po 8 hodinách), čímž byly karboxylové skupiny kyseliny methakrylové (MA) převedeny na skupiny karboxylátové, a nakonec následovalo promytí fyziologickým roztokem (5× po 8 hodinách), při kterém jsme odstranili monomery.

Dále jsme pro účely výpočtů objemů a povrchu pórů připravili vzorky homogenních (tj. neporézních) hydrogelů o stejných koncentracích MA, jako u makroporézních hydrogelů, tj. bez přítomnosti chloridu sodného. Po jejich vymytí vodou, roztokem hydroxidu sodného a fyziologickým roztokem (stejný postup jako u makroporézních hydrogelů) byl stanoven objemový zlomek suchého polymeru v rovnovážně zbotnalém hydrogelu (Z_V).

3.2 Příprava kopolymerů s kladným elektrickým nábojem

Kladný elektrický náboj kopolymerů HEMA-MOETACl, HEMA-MA-MOETACl a polyelektrolytových komplexů je tvořen kvarterní amoniovou solí obsahující čtyřvazný atom dusíku. Poly(methakryloyloxyethyltrimethylamonium chlorid) byl připraven kvarternizační reakcí poly(dimethylaminoethylmethakrylátu) methyljodidem a převedením do Cl⁻ formy na koloně s náplní silně bazického ionexu IRA 402 (Fluka).

Hydrogely na bázi kopolymeru HEMA a MOETACl a terpolymeru HEMA s MOETACl a MA byly připraveny v tabletovacím zařízení podle obrázku 3.1 a postupem popsaným v kapitole 3.1, přičemž byly použity směsi uvedené v tabulce 3.2.

Hydrogel na bázi polyelektrolytového komplexu (tj. fyzikálního hydrogelu, kdy roli příčných vazeb hraje elektrostatická interakce mezi kationty MOETACl a anionty MA) byl připraven reakcí síťovaného makroporézního kopolymeru HEMA-MA popsaného v odstavci 3.1 s lineárním poly(MOETACl). Makroporézní hydrogel HEMA – MA byl postupně promyt vodou, 1 % roztokem NaOH, vodou, 1 % roztokem lineárního poly(MOETACl), vodou a fyziologickým roztokem.

Hydrogely HEMA-MOETACl byly promyty vodou a fyziologickým roztokem; hydrogely HEMA-MA-MOETACl byly nejprve promyty 1% NaOH, poté vodou a fyziologickým roztokem. Cílem tohoto promývání bylo vymytí monomerů.

2-hydroxyethylmethakrylát	0.67 g
Azobis(isobutyronitril)	0.0067 g
Chlorid sodný	10.02 g
1,2-ethylendimethakrylát	0.019 g
polyethylenglykol, Mw = 400	3.79 g
HEMA-MOETACI	methakryloyloxyethyltrimethylamonium chlorid 0-14% vztaženo na hmotnost polymeru
HEMA-MA-MOETACI	methakryloyloxyethyltrimethylamonium chlorid kyselina methakrylová v molárním poměru 1:1 0-14% vztaženo na hmotnost polymeru

Tab. 3.2. Polymerizační směsi pro přípravu kopolymerů HEMA-MOETACI a HEMA-MA-MOETACI

3.3 Příprava biodegradovatelných hydrogelů

Biodegradovatelné hydrogely byly připraveny v tabletovacím zařízení podle obrázku 3.1 síťující radikálovou polymerizací monomerů (HEMA, HEMA, EOEMA v různém poměru), síťovadla (N,O-dimethakryloyl hydroxylamin v koncentraci 2,7 % relativně k monomerům), polyethylenglykolu (PEG) s molární hmotností 400 a částicemi chloridu sodného (frakcionovanými na 0 – 30 μm , 30 – 50 μm a 50 – 90 μm) pomocí azobis(isobutyronitrilu) při 80 °C po dobu 8 h. Po ukončení polymerizace byl chlorid sodný a PEG vypláchnut promytím (10 $\times$) v citrátovém pufru s pH 3,0. Hydrogely byly až do použití skladovány v pufru s pH 3,0, ve kterém nejsou degradovány.

Jako výchozí materiály ke štěpitelným hydrogelům byly zvoleny takové dvojice monomerů, z nichž jeden je silně hydrofilní a jeho homopolymer je rozpustný ve vodě a druhý je méně hydrofilní a jeho homopolymer se ve vodě nerozpouští. Účelem méně hydrofilního komonomeru je to, aby bylo možné prodloužit dobu rozpadu hydrogelu. Hydrogely složené pouze z homopolymeru rozpustného ve vodě se štěpí velmi rychle (2-5 dní), zatím co hydrogely složené pouze z monomeru, jehož homopolymer se ve vodě nerozpouští, se štěpit nemůže. Abychom získali škálu hydrogelů s nastavitelnou dobou štěpení, zvolili jsme za dvojice středně a silně hydrofilních komonomerů 2-hydroxyethylmethakrylátu v kombinaci s komonomerem bez náboje (HPMA), s kladným nábojem (MOETACI) a s nábojem záporným (MA) a dále elektricky neutrální dvojici EOEMA – HPMA.

3.4 Příprava nanovláken

Nanovláknna na bázi kopolymerů HEMA byly připraveny s využitím původní české technologie Nanospider™ vyvinuté na Katedře netkaných textilií Technické univerzity v Liberci (Jirsák et al., 2004). Princip technologie je založen na objevu, že je možné vytvořit Taylorův kužel, který při klasickém elektrostatickém zvlákňování vzniká pouze na konci kapiláry, také z tenké vrstvy roztoku polymeru. Na rozdíl od ostatních metod nepoužívá přístroj Nanospider™ žádných trysek ani kapilár pro tvorbu vláken; místo toho využívá válec (Obr. 3.2B). Válec je částečně ponořený v roztoku polymeru a jak se otáčí, nanáší na sebe určité množství roztoku, to je přinášeno na vrchní část válce, kde se tvoří Taylorovy kužely: počátek tvorby nanovláken. Taylorovy kužely jsou vytvářeny blízko vedle sebe po celé délce válce, čímž je dosaženo vysoké hustoty nanovláken. Proudby roztoků polymeru jsou odpařením rozpouštědla přeměňovány a stávají se pevnými nanovláknky před tím, než dosáhnou protější sběrné elektrody. Nanovláknna se ukládají na sběrné elektrodě, kde tvoří homogenní vrstvu, sběrná elektroda se pohybuje a umožňuje přípravu velkých ploch pokrytých nanovláknky.



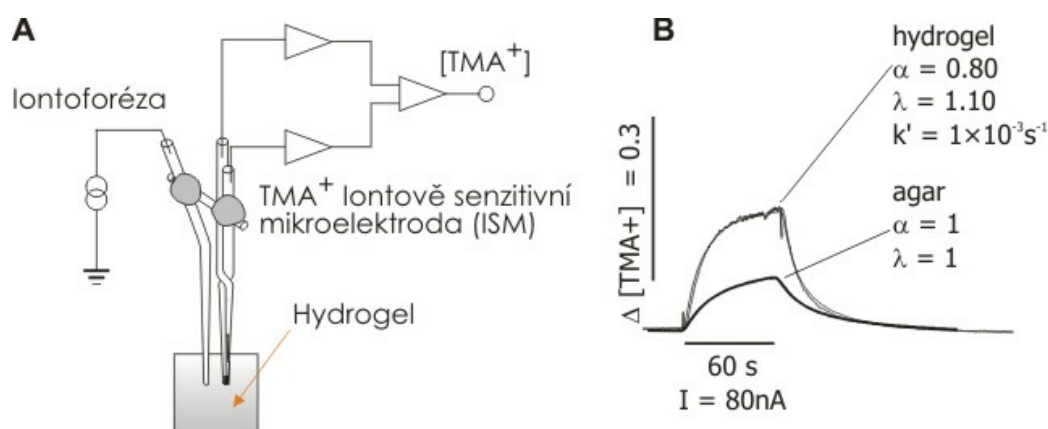
Obr. 3.2 Technologie Nanospider™. A. Přístroj Nanospider určený pro laboratorní použití, B. Taylorovy kužele vznikající na válci ponořeném v roztoku polymeru.

3.5 Měření difúzních vlastností hydrogelů *in vitro*

Pro studium difúzních parametrů v hydrogelech *in vitro* jsme využili iontoforetickou metodu v reálném čase (Nicholson a Phillips, 1981), založenou na bodové aplikaci

tetramethylamonia (TMA^+) a měření jeho koncentrace v definované vzdálenosti pomocí iontově selektivních mikroelektrod ve vzdálenosti 100-200 μm (Nicholson a Syková, 1998; Syková et al., 1992). Ionty TMA^+ zůstávají v extracelulárním prostoru a experimentálně bylo potvrzeno, že nejsou adsorbovány ani absorbovány testovanými hydrogely. Křivka udávající koncentrace iontů TMA^+ v čase byla vyhodnocena pomocí specializovaného software VOLTORO (Nicholson, *nepublikováno*) pracujícího s radiálními difúzními rovnicemi modifikovanými tak, aby počítaly s objemovou frakcí extracelulárního prostoru α , tortuozitou λ a mírou nespecifické absorpce iontů TMA^+ (k'). Příprava elektrod a postup měření jsou podrobně popsány v publikaci (Voříšek a Syková, 1997b).

Elektrody byly kalibrovány v 0.3% agarovém gelu připraveném ze 150 mM NaCl, 3 mM KCl a 0.3 mM TMACl. Difúzní parametry α , λ a k' jsme měřili ve dvou až šesti místech bloku studovaného hydrogelu (Obr. 3.3). V každém místě jsme získali dvě až čtyři difúzní křivky a získané hodnoty jsme zprůměrnili.



Obr. 3.3. Uspořádání pokusu pro měření difúzních vlastností hydrogelů *in vitro*.

A. uspořádání elektrod v hydrogelu, B. naměřené difúzní křivky.

3.6 Příprava buněčných kultur mezenchymových buněk

Potkaní stromální buňky kostní dřeně jsme izolovali ze stehenních kostí potkanů kmene Wistar o hmotnosti 250 g. Oba konce kosti byly odděleny a kostní dřeň jsme vypláchli médiem DMEM pomocí jehly a stříkačky (Azizi et al., 1998). Buňky kostní dřeně jsme vyseli do kultivačních lahví o ploše 75 cm² do média DMEM obsahujícího 10% fetálního telecího séra, 100 IU/ml penicilinu a 0.1 mg/ml streptomycinu. Po 24 hodinách jsme odstranili neadherentní buňky výměnou média. Kultivace probíhala v inkubátorech při 37°C a 5% CO₂.

Výměna média probíhala každé 2-3 dny a při dosažení 80% konfluence byly buňky pasážovány trypsinizací – po opláchnutí kultury PBS jsme do kultivační lahve přidali 1 ml trypsinu v koncentraci 0.25% (GIBCO) a nechali jsme jej působit 5 minut při 37°C. Disociace byla zastavena přidáním 1ml fetálního telecího séra, buňky byly vypláchnuty PBS, centrifugovány, barvením trypanovou modří a počítáním v Bürkerově komůrce byl určen jejich počet a viabilita (DeRenzis a Schechtman, 1973) a buňky byly vysety do nových kultivačních lahví v koncentraci cca 1×10^3 buněk na cm^2 .

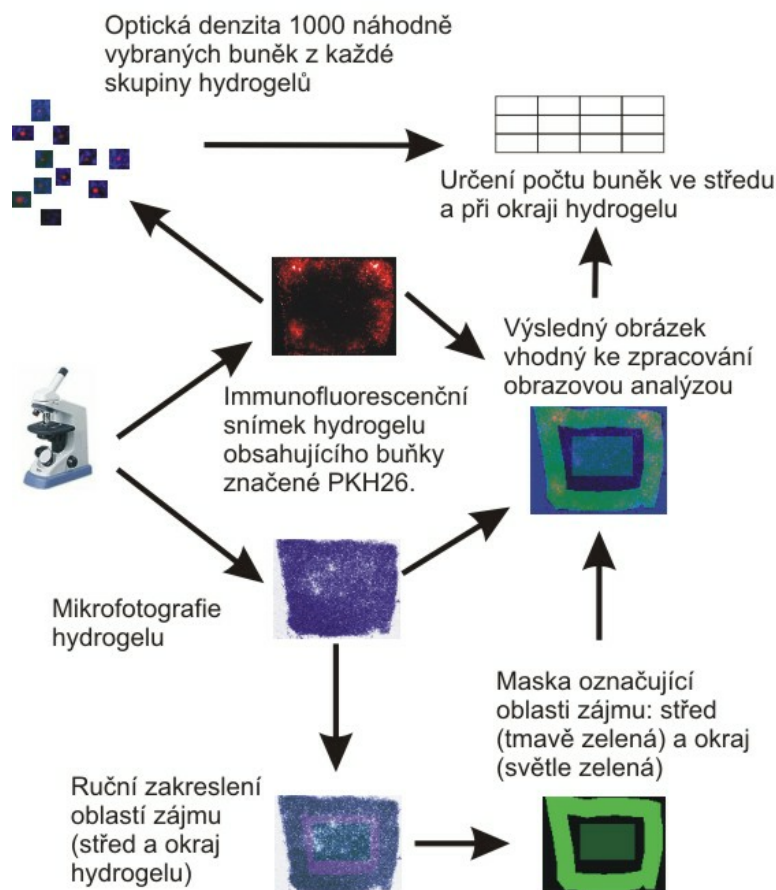
Pro kultivaci v hydrogelech byly mezenchymové buňky trypsinizovány a pro odstranění zbytků kultivačního média opakovaně resuspendovány v PBS a centrifugovány. Na závěr byly buňky resuspendovány v PBS v koncentraci 10^6 buněk/ml.

3.7 Hodnocení růstu buněk v hydrogelu

Pro hodnocení biokompatibility hydrogelů a adheze buněk *in vitro* byly využity mezenchymové buňky, které byly obarveny přidáním fluorescentního membránového barviva PKH26-GL (Sigma) do kultivačního média na dobu 10 minut a trojnásobným promytím PBS; obarvené buňky byly resuspendovány v kultivačním médiu na cílovou koncentraci 1×10^5 buněk/ml. Do připravené suspenze byl ponořen sledovaný bloček hydrogelu velikosti $2 \times 2 \times 2$ mm a po dobu 1 hodiny byl umístěn na třepačku vyhřívanou na 37°C. Tímto postupem bylo možné hodnotit nejen adhezi buněk k povrchům hydrogelu, ale i jejich pronikání od krajů do středu bločku hydrogelu.

Hydrogely osídlené buňkami byly inkubovány v kultivačním médiu (DMEM, 10% fetálního telecího séra, 100 IU/ml penicilinu a 0.1 mg/ml streptomycinu) ve standardních podmínkách (5% CO_2 , 37°C) po příslušnou dobu. Po ukončení kultivace byly hydrogely opláchnuty PBS a fixovány 30 minut paraformaldehydem; následovalo zalití do agaru a příprava 90 μm tlustých řezů na mikrotomu. Hodnoceny byly vždy řezy ze střední části bločku hydrogelu.

Při hodnocení množství buněk v hydrogelu jsme použili denzitometrickou metodu, schematicky znázorněnou na obrázku 3.4. Pro hodnocení byl vždy využit imunofluorescenční snímek a odpovídající nativní snímek. Nejprve byla na fluorescenčních snímcích dané skupiny určena intenzita fluorescence, odpovídající jedné buňce. Tento krok byl nezbytný pro eliminaci artefaktů vznikajících ředěním membránového barviva při dělení buněk. Poté jsme na nativním snímku označili okrajovou (100 μm od kraje) a střední zónu (více než 150 μm od kraje). Obrazovou analýzou jsme poté vyhodnotili intenzitu fluorescence obou zón a korigovali na úbytek membránového barviva.



Obr. 3.4. Přehledné schéma experimentálního vyhodnocení růstu buněk v povrchové a centrální oblasti sledovaných hydrogelů.

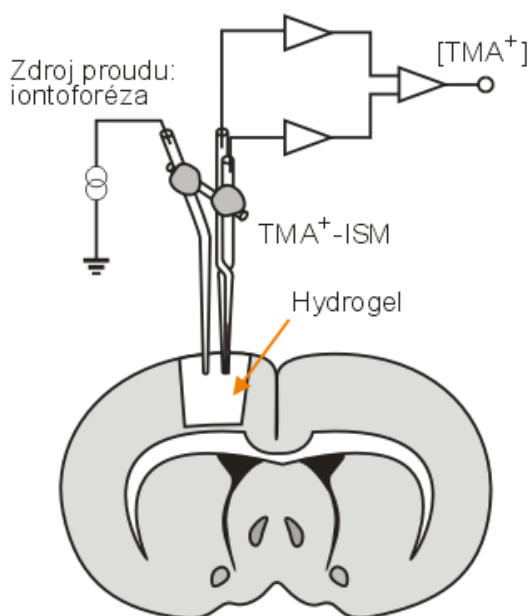
3.8 Implantace hydrogelů do kortexu laboratorního potkana

Experimenty s implantací hydrogelů do kortexu byly prováděny u 6-měsíčních samců laboratorních potkanů kmene Wistar v anestézii pentobarbitalem (50 mg/kg i.p.). Všechny experimenty na zvířatech jsme prováděli na základě schváleného projektu pokusů. Anestetizovaná zvířata byla uchycena do stereotaktického aparátu a v oblasti 3 mm laterálně od bregmatu jsme incidovali kůži a odstranili vazivovou tkáň kryjící kosti kalvy. Pomocí dentální vrtačky jsme oddělili a odklopili kruhový plátek kosti o průměru 2mm, pod ním jsme incidovali a roztáhli *duru mater*. Z mozkové tkáně jsme vyřízli blok velikosti $1.5 \times 1.5 \times 1.5$ mm a po zastavení krvácení jsme do vzniklé kavity implantovali sledovaný hydrogel. Odklopený plátek kosti jsme vrátili na místo a sešili jsme podkožní vazivo a kůži.

Operovanému zvířeti jsme na závěr výkonu podali antibiotika (ampicilin 200-400 mg/kg) a analgetika (karprofen 4 mg/kg) a ponechali jsme jej v klidu při 37°C do odeznění anestézie.

3.9 Měření difúzních vlastností hydrogelů *in vivo* v kortexu laboratorního potkana

Pro zjištění změn difúzních vlastností implantovaných hydrogelů jsme využili *in vivo* iontoforetickou metodu v reálném čase (Nicholson a Syková, 1998; Syková et al., 1992; Syková a Nicholson, 2008). Čtyři týdny po implantaci hydrogelu do kortexu byla experimentální zvířata anestetizována pentobarbitalem (50 mg/kg i.p.) a uchycena do stereotaktického aparátu. Během měření jsme monitorovali jejich životní funkce a rektální teplota. Přehledné schéma pokusu je na obrázku 3.5. Všechny experimenty na zvířatech byly prováděny na základě schváleného projektu pokusů.



Obr. 3.5. Uspořádání pokusu pro měření difúzních vlastností hydrogelů v kortexu laboratorního potkana.

Před difúzním měřením jsme operačně odklopili kožní lalok i plátek kosti kryjící hydrogel a do hydrogelu jsme mikromanipulátorem zavedli kalibrovanou měřicí elektrodu, sestávající z iontoforetické pipety uvolňující ionty TMA^+ a iontově senzitivní mikroelektrody. Elektrody byly kalibrovány v 0.3% agarovém gelu připraveném ze 150 mM NaCl, 3 mM KCl a 0.3 mM TMACl (Nicholson a Phillips, 1981). Kontrolní měření proběhlo v bílé hmotě kortexu laboratorního potkana (Syková a Nicholson, 2008). Po kontrolním měření byla

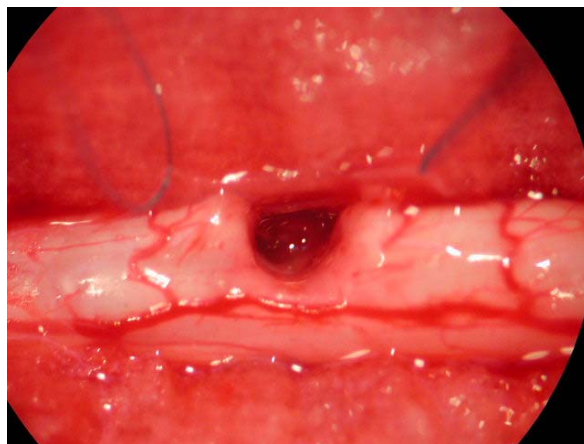
elektroda zavedena do hydrogelu a byly změřeny difúzní parametry α , λ a k' ve třech místech bloku studovaného hydrogelu.

Křivka udávající koncentrace iontů TMA^+ v čase byla vyhodnocena pomocí specializovaného software VOLTORO (Nicholson, *nepublikováno*) pracujícího s radiálními difúzními rovnicemi modifikovanými tak, aby počítaly s objemovou frakcí extracelulárního prostoru α , tortuozitou λ a mírou nespecifické absorpce iontů TMA^+ (k').

3.10 Implantace hydrogelů do míchy laboratorního potkana

Hydrogely byly implantovány 6-měsíčním samcům laboratorních potkanů kmene Wistar anestezizovaných pentobarbitalem (50 mg/kg i.p.). Všechny experimenty na zvířatech byly prováděny na základě schváleného projektu pokusů. Vzhledem k délce a náročnosti operačního výkonu byla podána premedikace: atropin 0.2 mg s.c. a gentamycin 0.05 mg i.m. Počet operovaných zvířat v jedné skupině byl 5-10, přežití experimentálních zvířat po hemisekci do ukončení experimentu bylo 70 %.

Laminektomie v oblasti Th7-Th9 byla provedena asepticky pod binokulárním operačním mikroskopem (Zeiss). Dura mater byla rozstřížena a část míšní tkáně v délce 2 mm na pravé straně míchy (hemisekce) nebo v celé šířce míchy (kompletní transekce) byla disekována a odstraněna (Obr. 3.6).

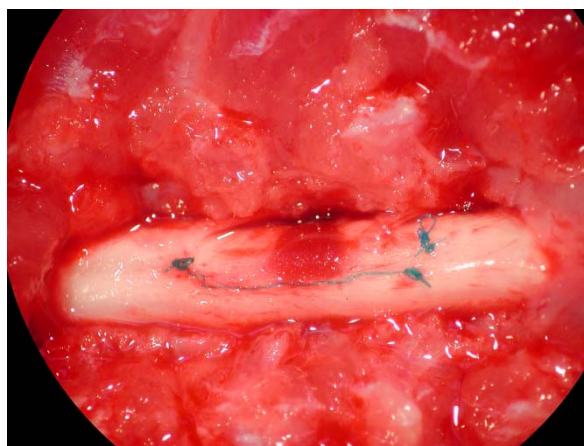


Obr. 3.6. Hemisekce míchy laboratorního potkana – vytvoření kavity pro implantaci hydrogelu.

Do vytvořené kavity jsme implantovali sledovaný hydrogel, který byl bezprostředně před implantací pod mikroskopem seříznut tak, aby jeho délka přesně odpovídala délce míšní

léze. Dura mater byla sešita neresorbovatelným očním 10/0 stehem Ethilon® (obr. 3.7) a operační rána byla dále uzavřena chirurgickým šitím po vrstvách.

Operovanému zvířeti jsme na závěr výkonu podali antibiotika (ampicilin 200-400 mg/kg) a analgetika (karprofen 4 mg/kg) a ponechali jsme jej v klidu při 37°C do odeznění anestézie. Do doby obnovení funkce svěračů jsme prováděli pravidelnou manuální expresi moči a podávali jsme gentamycin intramuskulárně jako prevenci uroinfekcí. Zvířata byla až do ukončení experimentů držena v akváriích a dostávala vodu a granulované krmivo *ad libitum*.



Obr. 3.7. Hydrogel v míše laboratorního potkana, dura mater sešita.

3.11 Histologie a imunohistochemie

Po ukončení každého pokusu byla experimentální zvířata utracena předávkováním anestetika (pentobarbital sodný) a transkardiálně perfundována fosfátovým pufrům s pH 7.2 a paraformaldehydem. Sledovaná tkáň s implantovaným hydrogelem (mozek, mícha) byla operačně vyjmuta a nakrájena na řezy o tloušťce 40 μm . Větší tloušťka řezů, než je běžně v histologii běžně používána, byla zvolena proto, aby se na snímku dobře zobrazila morfologie hydrogelu.

Řezy byly obarveny pomocí standardních histologických (barvení kresylovou modří, hematoxylin-eosin) a imunohistochemických (protilátky proti NF160, GFAP, RECA, CSPG) metod, při kterých byla nahrazena destilovaná voda fyziologickým roztokem, aby změny osmotického tlaku nepoškodily implantovaný hydrogel.

Pro hodnocení prorůstání axonů a astrocytů jsme zkonstruovali semikvantitativní škálu (Tab. 3.3), kterou jsme používali pro porovnávání imunohistochemických nálezů u jednotlivých implantovaných hydrogelů.

Stupeň	Pozorování
0	Výběžky buněk neprorůstají do hydrogelu
1	Malé množství (méně než 10) výběžků buněk prorůstá na malou vzdálenost do hydrogelu
2	Mnoho výběžků buněk prorůstá do hydrogelu, ale jen na malou vzdálenost (méně než 20 μm)
3	Jako předchozí, některé výběžky prorůstají ke středu hydrogelu (dále než 500 μm)
4	Nacházíme výběžky buněk ve středu hydrogelu

Tab. 3.3. Semikvantitativní škála pro hodnocení prorůstání elementů nervové tkáně do hydrogelů

3.12 Zobrazování míchy magnetickou rezonancí

Blok obratlů s míchou byl vyjmut a *ex vivo* snímán na magnetickém rezonančním spektrometru (Bruker Biospec 47/20, 4.7T) instalovaném na pracovišti magnetické rezonance Klinické MR spektroskopie IKEM vybaveném na zakázku zhotovenou povrchovou cívkou. Sagitální a axiální řezy byly zhotoveny s použitím sekvencí R.A.R.E. (*rapid acquisition with relaxation enhancement*).

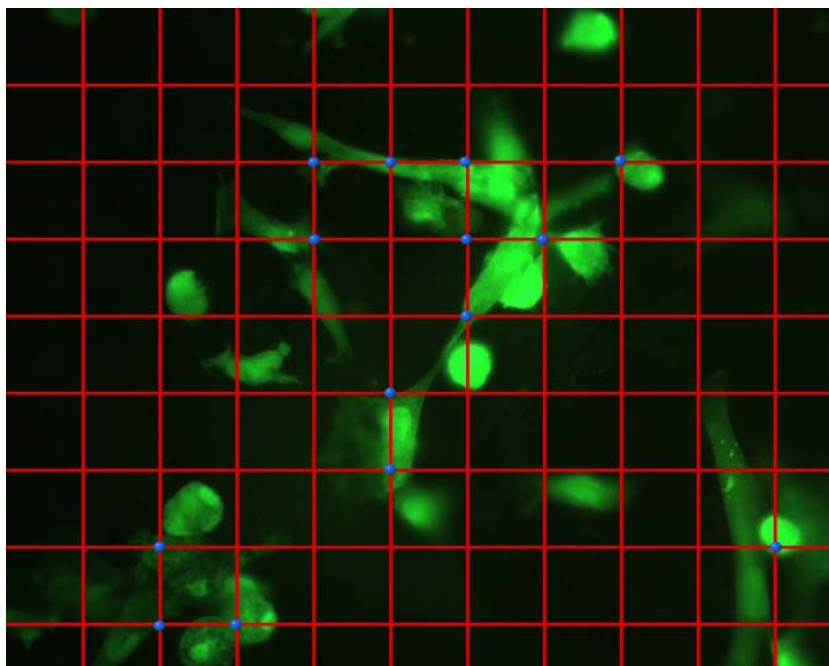
3.13 Obrazová analýza

Histologické a imunohistochemické preparáty byly digitalizovány mikroskopem vybaveným digitální kamerou (Zeiss) a vyhodnoceny pomocí počítačového programu MATLAB verze 6 (The MathWorks, Inc.) s využitím rozšíření pro obrazovou analýzu (Image analysis toolbox). V některých případech byla obrazová analýza doplněna ručním odstraněním artefaktů z digitalizovaných snímků.

Při kvantifikaci obrazových dat byly využity dva základní algoritmy: denzitometrie a počítání objektů. Při denzitometrickém hodnocení převedeme nejprve každý obrazový bod snímku (pixel) na poměrné číslo, které odpovídá předpokládanému množství sledovaného barviva v daném místě preparátu. U fluorescenčních snímků toto číslo získáme přímo jako hodnotu červené, zelené nebo modré složky digitalizovaného obrazu. U klasických histologických snímků určíme barevný odstín, který odpovídá použitému histologickému barvivu, a následně vypočítáme koncentraci barviva z intenzity zastoupení tohoto odstínu v barvě pixelu. Poté co zvolíme oblast zájmu, můžeme spočítat průměrné zastoupení barviva v této oblasti.

Při počítání objektů jsme nejprve stanovili základní vlastnosti objektů, které nás zajímaly (například buňky nebo póry), zejména jejich tvar a rozmezí velikosti. Poté jsme

převodli fluorescenční nebo histologický snímek na černobílý a pomocí funkcí obrazové analýzy dilatace a eroze s vhodnými strukturními elementy jsme izolovali zvolené objekty. Dalším zpracováním černobílého snímku, obsahujícího izolované objekty jsme získali jednak počet objektů a jednak jejich plochu; z naměřených dat jsme vypočítali průměrnou velikost objektu.



Obr. 3.8. Ilustrace Cavalieriho principu. Zeleně jsou vyznačeny studované buňky, červeně je příklad čtvercové sítě, modře jsou označeny průsečíky sítě, které zasahují do buněk. Odhadovaná denzita buněk v tomto příkladu je rovna 18%.

Pro určení denzity buněk na povrchu nanovlákněné vrstvy jsme využívali **Cavalieriho princip** (Eves, 1991), který je jedním ze základů současné stereometrie. Tento princip udává, že je možné aproximovat plochu rovinného útvaru ze série měření ve čtvercové síti. Povrch kultivační misky nebo nanovlákněné vrstvy byl nasnímán digitální kamerou a analyzován v programu MATLAB verze 6 (The MathWorks, Inc.). Ilustrace Cavalieriho principu je na uvedeném obrázku (Obr. 3.8). Zelené jsou buňky obarvené GFP, červeně je vyznačena čtvercová síť. Průsečíky sítě, které zasahují do buňky, jsou označeny modře. Denzita buněk na tomto obrázku je $14 \text{ (modře označených průsečíků, které jsou v místě buňky)} / 80 \text{ (celkový počet průsečíků)} = 18\%$. Čím zvolíme hustší čtvercovou síť, tím je výpočet přesnější; pro účely analýz denzity buněk rostoucích na nanovlákněných nosičích jsme používali hustotu čtvercové sítě odpovídající rozměrům analyzovaných digitalizovaných obrázků v obrazových bodech.

Poslední použitou metodou obrazové analýzy byl výpočet celkové plochy kavity na histologických řezech, ke kterému byl využíván program (Neurolucida, verze 5.05.4). Pro hodnocení byl vybrán každý pátý histologický řez, na kterém byl nejprve ručně zvýrazněn obrys kavity a poté spočten počet obrazových bodů nacházejících se v kavitě. Sečtením plochy na všech hodnocených řezech a vynásobením kalibrační plochou jednoho obrazového bodu v milimetrech čtverečních jsme dostali hodnotu, která nejlépe umožní porovnat velikost kavit se složitým prostorovým tvarem na hodnocených preparátech.

3.14 Zobrazení hydrogelů v konfokálním mikroskopu

Pro určení trojrozměrné mikrostruktury hydrogelů jsme použili konfokální mikroskop Leica TCS SP (Obr. 3.9) vybavený spektrálním detektorem a helium-neonovým a argonovým laserem. Vzhledem k tomu, že použité materiály nemají vlastní fluorescenci, byly pozorované hydrogely na 10 minut ponořeny do roztoku luciferové žluti (Lucifer Yellow, Sigma) a poté na sítku propláchnuty fyziologickým roztokem a pozorovány v konfokálním mikroskopu. Molekuly luciferové žluti adherované na povrchu pórů hydrogelu po excitaci helium-neonovým laserem (425nm) vykazovaly obvyklou emisi v pásmu 528-535nm, která byla detekována spektrálním detektorem.



Obr. 3.9. Konfokální mikroskop Leica TCS SP instalovaný v ÚEM AV ČR

Mikroskop Leica TCS SP byl vybaven objektivy s vodní imerzí; to umožnilo sledovat makroporézní hydrogely přímo ve fyziologickém roztoku. Vyhnuli jsme se tak možnému

poškození vnitřní struktury hydrogelů vznikajícímu při jejich vysušení (nutnému pro sledování elektronovou mikroskopií).

Digitální obrazová data z konfokálního mikroskopu byla uložena ve formátu *.TIFF a zpracována softwarem pro trojrozměrné vizualizace Amira verze 3.0 (Mercury).

3.15 Statistické metody

Hodnoty významnosti (p) menší než 0,05 jsme považovali za signifikantní, $p < 0,01$ za vysoce signifikantní. Používali jsme interval spolehlivosti 95%. Při porovnávání spojitých dat s předpokladem normálního rozložení byl používán Studentův t -test. Při testování korelací mezi daty byl používán Pearsonův korelační koeficient.

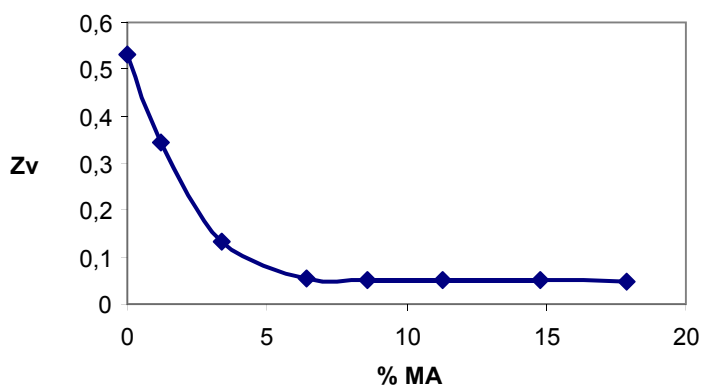
4 Výsledky

4.1 Makroporézní hydrogely na bázi kopolymerů HEMA-MA

Materiály založené na hydrogelech z HEMA jsou v medicíně používány již od 50. let minulého století; během této doby byla prokázána jejich biokompatibilita v řadě odvětví medicíny. Vzhledem k tomu, že samotný HEMA hydrogel má z hlediska tkáňových rekonstrukcí CNS příliš velkou tvrdost a traumatizoval by okolní tkáň, zvolili jsme jako základ pro hydrogely určené k implantaci do tkáně CNS kopolymery HEMA-MA.

Před aplikačním využitím těchto materiálů jsme na základě naměřených dat vytvořili model, ze kterého jsme dále vycházeli při upřesňování vlastností vyvíjených hydrogelů. Vzhledem k velikosti buněk, vyskytujících se v nervové tkáni, jsme pro testování zvolili velikosti pórů v řádech desítek mikrometrů.

Závislost objemového zlomku suchého polymeru v rovnovážně zbotnalém homogenním, tj. neporézním hydrogelu na obsahu MA v kopolymeru (hmotnostní %) znázorňuje obr. 4.1, ze kterého vyplývá, že asi do 5 hmotnostních % MA v síťovaném kopolymeru s HEMA je závislost Z_v strmá, od této hodnoty se již příliš nemění a dosahuje hodnoty asi 0.05. Vyšší obsah MA než 18 hmotnostních % již nebylo možno změřit, neboť se hydrogel samovolně při botnání rozpadal.

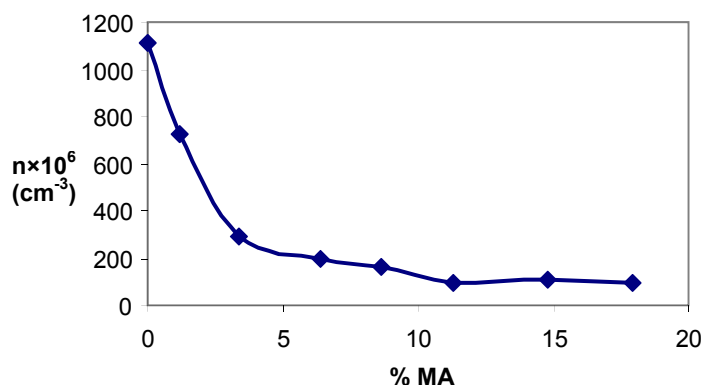


Obr. 4.1. Závislost objemového zlomku polymeru v rovnovážně zbotnalém homogenním hydrogelu na obsahu MA v kopolymeru

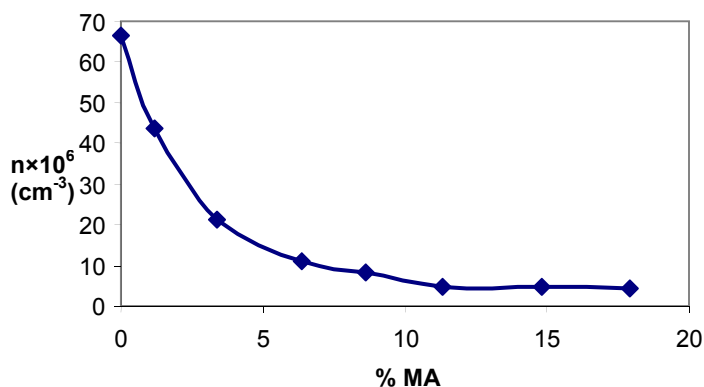
Počet pórů ve vzorku je možné spočítat z následujícího vzorce, ve kterém je ρ_{NaCl} hustota chloridu sodného (2.16 g.cm^3), a d střední průměr frakcionovaných částic chloridu

sodného (15 μm , 40 μm a 70 μm). V_H je změřený objem zbotnalého vzorku a m_{NaCl} je hmotnost chloridu sodného použitého při přípravě vzorku:

$$n = \frac{m_{\text{NaCl}}}{\rho_{\text{NaCl}} \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d}{2}\right)^3 V_H}$$



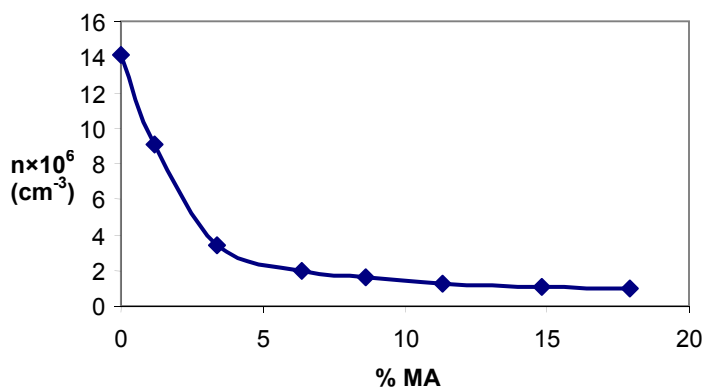
Obr. 4.2. Závislosti počtu pórů na obsahu MA ve zbotnalém makroporézním hydrogelu (o objemu 1 cm^3) pro frakci chloridu sodného 50-70 μm .



Obr. 4.3. Závislosti počtu pórů na obsahu MA ve zbotnalém makroporézním hydrogelu (o objemu 1 cm^3) pro frakci chloridu sodného 30-50 μm .

Na obr. 4.2 až 4.4 jsou znázorněny závislosti počtu pórů v hydrogelu na obsahu MA v polymerním řetězci pro tři různé frakce použitého chloridu sodného. Porozita byla charakterizována jako počet pórů v 1 cm^3 hydrogelu, tj. hustota všech (komunikujících i nekomunikujících) pórů. Naměřené závislosti odpovídají vztahu Z_V a % MA podle obr. 4.1;

při konstantním obsahu chloridu sodného v polymerační směsi je hustota pórů dána objemem hydrogelového vzorku, tj. stupněm jeho zbotnění. Protože stupeň zbotnění se od asi 5 % obsahu MA již mění jen málo, je v tomto intervalu i vliv obsahu MA malý. Současně porozita hydrogelů strmě roste s klesajícím průměrem použitých částic chloridu sodného, neboť při konstantní hmotnosti NaCl v polymerační směsi roste počet jeho částic.



Obr. 4.4. Závislosti počtu pórů na obsahu MA ve zbotnalém makroporézním hydrogelu (o objemu 1 cm^3) pro frakci chloridu sodného 0-30 μm

Celkový objem pórů v jednom centimetru krychlovém hydrogelu (objem vody ve všech pórech hydrogelu) může být spočten ze vzorce:

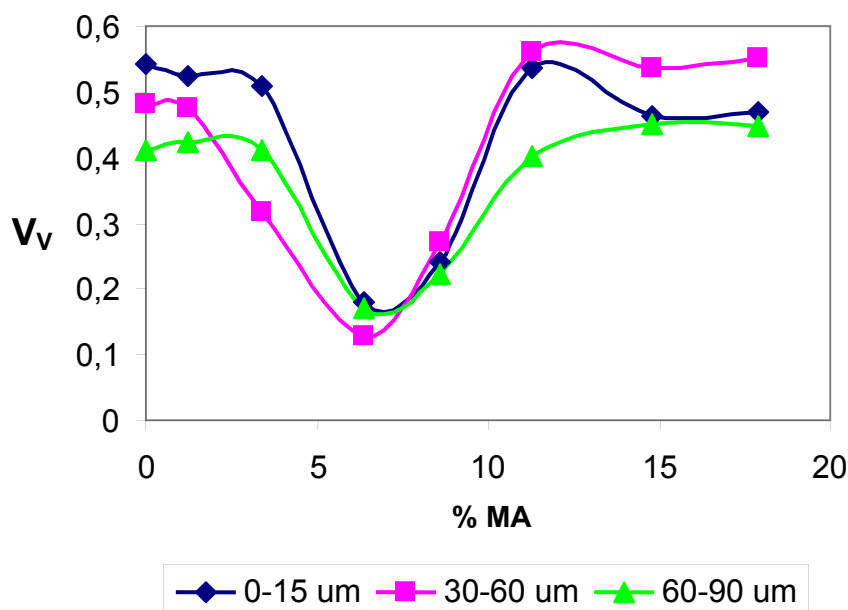
$$V_V = 1 - \frac{m_H}{\rho_P \times Z_V \times V_H}$$

kde m_H je hmotnost zbotnalého vzorku, V_H je jeho objem, Z_V je objemový zlomek suchého polymeru v rovnovážně zbotnalém homogenním stavu (obr. 4.1) a ρ_P je hustota suchého polymeru (1.2 g.cm^3). Zajímavá je závislost této hodnoty na obsahu MA v kopolymeru, jak je znázorněno na obr. 4.5.

Celkový objem pórů je jen málo ovlivněn velikostí použitých částic chloridu sodného, naměřené křivky se pro jednotlivé frakce liší jen nevýrazně a pro obsah MA asi 7.5 % jeví všechny tři křivky výrazné minimum.

Vydělíme-li V_V počtem pórů v 1 cm^3 hydrogelu, získáme hodnotu V_{V1} , tedy specifický objem póru ve vzorku; průměr jednoho póru (za zjednodušujícího předpokladu, že částice chloridu sodného mají tvar koule) spočteme ze vzorce:

$$d_H = 2 \times \sqrt[3]{\frac{3V_{V1}}{4\pi}}$$



Obr. 4.5. Závislost celkového objemu pórů vztažených na 1 cm^3 vzorku ve zbotnalém hydrogelu na obsahu MA v kopolymeru.

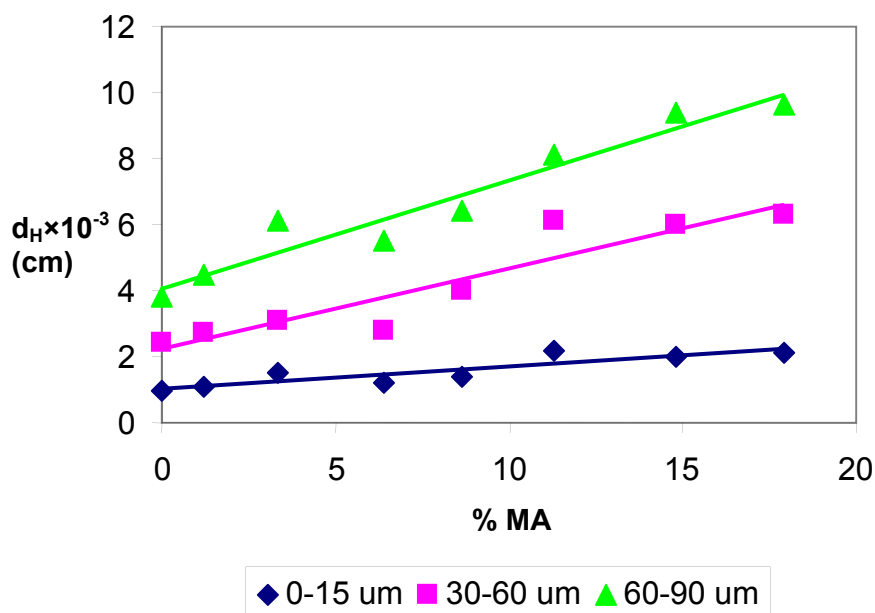
Na obr. 4.6 je ukázána závislost průměru jednoho póru v makroporézním hydrogelu na obsahu MA v kopolymeru, pro všechny tři frakce chloridu sodného. Z obrázku vyplývá, že průměr póru roste se zvyšujícím se obsahem MA v měřeném rozsahu monotónně, avšak růst je poněkud strmější při vyšším množství ionogenní složky v kopolymeru. Povrch pórů hydrogelu (za zjednodušujícího předpokladu, že částice chloridu sodného mají tvar koule) můžeme spočítat podle vzorce:

$$S = 4\pi \left(\frac{d_H}{2} \right)^2 n$$

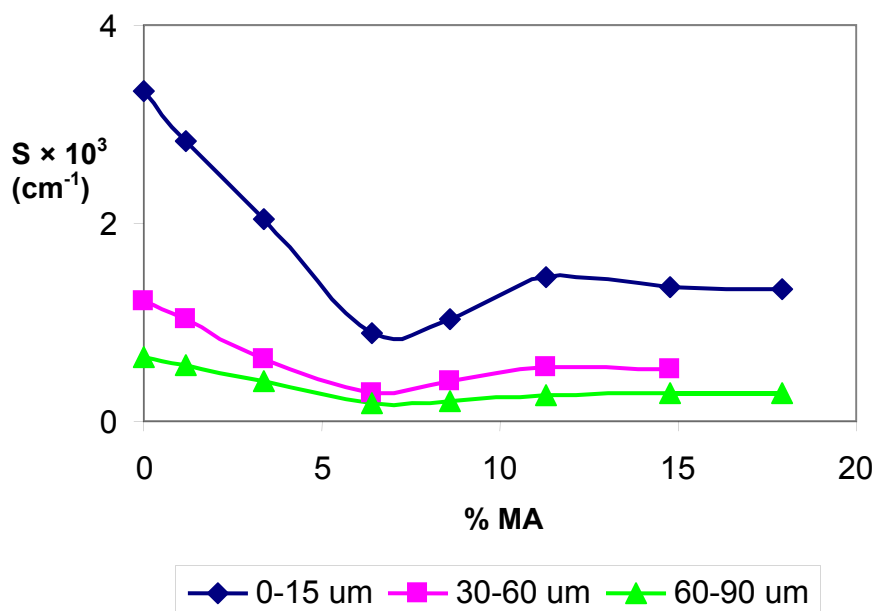
Nevýrazná minima vykazují závislosti celkového povrchu pórů (vztažené na 1 cm^3 vzorku) na obsahu ionogenní složky v polymeru, jak je ukázáno na obr. 4.5, přičemž hodnoty povrchu v celém měřeném rozsahu rostou s klesající velikostí částic chloridu sodného.

Odhadneme-li průměrný povrch všech pórů vztažený na 1 cm^3 hydrogelu při koncentraci MA v polymeru okolo 7.5 hmotnostních % na přibližně 0.1 m^2 (viz obr. 4.7), můžeme odhadnout, že povrch bloku hydrogelu použitého dále pro kultivaci buněk a pro implantaci, který měří $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$, má velikost řádově jednotky až desítky čtverečních centimetrů, v závislosti na velikosti použitých částic NaCl. S rostoucím množstvím MA

v kopolyměru vzrůstá hydrofilita a mění se mechanické vlastnosti vzorku; vzorky s vysokým obsahem MA jsou měkčí a křehčí, než vzorky s nízkým obsahem MA.



Obr. 4.6. Závislost průměru jednoho póru v makroporézním hydrogelu na obsahu MA v kopolyměru.



Obr. 4.7. Závislost celkového povrchu pórů vztahujícího se na 1 cm³ vzorku na obsahu MA v kopolyměru.

Na rozdíl od závislosti počtu pórů na %MA je V_{VI} jen málo ovlivněn velikostí použitých částic chloridu sodného, naměřené křivky se pro jednotlivé frakce liší jen nevýrazně a pro obsah MA asi 7.5 % jeví všechny tři křivky výrazné minimum. To lze vysvětlit následovně: s rostoucí botnavostí hydrogelu roste tloušťka přepážek a tím i celkový objem hydrogelu, který má na specifický objem pórů negativní vliv. Naproti tomu se ale zvyšuje povrch přepážek spolu s objemem pórů, zvyšuje V_{VI} . Oba tyto efekty jsou téměř vyrovnány v oblastech 0–3 % MA a 12–18 % MA. V_{VI} na koncentraci kyseliny methakrylové téměř nezávisí a má hodnotu okolo 0.5, tj. v makroporézním hydrogelu je objem polymeru a pórů téměř stejný při sledovaných složení materiálu. Naproti tomu v oblasti kolem 6 % MA zřejmě silně převažuje vliv tloušťky přepážek a V_{VI} tak vykazuje výrazné minimum, objem pórů je vzhledem k objemu hydrogelu nejnižší.

Z naměřených a spočtených závislostí vyplývá, že optimální množství MA v kopolymeru se pohybuje v oblasti 3 nebo 12 hmotnostních procent; při této koncentraci je vhodná porozita i vhodné mechanické vlastnosti. Hydrogely s množstvím MA v kopolymeru v oblasti 4 – 8 hmotnostních procent mají výhodné mechanické vlastnosti, nicméně jejich objem pórů V_V je příliš nízký.

Výsledek byl publikován v rámci práce:
Přádný M, Lesný P, Fiala J, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, et al. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethylmethacrylate. Part 1. Copolymers of 2-hydroxyethylmethacrylate with methacrylic acid. Collection of Czech Chemical Communication. 2002;68:812-22. IF (2013) = 1,137; citováno (2015) 33×

4.2 Difúzní vlastnosti hydrogelů HEMA-MA a HPMa

Značná část dějů, které souvisí s regenerací tkáně, závisí na volné difúzi: ať už živin a kyslíku nebo neurotrofních látek a růstových faktorů. Proto je při návrhu biomateriálu vhodného pro regeneraci nervové tkáně důležité vytvořit podmínky pro volnou difúzi nízkomolekulárních látek.

Standardní metodou pro měření difúzních vlastností v tkáni centrálního nervového systému je metoda měření difúze iontů TMA^+ v reálném čase (Nicholson a Phillips, 1981; Nicholson a Syková, 1998; Syková a Nicholson, 2008). Touto metodou je možné získat hodnoty objemové frakce α , která odpovídá podílu tkáně (nebo biomateriálu), ve kterém probíhá difúze iontů, a tortuozity λ , která vyjadřuje přítomnost překážek, které brání difúzi.

Difúzní parametry byly měřeny ve vzorcích s 3 – 15% MA. Hodnoty objemového podílu α naměřené v připravených hydrogelech byly vždy výrazně vyšší než hodnoty V_{V1} a pohybovaly se mezi 0.75 a 0.96. Hodnoty difúzních parametrů u měřených vzorků jsou v tabulce 4.1.

Hodnoty absorpce iontů TMA^+ k' se u všech vzorků pohybovaly na spodní hranici měřitelnosti (méně než 10^{-5}); ionty TMA^+ tedy nepronikají významně do hydrogelů.

Vzorek číslo	%MA	Velikost pórů	α	λ
10.10.1	11.30	0-30 μm	0.75 ± 0.02	1.05 ± 0.02
10.10.2	3.37	0-30 μm	0.90 ± 0.08	1.11 ± 0.01
10.10.4	8.62	0-30 μm	0.79 ± 0.08	1.03 ± 0.03
10.10.5	6.39	0-30 μm	0.90 ± 0.05	1.04 ± 0.04
10.10.6	14.8	0-30 μm	0.81 ± 0.10	1.02 ± 0.02
10.11.1	11.30	50-90 μm	0.95 ± 0.06	1.01 ± 0.01
10.11.2	3.37	50-90 μm	0.86 ± 0.08	1.06 ± 0.02
10.11.4	8.62	50-90 μm	0.87 ± 0.09	1.03 ± 0.02
10.11.5	6.39	50-90 μm	0.82 ± 0.03	1.00 ± 0.02
10.11.6	14.8	50-90 μm	0.86 ± 0.02	1.02 ± 0.01
10.1.2	11.30	30-50 μm	0.96 ± 0.03	1.03 ± 0.01
10.1.2.1	6.39	30-50 μm	0.78 ± 0.04	1.01 ± 0.02
10.1.2.2	8.62	30-50 μm	0.85 ± 0.11	1.06 ± 0.02
10.1.2.4	3.37	30-50 μm	0.91 ± 0.08	1.10 ± 0.02
10.1.2.5	14.8	30-50 μm	0.75 ± 0.07	1.04 ± 0.04

Tab. 4.1. Difúzní parametry hydrogelů na bázi HEMA-MA v závislosti na velikosti pórů a obsahu MA v kopolymeru.

Naměřené hodnoty jsme porovnávali s makroporézním hydrogelem na bázi HEMA připraveným srážecí polymerací a popsáným dříve (Woerly et al., 1999; Woerly et al., 1998), ve kterém byly hodnoty objemového zlomku α rovny 0.80 ± 0.01 a hodnoty tortuozity λ rovny 1.13 ± 0.01 . Nebyla nalezena žádná statisticky významná závislost mezi velikostí pórů, celkovým objemem pórů, obsahem kyseliny methakrylové a difúzními parametry (Tab. 4.2).

Za předpokladů, že připravené hydrogely obsahují pouze komunikující póry a difúze se uplatňuje pouze prostřednictvím těchto pórů, měly by být hodnoty V_{V1} a objemového podílu α totožné. Vzhledem k tomu, že tato totožnost prokázána nebyla a $\alpha > V_{V1}$, usuzujeme na to, že část pórů v hydrogelech je nekomunikující a difúze TMA^+ probíhá částečně i přes přepážky mezi póry. Hodnoty tortuozity se u všech vzorků blížily k jedné; tento výsledek

naznačuje jen velmi malé množství překážek, které kladou hydrogely difúzi malých kationtů, například TMA^+ např. ve srovnání s mozkovou tkání (obr. 4.17).

Pearsonův korelační koeficient	α	λ
%MA	-0.163 (p = 0.56)	-0.384 (p = 0.16)
Velikost pórů	0.241 (p = 0.39)	-0.357 (p = 0.19)
V_{V1}	-0.153 (p = 0.59)	0.028 (p = 0.92)

Tab. 4.2. Korelační koeficienty mezi velikostí pórů, obsahem MA v kopolymeru a difúzními parametry hydrogelu

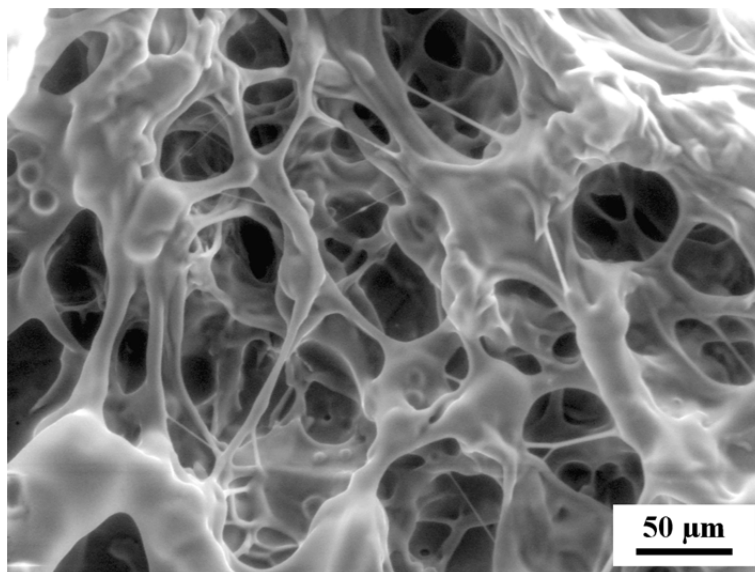
Výsledek byl publikován v rámci práce:
Lesný P, De Croos J, Přádný M, Vacík J, Michálek J, Woerly S, et al. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. Journal of Chemical Neuroanatomy. 2002 May;23(4):243-7. IF (2013) = 2.520, citováno (2015) 75×

4.3 Elektronová mikroskopie hydrogelů HEMA-MA

Standardní metodou pozorování povrchů hydrogelů je environmentální rastrovací elektronová mikroskopie ESEM (přístroj AQUASEM). Mírným nedostatkem této metody je nutnost umístění vzorku do řídkých vodních par, ve kterých může dojít ke změně struktury oproti struktuře ve fyziologickém roztoku.

Příklad zobrazení hydrogelu s obsahem 11.3 % MA a frakcí NaCl 50-90 μm mikroskopem AQUASEM je na obrázku 4.8, ze kterého je zřetelně patrné, že póry v hydrogelu jsou komunikující.

Mikrofotografie hydrogelu pořízená pomocí elektronového mikroskopu AQUASEM ukazuje vysokou koncentraci komunikujících pórů v hydrogelech. Výsledky však mohou být zkreslené částečným vakuem, ve kterém jsou vzorky umístěny. Proto jsme doplnili pozorování hydrogelů i o jejich zobrazení ve vodném prostředí pomocí konfokálního mikroskopu.



Obr. 4.8. Struktura hydrogelu s obsahem 11.3 % MA a frakcí NaCl 50-90 μm pozorovaná pomocí mikroskopu AQUASEM.

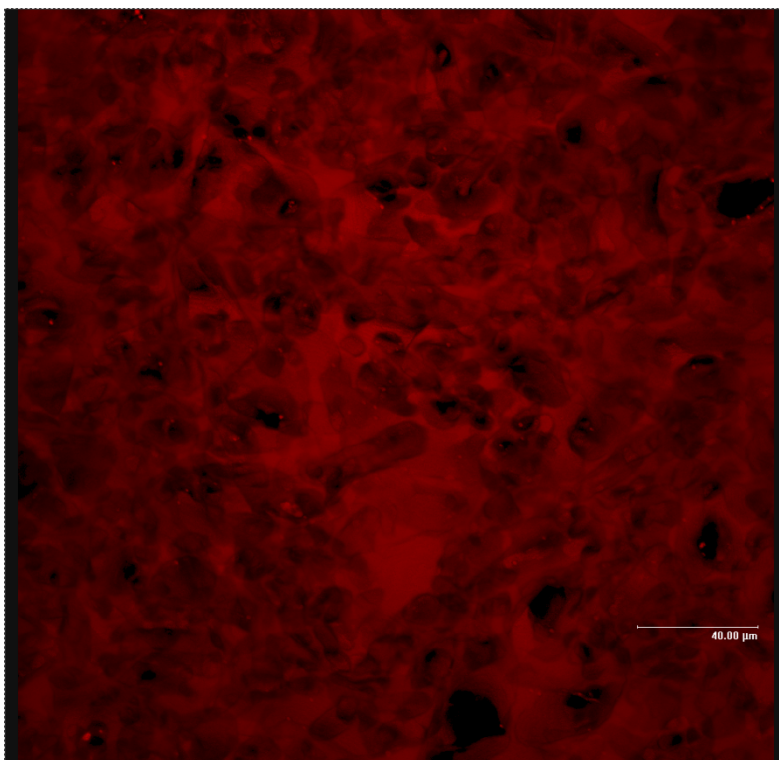
4.4 Konfokální mikroskopie hydrogelů HEMA-MA a HPMA

Konfokální mikroskop umožňuje pozorovat mikrostrukturu připravených hydrogelů v prostředí, které nedeformuje jejich strukturu, tj. přímo ve fyziologickém roztoku. Elektronický snímač je možné zaostřit na danou rovinu vzorku a snímat fluorescenci, která má svůj zdroj v této rovině. Skládáním obrazů z jednotlivých rovin vzorku poté vzniká výsledný obrázek, který ilustruje strukturu vzorku, aniž by byl rozostřen vlivem ohniskové vzdálenosti.

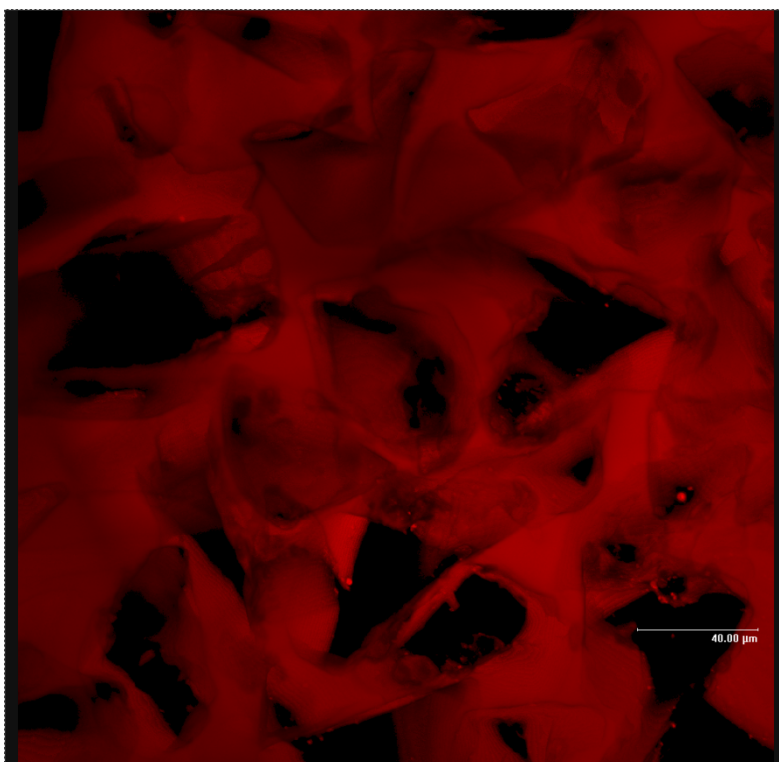
Na obr. 4.9 až 4.11 jsou zobrazeny jednoduché rekonstrukce hydrogelů s 8.62 % MA a odlišnými frakcemi chloridu sodného. Ačkoliv tyto rekonstrukce mohou připomínat trojrozměrné zobrazení, je barva každého obrazového bodu (pixelu) vytvořena jako prostý průměr fluorescence pod ním ležících prostorových obrazových bodů (voxelů) a nezobrazují zcela správně vztahy mezi objekty ležícími vpředu a objekty v zadní rovině (srovnejte s obr. 4.12, na kterém je 3D rekonstrukce).

Výsledek byl publikován v rámci práce:

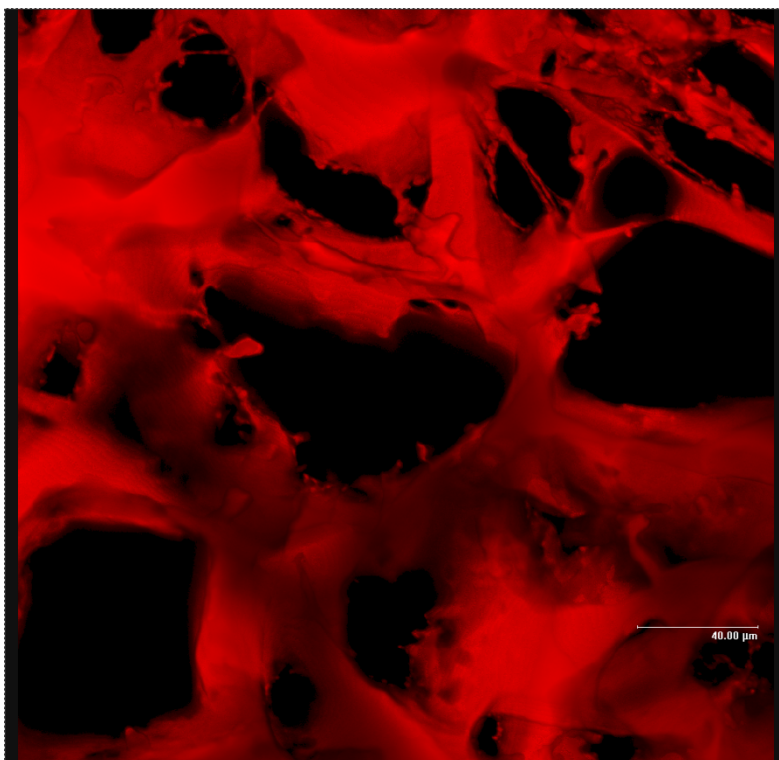
Přádný M, Lesný P, Fiala J, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, et al. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethylmethacrylate. Part 1. Copolymers of 2-hydroxyethylmethacrylate with methacrylic acid. Collection of Czech Chemical Communication. 2002;68:812-22.
IF (2013) = 1.137, citováno (2015) 33×



Obr. 4.9. Zobrazení hydrogelu s obsahem 8.62% MA a frakcí NaCl 0-30 μm , pomocí konfokálního mikroskopu (průměrná intenzita). Měřítka = 40 μm .



Obr. 4.10. Zobrazení hydrogelu s obsahem 8.62% MA a frakcí NaCl 30-50 μm , pomocí konfokálního mikroskopu (průměrná intenzita). Měřítka = 40 μm .



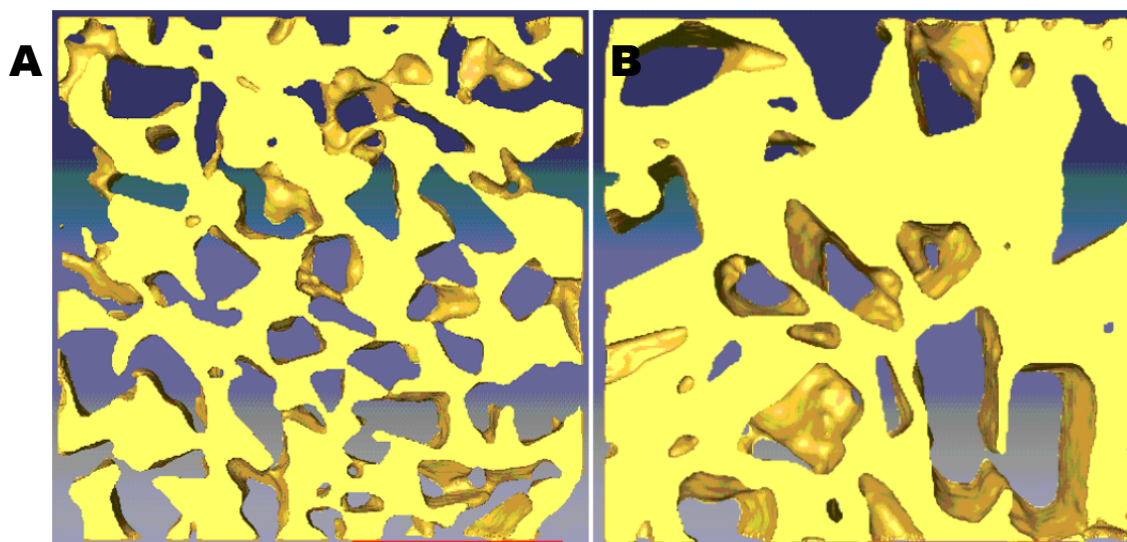
Obr. 4.11. Zobrazení hydrogelu s obsahem 8.62% MA a frakcí NaCl 50-90 μm , pomocí konfokálního mikroskopu (průměrná intenzita). Měřítka = 40 μm .

4.5 Porozimetrie pomocí konfokálního mikroskopu

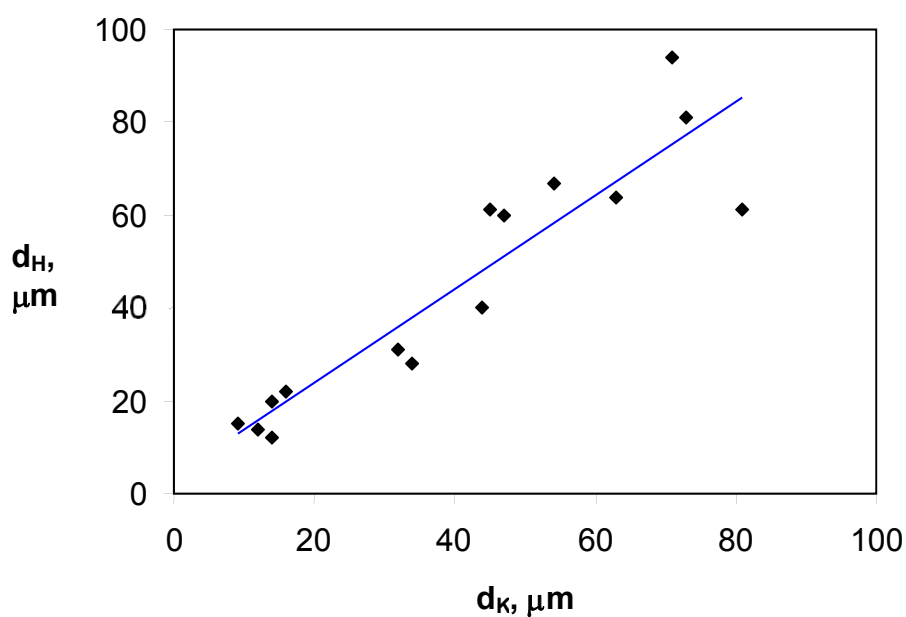
Data pořízená pomocí konfokálního mikroskopu je možné zpracovat pomocí obrazové analýzy, s cílem přesnější vizualizace vzorků, případně objektivizování morfologických prvků vzorku (například velikosti pórů v hydrogelu).

Na obr. 4.12 jsou srovnány prostorové rekonstrukce hydrogelů se stejnou průměrnou velikostí pórů, ale lišící se obsahem MA. Z naměřených dat vyplývá, že při zachování stejné velikosti pórů je nezbytné brát do úvahy i tloušťku „přepážek mezi póry“. Z tohoto hlediska je významný celkový objem pórů vztažený na objemovou jednotku hydrogelu (parametr V_{V1} , viz obr. 4.5).

Dalším z možných využití dat získaných pomocí obrazové analýzy konfokálních obrázků je výpočet prostorových parametrů hydrogelu, například středního průměru póru d_H . Tento parametr byl zvolen pro kompatibilitu s naším modelem (viz graf na obr. 4.4). Vztah mezi d_H (spočtený střední průměr póru) a d_K (střední průměr póru získaný obrazovou analýzou) je na obrázku 4.13.



Obr. 4.12. Prostorová rekonstrukce hydrogelu s porozitou 30-50 μm a obsahem MA 3.37% (A) a 8.62% (B). Měřítko = 100 μm



Obr. 4.13 – korelace mezi průměrnou velikostí póru spočtenou z modelu a průměrnou velikostí póru získanou pomocí obrazové analýzy

Obrazová analýza obrázků, pořízených pomocí konfokálního mikroskopu umožňuje relativně přesně změřit velikost pórů v hydrogelu. Porovnání d_H (spočtený střední průměr póru) a d_K (střední průměr póru získaný obrazovou analýzou) ukázalo statisticky významnou korelaci mezi těmito hodnotami ($d_H = 1.076 \times d_K$, $R^2 = 0.842$), která potvrdila platnost námi navrženého modelu makroporézního hydrogelu, popsaného v oddílu 4.1.

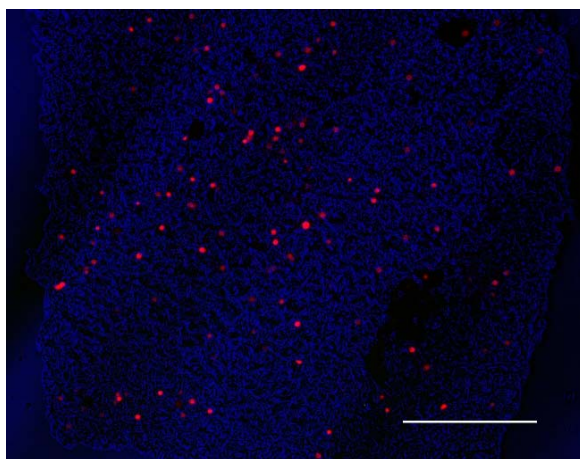
Výsledek byl publikován v rámci práce:
Přádný M, Lesný P, Fiala J, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, et al. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethylmethacrylate. Part 1. Copolymers of 2-hydroxyethylmethacrylate with methacrylic acid. Collection of Czech Chemical Communication. 2002;68:812-22. IF (2013) = 1.137, citováno (2015) 33×

4.6 Růst MSC v hydrogelu na bázi kopolymeru HEMA-MA

Interakce biomateriálu s buňkami v prostředí *in vitro* nám poskytne cenné informace o biokompatibilitě testovaných vzorků. Při pozorování růstu buněk uvnitř implantátů nás také zajímá, zda proniknou buňky do středu implantátu a zda jsou schopné v implantátu přežít. Při využití hydrogelů k terapii míšního poranění se počítá s možností jejich preimplantačního osídlení podpurnými buněčnými typy, například MSC nebo buňkami olfaktorické glie.

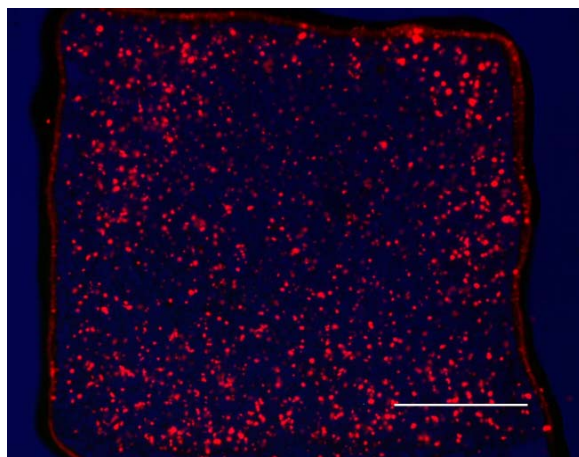
Při testování biokompatibility připravených hydrogelů jsme zvolili MSC, jako typického představitele buněčné linie, kterou by mohly být hydrogely před implantací do míšního poranění osídleny. MSC vylučují řadu růstových faktorů a experimentálně byl opakovaně prokázán jejich neuroprotektivní (Kim et al., 2008) a antiapoptotický (Nagaya et al., 2005) účinek.

Pozorovali jsme růst MSC v námi připraveném hydrogelu. Pro účely tohoto pokusu byl zvolen vzorek 10.1.2.4 (viz tab. 4.1) s porozitou 30-50 μm obsahující 3.37 % MA (obr. 4.12 A). Na obr. 4.14 a 4.15 jsou zobrazeny buňky na řezu hydrogelem třetí a desátý den kultivace.



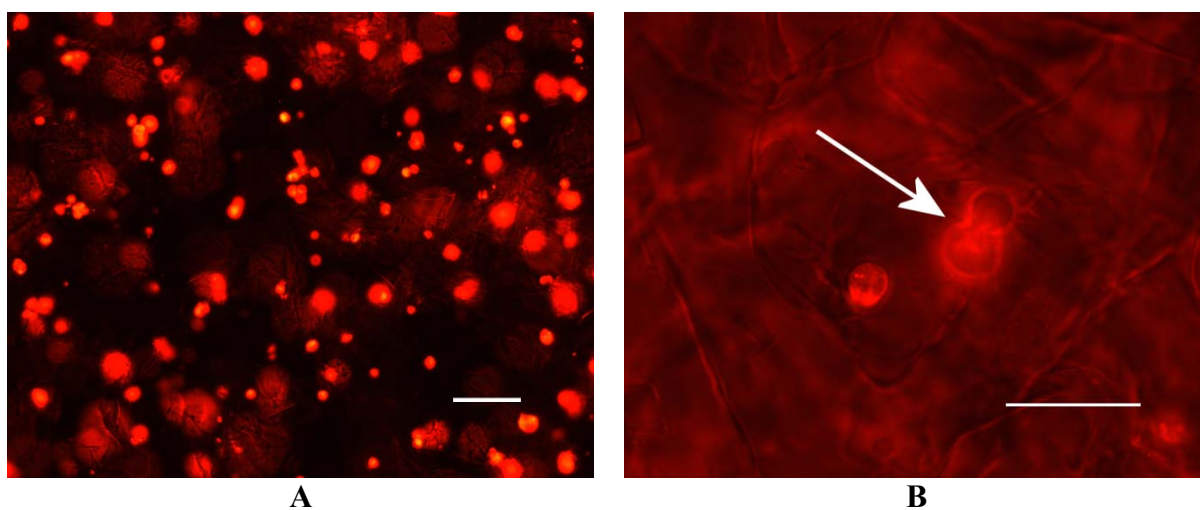
Obr. 4.14. Přehledný obrázek znázorňující růst MSC v hydrogelu 10.1.2.4. třetí den kultivace.

Červeně jsou zobrazeny buňky (barveny PKH26-GL). Měřítko = 800 μm .



Obr. 4.15. Přehledný obrázek znázorňující růst MSC v hydrogelu 10.1.2.4. desátý den kultivace. Červeně jsou zobrazeny buňky (barveny PKH26-GL). Měřítka = 800 μ m.

MSC kultivované v hydrogelu přežívaly do 10. dne kultivace, jejich počet v hydrogelech vzrůstal (obr. 4.16 A). Buňky si zachovávaly kulatý tvar; mikroskopicky bylo možné zachytit i dělící se buňky (obr. 4.16 B).



Obr. 4.16. A. MSC barvené PKH26-GL (červeně) ve středu hydrogelu 10. den kultivace – vysoká denzita buněk, které si udržují kulovitý tvar. Měřítka = 100 μ m. B. Detail dělící se buňky barvené PKH26-GL (červeně) ve středu hydrogelu 10. den kultivace. Měřítka = 50 μ m.

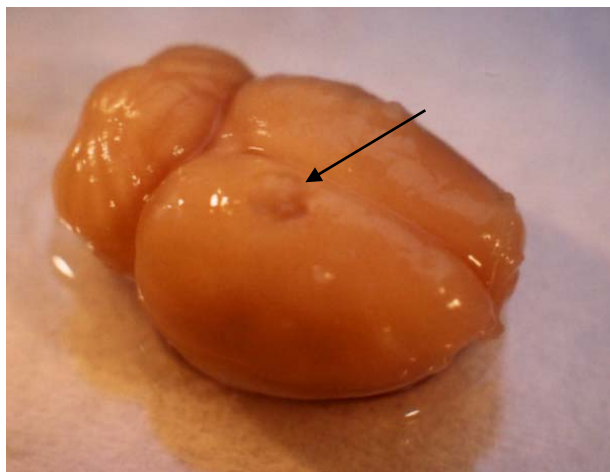
Přítomnost buněk ve středu implantátu prokazuje existenci komunikujících pórů dostatečné velikosti, které dovolují průnik buněk od povrchu až do středu implantátu. Nárůst počtu buněk ve středu hydrogelu a jejich přibližně homogenní distribuce 10. den kultivace naznačuje možnost pohybu buněk v hydrogelu.

V pozorovaném pokusu MSC přežívaly v hydrogelu podobně jako v suspenzi – udržovaly si kulatý tvar a neadherovaly k povrchu biomateriálu. Vzhledem k vysoké předpokládané biokompatibilitě jsme se proto rozhodli implantovat hydrogely HEMA-MA do kortexu laboratorního potkana, abychom studovali jejich interakci s tkání CNS. Póry hydrogelu, pozorované v tomto pokusu (obr. 4.16 B) byly v porovnání s velikostí buněk příliš velké, proto jsme pro další pokusy zvolili vzorek s nižší velikostí pórů.

4.7 Implantace hydrogelů HEMA-MA a HPMA do kortexu laboratorního potkana

Pro ověření biokompatibility připravených hydrogelů v prostředí *in vivo* jsme zvolili jejich implantaci do kůry mozkové laboratorního potkana; pozorovali jsme reakci okolní tkáně na implantovaný hydrogel. Porovnávali jsme námi připravené hydrogely na bázi HEMA-MA s porozitou 0-30 μm , obsahem MA 12 % a mechanickými vlastnostmi shodnými s mozkovou tkání s hydrogelem na bázi HPMA, připraveným metodou srážecí polymerace.

Všechny implantované hydrogely již 1 měsíc po implantaci adherovaly k nervové tkáni (obr. 4.17). V některých případech došlo při manipulaci se vzorkem k vytržení hydrogelu z mozkové tkáně; v takových případech zůstávala v kontaktu s tkání pevně adherující rezidua hydrogelu.

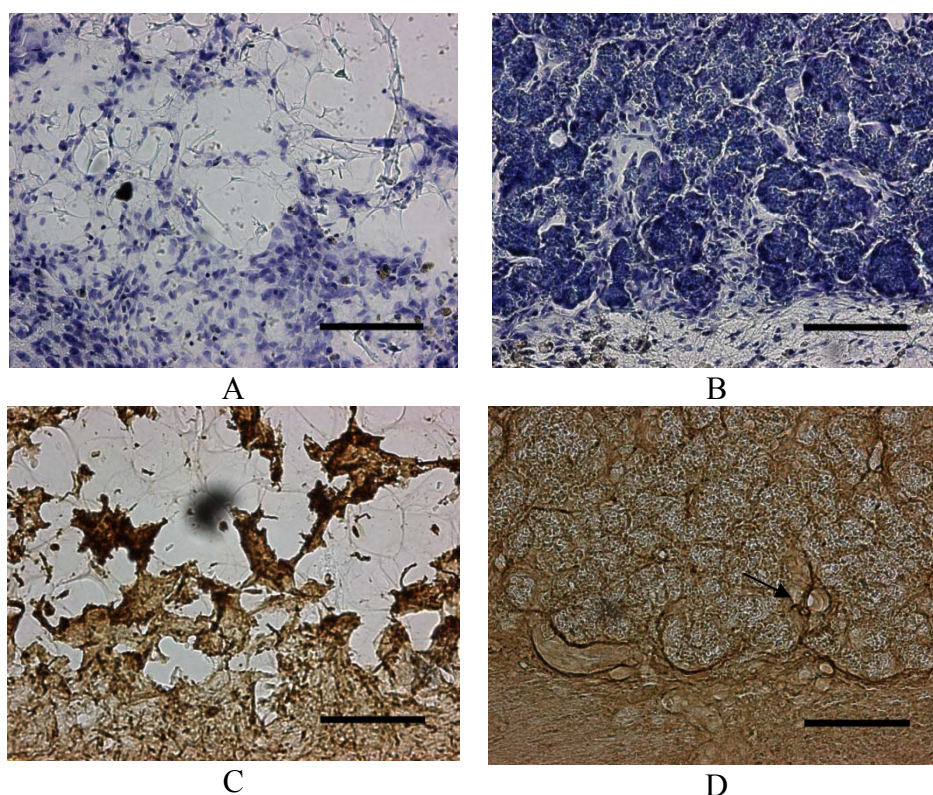


Obr. 4.17. Mozek laboratorního potkana s implantovaným hydrogelem HEMA-MA (šipka).

Přestože jsme pozorovali vrůstání tkáně do obou porovnávaných hydrogelů, lišily se materiály od sebe charakterem vrůstající tkáně a jejím vztahem k biomateriálu. V hydrogelech na bázi HPMA vrůstalo větší množství buněk do hydrogelu, který jimi byl zcela vyplněn: celý blok

hydrogelu obsahoval vysoce buněčnou tkáň s charakterem řídkého vaziva, ve kterém jsme našli probíhající krevní cévy. Hydrogel byl ohraničen větvenými buňkami, jejichž podélná osa byla rovnoběžná s okrajem hydrogelu (obr. 4.18 B, D).

Oproti tomu hydrogel na bázi HEMA-MA obsahoval výrazně nižší podíl buněk; vrůstající buňky byly organizovány v pruzích odpovídajících přibližně makroskopické struktuře přepážek hydrogelu. Hydrogel nebyl opouzdřen (obr. 4.18 A, C). V blízkosti implantovaných hydrogelů jsme nepozorovali reakci na cizí těleso ani lymfocytární infiltraci.



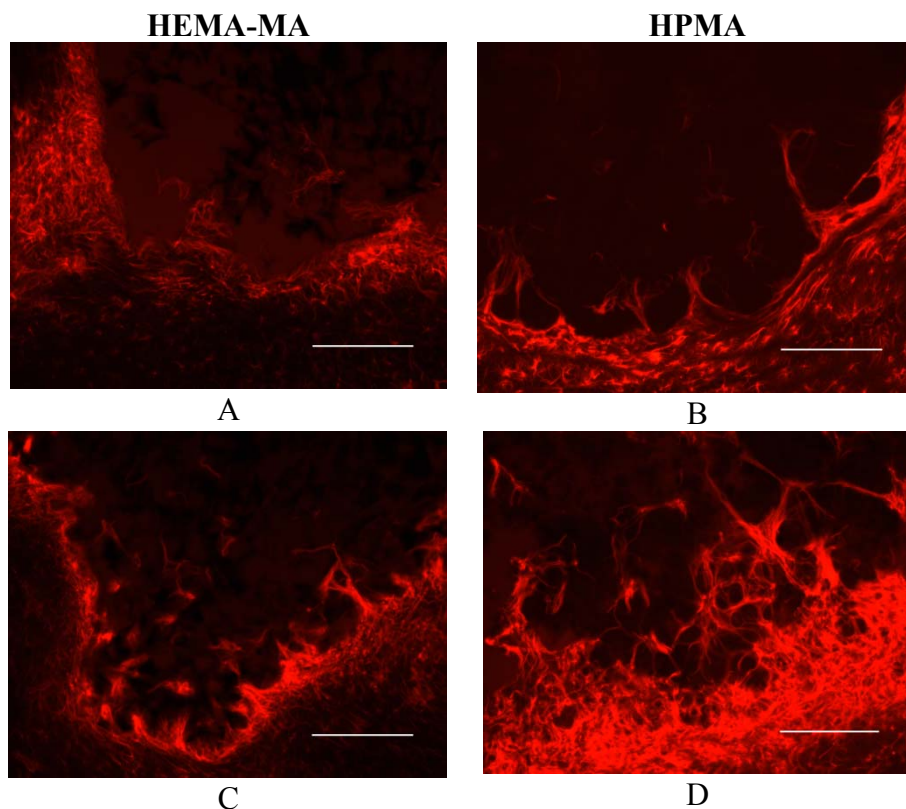
Obr. 4.18. Histologie a imunohistochemie hydrogelů na bázi HEMA-MA (A,C) a hydrogelů na bázi HPMA (B,D) implantovaných do kortexu laboratorního potkana. Měřítka = 100 μ m.

A, B – barvení kresylovou modří C, D – barvení protilátkou anti-GFAP + DAB. Šipkou je označena céva vrůstající do hydrogelu.

Do obou typů hydrogelů (HEMA i HPMA) vrůstaly GFAP pozitivní výběžky astrocytů (obr. 4.19); v obou dvou případech jejich vrůstání sledovalo průběh pruhů buněk ostatní tkáň vrůstajících do hydrogelu.

Obrazovou analýzou preparátů barvených fluorescenční protilátkou proti GFAP jsme objektivizovali vrůstání astrocytů do obou porovnávaných hydrogelů. Přesto, že vrůstání tkáň do hydrogelů na bázi HEMA-MA a HPMA bylo výrazně odlišné, z grafu vyplývá, že

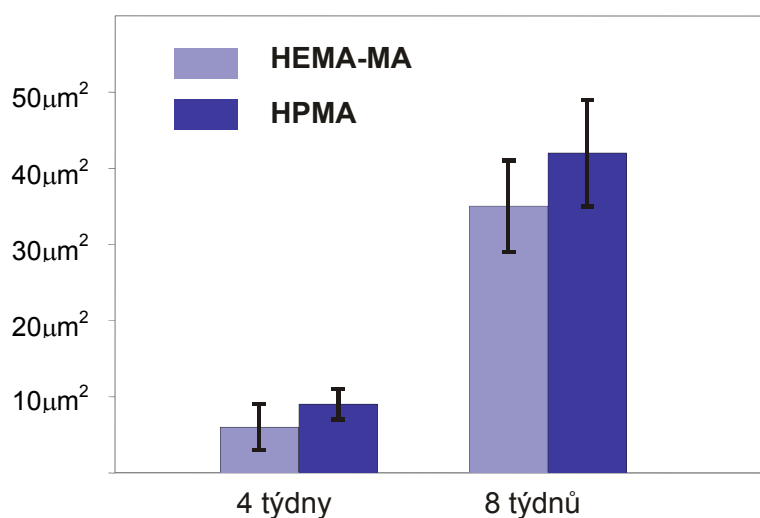
vrůstání astrocytů do hydrogelu (vyjádřené jako celková plocha zaujímaná jejich výběžky) se v obou dvou sledovaných hydrogelech neliší (Obr. 4.20). Výběžky neuronů, barvené protilátkou proti NF-160 se sporadicky objevovaly v obou porovnávaných hydrogelech (Obr. 4.21).



Obr. 4.19. Výběžky astrocytů barvené protilátkou proti GFAP v hydrogelu.

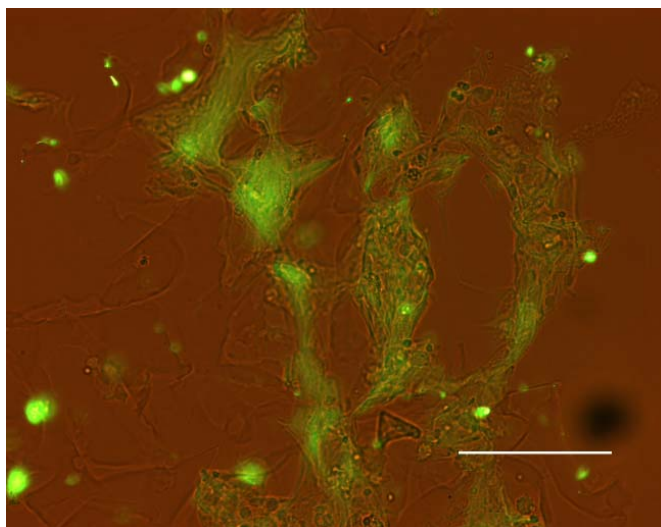
Měřítka = 200 μm . A,B – do hydrogelů 1 měsíc po implantaci vrůstají výběžky astrocytů.

C, D – 2 měsíce po implantaci zasahují výběžky astrocytů dále do středu hydrogelu.



Obr. 4.20. Plocha zaujímaná GFAP pozitivními výběžky astrocytů v hydrogelech 4 a 8 týdnů po implantaci.

Při porovnání námi vybraných hydrogelů na bázi HEMA-MA a hydrogelu na bázi HPMA jsme ověřili biokompatibilitu hydrogelů na bázi HEMA-MA. Zatímco výběžky neuronů se objevovaly sporadicky v obou implantovaných hydrogelech, našli jsme mezi oběma hydrogely značné rozdíly ve vrůstání tkáně a astrocytů.



Obr. 4.21. Výběžky neuronů barvené protilátkou proti NF160 (zeleně); na pozadí je vidět struktura hydrogelu HEMA-MA. Měřítko = 50 μ m.

Na základě našich výsledků jsme se rozhodli modifikovat strukturu makroporézních hydrogelů na bázi HEMA tak, abychom dosáhli větší míry vrůstání tkáňových elementů, které by se staly základem nově vytvořené tkáně v hydrogelu.

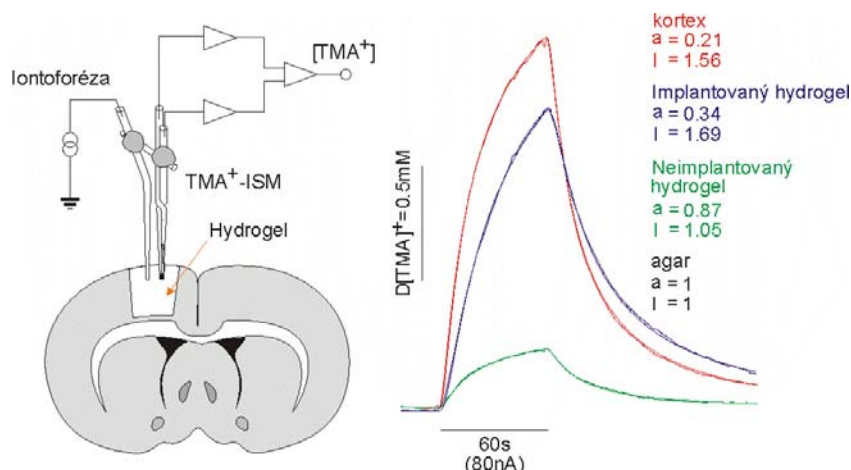
Výsledek byl publikován v rámci práce:

Lesný P, De Croos J, Přádný M, Vacík J, Michálek J, Woerly S, et al. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. Journal of Chemical Neuroanatomy. 2002 May;23(4):243-7. IF (2013) = 2.520, citováno (2015) 75×

4.8 Difúzní vlastnosti implantovaných hydrogelů HEMA-MA a HPMA *in vivo*

Vzhledem k tomu, že difúzi iontů TMA^+ je možné měřit *in vivo*, můžeme prostřednictvím difúzních měření sledovat postup a míru vrůstání tkáně do implantovaných hydrogelů. Měřili jsme změnu difúzních vlastností hydrogelů na bázi HPMA a HEMA-MA před a po jejich implantaci do kortexu laboratorního potkana (Obr. 4.22).

V hydrogelech na bázi HPMA jsme po implantaci pozorovali snížení objemové frakce a nárůst tortuozity (tab. 4.2). V hydrogelech na bázi HEMA-MA s porozitou 0-30 μm a obsahem MA 12 % nedošlo po implantaci k žádné změně difúzních parametrů; tento nálezn je ve shodě s pozorováním, že do hydrogelu nevrůstají tkáňové elementy.



Obr. 4.22. Uspořádání pokusu pro měření difúzních vlastností hydrogelů v kortexu laboratorního potkana. A. uspořádání elektrod, B. difúzní křivky porovnávající difúzi v hydrogelu s difúzí v agaru a v nervové tkáni v prováděném experimentu.

Naše pokusy prokázaly, že je možné využít difúzní měření TMA⁺ ke sledování vrůstání tkáně do hydrogelů *in vivo*. Tuto metodu je tedy možné použít nejen k odlišení hydrogelů, do kterých vrůstají tkáňové elementy od hydrogelů, u kterých ke vrůstání tkáně nedochází, ale i ke sledování časového průběhu „zaplnování“ hydrogelu vrůstající tkání.

	před implantací		po implantaci do kortexu	
	α	λ	α	λ
HEMA-MA	0.46 ± 0.01	1.00 ± 0.01	0.46 ± 0.01	1.00 ± 0.01
HPMA	0.87 ± 0.01	1.05 ± 0.01	0.34 ± 0.01	1.69 ± 0.03

Tab. 4.3. Změny difúzních vlastností hydrogelu na bázi HEMA-MA a hydrogelu na bázi HPMA po implantaci do kortexu laboratorního potkana

Výsledek byl publikován v rámci práce:
Lesný P, De Croos J, Prádný M, Vacík J, Michálek J, Woerly S, et al. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. Journal of Chemical Neuroanatomy. 2002 May;23(4):243-7. IF (2013) = 2.520, citováno (2015) 75×

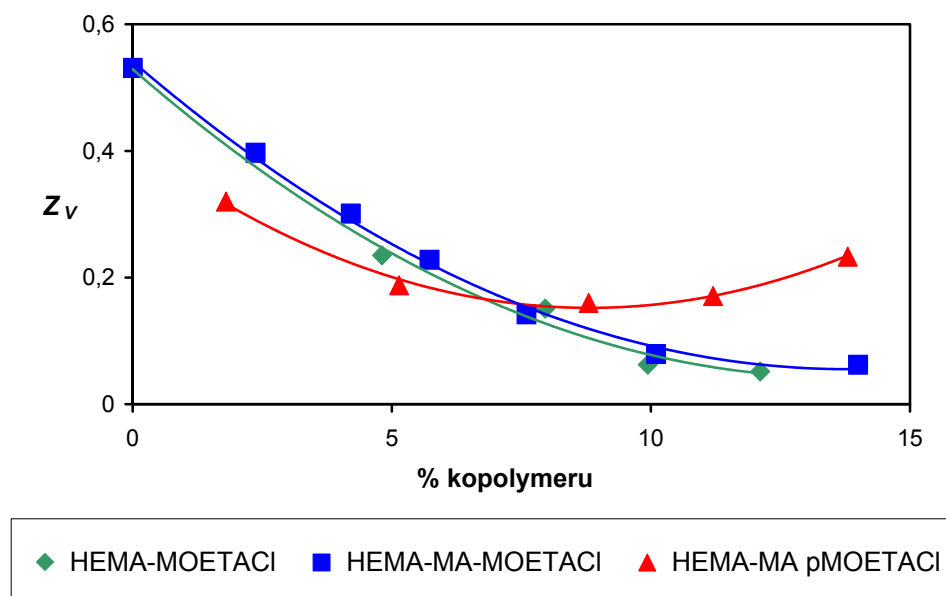
4.9 Hydrogely na bázi kopolymerů HEMA s kladným elektrickým nábojem

Základním rozdílem, který jsme pozorovali mezi hydrogely na bázi kopolymerů HEMA a hydrogely na bázi HPMa byla míra vrůstání tkáňových elementů do hydrogelu. Ukázalo se, že je nezbytné modifikovat vlastnosti námi připraveného hydrogelu tak, aby docházelo ke zvýšení jeho afinity pro buňky a tkáňové elementy.

Na základě pozorování, že buňky při adhezi preferují kladně nabitě povrchy (Qiu et al., 1998; Schneider et al., 2004) jsme rozhodli o modifikaci námi připravených hydrogelů prostřednictvím kopolymerizace s kovalentně vázanou kvarterní amoniovou solí, která zajistí kladný náboj povrchu hydrogelu. V ÚMCH AV ČR, v.v.i. byly připraveny kopolymery HEMA-MOETACI s kladným elektrickým nábojem, HEMA-MA-MOETACI s kladným i záporným elektrickým nábojem a polyelektrolytové komplexy HEMA-MA s lineárním poly-MOETACI, ve kterých jsou kladné náboje MOETACI „blokovány“ vazbou na záporně nabitou MA.

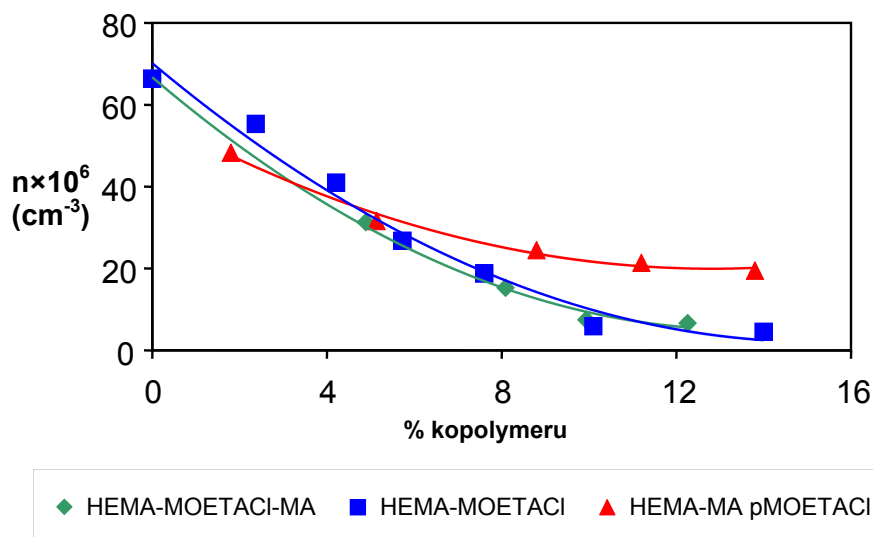
Před využitím těchto materiálů v *in vitro* nebo *in vivo* pokusech jsme na základě naměřených dat vytvořili model, ze kterého jsme dále vycházeli při upřesňování vlastností vyvíjených hydrogelů.

Závislost objemového zlomku suchého polymeru v rovnovážně zbotnalém homogenním, tj. neporézním hydrogelu na obsahu MA v kopolymeru (hmotnostní %) znázorňuje obr. 4.23.

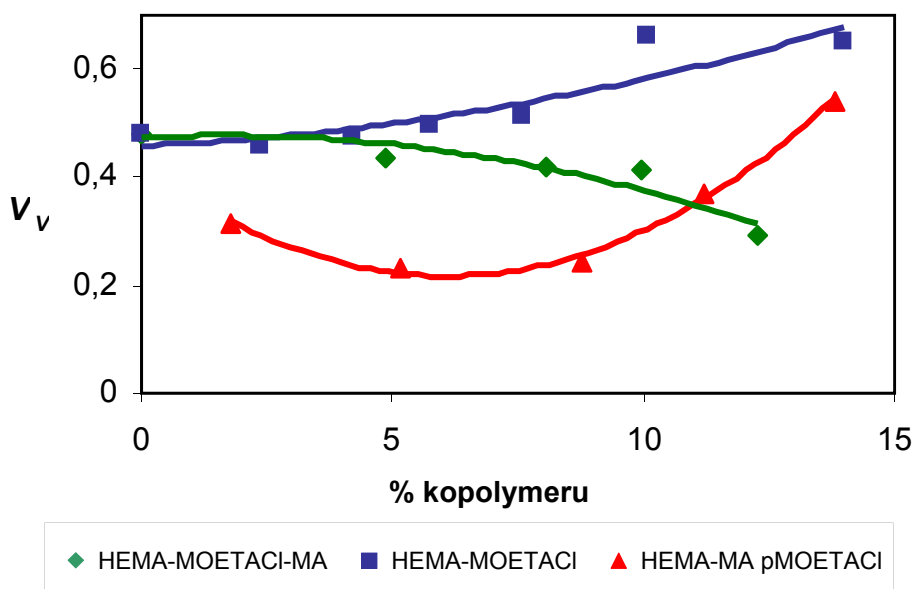


Obr. 4.23. Závislost objemového zlomku polymeru v rovnovážně zbotnalém homogenním hydrogelu na obsahu MA v kopolymerech.

Na obrázku 4.24 je zobrazena závislost počtu pórů na obsahu kopolymeru pro jednotlivé hydrogely obsahující kladně nabitě skupiny MOETACI a pro prostřední frakci chloridu sodného (30-50 μ m) a výsledná závislost celkového objemu pórů v hydrogelu V_V je na obrázku 4.25.



Obr. 4.24. Závislosti počtu pórů na obsahu kopolymeru (MA, MOETACI) ve zbotnalém makroporézním hydrogelu pro frakci chloridu sodného 30-50 μ m.



Obr. 4.25. Závislost celkového objemu pórů V_V na obsahu kopolymeru v makroporézním hydrogelu pro frakci chloridu sodného 30-50 μ m.

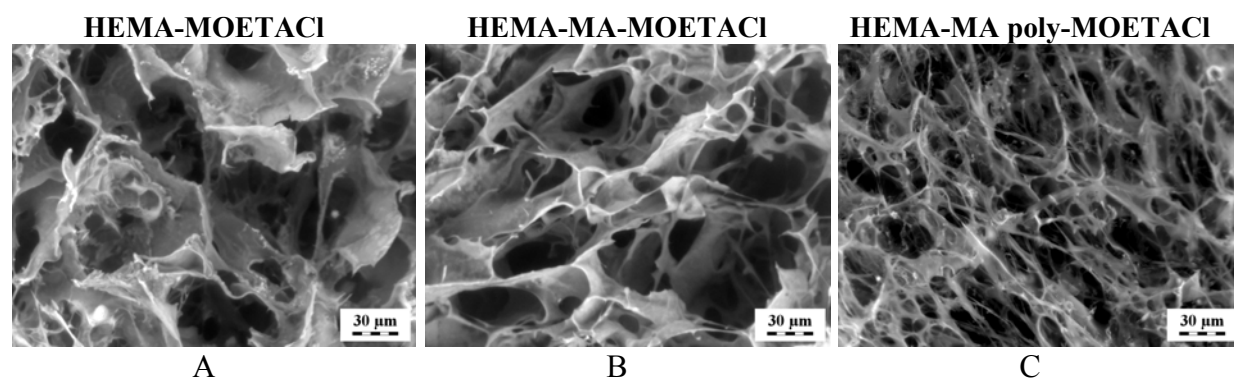
Na rozdíl od hydrogelů založených na kopolymerech HEMA-MA (mezi které patří i polyelektrolytové komplexy HEMA-MA poly-MOETACl) jsme u kopolymerů HEMA-MOETACl a HEMA-MOETACl-MA nepozorovali v oblasti koncentrace MA cca 6% vzrůstání tloušťky přepážek mezi póry. Změna velikosti pórů v rozmezí přijatelné koncentrace kopolymeru (3-10%) byla zanedbatelná. Pro další pokusy jsme zvolili hydrogely s obsahem kopolymeru 9,94 molárních procent.

Výsledek byl publikován v rámci práce:

Přádný M, Lesný P, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 2: Copolymers with positive and negative charges, polyelectrolyte complexes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005;16(8):767-73.
IF (2013) = 2.379, citováno (2015) 23×

4.10 Elektronová a konfokální mikroskopie hydrogelů s kladným elektrickým nábojem

Hydrogely na bázi HEMA s odlišným elektrickým nábojem a s odlišnou porozitou jsme pozorovali v environmentálním elektronovém mikroskopu AQUASEM a v konfokálním mikroskopu. Cílem bylo ověřit morfologii pórů v hydrogelu, zejména přítomnost komunikujících pórů, a její odlišnosti u jednotlivých hydrogelů.

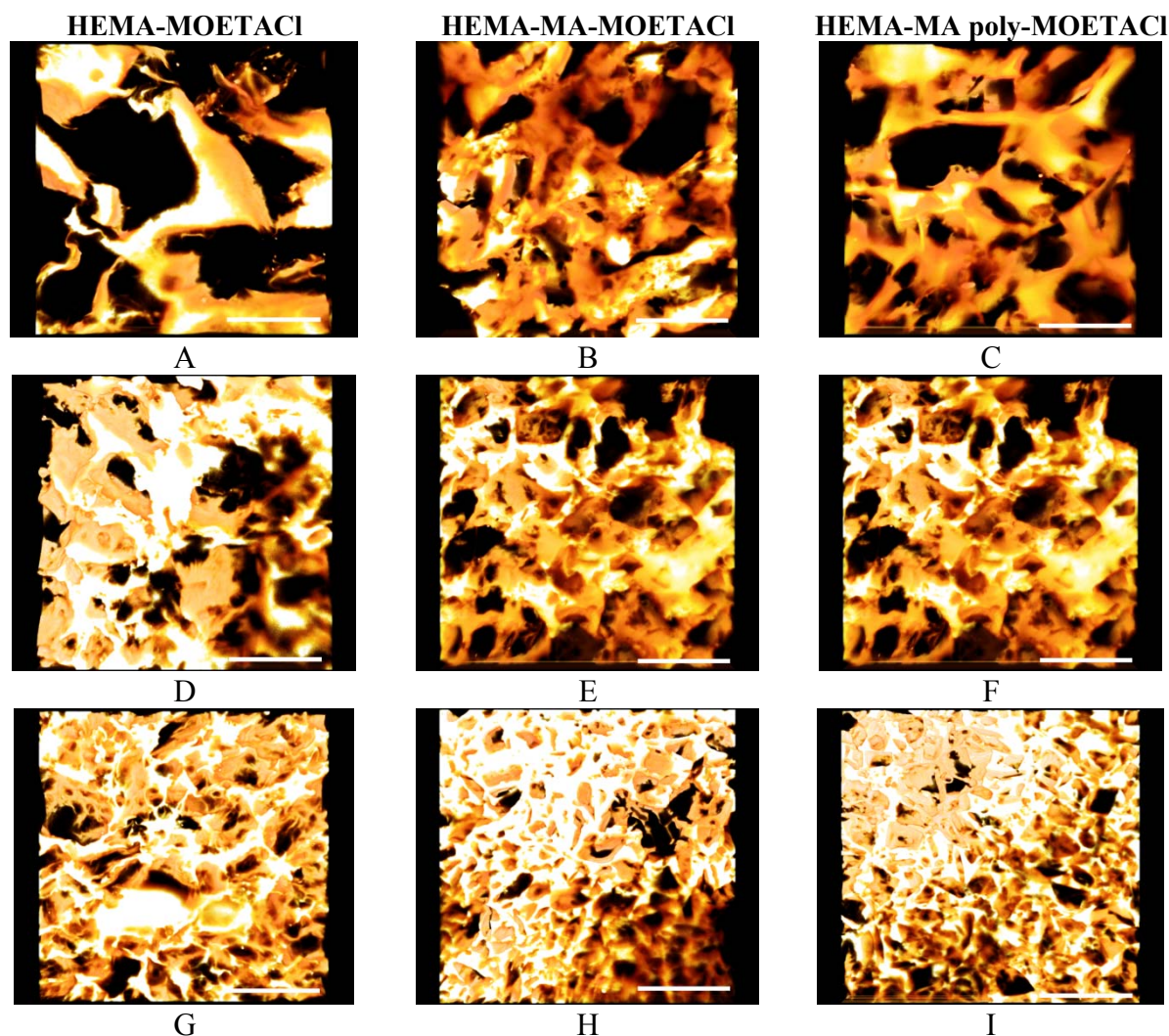


Obr. 4.26. Hydrogely s porozitou 50-90 µm pozorované mikroskopem AQUASEM.

A. Kopolymer HEMA-MOETACl, B. Kopolymer HEMA-MA-MOETACl, C. polyelektrolytový komplex (HEMA-MA poly-MOETACl).

Mikrofotografie hydrogelů s porozitou 50-90 µm a obsahu kopolymeru 9.94 molárních procent pořízené mikroskopem AQUASEM jsou na obrázku 4.26, na kterém vidíme výrazné odlišnosti morfologie, zejména u polyelektrolytových komplexů (Obr. 4.26 C).

Trojrozměrné rekonstrukce jednotlivých hydrogelů (HEMA-MOETACI, HEMA-MA-MOETACI, polyelektrolytové komplexy) pro všechny rozsahy porozity (0-30 μm , 30-50 μm a 50-90 μm) pořízené konfokálním mikroskopem jsou na obrázku 4.27.



Obr. 4.27. Jednotlivé typy hydrogelů pozorované v konfokálním mikroskopu. A,B,C: porozita 50-90 μm , D,E,F: porozita 30-40 μm , G,H,I: porozita 0-30 μm .

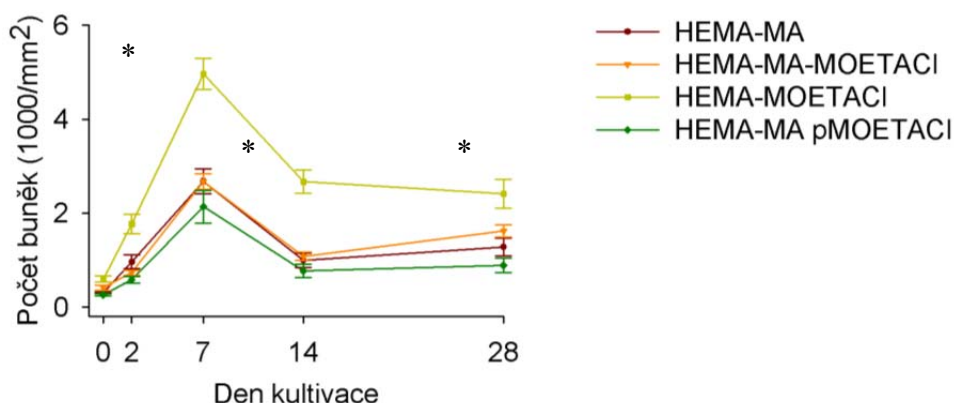
Morfologie všech studovaných hydrogelů potvrdila naše očekávání přítomnosti komunikujících pórů a relativní shody mezi jednotlivými typy hydrogelů s odlišným elektrickým nábojem na povrchu. Při srovnání zobrazení v elektronovém (AQUASEM) a v konfokálním mikroskopu jsou u hydrogelů vystavených nízkému vakuu porušeny některé – zejména ty tenké – přepážky mezi póry; neporušené přepážky, které mohou ovlivňovat vrůstání buněk, jsou však dobře pozorovatelné při zobrazení konfokálním mikroskopem. Vzhledem k tomu, že částečné odstranění vody vlivem vakua používaného při elektronové mikroskopii vede u hydrogelů k porušení přepážek a ke změně pozorované struktury, je

využití konfokálního mikroskopu a pozorování hydrogelů ve vodném prostředí mnohem přínosnější.

Výsledek byl publikován v rámci práce:
Přádný M, Lesný P, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 2: Copolymers with positive and negative charges, polyelectrolyte complexes. <i>Journal of Materials Science: Materials in Medicine</i> . 2005;16(8):767-73. IF (2013) = 2.379, citováno (2015) 23×

4.11 Růst MSC v hydrogelech s kladným elektrickým nábojem

Hodnocení růstu buněk v hydrogelu v prostředí *in vitro* je cenným nástrojem jednak pro určení biologických vlastností hydrogelu, jednak pro vyhodnocení možnosti *in vitro* osídlení biomateriálu buňkami před implantací. V pokusu jsme srovnávali růst buněk v jednotlivých hydrogelech s odlišným povrchovým polárním nábojem (HEMA-MA, HEMA-MOETACI, HEMA-MA-MOETACI a HEMA-MA poly-MOETACI). Buňky jsme v hydrogelech kultivovali po dobu 28 dní.

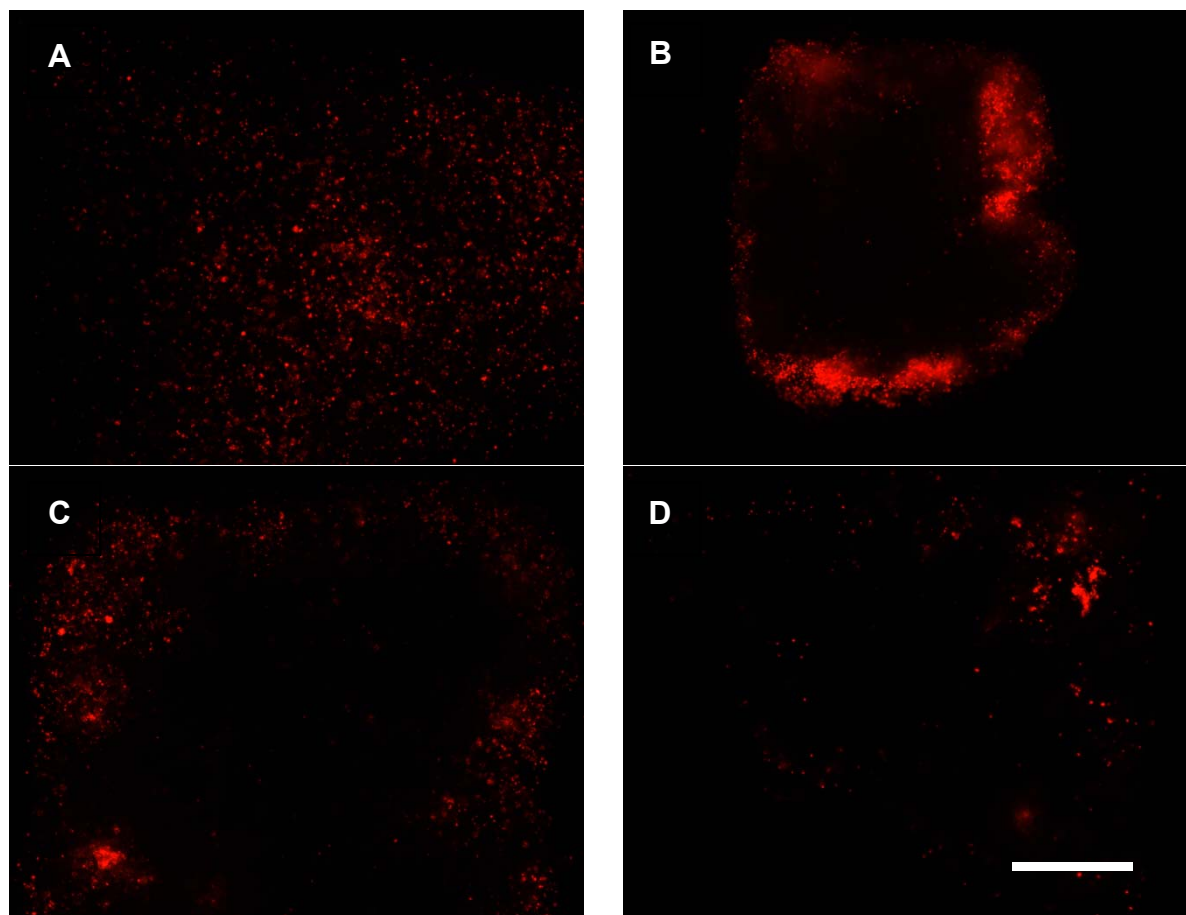


Obr. 4.28. Průměrný počet buněk na řezu hydrogelu u jednotlivých skupin hydrogelů (HEMA-MA, HEMA-MOETACI, HEMA-MA-MOETACI a HEMA-MA poly-MOETACI). Hvězdička označuje statisticky významnou odlišnost hydrogelu HEMA-MOETACI od všech ostatních typů.

Celkový počet buněk na řezu hydrogelu, který je dobrým ukazatelem osídlení hydrogelu buňkami, je na obrázku 4.28. Absolutně nejvyšší počet buněk byl naměřen v hydrogelu na bázi HEMA-MOETACI od 2. dne kultivace.

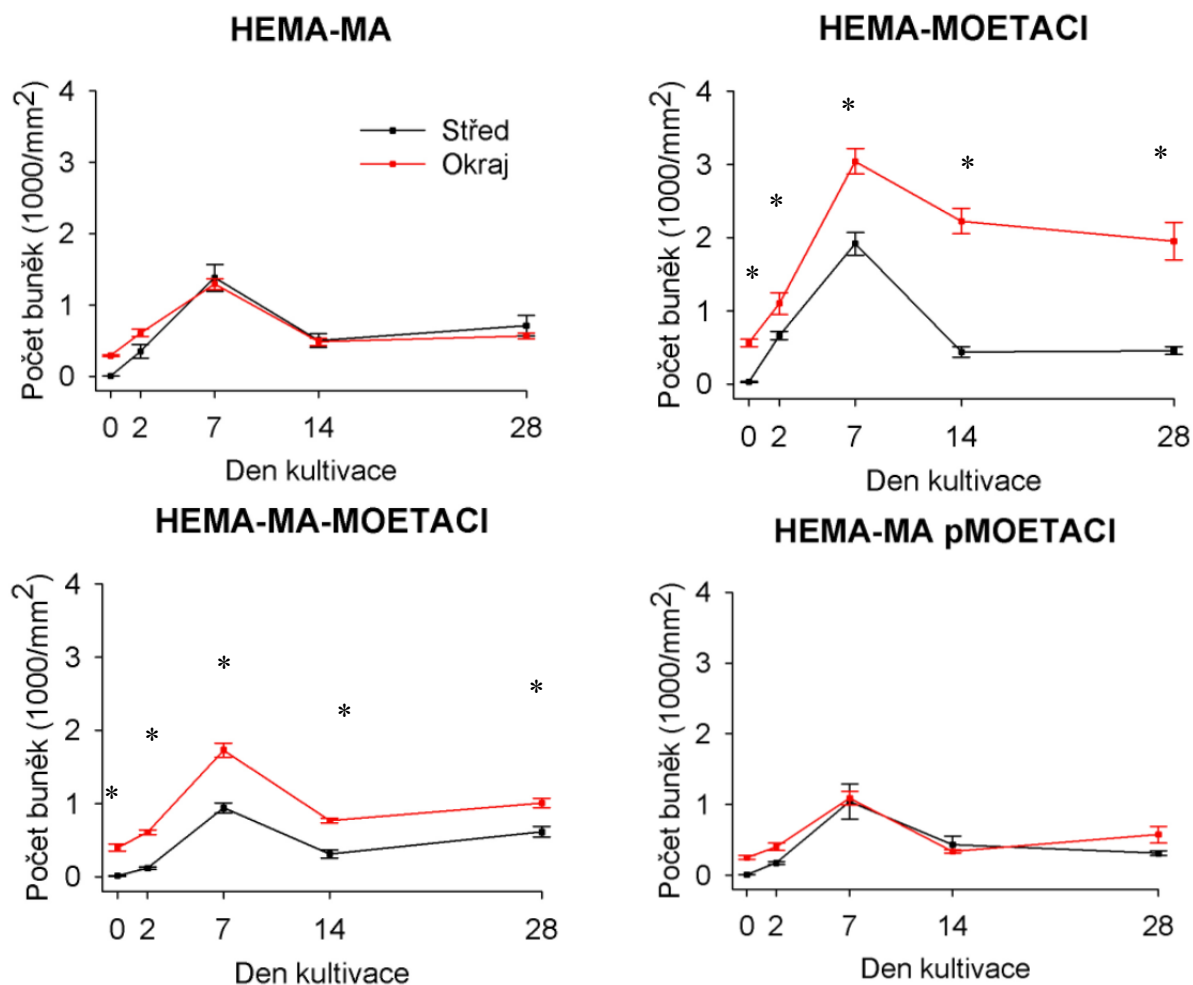
Při hodnocení růstu buněk v hydrogelech jsme našli zajímavou závislost mezi osídlením hydrogelu buňkami a typem povrchového náboje, která se nejvíce manifestovala

sedmý den kultivace (Obr. 4.29). V hydrogelech nesoucích nestíněný kladný povrchový náboj (HEMA-MOETACl a HEMA-MA-MOETACl) jsme pozorovali výraznější růst buněk v okrajové vrstvě hydrogelu; množství buněk ve středu hydrogelu bylo v jednotlivých skupinách podobné.



Obr. 4.29. Růst mezenchymových buněk barvených PKH26-GL v makroporézních hydrogelech na bázi HEMA s porozitou 50-70 μm 7. den kultivace. A. Hydrogel HEMA-MA, B. Hydrogel HEMA-MOETACl, C. Hydrogel HEMA-MA-MOETACl, D. Hydrogel HEMA-MA poly-MOETACl (polyelektrolytový komplex). Měřítka = 500 μm .

Použití obrazové analýzy nám umožnilo objektivizovat naše pozorování a porovnat množství buněk v centrální a okrajové zóně pozorovaných hydrogelů (obr. 4.30). U hydrogelů nesoucích kladné elektrické náboje (ne však u polyelektrolytových komplexů, u kterých byl kladný elektrický náboj stíněný) jsme našli od 2. dne kultivace signifikantní rozdíl mezi počtem buněk v okrajové a centrální zóně hydrogelu.



Obr. 4.30. Růst mezenchymových buněk v makroporézních hydrogelech na bázi HEMA s porozitou 50-70 μm . A. Hydrogel HEMA-MA, B. Hydrogel HEMA-MOETACI, C. Hydrogel HEMA-MA-MOETACI, D. Hydrogel HEMA-MA poly-MOETACI (polyelektrolytový komplex).

Nárůst počtu buněk ve všech sledovaných hydrogelech od počátku kultivace až do 7. dne je pravděpodobně způsoben růstem buněk v hydrogelu; zajímavý je úbytek, ke kterému dojde ve všech případech mezi 7. a 14. dnem kultivace. Ověřili jsme, že tento úbytek není artefaktem způsobeným obrazovou analýzou; jeho nejpravděpodobnější příčinou se zdá dosažení limitu pro výživu buněk v hydrogelu, které se projeví snížením jejich počtu a dále udržováním populace v hydrogelu na určité úrovni. Rozdíl v množství buněk mezi středovou a okrajovou vrstvou si vysvětlujeme jednak vyšší dostupností živin na periferii hydrogelu, která urychluje růst a dělení buněk a dále tím, že snížená adheze buněk v hydrogelech HEMA-MA a polyelektrolytových komplexech spolu s pohybem tekutiny vzniklým například při dolévání média napomohla náhodnému rozmístění buněk v bloku hydrogelu.

Z nálezu limitu pro kultivace buněk u implantátů milimetrových rozměrů vyplývá také nutnost – v případě implantátů větších rozměrů osazených buňkami – jejich kultivace v prostředí, které zajistí vyšší přísun živin i pro buňky ve středu implantátu. Toho lze dosáhnout využitím bioreaktoru, nebo perfúzí implantátu kultivačním médiem.

Výsledek byl publikován v rámci práce:
Lesný P, Přádný M, Jendelová P, Michálek J, Vacík J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 4: Growth of rat bone marrow stromal cells in three-dimensional hydrogels with positive and negative surface charges and in polyelectrolyte complexes. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2006 Sep;17(9):829-33. IF (2013) = 2.379, citováno (2015) 31×

4.12 Difúzní charakteristiky hydrogelů s kladným elektrickým nábojem

Vzhledem k již zmiňovanému významu difúze v implantovaných biomateriálech jsme i u připravených hydrogelů na bázi HEMA s odlišným elektrickým nábojem změřili difúzní parametry *in vitro*. Měření jsme provedli jak u hydrogelů bez buněk, tak – v případě hydrogelů HEMA-MA a HEMA-MOETACI – 14. den kultivace MSC v hydrogelech.

	α	λ
HEMA-MA	0.879 ± 0.014	1.074 ± 0.006
HEMA-MOETACI	0.993 ± 0.087	1.021 ± 0.047
HEMA-MA-MOETACI	0.770 ± 0.005	1.040 ± 0.010
HEMA-MA poly-MOETACI	0.874 ± 0.031	1.145 ± 0.017

Tab. 4.4. Srovnání difúzních vlastností hydrogelů na bázi HEMA.

	střed		okraj	
	α	λ	α	λ
HEMA-MA	0.774 ± 0.029	1.045 ± 0.013	0.787 ± 0.044	1.045 ± 0.006
HEMA-MOETACI	0.863 ± 0.235	1.067 ± 0.035	0.805 ± 0.089	1.061 ± 0.017

Tab. 4.5. Difúzní vlastnosti v okrajové a střední zóně hydrogelů HEMA-MA a HEMA-MOETACI.

Přehled difúzních vlastností hydrogelů je v tabulce 4.4 a srovnání difúzních vlastností v centrální a okrajové zóně hydrogelu je v tabulce 4.5. Objemová frakce extracelulárního prostoru (resp. prostoru zaujímaného póry) u hydrogelů se pohybovala mezi 0,77 a 0,99;

signifikantně nejnižší byla u terpolymerů HEMA-MA-MOETACl, nejvyšší byla u kopolymerů HEMA-MOETACl. Vrstvení buněk do hydrogelů HEMA-MA a HEMA-MOETACl způsobilo snížení objemové frakce ECP α , nicméně nezměnilo tortuozitu tohoto prostoru. U hydrogelů HEMA-MOETACl jsme zcela v souladu s předchozím pozorováním našli signifikantně vyšší hodnotu objemové frakce ECP α v centrální zóně hydrogelu v porovnání se zónou okrajovou.

Hodnota objemové frakce extracelulárního prostoru (α) není zcela totožná s objemem pórů (hodnota Z_v): jedná se o funkční parametr, který aproximuje objem, ve kterém se nachází difundující látka (ionty TMA^+).

Hodnoty tortuozity blízké 1,0 u všech vzorků svědčí pro volnou, ničím nebrzděnou difúzi v hydrogelech, která se jen nevýrazně mění v závislosti na jejich typu a přítomnosti buněk. Ve srovnání s mozkovou tkání není totiž v tekutině v pórech vysoký obsah makromolekul a výběžků buněk, které zvyšují tortuozitu tak, jako například v CNS (Nicholson a Syková, 1998; Syková a Nicholson, 2008).

Výsledek byl publikován v rámci práce:

Lesný P, Přádný M, Jendelová P, Michálek J, Vacík J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 4: Growth of rat bone marrow stromal cells in three-dimensional hydrogels with positive and negative surface charges and in polyelectrolyte complexes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006 Sep;17(9):829-33. IF (2013) = 2.379, citováno (2015) 31×

4.13 Implantace hydrogelů s elektrickým nábojem do hemisekce míchy

Připravené kopolymery HEMA s odlišným elektrickým nábojem byly implantovány do dutiny vytvořené hemisekcí v hrudní míše laboratorního potkana. Pro implantaci byla zvolena stejná strana (pravá) a stejná výška (Th6-9) u všech zvířat; implantován byl bloček hydrogelu o velikosti cca $2 \times 2 \times 2$ mm. V každé implantované skupině bylo operováno 7 experimentálních zvířat. Vyhodnocení jsme provedli histologicky a imunohistochemicky jeden měsíc od implantace.

Po 1 měsíci od implantace všechny implantované hydrogely pevně adherovaly k okolní míšní tkáni (Obr. 4.32) a nebyly kolonizovány zánětlivými elementy. Hydrogely byly obklopeny jen tenkým vazivovým pouzdrem, které nebránilo vrůstání míšní tkáně do pórů. Reakce na cizí těleso (přítomnost mnohobuněčných buněk) byla vyjádřena pouze u polyelektrolytových komplexů. Minimální množství vrůstající tkáně jsme našli

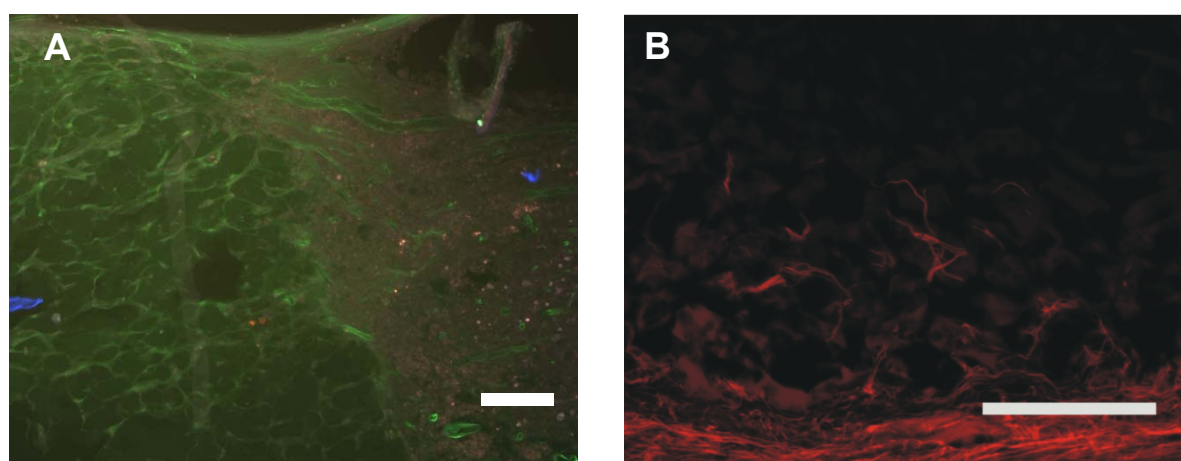
v hydrogelech se záporným povrchovým nábojem, maximální v hydrogelech s kladným povrchovým nábojem.

Při imunohistochemickém barvení jsme pozorovali vrůstání RECA pozitivních cév do všech hydrogelů (Obr. 4.31A). Implantovaný hydrogel byl obklopen nevýraznou gliovou jizvou; GFAP pozitivní výběžky astrocytů vrůstaly jen minimálně, převážně z mediální části hydrogelu (Obr. 4.31B). Výběžky nervových buněk, barvené protilátkou proti NF160 vrůstaly do hydrogelů z rostrální, kaudální i mediální části. Medián stupně vrůstání výběžků astrocytů a nervových buněk (dle škály popsané v kapitole 3.10) do hydrogelů je v tabulce 4.6.

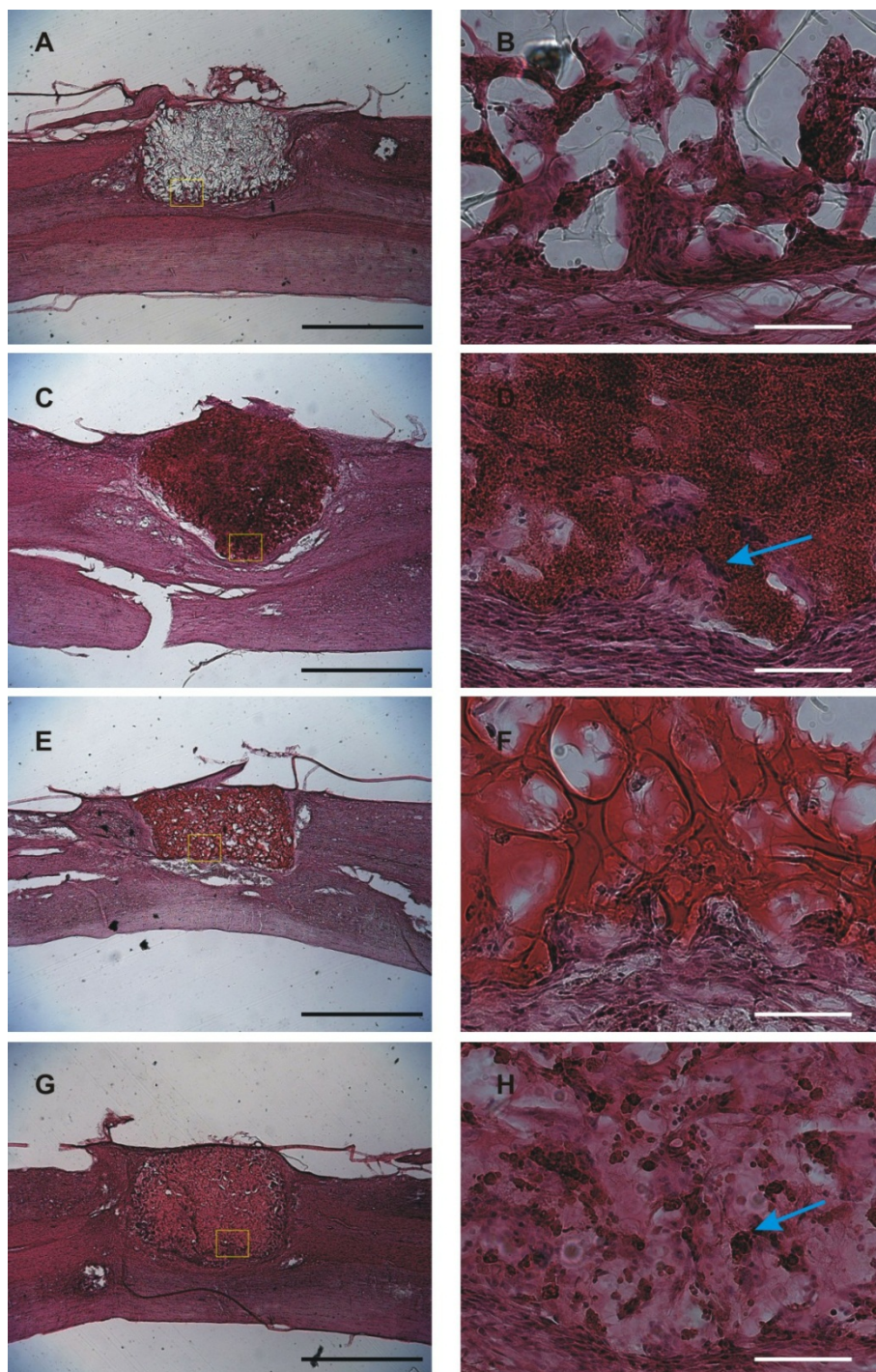
Hydrogel	NF160 (neurony)	GFAP (astrocyty)
HEMA-MA	3	1
HEMA-MOETACI	3	0
HEMA-MA-MOETACI	3	0
HEMA-MA poly-MOETACI	1.5	1

Tab. 4.6. Vrustání výběžků neuronů a astrocytů do jednotlivých skupin hydrogelů (medián dle škály popsané v kapitole 3.10.).

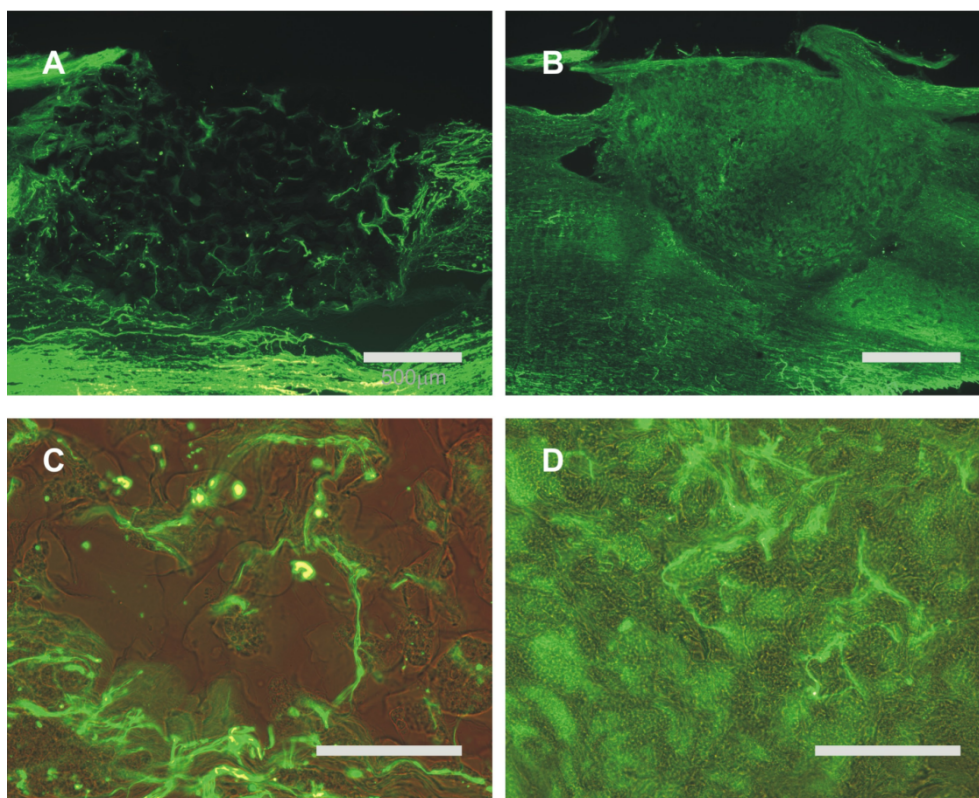
Zajímavý byl poměr mezi vrůstáním neurofilament a okolní tkáně (Obr. 4.33): u hydrogelů se záporným povrchovým nábojem (HEMA-MA) do hydrogelu vrůstalo jen minimální množství tkáně, přesto bylo vrůstání neurofilament stejně vyjádřené, jako u hydrogelů s kladným nábojem (HEMA-MOETACI).



Obr. 4.31. A. Vrustání cév do hydrogelů HEMA-MOETACI, barveno na RECA. B. Vrustání výběžků astrocytů do hydrogelů HEMA-MA, barveno na GFAP. Měřítka = 50 μ m.



Obr. 4.32. Vrůstání míšní tkáně do hydrogelů na bázi HEMA, barveno hematoxylinem-eosinem. A,B. Málo významné vrůstání tkáně do hydrogelů HEMA-MA. C,D. Vrůstání tkáně do hydrogelů HEMA-MOETACl v pruzích (šipka). E,F. Minimální vrůstání tkáně do hydrogelů HEMA-MA-MOETACl s nepřítomností reakce na cizí těleso. G,H. Reakce na cizí těleso u polyelektrolytových komplexů (šipka). Měřítko: 1mm (A,C,E,G) a 50 μ m (B,D,F,H).



Obr. 4.33. Vrůstání výběžků neuronů do hydrogelů na bázi HEMA-MA (A, C) a HEMA-MOETACl (B, D). Barveno na NF-160. Měřítka 500 µm (A,B) a 50 µm (C,D).

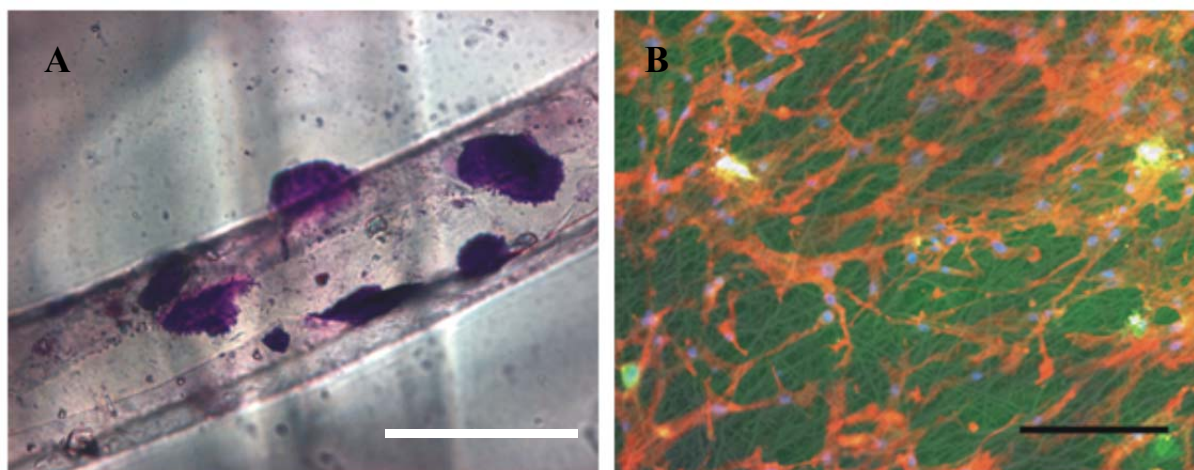
Výsledek byl publikován v rámci práce:

Hejčl A., Lesný P., Přádný M., Šedý J., Zámečník J., Jendelová P., Michálek J., Syková E.: Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 6: 3D hydrogels with positive and negative surface charges and polyelectrolyte complexes in spinal cord injury repair. J Mater Sci Mater Med. 2009;20:1571-7.
IF (2013) = 2.379, citováno (2015) 22×

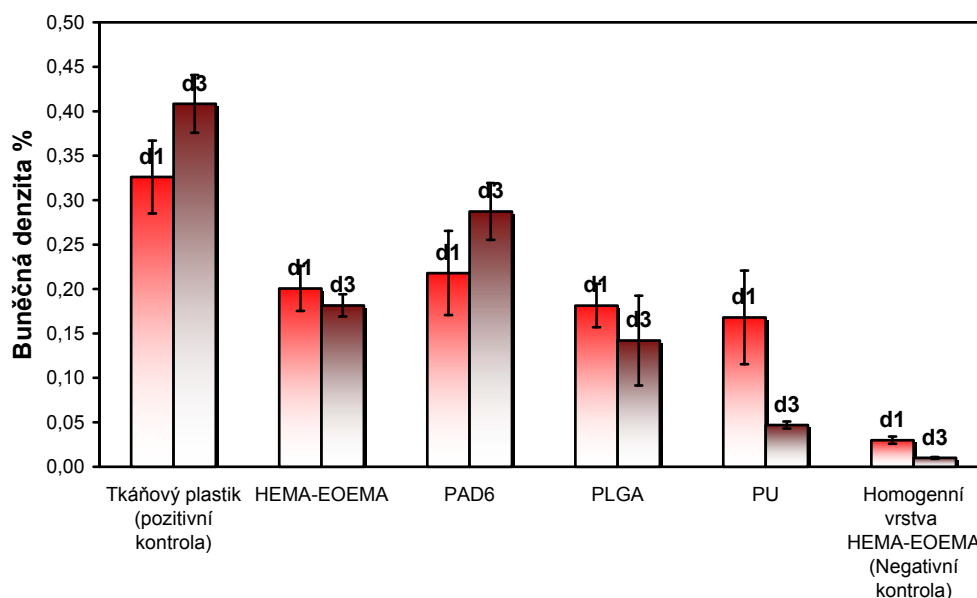
4.14 Růst buněk na mikrovlákněch a nanovlákněch

Klasická metoda přípravy trojrozměrných implantátů s komunikujícími póry, kterou použil již Vacanti (Vacanti et al., 1994) využívá netkané sítě (vaty) vytvořené z vláken o průměru desítek mikrometrů (mikrovláken). Buňky, které jsou řádově stejné velikosti jako mikrovlákná, na nich rostou obdobně jako na dvourozměrném povrchu (obr. 4.34 A). Pro rekonstrukce nervové tkáně, ve které záleží na organizaci extracelulární matrix, je vhodnější využít vlákna řádově menšího průměru. Vzhledem k tomu, že kopolymery kyseliny methakrylové mohou být zvlákněny přístrojem Nanospider™ na nanovláknenné vrstvy s tloušťkou v řádu desítek až stovek mikrometrů (Jirsák et al., 2004), připravili jsme ve spolupráci s Katedrou netkaných textilií Technické univerzity v Liberci řadu nanovláknenných

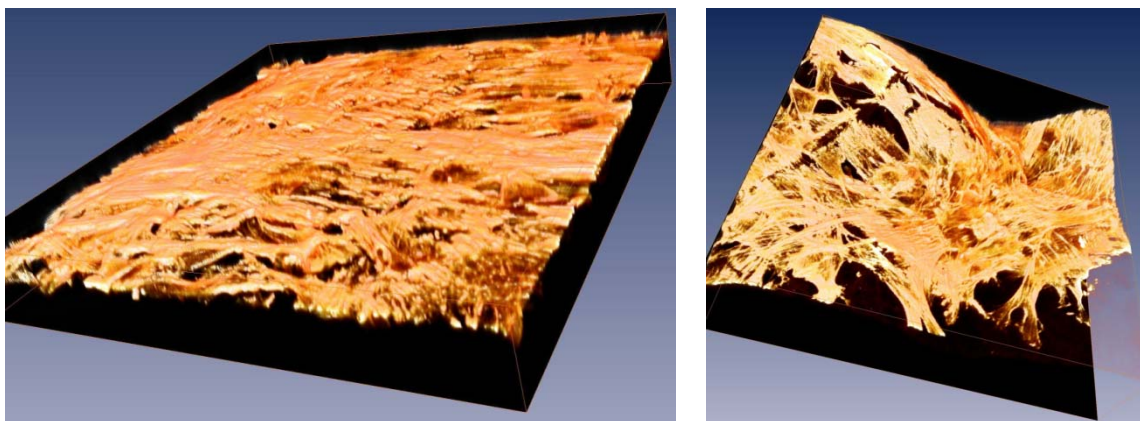
biomateriálů pro kultivaci buněk a přípravu trojrozměrných struktur. Poměr mezi buňkami a nanovláknny (obr. 4.34 B) je příznivější a připomíná vztahy buněk a molekul extracelulární matrix (Schindler et al., 2005) a řada buněčných typů (MSC, astrocyty) k nanovláknům adhuje obdobně jako k tkáňovému plastiku.



Obr. 4.34. A. MSC na povrchu mikrovláken barvené kresylovou violetí. B. MSC na povrchu nanovláken barvené phalloidinem (cytoskelet) červeně a DAPI (jádra buněk) modře. Měřítka = 50μm.



Obr. 4.35. Růst astrocytů první (d1) a třetí den (d3) po osazení na nanovláknkách připravených z kopolymeru kyseliny methakrylové (HEMA-EOEMA), polyamidu (PAD6), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové kyseliny (PLGA) a polyuretanu (PU). Jako pozitivní kontrola byl zvolen tkáňový plastik, jako negativní kontrola homogenní vrstva kopolymeru HEMA-EOEMA.



Obr. 4.36 Trojrozměrná rekonstrukce růstu MSC barvených phalloidinem na nanovláknenných nosičích HEMA-EOEMA 5. den po osazení plochých (A) a zvlněných (B). Konfluentní vrstva buněk kopíruje povrch nanovláknenného nosiče.

Pro další experimenty jsme ověřili růst astrocytů na nanovláknenných vrstvách připravených pomocí přístroje Nanospider™ z řady biokompatibilních polymerů. Zjistili jsme, že astrocyty (obr. 4.35) i MSC (obr. 4.34 B, 4.36) adherují k nanovláknům lépe než k homogenním vrstvám identických polymerů.

Při kultivaci MSC buněk na nanovláknenných nosičích HEMA-EOEMA jsme 5. den po osazení pozorovali konfluentní růst buněk na povrchu nosiče (Obr. 4.36). Prostorová rekonstrukce odhalila také vrůstání výběžků buněk do nanovláknenné vrstvy, buňky však neprorůstaly na druhou stranu.

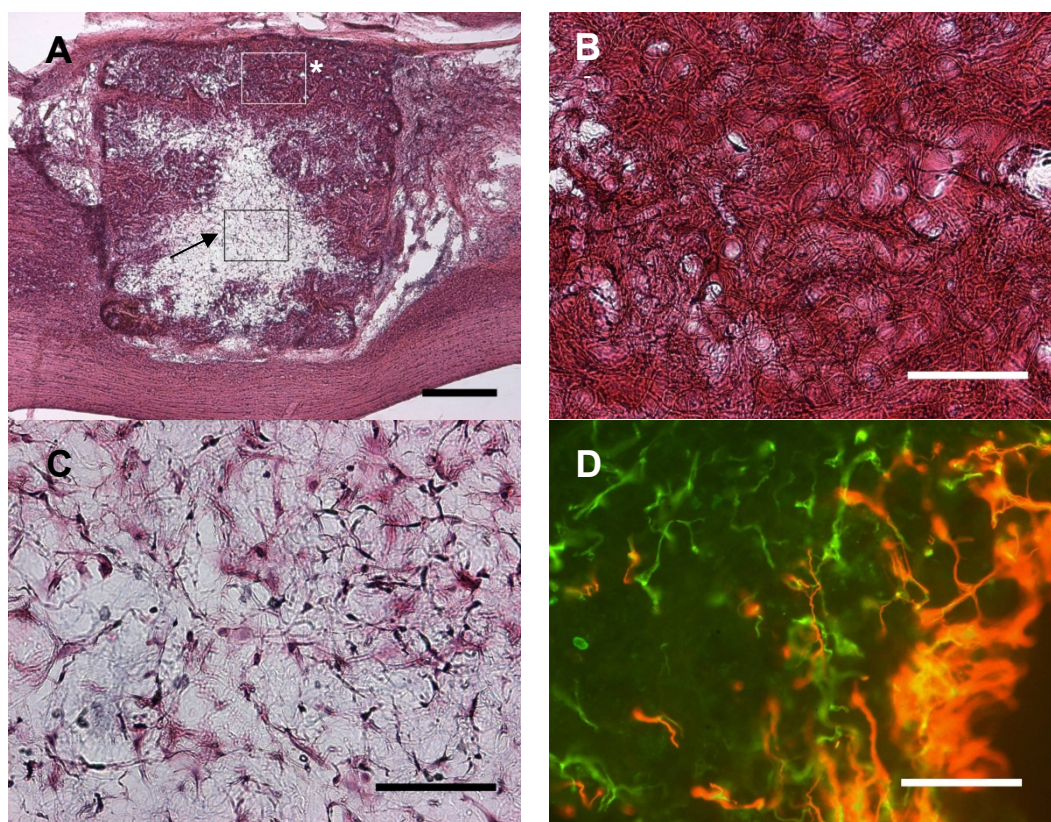
Výsledky posloužily jako podklad pro patent:

Lesny P., Syková E., Michalek J., Prádný M., Jirsák O., Martinová L.: Biomateriál na bázi nanovláknenných vrstev a způsob jeho přípravy. Český patent č. 300805, 2007.

4.15 Implantace nanovláknenných nosičů do míchy

Současné technologické možnosti (elektrospinning, případně technologie Nanospider™) umožňují připravovat nanovláknenné nosiče tloušťky řádově v milimetrech; takto vytvořená nanovláknenná textilie je však homogenní a její porozita (řádově ve stovkách nanometrů) neumožňuje vrůstání buněk. Pro přípravu prostorového nanovláknenného nosiče jsme proto využili technologii skládání trojrozměrného tvaru z jednotlivých nanovláknenných vrstev. Tato technologie, kterou jsme pro její novost patentovali (Český patent číslo 300805), umožňuje připravit trojrozměrný implantát složením požadovaného tvaru z jednotlivých

vrstev nanovláken (které mohou případně obsahovat buňky zajišťující funkční propojení těchto vrstev již v prostředí in vitro).



Obr. 4.37. Implantace nanovláčenného implantátu do míchy – případ, kdy nanovláčenné vrstvy vedou rovnoběžně s míchou a pozorujeme výraznější vrůstání tkáňových elementů. A. Přehledný řez implantátem v míše, který prochází skrz prostor mezi nanovláčennými vrstvami (hvězdička) a skrze nanovláčennou tkaninu (šipka). Měřítko = 500 μ m. B. Detail řezu procházejícího mezi nanovláčennými vrstvami obsahujícího denzní tkáň. C. Detail řezu nanovláčennou vrstvou obsahujícího jen malé množství buněk. D. Okraj implantátu barvený protilátkou proti NF160 (zeleně) a GFAP (červeně). Měřítko = 50 μ m.

Trojrozměrné nanovláčenné implantáty na bázi kopolymerů HEMA-EOEMA jsme implantovali do dutiny vytvořené hemisekcí v hrudní míše laboratorního potkana. Pro implantaci byla zvolena stejná strana (pravá) a stejná výška (Th6-9) u všech zvířat. Operováno bylo 5 experimentálních zvířat. Vyhodnocení jsme provedli histologicky a imunohistochemicky 1 měsíc od implantace.

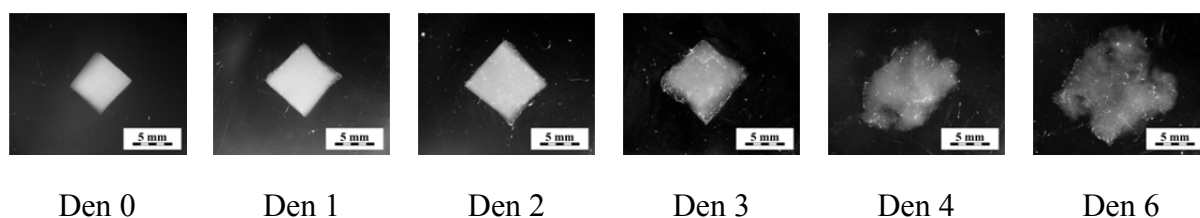
Po jednom měsíci od implantace (Obr. 4.37) jsme pozorovali srůstání nanovláčenných implantátů a okrajů míšní léze. Sledované elementy nervové tkáně (výběžky nervových

buněk, astrocyty, cévy) prorůstaly v místech kontaktu nanovláknenného nosiče s nervovou tkání do implantátu. Jednotlivé elementy nervové tkáně vrůstaly méně do implantátů, u kterých došlo k osovému pootočení a které naléhaly na nervovou tkáň nanovláknennou vrstvou. V těchto případech došlo pouze ke vrůstání vaziva v pruzích (pravděpodobně z míst, kde byla homogenita nanovláknenného implantátu porušena). Výběžky nervových buněk a astrocyty prorůstaly do tkáně převážně „mezi nanovláknenné vrstvy“.

Výsledky posloužily jako podklad pro patent:
Lesny P., Syková E., Michalek J., Prádný M., Jirsák O., Martinová L.: Biomateriál na bázi nanovláknenných vrstev a způsob jeho přípravy. Český patent č. 300805, 2007.

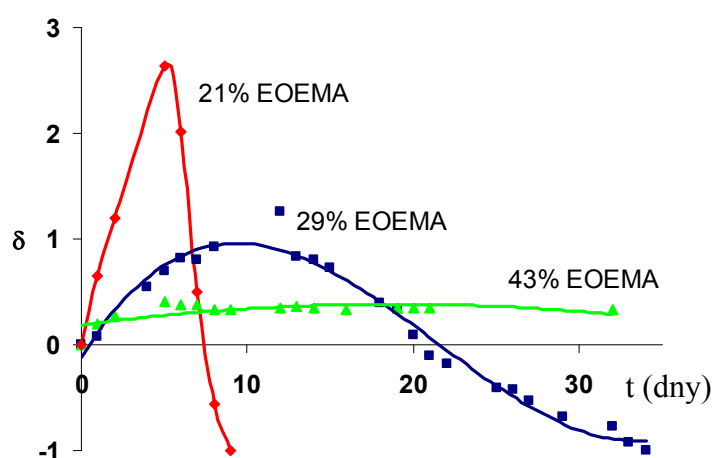
4.16 Hydrolyticky biodegradovatelné hydrogely

Dosud popisované hydrogely na bázi HEMA nebyly biodegradovatelné: po implantaci zůstávaly v místě. Přesto, že z hlediska množství cizího materiálu tvořil implantovaný hydrogel méně než 10 procent objemu (například v hydrogelu HEMA-MA s objemovým zlomkem suchého polymeru v rovnovážně ztuhlém homogenním stavu $Z_v = 0.2$ a podílem pórů na celkovém objemu hydrogelu 80 % je po novotvorbě tkáně v hydrogelu pouze 1,6 % objemu implantátu tvořeno polymerem), mohla by být z dlouhodobého hlediska výhodnější implantace materiálů biodegradovatelných. Vzhledem k vysoké biokompatibilitě hydrogelů na bázi HEMA, které byly implantovány do hemisekcí vytvořené akutní míšní léze, jsme se rozhodli pro přípravu biodegradovatelných makroporézních hydrogelů také na bázi methakrylátů nebo jejich kopolymerů. Výhodou tohoto uspořádání je nejen již existující model, umožňující hodnotit vlastnosti hydrogelu, ale i možnost srovnat stávající výsledky implantací nebiodegradovatelného materiálu do míšní léze s výsledky dosaženými s hydrogely biodegradovatelnými.



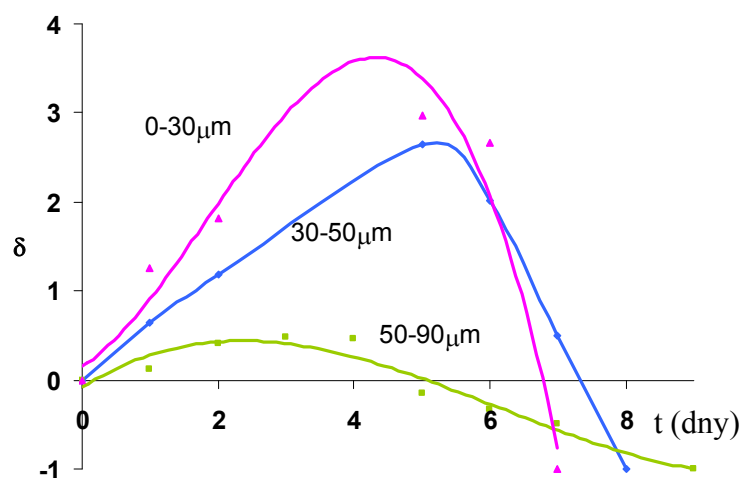
Obr. 4.38. Fotografie zahrnující degradaci kopolymeru EOEMA-HPMA s koncentrací 21 % EOEMA bezprostředně po vložení do pufru s fyziologickým pH a poté první až šestý den. Sedmý den již byl hydrogel kompletně rozštěpen.

Biodegradovatelné hydrogely byly připraveny jako kopolymery methakrylátů (kombinace HEMA, HPMA, MA, MOETACl nebo EOEMA) s hydrolyticky štěpitelným síťovadlem N,O-dimethakryloylhydroxylaminem (DMHA), které je stabilní při kyselém pH a podléhá hydrolytické degradaci při pH fyziologickém. Testovány byly kombinace HEMA-HPMA, HEMA-MOETACl, HEMA-MA, HPMA-EOEMA; s přihlédnutím k výhodným mechanickým parametrům byly pro pokusy s biodegradovatelnými hydrogely vybrány kopolymery EOEMA a HPMA s odlišným poměrem hydrofilní (HPMA) a hydrofobní (EOEMA) složky, kterým je možné nastavit dobu biodegradace v řádu jednotek až desítek dnů. Makroskopický postup biodegradace hydrogelu na bázi kopolymery EOEMA-HPMA je znázorněn na obrázku 4.38.



Obr. 4.39. Kinetika degradace kopolymerů EOEMA-HPMA při pH 7,4 v prostředí *in vitro*.

Hydrogel připravený v přítomnosti částic NaCl 30 – 50 μm .



Obr. 4.40. Závislost degradace kopolymerů EOEMA-HPMA s podílem EOEMA 21% na velikosti použitých částic NaCl při jejich přípravě.

Připraveny byly hydrogely s poměrem EOEMA-HPMA mezi 10 a 43 hmotnostními procenty EOEMA (při jeho vyšším obsahu jsou hydrogely již nedegradovatelné a při nižším jsou degradovatelné příliš rychle). Závislost procesu hydrolytické degradace charakterizované gravimetricky relativní změnou hmotnosti hydrogelu δ ($\delta = (m_H - m_0)/m_0$, kde m_H je hmotnost hydrogelu v čase t a m_0 hmotnost hydrogelu v čase $t = 0$) při fyziologickém pH (7.4) na poměru EOEMA-HPMA je ukázána na obr. 4.39 a na velikosti částic NaCl použitých při přípravě hydrogelu na obr. 4.40. Degradovatelné jsou pouze takové hydrogely, které dosáhnou hodnoty $\delta = -1$, hydrogel s obsahem 43 hmotnostních procent EOEMA je tedy již nedegradovatelný.

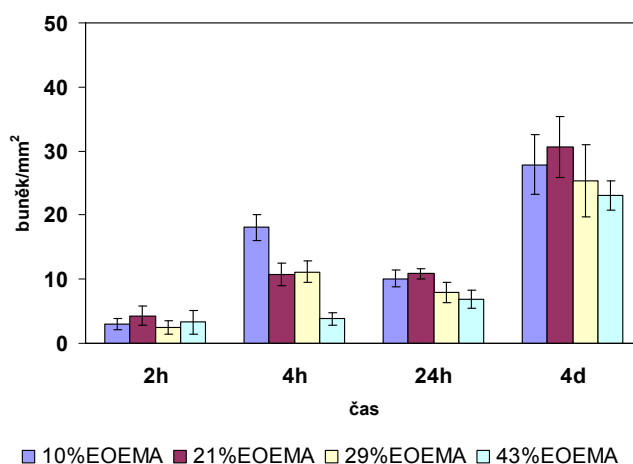
Při hydrolytické degradaci hydrogelů dochází v důsledku praskání příčných vazeb ke dvěma dějům zároveň: k jejich rostoucímu bobtnání, které nejprve převládá a je doprovázeno nárůstem hmotnosti vzorku (vzestupná fáze křivek), a k jejich rozpadu, který je od určitého času rychlejší než bobtnací proces (pokles hmotnosti - sestupná fáze křivek). Ze závislosti kinetiky degradace kopolymerů EOEMA-HPMA (obr. 4.40) na velikosti pórů vyplývá, že u makroporézních hydrogelů s menšími póry dochází k výraznějšímu zbobtnání hydrogelu v průběhu degradace než u hydrogelů s póry většími, což může být na překážku vrůstání buněčných elementů nervové tkáně do hydrogelu.

Výsledky byly publikovány v rámci práce:
Přádný M, Michálek J, Lesný P, Hejčl A, Vacík J, Šlouf M, et al. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 5: Hydrolytically degradable materials. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2006 Dec;17(12):1357-64. IF (2013) = 2.379, citováno (2015) 22×

4.17 Růst MSC na nebiodegradovatelných kopolymerech HPMA-EOEMA

Pro hodnocení růstu MSC na hydrolyticky štěpitelných hydrogelech jsme připravili nedegradovatelné modifikace kopolymerů HPMA-EOEMA, u kterých byl jako síťovadlo použit 1,2-ethylendimethakrylát místo DMHA. Růst MSC na hydrogelech jsme hodnotili na discích z hydrogelu o průměru 1 cm umístěných na dnech 24-jamkových destiček pro tkáňové kultury (Obr. 4.41).

Všechny připravené kopolymery EOEMA-HPMA byly biokompatibilní a na jejich povrchu docházelo k růstu a zvyšování počtu potkaních mezenchymových buněk. Nenalezli jsme žádnou statisticky významnou závislost mezi poměrem EOEMA-HPMA a růstem buněk na povrchu hydrogelu.



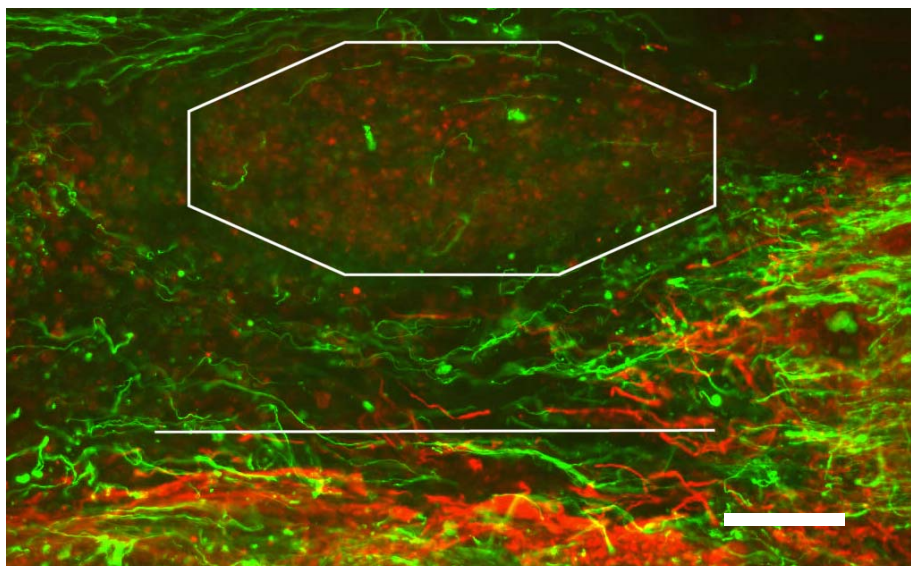
Obr. 4.41. Růst potkaních mezenchymových buněk na povrchu kopolymerů EOEMA-HPMA.

4.18 Implantace biodegradovatelných hydrogelů do míchy

Připravené degradovatelné kopolymery EOEMA-HPMA s odlišným poměrem EOEMA:HPMA v rozmezí 21 až 43 hmotnostních procent byly implantovány do hemisekcí vytvořené dutiny v hrudní míše laboratorního potkana. Pro implantaci byla zvolena stejná strana (pravá) a stejná výška (Th6-9) u všech zvířat; implantován byl bloček hydrogelu o velikosti cca $2 \times 2 \times 2$ mm. V každé implantované skupině bylo operováno 7 experimentálních zvířat. Vyhodnocení jsme provedli histologicky a imunohistochemicky jeden měsíc od implantace.

Implantované kopolymery s 10 % EOEMA, jejichž doba degradace *in vitro* byla kratší než týden byly 1 měsíc od implantace zcela resorbovány a jejich místo zaujímala řídká síť kapilár, kolem kterých bylo jen malé množství vaziva (Obr. 4.43 G,H). GFAP pozitivní výběžky astrocytů ani NF160 pozitivní výběžky nervových buněk jsme nezastihli.

U kopolymerů s delší dobou biodegradace (21 a 29 % EOEMA) jsme pozorovali po jednom měsíci rozdělení na okrajovou zónu hydrogelu, ve které jsme pozorovali řídké, bohatě prokrvené vazivo, a centrální zónu vyplněnou kondenzovaným hydrogelem obsahujícím množství malých buněk, pravděpodobně zánětlivých elementů. Neurofilamenta a výběžky astrocytů byly zastoupeny pouze v okrajové zóně hydrogelu (Obr. 4.43 C-F, 4.42).



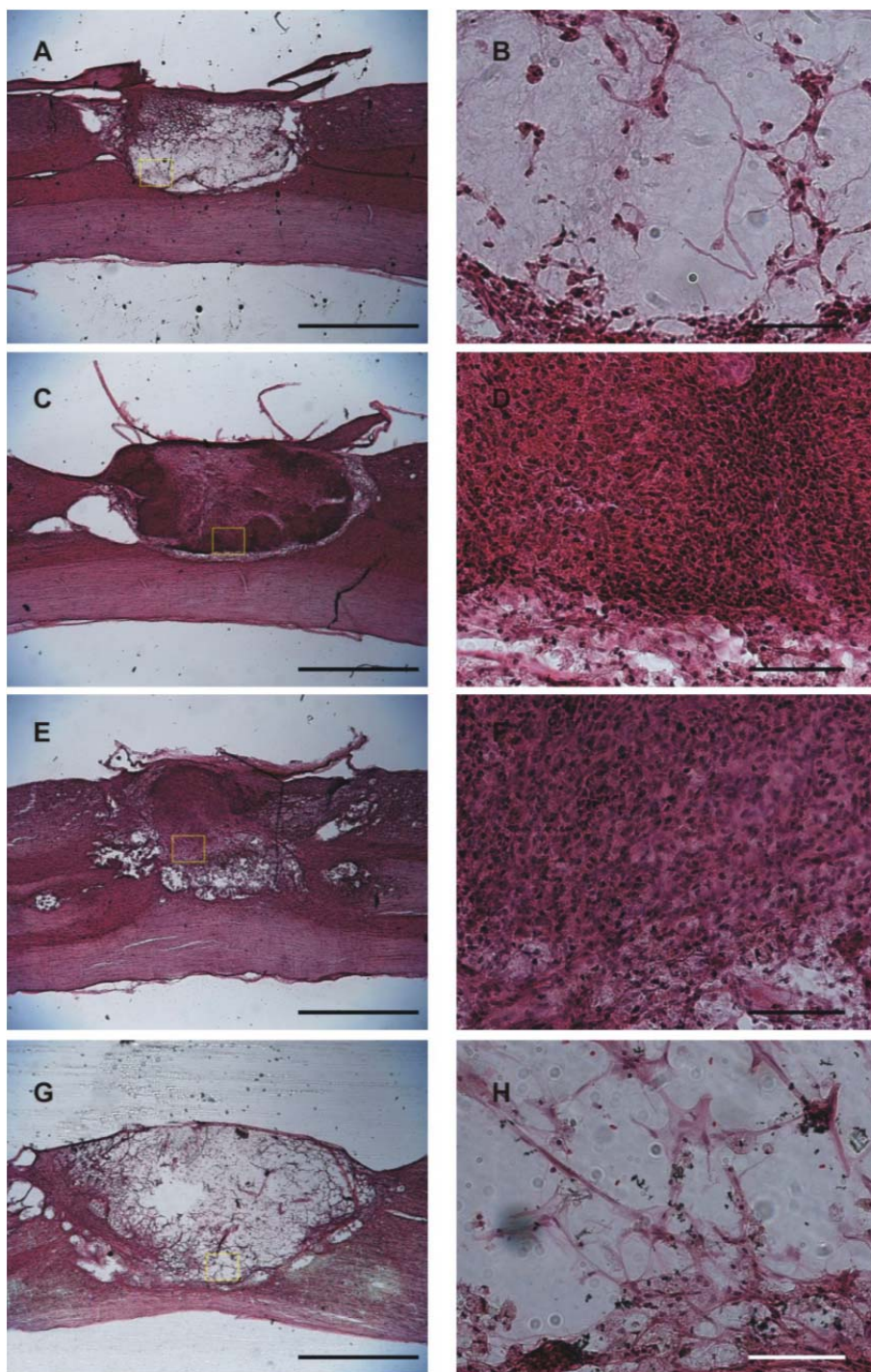
Obr. 4.42. Kopolymer s 21 % EOEMA ve dvojím barvení: zeleně jsou barveny NF160 pozitivní nervové buňky, červeně GFAP pozitivní astrocyty. Čára označuje mediální hranici implantovaného hydrogelu, osmiúhelníkem je obkresleno kondenzované jádro hydrogelu obsahující jen malé množství buněk. Měřítko = 200 μ m.

Kopolymer s 43 % EOEMA neprodělávaly během doby implantace výraznou biodegradaci a jejich histologie ve všem odpovídala kopolymerům HEMA-MA (kopolymer se záporným nábojem).

Vznik „kondenzovaného jádra“ ve středu biodegradovatelného hydrogelu je velmi pravděpodobně ovlivněn průběhem biodegradace, při které se hydrogel rozpadá na lineární (větvený) vodorozpustný polymer, který je následně odstraňován z místa implantace fagocytózou a rozpouštěním v krvi.

Výsledky byly publikovány v rámci práce:
--

Přádný M, Michálek J, Lesný P, Hejčl A, Vacík J, Šlouf M, et al. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 5: Hydrolytically degradable materials. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2006 Dec;17(12):1357-64. IF (2013) = 2.379, citováno (2015) 22×



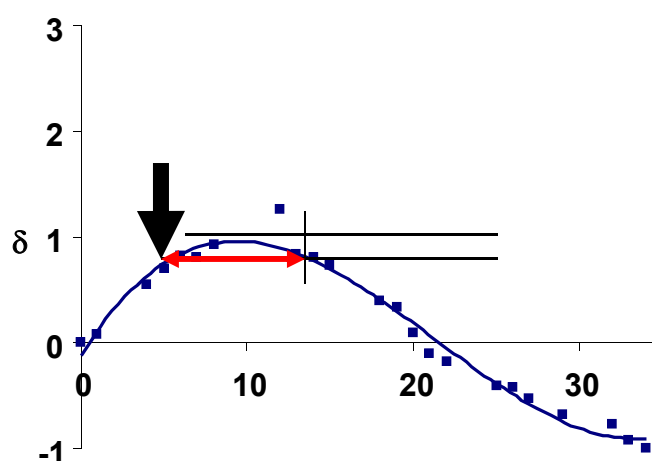
Obr. 4.43. Vrstání mišní tkáně do kopolymerů EOEMA-HPMA, barveno hematoxylinem-eosinem. A,B. Kopolymer s 43 % EOEMA, ve kterých dochází jen k málo významnému vrůstání tkáně. C,D. Kopolymer s 29 % EOEMA. E,F. Kopolymer s 21 % EOEMA, kde jasně pozorujeme okrajovou zónu řídkého vaziva a centrální zónu kondenzovaného hydrogelu. G,H. Kopolymer s 10% EOEMA jsou zcela degradovány, na jejich místě je řídká síť kapilár. Měřítka: 1mm (A,C,E,G) a 50µm (B,D,F,H).

4.19 Implantace biodegradovatelných hydrogelů ve fázi maximální hydratace

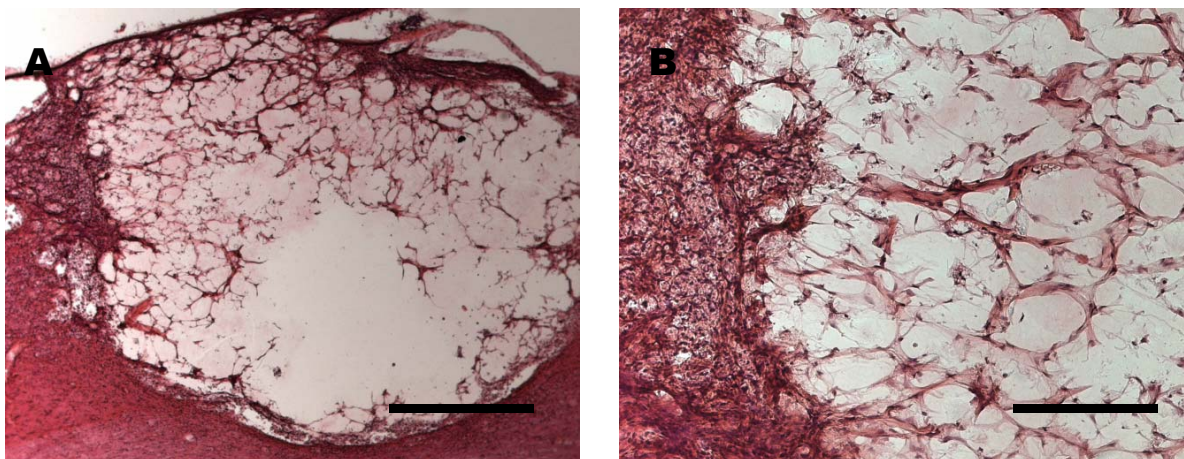
Z průběhu degradace hydrolyticky štěpitelných hydrogelů (Obr. 4.34) vyplývá, že na jejím začátku dochází k nárůstu objemu hydrogelu v důsledku praskání příčných vazeb, snižování síťové hustoty a tím i vyšší botnavosti stále zesíťovaného hydrogelu. V okamžiku, kdy je síťová hustota již příliš nízká, oddělují se rozpustné makromolekuly od sítě do extracelulární tekutiny a hmotnost degradujícího hydrogelu klesá. Počáteční vzrůst objemu (botnání) může vyvolat zvýšený tlak na tkáň v místě implantace, snížit průtok krve v místě léze a zpomalovat odstraňování rozpadových produktů hydrogelu. Proto jsme implantovali hydrogely s 29 % EOEMA (s nejdelší dobou biodegradace) těsně pod maximem na kinetické křivce (svislá šipka na obr. 4.39), kdy docházelo už jen k menšímu než 10% nárůstu objemu hydrogelu (Obr. 4.44).

Připravené hydrogely byly vloženy do roztoku PBS s pH 7,4, ve kterém začalo okamžitě docházet k hydrolytickému štěpení. Po pěti dnech byly z roztoku vyjmuty, opracovány na velikost $2 \times 2 \times 2$ mm a bezprostředně na to implantovány do hemisekce míchy laboratorního potkana.

Po 30 dnech od implantace byl hydrogel zcela biodegradován bez známek hromadění materiálu ve středu a vzniku „kondenzovaného jádra“. Hydrogel byl vyplněn řídkým bohatě prokrveným vazivem (Obr. 4.45) s hustou sítí neorientovaných výběžků nervových buněk uvnitř léze (Obr. 4.46). Uspořádání řídkého vaziva zhruba sledovalo rozměry a tvar pórů v hydrogelech.

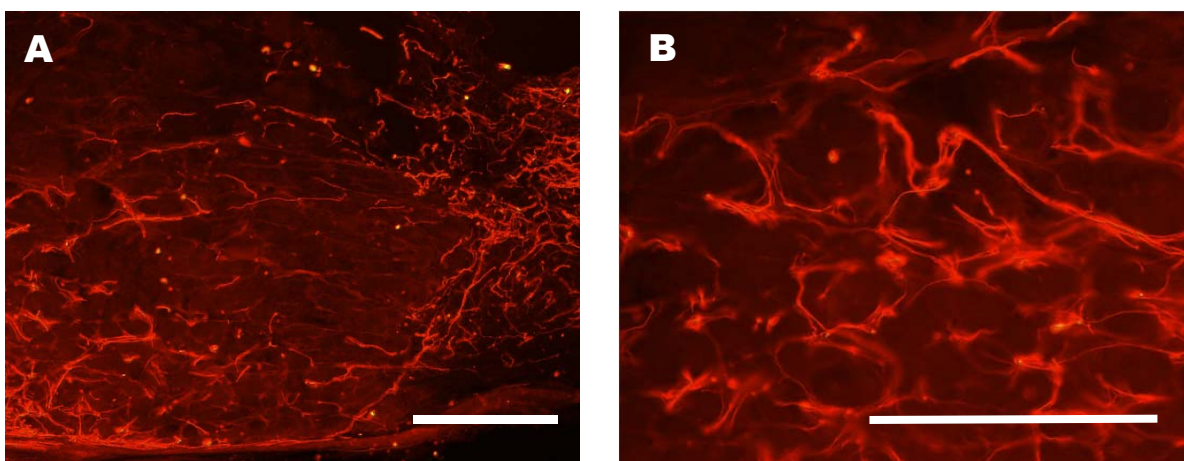


Obr. 4.44. Kinetika biodegradace hydrogelu s 29 % EOEMA a vyznačení okamžiku implantace (černá šipka) a doby, po kterou se objem hydrogelu implantovaného v míše mění o méně než 10% (červená šipka odpovídající době cca 7 dní po implantaci).



Obr. 4.45. Vrstání míšní tkáně do biodegradovatelného hydrogelu 29% EOEMA po 30 dnech od implantace do hemisekce míchy laboratorního potkana. A. Přehledný snímek hemisekce, na kterém je vidět uspořádání vaziva, sledujícího morfologii (již degradovaného) hydrogelu. Měřítka = 500 μ m. B. Detail ukazuje vrstání řídkého vaziva z rostrálního okraje hemisekce do léze. Měřítka = 50 μ m.

Z námi připravených biomateriálů docházelo v makroporézních biodegradovatelných hydrogelech implantovaných ve fázi maximální hydratace k nejvýraznějšímu vrstání neurofilament.



Obr. 4.46. Vrstání NF160 pozitivních neurofilament do biodegradovatelného hydrogelu 29% EOEMA po 30 dnech od implantace do hemisekce míchy laboratorního potkana. A. Vysoké množství výběžků nervových buněk v hydrogelu. Měřítka = 500 μ m. B. Vrstání neurofilament z rostrálního okraje hemisekce do léze. Měřítka = 50 μ m.

4.20 Akutní a subakutní implantace hydrogelu do chronické míšní léze

Pro sledování rozvoje míšní léze jsme zvolili model transektce míchy laboratorního potkana. U experimentálních zvířat bez implantace hydrogelu dochází během 3 měsíců po poranění k postupnému rozvoji gliové jizvy (Obr. 4.42 A) a četných pseudocyst (Obr. 4.42 B) postupně splývajících do jedné pseudocysty, která dominuje histologickému nálezu (Obr. 4.42 C).

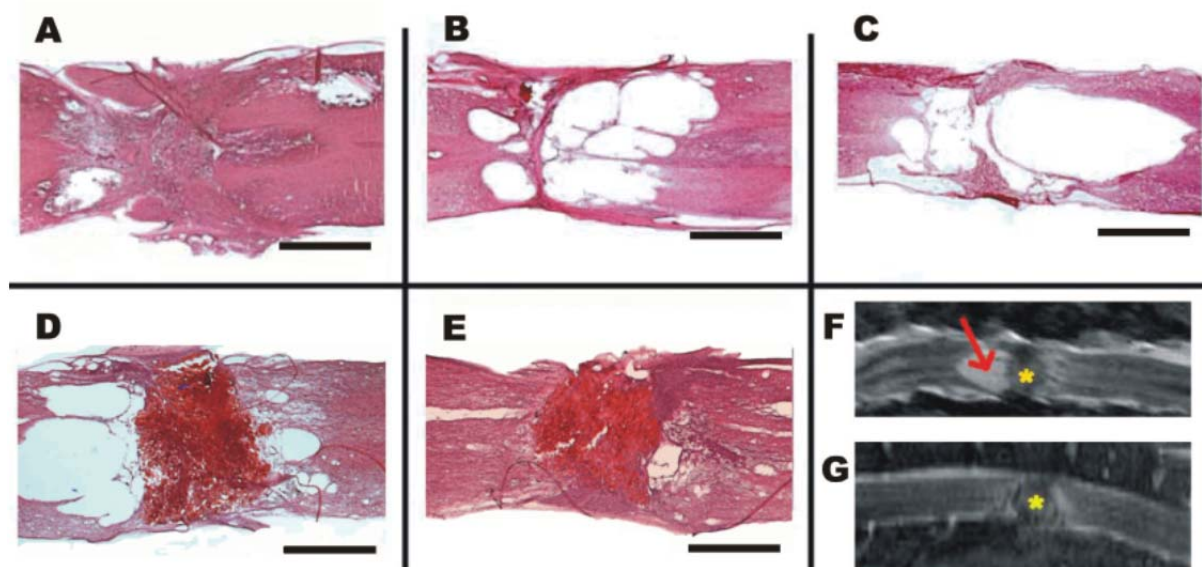
Skupina experimentálních zvířat	Celková plocha kavity
Kontrolní skupina – bez terapie	$25,7 \pm 4,6 \text{ mm}^2$
Akutní léze – implantace hydrogelu bezprostředně po transektci	$5,3 \pm 1,5 \text{ mm}^2$
Subakutní léze – implantace po 7 dnech od transektce	$1,5 \pm 1,1 \text{ mm}^2$

Tab. 4.7. Velikost pseudocyst (celková plocha na hodnocených řezech) v jednotlivých experimentálních skupinách.

Porovnávali jsme nálezy po akutní implantaci hydrogelu s kladným elektrickým nábojem (HEMA-MOETACI) s implantací subakutní (po transektci byla operační rána zavřena a 7. den následovala reoperace s odstraněním granulační tkáně a vložením hydrogelu). Výsledky byly vyhodnoceny 3 měsíce po implantaci, kdy byl blok tkáně obsahující obratle a míchu po perfúzi vyjmut, zobrazen magnetickou rezonancí a poté zpracován histologicky a imunohistochemicky. V obou skupinách (akutní i subakutní) jsme pozorovali dobrou integraci hydrogelu do okolní míšní tkáně a přítomnost pseudocyst na jeho okrajích (Obr. 4.47 D-G); velikost pseudocyst se statisticky významně ($p < 0.05$) lišila v jednotlivých skupinách (Tab. 4.7).

Tři měsíce po míšní lézi byly póry hydrogelu vyplněny vazivovými elementy – fibroblasty, kolagenem a krevními cévami (Obr. 4.48 A-D). S výjimkou nečetných míst na okraji implantátu, kde jsme pozorovali granulomatózní reakci na cizí těleso, nebyla přítomna zánětlivá reakce. Neurofilamenta rostla směrem k implantátu z proximální i distální strany, v řadě případů vstupovala z obou stran do implantátu (Obr. 4. 48 E, F); pozorovali jsme je i v centrální části hydrogelu (Obr. 4. 48 G). V implantátu jsme nacházeli i Schwannovy buňky, které do hydrogelu vrůstaly v pruzích z míšních kořenů; výběžky Schwannových buněk probíhaly v řadě případů paralelně s neurofilamenty (Obr. 4. 48 H). Podobně jako u ostatních experimentů vrůstaly astrocyty do implantátů jen zřídka (Obr. 4. 48 I). Při imunohisto-

chemickém hodnocení jsme nenalezli významné rozdíly mezi skupinou zvířat s akutní a subakutní implantací hydrogelu.

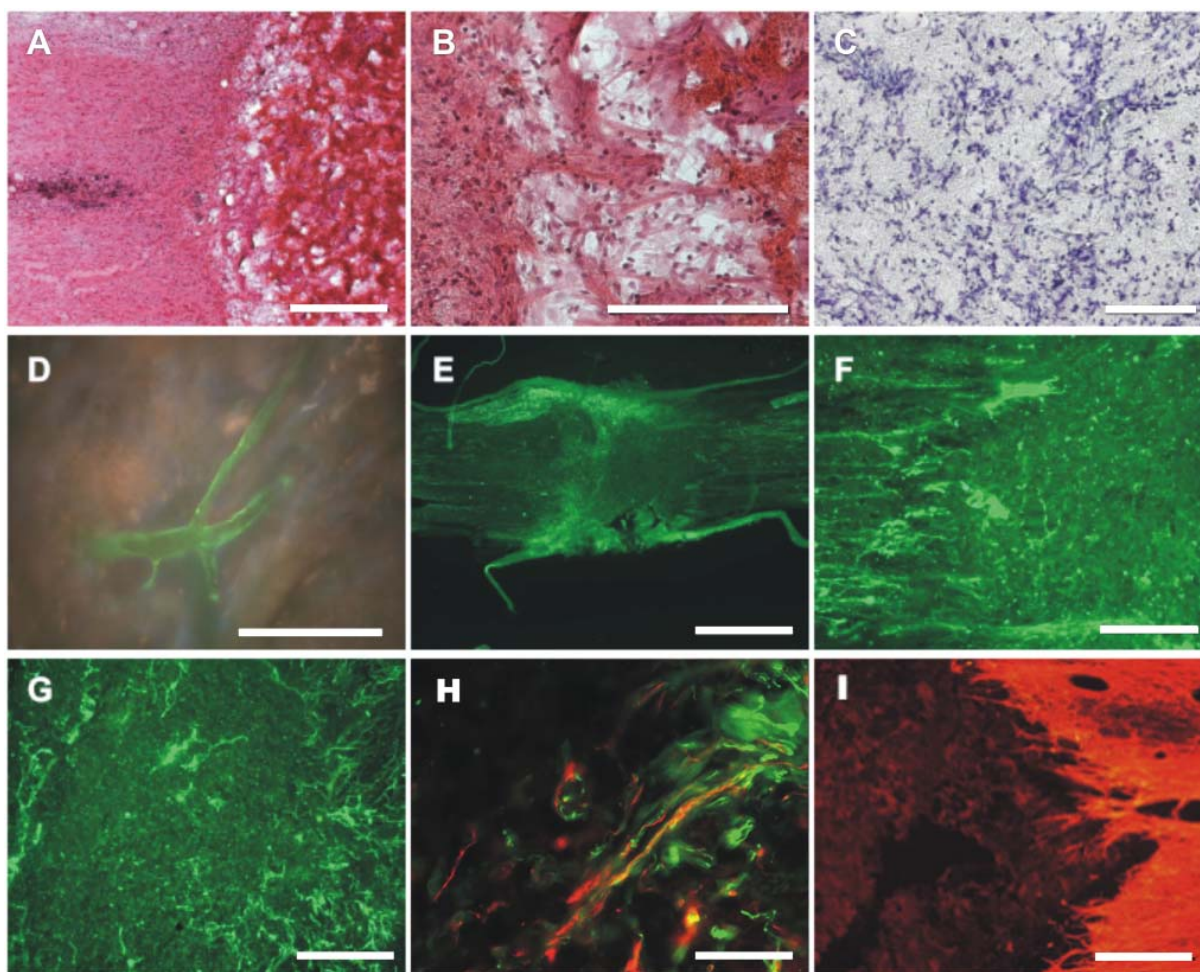


Obr. 4.47. Rozvoj míšní léze po kompletní transekcii u kontrolní skupiny a po implantaci hydrogelů . A. Dva týdny po transekcii u kontrolní skupiny dominuje vazivová a gliální jizva. B. Jeden měsíc po transekcii u kontrolní skupiny vznikají v místě léze četné posttraumatické pseudocysty. C. Tři měsíce po transekcii u kontrolní skupiny dominuje lézi jedna rozsáhlá pseudocysta, integrita míchy je vážně porušena. D. Mícha po transekcii a akutní implantaci hydrogelu HEMA-MOETACl tři měsíce po lézi, implantovaný hydrogel je obklopen malými pseudocystami. E. Mícha po transekcii a subakutní implantaci hydrogelu HEMA-MOETACl tři měsíce po lézi: integrita míchy je zachována, rozvoj pseudocyst je významně menší než v předchozích případech. F. MR zobrazení míchy u akutní implantace hydrogelu (hvězdička), šipka označuje pseudocystu na okraji hydrogelu. G. MR zobrazení míchy po subakutní implantaci hydrogelu (hvězdička), kde nedochází k rozvoji pseudocyst.

Měřítko = 500 μ m.

Výsledek byl publikován v rámci práce:

Hejčl A, Urdzíkova L, Šedý J, Lesný P, Přádný M, Michálek J, et al. Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. J Neurosurg Spine. 2008 Jan;8(1):67-73.
IF (2013) = 2.355, citováno (2015) 29×



Obr. 4.48. Rekonstrukce míšní léze s využitím akutní a subakutní implantace hydrogelu HEMA-MOETACI. A. Přechod kraniálního pahýlu míchy do hydrogelu, barvení hematoxylinem-eosinem. Měřítko = 100 μ m. B. Detail mýstků z řídkého vaziva spojujících míšní tkáň a hydrogel, barvení hematoxylinem-eosinem. Měřítko = 100 μ m. C. Porézní struktura hydrogelu infiltrovaná buňkami, barvení kresylovou modří. Měřítko = 100 μ m. D. Cévy vrůstající do hydrogelu, barvení proti RECA-1. Měřítko = 50 μ m. E. Neurofilamenta (NF160 pozitivní, zelená) vrůstající do hydrogelu z míchy, přehledný obrázek. Měřítko = 500 μ m. F. Neurofilamenta přecházející do hydrogelu, detail. Měřítko = 100 μ m. G. Střed hydrogelu s přítomností neurofilament. Měřítko = 100 μ m. H. Schwannovy buňky (p75 pozitivní, zelené) z míšních kořenů vrůstají do hydrogelu a doprovází nervová vlákna (NF160 pozitivní, červená). Měřítko = 100 μ m. I. Astrocyty (GFAP pozitivní, červené) nepřekračují hranici mezi míšní tkání a implantátem. Měřítko = 100 μ m.

5 Diskuse

5.1 Příprava a charakterizace hydrogelů

V našich pokusech jsme navázali na studie zabývající se regenerací míšní tkáně v makroporézních hydrogelech (Woerly et al., 1999; Woerly et al., 1998); práce Dr. Woerlyho se soustředily zejména na hydrogely na bázi HPMA připravené srážecí polymerací (Woerly et al., 1996). Při volbě základního biomateriálu pro naši výzkumnou práci jsme zvolili biomateriály na bázi methakrylátů, zejména kopolymery HEMA. Biomateriály na bázi kopolymerů HEMA jsou v současnosti využívány v řadě aplikací, od kontaktních čoček až po chirurgické implantáty; jejich biokompatibilita byla opakovaně prakticky prověřena v řadě medicínských aplikací (Wheeler et al., 1996). Hydrogely na bázi methakrylátů byly experimentálně využity pro enkapsulaci buněk v CNS (Mokrý et al., 2000), rekonstrukci periferního nervového systému (Belkas et al., 2005) i implantaci do míšního poranění (Giannetti et al., 2001). HEMA představuje dlouhodobě testovaný materiál, s jehož fyzikálně-chemickými vlastnostmi i použitím v lékařství je v Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. již více než 50 let zkušeností (Wichterle et al., 1961). Pro dosažení makroporozity byla zvolena metoda polymerizace v přítomnosti frakcionovaných částic chloridu sodného; tato metoda, vytváří pravidelné a matematicky jednoduše modelovatelné struktury (Přádný et al., 2009).

Jinou metodou přípravy makroporézních polymerních nosičů je využití mikrovláken uspořádaných rovnoběžně (Chauhan et al., 1999) nebo v křížově síťované struktuře (Vacanti et al., 1994), případně bloků polymeru, ve kterých byly odmytím mikrovláken vytvořeny kanálky (Flynn et al., 2003). Ačkoliv implantáty připravené na bázi mikrovláken poskytují vysoký povrch pro růst buněk a – v případě rovnoběžně jdoucích vláken – podporují orientovaný růst výběžků nervových buněk, nejsou již dnes při konstrukci tkáňových náhrad používány.

Novým přístupem je využití polymerních nosičů na bázi nanovláken. Nanovlákná jsou vlákna o průměru v řádech jednotek až stovek nanometrů; interakce buněk s nanovláknem je obdobná jako interakce buněk s vláknitými molekulami ECM (Jayaraman et al., 2004). V prostředí *in vitro* vytváří řada typů buněk na nanovláknenných nosičích samoorganizující se struktury (Schindler et al., 2005), schopnost růst na nanovlákněch jsme v našich experimentech potvrdili u astrocytů a MSC. Pro vysokou míru adheze buněk k nanovláknům jsou v současnosti přijímána dvě vysvětlení: prvním možným vysvětlením je strukturální

podobnost nanovláken a molekul ECM, která vede k aktivaci specifických povrchových receptorů (Liu et al., 2009; Schindler et al., 2005). Druhá teorie uvažuje možnost vzniků kladných nábojů podporujících adhezi buněk na nanovláčkách, a to při průchodu elektrodou emitoru v rámci elektrostatického procesu zvlákňování (Zhang et al., 2009).

Pro analýzu difúzních vlastností extracelulárního prostoru CNS je již dlouhou dobu úspěšně používána metoda difúzní analýzy s využitím iontů tetramethylamonia (Nicholson a Syková, 1998). Difúzní měření je schopno nejen odhalit objem ECP nervové tkáně, ale i jeho strukturní složitost a případnou anizotropii, která svědčí například pro převládající směr vláken bílé hmoty. Pomocí této metody bylo například možné odhalit změnu difúzní anizotropie při myelinizaci vláken ve vyvíjejícím se *corpus callosum* laboratorního potkana (Voříšek a Syková, 1997a)

Při měření difúzních vlastností iontů tetramethylamonia v hydrogelech na bázi HPMa připravených srážecí polymerizací byly naměřeny hodnoty tortuozity jen nepatrně zvýšené nad hodnoty při volné difúzi; měření objemového podílu tekutiny přístupné difúzi v hydrogelech ukázalo, že v připravených hydrogelech je zhruba 80 % vnitřního prostoru ($\alpha = 0.80$) přístupných pro difundující molekuly (Woerly et al., 1998); hodnota absorpce TMA^+ v hydrogelu (k') byla velmi nízká a je proto pravděpodobné, že měření nebylo zkresleno průnikem iontů TMA^+ do hydrogelu.

Obdobné výsledky jsme naměřili v hydrogelech na bázi HEMA, které byly připraveny polymerací v přítomnosti frakcionovaných částic chloridu sodného. Hodnoty difúzních parametrů byly nezávislé na velikosti pórů nebo podílu kyseliny methakrylové v hydrogelu. Tortuozita byla nepatrně zvýšena nad hodnotu volné difúze, v průměru však byla nižší ($\lambda = 1.04$) než tortuozita naměřená v hydrogelech na bázi HPMa ($\lambda = 1.13$). Průměrné hodnoty objemového podílu ECP (přístupného pro ionty TMA^+) v hydrogelech na bázi HEMA ($\alpha = 0.86$) byly nevýznamně vyšší, než hodnoty naměřené v HPMa hydrogelech ($\alpha = 0.80$). Tyto údaje jsou odlišné od vypočtených hodnot objemu komunikujících pórů V_V , které se pohybovaly mezi 20 a 50 % objemu hydrogelu a které byly potvrzeny obrazovou analýzou dat pořízených z konfokálního mikroskopu. Na vyšším odhadu objemu tekutiny v pórech pomocí difúzního měření se pravděpodobně podílely jednak nekomunikující póry hydrogelu, jednak schopnost malých molekul difundovat částečně i přes přepážky mezi póry a hmotu hydrogelu. Zatímco objem komunikujících pórů (V_V) vypovídá o morfologii hydrogelu, objemová frakce ECP (α) odráží vnitřní prostor, ve kterém probíhá difúze ve vodě rozpustných molekul.

Běžně používanou metodou pro sledování morfologie polymerů je skenovací elektronová mikroskopie (Chen a Park, 2000). Při sledování morfologie hydrogelů jsme vyvinuli metodu jejich sledování v konfokálním mikroskopu. Nevýhodami konfokálního mikroskopu jsou menší rozlišení a možnost pozorovat pouze fluorescenčně barvené preparáty; ty jsou však vyváženy možnostmi pozorovat hydrogel ve vodném prostředí.

Významnou otázkou, kterou řeší jednotlivé skupiny zabývající se experimentální terapií míšní léze využívající implantáty na bázi biomateriálů je, zda je výhodnější použít biodegradovatelné nebo nebiodegradovatelné biomateriály (Friedman et al., 2002). Mezi výhodami biodegradovatelných materiálů jsou uváděny zejména jejich úplná resorpce v čase a možnost využít je k současnému řízenému uvolňování terapeuticky působících látek. Na druhé straně, při použití materiálů nebiodegradovatelných nejsou uvolňovány rozpadové produkty, které mohou nepříznivě ovlivnit regeneraci (Bakshi et al., 2004). Mechanické vlastnosti biodegradovatelných polymerů se navíc mohou měnit v čase (Deng a Uhrich, 2002), což může nepříznivě ovlivnit stabilitu regenerující tkáně.

Ačkoliv biokompatibilita hydrogelů na bázi HEMA byla opakovaně ověřena (Mokry et al., 2000; Smetana et al., 1987), hodnotili jsme před implantací hydrogelů růst buněk jednak s cílem zjistit případnou toxicitu (vzniklou například nedostatečným vymytím monomerů), jednak s cílem vyhodnotit adhezi buněk k implantátu v prostředí *in vitro*. MSC buňky jsou opakovaně používány k testům biokompatibility (Heckmann et al., 2007; Zhao et al., 2004) a současně je jejich implantace do místa léze zvažována jako terapeutická alternativa pro léčbu míšní léze (Čížková et al., 2006; Deng et al., 2006; Kim et al., 2006; Mansilla et al., 2005; Syková a Jendelová, 2006; Urdziková et al., 2006).

Důležitou charakteristikou použitých hydrogelů je vztah buněk k povrchům hydrogelu, zejména míra adheze buněk na povrchy hydrogelu (včetně povrchu pórů). Pokus ukázal, že MSC výrazně lépe adherují ke kladně nabitým hydrogelům. Námi pozorovaná výrazná adheze MSC ke kladně nabitým povrchům je v souladu s pozorováními jiných autorů (Qiu et al., 1998; Schneider et al., 2004). Buňky adherují přednostně na kladně nabitě povrchy i v bezsérovém médiu (Makohliso et al., 1993) – pravděpodobně na základě interakcí membránových proteinů přímo s nábojem; v pokusu (Wittmer et al., 2007) byla například nalezena vyšší míra adsorpce fibronektinu na kladně nabitě povrchy. Na podobném principu funguje i výroba plastiku pro tkáňové kultury pomocí ozařování polystyrenu plazmatickým paprskem (van Kooten et al., 2004).

Z výsledků dalších provedených studií můžeme usuzovat na to, že neexistuje univerzální vztah mezi typem buněk a povrchovým nábojem, který upřednostňují. Zatímco

Richert našel vyšší adhezi buněk chondrosarkomu na vrstvách obsahujících polykationy (Richert et al., 2004), Kidambi a kol. v experimentech prokázal přednostní růst a šíření hepatocytů na vícevrstvých záporně nabitých vrstvách sulfonovaného polystyrenu (Kidambi et al., 2004). V jiných experimentech se nepodařilo prokázat závislost buněčné adheze fibroblastů na povrchovém náboji (Mendelsohn et al., 2003).

5.2 Implantace hydrogelů do akutního poranění

Pro hodnocení regenerace tkáně CNS v implantátech jsme zvolili techniku jejich implantace do akutní léze mozku nebo míchy; v případě míšní léze jsme dali přednost hemisekci (Kunkel-Bagden et al., 1992) před kompletní transekcí. U kompletní transekce u potkanů dochází při pohybu zvířete k pohybům páteře a k postupnému oddalování proximálního a distálního pahýlu transekce, což vede k rozsáhlejšímu vzniku pseudocyst (Nomura et al., 2006). Rovněž jsme u hemisekce očekávali nižší počet komplikací, zejména infekcí močového traktu (Talac et al., 2004).

Nevýhodou hemisekce je obtížné behaviorální hodnocení, protože již drobné odchylky od střední čáry při operaci mají za následek – podle strany odchylky – zachování částečné hybnosti zadní končetiny na operované straně, nebo naopak postižení zadní končetiny na straně opačné (You et al., 2003). U experimentálních zvířat se může vyskytovat i mírná přirozená variabilita (Hultborn a Malmsten, 1983) způsobující asymetrii reflexů, která zkresluje nálezy po jednostranné míšní lézi.

V našich pokusech jsme využívali hydrogely nesoucí polární (kladně i záporně) nabitě funkční skupiny. Z řady prací je možné odvodit, že biokompatibilita polymerních hydrogelů bez nabitých skupin je nižší než u hydrogelů obsahujících polární skupiny (Smetana et al., 1990; Woerly et al., 1992). Při implantaci hydrogelů bez polárních skupin docházelo k více vyjádřené reakci proti cizímu tělesu (Smetana et al., 1990) i k výraznější enkapsulaci implantovaného hydrogelu aktivovanými astrocyty (Plant et al., 1997).

Klíčovou otázkou pro reparaci míšní léze je vztah mezi tkáňovou infiltrací implantovaných hydrogelů, zejména angiogenezí, a axonální regenerací v nich. Vazivové buňky infiltrují implantát, ve kterém se snižuje tenze kyslíku a jsou uvolňovány angiogenní faktory (Patel a Mikos, 2004). Četné vrůstání RECA-pozitivních cév do implantovaných hydrogelů jsme pozorovali v souladu s ostatními autory.

Vrůstání tkáně do hydrogelů je možné pozorovat histologickými metodami, nebo pomocí změny objemu extracelulárního prostoru, jak jsme ukázali dříve (Woerly et al., 1999; Woerly et al., 1998). Objem extracelulárního prostoru v hydrogelu při vrůstání tkáně po

implantaci klesá a tortuozita stoupá; oba dva parametry získávají hodnoty, které jsou typické pro vyvíjející se nervovou tkáň a podporují tvorbu tkáňové matrice, která podporuje a usnadňuje růst axonů (Woerly et al., 1999).

V souladu s publikovanými pracemi, které ukazují preferenční růst neuronů na kladně nabitých površích, například polylysinu (James et al., 2000), polyethyleniminu (Lakard et al., 2005; Liu et al., 2006) nebo kladně elektrostaticky nabitým povrchu (Makohliso et al., 1993) jsme pozorovali zvýšené vrůstání neuronů do kladně nabitých hydrogelů.

Implantované hydrogely byly ve všech případech, obdobně jako v ostatních publikovaných pracích (King et al., 2006; Teng et al., 2002; Woerly et al., 2001; Woerly et al., 1992; Woerly et al., 1999; Woerly et al., 1998) obklopeny vrstvou GFAP pozitivních astrocytů. Gliová jizva u spinálních lézí s implantovanými hydrogely byla obdobně jako v práci (Woerly et al., 2004) menší, než u kontrolní skupiny bez implantace hydrogelu; jednotlivé skupiny hydrogelů se mezi sebou nelišily rozsahem pozorované gliové jizvy.

Podobně jako u implantovaných hydrogelů na bázi HPMA (Woerly et al., 1999; Woerly et al., 1998) jsme našli jen malé množství GFAP pozitivních výběžků astrocytů vrůstajících do implantátu z okolní tkáně. Ačkoliv astrocyty jsou považovány za elementy bránící regeneraci (rozvojem gliové jizvy) a někteří autoři považují inhibici vrůstání astrocytů za prospěšnou (Teng et al., 2002), trojrozměrná síť astrocytů je nezbytná pro normální růst a regeneraci tkáně centrálního nervového systému (Benarroch, 2005). Jen málo prací popisuje rozsáhlé vrůstání astrocytů z místa implantace do implantátu; oproti tomu vlákna astrocytů z implantátu mohou vrůstat do okolní tkáně (Connor a Bernstein, 1987). Nelze vyloučit, že pro správnou funkční organizaci nervových vláken v hydrogelu bude nezbytné osadit hydrogely například kultivovanými astrocyty (Shany et al., 2006), které vytvoří cytoskeletární strukturu vhodnou pro samoorganizaci nervových vláken.

Pro osazení hydrogelů jsou zvažovány i buňky olfaktorické glie (*Olfactory Ensheathing Glial Cells*), které svými výběžky obalují axony čichových receptorů vrůstající do čichového laloku a vytváří tak jediné místo, kde mohou axony zvenku prorůstat do CNS (Garcia-Alias et al., 2004; Li et al., 1998; Marshall et al., 2006; Ramon-Cueto et al., 1998). Přítomnost buněk olfaktorické glie v hydrogelu může pak vést k usnadnění vrůstání vláken z hydrogelu do zdravé míšní tkáně.

5.3 Růst buněk na polymerních nanovlákních

Nanovláknenné struktury jsou v lidském organismu hojně zastoupeny – příkladem může být struktura makromolekul kolagenu a fibrinu. Biologické vlastnosti nanovláken

připravených z biokompatibilních polymerů pomocí procesu zvaného elektrospinning jsou studovány od roku 2004 (Mo et al., 2004), zprvu byla nanovlákná zvažována zejména pro tkáňové inženýrství cév (Xu et al., 2004), postupně se jejich předpokládané použití rozšiřovalo na rekonstrukci jiných tkání. Interakce elementů nervové tkáně s nanovláknem je komplexní, a je závislá jak na chemické struktuře povrchu nanovláken, tak i na jejich morfologii. V experimentu byla například aktivita vnitrobuněčného enzymu (Rho GTPázy) signifikantně zvýšena při kultivaci astrocytů na nanovlákněch z polylaktidu ve srovnání s buňkami kultivovanými na planárním polylaktidovém nosiči (Tiryaki et al., 2012). Řada typů nanovláken na bázi polymerů vykazuje dobrou adhezi neuronů a jejich výběžků (Lee et al., 2009; Schnell et al., 2007).

Výhodou nanovláken je mimo jiné i možnost jejich využití pro řízené uvolňování léčiv; vzhledem k morfologii nanovláken (konstantnímu průměru vláken při odlišné délce) se chemické látky enkapsulované v nanovlákněch uvolňují s kinetikou nultého řádu (Zeng et al., 2003). Uvolňování růstových faktorů z nanovláken bylo v kombinaci s vhodnou topologií nanovlákněné vrstvy použito například pro dosažení transdiferenciace MSC na buňky vykazující neuronální charakteristiky, které bylo dosaženo nedávno (Jiang et al., 2012).

V našich experimentech jsme shodně s jinými autory (Mo et al., 2004; Rochkind et al., 2006; Schindler et al., 2005; Xu et al., 2004) prokázali dobrou adhezi MSC k námi připraveným nanovláknům v prostředí *in vitro*. MSC jsou mnoha autory zvažovány jako vhodné buňky pro somatobuněčnou terapii CNS (Čížková et al., 2006; Deng et al., 2006; Hejčl et al., 2010; Kim et al., 2006; Mansilla et al., 2005; Syková a Jendelová, 2006; Urdziková et al., 2006); nanovlákná mohou být využita k jejich transportu přímo do postižené nervové tkáně, případně do jejího bezprostředního okolí, odkud se buňky mohou uvolňovat.

Naše experimenty využívaly nanovlákněné vrstvy připravené elektrospinningem. Obě formy elektrospinningu (klasický i metoda Nanospider™) vytváří nanovlákněné vrstvy s homogenní a náhodnou distribucí vláken (Jirsák et al., 2004). Z hlediska vývoje nervové tkáně je však náhodné uspořádání vláken ECM nefyziologické a jsou aktivně hledány prostředky k řízení orientace vláken při elektrospinningu (Murugan a Ramakrishna, 2007). Jiní autoři využívají komplexní 3D struktury založené na polymerních nanovlákněch v kombinaci se samoorganizujícími oligopeptidovými strukturami pro dosažení regenerace chronické míšní léze (Gelain et al., 2011).

Samostatnou otázkou zůstává problematika vytvoření vhodné 3D struktury z nanovláken. Proces elektrospinningu, případně jeho modifikace – technologie Nanospider™ je vhodná pro vytváření plochých vrstev s řízenou tloušťkou. Snižování plošné hmotnosti

nanovláknenné vrstvy, které zvětšuje relativní vzdálenosti mezi nanovláknny (a tedy zvyšuje porozitu), má za následek vyšší biokompatibilitu (Soliman et al., 2011). Při „řídnutí“ má však nanovláknenná vrstva tendenci kolabovat vlastní vahou; k řešení tohoto problému jsou využívány různé technologické modifikace procesu elektrospinningu (Jayasinghe a Sullivan, 2006). Námi zvolený přístup (který jsme pro jeho novost úspěšně patentovali) spočíval v sestavení implantátu z více vrstev nanovláken osázených po obou stranách buňkami.

5.4 Implantace hydrogelů v léčbě míšního poranění

Pro naše experimenty jsme zvolili model akutní (hemisekce, transekce a okamžitá implantace biomateriálu) a subakutní (implantace biomateriálu 7 dní po transekcii) terapie míšního poranění. Výhodou těchto modelů je jejich snadná realizovatelnost v laboratorních podmínkách a konzistentní výsledky; u modelů chronického poranění míchy, kdy mezi lézí a implantací uplyne několik měsíců, je vyšší variabilita výsledků, způsobená odlišným pooperačním průběhem u jednotlivých zvířat. Námi zvolený model, ačkoliv je výhodný z hlediska testování nově vyvíjených biomateriálů, nevypovídá o jejich použitelnosti z klinického hlediska. Po úrazu odezní po zhruba 6 měsících míšního šoku a stav pacienta se zlepšuje (Atkinson a Atkinson, 1996). Radikální forma zásahu do míchy – vyjmutí gliové jizvy a implantace biomateriálu – by tedy pravděpodobně nebyla načasována před odezněním míšního šoku. Pro modelování míšní rekonstrukce jsou tedy vhodné spíše chronické modely, např. balónková léze (Vanický et al., 2001). Námi použité modely míšního poranění, u kterých je dobrá reprodukovatelnost, jsou vhodné pro posouzení biokompatibility implantátů, akutní tkáňové reakce CNS na implantát a růstu výběžků nervových a gliálních buněk v implantátu; v tomto jsme zvolili stejný přístup jako jiní autoři vyvíjející polymerní hydrogely pro implantaci do míšní léze (Marchand a Woerly, 1990; Marchand et al., 1993; Plant et al., 1997; Woerly et al., 2001). Navazující experimentální práce, např. (Hejčl et al., 2010; Hejčl et al., 2008), pak hodnotí efekt hydrogelů úspěšně vybraných pro translaci do klinické medicíny.

Uspořádání a funkční propojení axonů v dospělé savčí CNS vzniká během prenatálního vývoje; pokud dojde k jeho poranění v dospělosti, tak regeneruje jen minimálně (Harel a Strittmatter, 2006). V míše se po závažném poranění rozvine gliová jizva, která vytvoří překážku pro regeneraci axonů (Das, 1983). I když jsou následně odstraněny překážky pro úspěšnou regeneraci (například vložení materiálu podporujícího prorůstání výběžků nervových buněk), pak je často diskutovanou otázkou, zda budeme pozorovat funkční regeneraci a které neurony se na ní budou podílet. V roce 1979 byla formulovaná hypotéza,

podle které rostou vlákna vyvíjejících se primitivních neuronových a gliálních prekursorů podle geneticky daného růstového plánu – *blueprint hypothesis* (Singer et al., 1979). Řada signálních molekul, které podle této hypotézy řídí navigaci axonů, přetrvává i po ukončení vývoje (Koeberle a Bahr, 2004); velmi pravděpodobně se však mění jejich distribuce v prostoru, což může mít za příčinu neuspořádaný růst regenerujících axonů v okolí míšní léze. U potkana bylo prokázáno, že ačkoliv axony degenerují, tak těla neuronů kortikospinální dráhy přežívají až 20 týdnů po transekcii míchy (McBride et al., 1989). V tomto směru se přikláníme k hypotéze, že plasticita nervové tkáně je natolik vysoká, že kombinací jednak odstranění překážek regenerace (včetně případného přemostění gliové jizvy) a jednak podpořením plasticity CNS (senzorickou stimulací a neurotrofními faktory, které tvoří klíčové složky růstového plánu) můžeme dosáhnout účinného přemostění implantátu (Harel a Strittmatter, 2006). V této strategii mohou být námi připravené hydrogely součástí komplexního řešení.

Regenerace míchy, využívající přemostění místa léze implantátem umožňujícím prorůstání axonů, je dále komplikována bariérami, které znemožňují vstup výběžků nervových buněk do CNS. Tento problém se v literatuře označuje jako *off-ramp* a má za následek, že do řady dnes využívaných biokompatibilních implantátů axony vrostou, nicméně nejsou schopny implantát opustit na druhé straně (Geller a Fawcett, 2002). Jak detekce, tak i překonání tohoto stavu jsou velmi komplikované. Jediným místem, kde vrůstají vlákna nervových buněk do CNS je jeho fylogeneticky nejstarší část – rhinencefalon (Crews a Hunter, 1994). Na vrůstání axonů čichového nervu do CNS se podílí buňky olfaktorické glie (Ramon-Cueto et al., 1998), které jsou využívány od roku 1998 v experimentální léčbě míšního poranění i v klinických studiích (Huang et al., 2006; Lima et al., 2010). Námi připravené biokompatibilní makroporézní hydrogely mohou sloužit jako nosiče buněk olfaktorické glie (OEG); pro adhezi OEG však bude nutné modifikovat jejich povrch například kolagenem (Schnell et al., 2007).

Při implantaci do subakutního modelu jsme našli další možný mechanismus účinku implantovaného hydrogelu, kterým je nesespecifické zlepšení trofiky okolní míšní tkáně. Implantace hydrogelu má za následek nahrazení pseudocyst v míšní lézi prokrvenou nově vytvořenou tkání. Zatímco pseudocysty v míšní lézi mají tendenci expandovat na úkor zdravé tkáně (Kala, 1996), nově tvořená tkáň v hydrogelu má tendenci kontrahovat a tím zmenšovat tlak na okolní míšní tkáň. Popsaný efekt by se projevil v největší míře při implantaci hydrogelu do posttraumatické pseudocysty (Aoki et al., 2010). Podobně by pak bylo možné námi připravený hydrogel využít jako nosič buněk do blízkosti míšní léze. Příkladem buněk,

kteřé by mohly mít v kombinaci s polymerním hydrogelem pozitivní efekt na regeneraci míšní léze, jsou MSC (Čížková et al., 2006; Deng et al., 2006; Hejčl et al., 2010; Kim et al., 2006; Mansilla et al., 2005; Urdziková et al., 2006), u kterých jsme prokázali kompatibilitu s implantáty.

Naše výsledky naznačují možný klinický význam léčby míšního poranění pomocí implantace vhodného biomateriálu na bázi makroporézního hydrogelu, který nahradí gliovou jizvu případně posttraumatickou pseudocystu vzniklou v místě léze. V popsáných experimentech jsme používali hydrogely na bázi kopolymerů HEMA bez povrchové modifikace; ty jsou však pouze jedním z možných typů biomateriálů, který může být použit. Zajímavým biomateriálem z hlediska míšní regenerace jsou i hydrogely na bázi HEMA připravené srážecí polymerací, jejichž povrch byl modifikován sekvencí RGD pro zvýšení míry adheze buněk (Hejčl et al., 2010; Woerly et al., 1999). Je však třeba řady doplňujících experimentů, zejména v modelu léčby míšní léze v chronickém stádiu, dříve než budou moci našich poznatků využít pacienti s míšním poraněním.

5.5 Limity práce

Ačkoliv výsledky popisované v této práci jsou velmi slibným krokem při poznávání mechanismů míšní regenerace a experimentální terapii míšní léze, nepovažujeme za pravděpodobné, že se samotné makroporézní hydrogely (nezávisle na jejich morfologii) významně uplatní v terapii míšního poranění.

Za mnohem pravděpodobnější scénář považujeme využití námi připravených biomateriálů jako nosičů pro buňky při buněčné terapii onemocnění CNS, nebo jejich využití v kombinaci s vhodnými růstovými faktory. Při implantaci makroporézních hydrogelů do tkáně CNS je zapotřebí podpořit vrůstání nervových elementů, inhibovat (nikoliv zcela zabránit) vrůstání vaziva a cév a podpořit vznik normální cytoarchitektonické struktury v implantátu. Jednou z možných cest se pak stává „*cell-polymer construct*“, tedy komplexní implantát připravený metodami tkáňového inženýrství a obsahující polymerní kostru, vhodné buňky a růstové faktory ovlivňující regeneraci tkáně v okolí a v implantátu (Kubínová a Syková, 2012).

6 Závěry

6.1 Hypotézy práce

Z hlediska hypotéz, které byly formulovány v rámci výzkumu, je možné učinit následující závěry:

1. Je tkáň CNS (mozku, míchy) včetně výběžků nervových a gliových buněk, schopna vrůstat do implantovaných makroporézních polymerních hydrogelů na bázi HEMA?

Do námi připravených makroporézních hydrogelů na bázi HEMA vrůstala nervová tkáň – zastihli jsme tam jak pojivo propojující biomateriál s tkání CNS, tak i nově vytvořené cévy. V hydrogelech na bázi HEMA jsme našli GFAP pozitivní výběžky astrocytů i NF160 pozitivní výběžky neuronů, prorůstající tam z tkáně CNS.

2. Rostou v hydrogelech na bázi HEMA in vitro mezenchymové kmenové buňky?

V makroporézních hydrogelech na bázi HEMA jsme našli dělicí se MSC, které přežívaly po dobu nejméně 28 dnů.

3. Závisí míra vrůstání jednotlivých tkáňových elementů in vivo a růst buněk in vitro do polymerních hydrogelů na elektrickém náboji povrchu polymeru?

V prostředí in vitro je adheze buněk k hydrogelům s kladným povrchovým nábojem vyšší než u hydrogelů se záporným povrchovým nábojem, nebo k hydrogelům, u nichž je kladný povrchový náboj odstíněn. V prostředí in vivo se hydrogely s odlišným elektrickým nábojem chovají obdobně s výjimkou GFAP pozitivních výběžků astrocytů, které jsme více našli v hydrogelech se záporným povrchovým nábojem.

4. Zvýší se zvlákněním polymerního hydrogelu do podoby nanovláken pomocí elektrospinningu míra adheze buněk in vitro?

Zvlákněním hydrogelů jsme dostali biomateriál s vysokou mírou in vitro adheze řady typů buněk (MSC, astrocyty).

5. Záviseí efekt implantace biodegradovatelných materiálů do míšní léze na kinetice biodegradace těchto biomateriálů?

Hydrolyticky degradovatelné polymerní hydrogely se při implantaci *in vivo* chovají odlišně v závislosti na rychlosti jejich biodegradace. Pokud tyto hydrogely implantujeme ve fázi maximální hydratace (spočtené dle modelu), je vrůstání tkáně CNS zvýšeno.

6.2 Souhrnný závěr

Výsledkem experimentální práce byla technologie přípravy biokompatibilních makroporézních hydrogelů, které mohou sloužit jako implantáty do CNS, a ověření jejich vlastností v podmínkách *in vitro* i *in vivo*. Biomateriály, které jsme navrhli a připravili, byly biokompatibilní a po implantaci do míchy laboratorního potkana podporovaly vrůstání pojivové tkáně, obsahující cévy a síť výběžků nervových buněk. Připravené hydrogely mohou být využity k experimentálnímu přemostění léze CNS a jako vhodný experimentální model při studiu regeneračních vlastností CNS.

1. Navrhli jsme postup přípravy makroporézních hydrogelů na bázi kopolymerů HEMA s použitím částic NaCl jako porogenu. Zvolený postup přípravy makroporézních hydrogelů umožňuje – při aproximaci kulového tvaru částic NaCl – spočítat u těchto a podobných hydrogelů jejich charakteristiky dle následujících vzorců (ρ_{NaCl} je hustota chloridu sodného – 2.16 g.cm³ a ρ_P je hustota suchého polymeru - 1.2 g.cm³). Pro výpočet potřebujeme znát hodnotu objemové frakce suchého polymeru v rovnovážně zbotnalém hydrogelu (Z_V), celkový objem zbotnalého makroporézního hydrogelu (V_H) a hmotnost suchého hydrogelu (m_H) a hmotnost použitého NaCl. (m_{NaCl}).

(1) – počet pórů v 1 cm ³ vzorku	$n = \frac{m_{\text{NaCl}}}{\rho_{\text{NaCl}} \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d}{2}\right)^3 V_H}$
(2) – celkový objem pórů v 1 cm ³ vzorku	$V_V = 1 - \frac{m_H}{\rho_P \times Z_V \times V_H}$
(3) – objem jednoho póru	$V_{V1} = \frac{V_V}{n}$
(4) – průměr jednoho póru	$d_H = 2 \times \sqrt[3]{\frac{3V_{V1}}{4\pi}}$

$$(5) - \text{celkový povrch pórů v } 1 \text{ cm}^3 \text{ vzorku} \quad S = 4\pi \left(\frac{d_H}{2} \right)^2 n$$

Výpočet byl ověřen korelací spočteného průměru póru d_H a průměru pórů d_K , získaného obrazovou analýzou trojrozměrných obrázků pořízených konfokálním mikroskopem. Difúzní parametry hydrogelů svědčily pro volnou difúzi (hodnota objemové frakce se pohybovala mezi 0.46 a 0.96 a tortuozita se u všech sledovaných vzorků blížila k 1.00). Zobrazení hydrogelů v konfokálním i elektronovém mikroskopu prokázala převážně komunikující póry.

2. Mechanické vlastnosti připravených hydrogelů na bázi HEMA byly srovnatelné s mechanickými vlastnostmi tkáně CNS a jejich biokompatibilita byla ověřena růstem MSC v těchto hydrogelech. Při implantaci do kortexu jsme však pozorovali jen minimální vrůstání tkáně (ačkoliv jsme v implantátech našli GFAP-pozitivní výběžky astrocytů i NF160-pozitivní výběžky nervových buněk ve stejné míře, jako v hydrogelech na bázi HPMA). Tento výsledek jsme potvrdili difúzním měřením: po implantaci se tortuozita v hydrogelech na bázi HPMA zvýšila z 1.05 ± 0.01 na 1.69 ± 0.03 , zatímco v námi připravených hydrogelech zůstala konstantní. Proto jsme se rozhodli modifikovat připravené materiály zavedením kladného elektrického náboje. Pro tuto modifikaci jsme zvolili kopolymer HEMA s kyselinou methakrylovou a kvarterní amoniovou solí MOETACI a připravili jsme následující čtyři kategorie makroporézních hydrogelů, odlišujících se elektrickým nábojem povrchu:

HEMA-MA ⁻	Kopolymer obsahující záporný elektrický náboj.
HEMA-MOETACI ⁺	Kopolymer obsahující kladný elektrický náboj.
HEMA-MA ⁻ -MOETACI ⁺	Kopolymer obsahující kladné i záporné elektrické náboje v poměru 1:1.
HEMA-MA ⁻ + poly(MOETACI ⁺)	Polyelektrolytový komplex kopolymeru obsahujícího záporný elektrický náboj (HEMA-MA) s lineárním poly(MOETACI) obsahujícím kladný náboj.

3. Mechanické vlastnosti všech připravených hydrogelů, lišících se elektrickým nábojem, byly srovnatelné s mechanickými vlastnostmi tkáně CNS a jejich biokompatibilita byla ověřena růstem chondrocytů a MSC v těchto hydrogelech. Difúzní parametry hydrogelů svědčily pro volnou difúzi (hodnota objemové frakce se pohybovala mezi 0.82 a 0.87 a tortuozita mezi 1.03 a 1.14).

Při sledování růstu MSC v hydrogelech s odlišným elektrickým nábojem jsme zjistili, že ve všech sledovaných hydrogelech počet buněk do 7. dne roste, poté se sníží a dále až do 28. dne je konstantní. Nejvíce MSC roste v kladně nabitých hydrogelech (HEMA-MOETACI). Zatímco v hydrogelech HEMA-MA jsou buňky rovnoměrně rozptýlené v objemu hydrogelu, roste v hydrogelech obsahujících kladné náboje (HEMA-MOETACI a HEMA-MA-MOETACI) výrazně více buněk v okrajové vrstvě hydrogelu. Polyelektrolytové komplexy se chovají stejně jako záporně nabitě hydrogely (HEMA-MA); kladné elektrické náboje lineárního poly(MOETACI) jsou pravděpodobně stíněny jejich makromolekulárními iontovými protějšky.

Po implantaci do míchy laboratorního potkana všechny sledované hydrogely vyvolávaly jen minimální sterilní zánětlivou reakci a dobře adherovaly k míšní tkáni; nervová tkáň vrůstala do všech čtyř hydrogelů. Nejvíce podpůrné tkáně (vazivo, cévy) jsme pozorovali v hydrogelech obsahujících kladný náboj (HEMA-MOETACI), ve kterých bylo vrůstání nervové tkáně srovnatelné s hydrogely na bázi HEMA (NeuroGel™). Vrstvení tkáňových elementů bylo méně patrné v hydrogelech obsahujících kladný i záporný náboj (HEMA-MA-MOETACI). V obou zmíněných hydrogelech se nacházely i cévy. V hydrogelech se záporným nábojem (HEMA-MA) a v polyelektrolytových komplexech jsme pozorovali jen minimální vrůstání tkáně.

Výběžky nervových buněk v našich experimentech pronikaly do všech sledovaných hydrogelů; největší míru vrůstání jsme pozorovali u kopolymerů HEMA-MOETACI, nejmenší u polyelektrolytových komplexů. Výběžky astrocytů překračovaly hranice všech implantátů a vrůstaly do nich, jejich vlákna však v žádném z implantátů nedosahovala až do středu; míra vrůstání vláken astrocytů do implantátů byla nepřímo úměrná růstu neurofilament.

Vhodným materiálem pro regeneraci tkáně CNS mohou být i trojrozměrné implantáty připravené s využitím více vrstev nanovláken. Morfologie nanovláken, která napodobuje uspořádání strukturálních komponent extracelulární matrix, vede k vysoké biokompatibilitě těchto materiálů. MSC i buňky přítomné v CNS adherují k nanovláknům významně více, než k homogenním povrchům identických polymerů. Nanovlákna adherují ke tkáni CNS a dochází v nich k růstu výběžků nervových buněk; nevýhodou je nutnost vytvoření trojrozměrného implantátu z jednotlivých vrstev. Naše výzkumy v tomto směru vedly k podání dvou patentů.

4. Pro přípravu biodegradovatelných hydrogelů jsme nahradili základní polymer na bázi HEMA kopolymerem HPMA s EOEMA a hydrolyticky štěpitelným síťovadlem. Štěpitelné síťovadlo umožňuje degradaci hydrogelu. Jeho obsahem a zároveň obsahem EOEMA v hydrogelu lze nastavit dobu degradace hydrogelu v prostředí s fyziologickým pH v rozmezí 3 – 35 dní. Strukturální a mechanické vlastnosti biodegradovatelných hydrogelů i jejich biokompatibilita byly srovnatelné s hydrogely na bázi kopolymerů HEMA.

Po implantaci do hemisekce míchy laboratorního potkana jsme pozorovali, že v okrajové zóně implantátu dochází k regeneraci tkáně a prorůstání nervových vláken; šířka této okrajové zóny závisela na době biodegradace hydrogelu, největší byla u hydrogelů s dobou biodegradace 7 dní. Uprostřed implantátu kondenzoval částečně degradovaný polymer, který nebyl transportován z místa léze. Vzhledem k předpokladu, že tato kondenzace je způsobena botnáním hydrogelu na počátku jeho degradace, jsme implantovali hydrogel, který byl na počátku ponechán po nějakou dobu botnat v prostředí *in vitro*.

Po implantaci takto upraveného hydrogelu jsme pozorovali nejlepší výsledky při regeneraci míšní tkáně u hydrogelů, které byly implantovány po 5 dnech jejich botnání, resp. ve fázi blízké jejich maximální hydratace (těsně před maximem).

5. Regeneraci míšní tkáně v hydrogelech s kladným elektrickým nábojem (kopolymerech HEMA-MOETACI) jsme prokázali i v subakutním modelu léčby míšního poranění (implantace 7 dní po transekcii). Významným prvkem regenerace je zmenšení pseudocysty vytvářené v místě léze.

7 Souhrn

Biokompatibilní hydrogely na bázi kopolymerů 2-hydroxyethylmethakrylátu jsou vhodné k implantaci do poranění centrálního nervového systému. Námi připravené hydrogely byly makroporézní s převážně komunikujícími póry a jejich mechanické vlastnosti byly srovnatelné s mechanickými vlastnostmi míšní tkáně. Po ověření biokompatibility růstem MSC a změření difúzních vlastností jsme připravené hydrogely implantovali do modelu akutní léze míchy laboratorního potkana a studovali proces regenerace míšní tkáně v implantátech. Při implantaci v subakutní fázi jsme pozorovali příznivý vliv implantovaných hydrogelů na regeneraci tkáně míchy v okolí léze a zmenšení tvorby pseudocyst.

Pomocí histologie a imunohistochemie jsme pozorovali vrůstání tkáňových elementů CNS (vazivo, cévy, neurofilamenta, Schwannovy buňky, výběžky astrocytů) do hydrogelů implantovaných do hemisekce míchy laboratorního potkana. Zjistili jsme, že kopolymerací s kvarterní amoniovou solí nesoucí kladný náboj, se zvyšuje míra adheze buněk *in vitro* i vrůstání některých tkáňových elementů (vazivo, cévy) do připravených hydrogelů. Kladný náboj nemá vliv na vrůstání výběžků neurofilament ani astrocytů které vrůstají do všech připravených hydrogelů.

Kopolymerací s hydrolyticky degradovatelným síťovadlem jsme připravili hydrogely s dobou biodegradace *in vivo* 7-34 dní. Regenerace míšní tkáně v těchto biomateriálech byla obdobná, jako regenerace v nebiodegradovatelných hydrogelech bez elektrického náboje; komplikována byla kondenzací degradačních produktů v centru hydrogelu. Implantací hydrogelů ve fázi maximální hydratace jsme dosáhli snížení míry této kondenzace a zvýšení regenerace strukturálních elementů míšní tkáně v biomateriálu.

Výsledky práce byly jak nové znalosti o regeneraci CNS, tak i technologie přípravy biokompatibilních makroporézních hydrogelů, které mohou sloužit jako implantáty do CNS, a ověření jejich vlastností v podmínkách *in vitro* i *in vivo*. Biomateriály, které jsme navrhli a připravili, byly biokompatibilní a po implantaci do míchy laboratorního potkana podporovaly vrůstání pojivové tkáně, obsahující cévy a síť výběžků nervových buněk v akutním i subakutním modelu terapie míšní léze. Připravené hydrogely mohou být využity k experimentálnímu přemostění léze CNS a jako vhodný experimentální model při studiu regeneračních vlastností CNS.

8 Summary

Biocompatible hydrogels based on copolymers of 2-hydroxyethylmethacrylate are suitable for implantation into a central nervous tissue lesion. Our prepared hydrogels were macroporous with predominantly communicating pores, and their mechanical properties were similar to those of spinal cord tissue. After we confirmed their biocompatibility by the growth of mesenchymal stem cells and determined the hydrogel diffusion properties, we implanted the prepared hydrogels into acute spinal cord injury in laboratory rats and studied the process of spinal cord tissue regeneration within the implants. When the hydrogels were implanted in subacute phase of spinal cord injury, we observed favorable impact on the spinal cord tissue regeneration and reduction of pseudocyst formation.

Using histological and immunohistochemical methods, we observed the ingrowth of central nervous tissue elements (connective tissue, vessels, neurofilaments, Schwann cells, astrocyte processes) into the hydrogels implanted into the spinal cord hemisections. We have found that copolymerization with a positively charged ammonium salt increases the adhesion of the cells to the hydrogels *in vitro* and the ingrowth of nonspecific tissue elements (connective tissue, vessels) into the hydrogels. However, the positive charge had no effect on the ingrowth of neural cell processes and astrocytes, which were found within all of the studied materials.

Using copolymerization with a hydrolytically degradable crosslinker, we prepared hydrogels biodegradable *in vivo* in 7-34 days. The regeneration of the spinal cord tissue in these biomaterials was similar to the regeneration in nonbiodegradable hydrogels without an electric charge; however, it was complicated by the condensation of hydrogel degradation products in the central zones of the hydrogels. By implanting these hydrogels in the phase of maximal hydration, we decreased the condensation process and increased the regeneration of neural cell processes within the implants.

This work has resulted in increased knowledge about spinal cord regenerative processes and also in improved technology for the preparation of biocompatible macroporous hydrogels, which can serve as implants into the central nervous tissue, as well as a better understanding of their properties both *in vitro* and *in vivo*. Our biomaterials were biocompatible, and after implantation into a spinal cord hemisection in the laboratory rat, they facilitated the ingrowth of connective tissue containing vessels as well as a network of neural cell processes in both acute and subacute spinal cord injury therapy models. These hydrogels can be utilized as a suitable experimental model in order to study the regenerative properties of the central nervous tissue.

9 Související publikace autora

9.1 Publikace, které jsou podkladem disertační práce

[1] Lesný P, De Croos J, Přádný M, Vacík J, Michálek J, Woerly S, Syková E. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. Journal of Chemical Neuroanatomy. 2002 May;23(4):243-7.

IF (2013) = **2.520**

Citováno (2015) **75**×

Podíl práce autora: 60% (implantace hydrogelů, péče o zvířata, difúzní měření, histologie a imunohistochemie)

[2] Přádný M, Lesný P, Fiala J, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethylmethacrylate. Part 1. Copolymers of 2-hydroxyethylmethacrylate with methacrylic acid. Collection of Czech Chemical Communication. 2002;68:812-22.

IF(2013) = **1.137**

Citováno (2015) **33**×

Podíl práce autora: 40% (část návrhu matematického modelu, difúzní měření, zobrazení v konfokálním mikroskopu)

[3] Přádný M, Lesný P, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part II: Copolymers with positive and negative charges, polyelectrolyte complexes. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2005;16(8):767-73.

IF (2013) = **2.379**

Citováno (2015) **23**×

Podíl práce autora: 40% (část návrhu matematického modelu, zobrazení v konfokálním mikroskopu)

[4] Lesný P, Přádný M, Jendelová P, Michálek J, Vacík J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 4: Growth of rat bone marrow stromal cells in three-dimensional hydrogels with positive and negative surface charges and in polyelectrolyte complexes. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2006;17(9):829-33.

IF (2013) = **2.379**

Citováno (2015) **31**×

Podíl práce autora: 75% (izolace a expanze buněk, difúzní měření, mikroskopie, obrazová analýza)

[5] Přádný M, Michálek J, Lesný P, Hejčl A, Vacík J, Šlouf M, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 5: Hydrolytically degradable materials. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2006;17(12):1357-64.

IF (2013) = **2.379**

Citováno (2015) **22**×

Podíl práce autora: 40% (část návrhu matematického modelu, péče o zvířata, implantace, histologie a imunohistochemie)

[6] Hejčl A, Urdzíková L, Šedý J, Lesný P, Přádný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Zámečník J, Jendelová P, Syková E. Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. J Neurosurg Spine. 2008;8(1):67-73.

IF (2013) = **2.355**

Citováno (2015) **29**×

Podíl práce autora: 25% (příprava implantátů, imunohistochemie)

[7] Hejčl A, Lesný P, Přádný M, Sedý J, Zámečník J, Jendelová P, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 6: 3D hydrogels with positive and negative surface charges and polyelectrolyte complexes in spinal cord injury repair. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2009. 20(7):1571-7.

IF (2013) = **2.379**

Citováno (2015) **22**×

Podíl práce autora: 35% (příprava implantátů, imunohistochemie, obrazová analýza)

[8] Lesny P., Sykova E., Michalek J., Pradny M., Jirsak O., Martinova L.: Biomateriál na bázi nanovlákných vrstev a způsob jeho přípravy. Český patent č. 300805, 2007.

[9] Lesny P., Sykova E., Michalek J., Pradny M., Jirsak O., Martinova L.: Biomateriál na bázi nanovlákné vrstvy a způsob jeho přípravy. Český patent č. 301002, 2009.

9.2 Publikace související s tématem, které nejsou podkladem disertační práce

[1] Hejcl A, Sedy J, Kapcalova M, Arboleda Toro D, Amemori T, Likavcanova-Masinova K, Lesný P., Krumbholcova E, Pradny M, Michalek J, Burian M, Hajek M, Jendelova P, Sykova E: HPMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. Stem Cells Dev. 2010. 19(10):1535-46.

IF (2008) = **4.202**

Citováno (2015) **47×**

[2] Syková E, Jendelová P, Urdzíkova L, Lesný P., Hejcl A. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels-two strategies for spinal cord injury repair. Cellular and Molecular Neurobiology. 2006;26(7-8):1111-27.

IF (2013) = **2.201**

Citováno (2015) **114×**

9.3 Ostatní články autora v recenzovaných periodických

[1] Krasnicanova H., Lesny P.: Kompendium pediatrické auxologie. Cesko-slovenska pediatrie 2001;56:412-6.

[2] Seeman P., Groh D., Raskova D., Lesny P., Malikova M., Seemanova E., Kabelka Z.: Vyšetření genu pro connexin 26 u českých pacientů s vrozenou autosomálně recesivní nesyndromovou ztrátou sluchu. Otorinolaryngologie a Foniatrie 2002;51:221-5.

[3] Janoušek P., Kabelka Z., Fajstavr J., Lesný P., Jurovčík M., Šnajdauf J., Soukup J., Rygl M.: Poleptání jícnu u dětí. Otorinolaryngologie a Foniatrie 2003;52:170-74.

- [4] Kabelka Z., Boleslavská V., Groh D., Lesný P., Jurovcík M.: Chirurgické komplikace v souboru 206 dětských uživatelů kochleárního implantátu. *Otorinolaryngologie a Foniatrie* 2005;54:71-5.
- [5] Lesný P., Pradný M., Michálek J., Janoušek P., Kabelka Z.: Vliv povrchového náboje polymerních hydrogelů na růst chondrocytů in-vitro. *Choroby hlavy a krku (Head and Neck Diseases)* 2005;2:5-9.
- [6] Lesný P., Krasnicánová H., Vejvalka J.: Web based software for growth diagnostics. *Technology and Health Care* 2005;13:415-17.
- [7] Kuba M., Krajíček O., Lesný P., Vejvalka J., Holeček T.: Grid empowered sharing of medical expertise. *Stud Health Technol Inform* 2006;120:273-82.
- [8] Janoušek P., Kabelka Z., Lesný P., Jurovcík M., Snajdauf J., Rygl M.: Naše zkušenosti s diagnostikou a léčbou poleptání jícnu u dětí. *Choroby hlavy a krku (Head and Neck Diseases)* 2006;15:38-46.
- [9] Janoušek P., Kabelka Z., Rygl M., Lesný P., Grabec P., Fajstavr J., Jurovcík M., Snajdauf J.: Corrosive injury of the oesophagus in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:1103-7.
- [10] Brynda E., Riedel T., Dyr J., Houska M., Bacáková L., Filová E., Chlupac J., Lesný P., Jendelová P., Syková E.: Způsob přípravy regulovaných vrstev fibrinu na pevných površích. Český patent č. 299687, 2006.
- [11] Danisović L., Lesný P., Havlas V., Teyssler P., Syrová Z., Kopani M., Fajeriková G., Trc T., Syková E., Jendelová P.: Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Applied Biomedicine* 2007;5.
- [12] Babic M., Horák D., Trchová M., Jendelová P., Glogarová K., Lesný P., Herynek V., Hajek M., Syková E.: Poly(l-lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Bioconjug Chem* 2008.

- [13] Babic M., Horak D., Jendelova P., Glogarova K., Herynek V., Trchova M., Likavanova K., Lesny P., Pollert E., Hajek M., Sykova E.: Poly(N,N-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem* 2009;20:283-94.
- [14] Lesny P., Krasnicanova H., Holecek T., Slaby K., Vejvalka J.: Repositories of Reusable Auxological (Growth) Algorithms for eHealth; Karopka T., Correia R.J., (eds): *Open Source in European Health Care: The Time is Ripe*. Porto, Portugal, INSTICC PRESS, 2009.
- [15] Marekova D., Lesny P., Jendelova P., Michalek J., Kostecka P., Pradny M., Martinova L., Pantoflicek T., Ryska M., Sykova E.: Hepatocyte growth on polycapronolactone and 2-hydroxyethylmethacrylate nanofiber sheets enhanced by bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Hepato-gastroenterology* 2013;60:1156-63.
- [16] Urdzikova L., Lesny P., Sykova E., Jendelova P.: Mesenchymal stem cells for the treatment of tendon disorders. *J Biomedical Science and Engineering* 2013;6:14-23.

10 Literatura

Aguayo A.J., David S., Bray G.M.: Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 1981;95:231-40.

Akesson E., Holmberg L., Jonhagen M.E., Kjaeldgaard A., Falci S., Sundstrom E., Seiger A.: Solid human embryonic spinal cord xenografts in acute and chronic spinal cord cavities: a morphological and functional study. *Exp Neurol* 2001;170:305-16.

Akesson E., Kjaeldgaard A., Seiger A.: Human embryonic spinal cord grafts in adult rat spinal cord cavities: survival, growth, and interactions with the host. *Exp Neurol* 1998;149:262-76.

Allen A.R.: Surgery of experimental lesion of spinal cord. equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *JAMA* 1911;57:878-80.

Alsmadi N.Z., Patil L.S., Hor E.M., Lofti P., Razal J.M., Chuong C.J., Wallace G.G., Romero-Ortega M.I.: Coiled polymeric growth factor gradients for multi-luminal neural chemotaxis. *Brain Res Brain Res Rev* 2015;1619:72-83.

Ambrosino G., Varotto S., Basso S., Galavotti D., Cecchetto A., Carraro P., Naso A., De Silvestro G., Plebani M., Giron G., Abatangelo G., Donato D., Braga G.P., Cestrone A., Marrelli L., Trombetta M., Lorenzelli V., Picardi A., Valente M.L., Palu G., Colantoni A., Van Thiel D., Ricordi C., D'Amico D.F.: ALEX (artificial liver for extracorporeal xenoassistance): a new bioreactor containing a porcine autologous biomatrix as hepatocyte support. Preliminary results in an ex vivo experimental model. *Int J Artif Organs* 2002;25:960-5.

Anderson D.K., Howland D.R., Reier P.J.: Fetal neural grafts and repair of the injured spinal cord. *Brain Pathol* 1995;5:451-57.

Andriano K.P., Tabata Y., Ikada Y., Heller J.: In vitro and in vivo comparison of bulk and surface hydrolysis in absorbable polymer scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 1999;48:602-12.

Aoki M., Kishima H., Yoshimura K., Ishihara M., Ueno M., Hata K., Yamashita T., Iwatsuki K., Yoshimine T.: Limited functional recovery in rats with complete spinal cord injury after transplantation of whole-layer olfactory mucosa: laboratory investigation. *Journal of neurosurgery Spine* 2010;12:122-30.

Asher R., Perides G., Vanderhaeghen J.J., Bignami A.: Extracellular matrix of central nervous system white matter: demonstration of an hyaluronate-protein complex. *J Neurosci Res* 1991;28:410-21.

Atala A., Lanza R.P.: *Methods of Tissue Engineering*; Academic Press, 2002.

Atkinson P.P., Atkinson J.L.: Spinal shock. *Mayo Clin Proc* 1996;71:384-9.

Auerbach R.: Qualities of Fetal Cells and Tissues: Report of the Human Fetal Tissue Transplantation Research Panel, vol II. Bethesda, National Institutes of Health, 1988.

Avital I., Inderbitzin D., Aoki T., Tyan D.B., Cohen A.H., Ferraresso C., Rozga J., Arnaout W.S., Demetriou A.A.: Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-64.

Azizi S.A., Stokes D., Augelli B.J., DiGirolamo C., Prockop D.J.: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3908-13.

Bakshi A., Fisher O., Dagci T., Himes B.T., Fischer I., Lowman A.: Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2004;1:322-9.

Balint R., Cassidy N.J., Cartmell S.H.: Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta biomaterialia* 2014;10:2341-53.

Bamber N.I., Li H., Aebischer P., Xu X.M.: Fetal spinal cord tissue in mini-guidance channels promotes longitudinal axonal growth after grafting into hemisectioned adult rat spinal cords. *Neural Plast* 1999;6:103-21.

Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C.: A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995;12:1-21.

Becker A.J., Mc C.E., Till J.E.: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452-4.

Becker D., Sadowsky C.L., McDonald J.W.: Restoring function after spinal cord injury. *Neurologist* 2003;9:1-15.

Behrmann D.L., Bresnahan J.C., Beattie M.S., Shah B.R.: Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma* 1992;9:197-217.

Belkas J.S., Munro C.A., Shoichet M.S., Johnston M., Midha R.: Long-term in vivo biomechanical properties and biocompatibility of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) nerve conduits. *Biomaterials* 2005;26:1741-9.

Bellucci C.H., de Castro Filho J.E., Gomes C.M., de Bessa J., Jr., Battistella L.R., Rubio de Souza D., Scazufca M., Bruschini H., Srougi M., Barros Filho T.E.: Contemporary Trends in the Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury: Changes in Age and Etiology. *Neuroepidemiology* 2015;44:85-90.

Benarroch E.E.: Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc* 2005;80:1326-38.

Beneš V.: Poranění míchy. Praha, Státní zdravotnické nakladatelství, 1961.

Benfey M., Aguayo A.J.: Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* 1982;296:150-2.

Bernstein J.J., Underberger D., Hoovler D.W.: Fetal CNS transplants into adult spinal cord: techniques, initial effects, and caveats. *Cent Nerv Syst Trauma* 1984;1:39-46.

Bjorklund A., Stenevi U., Schmidt R.H., Dunnett S.B., Gage F.H.: Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. I. Introduction and general methods of preparation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1983;522:1-7.

Blagodatskii M.D., Sufianov A.A., Larionov S.N., Kibort R.V., Seminskii I., Manokhin P.A.: [The transplantation of embryonic nerve tissue in syringomyelia: initial clinical experience]. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko* 1994:27-9.

Blacher S., Maquet V., Schils F., Martin D., Schoenen J., Moonen G., Jerome R., Pirard J.P.: Image analysis of the axonal ingrowth into poly(D,L-lactide) porous scaffolds in relation to the 3-D porous structure. *Biomaterials* 2003;24:1033-40.

Blight A.R.: Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by line-sampling. *Neuroscience* 1983;10:521-43.

Blight A.R., Tuszynski M.H.: Clinical trials in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006;23:586-93.

Blinkov S.M., Gletze I.: The human brain in figures and tables. New York, Plenum Press, 1968.

Boer G.J.: Ethical guidelines for the use of human embryonic or fetal tissue for experimental and clinical neurotransplantation and research. Network of European CNS Transplantation and Restoration (NECTAR). *J Neurol* 1994;242:1-13.

Borlongan C.V., Stahl C.E., Cameron D.F., Saporta S., Freeman T.B., Cahill D.W., Sanberg P.R.: CNS immunological modulation of neural graft rejection and survival. *Neurol Res* 1996;18:297-304.

Bracken M.B., Shepard M.J., Collins W.F., Holford T.R., Young W., Baskin D.S., Eisenberg H.M., Flamm E., Leo-Summers L., Maroon J., et al.: A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990;322:1405-11.

Bregman B.S., Reier P.J.: Neural tissue transplants rescue axotomized rubrospinal cells from retrograde death. *J Comp Neurol* 1986;244:86-95.

Bresnahan J.C., King J.S., Martin G.F., Yashon D.: A neuroanatomical analysis of spinal cord injury in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neurol Sci* 1976;28:521-42.

Broadwell R.D.: Absence of a blood-brain barrier within transplanted brain tissue? *Science* 1988;241:473-4.

Broadwell R.D., Charlton H.M., Ebert P.S., Hickey W.F., Shirazi Y., Villegas J., Wolf A.L.: Allografts of CNS tissue possess a blood-brain barrier. II. Angiogenesis in solid tissue and cell suspension grafts. *Exp Neurol* 1991;112:1-28.

Broadwell R.D., Charlton H.M., Ganong W.F., Saleman M., Sofroniew M.: Allografts of CNS tissue possess a blood-brain barrier. I. Grafts of medial preoptic area in hypogonadal mice. *Exp Neurol* 1989;105:135-51.

Bruck S.D.: The role of biomaterials in insulin delivery systems. *Int J Artif Organs* 1980;3:299-304.

Bunge M.B., Holets V.R., Bates M.L., Clarke T.S., Watson B.D.: Characterization of photochemically induced spinal cord injury in the rat by light and electron microscopy. *Exp Neurol* 1994;127:76-93.

Bunge R.P., Puckett W.R., Becerra J.L., Marcillo A., Quencer R.M.: Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol* 1993;59:75-89.

Burke D.A., Linden R.D., Zhang Y.P., Maiste A.C., Shields C.B.: Incidence rates and populations at risk for spinal cord injury: A regional study. *Spinal Cord* 2001;39:274-8.

Buss A., Pech K., Kakulas B.A., Martin D., Schoenen J., Noth J., Brook G.A.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human traumatic spinal cord injury. *BMC Neurol* 2007;7:17.

Cadic-Amadeuf C.M., Vitiello S., Baquey C.V., Dupuy B.J.: Inflammatory reaction induced by agarose implants reduced by adding adrenal cells to the polymer. *Asaio J* 1992;38:M386-9.

Carter D.A., Bray G.M., Aguayo A.J.: Regenerated retinal ganglion cell axons can form well-differentiated synapses in the superior colliculus of adult hamsters. *J Neurosci* 1989;9:4042-50.

Celio M.R., Blumcke I.: Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 1994;19:128-45.

Connor J.R., Bernstein J.J.: Astrocytes in rat fetal cerebral cortical homografts following implantation into adult rat spinal cord. *Brain Res* 1987;409:62-70.

Cooper R.A.: Bioengineering and spinal cord injury: a perspective on the state of the science. *J Spinal Cord Med* 2004;27:351-64.

Corkhill P.H., Hamilton C.J., Tighe B.J.: Synthetic hydrogels. VI. Hydrogel composites as wound dressings and implant materials. *Biomaterials* 1989;10:3-10.

Crews L., Hunter D.: Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspectives on developmental neurobiology* 1994;2:151-61.

Crowe M.J., Bresnahan J.C., Shuman S.L., Masters J.N., Beattie M.S.: Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 1997;3:73-6.

Cruz G.J., Mondragon-Lozano R., Diaz-Ruiz A., Manjarrez J., Olayo R., Salgado-Ceballos H., Olayo M.G., Morales J., Alvarez-Mejia L., Morales A., Mendez-Armenta M., Plascencia N., del Carmen Fernandez M., Rios C.: Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *Journal of materials science Materials in medicine* 2012;23:2583-92.

Čížková D., Rosocha J., Vanický I., Jergova S., Cizek M.: Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26:1167-80.

Darabi S., Tiraihi T., Delshad A., Sadeghizadeh M.: A new multistep induction protocol for the transdifferentiation of bone marrow stromal stem cells into GABAergic neuron-like cells. *Iranian biomedical journal* 2013;17:8-14.

Das G.D.: Neural transplantation in the spinal cord of adult rats. Conditions, survival, cytology and connectivity of the transplants. *J Neurol Sci* 1983;62:191-210.

David S., Aguayo A.J.: Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 1981;214:931-3.

David S., Aguayo A.J.: Axonal regeneration after crush injury of rat central nervous system fibres innervating peripheral nerve grafts. *J Neurocytol* 1985;14:1-12.

de la Torre J.C., Goldsmith H.S.: Collagen-omental graft in experimental spinal cord transection. *Acta Neurochir (Wien)* 1990;102:152-63.

Deng M., Uhrich K.E.: Effects of in vitro degradation on properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) pertinent to its biological performance. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:1091-6.

Deng Y.B., Liu X.G., Liu Z.G., Liu X.L., Liu Y., Zhou G.Q.: Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytotherapy* 2006;8:210-4.

DeRenzis F.A., Schechtman A.: Staining by neutral red and trypan blue in sequence for assaying vital and nonvital cultured cells. *Stain Technol* 1973;48:135-6.

DeVivo M.J., Kartus P.L., Stover S.L., Fine P.R.: Benefits of early admission to an organised spinal cord injury care system. *Paraplegia* 1990;28:545-55.

Dillon G.P., Yu X., Sridharan A., Ranieri J.P., Bellamkonda R.V.: The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:1049-69.

Dohrmann G.J., Wagner F.C., Jr., Wick K.M., Bucy P.C.: Fine structural alterations in transitory traumatic paraplegia. *Proc Veterans Adm Spinal Cord Inj Conf* 1971;18:6-8.

Doležel J.: Traumatická léze míšní. *Urologie pro praxi* 2004;4:146-55.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.

Drábková J.: Spinální trauma z pohledu intenzivisty. *Acta Spondylologica* 2003;2:101-4.

Dreifus M., Wichterle O.: [Clinical Experiences with Hydrogel Contact Lenses.]. *Cesk Oftalmol* 1964;20:393-9.

Ducker T.B.: Spinal cord neurophysiological monitoring during operation: a viewpoint. *Neurosurgery* 1987;20:988.

Duncan I.D., Aguayo A.J., Bunge R.P., Wood P.M.: Transplantation of rat Schwann cells grown in tissue culture into the mouse spinal cord. *J Neurol Sci* 1981;49:241-52.

Emery E., Aldana P., Bunge M.B., Puckett W., Srinivasan A., Keane R.W., Bethea J., Levi A.D.: Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg* 1998;89:911-20.

Eves H.: Two Surprising Theorems on Cavalieri Congruence. *The College Mathematics Journal* 1991;22:118-24.

Falci S., Holtz A., Akesson E., Azizi M., Ertzgaard P., Hultling C., Kjaeldgaard A., Levi R., Ringden O., Westgren M., Lammertse D., Seiger A.: Obliteration of a posttraumatic spinal cord cyst with solid human embryonic spinal cord grafts: first clinical attempt. *J Neurotrauma* 1997;14:875-84.

Fehlings M.G., Baptiste D.C.: Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury* 2005;36 Suppl 2:B113-22.

Fehlings M.G., Perrin R.G.: The role and timing of early decompression for cervical spinal cord injury: update with a review of recent clinical evidence. *Injury* 2005;36 Suppl 2:B13-26.

Fehlings M.G., Tator C.H.: An evidence-based review of decompressive surgery in acute spinal cord injury: rationale, indications, and timing based on experimental and clinical studies. *J Neurosurg* 1999;91:1-11.

Flynn L., Dalton P.D., Shoichet M.S.: Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:4265-72.

Francis N.L., Hunger P.M., Donius A.E., Riblett B.W., Zavaliangos A., Wegst U.G., Wheatley M.A.: An ice-templated, linearly aligned chitosan-alginate scaffold for neural tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part A* 2013;101:3493-503.

Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S.: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3:393-403.

Friedenstein A.J., Piatetzky S., II, Petrakova K.V.: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381-90.

Friedman J.A., Windebank A.J., Moore M.J., Spinner R.J., Currier B.L., Yaszemski M.J.: Biodegradable polymer grafts for surgical repair of the injured spinal cord. *Neurosurgery* 2002;51:742-51; discussion 51-2.

Galletti P.M., Hellmann K.B., Nerem R.M.: Tissue engineering: From basic science to products: A preface. *Tissue Engineering* 1995;1:147-9.

Garcia-Alias G., Lopez-Vales R., Fores J., Navarro X., Verdu E.: Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells promotes recovery after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 2004;75:632-41.

Gelain F., Panseri S., Antonini S., Cunha C., Donega M., Lowery J., Taraballi F., Cerri G., Montagna M., Baldissera F., Vescovi A.: Transplantation of nanostructured composite scaffolds results in the regeneration of chronically injured spinal cords. *ACS nano* 2011;5:227-36.

Gelderd J.B.: Evaluation of blood vessel and neurite growth into a collagen matrix placed within a surgically created gap in rat spinal cord. *Brain Res* 1990;511:80-92.

Geller H.M., Fawcett J.W.: Building a bridge: engineering spinal cord repair. *Exp Neurol* 2002;174:125-36.

Giannetti S., Lauretti L., Fernandez E., Salvinelli F., Tamburrini G., Pallini R.: Acrylic hydrogel implants after spinal cord lesion in the adult rat. *Neurol Res* 2001;23:405-9.

Goldsmith H.S., de la Torre J.C.: Axonal regeneration after spinal cord transection and reconstruction. *Brain Res* 1992;589:217-24.

GrandPre T., Nakamura F., Vartanian T., Strittmatter S.M.: Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000;403:439-44.

Grauss R.W., Hazekamp M.G., Oppenhuizen F., van Munsteren C.J., Gittenberger-de Groot A.C., DeRuiter M.C.: Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:566-71.

Greitz D.: Unraveling the riddle of syringomyelia. *Neurosurg Rev* 2006;29:251-63; discussion 64.

Grigolo B., Lisignoli G., Piacentini A., Fiorini M., Gobbi P., Mazzotti G., Duca M., Pavesio A., Facchini A.: Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* 2002;23:1187-95.

Gruner J.A.: A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* 1992;9:123-6; discussion 6-8.

Guo X., Zahir T., Mothe A., Shoichet M.S., Morshead C.M., Katayama Y., Tator C.H.: The effect of growth factors and soluble Nogo-66 receptor protein on transplanted neural stem/progenitor survival and axonal regeneration after complete transection of rat spinal cord. *Cell transplantation* 2012;21:1177-97.

Hall E.D., Springer J.E.: Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 2004;1:80-100.

Harel N.Y., Strittmatter S.M.: Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury? *Nature reviews Neuroscience* 2006;7:603-16.

Hasegawa T., Suga Y., Mizoguchi M., Ikeda S., Ogawa H., Kubo K., Matsui H., Kagawa S., Kuroyanagi Y.: Clinical trial of allogeneic cultured dermal substitute for the treatment of intractable skin ulcers in 3 patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol* 2004;50:803-4.

Heckmann L., Schlenker H.J., Fiedler J., Brenner R., Dauner M., Bergenthal G., Mattes T., Claes L., Ignatius A.: Human mesenchymal progenitor cell responses to a novel textured poly(L-lactide) scaffold for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;81:82-90.

Hejčl A., Šedý J., Kapcalová M., Arboleda Toro D., Amemori T., Likavčanová-Mašínová K., Lesný P., Krumbholcová E., Příkladný M., Michálek J., Burian M., Hájek M., Jendelová P., Syková E.: HPMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *Stem Cells Dev* 2010.

Hejčl A., Urdžíková L., Šedý J., Lesný P., Přádný M., Michalek J., Burian M., Hajek M., Zamecnik J., Jendelova P., Syková E.: Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine* 2008;8:67-73.

Hentze H., Soong P.L., Wang S.T., Phillips B.W., Putti T.C., Dunn N.R.: Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res* 2009.

Hiruma S., Otsuka K., Satou T., Hashimoto S.: Simple and reproducible model of rat spinal cord injury induced by a controlled cortical impact device. *Neurol Res* 1999;21:313-23.

Hitchon P.W., Lobosky J.M., Wilkinson T.T., Dyste G.N., Girton R.A., 3rd: Impact and balloon compression models of the spinal cord. *J Am Paraplegia Soc* 1988;11:35-40.

Hofstetter C.P., Schwarz E.J., Hess D., Widenfalk J., El Manira A., Prockop D.J., Olson L.: Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2199-204.

Horáček M.J., Thompson J.C., Dada M.O., Terracio L.: The extracellular matrix components laminin, fibronectin, and collagen IV are present among the epithelial cells forming Rathke's pouch. *Acta Anat (Basel)* 1993;147:69-74.

Horn-Ranney E.L., Curley J.L., Catig G.C., Huval R.M., Moore M.J.: Structural and molecular micropatterning of dual hydrogel constructs for neural growth models using photochemical strategies. *Biomedical microdevices* 2013;15:49-61.

Horn E.M., Beaumont M., Shu X.Z., Harvey A., Prestwich G.D., Horn K.M., Gibson A.R., Preul M.C., Panitch A.: Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2007;6:133-40.

Houle J.D., Johnson J.E.: Nerve growth factor (NGF)-treated nitrocellulose enhances and directs the regeneration of adult rat dorsal root axons through intraspinal neural tissue transplants. *Neurosci Lett* 1989;103:17-23.

Houle J.D., Ziegler M.K.: Bridging a complete transection lesion of adult rat spinal cord with growth factor-treated nitrocellulose implants. *J Neural Transplant Plast* 1994;5:115-24.

Hsieh F.Y., Lin H.H., Hsu S.H.: 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair. *Biomaterials* 2015;71:48-57.

Huang H., Chen L., Wang H., Xi H., Gou C., Zhang J., Zhang F., Liu Y.: Safety of fetal olfactory ensheathing cell transplantation in patients with chronic spinal cord injury. A 38-month follow-up with MRI. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2006;20:439-43.

Huang J., Hu X., Lu L., Ye Z., Zhang Q., Luo Z.: Electrical regulation of Schwann cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers. *Journal of biomedical materials research Part A* 2010;93:164-74.

Hultborn H., Malmsten J.: Changes in segmental reflexes following chronic spinal cord hemisection in the cat. I. Increased monosynaptic and polysynaptic ventral root discharges. *Acta Physiol Scand* 1983;119:405-22.

Hurlbert R.J.: Strategies of medical intervention in the management of acute spinal cord injury. *Spine* 2006;31:S16-21; discussion S36.

Chauhan N.B., Figlewicz H.M., Khan T.: Carbon filaments direct the growth of postlesional plastic axons after spinal cord injury. *Int J Dev Neurosci* 1999;17:255-64.

Chen J., Park K.: Synthesis and characterization of superporous hydrogel composites. *J Control Release* 2000;65:73-82.

Chen M.S., Huber A.B., van der Haar M.E., Frank M., Schnell L., Spillmann A.A., Christ F., Schwab M.E.: Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000;403:434-9.

Chen T.H.: Tissue regeneration: from synthetic scaffolds to self-organizing morphogenesis. *Current stem cell research & therapy* 2014;9:432-43.

Cheng H., Cao Y., Olson L.: Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 1996;273:510-3.

Chiquet-Ehrismann R.: Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia* 1995;51:853-62.

Iwakawa M., Mizoi K., Tessler A., Itoh Y.: Intraspinal implants of fibrin glue containing glial cell line-derived neurotrophic factor promote dorsal root regeneration into spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* 2001;15:173-82.

Iwaya K., Mizoi K., Tessler A., Itoh Y.: Neurotrophic agents in fibrin glue mediate adult dorsal root regeneration into spinal cord. *Neurosurgery* 1999;44:589-95; discussion 95-6.

Jakeman L.B., Reier P.J.: Axonal projections between fetal spinal cord transplants and the adult rat spinal cord: a neuroanatomical tracing study of local interactions. *J Comp Neurol* 1991;307:311-34.

Jaksche H., Schaan M., Schulz J., Bosczyk B.: Posttraumatic syringomyelia--a serious complication in tetra- and paraplegic patients. *Acta Neurochir Suppl* 2005;93:165-7.

James C.D., Davis R., Meyer M., Turner A., Turner S., Withers G., Kam L., Banker G., Craighead H., Isaacson M., Turner J., Shain W.: Aligned microcontact printing of

micrometer-scale poly-L-lysine structures for controlled growth of cultured neurons on planar microelectrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng* 2000;47:17-21.

Jayaraman K., Kotaki M., Zhang Y., Mo X., Ramakrishna S.: Recent advances in polymer nanofibers. *J Nanosci Nanotechnol* 2004;4:52-65.

Jayasinghe S.N., Sullivan A.C.: Electrohydrodynamic atomization: an approach to growing continuous self-supporting polymeric fibers. *The journal of physical chemistry B* 2006;110:2522-8.

Jiang X., Cao H.Q., Shi L.Y., Ng S.Y., Stanton L.W., Chew S.Y.: Nanofiber topography and sustained biochemical signaling enhance human mesenchymal stem cell neural commitment. *Acta biomaterialia* 2012;8:1290-302.

Jirsák O., Sanetrník F., Lukáš D., Kotek V., Martinová L., Chaloupek J.: The Nanospider technology – production of polymeric nanofibers in industrial scale, CZ 294274 (B6), WO 2005024101. 2004.

Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M., Yoo J.U.: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-72.

Jones L.L., Margolis R.U., Tuszynski M.H.: The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003;182:399-411.

Joosten E.A., Bar P.R., Gispen W.H.: Collagen implants and cortico-spinal axonal growth after mid-thoracic spinal cord lesion in the adult rat. *J Neurosci Res* 1995;41:481-90.

Juláková E.: Rovnice, jednotky a veličiny - jak s nimi? *Chem Listy* 2005;99:250-7.

Justesen J., Stenderup K., Eriksen E.F., Kassem M.: Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 2002;71:36-44.

Kakulas B.A.: Pathology of spinal injuries. *Cent Nerv Syst Trauma* 1984;1:117-29.

Kala M.: Cerebrospinal fluid pseudocyst after anterior stabilization for cervical spine injury treated by ventricular drainage: case report. *Surg Neurol* 1996;45:293-5.

Kao J.M., Rose R., Yousef M., Hunter S.K., Rodgers V.G.: In vivo biocompatibility evaluation of Cibacron blue-agarose. *J Biomed Mater Res* 1999;47:537-42.

Kassem M., Mosekilde L., Eriksen E.F.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1993;8:1453-8.

Keirstead S.A., Rasminsky M., Fukuda Y., Carter D.A., Aguayo A.J., Vidal-Sanz M.: Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science* 1989;246:255-7.

Kidambi S., Lee I., Chan C.: Controlling primary hepatocyte adhesion and spreading on protein-free polyelectrolyte multilayer films. *J Am Chem Soc* 2004;126:16286-7.

Kim K.N., Oh S.H., Lee K.H., Yoon D.H.: Effect of human mesenchymal stem cell transplantation combined with growth factor infusion in the repair of injured spinal cord. *Acta Neurochir Suppl* 2006;99:133-6.

Kim Y.J., Park H.J., Lee G., Bang O.Y., Ahn Y.H., Joe E., Kim H.O., Lee P.H.: Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. *Glia* 2008.

King V.R., Phillips J.B., Hunt-Grubbe H., Brown R., Priestley J.V.: Characterization of non-neuronal elements within fibronectin mats implanted into the damaged adult rat spinal cord. *Biomaterials* 2006;27:485-96.

Koda M., Nishio Y., Kamada T., Someya Y., Okawa A., Mori C., Yoshinaga K., Okada S., Moriya H., Yamazaki M.: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res* 2007;1149:223-31.

Koeberle P.D., Bahr M.: Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone? *Journal of neurobiology* 2004;59:162-80.

Koshizuka S., Okada S., Okawa A., Koda M., Murasawa M., Hashimoto M., Kamada T., Yoshinaga K., Murakami M., Moriya H., Yamazaki M.: Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:64-72.

Kubinová S., Horak D., Hejčl A., Plichta Z., Kotek J., Proks V., Forostyak S., Syková E.: SIKVAV-modified highly superporous PHEMA scaffolds with oriented pores for spinal cord injury repair. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2013.

Kubinová S., Horak D., Vanecek V., Plichta Z., Proks V., Syková E.: The use of new surface-modified poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels in tissue engineering: treatment of the surface with fibronectin subunits versus Ac-CGGASIKVAVS-OH, cysteine, and 2-mercaptoethanol modification. *Journal of biomedical materials research Part A* 2014;102:2315-23.

Kubinová S., Syková E.: Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury. *Regenerative medicine* 2012;7:207-24.

Kunkel-Bagden E., Dai H.N., Bregman B.S.: Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol* 1992;116:40-51.

Lakard S., Herlem G., Valles-Villareal N., Michel G., Propper A., Gharbi T., Fahys B.: Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. *Biosens Bioelectron* 2005;20:1946-54.

Langer R., Vacanti J.P.: Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.

Lanza R.P., Langer R., Vacanti J.P.: Principles of Tissue Engineering; Elsevier, 2000.

Lee J.Y., Bashur C.A., Goldstein A.S., Schmidt C.E.: Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials* 2009;30:4325-35.

Li G.L., Brodin G., Farooque M., Funa K., Holtz A., Wang W.L., Olsson Y.: Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:280-9.

Li X., Liu X., Cui L., Brunson C., Zhao W., Bhat N.R., Zhang N., Wen X.: Engineering an in situ crosslinkable hydrogel for enhanced remyelination. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013;27:1127-36.

Li Y., Field P.M., Raisman G.: Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 1998;18:10514-24.

Li Y., Zhao Q.: [The effects of fibrin glue on acute complete transection spinal cord injury]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2008;22:828-31.

Lima C., Escada P., Pratas-Vital J., Branco C., Arcangeli C.A., Lazzeri G., Maia C.A., Capucho C., Hasse-Ferreira A., Peduzzi J.D.: Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 2010;24:10-22.

Lindstedt S., Prockop D.J.: Isotopic studies on urinary hydroxyproline as evidence for rapidly catabolized forms of collagen in the young rat. *J Biol Chem* 1961;236:1399-403.

Liu B.F., Ma J., Xu Q.Y., Cui F.Z.: Regulation of charged groups and laminin patterns for selective neuronal adhesion. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;53:175-8.

Liu D., Bao F., Prough D.S., Dewitt D.S.: Peroxynitrite generated at the level produced by spinal cord injury induces peroxidation of membrane phospholipids in normal rat cord: reduction by a metalloporphyrin. *J Neurotrauma* 2005;22:1123-33.

Liu J.B., Tang T.S., Xiao D.S.: Changes of free iron contents and its correlation with lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. *Chin J Traumatol* 2004;7:229-32.

Liu Y., Ji Y., Ghosh K., Clark R.A., Huang L., Rafailovich M.H.: Effects of fiber orientation and diameter on the behavior of human dermal fibroblasts on electrospun PMMA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2009;90:1092-106.

Liu Y., Murray M., Tessler A., Fischer I.: Grafting of genetically modified fibroblasts into the injured spinal cord. *Prog Brain Res* 2000;128:309-19.

Long X., Olszewski M., Huang W., Kletzel M.: Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2005;14:65-9.

Lund R.D., Rao K., Hankin M.H., Kunz H.W., Gill T.J., 3rd: Transplantation of retina and visual cortex to rat brains of different ages. Maturation, connection patterns, and immunological consequences. *Ann N Y Acad Sci* 1987;495:227-41.

Maeda A., Sobel R.A.: Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:300-9.

Makohliso S.A., Valentini R.F., Aebischer P.: Magnitude and polarity of a fluoroethylene propylene electret substrate charge influences neurite outgrowth in vitro. *J Biomed Mater Res* 1993;27:1075-85.

Mansilla E., Marin G.H., Sturla F., Drago H.E., Gil M.A., Salas E., Gardiner M.C., Piccinelli G., Bossi S., Salas E., Petrelli L., Iorio G., Ramos C.A., Soratti C.: Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc* 2005;37:292-4.

Marchand R., Woerly S.: Transected spinal cords grafted with in situ self-assembled collagen matrices. *Neuroscience* 1990;36:45-60.

Marchand R., Woerly S., Bertrand L., Valdes N.: Evaluation of two cross-linked collagen gels implanted in the transected spinal cord. *Brain Res Bull* 1993;30:415-22.

Marshall C.T., Lu C., Winstead W., Zhang X., Xiao M., Harding G., Klueber K.M., Roisen F.J.: The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells. *Histol Histopathol* 2006;21:633-43.

McBride R.L., Feringa E.R., Garver M.K., Williams J.K., Jr.: Prelabeled red nucleus and sensorimotor cortex neurons of the rat survive 10 and 20 weeks after spinal cord transection. *J Neuropathol Exp Neurol* 1989;48:568-76.

McCall J., Weidner N., Blesch A.: Neurotrophic factors in combinatorial approaches for spinal cord regeneration. *Cell and tissue research* 2012;349:27-37.

McCreedy D.A., Sakiyama-Elbert S.E.: Combination therapies in the CNS: engineering the environment. *Neurosci Lett* 2012;519:115-21.

McKerracher L., David S., Jackson D.L., Kottis V., Dunn R.J., Braun P.E.: Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 1994;13:805-11.

Mei N., Chen G., Zhou P., Chen X., Shao Z.Z., Pan L.F., Wu C.G.: Biocompatibility of Poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan--the fibroblasts proliferation in vitro. *J Biomater Appl* 2005;19:323-39.

Mendelsohn J.D., Yang S.Y., Hiller J., Hochbaum A.I., Rubner M.F.: Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules* 2003;4:96-106.

Mo X.M., Xu C.Y., Kotaki M., Ramakrishna S.: Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004;25:1883-90.

Mokřý J., Karbanová J., Lukáš J., Palečková V., Dvořánková B.: Biocompatibility of HEMA copolymers designed for treatment of CNS diseases with polymer-encapsulated cells. *Biotechnol Prog* 2000;16:897-904.

Monnier P.P., Sierra A., Schwab J.M., Henke-Fahle S., Mueller B.K.: The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci* 2003;22:319-30.

Montzka K., Lassonczyk N., Tschoke B., Neuss S., Fuhrmann T., Franzen R., Smeets R., Brook G.A., Woltje M.: Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC neuroscience* 2009;10:16.

Murugan R., Ramakrishna S.: Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Engineering* 2007;13:1845-66.

Nagaoka S., Tanzawa H., Suzuki J.: Cell proliferation on hydrogels. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990;26:51-6.

Nagaya N., Kangawa K., Itoh T., Iwase T., Murakami S., Miyahara Y., Fujii T., Uematsu M., Ohgushi H., Yamagishi M., Tokudome T., Mori H., Miyatake K., Kitamura S.: Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:1128-35.

Nankovic V., Snur I., Nankovic S., Sokolovic-Matejcic B., Kvesic D.: [Spinal shock. Diagnosis and therapy. Problems and dilemmas]. *Lijec Vjesn* 1995;117 Suppl 2:30-2.

Nicholson C., Phillips J.M.: Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J Physiol* 1981;321:225-57.

Nicholson C., Syková E.: Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 1998;21:207-15.

Nomura H., Katayama Y., Shoichet M.S., Tator C.H.: Complete spinal cord transection treated by implantation of a reinforced synthetic hydrogel channel results in syringomyelia and caudal migration of the rostral stump. *Neurosurgery* 2006;59:183-92; discussion -92.

Novikova L.N., Mosahebi A., Wiberg M., Terenghi G., Kellerth J.O., Novikov L.N.: Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:242-52.

Owen M., Friedenstein A.J.: Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42-60.

Pakulska M.M., Ballios B.G., Shoichet M.S.: Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomedical materials* 2012;7:024101.

Papadopoulos S.M.: Spinal cord injury. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992;5:554-7.

Park H.C., Shim Y.S., Ha Y., Yoon S.H., Park S.R., Choi B.H., Park H.S.: Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Eng* 2005;11:913-22.

Park S., Yang G., Madduri N., Abidian M.R., Majd S.: Hydrogel-mediated direct patterning of conducting polymer films with multiple surface chemistries. *Advanced materials* 2014;26:2782-7.

Pasterkamp R.J., Verhaagen J.: Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;35:36-54.

Patel Z.S., Mikos A.G.: Angiogenesis with biomaterial-based drug- and cell-delivery systems. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004;15:701-26.

Patist C.M., Mulder M.B., Gautier S.E., Maquet V., Jerome R., Oudega M.: Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials* 2004;25:1569-82.

Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.

Plant G.W., Bates M.L., Bunge M.B.: Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral Schwann cell graft-transected spinal cord interface. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:471-87.

Plant G.W., Woerly S., Harvey A.R.: Hydrogels containing peptide or aminosugar sequences implanted into the rat brain: influence on cellular migration and axonal growth. *Exp Neurol* 1997;143:287-99.

Podgornyi O.V., Poltavtseva R.A., Marei M.V., Sukhikh G.T., Aleksandrova M.A.: Formation of neuroepithelial structures in culture of neural stem cells from human brain. *Bull Exp Biol Med* 2005;140:113-7.

Pollock K., Stroemer P., Patel S., Stevanato L., Hope A., Miljan E., Dong Z., Hodges H., Price J., Sinden J.D.: A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol* 2006;199:143-55.

Přádný M., Michalek J., Sirc J.: *Hydrogels: Porous media*. Nova publishers, 2009.

Qi F., Wang Y., Ma T., Zhu S., Zeng W., Hu X., Liu Z., Huang J., Luo Z.: Electrical regulation of olfactory ensheathing cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers. *Biomaterials* 2013;34:1799-809.

Qiu Q., Sayer M., Kawaja M., Shen X., Davies J.E.: Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998;42:117-27.

Ramon-Cueto A., Plant G.W., Avila J., Bunge M.B.: Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 1998;18:3803-15.

Ramon y Cajal S.: *Degeneration and regeneration of the nervous system* [English translation 1959]. New York, Hafner, 1928.

Reier P.J.: Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology. *NeuroRx* 2004;1:424-51.

Reier P.J., Bregman B.S., Wujek J.R.: Intraspinal transplantation of embryonic spinal cord tissue in neonatal and adult rats. *J Comp Neurol* 1986;247:275-96.

Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M.: Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-25.

Richardson P.M., McGuinness U.M., Aguayo A.J.: Peripheral nerve autografts to the rat spinal cord: studies with axonal tracing methods. *Brain Res* 1982;237:147-62.

Richert L., Boulmedais F., Lavalle P., Mutterer J., Ferreux E., Decher G., Schaaf P., Voegel J.C., Picart C.: Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* 2004;5:284-94.

Rivlin A.S., Tator C.H.: Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 1978;10:38-43.

Rochkind S., Shahar A., Amon M., Nevo Z.: Transplantation of embryonal spinal cord nerve cells cultured on biodegradable microcarriers followed by low power laser irradiation for the treatment of traumatic paraplegia in rats. *Neurol Res* 2002;24:355-60.

Rochkind S., Shahar A., Fliss D., El-Ani D., Astachov L., Hayon T., Alon M., Zamostiano R., Ayalon O., Biton I.E., Cohen Y., Halperin R., Schneider D., Oron A., Nevo Z.: Development of a tissue-engineered composite implant for treating traumatic paraplegia in rats. *Eur Spine J* 2006;15:234-45.

Romanic A.M., Madri J.A.: Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain Pathol* 1994;4:145-56.

Saillant G., Pascal-Moussellard H., Langeron O., Lazennec J.Y.: [Spinal cord trauma: epidemiology and pre-hospital management]. *Bull Acad Natl Med* 2005;189:1095-106; discussion 106-7.

Samadikuchaksaraei A.: An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injuries. *J Neuroeng Rehabil* 2007;4:15.

Scarisbrick I.A., Isackson P.J., Ciric B., Windebank A.J., Rodriguez M.: MSP, a trypsin-like serine protease, is abundantly expressed in the human nervous system. *J Comp Neurol* 2001;431:347-61.

Sephel G.C., Burrous B.A., Kleinman H.K.: Laminin neural activity and binding proteins. *Dev Neurosci* 1989;11:313-31.

Setoguchi T., Nakashima K., Takizawa T., Yanagisawa M., Ochiai W., Okabe M., Yone K., Komiya S., Taga T.: Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol* 2004;189:33-44.

Sgouros S., Williams B.: Management and outcome of posttraumatic syringomyelia. *J Neurosurg* 1996;85:197-205.

Shany B., Peretz H., Blinder P., Lichtenfeld Y., Jeger R., Vago R., Baranes D.: Aragonite crystalline biomatrices support astrocytic tissue formation in vitro and in vivo. *Tissue Eng* 2006;12:1763-73.

Shifman M.I., Selzer M.E.: Differential expression of class 3 and 4 semaphorins and netrin in the lamprey spinal cord during regeneration. *J Comp Neurol* 2007;501:631-46.

Schindler M., Ahmed I., Kamal J., Nur E.K.A., Grafe T.H., Young Chung H., Meiners S.: A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture. *Biomaterials* 2005;26:5624-31.

Schneider G.B., English A., Abraham M., Zaharias R., Stanford C., Keller J.: The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials* 2004;25:3023-8.

Schnell E., Klinkhammer K., Balzer S., Brook G., Klee D., Dalton P., Mey J.: Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend. *Biomaterials* 2007;28:3012-25.

Schurig K., Zieris A., Hermann A., Freudenberg U., Heidel S., Grimmer M., Storch A., Werner C.: Neurotropic growth factors and glycosaminoglycan based matrices to induce dopaminergic tissue formation. *Biomaterials* 2015;67:205-13.

Schwab J.M., Brechtel K., Mueller C.A., Failli V., Kaps H.P., Tuli S.K., Schluesener H.J.: Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Prog Neurobiol* 2006;78:91-116.

Schwab M.E.: Increasing plasticity and functional recovery of the lesioned spinal cord. *Prog Brain Res* 2002;137:351-9.

Simmons P.J., Torok-Storb B.: Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78:55-62.

Singer M., Nordlander R.H., Egar M.: Axonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of the newt: the blueprint hypothesis of neuronal pathway patterning. *J Comp Neurol* 1979;185:1-21.

Singh A., Tetreault L., Kalsi-Ryan S., Nouri A., Fehlings M.G.: Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clinical epidemiology* 2014;6:309-31.

Sipski M.L., Pearse D.D.: Methylprednisolone and other confounders to spinal cord injury clinical trials. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2:402-3.

Smetana K., Jr., Sulc J., Krcova Z., Pitrova S.: Intraocular biocompatibility of hydroxyethyl methacrylate and methacrylic acid copolymer/partially hydrolyzed poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *J Biomed Mater Res* 1987;21:1247-53.

Smetana K., Jr., Vacik J., Souckova D., Krcova Z., Sulc J.: The influence of hydrogel functional groups on cell behavior. *J Biomed Mater Res* 1990;24:463-70.

Soliman S., Sant S., Nichol J.W., Khabiry M., Traversa E., Khademhosseini A.: Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density. *Journal of biomedical materials research Part A* 2011;96:566-74.

Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Salagianni M., Baxevanis C.N., Papamichail M.: Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:462-71.

Stendel R., Krischek B., Pietila T.A.: Biodegradable implants in neurosurgery. *Acta Neurochir (Wien)* 2001;143:237-43.

Stocum D.L.: Tissue restoration through regenerative biology and medicine. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2004;176:III-VIII, 1-101, back cover.

Stokes B.T., Jakeman L.B.: Experimental modelling of human spinal cord injury: a model that crosses the species barrier and mimics the spectrum of human cytopathology. *Spinal Cord* 2002;40:101-9.

Stokes B.T., Reier P.J.: Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1992;116:1-12.

Stroemer P., Hope A., Patel S., Pollock K., Sinden J.: Development of a human neural stem cell line for use in recovery from disability after stroke. *Front Biosci* 2008;13:2290-2.

Stroemer P., Patel S., Hope A., Oliveira C., Pollock K., Sinden J.: The neural stem cell line CTX0E03 promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after experimental stroke in a dose-dependent fashion. *Neurorehabil Neural Repair* 2009;23:895-909.

Surkin J., Smith M., Penman A., Currier M., Harkey H.L., 3rd, Chang Y.F.: Spinal cord injury incidence in Mississippi: a capture-recapture approach. *J Trauma* 1998;45:502-4.

Syková E., Jendelová P.: Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* 2006;3:62-7.

Syková E., Jendelova P., Svoboda J., Chvatal A.: Extracellular K⁺, pH, and volume changes in spinal cord of adult rats and during postnatal development. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;70 Suppl:S301-9.

Syková E., Nicholson C.: Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* 2008;88:1277-340.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-72.

Takahashi K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.

Talac R., Friedman J.A., Moore M.J., Lu L., Jabbari E., Windebank A.J., Currier B.L., Yaszemski M.J.: Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials* 2004;25:1505-10.

Taoka Y., Okajima K.: Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998;56:341-58.

Tarnowski M., Sieron A.L.: Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit* 2006;12:RA154-63.

Teijon J.M., Trigo R.M., Garcia O., Blanco M.D.: Cytarabine trapping in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels: drug delivery studies. *Biomaterials* 1997;18:383-8.

Teng Y.D., Lavik E.B., Qu X., Park K.I., Ourednik J., Zurakowski D., Langer R., Snyder E.Y.: Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3024-9.

Thompson F.J., Reier P.J., Uthman B., Mott S., Fessler R.G., Behrman A., Trimble M., Anderson D.K., Wirth E.D., 3rd: Neurophysiological assessment of the feasibility and safety of neural tissue transplantation in patients with syringomyelia. *J Neurotrauma* 2001;18:931-45.

Till J.E., McCulloch E.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-22.

Tiryaki V.M., Ayres V.M., Khan A.A., Ahmed I., Shreiber D.I., Meiners S.: Nanofibrillar scaffolds induce preferential activation of Rho GTPases in cerebral cortical astrocytes. *International journal of nanomedicine* 2012;7:3891-905.

Tresco P.A.: Tissue engineering strategies for nervous system repair. *Prog Brain Res* 2000;128:349-63.

Tsou T.L., Tang S.T., Huang Y.C., Wu J.R., Young J.J., Wang H.J.: Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) wound dressing containing ciprofloxacin and its drug release studies. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:95-100.

Urdziková L., Jendelová P., Glogarová K., Burian M., Hájek M., Syková E.: Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006;23:1379-91.

Urdziková L.M., Ruzicka J., LaBagnara M., Karova K., Kubinová S., Jirakova K., Murali R., Syková E., Jhanwar-Uniyal M., Jendelova P.: Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *International journal of molecular sciences* 2014;15:11275-93.

Vacanti C.A., Paige K.T., Kim W.S., Sakata J., Upton J., Vacanti J.P.: Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg* 1994;29:201-4; discussion 4-5.

van Gorp S., Leerink M., Kakinohana O., Platoshyn O., Santucci C., Galik J., Joosten E.A., Hruska-Plochan M., Goldberg D., Marsala S., Johe K., Ciacci J.D., Marsala M.: Amelioration of motor/sensory dysfunction and spasticity in a rat model of acute lumbar spinal cord injury by human neural stem cell transplantation. *Stem cell research & therapy* 2013;4:57.

van Kooten T.G., Spijker H.T., Busscher H.J.: Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2004;25:1735-47.

Vanický I., Urdzíkova L., Saganova K., Čížková D., Galik J.: A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma* 2001;18:1399-407.

Vannemreddy S.S., Rowed D.W., Bharatwal N.: Posttraumatic syringomyelia: predisposing factors. *Br J Neurosurg* 2002;16:276-83.

Verdu E., Garcia-Alias G., Fores J., Vela J.M., Cuadras J., Lopez-Vales R., Navarro X.: Morphological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* 2003;20:483-99.

Verma P., Fawcett J.: Spinal cord regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005;94:43-66.

Vidal-Sanz M., Bray G.M., Villegas-Perez M.P., Thanos S., Aguayo A.J.: Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 1987;7:2894-909.

Voříšek I., Syková E.: Evolution of anisotropic diffusion in the developing rat corpus callosum. *J Neurophysiol* 1997a;78:912-9.

Voříšek I., Syková E.: Ischemia-induced changes in the extracellular space diffusion parameters, K⁺, and pH in the developing rat cortex and corpus callosum. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997b;17:191-203.

Wallace M.C., Tator C.H., Lewis A.J.: Chronic regenerative changes in the spinal cord after cord compression injury in rats. *Surg Neurol* 1987;27:209-19.

Walsh F.S., Doherty P.: Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:425-56.

Wang S., Cui W., Bei J.: Bulk and surface modifications of polylactide. *Anal Bioanal Chem* 2005;381:547-56.

Westergren H., Farooque M., Olsson Y., Holtz A.: Spinal cord blood flow changes following systemic hypothermia and spinal cord compression injury: an experimental study in the rat using Laser-Doppler flowmetry. *Spinal Cord* 2001;39:74-84.

Wheeler J.C., Woods J.A., Cox M.J., Cantrell R.W., Watkins F.H., Edlich R.F.: Evolution of hydrogel polymers as contact lenses, surface coatings, dressings, and drug delivery systems. *J Long Term Eff Med Implants* 1996;6:207-17.

Widner H., Brundin P., Bjorklund A., Moller E.: Immunological aspects of neural grafting in the mammalian central nervous system. *Prog Brain Res* 1988;78:303-7.

Wichterle O., Lim D., Dreifus M.: [On the problem of contact lenses.]. *Cesk Oftalmol* 1961;17:70-5.

Williard: Clines Operation. Chicago M Exam 1871;XII:585.

Wilson D.H.: Peripheral nerve implants in the spinal cord in experimental animals. *Paraplegia* 1984;22:230-7.

Wirth E.D., 3rd, Reier P.J., Fessler R.G., Thompson F.J., Uthman B., Behrman A., Beard J., Vierck C.J., Anderson D.K.: Feasibility and safety of neural tissue transplantation in patients with syringomyelia. *J Neurotrauma* 2001;18:911-29.

Wittmer C.R., Phelps J.A., Saltzman W.M., Van Tassel P.R.: Fibronectin terminated multilayer films: protein adsorption and cell attachment studies. *Biomaterials* 2007;28:851-60.

Woerly S., Doan V.D., Evans-Martin F., Paramore C.G., Peduzzi J.D.: Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury. *J Neurosci Res* 2001;66:1187-97.

Woerly S., Doan V.D., Sosa N., de Vellis J., Espinosa-Jeffrey A.: Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *J Neurosci Res* 2004;75:262-72.

Woerly S., Lavalley C., Marchand R.: Intracerebral implantation of ionic synthetic hydrogels: effect of polar substrata on astrogliosis and axons. *J Neural Transplant Plast* 1992;3:21-34.

Woerly S., Marchand R., Lavalley C.: Intracerebral implantation of synthetic polymer/biopolymer matrix: a new perspective for brain repair. *Biomaterials* 1990;11:97-107.

Woerly S., Petrov P., Syková 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. *Tissue Eng* 1999;5:467-88.

Woerly S., Pinet E., De Robertis L., Bousmina M., Laroche G., Roitback T., Vargova L., Syková E.: Heterogeneous PHPMA hydrogels for tissue repair and axonal regeneration in the injured spinal cord. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:681-711.

Woerly S., Plant G.W., Harvey A.R.: Cultured rat neuronal and glial cells entrapped within hydrogel polymer matrices: a potential tool for neural tissue replacement. *Neurosci Lett* 1996;205:197-201.

Xu C., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S.: Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. *Tissue Engineering* 2004;10:1160-8.

Xu X.M., Zhang S.X., Li H., Aebischer P., Bunge M.B.: Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisected adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999;11:1723-40.

Yamanaka M., Yanai K., Zama Y., Tsuchiyagaito J., Yoshida M., Ishii A., Hasegawa M.: Cation-tuned stimuli-responsive and optical properties of supramolecular hydrogels. *Chemistry, an Asian journal* 2015;10:1299-303.

Yang L., Jones N.R., Stoodley M.A., Blumbergs P.C., Brown C.J.: Excitotoxic model of post-traumatic syringomyelia in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001;26:1842-9.

Yang L.Y., Huang T.H., Ma L.: Bone marrow stromal cells express neural phenotypes in vitro and migrate in brain after transplantation in vivo. *Biomed Environ Sci* 2006;19:329-35.

Yeziarski R.P., Liu S., Ruenes G.L., Kajander K.J., Brewer K.L.: Excitotoxic spinal cord injury: behavioral and morphological characteristics of a central pain model. *Pain* 1998;75:141-55.

You S.W., Chen B.Y., Liu H.L., Lang B., Xia J.L., Jiao X.Y., Ju G.: Spontaneous recovery of locomotion induced by remaining fibers after spinal cord transection in adult rats. *Restor Neurol Neurosci* 2003;21:39-45.

Yu X., Dillon G.P., Bellamkonda R.B.: A laminin and nerve growth factor-laden three-dimensional scaffold for enhanced neurite extension. *Tissue Eng* 1999;5:291-304.

Zeng J., Xu X., Chen X., Liang Q., Bian X., Yang L., Jing X.: Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2003;92:227-31.

Zhang X., Meng L., Lu Q.: Cell behaviors on polysaccharide-wrapped single-wall carbon nanotubes: a quantitative study of the surface properties of biomimetic nanofibrous scaffolds. *ACS Nano* 2009;3:3200-6.

Zhao L.R., Duan W.M., Reyes M., Keene C.D., Verfaillie C.M., Low W.C.: Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002;174:11-20.

Zhao Y., Hu P., Lu Y.L.: [Biocompatibility of p(3HB-co-3HH) and marrow mesenchymal stem cells]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2004;18:104-7.

Zingale A.: An experimental model to study axonal regeneration of the rat spinal cord*. *J Neurosurg Sci* 1989;33:329-31.

11 Přílohy

č.	Publikace
1	Lesný P, De Croos J, Přádný M, Vacík J, Michálek J, Woerly S, et al. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. Journal of Chemical Neuroanatomy. 2002 May;23(4):243-7.
2	Přádný M, Lesný P, Fiala J, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, et al. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethylmethacrylate. Part 1. Copolymers of 2-hydroxyethylmethacrylate with methacrylic acid. Collection of Czech Chemical Communication. 2002;68:812-22.
3	Přádný M, Lesný P, Vacík J, Šlouf M, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 2: Copolymers with positive and negative charges, polyelectrolyte complexes. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2005;16(8):767-73.
4	Lesný P, Přádný M, Jendelová P, Michálek J, Vacík J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 4: Growth of rat bone marrow stromal cells in three-dimensional hydrogels with positive and negative surface charges and in polyelectrolyte complexes. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2006 Sep;17(9):829-33.
5	Přádný M, Michálek J, Lesný P, Hejčl A, Vacík J, Šlouf M, et al. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 5: Hydrolytically degradable materials. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2006 Dec;17(12):1357-64.
6	Hejčl A, Urdžíková L, Šedý J, Lesný P, Přádný M, Michálek J, et al. Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. J Neurosurg Spine. 2008 Jan;8(1):67-73.
7	Hejčl A., Lesný P., Přádný M., Šedý J., Zámečník J., Jendelová P., Michálek J., Syková E.: Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 6: 3D hydrogels with positive and negative surface charges and polyelectrolyte complexes in spinal cord injury repair. J Mater Sci Mater Med. 2009;20:1571-7.
8	Lesny P., Syková E., Michalek J., Přádný M., Jirsák O., Martinová L.: Biomateriál na bázi nanovlákných vrstev a způsob jeho přípravy. Český patent č. 300805, 2007.