

Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Neurovědy



Mgr. Jana Vallová

Vliv modifikace extracelulární matrix na změnu struktury a regeneraci nervové tkáně
Regeneration and structural changes of the nerve tissue after the extracellular matrix
modification.

Disertační práce

Školitel: MUDr. Lucia Machová Urdzíková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 03. 06. 2022

Jana Vallová

.....
Podpis autora

Poděkování

Chtěla bych poděkovat mé školitelce MUDr. Lucií Máchové Urdzíkové, Ph.D. za vedení mé práce v nejnáročnější době mého studia, dále bývalé školitelce PharmDr. Šárce Kubinové PhD. za vedení mých prvních let ve výzkumu, všem, kteří se podíleli na vypracování publikací a své rodině za trpělivost a podporu.

Vliv modifikace extracelulární matrix na změnu struktury a regeneraci nervové tkáně

Abstrakt

Extracelulární matrix (ECM) je nebuněčná 3D struktura, která se nachází ve všech typech tkání a podílí se nejen na tvorbě struktury a fyzikální podpory tkání, ale aktivně vstupuje do biologických dějů a homeostázy. Modifikace ECM může přispět k změnám plasticity nervové tkáně. Proto je v naší studii použit 4-Methylumbelliferone (4-MU) který narušil strukturu perineuronálních sítí, obklopující některé typy neuronů, které jsou zodpovědné za tvorbu paměťových stop. Myši byly po dobu 6 měsíců krmeny krmivem s příměsí 4-MU (6,7mg/g/den), což zlepšilo jejich paměťové schopnosti, testované v testu spontánní rekognice, bez výraznějšího negativního vlivu na ledviny, játra či klouby. V další části naší studie byl vytvořen biomimetický hydrogel pomocí decelularizace extracelulární matrix derivované z fetální lidské pupečníkové tkáně. Vzhledem k nízké stabilitě vytvořené UC-ECM a její rychlé degradaci byla struktura stabilizována kovalentní genipinovou vazbou (ECM/G). Stabilizace při použití 1mM genipinu zvýšila biologickou stabilitu materiálu. UC-ECM tak jako ECM/G neprokazoval toxicitu v testech *in vitro*, kdy nebyla negativně ovlivněna proliferace mezenchymálních kmenových buněk, axonální pučení nebo růst a diferenciaci nervových kmenových buněk. Biokompatibilita obou materiálů byla *in vivo* ověřována pomocí aplikace materiálu do intrakortikální fototrombotické potkaní léze, kde byla pozorována gelace a infiltrace léze a hydrogelu hostitelskými buňkami po 1 a 14 dnech od aplikace. Závěrem se dá poukázat, že ECM je důležitá struktura nervové tkáně, která má jak vliv na správnou fyziologickou funkci, neuromodulaci a mimo jiného na proces učení, tak také ovlivňuje reparační procesy po zranění nervové tkáně.

Klíčová slova

4-Methylumbelliferone, extracelulární matrix, hydrogel, kolagen, kyselina hyaluronová, neuroplasticita, paměť, perineuronální síť, pupečník

Regeneration and structural changes of the nerve tissue after the extracellular matrix modification.

Abstract

ECM modification may contribute to changes in nerve tissue plasticity. Therefore, 4-methylubulliferone is used in our study, which disrupted the structure of the perineuronal networks surrounding some types of neurons responsible for the formation of memory traces. Mice were fed a 4-MU diet (6.7 mg / g / day) for 6 months, which improved their memory skills in a spontaneous recognition test without a significant adverse effect on the kidneys, liver, or joints. In the next part of the study, an extracellular matrix (UC-ECM) was derived from fetal human umbilical cord tissue also generated as biomimetic hydrogel. Due to the generated UC-ECM's low stability and rapid degradation, the structure was stabilized by covalent genipin bonding. Stabilization with 1 mM genipine increased the biological stability of the material. UC-ECM as well as ECM/G didn't show toxicity *in vitro* in mesenchymal stem cell proliferation; axonal budding or neural stem cell growth and differentiation were not adversely affected. The biocompatibility of both materials was verified *in vivo* by applying the material to an intracortical photothrombotic rat lesion, where gelation and infiltration of the lesion and hydrogel by host cells were observed 1 and 14 days after application. In conclusion, ECM is an essential structure of nervous tissue that affects both proper physiological function, neuromodulation, and among other things, the learning process. Also, it affects repair processes in nerve tissue injury.

Keywords

4-Methylumbelliferone, collagen, extracellular matrix, hyaluronic acid, hydrogel, memory, neuroplasticity, perineuronal nets, umbilical cord

Seznam zkratek

4-MU – 4-Methylumbelliferone

4-OHT – afimoxifen

ACAN – Agrekan

AIS – perineuronální síť kolem počátečního segmentu axonu

AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionová kyselina

B-ECM – extracelulární matrix derivovaná z prasečího mozku

BCAN – brevikan

BRAL2 – link proteiny proteoglykanu

BSA – hovězí sérový albumin

CD10 – antigen akutní lymfoblastické leukémie (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen)

CD14 – klastr diferenciac 14

CD29 – integrin β -1

CD31 – adhezní molekula krevních destiček a endoteliálních buněk

CD34 – klastr diferenciac 34

CD44 – buněčný povrchový glykoprotein podílející se na adhezi

CD45 – protein tyrosin fosfatáza, receptor typu C

CD73 – ekto-5'-nukleotidáza

CD90 – marker Thy-1

CD105 – endoglin

CD133 – prominin 1

cDNA – komplementární DNA

CNS – centrální nervová soustava

CPC – cetylpyridiniumchlorid

CPSG – chondroitinsulfát proteoglykan

CS – chondroitin sulfát

CS-GaG – chondroitin sulfát glykosaminoglykan

CTCF – Calculate the Corrected Total Cell Fluorescence

CTRL1 – link proteiny hyaluronanu

DAPI – 4',6diamidin-2-fenylindol

DMSO – dimetyl sulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DRG – ganglia dorzálních kořenů

ECM – extracelulární matrix

ECM/G – extracelulární matrix zesíťovaná genipinem

ECS – extracelulární prostor

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctovou

EN – entaktin/nidogen

EPHA3 – efrin typu A

FN – fibronectin

GABA – kyselina gama-aminomáselná

GAG – glykosaminoglykan

GF – růstové faktory

GluA1 – glutamátový ionotropický receptor typu 1

gria2 – glutamátový receptor 2

H&E – hematoxilin-eosin

HA – kyselina hyaluronová

HAPLN1 – link protein hyaluronanu

HAPLN4 – link proteiny proteoglykanu

HAS – syntáza kyseliny hyaluronové

hASC – mezenchymální kmenové buňky derivované z lidské tukové tkáně

HLA ABC – lidský leukocytový antigen ABC

HLA-DR – lidský leukocytový antigen vztahující se k oblasti D

hMSC – lidské mezenchymální kmenové buňky

hWJ-MSC – mezenchymální kmenové buňky derivované z pupečníku

hyal – hyaluronidáza

ChABC – chondroitináza ABC

IGg-1 – imunoglobulin G1

LD50 – letální dávka 50

LN – laminin

lyve1 – integrální membránový glykoprotein typu 1

MAP2 – protein asociovaný s mikrotubuly

MMPs – matrix metaloproteinasy

MSC – mesenchymální kmenové buňky

NCAM – molekuly adheze nervových buněk

NCAN – neurokan

NG2 – neuron-gliální antigen -2

NGF – neurální růstový faktor

NPTX2 – neuronální pentraxin 2

NS – nervový systém

NSC – fetální neurální kmenové buňky

OCT – optimal cutting temperature compound

OTX2 – orthodenticle Homeobox 2

PBS – fosfátový pufr

PG – proteoglykany

PNN – preineuronální síť

PNS – periferní nervová soustava

PV – parvalbumin

qPCR – kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce

RPTP β – tyrozinofosfátový receptor

SA – spontánní alternace

SC-ECM – extracelulární matrix derivovaná z prasečí míchy

SOR- -spontánní rozeznávání objektů

spam1 – sperm Adhesion Molecule 1

syp – synaptofisin

tmem2 – transmembránový protein 2

TN – tenascin

UB-ECM – extracelulární matrix derivovaná z prasečího močového měchýře

UC-ECM – extracelulární matrix derivovaná z lidského pupečníku

UDP – uridin difostát

Vcan – versikan

VEGFR 2 - vaskulární endoteliální růstový faktor

VN – vitronektin

WFA – lektin z Wisteria floribunda

WOE – wash out effect

Obsah

1.	Úvod	14
1.1.	Složení nervového systému	14
1.2.	Extracelulární matrix.....	15
1.2.1.	Složení extracelulární matrix	16
1.2.1.1.	Glykosaminoglykany	16
1.2.1.2.	Chondroitinsulfát proteoglykany	17
1.2.1.3.	Nekolagenové glykoproteiny	18
1.3.	Perineuronální síť.....	19
1.3.1.	Složení perineuronálních sítí	20
1.3.2.	Mechanismus účinku PNN	22
1.3.3.	PNN a paměť	24
1.4.	ECM využívaná jako řešení pro opravu poškozené CNS.....	26
1.4.1.	Alogenní a xenogenní ECM transplantáty	26
1.4.2.	Věk dárcovské tkáně jako důležitý faktor pro transplantaci.....	27
1.4.2.1.	Použití neonatální lidské tkáně pro přípravu ECM	27
2.	Cíle práce a hypotézy	29
2.1.	Stanovené hypotézy	29
2.2.	Dílčí cíle práce	30
3.	Materiály a metody.....	31
3.1.	Experimentální zvířata.....	31
3.2.	Sledování účinků 4-MU na myším modelu.....	31
3.2.1.	Behaviorální testy	31
3.2.1.1.	Test spontánní alternace	31
3.2.1.2.	Spontánní rozpoznávání objektů	32
3.2.1.3.	Test rotarodu a test síly úchopu	33
3.2.2.	Zpracování tkání a histologie	34
3.2.2.1.	Imunohistochemické barvení vzorků	34
3.2.2.2.	Imunohistochemická analýza PNNs.....	35
3.2.2.3.	Extrakce a kvantifikace glykosaminoglykanu (GAG).....	35
3.2.2.4.	Analýza genové exprese	36
3.2.3.	Histopatologické hodnocení	37
3.2.4.	Statistická analýza použita při redukci PNN pomocí 4-MU	37
3.3.	Příprava a aplikace hydrogelů na potkaním modelu cerebrální léze	37
3.3.1.	Decelularizace a příprava ECM hydrogelů z pupečníku	37
3.3.2.	Charakterizace hydrogelu ECM	38
3.3.2.1.	Účinnost decelularizace tkáně	38
3.3.2.2.	<i>In vitro</i> charakterizace na buněčné kultuře	39
3.3.2.3.	Injekce hydrogelů UC-ECM do potkaního modelu kortikální fototrombotické léze	43
3.3.3.	Statistická analýza použita při ECM	44
4.	Výsledky a diskuse.....	45
4.1.	Modifikace ECM blokáci syntézy kyseliny hyaluronové	45

4.1.1.	Neinvazivní podání 4-Methylumbelliferonu	45
4.2.	Testování účinků dlouhodobé léčby 4-MU na mozek a jiné orgány	46
4.2.1.	4-MU zlepšilo zachování paměti v behaviorálním testování	46
4.2.2.	4-MU snižuje množství GAG v CNS	48
4.2.3.	Podávání 4-MU zredukovalo množství PNN v oblasti hipokampu	49
4.2.3.1.	Imunohistologická vizualizace PNN pomocí WFA	50
4.2.3.2.	Imunohistologická vizualizace PNN pomocí agrekanu.....	51
4.2.4.	Změny genové exprese sledované pomocí RT-qPCR	54
4.2.5.	Histopatologická analýza vybraných tkání po dlouhodobé léčbě 4-MU.....	57
4.3.	Použití ECM vytvořené z lidských pupečníků ve fototrombotické lézi....	61
4.3.1.	Příprava UC-ECM z lidských pupečníků	62
4.3.2.	Potvrzení buněčné proliferace a podpora neuronového růstu <i>in vitro</i> a biokompatibility <i>in vivo</i> na modelu fototrombotické léze	65
4.3.3.	In vivo hodnocení ECM hydrogelu	69
4.4.	Stabilizace UC-ECM hydrogelů za pomoci síťování genipinem	71
4.4.1.	Buněčná proliferace v přítomnosti genipinu a zesíťovaného ECM/G	73
4.4.2.	Vliv síťování na axonální růst a na růst a diferenciaci nervových kmenových buněk	76
4.4.3.	Ověření biokompatibility ECM a ECM/G <i>in vivo</i> na modelu fototrombotické léze	78
5.	Závěr	80
6.	Souhrn.....	83
7.	Summary	84
8.	Literatura	85
9.	Původní práce, které jsou podkladem disertační práce	100
10.	Publikace autorky, které nemají vztah k disertační práci.....	101

Úvod

1.1. Složení nervového systému

Nervový systém (NS) spolu s endokrinním a imunitním systémem zabezpečují výměnu informací mezi vnitřním a vnějším prostředím a zajišťují homeostázu. NS má funkci příjmu, analýzy a integrace informací z vnitřního a vnějšího prostředí organismu a reakci na změny v těchto podnětech. Stejně důležitá funkce NS je zajišťování paměťových stop, které umožňují rychlejší reakci na podněty, které byly v minulosti rozeznány.

Nervový systém se skládá ze dvou hlavních částí, a to centrálního nervového systému (CNS) a periferního nervového systému (PNS). CNS je tvořen mozkem, který je uložený v lebeční dutině a prodlouženou míchou, nacházející se v míšním kanále. PNS je tvořen nervovými vlákny a neurony v periferních gangliích, pletencích a nervech. Funkcí CNS je integrace různých orgánových systémů a udržování homeostázy pomocí komunikace s vnějším a vnitřním prostředím prostřednictvím PNS.

Stárnutí a poranění nervového systému mají signifikantní dopad na nemocnost jednotlivců a rovněž mají výrazný socioekonomický impakt na společnost, proto se tkáňové inženýrství zaměřuje pomocí nových přístupů a inženýrských metod k obnově funkce nervového systému. Nicméně v oblasti neurální regenerace je třeba řešit různé výzvy. CNS má nižší potenciál k opětovnému růstu ve srovnání s PNS. Mezi faktory bránící regeneraci CNS patří hematoencefalická bariéra, zánět a tvorba gliových jizev. Proto by tyto faktory měly být pečlivě sledovány a zváženy při navrhování inženýrských přístupů k obnově struktury a funkce CNS. PNS vykazuje vyšší míru regenerace v porovnání s CNS, nicméně vytváření neuromů, stejně tak jako poranění dlouhých neurálních segmentů musí být bráno v úvahu jako komplikace.

Nervová tkáň je tvořena dvěma základními typy buněk, neurony a gliovými buňkami a prostor mezi těmito buněčnými typy je vyplněn mezibuněčnou hmotou, zvanou extracelulární matrix. Základní strukturní a funkční jednotkou CNS jsou neurony, což jsou buňky specializované na příjem, vedení a zpracovávání informací. Mají širokou škálu tvarů a velikostí, které se liší v závislosti na jejich funkci. Gliové buňky jsou další buněčnou součástí CNS. Dělí se na buňky, které mají neuroektodermální původ, což jsou makroglie a buňky mezodermálního původu, mikroglie, které migrují do CNS z krevního řečiště.

Typickými zástupci makroglíí jsou astrocyty a oligodendrocyty, avšak řadíme mezi ně i gliové buňky specifických oblastí CNS jako jsou ependymové buňky, Müllerovy buňky sítnice či pinocyty v hypofýze.

Extracelulární prostor (ECS-*extracellular space*) tvoří přibližně 15-20% objemu CNS. Je důležitou komunikační cestou mezi neurony a gliovými buňkami. Kromě iontů a jiných anorganických molekul obsahuje makromolekuly, syntetizované v neuronech a gliových buňkách a jsou označovány jako extracelulární matrix (ECM). Ta je tvořena hlavně glykoproteiny, proteoglykany, glykosaminoglykany a jinými makromolekulami. Iontové prostředí ECM není stálé, závisí na neuronové aktivitě a obsahuje difundující neuroaktivní látky, které se vážou na mimosynaptických vysoce afinitních vazebných místech neuronů, axonů a gliových buněk (difuzní přenos).

Některé molekuly ECM vytvářejí struktury, které obklopují neurony, na které jsou vázány ve formě perineuronálních sítí.

1.2. Extracelulární matrix

Extracelulární matrix (ECM) je komplexní nebuněčná struktura, nacházející se ve všech typech tkání a orgánů, kde netvoří jenom základní fyzikální podpůrnou strukturu pro buňky, ale rovněž iniciuje klíčové biochemické a biomechanické podněty, které jsou nutné pro morfogenezi, diferenciaci, a pro homeostázu tkání. Důležitost ECM je názorně ilustrována širokým spektrem syndromů a poruch, které vyplývají z genetických abnormalit v proteinech ECM a které mohou mít méně závažné až závažné zdravotní důsledky (Järveläinen et al., 2009). ECM jako komplexní síťovitá struktura je produkována buňkami, kde její hlavní složkou jsou polysacharidy a proteiny (Hynes, 2002). Ačkoli se ECM v zásadě skládá z vody, proteinů a polysacharidů, každá tkáň má ECM s jedinečným složením a topologií, která se tvoří během vývoje tkáně prostřednictvím dynamického a recipročního, biochemického a biofyzikálního dialogu mezi různými buněčnými složkami (např. fibroblasty, adipocyty, endoteliální elementy) a vyvíjejícím se buněčným a proteinovým mikroprostředím. Fyzikální, topologické a biochemické složení ECM je skutečně nejen tkáňově specifické, ale je také výrazně heterogenní. Buněčná adheze vůči ECM je zprostředkována receptory ECM, jako jsou integriny, receptory diskoidinových domén a syndekany (Harburger and Calderwood, 2009; Humphries et al., 2006; Leitinger and Hohenester, 2007; Xian et al., 2010).

ECM je za normálních okolností ve stavu dynamické rovnováhy, ale za patologických podmínek nemůže udržet normální produkci nebo degradaci, což má za následek změny ve složení ECM, ovlivňující buněčnou homeostázu a interferenci s normálními fyziologickými funkcemi (Bosman and Stamenkovic, 2003). Adheze podporuje cytoskeletální spojení s ECM a podílí se na migraci buněk přes ECM (Schmidt and Friedl, 2010). Kromě toho je ECM vysoce dynamická struktura, která je neustále remodelována, ať už enzymaticky nebo neenzymaticky a její molekulární složky jsou vystaveny nesčetným posttranslačním modifikacím. Prostřednictvím těchto fyzikálních a biochemických charakteristik ECM generuje biochemické a mechanické vlastnosti každého orgánu, jako je jeho pevnost v tahu a tlaku a elasticita, a také zprostředkovává ochranu pufrací, která udržuje extracelulární homeostázu a zadržování vody. Rovněž ECM řídí základní morfologickou organizaci a fyziologickou funkci vazbou růstových faktorů (GF- *growth factors*) a interaguje s receptory buněčného povrchu, kde vyvolává signální transdukcii a reguluje genovou transkripci. Biochemické, biomechanické, ochranné a organizační vlastnosti ECM se mohou významně lišit od jedné tkáně ke druhé (např. plíce versus kůže versus kost) a dokonce i v rámci jedné tkáně (např. kůra ledvin versus dřevina ledvin), stejně jako od z jednoho fyziologického stavu do druhého (normální versus rakovinný).

1.2.1. Složení extracelulární matrix

ECM se skládá ze dvou hlavních tříd makromolekul: proteoglykanů (PG) a skleroproteinů (Jarvelainen a kol., 2009; Schaefer a Schaefer, 2010). Řada makromolekul, které tvoří ECM mohou být řazena do čtyř kategorií: kolageny, glykosaminoglykany (GAGs), nekolagenové glykoproteiny a elastin. Kolagen je fibrózní protein složený ze tří polypeptidových řetězců, které tvoří triple helix a je nejvíc zastoupený v ECM. Kolagen může být kategorizován do sedmi typů s ohledem na jeho strukturu, funkci a distribuci, jmenovitě: fibrilární kolagen, retikulární kolagen, mikrofilamentární kolagen, kolageny tvořící ukotvující fibrily, FACIT kolagen (*Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices*), transmembránový kolagen a neklasifikovaný kolagen (Rozario and DeSimone, 2010).

1.2.1.1. Glykosaminoglykany

GAGs jsou nerozvětvené dlouhé řetězce polysacharidů tvořeny opakujícími se disacharidovými jednotkami, obsahující kyselinu hyaluronovou (HA), chondroitin sulfát (CS), heparan sulfát (HS) a dermatan sulfát (DS). HA je nesulfonovaný GAG s dlouhým

cukrovým řetězem (Bignami et al., 1993). CS a HS mají rozdílnou sulfonaci a opakující se disacharidové jednotky. CS je polysacharid tvořen řetězcem pravidelně se opakujících monomerů kyseliny glukuronové a N-acetylgalaktosaminem, zatímco HS tvoří kyselina glukuronová spojená s N-acetylglukosaminem (Zhang, 2010).

Proteiny kombinované s řetězcí GAG se nazývají proteoglykany.

1.2.1.2. Chondroitinsulfát proteoglykany

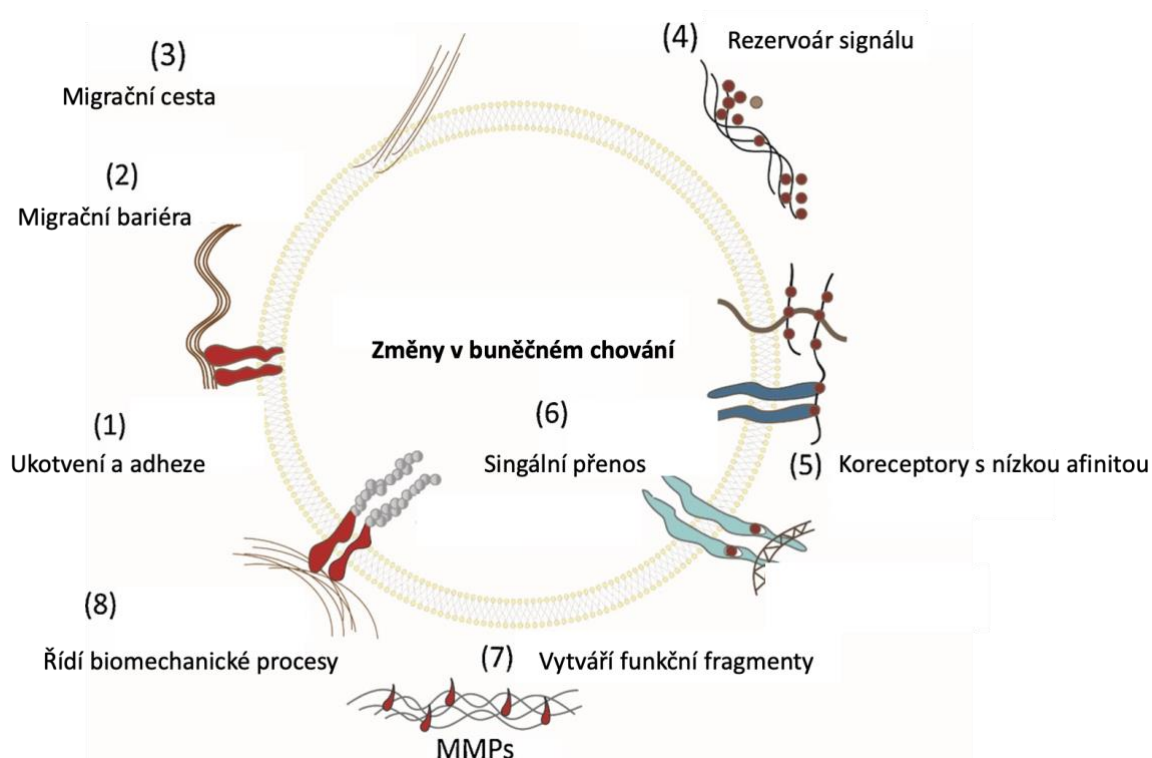
Chondroitinsulfát proteoglykany (CSPG) jsou rodina velkých molekul extracelulární matrix, složených z centrálního jádrového proteinu, ke kterému je připojen různý počet glykosaminoglykanových (GAGs) postranních řetězců. Jsou exprimovány všude v CNS a mají zásadní roli ve vývoji CNS, plasticitě a poúrazové regeneraci. Během vývoje CSPG působí jako vodící element, který je důležitý pro modelování buněčné migrace a axonálního růstu (Laabs et al., 2005). V dospělosti CSPG stabilizují synaptická spojení a zabraňují aberantnímu axonálnímu pučení (Busch and Silver, 2007; Dow and Wang, 1998; Galtrey et al., 2008; Laabs et al., 2005). Jejich exprese je vysoce zvýšená po poranění míchy (SCI) a ukládání CSPG přispívá k vytvoření gliové jizvy, která působí jako chemická i mechanická bariéra. (Galtrey et al., 2008; Laabs et al., 2005; Profyris et al., 2004; Silver and Miller, 2004; Yiu and He, 2006).

Vytvoření gliové jizvy se vysvětluje jako pokus CNS odizolovat místo poškození od zdravé tkáně, čímž se nepoškozená tkáň uchrání před sekundární patologií (Fawcett and Asher, 1999; Profyris et al., 2004). Bohužel přítomnost CSPG rovněž vytváří prostředí vysoce inhibiční pro axonální regeneraci, což má za následek inhibici prorůstání axonů tím snížení axonální regenerace v CNS (Galtrey and Fawcett, 2007; Yiu and He, 2006) a inhibiční vlastnosti CSPG na axonálním růstu byly dobře zdokumentovány (Friedlander et al., 1994). CSPG lze obecně rozdělit na rodinu lektikanů (agrekan, brevikan, neurokan a versikan), rodinu proteinových tyrozinofosfátových receptorů (RPTP β), rodinu malých proteoglykanů bohatých na leucin (dekorin a biglykan) a Neuron-gliální antigen -2 (NG2) (Bartus et al., 2012). Mnohočetné funkce CSPG závisí na různém jádrovém proteinu, počtu chondroitin sulfátu a sulfataci řetězců GAGs (Pu et al., 2018).

1.2.1.3. Nekolagenové glykoproteiny

Nekolagenové glykoproteiny jsou multifunkční spojovací proteiny kromě kolagenu, které obsahují více vazebných míst pro různé struktury, což vede k jejich strukturní složitosti a heterogenitě. Jejich domény mají vazebná místa pro kolagen, heparin, růstový faktor a cytokiny. Bylo popsáno více než deset typů glykoproteinů, včetně fibronektinu (FN), lamininu (LN), tenascin (TN), entaktinu/nidogenu (EN), vitronektinu (VN), reelinu atd. FN je proteinový dimer obsahující dva monomerní řetězce spojené párem disulfidových vazeb. Každý monomer se skládá ze tří typů opakujících se jednotek (nazývaných FN repetice): typ I, typ II a typ III (Potts and Campbell, 1996; Zollinger and Smith, 2017).

LN se skládá z řetězců α , β a γ . V lidském genomu bylo navrženo 5 genů kódujících α , 3 geny kódující β , 3 geny kódující γ podjednotku a 16 heterotrimerních tvarů LN (Aumailley, 2013). Rodina TN u obratlovců má čtyři členy, jmenovitě TN-C, -R, -W a -X (Jones and Jones, 2000). Rovněž je v ECM různých soustav přítomen elastin, kteří se vyskytuje hlavně ve vazech a cévních stěnách (Mak et al., 2012).



Obr. 1 Funkce ECM (1) Ukotvení a adheze (2) Migrační bariéra (3) Migrační cesta (4) Rezervoár signálu (5) Koreceptory s nízkou afinitou (6) Přenos signálu (7) Vytváří funkční fragmenty (8) Řídí biomechanické procesy. (Su et al., 2021)

1.3. Perineuronální síť

Jak bylo popsáno výše, ECM může formovat jako difúzní tak i kondenzovanou formu sítě, těsně obklopující buňky a hraje důležitou roli ve vývoji neuronů, plasticitě a patofyziologii. (Miyata and Kitagawa, 2017).

Nejčastější formou kondenzované ECM v centrálním nervovém systému (CNS) jsou perineuronální síť (PNN), které obklopují tělo a proximální dendrity různých neuronálních subpopulací.

Perineuronální síť (PNN) poprvé pozoroval Camillo Golgi, který popsal struktury jako „jemný obal, převážně retikulární struktury, který obklopuje buněčné tělo nervových buněk, až arborizace druhého a třetího řádu“ (Golgi, 1898). PNN jsou struktury pericelulární kondenzované extracelulární matrix (ECM), které obklopují soma a proximální a střední dendrity neuronů, často se rozšiřují tak, že zahrnují počáteční segment axonu. Synapse, které narážejí na neurony v těchto oblastech, jsou obklopeny a zabudovány do PNN (Blosa et al., 2013; Vo et al., 2013).

Téměř všechny části CNS savců obsahují buňky s PNN. V oblastech, ve kterých se nacházejí, obklopují PNN různé typy neuronů a mají podobnou distribuci napříč různými druhy savců (Brückner et al., 1996). V mozku jsou ve většině obklopené PNN inhibiční interneurony, zatímco v míše je nimi obklopená velká část neuronů nacházejících se ve ventrálních a středních rozích – včetně mnoha motorických neuronů. V dorzálních rozích jsou bez PNN pouze neurony s buněčnými těly ve dvou dorzálních vrstvách (včetně *substantia gelatinosa*) (Galtrey et al., 2008; Hendry et al., 1988, 1984; Jäger et al., 2013; Köppe et al., 1997; Seeger et al., 1994; Zaremba et al., 1990).

V mozkové kůře jsou PNN spojeny zejména s rychle se spouštějícími (*fast-speaking*) GABAergními interneurony exprimujícími parvalbumin (PV+); některé pyramidové buňky v hlubších kortikálních vrstvách jsou však také obklopeny PNN (Matthews et al., 2002) a složení PNN se v rámci kortikálních oblastí i mezi nimi liší (Dauth et al., 2016). V různých jiných oblastech mozku, včetně amygdaly a oblasti CA2 hippocampu, obklopují PNN excitační i inhibiční neurony (Morikawa et al., 2017). Většina PNN mohou vázat lektin *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA), který je široce používán jako PNN marker v histologických analýzách. Ve velké části literatury se skutečně předpokládá, že všechny PNN jsou obarveny WFA. Je důležité ale poznamenat, že existují také WFA-negativní PNN. Například PNN, které obklopují kortikální výstupní neurony, nevážou WFA a místo toho jsou rozpoznávány agrekanovými protilátkami (Matthews et al., 2002). Experimenty na

míše, zkoumající pahýly, které zůstaly po chondroitinázovém štěpení PNN, odhalily existenci více PNN, než bylo prokázáno barvením WFA (Galtrey et al., 2008; Matthews et al., 2002). Pro jednoduchost zde však používáme termín „PNN“ pro označení těch struktur, které jsou obarveny WFA, pokud není uvedeno jinak.

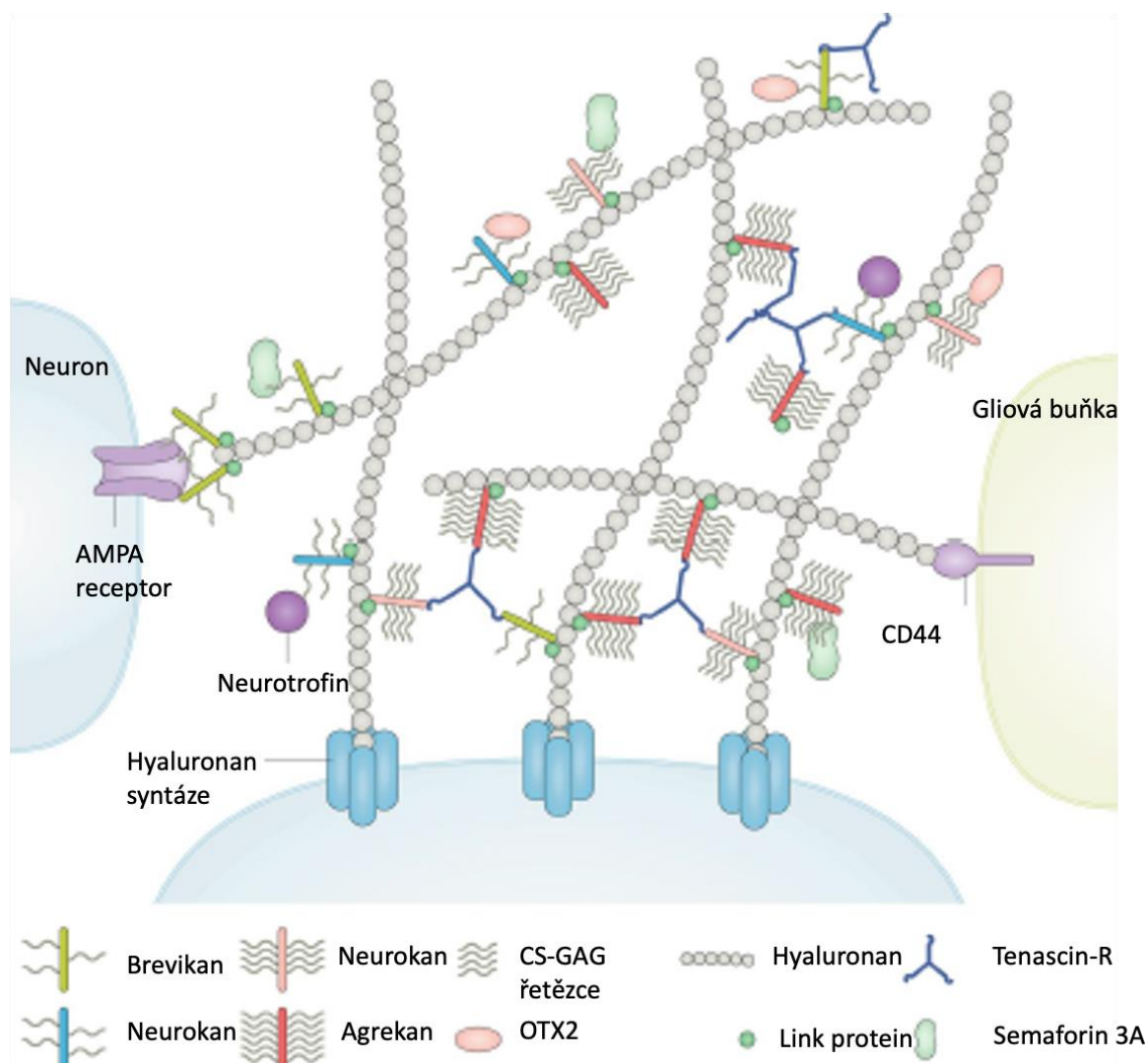
Kondenzovaná struktura ECM se složením podobným PNN se nachází téměř ve všech Ranvierových uzlech v CNS savců, kde uzavírá perinodální prostor obalem matrix podobné PNN. Umístění těchto struktur, které se shoduje s polohou, ve které se regenerují akční potenciály (Rasband, 2010), vedlo k domněnce, že se podílejí na modulaci iontových dějů během vedení axonů (Oohashi et al., 2002). Toto specializované ECM zde nazýváme „perinodální ECM“. Kromě PNN a perinodální ECM jsou synapse CNS obklopeny difuzní perisynaptickou matrix. Molekuly přítomné v této matrix se účastní synaptogeneze a plasticity a jsou často modulovány působením matricových metaloproteináz (MMPs) (Ferrer-Ferrer and Dityatev, 2018; Tsilibary et al., 2014).

K dnešnímu dni se mnoho studií PNN zaměřilo na jejich roli v plasticitě a zotavení po poškození nervového systému; v poslední době se však ukázalo, že PNN mají nesčetné množství účinků v mnoha různých funkcích CNS, včetně paměti, psychiatrických onemocnění, drogové závislosti a neurodegenerace (Sorg et al., 2016)

1.3.1. Složení perineuronálních sítí

PNN v podstatě sestává z hlavního řetězce složeného z glykosaminoglykanu (GAG) hyaluronanu, na který jsou vázány CSPG. Matrix je stabilizována vazebnými proteiny a tenascin-R doplňuje strukturu (Kwok et al., 2015; Oohashi et al., 2015). Složení PNN je poněkud proměnlivé; nicméně mechanismus, kterým se tvoří nejběžnější typy PNN, je obecně dobře znám. Mnoho složek PNN je exprimováno již v embryonálních stádiích vývoje, zejména hyaluronan a některé CSPG. V kortexu jsou vazebné proteiny PNN a agrekan a brevikan upregulovány později, v době tvorby PNN (Gao et al., 2018). K tvorbě PNN dochází jako k jednomu z posledních aktů neurálního vývoje, který se shoduje s uzavřením kritických období pro plasticitu. U myši a potkanů začíná kolem postnatálního dne 23 a trvá 10 dní. U lidí začíná ve 2 letech a ukončuje se v 8 letech (Carulli et al., 2010; Oohashi et al., 2015; Rogers et al., 2018). Agrekan a link proteiny hyaluronanu a proteoglykanu (HAPLN1; také známy jako CRTLN1) a/nebo HAPLN4 (také známy jako BRAL2) jsou exprimovány neurony nesoucími PNN, zatímco některé další složky PNN,

jako jsou tenascin- R a neurokan jsou exprimovány jak neurony, tak gliovými buňkami (Galtrey et al., 2008).



Obr. 2 Klíčové komponenty tvořící PNN (Fawcett et al., 2019)

Klíčové komponenty perineuronálních sítí – tedy ty, které jsou nezbytné pro jejich strukturu a funkci – jsou členy lektikanové rodiny chondroitin sulfátových proteoglykanů (CSPG; viz obrázek). CSPG agrekan je hlavní složka všech PNN a tři další CSPG (neurokan, versikan a brevikan) jsou přítomny v mnoha PNN v různé míře (Dauth et al., 2016; Miyata et al., 2018; Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). Z nich je brevikan zvláště koncentrován kolem perisynaptických oblastí excitačních terminálů košíkových buněk (Favuzzi et al., 2017). Vlastnosti PNN s různým složením CSPG byly málo studovány, i když je známo, že brevikan má specifické účinky (Brakebusch et al., 2002; Favuzzi et al., 2017).

Ačkoli se PNN liší ve složení v rámci oblastí mozku i mezi nimi (Dauth et al., 2016) pro všechny PNN platí některé obecné strukturální principy. PNN mají strukturu terciálního komplexu ne nepodobnou struktuře chrupavky, sestávající z páteře z hyaluronanu (produkovaného neuronálním buněčným povrchovým enzymem hyaluronan syntázou přítomným v membráně neuronů nesoucích PNN), na kterou se lektikany vážou prostřednictvím své spojovací domény, jak je ukázáno na obrázku. Glykoprotein tenascin-R spojuje lektikany mezi sebou (Yamaguchi, 2000). Link proteiny (včetně hyaluronanového a proteoglykanového link proteinu 1 (HaPLN1) a HaPLN4) jsou nezbytné pro stabilizaci vazby CSPG-hyaluronan (Carulli et al., 2010). Z lektikanů je známo, že brevikan má specifické role na synapsích a silně interaguje s tenascinem-R a HaPLN4 (Aspberg et al., 1997; Bekku et al., 2012, 2003; Hagihara et al., 1999). K CSPG jádrovým proteinům jsou připojené chondroitin sulfátové glykosaminoglykanové (CS-GAG) řetězce, kde se opakují disacharidy, které mohou být sulfatovány v polohách 4 nebo 6 nebo disulfatovány v polohách 4, 6 a 2, 6. Právě přidání těchto sulfoskupin dává řetězcům CS-GAG jejich nábojovou strukturu a vazebné vlastnosti (Kwok et al., 2015; Miyata and Kitagawa, 2017). Kromě toho se mnoho molekul (včetně neurotrofinů, semaforinu 3a a transkripčního faktoru OTX2) váže na řetězec CS-GAG, což jim umožňuje být prezentovány synapsím a dalším procesům v okolitě CNS a asociovat se s iontovými kanály. Aglutininový (WFA) lektin z *Wisteria floribunda* se váže na neidentifikovaný sulfatační motiv v řetězcích CS-GAG většiny PNN, WFA-negativní PNN se však nacházejí v kůře, míše a jinde (Galtrey et al., 2008; Matthews et al., 2002). V CNS se nacházejí tři další formy kondenzované ECM: PNN kolem počátečního segmentu axonu (AIS), perinodální ECM a axonální povlaky. AIS PNN (Brückner et al., 2006; John et al., 2006) má v podstatě stejné složení jako PNN. Obsahuje CSPG agrekan, brevikan (rekrutovaný neurofascinem) (Frischknecht et al., 2009; Hedstrom et al., 2007)) a neurokan, hyaluronan a tenascin-R. Axonální povlaky obsahují agrekan a brevikan a obklopují inhibiční presynaptické vstupy do různých typů neuronů (Brückner et al., 2008).

1.3.2. Mechanismus účinku PNN

Manipulace s PNN může mít vliv na synapse, plasticitu, paměť, chování a psychiatrické stavy (Sorg et al., 2016). Efekt PNN je většinou zprostředkován pomocí jejich CSPG. Pouze 2 % celkových CSPG v nervovém systému se nacházejí v PNN, zatímco zbývajících 98 % je přítomno v difúzní matrix (Deepa et al., 2006). Většina intervencí navržených k odstranění

funkce PNN, například ty, které využívaly trávení CSPG pomocí chondroitinázy ABC (ChABC), proto ovlivňují jak difuzní ECM tak PNN. Nicméně, *knockouty* vazebných proteinů, agrekanu nebo tenascin-R u transgenních myší, postihují převážně PNN, kde je situována většina těchto molekul (Brückner et al., 2000; Carulli et al., 2010; Rowlands et al., 2018). Obecně platí, že proteoglykany (včetně CSPG) uplatňují své účinky buď přímým působením na receptory, nebo častěji přitahováním a lokalizací efektorových molekul na místa, kde mohou interagovat s lokálními receptory nebo působit jako součást tripartitního receptoru-ligand-GAG komplexu. Vazebné vlastnosti a interakce řetězců CS-GAG jsou určeny motivy náboje, které jsou produktem jejich vzoru sulfatace (Gama et al., 2006; Mikami et al., 2009; Mikami and Kitagawa, 2013; Sugahara and Mikami, 2007). CS-GAG, které jsou přítomné v PNN, mají sulfatační vzorec, který se liší od difuzního ECM, který dává PNN specifické vazebné vlastnosti (Deepa et al., 2006). Vysoký lokální náboj kondenzovaných CSPG v PNN poskytuje silné vazebné místo pro molekuly a efekторы spojené s PNN a může také ovlivnit třídění iontů (Frischknecht et al., 2009). Byla popsána řada přímých interakcí s CSPG přítomnými v PNN. Brevican, spolu s dalšími CSPG, interaguje s AMPA receptory a draslíkovými kanály. Mobilita těchto membránových proteinů je omezena přítomností molekul ECM a štěpení nebo odstranění specifických složek PNN může ovlivnit krátkodobou synaptickou plasticitu a funkci excitačních spojení na interneurony PV+ (Favuzzi et al., 2017; Frischknecht et al., 2009). Zdá se, že trávení brevikanu nebo hyaluronanu ovlivňuje draslíkové kanály. Mobilita těchto membránových proteinů je omezena přítomností molekul ECM a štěpení nebo odstranění specifických složek PNN může ovlivnit krátkodobou synaptickou plasticitu a funkci excitačních spojení na interneurony PV+. Zdá se, že štěpení brevikanu nebo hyaluronanu ovlivňuje pohyb AMPA receptorů mezi synaptickými a extrasynaptickými doménami pomocí přerušení interakce mezi brevikanem a GluA1 podjednotkou AMPA receptoru. Tento účinek byl však pozorován v jedné studii PV+ interneuronů (Favuzzi et al., 2017) ale v jiné chyběl (Klueva et al., 2014). Další CSPG, neurokan, ovlivňuje vazbu molekuly adheze nervových buněk (NCAM) a receptoru efrinu typu A 3 (EPHA3) na perisomatické synapse (Sullivan et al., 2018). Konečně další možné spojení mezi matricí PNN a receptory AMPA je prostřednictvím pentraxinů, které působí jako molekuly lešení ECM v PNN (Xu et al., 2003). Jeden člen této rodiny, neuronální pentraxin 2 (NPTX2), je vylučován z presynaptických zakončení ovlivňující neurony obklopené PNN. Váže se na PNN a ovlivňuje AMPA receptory a následně synaptické škálování a plasticitu (Chang et al., 2010; Lee et al., 2017; Xu et al., 2003).

Obecně se ukázalo, že PNN jsou zodpovědné za synaptickou stabilizaci a shlukování receptorů, což v konečném důsledku omezuje plasticitu (Fawcett et al., 2019; Frischknecht et al., 2009; Pyka et al., 2011). Rovněž se prokázalo se, že PNN přispívají k mnoha fyziologickým mozkovým funkcím, včetně učení a paměti, a jsou zapojeny do mnoha poruch nebo patologií, jako jsou zotavení z poranění míchy, schizofrenie, neurodegenerativní onemocnění, epilepsie, autismus a drogová závislost (Sorg et al., 2016; Pantazopoulos a Berretta, 2016; Bozzelli et al., 2018). Další experimenty postupně prokázaly, že manipulace nebo narušení PNN reaktivuje neuroplasticitu a zlepšuje učení a paměť související se stárnutím nebo neurologickými chorobami, jako je Alzheimerova choroba (Duncan et al., 2019). Bylo vyvinuto několik přístupů pro manipulaci nebo odstranění PNN za účelem zvýšení neuroplasticity, paměti a opravy CNS. Patří mezi ně enzymatická degradace molekul ECM (Howell and Gottschall, 2012; Kwok et al., 2008; Romberg et al., 2013), protilátky blokující inhibiční účinek PNN (Yang et al., 2017) nebo genetické modifikace, jako jsou modely s genovou delecí různých složek PNN (Carulli et al., 2010; Romberg et al., 2013). Přirozené behaviorální změny mohou také modifikovat PNN u hlodavců: obohacené prostředí snižuje počet neuronů obklopených PNN ve vizuálním systému a mozečku (Foscarin et al., 2011; Sale et al., 2007), získání paměti sluchového strachu (*fear memory*) zvyšuje hladiny PNN a CSPG mRNA v kůře (Banerjee et al., 2017), vestibulární kompenzace snižuje počty PNN v vestibulární jádrech (Faralli et al., 2016) a učení snižuje množství brevikanu v hipokampu (Favuzzi and Rico, 2018). Experimentální odstranění PNN má různé další účinky na neuronální fyziologii. Například bylo zjištěno, že enzymatické štěpení CSPGs ve zrakové kůře dospělých myší mění rovnováhu mezi inhibicí a excitací snížením inhibiční aktivity, což způsobí, že se neuronální spojení vrátí do nezralého juvenilního stavu (Lensjø et al., 2017). Jak odstranění vazebných proteinů z CNS u transgenních myší (ovlivňující PNN), tak léčba ChABC (která ovlivňuje PNN i difuzní matrix) mají účinky jak na LTP, tak na dlouhodobou depresi (LTD) v perirhinálním kortexu. Tyto změny jsou spájené s vylepšením paměti pro rozpoznávání objektů (Griffiths et al., 2008; Massey et al., 2008; Romberg et al., 2013).

1.3.3. PNN a paměť

Vzhledem k tomu, že paměť je formou plasticity, která se opírá o krátkodobé a dlouhodobé synaptické změny, je role ECM v této kognitivní funkci velice zajímavá. V paradigmatu podmiňování strachu, který závisí na aktivitě v amygdale (ve které je mnoho neuronů

obklopeno PNN), injekce ChABC do amygdaly zvýšily ztrátu paměti. Toto umožnilo vymazat paměť strachu (*fear memory*) u dospělých myší, což je efekt plasticity „neučení“, který je obvykle možný pouze u mladých myší (Gogolla et al., 2009). Podobně podávání ChABC do sluchové kůry myší inhibovalo podmiňování „sluchového strachu“ a injekce ChABC do sekundární zrakové kůry ovlivnila dlouhodobé vzpomínání na podmiňování „zrakového strachu“ (Thompson et al., 2018). Tyto studie naznačují, že schopnost odnaučit se stresovým vzpomínkám, která je obvykle spojována s mladými zvířaty, může být dospělým obnovena trávením CS-GAG, pravděpodobně prostřednictvím modifikace PNN. Odstranění PNN může také ovlivnit některé formy rozpoznávací paměti. Například v experimentu, ve kterém jsou pískomilové trénování, aby rozlišovali mezi frekvenčně modulovanými tóny. Po odstranění PNN v sluchové kůře byla schopnost dospělých zvířat (která se v tomto paradigmatu obvykle učí pomalu) znovu se učit nové tóny a přitom nevymazávat zavedené vzpomínky, na úrovni mladých zvířat (Happel et al., 2014). Dalším velmi používaným modelem získávání a uchovávání paměti je paměť pro rozpoznávání objektů (*NOR-novel object recognition memory*). U myší po krátké expozici předmětu tato forma paměti degraduje během 12 hodin. U zvířat postrádajících PNN v perirhinální kůře (buď kvůli lokální injekci ChABC nebo kvůli nedostatku HAPLN1 nebo agrekanu) bylo získávání paměti normální, ale retence paměti byla výrazně prodloužena na více než 48 hodin (Romberg et al., 2013; Sorg et al., 2016). Myši s knockoutem tenascin-R také vykazují změny v hipokampální paměti, včetně rychlejšího reverzního učení, zlepšené pracovní paměti a zvýšené reaktivity na nové podněty (Morellini et al., 2010). Zdá se tedy, že modifikace PNN činí paměti snadněji modifikovatelné a silnější.

Zajímavým nedávným návrhem je, že PNN by mohly poskytnout stabilní strukturu pro umístění synapsí a poskytnout tak šablonu pro dlouhodobé paměti (Tsien, 2013). Myšlenka, že by mohl existovat stabilní mechanismus ukládání paměti nezávislý na metabolismu, který může zůstat na místě, aby umožnil synapsím vrátit se na stejné místo (a tedy zachovat paměť) po epizodách, které způsobují synaptické stažení, jako je ischemie nebo hibernace, je jistě atraktivní. Současné důkazy však jasně ukazují, že PNN nemohou být jediným mechanismem takového kódování paměti, protože několik forem paměti zůstává nedotčeno a je dokonce prodlouženo po degradaci CSPG chondroitinázou nebo hyaluronidázou (Gogolla et al., 2009; Happel et al., 2014; Romberg et al., 2013; Slaker et al., 2015).

1.4. ECM využívaná jako lešení pro opravu poškozené CNS

Omezená reparační kapacita centrálního nervového systému (CNS) je značnou lékařskou výzvou, protože v současné době neexistuje žádná dostupná léčba, která by umožnila obnovu poškozených spojení. Slibné alternativy pro rekonstrukci struktur nervové tkáně nabízejí různé biomateriály vyvinuté k aktivaci endogenních obnovovacích mechanismů a/nebo k poskytnutí strukturální a biochemické podpory pro připojení transplantovaných buněk. (Kubinova, 2017; Kubinová and Syková, 2012; Saldin et al., 2017)

Na rozdíl od uměle navržených materiálů tkáňového inženýrství, které nedokážou napodobit komplexní strukturu a chemii buněčného mikroprostředí pozorované *in vivo*, biologické lešení obsahující nativní extracelulární matrix (ECM) představují struktury velmi podobné strukturám neporaněné hostitelské tkáně s mnohými výhodami, jako je komplexní přírodní složení, trojrozměrná struktura, retence růstových faktorů a bioaktivní vlastnosti, včetně stimulace angiogeneze a migrace endogenních progenitorových buněk nebo modulace imunitní reakce. (Crapo et al., 2011). Tyto jedinečné vlastnosti lešení ECM zajišťují funkční remodelaci postižené oblasti, což je na rozdíl od tvorby zjizvené tkáně, která obvykle probíhá při standardním hojení (Badylak, 2002)

Biologické ECM *scaffoldy* byly použity pro rekonstrukci mnoha tkání, včetně myokardu (Wang and Christman, 2016) kosterních svalů (Agrawal et al., 2009), šlach a vazů (Badylak et al., 1999; Zantop et al., 2006), plic (Petersen, 2010), močových cest (Dedecker et al., 2005; Wood et al., 2005), jícnu (Badylak et al., 2005), periferního nervu (Karabekmez et al., 2009) nebo tvrdé pleny mozkové (Bejjani et al., 2007) a již byly použity pro léčbu mnoha pacientů s tolerovatelnými tkáňovými odpověďmi a pozitivními klinickými výsledky (Parmaksiz et al., 2016).

1.4.1. Alogenní a xenogenní ECM transplantáty

Alogenní i xenogenní biologické ECM materiály jsou v současné době transplantovány za účelem náhrady tkání a orgánů. Jako xenoimplantáty se běžně používají ECM od savců neprimátů (typicky prasat), což může být spojeno s nepříznivými zánětlivými reakcemi hostitelské tkáně v důsledku lidské imunitní odpovědi proti savčí ECM pomocí anti-Gal a anti-nonGal protilátek (Galili, 2015). I když se zdá, že role gal-specifických protilátek v xenogenní implantaci ECM je minimální (Badylak and Gilbert, 2008; Raeder et al., 2002)

biomateriály pocházející z člověka by mohly být více žádoucí, protože se vyhýbají obavám souvisejícím s potenciálními imunitními reakcemi a také přenosem xenogenních nemocí. Kromě xenogenní ECM se běžně připravují acelulární aloštiny lidského původu z mrtvol a používají se například jako kostní, chlopňové, rohovkové nebo kožní štiny (Taylor, 2009).

1.4.2. Věk dárcovské tkáně jako důležitý faktor pro transplantaci

Je pozoruhodné, že věk dárcovské tkáně je důležitým parametrem, který způsobuje významné rozdíly mezi vlastnostmi ECM získané ze stejného zdroje. Ukázalo se, že s věkem narůstá zesíťování ECM v důsledku neenzymatické glykace proteinů (Semba et al., 2010) a ukládání tukové tkáně a fibrózy, zatímco biologické materiály pocházející z mladších zvířat jsou spojeny s konstruktivnější tkání vhodnou pro dané místo. (Sicari et al., 2012; Tottey et al., 2011). Na druhé straně se kadaverózní tkáně mohou lišit věkem lidských dárců a předpokládá se, že jsou podstatně starší než prasečí zdroje. Například srovnání zdrojů lidské a prasečí tkáně pro injikovatelný hydrogel matrice myokardu odhalilo, že navzdory podobnosti těchto matrix existuje zvýšená obtížnost zpracování lidské tkáně a významná variabilita mezi pacienty (Johnson et al., 2014). Na rozdíl od dospělé tkáně obsahuje ECM z fetální nebo neonatální tkáně více nezralého kolagenu s několika příčnými vazbami, což podporuje efektivnější remodelaci tkáně (Badylak, 2014; Freytes et al., 2008; Kurtz and Oh, 2012). Je proto možné, že ECM odvozená z fetální nebo neonatální tkáně by vyvolala účinnější a konstruktivní remodelaci tkáně než ECM odvozená z dospělých nebo starých tkání.

1.4.2.1. Použití neonatální lidské tkáně pro přípravu ECM

V tomto kontextu představuje lidský pupečník (UC- *umbilical cord*) vhodný zdroj neonatální tkáně, který je snadno dostupný v dostatečném množství bez jakýchkoli etických omezení. Za zmínku stojí, že UC se běžně používá v regenerativní medicíně pro izolaci mezenchymálních kmenových buněk (MSC) a endoteliálních buněk a může také sloužit jako zdroj pro izolaci kyseliny hyaluronové. Protože jde o extraembryonální tkáň, odstraňuje překážky související s věkem, jako je remodelace ECM, fibróza, oxidační stres a další negativní změny (Kurtz and Oh, 2012). Jako řešení pro opravu nervové tkáně byly injikovatelné gelující hydrogely *in situ* považovány za vhodnější než vláknité ECM, protože tyto materiály se mohou snadno přizpůsobit nepravidelnosti léze s minimálním poškozením

tkáně během aplikace. Za účelem vytvoření injekčních hydrogelů lze ECM z různých decelularizovaných tkání enzymaticky solubilizovat do kapalné formy, která se za fyziologického pH a teploty sama sestaví do formy hydrogelu (Badylak et al., 2005; DeQuach et al., 2010; Okada et al., 2010). Dříve popsané injekční hydrogely ECM připravené decelularizací prasečího mozku (B-ECM), míchy (SC-ECM) a prasečího močového měchýře (UB-ECM) odhalily *in vitro* neurotrofické vlastnosti v prostředí po injekci do experimentálně vyvolané dutiny po mrtvici (Ghuman et al., 2016) nebo poranění míchy (Tukmachev et al., 2016) *in vivo*.

2. Cíle práce a hypotézy

Poslední léta výzkumu jasně ukazují, že ECM je nejenže stabilizační struktura pro nervový systém, ale aktivně se podílí i na neuromodulačních dějích, plasticitě CNS a v aktivaci i inhibici různých drah. Ovlivnění perineuronálních sítí už v minulosti prokázalo zlepšení paměťových stop a návrat schopností modulace paměti do juvenilních stádií.

V této studii jsme použili inhibitor vzniku hyaluronanu (4-methylumbilliferon) podávaný perorálně a sledovali jeho vlivy na modulaci paměti.

Rovněž bylo zjištěno, že materiály a hydrogely vytvořené z ECM jsou schopné ovlivňovat regeneraci tkání, kvůli jejich biomimetičnosti, trojrozměrné struktuře a biologické aktivitě jejich molekul, které mohou aktivně působit v místě poranění podpůrně, chemotakticky a protizánětlivě. Proto jsme vyvinuly materiály derivované z lidské neonatální lidské tkáně pupečníku, jejichž vlastnosti jsme ověřovali jak *in vitro* na různých buněčných liniích, tak *in vivo* na modelu kortikální fotochemické léze.

2.1. Stanovené hypotézy

- Perineuronální sítě jsou struktury tvořené hlavně chondroitinsulfáty ukotvenými na kostře z hyaluronanu. Je možné pomocí perorálního podání 4-methylumbilliferonu, který je blokátor syntézy kyseliny hyaluronové, rozvolnit perineuronální sítě a tím zlepšit krátkodobou paměť? Bude mít systémové podání léčiva negativní efekt na další orgány a motoriku?
- Hydrogely vytvořené z extracelulární matrix se ukazují jako vhodné lešení při poranění tkání. Je možné vytvořit hydrogel z lidské fetální tkáně pupečníku, který by podporoval reparační procesy v hojení po poškození nervového systému?
- V minulých studiích bylo pozorováno, že hydrogel derivovaný z ECM je v místě poranění relativně rychle degradován. Je možné strukturu vytvořenou z lidského pupečníku stabilizovat pomocí genipinu a tím prodloužit dobu degradace *in vivo*?

2.2. Dílčí cíle práce

- Sledování efektivity rozvolnění PNN po perorálním podání 4-MU pomocí imunohistochemických a biochemických analýz mozku a míchy.
- Pomocí behaviorálního testování zjistit efektivitu 4-MU léčby na zlepšení paměti po 2/3/6 měsících léčby a zjistit, zda efekt bude přetrvávat i měsíc po vysazení léčby.
- Pomocí motorických testů zjistit vliv na motorické schopnosti myši po 6 měsíční léčbě a pomocí histochemické analýzy sledovat efekt na klouby, slezinu, játra a ledviny.
- Vytvoření extracelulární matrix z lidského pupečníku, jeho stabilizace pomocí zesíťování a ověření biokompatibility *in vitro* na mezenchymálních kmenových buňkách, DRG explantátech a spinální fetální linii.
- Ověření biokompatibilitě nově syntetizovaného gelu z ECM, jeho gelace a migrace makrofágů *in vivo* na potkaním modelu fototrombotické léze v intervalech 1 a 14 dní po implantaci

3. Materiály a metody

3.1. Experimentální zvířata

Studie byly prováděny na myším kmenu C57BL/6JOlaHsd, kde bylo použito 24 myší (n=12 ♂ /12 ♀) ve věku 3 měsíců (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) a potkaním kmenu Wistar (n=18♂) o váze (330±30g). Všechny experimenty byly prováděny v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a rady (2010/63/EU) ze dne 22. září 2010

o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely a byly schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR, Praha, Česká republika.

Zvířata byla chována v klecích s 12 h režimem světla a tmy a neomezeným přístupem k vodě a potravě. Všechny behaviorální testy byli provedeny v průběhu denní fáze cyklu.

3.2. Sledování účinků 4-MU na myším modelu

Myši (n=24) byly krmeny *ad libitum* krmivem s příchutí čokolády s 5% obsahem 4-MU v dávce 6,5mg/g/deň (n=8 ♂ /8 ♀) nebo s čokoládovým kontrolním krmivem (n=4 ♂ /4 ♀) (Western diet, Sniff GmbH, TD.88137, Germany) po dobu 6 měsíců. Část zvířat byla usmrcena přímo po 6 měsících léčby (4-MU n = 8, kontrola n = 4) a orgány (mozek, mícha, slezina, játra, ledviny a chrupavčitá tkáň) byly vypreparovány a použity pro biochemické, histologické nebo qPCR analýzy.

3.2.1. Behaviorální testy

K pozorování účinku 4-MU byly provedeny série paměťových a funkčních lokomočních testů. Spontánní rozpoznávací úkoly byly použity pro hodnocení změn paměti a plasticity mozku. Rotarod a test síly úchopu byly použity pro ověření dopadu léku na motorické funkce, pohyblivost kloubů a svalovou degeneraci.

3.2.1.1. Test spontánní alternace

Test spontánní alternace (SA) testuje pozornost vůči novým podnětům a prostorovou paměť, které jsou závislé na hipokampu. Test byl proveden v Y-bludišti s rameny se stejnými

rozměry a vzdálenými od sebe v úhlu 120°, jak bylo popsáno dřívějších studiích pro potkany (Ennaceur and Delacour, 1988) (Winters et al., 2004) a myši (Bartko et al., 2011).

Bludiště mělo vysoké homogenní bílé neprůhledné stěny vyrobené z extrudovaného polystyrenu. Všechny stěny byly 30 cm vysoké a každé rameno bylo 15,5 cm dlouhé a 8 cm široké. Lampa osvětlující bludiště a videokamera pro záznam pokusů byly namontovány 40 cm nad zařízením. Každá myš byla umístěná do středu bludiště a ponechána v něm po dobu 5 minut, kde zvířata typicky vykazují tendenci vstoupit méně do nedávno navštíveného ramene. Byly zaznamenány počty vstupů do ramene (aktivita) a střídání ramen (alternace). Alternace byla definována jako vstup, který se lišil od dvou předtím navštívených ramen a nebyla definována žádná změna, pokud se myš vrátila do jednoho ze dvou ramen, které právě byly navštíveny. Procento střídání bylo vypočteno pomocí tohoto vzorce:

$$\% \text{ Alternace} = (\text{Počet alternací} / \text{Celkové množství vstupů}) \times 100\%$$

3.2.1.2. Spontánní rozpoznávání objektů

V testu spontánního rozpoznávání objektů (SOR) byly k určení rozpoznávací paměti myši použity dva známé a jeden nový objekt v bludišti Y. Jedno rameno Y bludiště bylo použito jako startovací rameno a další dvě ramena sloužila k zobrazení objektů (náhodně tvarované předměty, rozměry ~10 cm × 5 cm × 5 cm). Všechny myši si navykly na Y bludiště upravené pro SOR kde 2 ramena byla 10 cm dlouhá, 8 cm široká a počáteční rameno bylo 4,5 cm dlouhé a 8 cm široké. Prozkoumávání bludiště probíhalo 5 minut ve dvoudenním intervalu před prvním SOR testováním (2měsíční interval).

Následující testovací relace byly odděleny minimálně 48 hodinami.

Samotné testování sestávalo z fáze vzorku a fáze výběru.

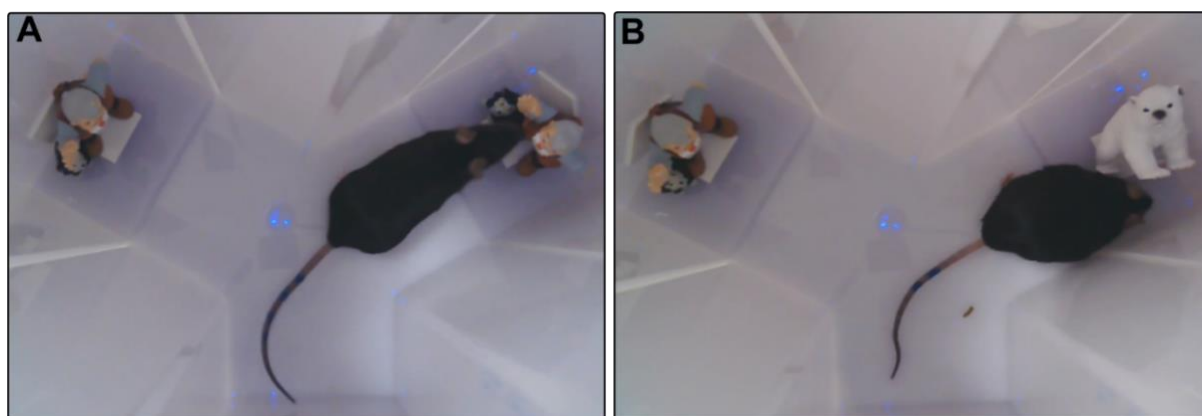
Ve fázi vzorku byly na konec každého ramene umístěny dva stejné předměty (**Obr. 3A**). Myš byla ponechána v bludišti 5 minut kdy zkoumala dané totožné předměty. Fáze výběru následovala po 3 a po 24 hodinách. Tyto intervaly byly odděleny 48h fází klidu, kterou zvířata strávila v chovných klecích.

Dobu mezi fází vzorku a fází výběru strávili zvířata rovněž v chovných klecích.

Fáze výběru byla procedurálně identická s fází vzorku, kromě toho, že objekt v jednom z ramen byl nahrazen novým objektem, zatímco druhé rameno obsahovalo známý objekt (**Obr. 3B**). Pro každé testování pokusného jedince byl použit jiný objektový pár. Čas strávený s dvojicemi objektů byl vyvážen 1 hodinu po expozici a pro experiment byly

vybrány objekty bez preferencí. Celý proces byl zaznamenán na video a čas strávený s objekty byl vyhodnocován z videozáznamů první a druhé fáze testu. Doba, kdy zvíře sedělo nebo leželo po samotném objektu byly vyřazeny. Pro fázi výběru bylo vypočítáno diskriminační skóre vydělením rozdílu v průzkumu nových a známých objektů celkovou dobou průzkumu objektu. Skóre 1 tedy odpovídalo pouze zkoumání nového objektu, zatímco skóre 0 odpovídalo myši, která stejně zkoumala nový i známý objekt. (Bralett's test, one-way ANOVA)

SOR testování na oba časové intervaly probíhalo po 2/3/6 měsících a 1 měsíc po léčbě.



Obr. 3 Fáze vzorku (A) a volby (B) testu SOR použitého pro analýzu uchování paměti (Dubisova et al., 2022)

3.2.1.3. Test rotarodu a test síly úchopu

Rotarod a test síly úchopu byly provedeny po 6 měsících léčby 4-MU.

Pro test na rotarodu byl použit rotarodový stroj s automatickými časovači a snímači pádu s bubnem o průměru 7 cm (ROTA-ROD 47700, UGO BASILE S.R.L., Itálie). Před tréninkovými lekcemi byly myši (kontrola n=4; 4-MU n=8) zvyklé zůstat na stacionárním bubnu po dobu 60 sekund a předem trénovány na 5 otáček za minutu (RPM) po dobu 120 sekund. V testovací fázi byla zvířata testována po dobu 300 sekund s 10 otáčkami za minutu ve 3 různých dnech po tréninku.

Pro test síly úchopu byl použit test síly úchopu (BIO-GS3, Bioseb, Vitrolles, Francie). Myši (kontrola n=4; 4-MU n=8) byly testovány na sevření předních končetin. Testování probíhalo 3krát denně ve 3 po sobě následujících dnech.

3.2.2. Zpracování tkání a histologie

3.2.2.1. Imunohistochemické barvení vzorků

Zvířata použita pro imunohistochemickou a histologickou analýzu (kontrola n=4, 4-MU n=7) byla hluboce anestetizována intraperitoneální injekcí chloralhydrátem (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), pak intrakardiálně perfundována fosfátovým pufrém (PBS), následovaným 4% paraformaldehydem v 0,1M fosfátovém pufru.

Hlavu jsme následně fixovaly v paraformaldehydu po dobu 1 týdne. Mozek byl z lebky vypreparován a přenesen do roztoků se zvyšující se koncentrací sacharózy od 10-30 %. Mozek byl poté zalit do zalévacího média OCT (00411243; VWR, USA), zmražen a na kryostatu (CryoStar NX70 ThermoScientific, Massachusetts, USA), pak byly nařezány série 20µm koronálních řezů, které byly umístěny na podložní sklíčka a skladovány při -20 °C.

Před barvením byly mozkové koronální řezy permeabilizovány 0,5% Tritonem X-100 v PBS při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Lipofuscinová autofluorescence byla zhasena pufrém octanu amonného 50mM s CuSO₄. K blokování endogenního biotinového signálu jsme použili endogenní *biotin blocking kit* (#Ab64212, Abcam, GB).

PNN byly vizualizovány aglutininem Wisteria floribunda (WFA), který specificky označuje zbytky N-acetylgalaktosaminu beta-1 glykoproteinů v ECM neuronů (1:150; biotinylovaný WFA, L1516, lektin z Wisteria floribunda, Sigma Aldrich, USA) a agrekanem (1:150; Anti-agrekan, králičí polyklonální, #AB1031, Merck, Germany), kterej je jeden z CSPG vázaný na řetězce HA v PNN. Blokování nespecifické vazby agrekanové protilátky a WFA bylo prováděno při pokojové teplotě za použití 10% chemiblokátoru (Chemiblocker, #2170, Merck, Německo) v 1X PBS s 0,2% Tritonem po dobu 2 hodin.

Primární a sekundární protilátky byly zředěny v roztoku stejného složení jako byl imunoblokující roztok. Primární protilátky proti agrekanu a biotinylované WFA byly inkubovány přes noc při 4 °C. WFA byla vizualizována pomocí streptavidinu konjugovaného s Alexa Fluor 488 (1:200; S32354, Life Technologies, USA). Agrekan byl obarven kozí-anti-králičí sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 594 (1:300; A11012, Life Technologies, USA). Jádra byla obarvena pomocí DAPI (1:1000; D1306, Invitrogen, USA). Poté byly řezy překryty krycím sklíčkem a upevněny médiem proti vyblednutí Vectashield (#H-1000; Vector Laboratories, Burlingame, USA).

3.2.2.2. Imunohistochemická analýza PNNs

Snímky fluorescenčního barvení WFA byly pořízeny mikroskopem Leica (Leica DMI 6000B, Německo) s použitím 20x objektivu a následně analyzovány softwarem ImageJTM (NIH, USA). Počet WFA pozitivních (WFA+) neuronů jsme stanovily v hipokampální oblasti ze čtyř mozkových řezů od každého zvířete (n=4 na skupinu). Intenzita barvení WFA byla měřena z WFA+ neuronů nacházejících se v hipokampální oblasti CA1-3. Hodnota intenzity byla vypočtena jako: CTCF (*Calculate the Corrected Total Cell Fluorescence*)= Integrovaná hustota vybrané buňky – integrovaná hustota odečtů pozadí. Kromě intenzity byl sledován celkový počet buněk obklopených PNN, který byl počítán z počtu WFA+ neuronů v oblasti CA1-CA3. Pro statistickou analýzu byl použit Bartlettův test, jednosměrná ANOVA.

Fluorescenční snímky neuronů (40 neuronů/myš; n = 4 na skupinu) z hipokampální oblasti CA2/CA3 obarvených na agrekan byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 880 Airyscan (Zeiss, Německo) s objektivem 20x. Sledování PNN obarvených agrekanem bylo také provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu (Leica DMRXA, Německo) se softwarem Neurolucida 2019 (MBF Bioscience, USA). 3D trasování bylo prováděno manuálně, počínaje tělem neuronů. PNN na dendritických větvích byly sledovány současným pomalým pohybem podél osy z, aby byl sledovaný segment udržován v ohnisku. Finální PNN trasování konkrétních neuronů byla uložena a Neurolucida Explorer 2019 (MBF Bioscience, USA) byl použit k provedení podrobné analýzy morfologické struktury. Získaná data byla dále exportována a statisticky zpracována pomocí GraphPad Prism Software (8.0). Rozdíly mezi skupinami byly analyzovány pomocí Kruskal Wallisova testu, následovaného Dunnovým vícenásobným srovnávacím testem.

3.2.2.3. Extrakce a kvantifikace glykosaminoglykanu (GAG)

GAG analýzy byly provedeny na 3 zvířatech na skupinu. Purifikace GAGs byla provedena podle protokolu z (Lin et al., 2011). Mozky a míchy byly vypreparovány, zmrazeny na suchém ledu a skladovány při -80 °C. Acetonový prášek vzorku byl připraven homogenizací vzorků s chlazeným acetonem a desikován při 4 °C. Vysušený prášek byl resuspendován v roztoku pronázy (pufr obsahující 0,1 M Tris-acetát, 10 mM octan vápenatý, pH 7,8) při 37

°C přes noc. Vzorky byly poté centrifugovány, naštěpeny proteiny ze supernatantu byly vysráženy 5% kyselinou trichloroctovou. Supernatant po centrifugaci jsme promyli diethyletherem a GAG přítomné ve vodné fázi roztoku se vysrážely přes noc při 4°C pomocí 5% octanu sodného a ledově chladného 75% etanolu. Vysrážené GAG byly získané centrifugací a vysušeny při 4 °C. Tento prášek GAG byl znovu rozpuštěn ve vodě a skladován při -20 °C. Celkový obsah GAG v každém vzorku byl kvantifikován pomocí turbidimetrického testu s cetylpyridiniumchloridem (CPC) (Manley and Hawksworth, 1966). K sestavení standardních křivek byl použit chondroitin sulfát-A (Sigma Aldrich, USA).

3.2.2.4. Analýza genové exprese

Změny v genové expresy mRNA souvisejících se syntézou HA (has1, has2, has3), hyaluronidázami (hyal1, hyal2, hyal3, tmem2, spam1), proteoglykany chondroitin sulfátu (acan, bean, ncan, vcan), tenascinem-C (tnc), synaptickým růstem (ngf, gri2, syp) a receptory pro HA (CD44, lyve1) byly stanoveny pomocí kvantitativní real-time PCR (qPCR) po 6 měsících léčby 4-MU a 4 týdny po léčbě a byly porovnány proti kontrolní neléčené skupině zvířat. RNA jsme izolovali z paraformaldehydem fixovaných zmrazených tkáňových řezů pomocí *High Pure RNA Paraffin Kit* (Roche, Německo). Množství RNA bylo kvantifikováno pomocí NanoPhotometeru P 330 (Implen, Německo) a izolovaná RNA byla reverzně transkribována za pomoci termálního cyklu T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) do komplementární cDNA pomocí transkriptů *Universal cDNA Master* (Roche, Německo).

Reakce qPCR byly provedeny pomocí roztoku cDNA, *FastStart Universal Probe Master* (Roche, Německo) a *TagMan Gene Expression Assays* (Life Technologies, USA) a byly provedeny v konečném objemu 10ul obsahujícím 45ng extrahované RNA, kdy se amplifikace provedla na *real-time* PCR cyklu (QuantStudio 6, ThermoFisher, USA). Všechny amplifikace probíhaly za stejných podmínek cyklů: 2 minuty při 50 °C, 10 minut při 95 °C, následovaných 40 cyklů po 15 s při 95 °C a 1 min při 60 °C. Všechny amplifikace byly provedeny v duplikátech a do každého pole byla zahrnuta negativní kontrola (voda) s gapdh jako referenčním genem. K zobrazení symetrické velikosti pro nahoru a dolů regulované geny byla použita stupnice log2.

Hodnoty neléčených zvířat byly stanoveny jako nulová čára. Výsledky byly analyzovány pomocí hodnot δC_t za použití jednosměrného testu ANOVA s Kolmogorov-Smirnov.

3.2.3. Histopatologické hodnocení

Pro histopatologické hodnocení byly odebrány vzorky sleziny, jater a ledvin a fixovány po dobu 24 hodin ve 4% paraformaldehydu v 0,1 M PBS. Vzorky byly zpracovány podle standardizovaného protokolu s použitím autotechnikonu Leica ASP 6P25 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Německo) do parafinových bloků pomocí zalévací stanice Leica EG 1150H (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Německo). Přibližně 10 µm plátky byly nařezány na rotačním mikrotomu Leica RM2255 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Německo), umístěny na standardní sklíčka (Bamned sro, Česká republika) a obarveny hematoxylinem-eosinem (H&E) (DiaPath, Itálie).

Vzorky kloubní chrupavky byly fixovány 24 hodin ve 4% paraformaldehydu v 0,1 M PBS a poté byly 4-krát promyty destilovanou vodou během 24 hodin. Chrupavky byly dekalcifikovány vodným roztokem 15% EDTA s pH 8,0, který byl měněn každé 3 dny po dobu 2 týdnů. Vzorky jsme opláchly destilovanou vodou, ošetřily zvyšující se koncentrací sacharózy (10-20-30%) v PBS a pak byly nařezány na kryostatu (CryoStar NX70 ThermoScientific, USA), umístěny na podložní sklíčka a skladovány při -20 °C. Řezy tkání obarvené H&E byly pozorovány a zobrazeny pomocí mikroskopu Zeiss (Zeiss Axioskop 2 Plus, Zeiss, Německo).

3.2.4. Statistická analýza použita při redukci PNN pomocí 4-MU

Data jsou prezentována jako průměr ± standardní chyba průměru (SEM), statistická významnost byla analyzována pomocí SigmaPlot V13 (Systat Software Inc., USA) a GraphPad Prism Software (8.0) s * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.3. Příprava a aplikace hydrogelů na potkaním modelu cerebrální léze

3.3.1. Decelularizace a příprava ECM hydrogelů z pupečníku

Pro přípravu ECM hydrogelu z lidských pupečnicků (UC-ECM) byly pupečníky získány od zdravých donošených novorozenců po spontánním porodu s informovaným souhlasem dárců za použití pokynů schválených Etickou komisí Fakultní nemocnice (Plzeň, Česká republika). Asi 10–15 cm pupeční tkáň bylo zmrazeno (>16 h při -20°C), asepticky transportováno do laboratoře a následně rozmrazeno a příčně nařezáno na kousky (<0,5 cm délka). Kousky

tkáně byly míchány v lázni 0,1 M fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS; IKEM, Česká republika) během 48 hodin při 120 otáčkách za minutu při 4 °C. PBS lázeň byla vyměněna třikrát až pětkrát, než byly kousky tkáně namočeny v roztoku 0,02% trypsinu, 0,05% EDTA (120 minut při 120 otáčkách za minutu, 37 °C) a poté v 0,1% kyselině peroctové v 4,0% etanolové lázni (120 minut při 300 ot./min; Penta, Česká republika) a v sérii namáčení v PBS a v deionizované vodě (dH₂O). Nakonec byly kousky tkáně lyofilizovány po dobu 24 hodin (FreeZone® 2,5; Labconco Corporation, USA) a rozmělněny na prášek (Mini-Mill Cutting Mills; Thomas Scientific, USA). Pro aplikaci *in vivo* byl práškový ECM sterilizován v etylenoxidu při 37 °C přes noc.

Pro přípravu hydrogelů byly práškové vzorky ECM solubilizovány pomocí 1,0 mg/ml pepsinu v 0,01 N HCl (Sigma, Německo) v koncentraci 10 mg ECM/ml a míchány při pokojové teplotě po dobu 48 hodin za vzniku roztoku pregelu (pH 2). Roztok pepsin-HCl-ECM byl neutralizován na pH 7,4 pomocí 0,1 N NaOH, pak izotonicky vyvážen 10xPBS a zředěn 1xPBS na konečnou koncentraci 8 mg/ml, což umožňuje gelovatění *in vivo* (Ghuman et al., 2016; Tukmachev et al., 2016). Pro vytvoření hydrogelu byl neutralizovaný pregel uložen při 37 °C po dobu 45 min.

Pro vytvoření zesíťovaného ECM byl neutralizovaný pregel udržován při teplotě 37 °C po dobu ~120 minut společně s genipinem (Sigma, Německo) v koncentraci 1mM, který byl solubilizován v 50% DMSO, z čehož vznikl genipinem zesíťovaný hydrogel (ECM/G).

3.3.2. Charakterizace hydrogelu ECM

3.3.2.1. Účinnost decelularizace tkáně

Absence buněčných jader v decelularizovaných tkáních byla prokázána barvením hematoxylinem a eosinem (H&E). Jádra byla obarvena fluorescenčním barvivem 4',6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI, 1:1000; Invitrogen, USA). Dvojvláknová DNA (dsDNA) byla izolována z nativní a decelularizované tkáně podle pokynů výrobce (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Qiagen, Německo) a kvantifikována pomocí spektrofotometru (Nano-Photometer® P-Class, USA). Obsah DNA byl normalizován na počáteční hmotnost suchého vzorku. Pro každou nativní a decelularizovanou tkáň byl test opakován třikrát. Délka páru bází zbytkové DNA byla stanovena na 2% agarózovém gelu (Sigma, Česká republika) obsahujícím 0,5% SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Nizozemsko) a

vizualizována ultrafialovým prosvícením za použití referenčního žebříku s 50 páry bází (bp) (Cleaver Scientific, UK).

3.3.2.2. *In vitro* charakterizace na buněčné kultuře

3.3.2.2.1. Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) lidské kostní dřeně (hBM) byly získány od Bioinova, Ltd. (Česká republika) a kultivovány, jak bylo popsáno dříve (Šponer et al., 2016), v kompletním médiu obsahujícím médium MEM Alpha (Lonza, Německo), 5% lyzát krevních destiček (Bioinova, Ltd., Česká republika) a gentamicin (10 mg /ml; gentamicin Lek®; Lek Pharmaceuticals, Slovinsko).

MSC derivované z lidské tukové tkáně (hASC) byly získány od zdravých dobrovolníků, kteří podstoupili liposukci z estetických důvodů a podepsali informovaný souhlas. Lipoaspirát byl opakovaně promyt v PBS a enzymaticky štěpen kolagenázou (0,3 PzU/ml, Collagenase NB 6 GMP; Serva Electrophoresis GmbH, Německo) při 37 °C, centrifugován při 1000 ot./min po dobu 5 minut a buňky byly kultivovány za standardních podmínek.

MSC *Human Wharton's jelly* (hWJ) byly odebrány z čerstvých lidských pupečnicků, jak je popsáno v části decelularizace tkání a příprava hydrogelů ECM.

Asi 10–15cm z pupečnicku bylo asepticky transportováno do sterilního PBS s antibioticko-antimykotickým roztokem (Sigma) při 4 °C. Po odstranění krevních cév byla zbývající tkáň nasekána na malé kousky (1–2mm³) a přenesena do 10cm kultivačních misek Nunc (Schoeller, Česká republika) obsahujících kompletní médium. V 10. den byly explantáty odstraněny z kultivačních misek a zbývající adherentní buňky byly kultivovány po dobu 3 týdnů nebo do 90% konfluence.

hMSC byly kultivovány při 37 °C a 5 % CO₂ ve zvlhčené atmosféře; médium bylo měněno dvakrát týdně. Buňky ve třetí pasáži byly analyzovány na povrchové markery a použity pro hodnocení ECM hydrogelu.

Pomocí průtokového cytometru (FACSAria™; Becton Dickinson, USA) byly oba typy MSC analyzované na charakteristické povrchové markery a to: CD90, CD73, CD29, CD10, CD44 (Exbio, Česká republika), CD105 (BioLegend, USA) a HLA ABC (BD Pharmingen, USA) a negativní na CD14, CD34, CD45 (Exbio, Česká republika), CD133 (Miltenyi Biotec, USA), VEGFR2 (BioLegend, USA), CD31 a HLA-DR (Pharmingen, USA). Analýza dat byla provedena pomocí softwaru BD FASCDiva.

3.3.2.2.2. Lidské nervové kmenové buňky

Podmíněně (*conditionally*) imortalizované lidské fetální neurální kmenové buňky (NSC) linie SPC-01 byly vytvořeny z 8-mi týdnů staré lidské fetální míchy, jak bylo popsáno dříve (Pollock et al., 2006). Buňky byly kultivovány v baňkách pro tkáňové kultury, čerstvě potažené lamininem (10 mg/ml) v DMEM/F12 (Gibco, Life Technologies, USA) a doplněné lidským sérovým albuminem (0,03 %; Baxter Healthcare Ltd., UK), lidským apo-transferrinem (100 mg/ml), putrescinem DiHCl (16,2 mg/ml), lidským rekombinantním inzulinem (5 mg/ml), progesteronem (60 ng/ml), L-glutaminem (2 mM), seleničitanem sodným (40 ng/ml), 4-OHT (100 nM) (vše od Sigma, Německo), lidským EGF (20 ng/ml), lidským bFGF (10 ng/ml) (PeproTech, UK) a primocinem 100 mg/ml (InvivoGen, USA) při 37 °C a 5 % CO₂ ve zvlhčené atmosféře.

3.3.2.2.3. Buněčný růst a proliferace

Pro stanovení *in vitro* proliferace hMSC byly hydrogely ECM umístěny do 96jamkové destičky (90 µl/jamka) a nasazenými buňkami (5000 buněk/cm² ve 100 µl média). Buňky nasazené na jamky bez hydrogelu (plast pro tkáňové kultury) sloužily jako kontrola. Buněčná proliferace byla měřena pomocí testu WST-1 (Roche, Německo) po 1, 3, 7 a 14 dnech kultivace. 10 µl činidla WST-1 bylo přidáno do každé jamky obsahující 100 µl kultivačního média a destičky byly inkubovány po dobu 2 hodin při 37 °C. Absorpce byla měřena pomocí čtečky destiček Tecan Spectra při 450 nm. Každý typ hydrogelu byl naočkován buňkami trojmo. Pro každý typ hydrogelu bylo provedeno šest nezávislých experimentů tří šarží hydrogelu. Morfologie hMSC pěstovaných na hydrogelech byla zkoumána imunofluorescenčním barvením na aktinová vlákna. Po fixaci ve 4% paraformaldehydu v PBS po dobu 15 minut byly buňky promyty PBS a obarveny Alexa Fluor 568 faloidinem (1:400; Molecular Probes, USA); jádra byla vizualizována pomocí fluorescenčního barviva DAPI (1:1000; Invitrogen, USA).

Pro stanovení biokompatibility zesíťovaných hydrogelů byly hydrogely pipetovány do 96jamkové destičky (90 µl/jamka) a naočovány hMSC buňkami (5000 buněk/cm² ve 100 µl média). Buněčná proliferace byla měřena pomocí testu Alamar Blue po 4 h, 3 dnech, 7 dnech a 14 dnech kultivace. Každý typ hydrogelu byl naočkován trojmo. Pro každou

koncentraci bylo provedeno šest nezávislých experimentů tří šarží hydrogelu. Po 14 dnech v kultuře byly buňky vizualizovány pomocí Live/Dead Barvení (Sigma, Německo)

3.3.2.2.4. Růst a diferenciacie neurálních kmenových buněk

Pro sledování růstu a diferenciaci neurálních kmenových buněk (NSC) byly tyto buňky nasazené v množství 100 000 buněk/cm² na krycí sklička potažené lamininem (kontrolní vzorek), nebo na UC-ECM hydrogelové disky, které byly vytvořené uvnitř válcové formy s průměrem 0,8cm (Scaffdex, Finsko).

Po 7 a 14 dnech kultivace byly buňky fixovány ve 4 % paraformaldehydu v PBS po dobu 15 minut, promyty PBS a obarveny pomocí Alexa Fluor 568 faloidinu. Dále bylo provedeno imunohistochemické barvení proti lehkým neurofilamentům (70 kDa) pomocí myšího monoklonálního IgG1 (NF70, 1:400; klon DA2, Merck Millipore, USA) a myšího monoklonálního IgG proti proteinu 2 asociovanému s mikrotubuly (MAP2, 1:1000; klon AP20; Millipore, USA). Jádra byla vizualizována pomocí fluorescenčního barviva DAPI (1:1000, Invitrogen, USA). Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO (Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Německo).

Růst a diferenciacie NSC na zesíťovaném a nezesíťovaném (ECM; ECM/G) byla stanovována pomocí suspenze 30 000 buněk SPC-01, které byly nasazeny na skleněná krycí sklička potažená lamininem nebo 200 000 buněk na ECM gely a kultivována na 24jamkové destičce s kultivačním médiem po dobu 7 a 21 dnů.

Buňky byly poté fixovány ve 4% paraformaldehydu v PBS po dobu 15 minut a promyty PBS. Růst a diferenciacie buněk SPC-01 byly analyzovány pomocí imunofluorescenčního značení pro Alexa-Fluor 568 Faloidin (1:400; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), gliální fibrilární kyselý protein (GFAP, 1:800; myší monoklonální IgG1 konjugovaný s Cy3; Sigma), beta-III-tubulin (1:1200; králičí monoklonální IgG; Abcam, USA), NG2 chondroitin sulfát proteoglykan (1:400; králičí polyklonální IgG; Abcam, USA). Kozí anti-králičí IgG (H + L) konjugovaný s AlexaFluor 594 (1:400; Life Technologies, USA) byl použit pro vizualizaci beta-III-tubulinu a protilátek NG2. Jádra byla vizualizována pomocí fluorescenčního barviva 4',6'-diamidino-2-fenylyndol (DAPI) (1:1000; Life Technologies, USA). Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO. Buněčný růst byl stanoven z 10 náhodných zorných polí v každém gelu a analyzován pomocí ImageJ (NIH, USA).

3.3.2.2.5. Kultura explantátu dorzálních kořenových ganglií na UC-ECM

Ganglia dorzálních kořenů (DRG) byla extrahována ze čtyř 3–5denních potkanů Wistar (Velaz, Česká republika). Míchy byly vypreparovány a DRG z hrudních a bederních částí byly izolovány, umístěny do studeného Hankova vyváženého solného roztoku bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ roztoku (Invitrogen, USA) a očištěny od periferních nervových výběžků. DRG explantáty byly poté umístěny na UC-ECM hydrogely ve 24jamkových destičkách a kultivovány v neurobazálním médiu (Invitrogen, USA) doplněném 2% B27 (Life Technologies, USA), 2 mM L-glutaminem (Invitrogen, USA), 0,5 % NGF (50 ng/ml; PeproTech), uridinem (17,5 mg/ml; Sigma) a primocinem (2 $\mu\text{l}/\text{ml}$; PeproTech) ve zvlhčené atmosféře při 37 °C a 5 % CO_2 . Médium bylo měněno každé 3 dny. Po 7 dnech kultivace byly DRG fixovány pomocí 4% paraformaldehydu v PBS po dobu 10 minut a obarveny protilátkou anti-NF160 (klon NN18, 1:200; Sigma), sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen) a buněčná jádra (DAPI, 1:1000; Invitrogen). Fluorescenční snímky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica (Leica DMI 6000B) a softwaru TissueGnostic (TissueGnostics GmbH, Německo). Oblast extenze neuritů a nejdelší délka neuritů byly stanoveny pomocí speciálního zásuvného modulu pro ImageJ (NeuriteJ) (Torres-Espín et al., 2014). Test hydrogelu byl opakován třikrát.

3.3.2.2.6. Axonový růst na hydrogelech zesíťovaných a nezesíťovaných ECM; ECM/G

Ganglia dorzálních kořenů (DRG) byla vypreparována z dospělých (2 měsíce) samců potkanů Wistar (Velaz, Česká republika). Neurony byly disociovány 0,2% kolagenázou z *Clostridium histolyticum* a 0,1% trypsinem (oba od Sigma, Německo) a poté centrifugovány přes 15% hovězí sérový albumin (BSA, Sigma, Německo). DRG byly kultivovány na krycích sklíčkách potažených hydrogely ECM a ECM/G (300 μl , koncentrace genipin 1 mM) v DMEM (ThermoFisher, USA) doplněném penicilin-streptomycin-fungizonem (1 %, Lonza, Švýcarsko), ITS + (1 %), NGF (10 ng/ml) a mitomycinem C (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, vše od Sigma, Česká republika) po dobu 2 dnů. Buňky byly fixovány 4% paraformaldehydem v PBS a barveny anti-beta-III-tubulinem (1:1200; Abcam, UK) a kozím anti-myším IgG Alexa Fluor 488 (1:400, Life Technologies, USA) a zobrazeny na fluorescenčním mikroskopu AxioCam HRc Axioskop 2 Plus (Zeiss, Německo) s objektivem 20x a softwarem ImageJ

(NIH, USA). Pro analýzu bylo vypočteno procento neuronů s neurity delšími než tělo buňky ze 3 jamek a 3 nezávislých oblastí v každé jamce. Experiment byl opakován třikrát.

3.3.2.3. Injekce hydrogelů UC-ECM do potkaního modelu kortikální fototrombotické léze

Pro testování biokompatibility hydrogelu UC-ECM *in vivo* byla vytvořena fokální mozková fotochemická léze v motorickém kortexu u potkanů. Pro vytvoření léze bylo zvíře umístěno do stereotaktického aparátu pod isofluranovou (3%) anestézií, řez na temeni hlavy byl vytvořen ve střední čáře a perikraniální tkáň byla vypreparována, aby se odhalila bregma. Fokální cerebrální ischemie byla provedena podle (Anděrová et al., 2006) následovně: Bengálská červeň (Sigma, Česká republika) byla injikována přes pravou stehenní žílu (0,08 g/ml fyziologického roztoku; 1 µl/g hmotnosti zvířete) a lebka byla osvětlena nad primárním motorickým kortexem (2 mm rostrální a 2 mm pravostranně k bregmě) pomocí svazku optických vláken zdroje studeného světla (KL 1500 LCD; Zeiss, Německo) po dobu 10 min. Kůže překrývající lebku byla poté sešita. Sedm dní po fokální cerebrální ischemii byl do lebky zvířete vyvrtán malý otvor v místě léze a do léze bylo injikováno 10 µl UC-ECM (n=4) nebo fyziologického roztoku (n=4)/ zesíťovaný ECM/G (n=5) a ECM (n=5) (do hloubky 2 mm) za použití stříkačky Hamilton (Hamilton Company, Švýcarsko) a stereotaktického zařízení.

Zvířata byla usmrcena 24h (kontrola, UC-ECM, ECM, ECM/G)/2 týdny (ECM, ECM/G) po implantaci, předávkováním anestézií a intrakardiálně perfundována 4% paraformaldehydem v 0,1 M PBS. Mozky byly vyjmuty, fixovány ve 4% paraformaldehydu po dobu 10 dnů a řezány ve zmrazeném stavu (-24 °C).

3.3.2.3.1. Analýza ECM derivovaného z lidských pupečnicků

Koronální řezy o tloušťce 40 µm byly obarveny přes noc při teplotě 4 °C na buněčná jádra pomocí DAPI (1:1000; Life Technologies, USA), myší monoklonální IgG pro CD68 (ED1, 1:150; Abcam, USA), kozí polyklonální IgG pro CD206 (c-20; 1:250; Santa Cruz, USA), nebo myší monoklonální IgG1 pro COL-I (1:1000, COL-I; Abcam, USA) zředěné v 0,1M PBS obsahujícím kozí (nebo oslí – v závislosti na hostitelském organismu sekundárních protilátek) sérum (1 :10 oba; Sigma, Německo) a Triton X-100 (0,1 %). Barvicí roztok

postrádající Triton X-100 byl použit pouze v případě extracelulárního antikolagenového barvení. Jako sekundární protilátky byly použity koží anti-myší IgG konjugovaný s Alexa Fluor 594 (1:400) pro COL-I, oslí anti-myší IgG konjugovaný s Alexa Fluor 488 (1:400) pro CD68 a oslí anti-koží IgG konjugované s Alexa Fluor 594 (1:400) pro CD206 (vše od Life Technologies). Fluorescenční snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO. Relativní počet makrofágů v oblasti hydrogelu byl stanoven ze tří náhodně vybraných řezů pomocí objektivu 20x a softwaru ImageJ.

3.3.2.3.2. Analýza zesítěvaného versus nezesítěvaného ECM

Koronální řezy o tloušťce 40 μm byly obarveny na buněčná jádra pomocí DAPI (1:1000; Life Technologies, USA), králíčí monoklonální IgG pro vimentin (1:200, Abcam), myší monoklonální IgG1 pro CD68 (ED1; 1:150, Abcam) koží polyklonální IgG na CD206 (c-20; 1:250, Santa Cruz, Heidelberg, Německo) nebo myší monoklonální IgG1 na kolagen I (1:1000, COL-I, Abcam) zředěné v 0,1 M PBS obsahujícím koží (nebo oslí) – v závislosti na hostitelském organismu sekundárních protilátek) sérum (oba 1:10; Sigma) a Triton X-100 (0,1 %) přes noc při 4 °C. Barvicí roztok postrádající Triton-X byl použit pouze v případě extracelulárního anti-kolagenového barvení. Jako sekundární protilátky byly koží anti-myší IgG konjugované s AlexaFluor 594 (1:400) pro kolagen I, oslí anti-myší IgG konjugované s AlexaFluor 488 (1:400) pro CD 68 a oslí anti-koží IgG konjugované s AlexaFluor 594 (1:400;) pro CD206 (vše od Life Technologies, USA). Fluorescenční snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 5 DUO. Relativní počet mikroglií/makrofágů (CD68+) a (CD206+) v oblasti obklopující léze byl stanoven z řezů nasnímaných fluorescenčním mikroskopem (Leica, Olympus Optical, Německo) s použitím objektivu 20x a softwaru ImageJ. Množství ED1 pozitivních a CD206 pozitivních makrofágů bylo vztaženo k počtu všech buněčných jader obarvených na DAPI v oblasti obklopující léze.

3.3.3. Statistická analýza použita při ECM

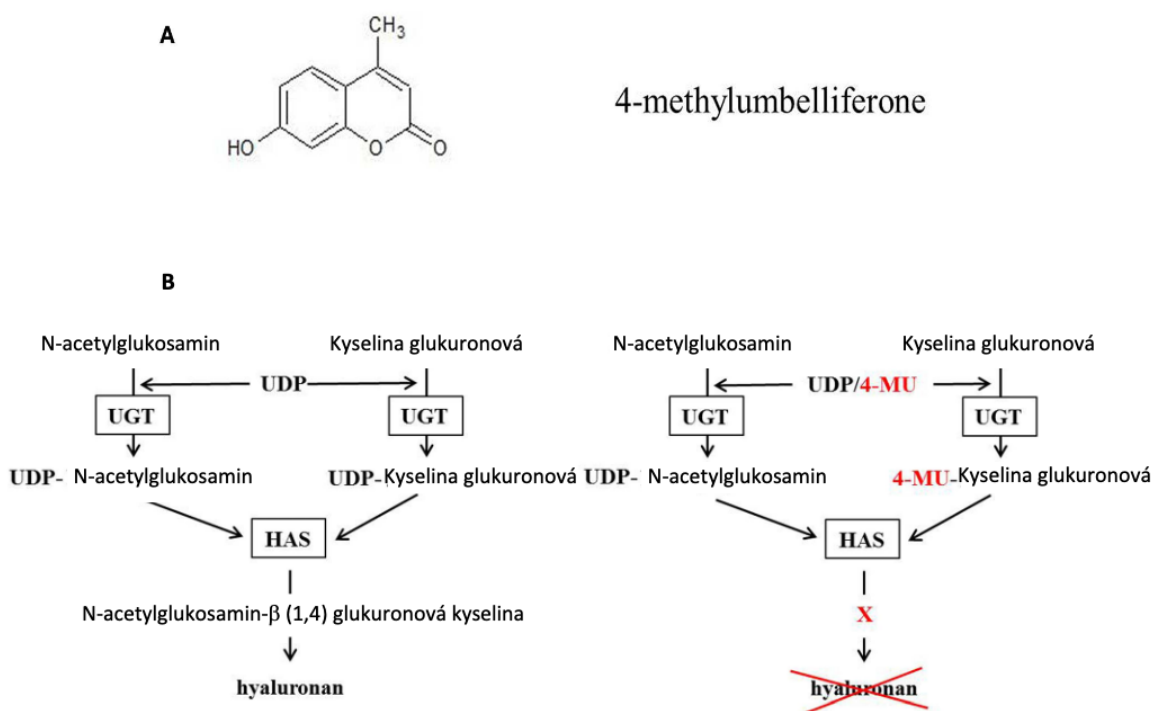
Data byla prezentována jako průměr $\pm$ standardní chyba měření SEM). Statistická významnost byla analyzována pomocí jednosměrné ANOVA s Tukeyho vícenásobnou srovnávací post hoc analýzou (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA) s hladinou $p < 0,05$ považovaná za statisticky významnou.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Modifikace ECM blokací syntézy kyseliny hyaluronové

4.1.1. Neinvazivní podání 4-Methylumbelliferonu

PNN představují slibný cíl léčby pro mnohá onemocnění mozku nebo poranění CNS. Proto 4-Methylumbelliferonu (4-MU), jakožto inhibitor syntézy HA, může mít široký potenciál ve funkční modulaci struktur bohatých na HA. 4-MU je lék schválený pro klinické použití. Denní perorální dávka ve výši 1200 mg/den po dobu 3 měsíců je u lidí dobře tolerována, nevykazuje závažné nežádoucí účinky a rovněž slouží jako dávka používána pro zkoumání nových indikací léčiva (Nagy et al., 2015; Trabucchi et al., 1986). K dosažení a udržení účinné koncentrace léčiva v orgánech jako je mozek, je však nutná vyšší dávka 4-MU z důvodu jeho rychlé *clearance*, což znamená nízkou systémovou biologickou dostupnost (<3 %) (Nagy et al., 2015). V této studii jsme použili perorální dávku ~6,7 mg/g/den (5 % 4-MU v krmivu), které bylo již dříve prokázáno jako dobře tolerované a účinné terapeutikum (Hedwich F. Kuipers et al., 2016; H. F. Kuipers et al., 2016; Nagy et al., 2015).



Obr. 4 (A) Molekulární struktura 4-methylumbelliferonu (B) Mechanismus účinku 4-MU na blokaci vzniku kyseliny hyaluronové. 4-MU se váže na kyselinu glukuronovou, čímž zabráňuje navázání UDP a vytvoření hyaluronanu. (Nagy et al., 2015)

Aby se zabránilo krmení sondou, 4-MU bylo smícháno s krmivem s čokoládovou příchutí a jeho konzumace byla povolena *ad libitum*. Abychom zabránili úbytku hmotnosti po konzumaci 4-MU (H. F. Kuipers et al., 2016), kombinovali jsme léčbu 4-MU s dietou s vysokým obsahem tuku doporučenou pro hlodavce. Ukázali jsme, že vmíchání 4-MU do čokoládového krmiva je snadný a neinvazivní způsob podání léku zvířatům. Použití čokoládové příchutě bylo rovněž z důvodu srovnatelnosti naší studie s předchozími pracemi (H. F. Kuipers et al., 2016; Tsuchiya et al., 2020).

4.2. Testování účinků dlouhodobé léčby 4-MU na mozek a jiné orgány

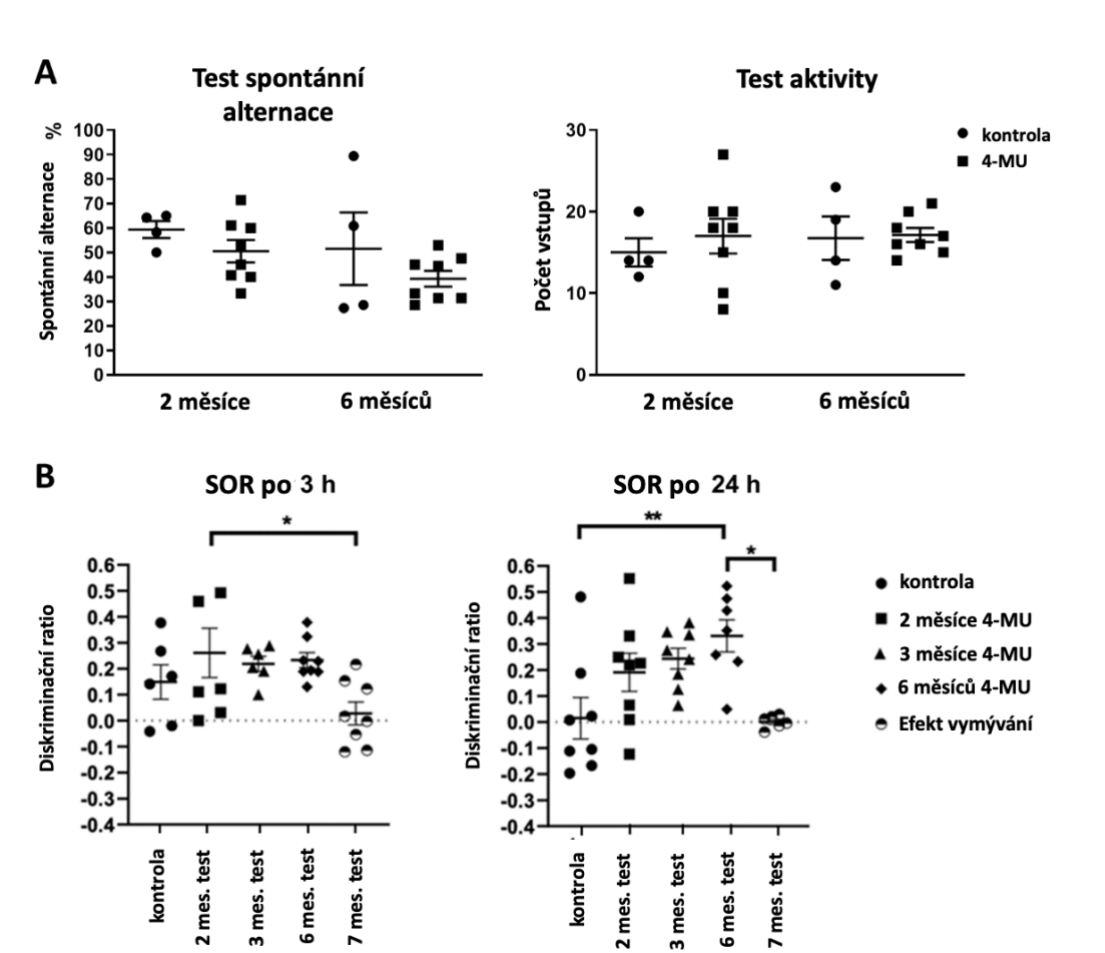
4.2.1. 4-MU zlepšilo zachování paměti v behaviorálním testování

Ke zkoumání vlivu 4-MU na neuroplasticitu jsme použili sadu behaviorálních testů zaměřených na krátkodobou paměť. Behaviorální testy byly zahájeny 2 měsíce po léčbě 4-MU a to z důvodu našeho předešlého pozorování u poranění míchy, kde se behaviorální přínosy léčby 4-MU se objevují až 6 až 7 týdnů po léčbě (Kwok et al., 2021). Rozhodli jsme se tedy zahájit naše behaviorální testování 2 měsíce po léčbě 4-MU.

Nejprve jsme zkoumali spontánní alternaci (SA) po 2 a 6 měsících léčby 4-MU (**Obr. 5A**). Tento test je založen na počítání střídání ve třech po sobě jdoucích vstupech do ramen labyrintu, které předtím nebyly navštíveny, čímž kvantifikuje ochotu hlodavců zkoumat nové prostředí a také krátkodobou prostorovou paměť. Mezi skupinami nebyl pozorován žádný rozdíl v celkové aktivitě nebo alternaci. Tyhle výsledky naznačují, že chování myší nebylo léčbou ovlivněno. Poté jsme testovali rozpoznávací paměť pomocí SOR testu po 2, 3 a 6 měsících léčby 4-MU a 1 měsíc po léčbě. Tento test je založen na tendenci hlodavců interagovat více s novým než se známým předmětem. Zvířata jsou testována v různých časech po vystavení objektům, čímž se měří paměťová perzistence. Ve všech sledovaných intervalech jsme pozorovali trend zlepšení paměti, a zároveň signifikantní zlepšení paměti bylo zjištěno po 2 měsících léčby ve 3hodinovém intervalu ve srovnání s kontrolní skupinou. Rovněž jsme viděli signifikantní zlepšení paměti po 6 měsících léčby v intervalu po 24 hodinách ve srovnání s kontrolní skupinou a skupinou, která byla měsíc po léčbě (**Obr. 5B**). Obdobné pozorování zlepšení paměti po 24 hodinovém intervalu bylo dříve pozorováno u knock-outovaných myší, kterým chyběl gen *Hapln1*, který kóduje spojovací protein nezbytný pro tvorbu PNN v CNS, a rovněž po enzymatické degradaci struktur PNN pomocí

chondroitinázy ABC v perirhinálním kortexu (Romberg et al., 2013). Naše výsledky naznačují, že perorální léčba 4-MU by mohla prostřednictvím down-regulace PNN zlepšit paměť.

Abychom zjistili, zda je efekt 4-MU trvalý, provedli jsme SOR test měsíc po ukončení 6měsíční léčby. Zjistili jsme, že účinek 4-MU po 1 měsíci nepřetrvává a hodnoty v SOR teste se vrátili na skóre před léčbou. Zatímco vysoká úroveň neuroplasticity vyvolaná redukcí PNN po léčbě 4-MU usnadňuje uchování paměti, nedostatek trvalých paměťových stop ve skupině měsíc po léčbě naznačuje, že je vyžadována konstantní nízká hladina PNN. **(Obr. 5B)** Kromě toho výsledky také naznačují zapojení dalšího mechanismu v řízení paměti při rozpoznávání objektů, který je nezávislý na PNN. Ukázalo se, že HA reguluje obnovu, proliferaci a diferenciaci nervových kmenových buněk v gyrus dentatus hipokampu (Su et al., 2017). Je možné, že přetrvávající nízká hladina HA vyvolaná prodlouženým podáváním 4-MU brání hipokampální neurogenezi, která je nezbytná pro získávání a tvorbu paměti.



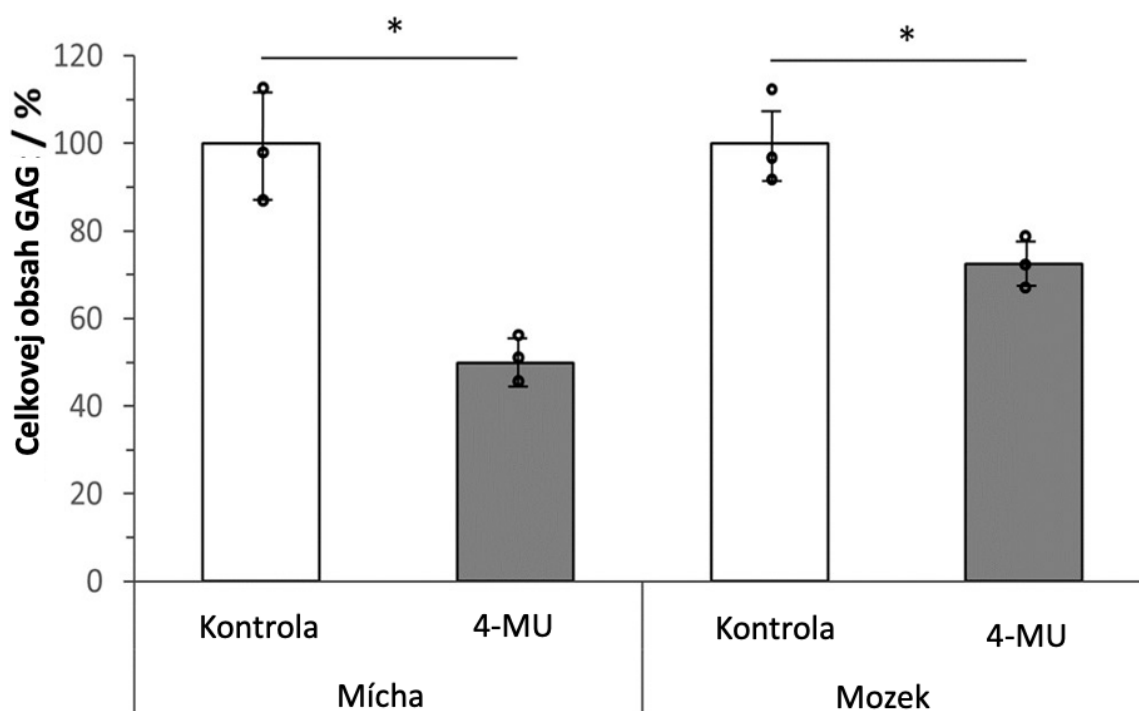
Obr. 5 Test spontánní alternace, aktivity a spontánní rekognice

Test spontánní alternace (SA) a aktivity po 2 a 6 měsících léčby pomocí 4-MU. (A) SA stejně jako test aktivity neukázaly žádné signifikantní změny po podání léčby 4-MU ve srovnání s kontrolními zvířaty. (B) Test SOR byl proveden po 2/3/6-ti měsících léčby 4-MU a poté po 1 měsíc po léčbě (vymytí). Významné zlepšení skóre SOR bylo zjištěno po 2 měsících léčby ve 3 hodinovém intervalu u zvířat léčených 4-MU ve srovnání se skupinou 1 měsíc po léčbě. Rovněž jsme pozorovaly signifikantní zlepšení ve 24 hodinovém intervalu po 6 měsících léčby ve srovnání s kontrolní skupinou a stejně tak skupinou zvířat 1 měsíc po léčbě.

*SOR skóre kleslo na kontrolní úroveň po 1 měsíci vymývání, což naznačuje, že účinek 4-MU je dočasný. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, jednosměrná ANOVA; Tukeyho vícenásobný srovnávací test.*

4.2.2. 4-MU snižuje množství GAG v CNS

Pro určení účinku systémové léčby 4-MU na syntézu HA, jsme nejprve zkoumali míru snížení GAG v CNS. HA patří do rodiny GAG, která také zahrnuje heparin/heparansulfát, chondroitin sulfát, dermatansulfát a keratansulfát. Analýzu a izolaci GAG jsme provedli podle našeho už dříve publikovaného protokolu (Lin et al., 2011). Léčba pomocí 4-MU vedla k významnému snížení celkových GAG o 50 % v míše a 28 % v mozku (**Obr. 6**) ve srovnání s myši, které byly krmeny kontrolním krmivem. Výraznější snížení GAG v míše mohlo být způsobeno rozdíly v metabolismu HA mezi mozkem a míchou. Výsledky však potvrzují, že perorální léčba 4MU by mohla účinně snížit hladinu HA v CNS.



Obr. 6 Léčba 4-MU vedla ke snížení GAG v CNS. Celkový obsah GAG ($\mu\text{g}/\text{mg}$) byl normalizován na množství GAG u kontrolní skupiny myši. Léčba 4-MU vedla k významnému snížení celkového GAG jak v míše (ze 100% na $49,93\% \pm 3,99\%$, $p=0,0127$), tak i v mozcích (ze 100 % na $72,46\% \pm 4,51\%$, $p=0,0300$). V míše byla pozorována výraznější redukce než v mozku ($50,07\%$ vs. $27,54\%$) ($n=3$), Studentův t -test, dvoustranný pár.

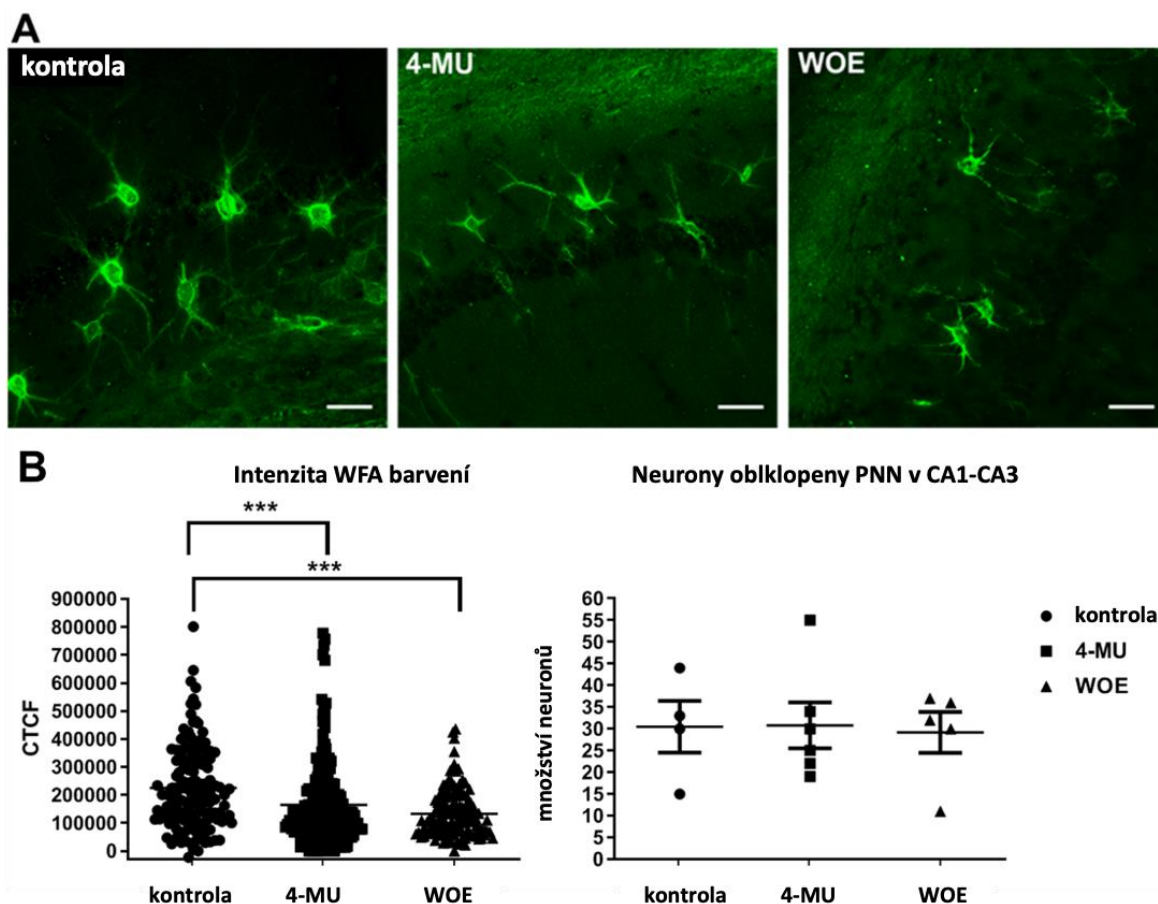
4.2.3. Podávání 4-MU zredukovalo množství PNN v oblasti hipokampu

Již dříve bylo prokázáno, že rozpoznávací paměť souvisí s hipokampem a přilehlými kortikálními oblastmi včetně entorhinálního, perirhinálního a parahipokampálního kortexu, které se podílejí na normální funkci paměti (Baxter, 2010). V předchozích studiích redukcí PNN za pomoci chondroitinázy ABC v perirhinálním kortexu se zvýšilo dosažené skóre v SOR testu (Romberg et al., 2013; Yang et al., 2015).

Tyto struktury jsou vysoce integrované, kdy perirhinální kůra je zapojena do rozpoznávání objektů v krátkých retenčních intervalech, zatímco hipokampus je spojen hlavně s prostorovou navigací a při kódování, konsolidaci a získávání neprostorové paměti včetně paměti pro rozpoznávání objektů. Zkoumali jsme tedy účinek 4-MU na expresi PNN v hipokampu.

4.2.3.1. Imunohistologická vizualizace PNN pomocí WFA

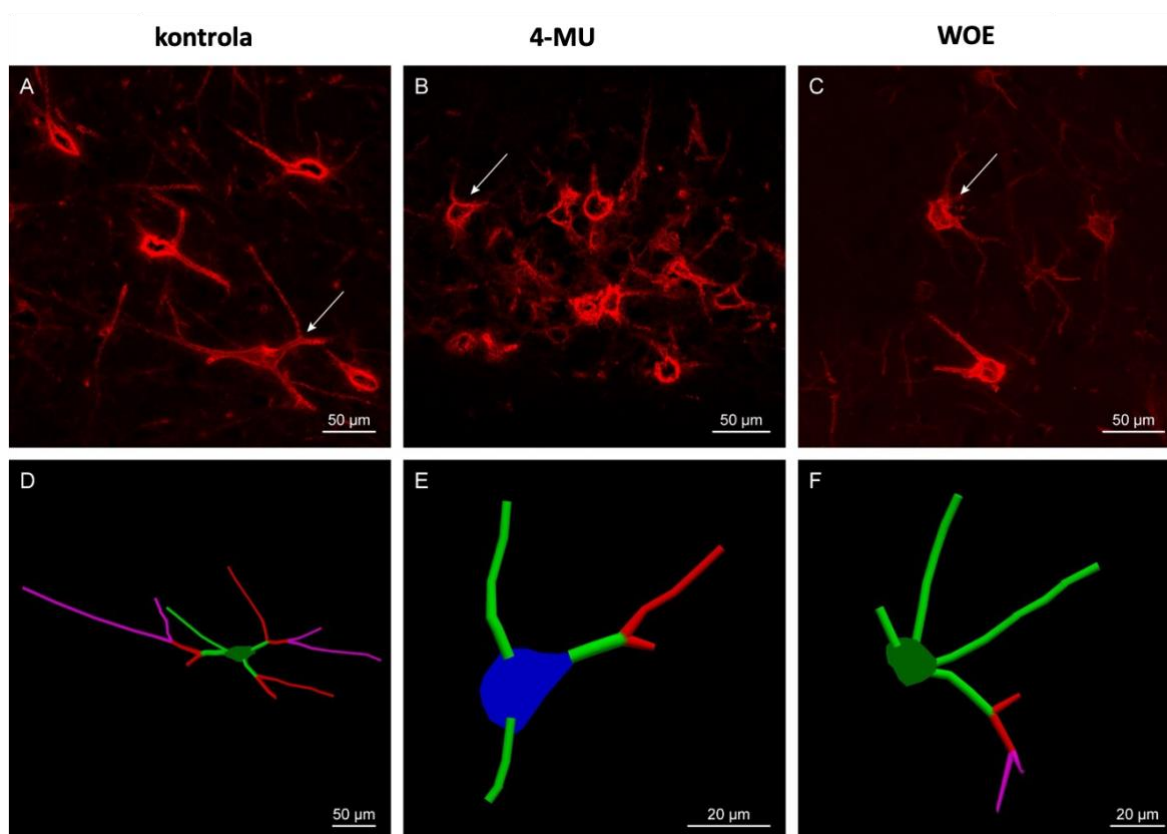
V naší studii jsme potvrdili snížení PNN po léčbě 4-MU v hipokampu. Pro zobrazení PNN jsme použili barvení pomocí WFA, které selektivně označuje zbytky N-acetylgalaktosamin-beta-1 glykosaminoglykanů v ECM, čímž jsme nejprve vyhodnotili účinek 4-MU na intenzitu PNN a celkový počet neuronů nimi obklopených (**Obr. 7A**). Zatímco celkový počet WFA pozitivních neuronů zůstává podobný, dochází k významnému poklesu intenzity WFA kolem těl neuronů jak ve skupině léčené 6 měsíců 4-MU, tak ve skupině, která byla měsíc po léčbě (**Obr. 7B**)



Obr. 7 (A) Reprezentativní snímky imunofluorescenčního barvení WFA v CA1-CA3 oblasti hipokampu u kontrolních myší, myší léčených 4-MU po dobu 6-ti měsíců a myší 1 měsíc po léčbě (WOE-wash out effect- efekt vymývání). **(B)** Intenzita barvení WFA a celkový počet buněk pozitivních na WFA stanovený v oblasti hipokampu (CA1-CA3). Významný pokles intenzity barvení WFA byl pozorován po 6 měsících léčby 4-MU a přetrvával i 1 měsíc po léčbě ve srovnání s kontrolní skupinou ($n = 4$ na skupinu) $***p < 0,001$; jednosměrný test ANOVA. WOE – vymývací efekt. Měřítko: $50 \mu\text{m}$.

4.2.3.2. Imunohistologická vizualizace PNN pomocí agrekanu

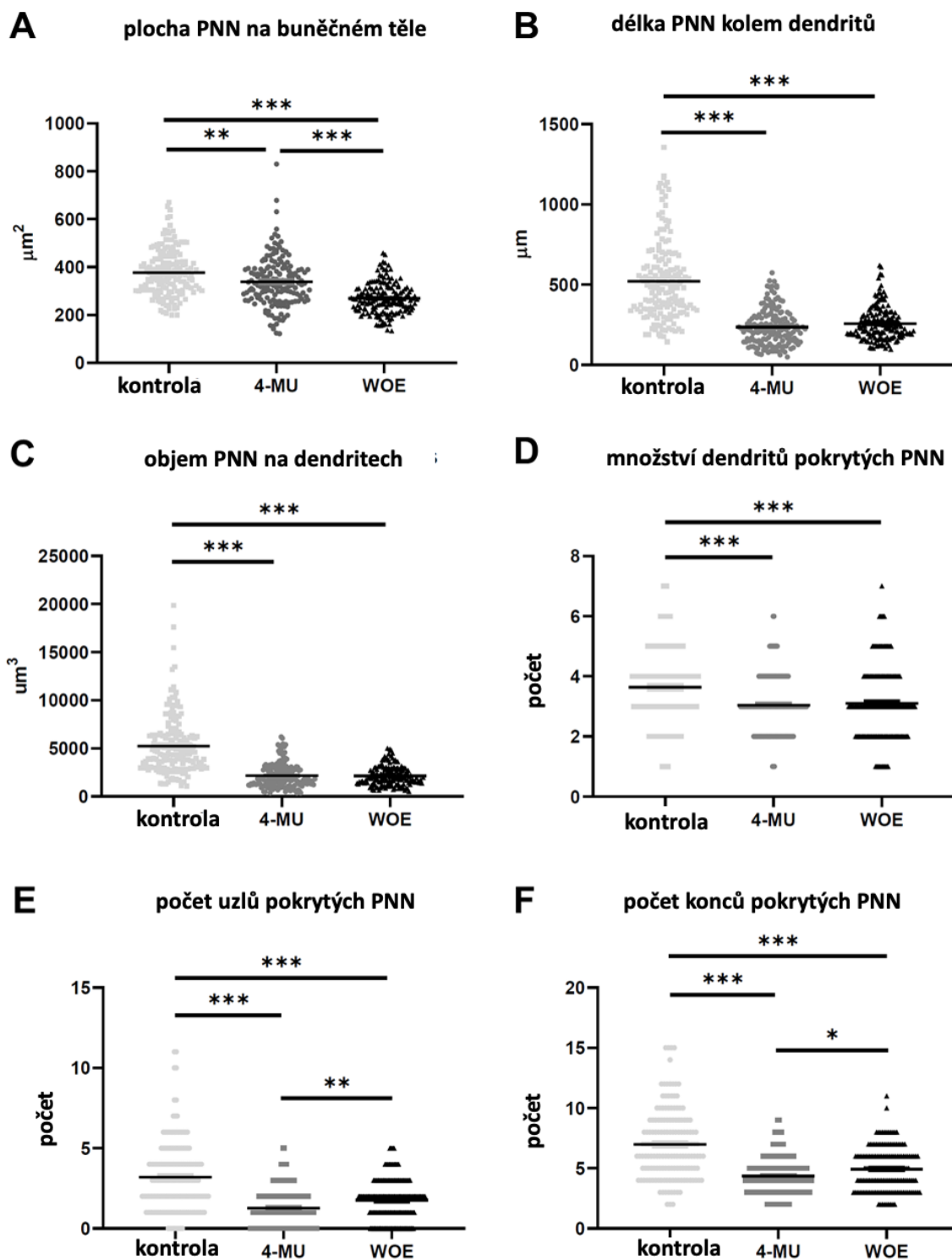
Agrekan patří mezi CSPG, a je přítomen téměř ve všech PNN-pozitivních neuronech v mozku, kde tvoří integrální strukturu PNN pomocí vazby na HA řetězce prostřednictvím Haplnů (Galtrey et al., 2008; Kwok et al., 2011). Předchozí studie prokázaly změny v dendritické délce a arborizaci neuronů během plasticity. Abychom prozkoumali účinek 4-MU na dendritickou plasticitu, provedli jsme imunohistochemické barvení na agrekan a kvantifikovali jsme dendritickou arborizaci PNN kolem jednotlivých neuronů v hipokampu (**Obr. 8**). Analýza jednotlivých hipokampálních neuronů pomocí barvení agrekanem po 6 měsících léčby odhalila snížení plochy a objemu PNN kolem neuronů a rovněž délky PNN kolem dendritu (**Obr. 8A-C**). Analýza arborizace neuronů také zjistila snížení dendritické složitosti pokrytých PNN, což je reflektováno v počtu arborizací, uzlů a konců dendritů (**Obr. 8D-F**). Podobně jako u barvení WFA se barvení agrekanem kolem neuronů neobnovilo ani jeden měsíc po ukončení léčby 4-MU (**Obr. 8C**). Tyto výsledky nám potvrdily, že HA je základní složkou pro tvorbu PNN a že inhibice syntézy HA vede k významnému snížení morfologie PNN v hipokampálních neuronech. Tato studie byla zaměřená na hipokampální oblast CA2/CA3 s nejvýraznějším agrekanovým zbarvením, a proto účinek 4-MU na PNN v jiných oblastech musí být potvrzen v budoucích studiích.



Obr. 8 (A-C) Zobrazení neuronů s obarvenými PNN pomocí agrekanu v hipokampální oblasti CA2/CA3 u **(A)** kontroly, **(B)** 4-MU po 6-ti měsících léčby, **(C)** skupině 1 měsíc po léčbě 4-MU (WOE)

(D-F) Příklady trasování PNN u **(D)** kontrol, **(E)** po 6-ti měsících léčby 4-MU a **(F)** 1 měsíc po léčbě 4-MU

Šipky v **A, B, C** znázorňují PNN neuronů trasovaných v **D, E, F**. WOE-washout effect. Měřítko: (A-D) 50 μm , (E, F): 20 μm .



Obr. 9 Morfologické parametry PNN obarvené pomocí agrekanu v hipokampální oblasti CA2/CA3 u kontrolní skupiny, skupiny s 4-MU po 6 měsících léčby a ve skupině 1 měsíc po léčbě. ($n = 4$ na skupinu, 40 neuronů na zvíře) *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, Kruskal Wallisův test, následovaný Dunnovým testem vícenásobného srovnání.

Naše výsledky naznačují korelaci zlepšení rozpoznávací paměti a snížení PNN po 6 měsících léčby 4-MU. Toto zjištění také souhlasí s předchozí studií, která prokázala, že zlepšení rozpoznávací paměti souvisí s redukcí PNN v hipokampu a jeho přidružených oblastech, jako je perirhinální kortex (Romberg et al., 2013). Také je třeba poznamenat, že velká část mozkové ECM existuje jako difúzní kompartment a kondenzovaná ECM včetně PNN představuje malý podíl z celkového ECM. Systémová inhibice HA pomocí 4-MU, která postrádá specificitu, může proto také způsobit změnu u difúzní ECM. V této studii systémová inhibice HA způsobila snížení PNN, což korelovalo se zvýšenou retencí paměti. Na druhou stranu měsíc po ukončení léčby 4MU útlum PNN stále přetrvával, zatímco efekt zlepšující paměť zmizel. To naznačuje, že je do řízení paměti pro rozpoznávání objektů zapojen další mechanismus nezávislý na PNN, ale související s ECM. Již dříve bylo prokázáno, že HA a její receptor CD44 regulují hipokampální neurogenezi a prostorovou paměť závislou na hipokampu (Raber et al., 2014; Su et al., 2017). Je proto možné, že přetrvávající nízká hladina HA vyvolaná prodlouženým podáváním 4-MU brání hipokampální neurogenezi, která je nezbytná pro získávání a tvorbu paměti. Tato data naznačují, že na zotavení plasticity po léčbě 4-MU mohou být kromě PNN zapojeny i další faktory.

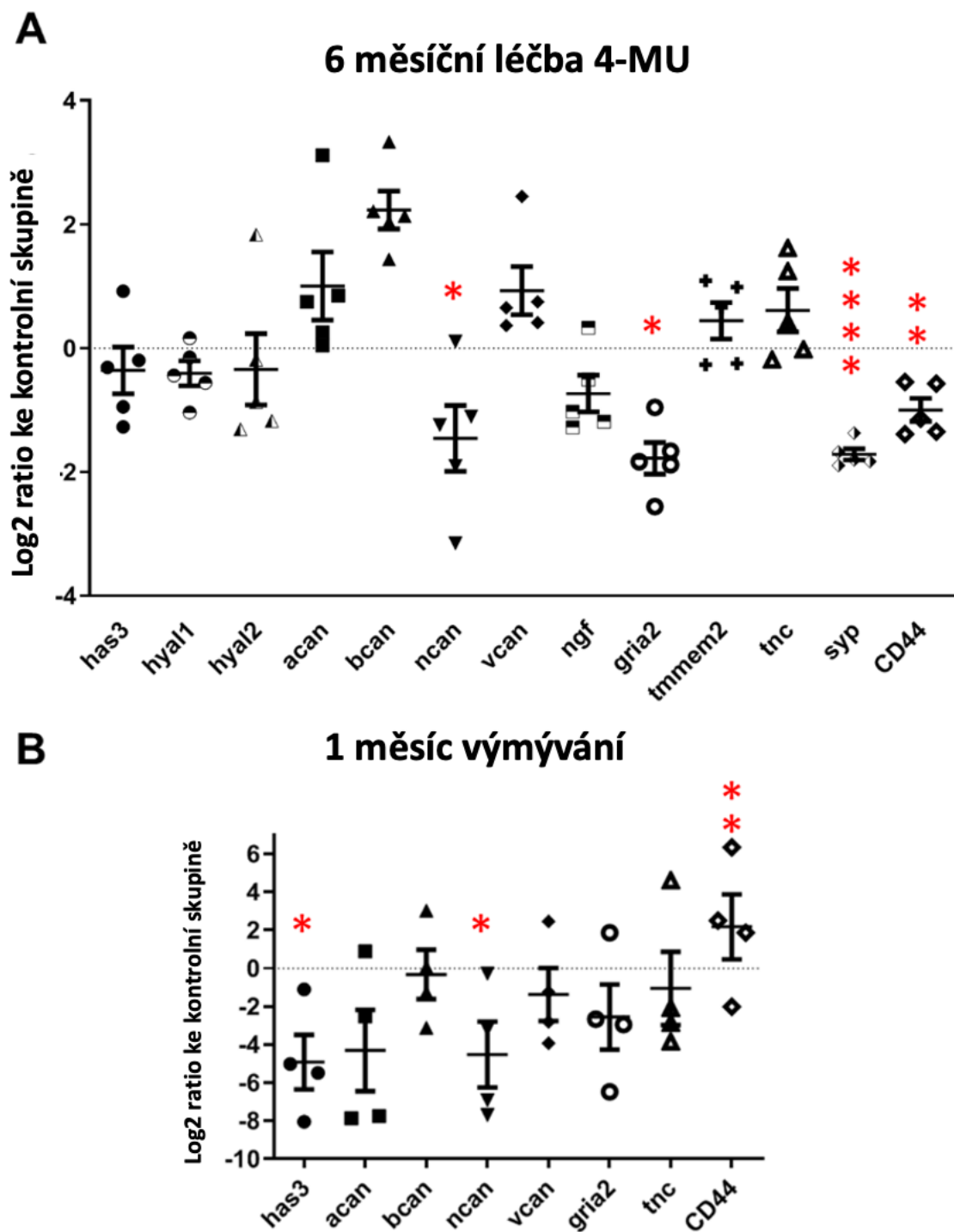
4.2.4. Změny genové exprese sledované pomocí RT-qPCR

Pro zkoumání vlivu léčby 4-MU na expresi genů souvisejících s metabolismem HA (has1-3, hyal1-3, tmmem2), signalizací (CD44) a neuroplasticitou (ngf, grla2, syp), jsme použili RT-qPCR analýzu (**Obr. 10**).

HA je syntetizována transmembránovými enzymy HAS1-3 a vytlačována na buněčný povrch, kde při interakci s jinými rozpustnými molekulami PNN tvoří PNN strukturu (Kwok et al., 2010). Každá izoforma HAS vykazuje různé enzymatické aktivity a různé požadavky na buněčnou zásobu UDP-cukrů *in vivo*. Zdá se, že HAS1 produkuje nízkou hladinu hyaluronanu v buňkách s nízkým obsahem nukleotidových cukrů, HAS3 produkuje HA vysokou rychlostí i při minimálním obsahu substrátu (Rilla et al., 2013) V mozečku jsou HAS2 a HAS3 produkovány cerebelárními neurony obklopenými PNN (Carulli et al., 2006). Na druhé straně bylo prokázáno, že genetická ablace syntézy HA v mozku geneticky modifikovaných myši Has3^{-/-} neodhalila žádné detekovatelné změny ve struktuře nebo složení PNN (Arranz et al., 2014), což by mohlo být způsobeno kompenzační regulací jiných HAS. *In vitro* léčba 4-MU snížila biosyntézu HA a expresi HAS2 a/nebo HAS3 v různých rakovinných buněčných liniích (Kultti et al., 2009; Saito et al., 2013), kostní dřeni

(Goncharova et al., 2012) nebo lidských kloubních chondrocytech (Ishizuka et al., 2016). V naší studii jsme pozorovali snížený trend exprese *has3* ve skupině myši léčené 4-MU po dobu 6-ti měsíců a významné snížení ve skupině 1 měsíc po léčbě. Expresi ostatních izoform *has1* a *has2* a rovněž HA degradující enzym *hyal3* nebyla detekována (**Obr. 10**). Kromě toho jsme také pozorovali významné snížení exprese receptoru pro HA, CD44. Tato data podporují předchozí studií, kde 4-MU reguluje expresi HAS (Rilla et al., 2013) a metabolismus HA vedoucí ke snížené tvorbě PNN.

U dalších klíčových složek PNN (*acan*, *bean*, *ncan*, *vcan*, *tnc*), došlo k významnému snížení exprese mRNA u *neurocanu* (*ncan*) po 6 měsících léčby 4-MU a rovněž měsíc po léčbě. *Neurocan* je jedním z klíčových CSPG vázajících HA v PNN a je silným inhibitorem neuronální a gliové adheze a vyrůstání neuritů. Snížení množství *ncan* by mohlo potenciálně vést k tolerantnějšímu prostředí, které podporuje neuroplasticitu. Pro sledování účinku 4-MU na související *down-regulaci* PNN a ECM při synaptické plasticitě, jsme určili také expresi pro nervový růstový faktor (*ngf*), AMPA-selektivní glutamátový receptor 2 (*gria2*) a synaptofyzin (*syp*). Pozorovali jsme signifikantní *down-regulaci* *syp* po 6 měsících léčby 4-MU. Pro *gria2* byla *down-regulace* pozorována jak ve skupině léčené 4-MU, tak ve skupině, která byla měsíc po léčbě. Tyto výsledky naznačují, že účinek 4-MU na mozkovou ECM byl dlouhodobý a nedochází k obnově struktur PNN, ani na úrovni genové exprese či na úrovni proteinů, a to ani 1 měsíc po ukončení léčby.

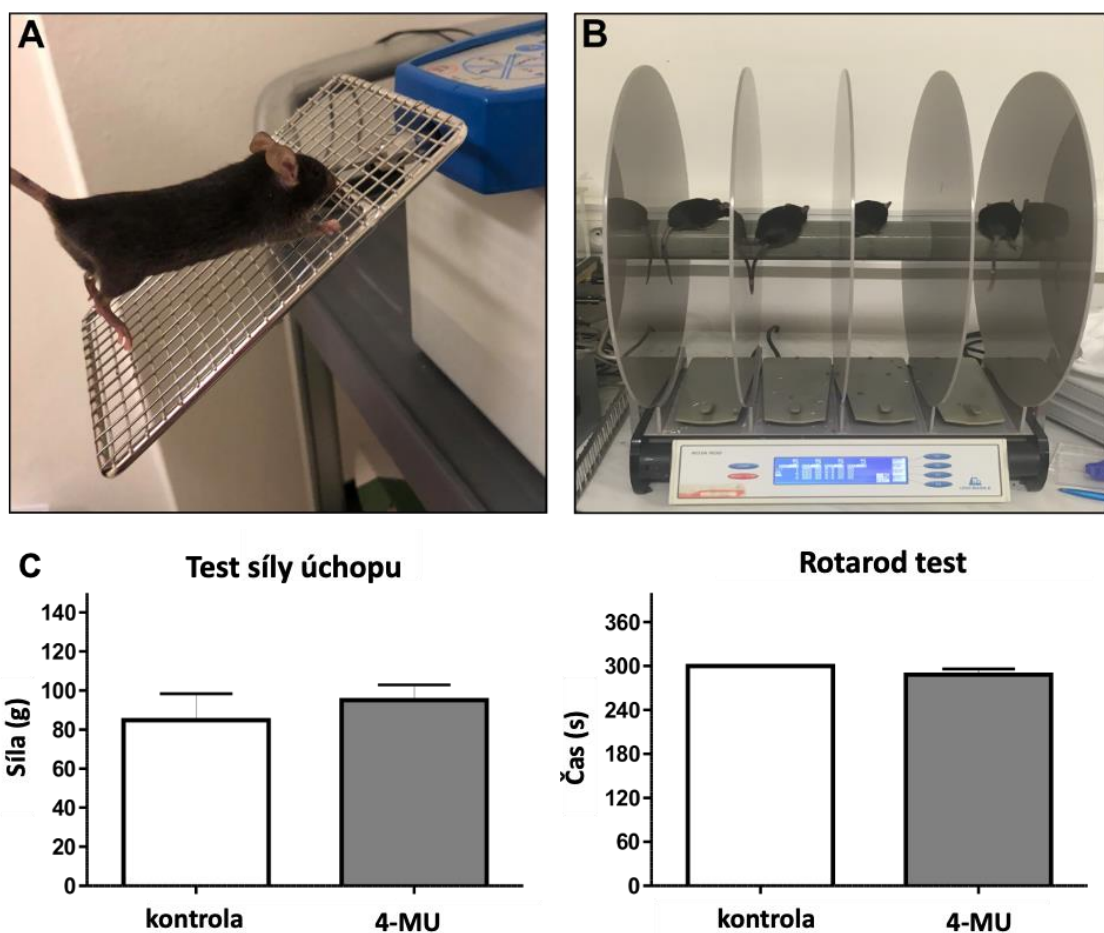


Obr. 10 mRNA exprese vybraných genů po (A) 6 měsících léčby 4-MU a (B) 1 měsíc po ukončení léčby. Významné změny exprese byly pozorovány u neurokanu (*ncan*), glutamátového ionotropního receptoru AMPA typu podjednotky 2 (*gria2*), synaptofyzinu (*syp*), (CD44) po 6 měsících léčby a u syntázy kys. hyaluronové typu 3 (*has3*), *ncan* a CD44 ve skupině 1 měsíc po léčbě ve srovnání s kontrolní skupinou. (kontrola $n=4$), (4-MU $n=5$), (1 měsíc po léčbě $n=4$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ vs. kontrola, jednosměrná ANOVA; Student-Newman-Keulsova metoda.

4.2.5. Histopatologická analýza vybraných tkání po dlouhodobé léčbě 4-MU

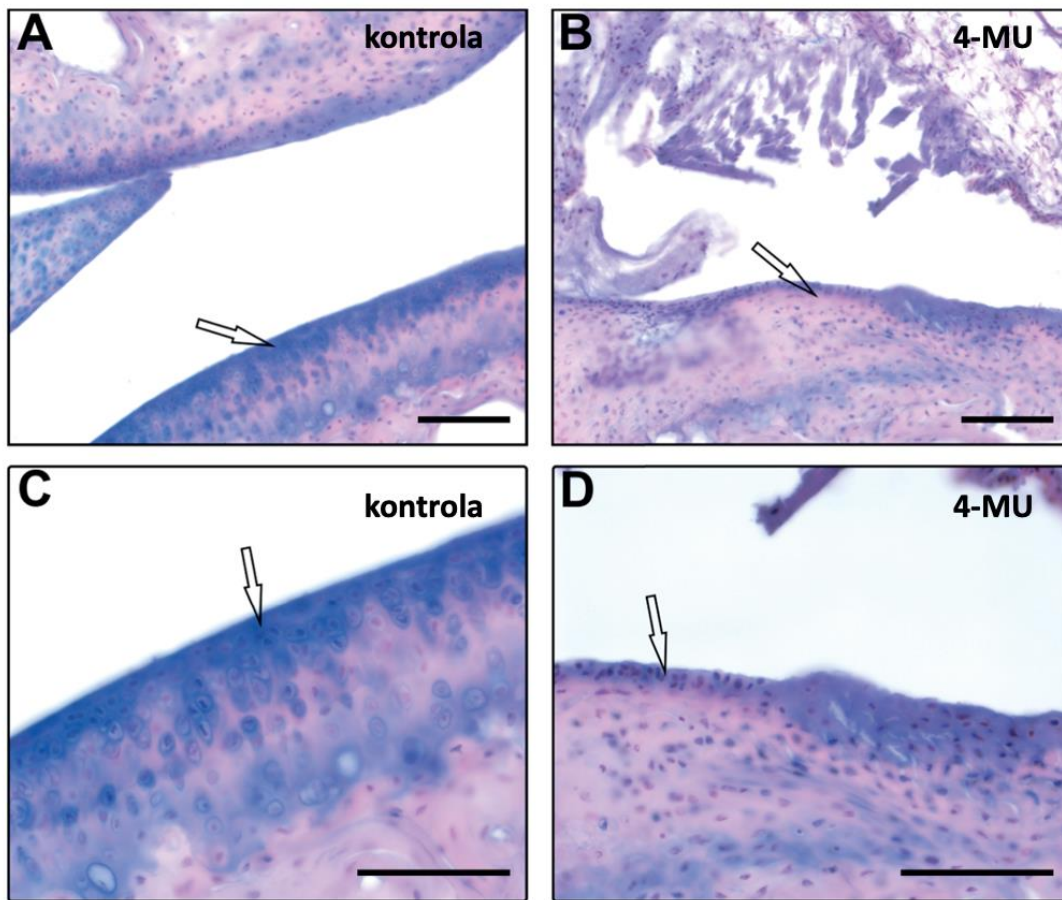
Kromě své nosné a lubrikační funkce v chrupavce plní HA řadu fyziologických funkcí v těle. Systémová inhibice syntézy hyaluronanu pomocí 4-MU (10 mg/g tělesné hmotnosti) u myši s deficitem apolipoproteinu E interferovala s ochrannou funkcí endoteliálního glykokalyxu, usnadňovala adhezi leukocytů, čímž podpořila následný zánět a progresi aterosklerózy (Nagy et al., 2010). Narušení produkce pomocí HA intravenózní injekce 4-MU (100 μ l 3mM roztoku) snížilo hematopoetickou aktivitu *in vitro* a snížilo migraci transplantovaných hematopoetických kmenových/progenitorových buněk do dřeně ozářených myši (Goncharova et al., 2012). Na druhé straně 4-MU snížilo prozánětlivou aktivaci kloubních chondrocytů a explantátů chrupavky *in vitro* prostřednictvím mechanismu nezávislého na HA (Ishizuka et al., 2016) nebo zmírnilo zánětlivou reakci na modelu myši artritidy (3 mg/g/den) a v lidských revmatoidních synoviálních fibroblastech (Yoshioka et al., 2013). Navzdory několika studiím o podávání 4-MU na různých modelech experimentálních onemocnění, stále chybí systematická histopatologická studie zabývající se potenciálními vedlejšími účinky vysokých dávek 4-MU. V současné studii jsme navodili dlouhodobou nespecifickou inhibici syntézy HA systémovou léčbou 4-MU v dávce ~6,7 mg/g/den. Dávka vychází z předchozí publikace (Nagy et al., 2015), ale je mnohem vyšší než schválená dávka hymerchromonu k léčbě žlučových spasmů. Pozoruhodné je, že LD50 4-MU pro perorální podání bylo hlášeno 2850 mg/kg u myši a 6200 mg/kg u potkanů (Bethesda (MD), 2021). Navzdory překročení hlášené orální LD50 (u myši) více než dvakrát, žádné zvíře během 6měsíčního krmení v naší studii nezemřelo a nebyly sledované žádné zjevné behaviorální následky, což naznačuje mnohem vyšší snášenlivost perorálního podání 4-MU, než bylo dříve uváděno v databázi Pubchem. Aktuální LD50 pro myši je uváděna z roku 1968 (Lontane et al., 1968) kde příprava léčiva a nečistoty mohly vést k pozorovanému rozdílu. V naší studii jsme použili farmaceutický 4-MU (5 % w/w), který se v několika předchozích studiích ukázal jako tolerovatelný, např. na modelu roztroušené sklerózy (Mueller et al., 2014), osteoartrózy (Tsuchiya et al., 2020) a diabetu (Sunkari et al., 2015). Na základě našich údajů a nedávných studií je nepochybně nutné přehodnotit LD50 pro perorální dávku 4-MU u myši. Abychom určili potenciální negativní efekt systémového podávání 4-MU na různé tkáně a jejich funkce, provedli jsme histopatologickou analýzu chrupavky, sleziny, jater a ledvin. Pomocí rotarodu a testu úchopu po 6 měsíční léčbě jsme sledovali, jestliže dlouhodobé systémové podávání 4-MU může poškodit chrupavky, což by mělo dopad na

pohybové schopnosti sledovaných myší. Výsledky použitých motorických testů (rodarod a test síly úchopu) ukazují, že zvířata nemněli problém s motorikou. V obou testech jsme nezjistili žádné rozdíly v rovnováze, koordinaci, motorickém plánování a ovládání předních končetin mezi léčenou a neléčenou skupinou (**Obr. 11**).



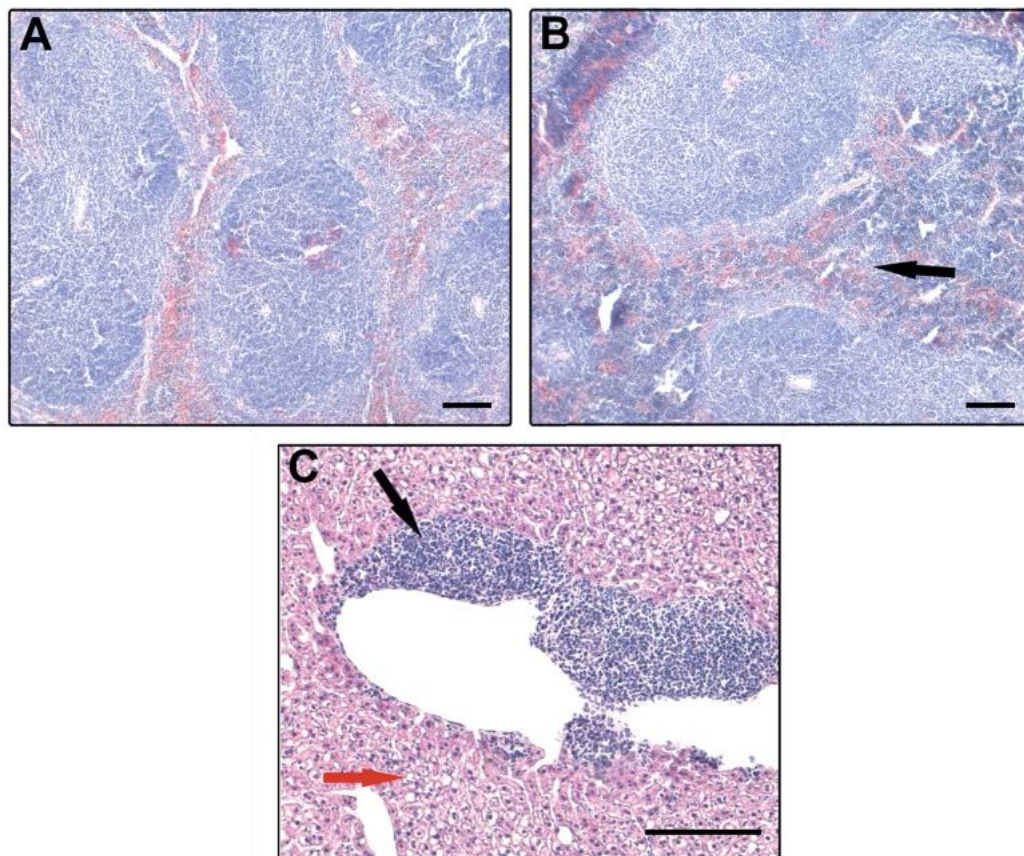
Obr. 11 (A) Test síly úchopu a (B) rotarod test. (C) Výsledky mezi kontrolní a léčenou skupinou neukázaly žádné změny v síle úchopu předních končetin ani motorických funkcí po 6 měsících léčby. (kontrola $n = 4$) (4-MU $n = 8$)

Ačkoli v rotarod testu ani testu úchopu nebyl pozorován žádný motorický deficit u sledovaných jedinců, při histopatologické analýze jsme pozorovali změny ve struktuře chrupavky u myší léčených 4-MU a to atrofii hyalinní chrupavky, kde byly pozorovány kostní trabekuly s reziduální, intermitentně se regenerující hyalinní chrupavkou (**Obr. 12**).

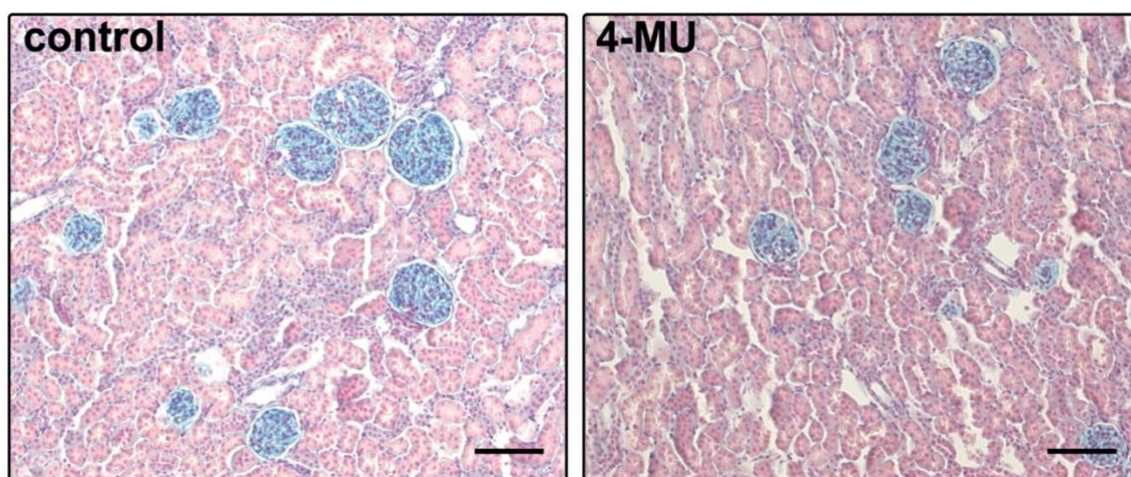


Obr. 12 Obarvená kloubní chrupavka Alcianovou modří. **(A, C)** Kloub v kontrolní skupině myši je pokrytý standardně silnými hyalinními chrupavkami. **(B, D)** Po léčbě 4-MU je pozorována atrofie hyalinní chrupavky a trabekuly se zbytkovými, intermitentně se regenerujícími hyalinními chrupavkami. Měřítka: A, B: 100 μm , C, D: 10 μm

Ve slezině (**Obr. 13B**) jsme pozorovali extramedulární hematopoézu a známky anémie u skupiny léčené 4-MU, což by mohlo naznačovat kompenzaci narušené krvetvorby v kostní dřeni po léčbě 4-MU, popsané v (Goncharova et al., 2012). V játrech kontrolních zvířat i zvířat léčených 4-MU byla detekována steatóza i extramedulární hematopoéza (**Obr. 13C**), což bylo pravděpodobně způsobeno vysokým obsahem tuku v použitém krmivu (1,25 % cholesterolu), které jsme použili ke snížení úbytku hmotnosti zvířat při léčbě 4-MU (H. F. Kuipers et al., 2016). V ledvině jak u kontrolní, tak u léčené skupiny nebyly zjištěny žádné patrné změny glomerulů a tubulů (**Obr. 14**).



Obr. 13 Ilustrativní HE barvení sleziny (**A, B**) a jater (**C**) u kontroly (**A, C**) a po 6-ti měsících léčby 4-MU (**B**). (**A**) Normální pohled na slezinu u kontrolního zvířete. (**B**) Po léčbě 4-MU byl pozorován mírně snížený obsah erytrocytů se známkami extramedulární hematopoézy ve slezině (černá šipka). (**C**) Lehká steatóza (**C-červená šipka**) s extramedulární hematopoézou (**C-černá šipka**) byla detekována v játrech v kontrolní, tak ve 4-MU skupině (ilustrativní obrázek). Měřítka: **A, B** 100 μm , **C** 10 μm



Obr. 14 *Ilustrativní HE barvení ledvin u kontroly a po 6 měsících léčby 4-MU. Mezi kontrolní a léčenou skupinou nebyly zjištěny žádné významné změny glomerulů a tubulů. Měřítko: 100 μ m*

Histopatologické pozorování při užití tak vysoké dávky 4-MU prokazovalo spíše mírné komplikace a celkově dobrou toleranci léčiva.

Dlouhodobá systémová léčba 4-MU po dobu 6ti měsíců vedla k atrofii chrupavky, která ale neovlivnila motorické funkce. Měly by být provedeny další studie, které by systematicky prozkoumaly všechny potenciální nežádoucí účinky 4-MU v jiných orgánech, a to například v játrech, slezině či kloubech, a to i v dlouhodobějším intervalu léčby.

4.3. Použití ECM vytvořené z lidských pupečnicků ve fototrombotické lézi

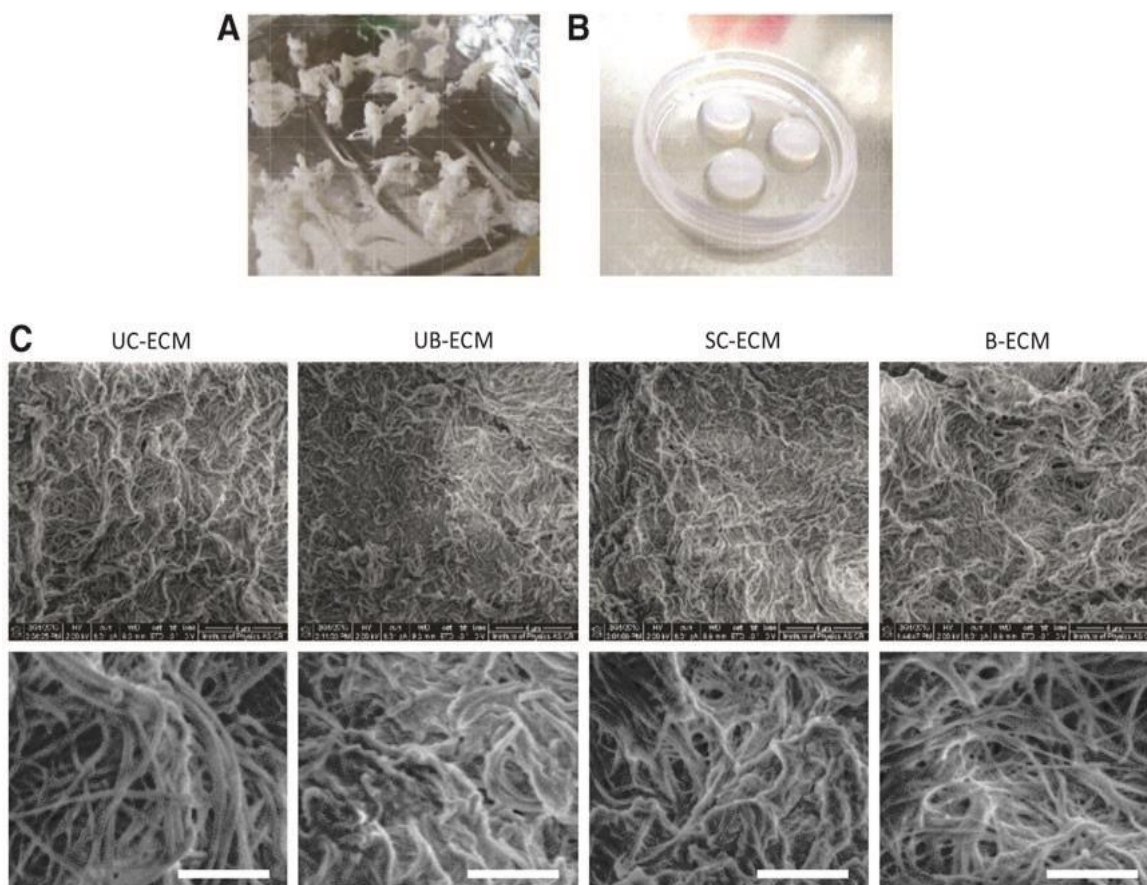
Obnova architektury a funkcí nervové tkáně hraje klíčovou roli v léčbě poraněného centrálního nervového systému (CNS). Pro rekonstrukci poškozené nervové tkáně bylo vyvinuto a implementováno několik strategií na zvířecích modelech. Jednou z těchto strategií je přemostění léze pomocí biomimetického lešení, které je schopno vyplnit dutinu léze a poskytnout potřebné mikroprostředí pro remodelaci nervové tkáně.

Jako tkáňové lešení pro opravu nervové tkáně byly použity různé syntetické a přírodní hydrogely (Bellamkonda et al., 1995; Geller and Fawcett, 2002; Kubinová and Syková, 2012; Schmidt and Leach, 2003) ale tyto materiály obvykle nedokážou napodobit komplexní strukturu a složení nativní tkáně. Decelularizované tkáně mohou být transformovány na lešení přírodního původu a v různých aplikacích použité v tkáňovém inženýrství (Spang and Christman, 2018). Tyto biologické nosiče, složené z nativní extracelulární matrix (ECM), mají mnoho výhod, včetně trojrozměrné (3D) struktury, nízké imunogenicity a komplexního biomolekulárního složení (Kubinová, 2017; Saldin et al., 2017), které slouží jako biologické lešení. Pro rekonstrukci nervových nebo jiných měkkých tkání jsou ECM ve formě hydrogelů klinicky přijatelnější, neboť tyto materiály si zachovávají svou biologickou aktivitu v kombinaci s výhodou možnosti injekční aplikace a *in situ* polymerizace. Injikovatelné ECM hydrogely z různých tkání byly už dříve použity pro léčbu poraněné míchy (Tukmachev et al., 2016), mrtvice (Freytes et al., 2008), po infarktu myokardu (Singelyn and Christman, 2010), kritické ischemie končetiny (Ungerleider et al., 2016) a vývoje nové tukové tkáně (Young et al., 2011). V následujících studiích jsme připravovali ECM z prasečí a lidské tkáně. ECM z lidských pupečnicků byla posléze implantována do

fototrombotické léze, kde byla sledovaná její degradace a imunogenicitu. Rovněž jsme se zaměřily na degradaci vytvořeného materiálu a jeho stabilizaci pomocí kovalentního zesíťování genipinem.

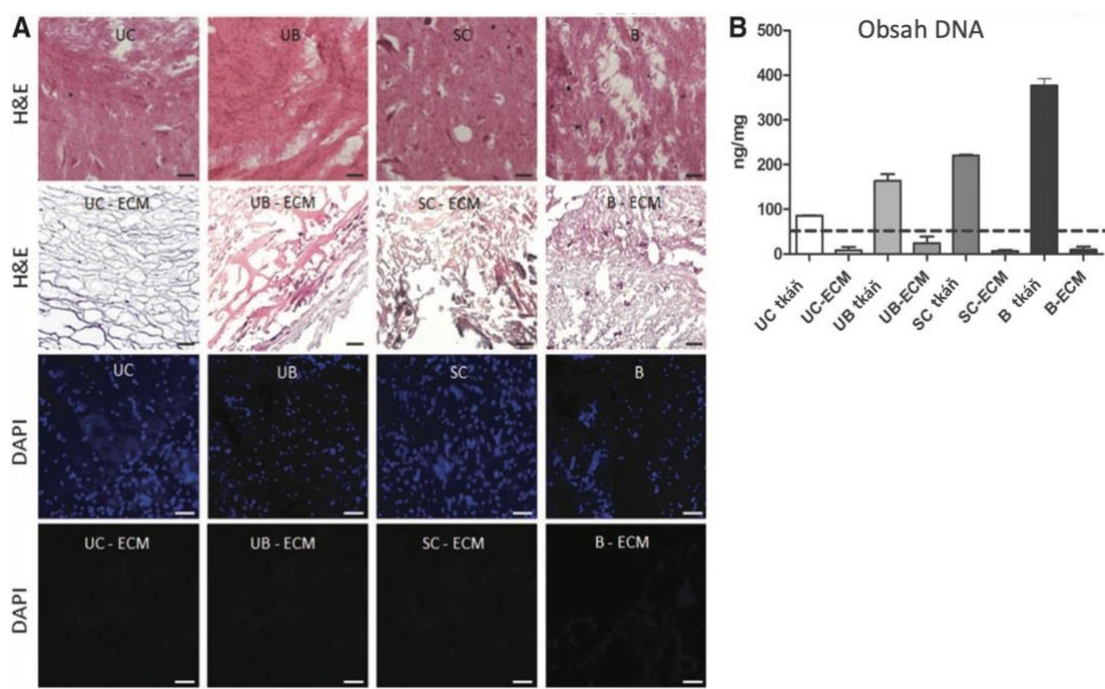
4.3.1. Příprava UC-ECM z lidských pupečnicků

V této studii jsme optimalizovali protokol decelularizace, jak popsal (Medberry et al., 2013), abychom připravili injikovatelný hydrogel z lidské pupečnickové tkáně, který kombinuje výhody neonatální tkáně lidského původu se snadnou dostupností, bez jakýchkoli etických nebo regulačních opatření. Vzhledem k vysokému množství kyseliny hyaluronové, která způsobuje masivní bobtnání tkání navazováním vody, vyžadoval decelularizační postup UC-ECM více promývacích kroků v dH₂O a PBS k důkladnému odstranění buněk z ECM. Důležité bylo zjištění, že míchání tkáně v trypsinu/EDTA bylo nezbytným krokem k dosažení gelovatění výsledného ECM hydrogelu (**Obr. 14AB**).



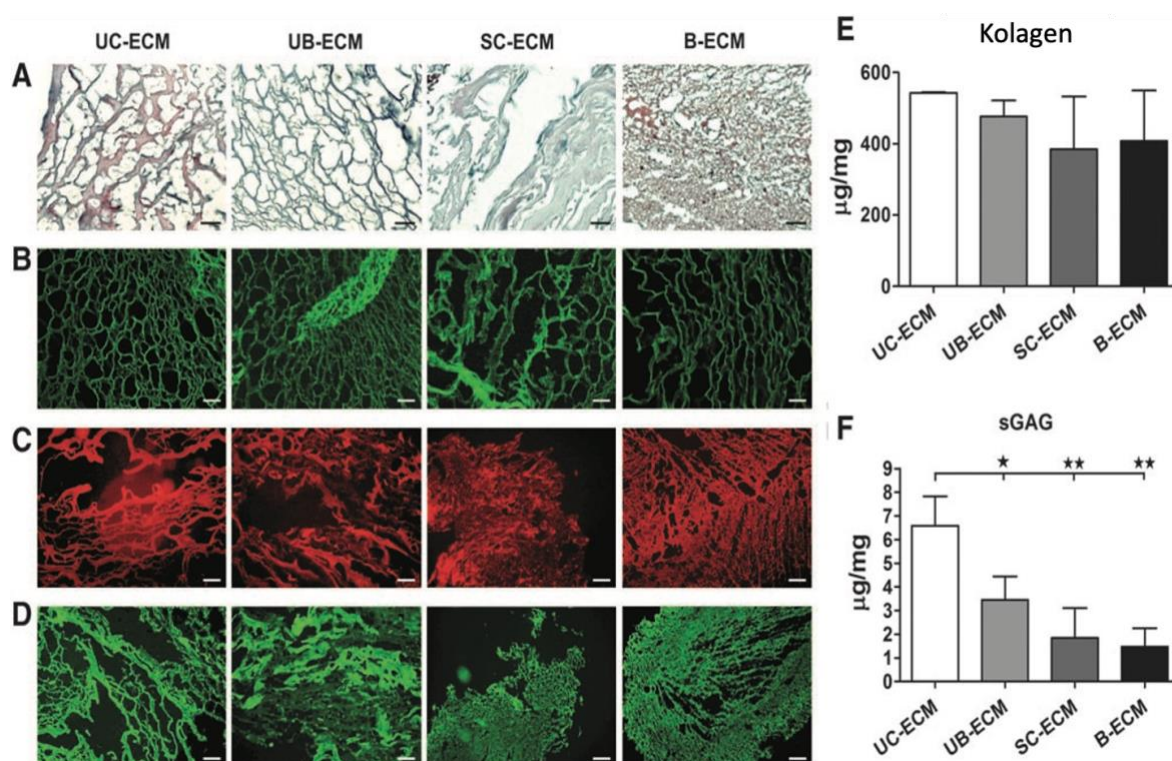
Obr. 14 (A) UC-ECM po procesu decelularizace. (B) UC-ECM ve formě hydrogelu. (C) Reprezentativní obrázky ze skenovací elektronové mikroskopie UC-ECM, UB-ECM, SC-ECM a B-ECM. Měřítka představuje 1 μm .

UC-ECM byla úspěšně decelularizována s minimálním buněčným obsahem v skeletu. Barvení H&E a DAPI potvrdilo nepřítomnost reziduálních buněčných jader (**Obr. 15A**). Předchozí studie (Crapo et al., 2011; Ghuman et al., 2016; Leung et al., 2012) ukazují, že DNA obsažená v ECM by neměla překročit 50 ng/mg tkáně, aby nedošlo k vyvolání imunitní reakce u příjemce. Náš protokol decelularizace UC zajistil účinné odstranění buněk a výsledná UC-ECM obsahovala <50 ng nebo žádnou reziduální dsDNA, a proto splnila základní požadavek pro klinickou aplikaci. Rovněž jsme decelularizovali i prasečí tkáň, a to konkrétně močový měchýř (UB- urinary bladder), míchu(SC- spinal cord) a mozek (B- brain), z kterých jsme pak vytvořili ECM pro porovnání účinnosti nově vytvořeného materiálu z lidského pupečníku s materiály použitými v předešlých studiích (DeQuach et al., 2010; Medberry et al., 2013).



Obr. 15 (A) První řada: H&E barvení (zleva doprava) řezů UC, UB, míchy (SC) a mozku (B) před decelularizací. Druhá řada: H&E barvení UC-ECM, UB-ECM, SC-ECM a B-ECM po decelularizaci. Třetí řádek: DAPI barvení na DNA (zleva doprava) UC, UB, SC a B řezů tkáň před decelularizací. Čtvrtý řádek: Barvení DAPI na obsah zbytkové DNA v UC-ECM, UB-ECM, SC-ECM a B-ECM. Měřítko představuje 50 μ m. **(B)** kvantifikace dsDNA. Tečkovaná čára ukazuje maximální povolené množství dsDNA (50 ng/mg) na mg suché hmotnosti. Data jsou zobrazena jako průměr – standardní chyba průměru, $n=3$.

Fetální a novorozenecké tkáně obecně obsahují vysoké hodnoty GAG (Leung et al., 2012), což jsme také pozorovali v derivované pupečníkové UC-ECM, která vykazovala velký obsah těchto molekul, zahrnujících taky chondroitin sulfáty, heparin, heparan sulfát a kyselinu hyaluronovou. GAG obsáhnuté ve vytvořené UC-ECM jsme zobrazily pomocí barvení alciánovou modří (**Obr. 16A**) Stejně tak byly sledovány molekuly kolagenu (**Obr. 16B**), lamininu (**Obr. 16C**) a fibronektinu (**Obr. 16D**). Tyto molekuly mohou vázat cytokíny a růstové faktory, jako je bFGF, což může také přispívat k rekonstrukci nervové tkáně. (Crapo et al., 2012; Badylak, 2004; Horn et al., 2007; Seif-Naraghi et al., 2012; Wang and Spector, 2009)

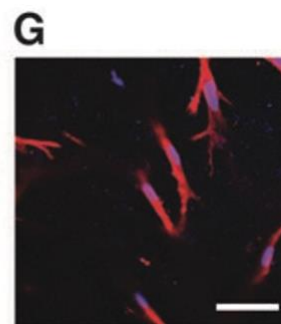
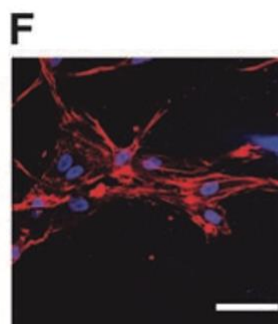
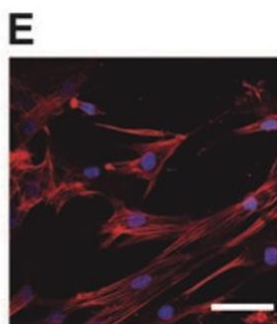
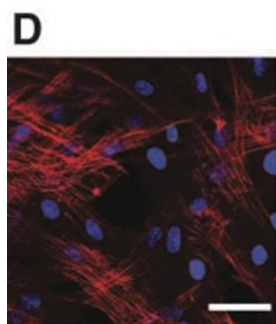
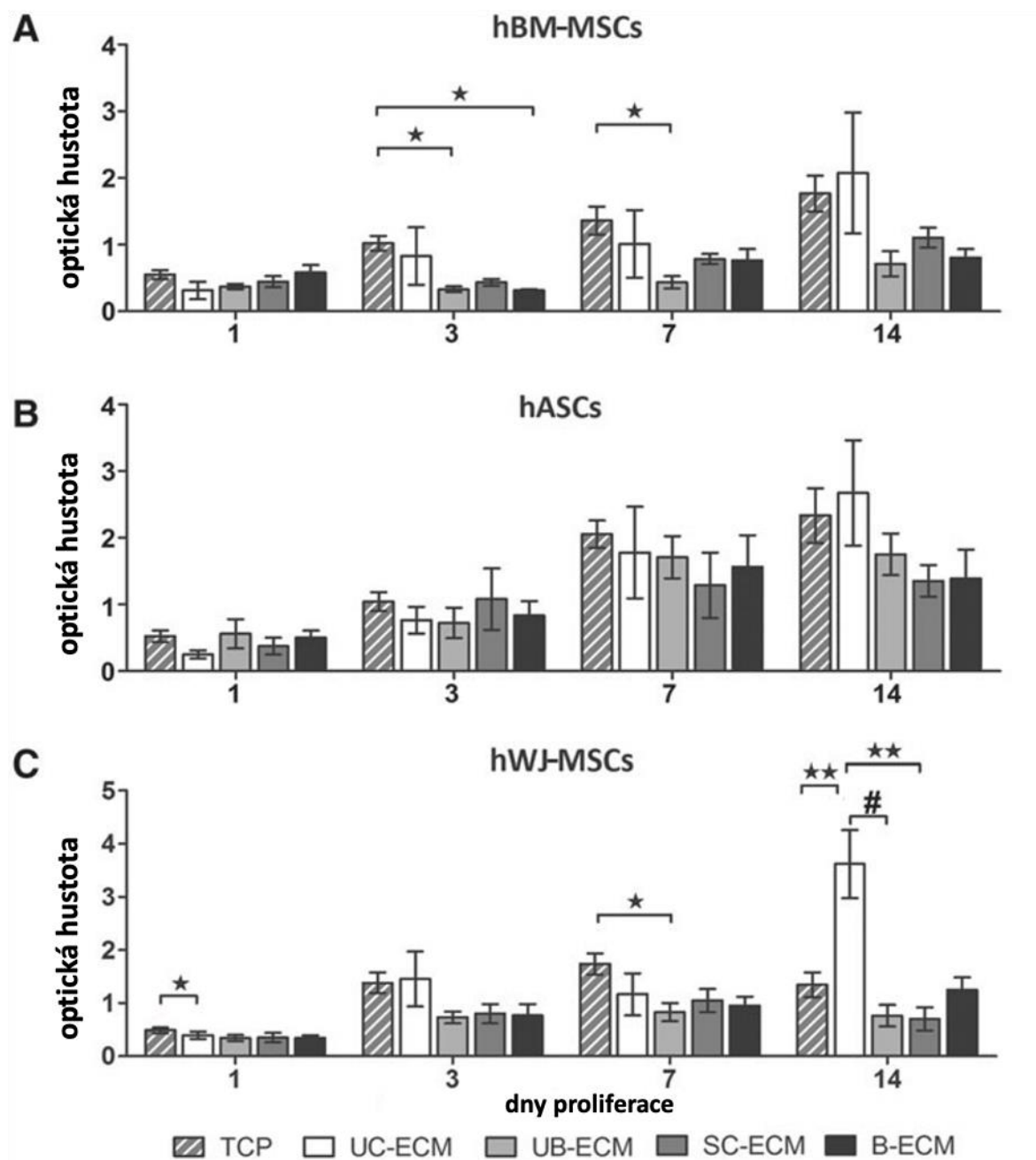


Obr. 16 (A) Barvení alciánovou modří pro kyselé mukopolysacharidy v lidské UC-ECM, prasečí UB-ECM, SC-ECM a B-ECM. (B) Imunohistochemická lokalizace kolagenu, (C) lamininu a (D) fibronektinu. Měřítko představuje 100 μm. (E) Obsah kolagenu a (F) sGAG na mg suché hmotnosti jednotlivých ECM pomocí kolorimetrických činidel. Data jsou zobrazena jako průměr – standardní chyba průměru. *p<0,05, **p<0,01, n=3. sGAG, sulfatovaný glykosaminoglykan.

4.3.2. Potvrzení buněčné proliferace a podpora neuronového růstu *in vitro* a biokompatibilitu *in vivo* na modelu fototrombotické léze

Pro zjištění kompatibility námi vytvořeného UC-ECM jsme materiál testovaly *in vitro* ve 4 typech testů, a to proliferace a chemotaxe hWJ-MSC, hBM-MSC a hASC, podpora prorůstání neuritů za použití explantátových kultur z potkaních DRG a určení neuronové diferenciace NSC na UC-ECM. Rovněž jsme sledovali kompatibilitu UC-ECM v mozkové tkáni *in vivo* pomocí aplikace UC-ECM do fototrombotické léze v potkaním modelu.

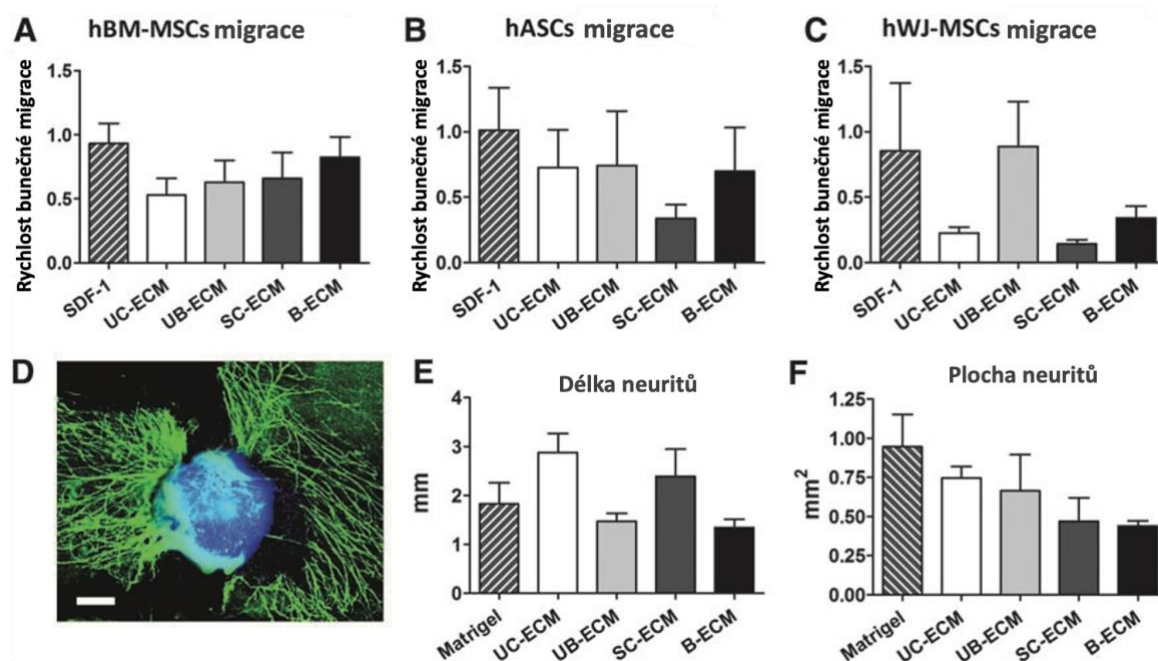
Z některých studií vyplývá, že ECM nosič, který je odvozen z původního typu tkáně, nacházející se v místě poranění, může mít jedinečné složení molekulárních složek pro indukci konstruktivní tkáňově specifické remodelace. Například srdeční ECM prokázalo schopnost poskytovat tkáňově specifické podněty pro růst a diferenciaci srdečních buněk (Wang and Christman, 2016). Rovněž ECM ze skeletálního svalu specifického pro tkáň odhalilo lepší výsledky při léčbě kritické ischemie končetiny ve srovnání s UC-ECM (Ungerleider et al., 2016). Naproti tomu, jiné studie neprokázaly výhodu ECM odvozených z CNS oproti materiálům ECM nepocházejícím z CNS, pokud jde o jejich účinky na *in vitro* růst neuritů (Crapo et al., 2012; Leung et al., 2012), nebo *in vivo* neurotrofické vlastnosti při opravě poranění míchy (Tukmachev et al., 2016). Při sledování proliferace jsme v naší studii pomocí eseje WST-1 po 1/3/7 a 14 dnech. Vyšší proliferace buněk hWJ-MSCs byla zjištěna po 14tich dnech kultivace na UC-ECM v porovnání s kontrolní skupinou. V intervalech 1, 3 a 7 dní jsme nepozorovali signifikantní rozdíly mezi oběma skupinami (**Obr. 17**).



Obr. 17 (A) Porovnání proliferace hBM-MSc, (B) hASC, (C) a hWJ-MSc na lidské UC-ECM, prasečí UB-ECM, SC-ECM, B-ECM a kontrolní TCP na 1, 3, 7 a 14 dní s použitím činidla WST-1. Rychlost proliferace byla hodnocena na spektrofotometru a znázorněna jako optická hustota. (D) Morfologie proliferujících hWJ-MSc na UC-ECM, (E) UB-ECM, (F) SC-ECM a (G) B-ECM byla znázorněna po 14 dnech. Data jsou zobrazena jako střední – standardní chyba průměru. Měřítka představuje 50 μm . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,001$, $n = 6$. hASC, buňky stromatu odvozené z lidské tukové tkáně; hBM-MSc, lidské mezenchymální kmenové buňky izolované z lidské kostní dřeně; hWJ, lidské Whartonovo žele; TCP, plast pro tkáňové kultury.

Pro sledování migrace jsme použili migrační esej, která prokázala chemotaktickou aktivitu a stimulaci migrace pomocí UC-ECM pro všechny typy MSC.

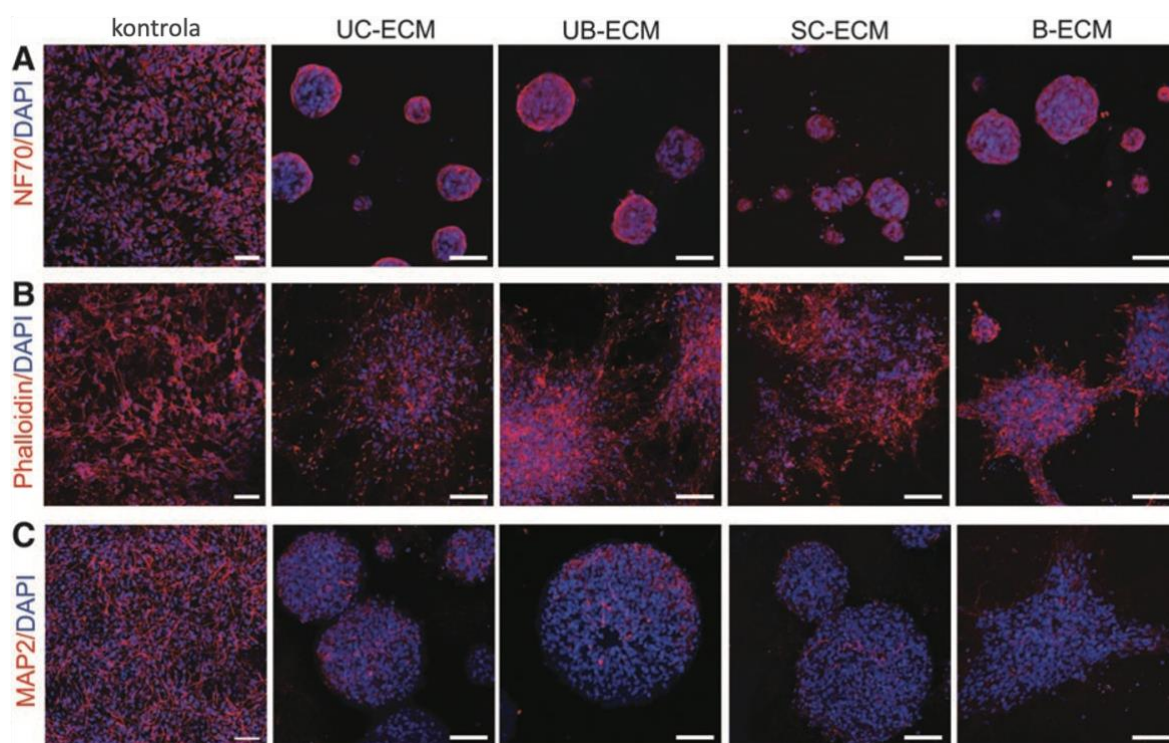
V dalším testu jsme se snažili ověřit schopnost ECM hydrogelů podporovat přerůstání neuritů na DRG explantátových kulturách z potkaní míchy. Po 7 dnech kultivace neurity hustě vyčnívaly z těl DRG bez signifikantních rozdílů v délce nebo ploše neuritů mezi hydrogelem a Matrigelem, který sloužil jako pozitivní kontrola (**Obr. 18**).



Obr. 18 Chemotaktické vlastnosti hydrogelů ECM zkoumané pomocí xCELLigence® RTCA DP Cell Invasion and Migration Assay ukazující migraci (A) hBM-MSc, (B) hASC a (C) WJ-MSc směrem k UC-ECM, UB-ECM, SC-ECM a B-ECM 6 hodin po naočkování. Výsledky jsou normalizovány ke kontrole (kultivační médium bez doplňků) ($n = 5$).

(D) Kultivace explantátu DRG na hydrogelu UC-ECM barveném DAPI a NF160. DRG byly kultivovány po dobu 7 dnů na UC-ECM a Matrigelu a nejdelší délka neuritů **(E)** a plocha neuritů **(F)** byly určeny pomocí NeuriteJ ImageJ plug-in. Data jsou zobrazena jako průměr – standardní chyba průměru, ($n = 3$). Měřítka představuje 200 μm . DRG-ganglion dorzálních kořenů míšních.

V minulých studiích se ukázalo, že jedinečné složení a mikrostrukturální rysy ECM mají vliv na řízení buněčného růstu a vývoje (*cell fate*) nebo morfologii (Bonnans et al., 2014). Abychom sledovali neurotrofické vlastnosti hydrogelu UC-ECM, určili jsme nervovou diferenciaci kultury NSC. NSC rostli na hydrogelu UC-ECM a po 7 dnech vykazovaly expresi časného neuronálního markeru NF70 **(Obr. 18)**. Zároveň je třeba poznamenat, že na rozdíl od rozptýlených NSC kultivovaných na krycích sklíčkách potažených lamininem, mají NSC pěstované na hydrogelech UC-ECM tendenci růst v odlišných shlucích s ohraničenými hranicemi. Po 14 dnech v kultuře NSC proliferovaly a diferencovaly se na neuronové buňky pozitivní na neuronální marker MAP2 **(Obr. 19C)**.

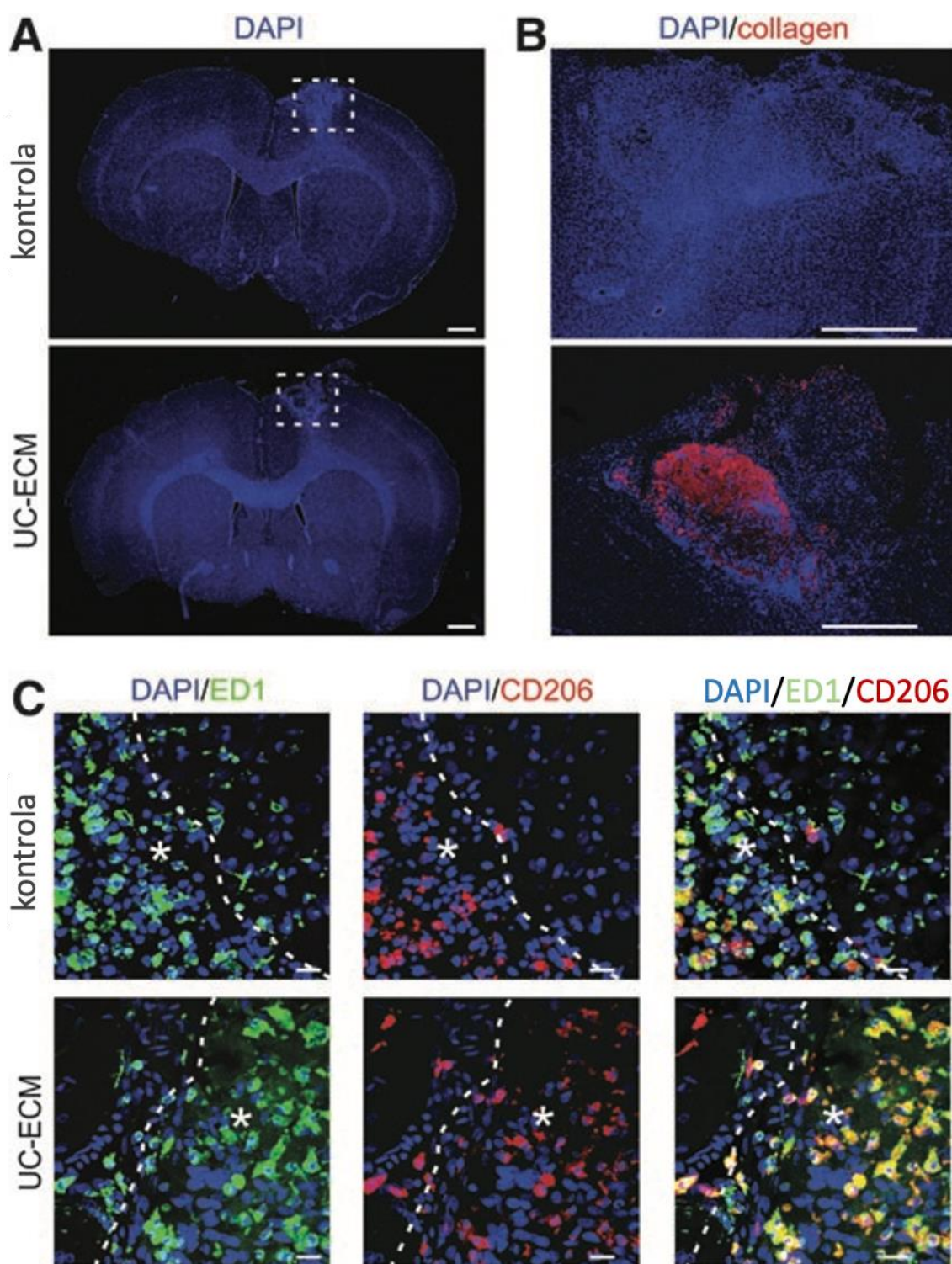


Obr. 19 **(A)** Růst a diferenciaci NSC linie SPC-01 na krycích sklíčkách potažených lamininem (kontrola) a na UC-ECM, UB-ECM, SC-ECM a B-ECM. Imunobarvení na neurofilamenta NF70 a DAPI po 1 týdnu v kultuře, **(B)** phalloidin a DAPI po 2 týdnech v

kultuře a (C) MAP2 a DAPI po 2 týdnech v kultuře. Měřítko 50 μ m. NSC-neurální kmenová buňka.

4.3.3. In vivo hodnocení ECM hydrogelu

Nakonec jsme *in vivo* prokázali gelaci a biokompatibilitu UC-ECM na potkaním modelu fototrombotické léze, kde jsme injekčně aplikovaly 10 μ l hydrogelu do fokální ischemické léze vytvořené v motorické kůře potkana. Jak je ilustrováno na **Obr. 20AB** na barvení kolagenem a DAPI po 24 hodinách, UC-ECM vytvořil uvnitř léze kompaktní hydrogel, který byl vysoce osídlen endogenními buňkami. Hostitelské makrofágy byly převládajícím buněčným typem přítomným v lézi a také UC-ECM byla hustě infiltrována rezidentními makrofágy s převládajícím fenotypem podobným M2-buňky CD206+ (75,7 % $\pm$ 5,0 % všech infiltrujících buněk v gelu, n = 3). (**Obr. 20C**)



Obr. 20 Koronální řezy mozku ilustrující gelaci *in vivo* a buněčnou infiltraci hydrogelu UC-ECM 24 hodin po implantaci do fototrombotické ischemické léze v motorické kůře potkana. **(A, B)** Fyziologický roztok (kontrolní léze, první řada) a UC-ECM hydrogel (druhá řada) byly injikovány do místa léze 7 dní po indukci léze. **(A)** Barvení na buněčná jádra (DAPI). Měřítka představuje 1 mm. **(B)** Barvení na DAPI (modrá) a kolagen I (červená). Měřítka představuje 500 μ m. **(C)** Infiltrace makrofágů do kontrolní léze a hydrogelu UC-ECM je

znázorněna barvením ED1 (zelená) a CD206 (červená). Buněčná jádra byla obarvena na DAPI (modrá). Tečkovaná čára ukazuje hranici léze a intaktní mozkovou tkáň, hvězdička představuje místo léze. Měřítko představuje 20 μ m.

Fenotyp makrofágů podobný M2 byl také nalezen pomocí SC-ECM a UB-ECM hydrogelu u potkaního poranění míchy (Tukmachev et al., 2016) a UB-ECM injikovaného do krysích dutin střední cerebrální ischemické léze (Ghuman et al., 2016). M2-pozitivní makrofágová infiltrace v reakci na acelulární ECM pozitivně korelovala s konstruktivní remodelací hostitelské tkáně, zatímco fenotyp M1 vedl k ukládání husté pojivové tkáně a zjizvení tkáně v delším časovém období (Badylak, 2014; Brown et al., 2009). Tyto výsledky rozšiřují dříve popsané ECM hydrogely a prokázaly UC-ECM jako snadno dostupný materiál lidského původu, který poskytuje vhodné mechanické a bioaktivní vlastnosti vhodné pro opravu CNS.

4.4. Stabilizace UC-ECM hydrogelů za pomoci síťování genipinem

Kontrola degradace skeletu ECM je nezbytná pro proces konstruktivní remodelace tkáně, protože degradující biomateriál je postupně nahrazován endogenními buňkami, které vytvářejí nový funkční ekvivalent ECM na rozdíl od zjizvené tkáně (Kubinova, 2017).

V naší předchozí studii jsme připravili a charakterizovali ECM hydrogel odvozený z lidské pupeční šňůry a zjistili jsme, že je srovnatelný s ECM hydrogely odvozenými z CNS a non-CNS prasečích tkání (Kočí et al., 2017). Jak bylo ukázáno v našich předchozích studiích, a navzdory výhodným bioaktivním vlastnostem, vykazují fyzikálně zesíťované hydrogely ECM slabou strukturální stabilitu a rychlou *in vivo* degradaci při aplikaci do akutní nebo subakutní léze CNS, což zase omezuje jejich použití pro aplikaci *in vivo*. Rovněž jsou při zánětlivých stavech implantované hydrogely ECM rychle naplněny rezidentními buňkami, což výrazně zrychluje rychlost degradace skeletů na bázi ECM (Tukmachev et al., 2016).

Zpomalující degradace může také prodloužit přítomnost bioaktivní matrice ECM v lézi CNS a umožnit tak rezidentním buňkám a axonů repopulaci ECM lešení, což umožní remodelaci tkáně a funkční přemostění léze. Náročný problém při aplikaci biomateriálů pro neurální regeneraci představuje degradovatelnost ECM v místě aplikace. Z těchto důvodů se hledají netoxické, biokompatibilní a reprodukovatelné techniky k prodloužení a kontrole degradovatelnosti ECM hydrogelů. Abychom tento problém vyřešili, v této studii jsme se zaměřili na zvýšení odolnosti hydrogelů ECM proti degradaci *in vivo* kovalentním zesíťováním pomocí genipinu a vyhodnocení proveditelnosti zesíťovaných materiálů *in vitro*

se zaměřením na jejich biokompatibilitu a podporu vývoje neuronů. Běžnou metodou pro snížení degradace různých biomateriálů je jejich chemické síťování. Formaldehyd nebo glutaraldehyd jsou běžnými činidly používané pro stabilizaci ECM (Schoen et al., 1988; Xi-xun et al., 2008) nicméně vysoká cytotoxicita a potenciální indukce zánětlivé reakce brání použití těchto sloučenin jako implantátů v nervové tkáni (Schmidt and Baier, 2000; Speer et al., 1980). Z tohoto důvodu bylo jako kandidát pro zlepšení stability ECM hydrogelů vybráno necytotoxické síťovadlo genipin (Sung et al., 2003, 1998).

Genipin je přírodní síťující nízkotoxická látka pocházející z plodů gardénie. Tato molekula je běžně užívána díky své nízké cytotoxicitě jako stabilizátor struktury, např. kolagen, želatina, chitostan nebo ECM matrice (Ma et al., 2014; Macaya et al., 2011). Váže proteiny nebo peptidy, jako je kolagen, který je nejvýznamnější sloučeninou ECM. Tato látka dokáže přemostit volné aminoskupiny lysinových nebo hydroxylysinových zbytků různých polypeptidových řetězců monomerními nebo oligomerními síťovými vazbami v kolagenu (Macaya et al., 2011; Sung et al., 2003, 2001, 1998). Kromě toho se skelet ECM skládá z podstatného množství glykosaminoglykanů a také dalších proteinů, které mohou tvořit další substrát pro proces síťování (Kočí et al., 2017). Ke stabilizaci skeletů ECM bylo zesíťování genipinem použito už v předešlých studiích v hydrogelu myokardu (Wassenaar et al., 2016), decelularizované míše (Jiang et al., 2013) nebo v decelularizovaných štěpech z celých jater (Wang et al., 2016), kde se ukázalo, že má nižší cytotoxicitu a *in vivo* imunogenicitu, než jejich protějšky ošetřené glutaraldehydem. Kromě toho má genipin řadu klíčových farmakologických vlastností, jako jsou protizánětlivé, neuroprotektivní, neurogenní a antidepressivní účinky, které této sloučenině poskytují terapeutický potenciál pro onemocnění CNS (Li et al., 2016). Z těchto důvodů jsme v naší další studii opět použili ECM odvozený z lidských pupečnicků, kterou jsme zesíťovali genipinem pro zlepšení strukturální stability a vyhodnotili jsme schopnosti získaných materiálů pro opravu nervové tkáně.

Naše práce navazovala na předešlou studii, a proto ověření biokompatibility *in vitro* jsme stanovovali pomocí proliferace lidských mezenchymálních kmenových buněk (MSC), axonálního růstu disociovaných neuronů z dorzálních kořenových ganglií dospělých potkanů a růstu a diferenciaci lidských fetálních nervových kmenových buněk. Pro ověření vlastností zesíťovaných hydrogelů *in vivo* jsme materiál testovali opět na modelu subakutní fototrombotické kortikální ischemické léze u potkanů, kde byla potvrzena gelace *in situ* a rovněž prodloužená retence zesíťovaných hydrogelů.

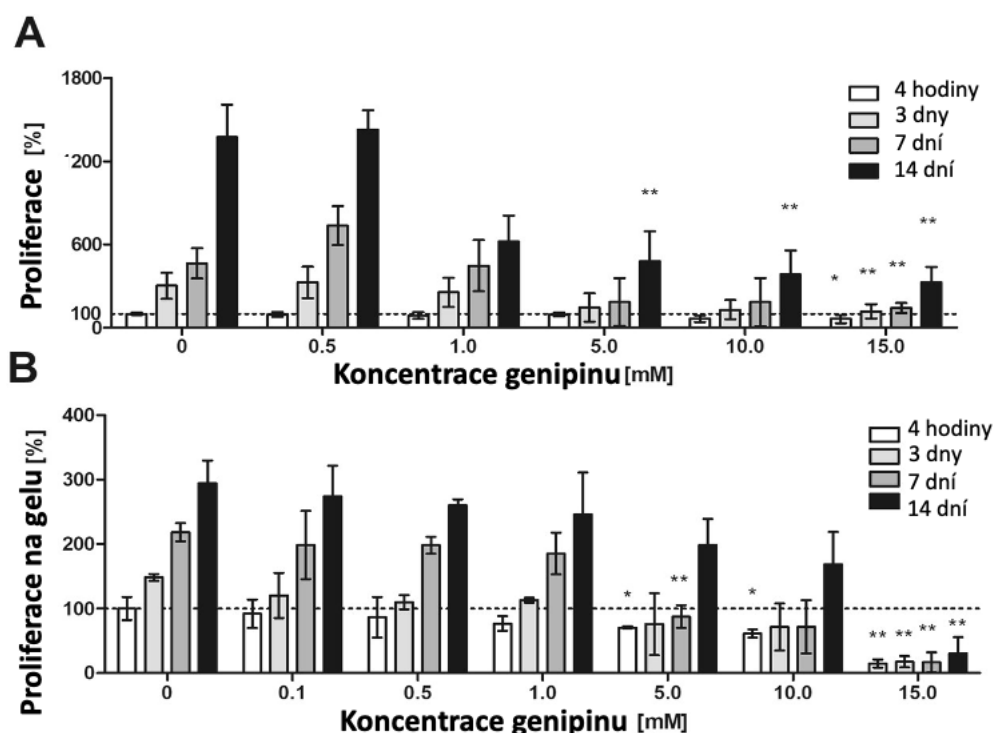
V naší předchozí studii jsme charakterizovali strukturu a složení hydrogelu ECM derivovaného z lidského pupečníku, přičemž bylo stanoveno množství celkového kolagenu (543 µg/mg suché hmotnosti ECM) a glykosaminoglykanů (6,6 µg/mg suché hmotnosti ECM) (Kočí et al., 2017). Složení hydrogelu ECM potvrzuje předchozí závěry o chemických sloučeninách ECM (Kočí et al., 2017; Ungerleider et al., 2016). Proteiny detekované v ECM jsou hlavně řetězce kolagenu alfa-1(I), alfa-2(I), alfa-1(III) a alfa-1(II), které byly relativně zesíleny v ECM ve srovnání s nativní tkání. Na druhou stranu proces decelularizace vede k úbytku jiných typů kolagenu, jako je kolagen alfa-1(IV,V,VI,XI,XII) řetězec, kolagen alfa-2(IV,V,VI,XI) řetězec nebo kolagenového alfa-3(VI) řetězce, stejně jako k podstatnému snížení fibronektinu, Fibrilinu-1, 2, tenascinů a podjednotky beta-1 a gama-1 lamininu. Některé z cytoskeletálních nebo cytoplazmatických proteinů, jako je Actin pro hladkou svalovou aortu, cytoplazmatický aktin 2, myosin-11, filamin-A, tropomyosinový beta řetězec a alfa-1 řetězec, kaveolin-1, myosin-10 a 9 byly stále zachovány v ECM matici, ale ve velmi nízkém rozsahu.

4.4.1. Buněčná proliferace v přítomnosti genipinu a zesíťovaného ECM/G

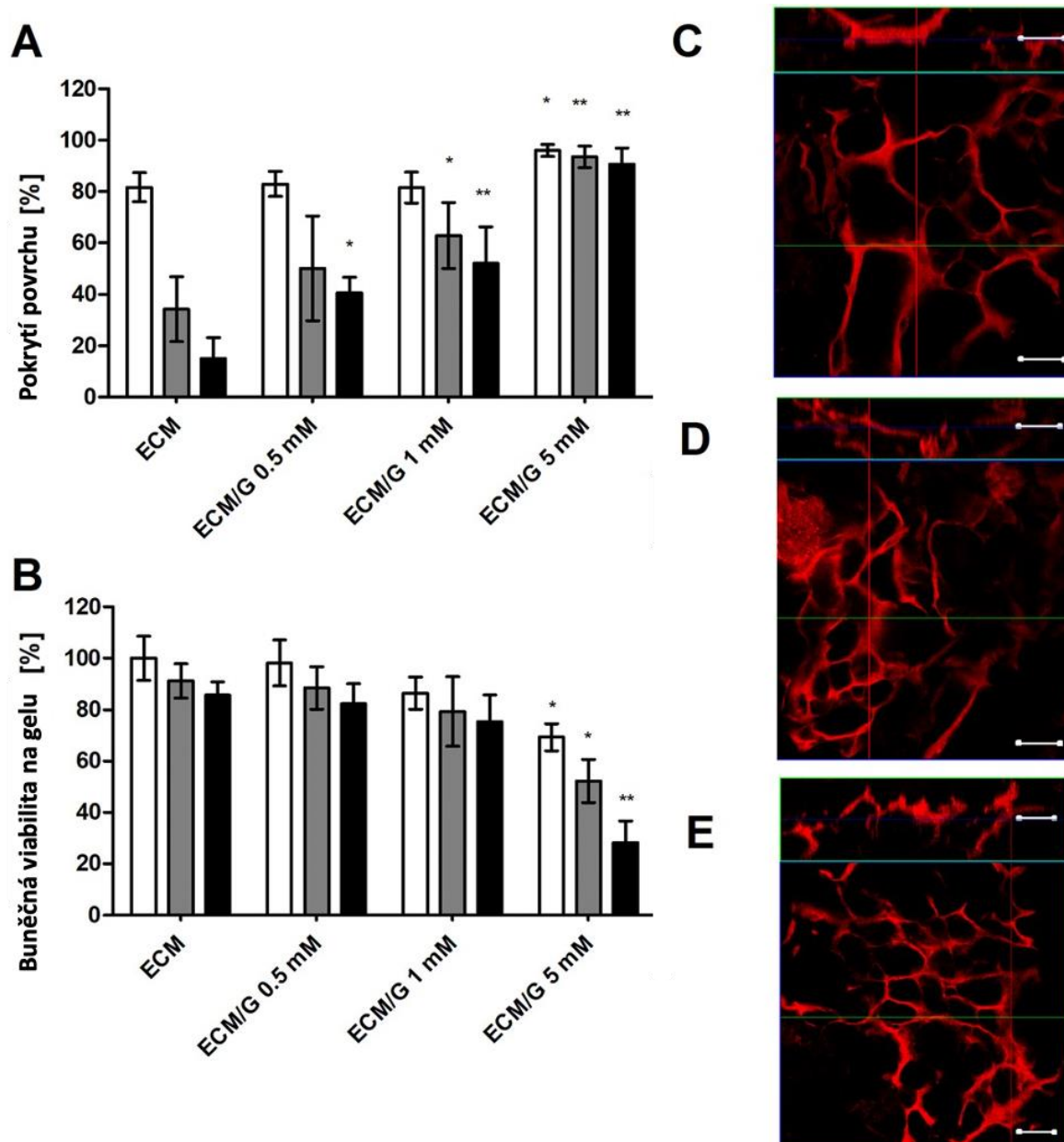
Při vývoji injikovatelných hydrogelů je dávka síťovacího činidla omezena jeho toxicitou, protože hydrogely ECM se musí zesíťovat *in situ* bez možnosti vymytí přebytku síťovacích činidel z matrix. Pro vyhodnocení toxicity a účinku síťovacích činidel na buněčnou proliferaci byly v kultuře MSC byly různé koncentrace volného genipinu přidány do kultivačního média testovány po 1, 4 a 7 dnech kultivace, Jak je zřejmé z **Obr. 21A**, proliferace MSC se významně snížila, když koncentrace genipinu v kultivačním médiu byla 5 mM a vyšší.

Rovněž jsme sledovali proliferaci MSC nasazených na hydrogely zesíťované pomocí různých koncentrací genipinu (ECM/G). Proliferace byla sledována po 3, 7 a 14 dnech kultivace (**Obr. 21B**). Významné snížení buněčné proliferace v porovnání s nezesíťovaným ECM bylo zjištěné na ECM hydrogelech zesíťovaných s koncentrací genipinu stejnou nebo vyšší než 5mM. Také bylo zjištěno, že koncentrace síťovacího činidla 1 mM byla shledána biokompatibilní a bez významných účinků na proliferaci MSC. Tato koncentrace poskytla významnou odolnost hydrogelu ECM vůči degradaci *in vitro* bez škodlivého účinku na buněčnou proliferaci, axonální pučení a růst a diferenciaci nervových kmenových buněk. Podpora zesíťovaných ECM hydrogelů pro neurální kmenové buňky a MSC má velký význam jako důkaz neuro-podporujících vlastností hydrogelů ECM a také pro přenos buněk, protože

bylo prokázáno, že tyto typy buněk zvyšují terapeutický přínos ECM (Tukmachev et al., 2016; Zaviskova et al., 2018). Je zřejmé, že cytotoxický účinek zesíťovaných hydrogelů nastává při vyšší koncentraci genipinu než v případě volných síťovacích činidel, které byly přidávány do kultivačního média a cytotoxický účinek vyšších koncentrací genipinu je s největší pravděpodobností způsoben zbytkovými nebo nenavázanými síťovacími činidly v matrix. Účinek zesíťování genipinu na zvýšení mechanické pevnosti ECM hydrogelu byl dále potvrzen slábnoucí kontrakcí hydrogelu po naočkování MSC ve 3D kultuře. Kontrakce matrixu po osazení MSC nebo jiných typů buněk podobných fibroblastům představuje běžný jev pro materiály na bázi kolagenu, který může zatěžovat schopnost matrice vyplnit dutinu léze (Medberry et al., 2013). Síťování s 1 mM genipinem významně snížilo kontrakci ECM bez ovlivnění životaschopnosti MSC, a tak zlepšilo schopnost hydrogelu účinně vyplnit léze v kombinaci s MSC.



Obr. 21 Proliferace MSC v rozličných koncentracích **(A)** volného genipinu a na hydrogelech ECM/G zesíťovaných různými koncentracemi genipinu **(B)**. Buněčná proliferace byla hodnocena pomocí testu Alamar Blue. Data jsou normalizována na počáteční hodnoty získané na začátku experimentu na nezesíťovaném ECM, které byly nastaveny jako 100% životaschopnost buněk (tečkovaná základní čára), (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. nezesíťovaný ECM, $n = 6$).

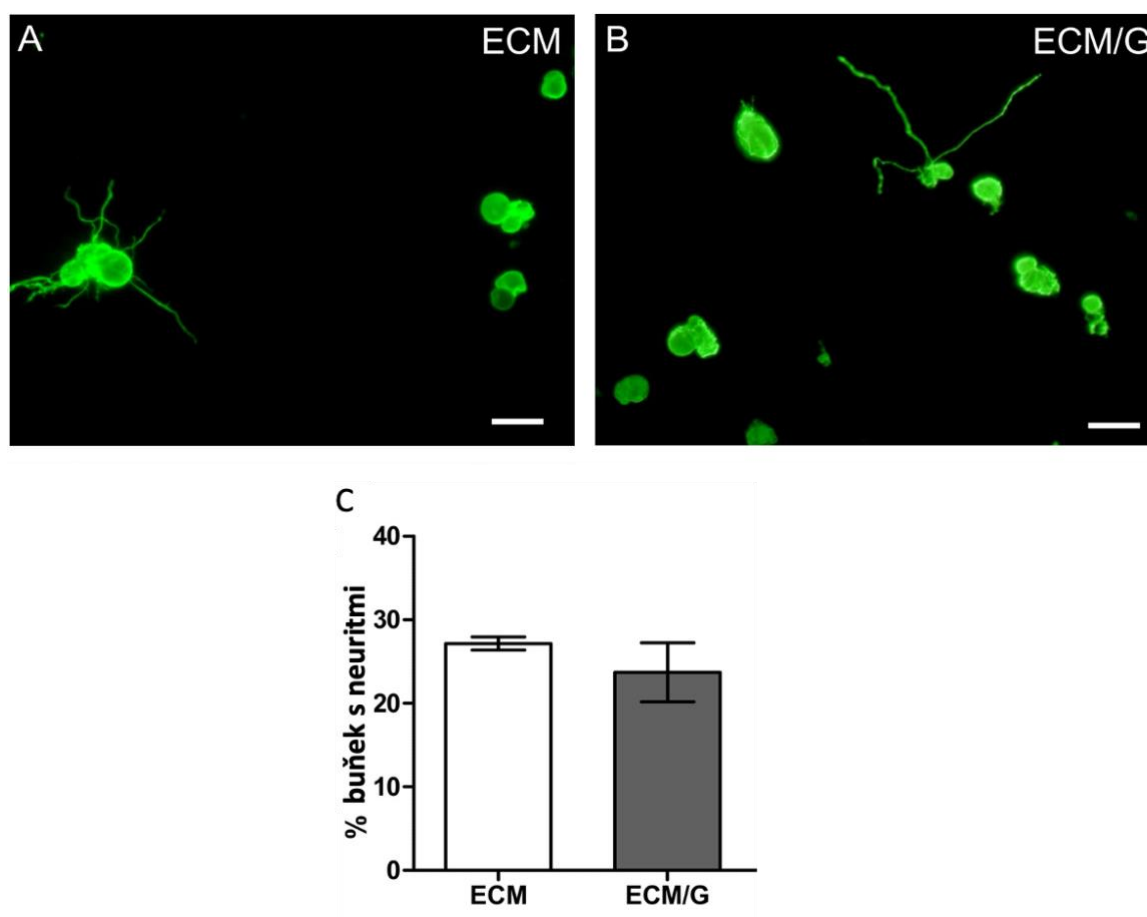


Obr. 22 (A) Kontrakce hydrogelových disků ECM a ECM/G zesíťovaných různými koncentracemi genipinu, 4 hodiny, 24 hodin a 48 hodin po 3D naočkování pomocí MSC (5×10^5 ve 200 μ l hydrogelu). Kontrakce je vyjádřena jako procento původní plochy hydrogelového disku (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. nezesíťovaný ECM, $n = 3$). (B) Životaschopnost MSC nasazených v hydrogelech ECM a ECM/G zesíťovaných s různými koncentracemi genipinu, po 4 hodinách, 24 hodinách a 48 hodinách po naočkování 3-D buněk. Životaschopnost je vyjádřena jako procento původní životaschopnosti buněk v nezesíťném ECM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. nezesíťný ECM, $n = 3$).

Schopnost MSC růst z povrchu do hydrogelů ECM byla pozorována po 1 týdnu kultivace (C–E) kdy buňky vytvořily propojenou 3D síť v nezesítěném ECM, stejně jako v ECM/G zesítěném 1 mM genipinem.

4.4.2. Vliv síťování na axonální růst a na růst a diferenciaci nervových kmenových buněk

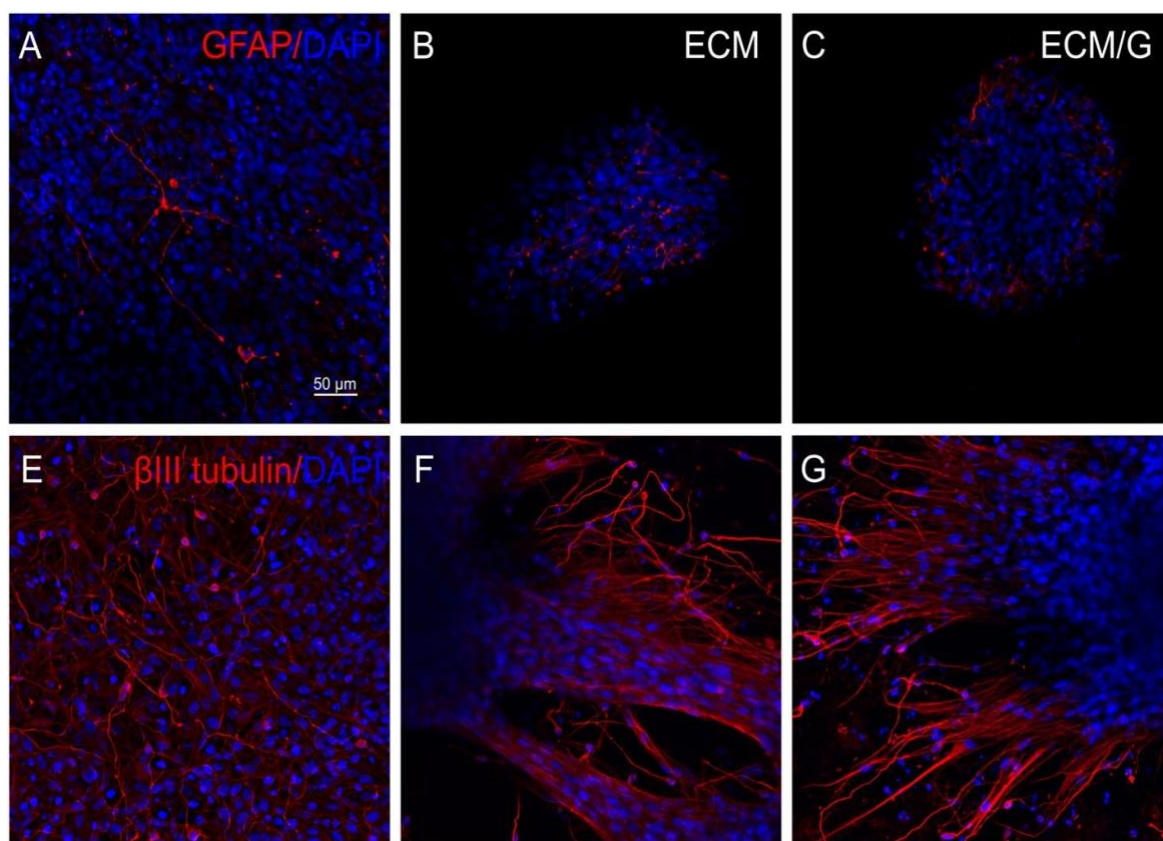
Stejně jako v předešlé studii jsme sledovali účinek zesítěného ECM/G hydrogelu s 1 mM genipinem pomocí analýzy axonálního růstu senzorických neuronů, tentokrát izolovaných z dospělých DRG. Procento neuronů, které vykazovaly axonální růst, bylo mnohem nižší než na krycích sklíčkách potažených lamininem, na druhou stranu nebili pozorovány významné rozdíly mezi nezesítěným ECM a ECM/G (**Obr. 23**).



Obr. 23 Axonální růst disociovaných neuronů ganglií dorzálních kořenů dospělých potkanů (DRG) na hydrogelech ECM, ECM/G s koncentrací genipinu 1 mM. (A–B) DRG kultura na

ECM hydrogelech barvených na beta-III-tubulin. (C) Procento buněk s neurity delšími než tělo buňky. Měřítka představuje 50 μm ($n = 3$)

Proliferace nervových kmenových buněk (linie SPC-01) byla hodnocena po 1 a 3 týdnech kultivace na nezesítěném ECM a ECM/G (1 mM). Hodnoty hustoty buněk na různých hydrogelech ECM se v obou časových intervalech významně nelišily. Diferenciace SPC-01 pak byla analyzována po 3 týdnech v kultuře. Buňky SPC-01 se šířily z klastrů a pokrývaly velké plochy na hydrogelech a byly pozitivní hlavně na hranicích šířících se klastrů na neuronální marker beta-III-Tubulin. Menšina buněk byla také pozitivní na astrocytární marker GFAP (**Obr. 24**). Diferenciace na oligodendrocyty nebyla pozorována. V intervalu 3 týdnů byly pouze jednotlivé buňky pozitivní na NG2, buď na ECM hydrogelech nebo na krycích sklíčkách potažených lamininem (nezobrazeno).



Obr. 24 Nervové kmenové buňky (SPC-01) kultivované (**A,E**), na krycích sklíčkách potažených lamininem, (**B,F**) nezesíťované ECM, (**C,G**) ECM/G. Buňky byly obarveny (**A-D**) GFAP (červená) a DAPI (modrá) nebo (**E-H**) beta-III-tubulin (červená) a DAPI (modrá). Měřítka: 50 μm .

4.4.3. Ověření biokompatibility ECM a ECM/G *in vivo* na modelu fototrombotické léze

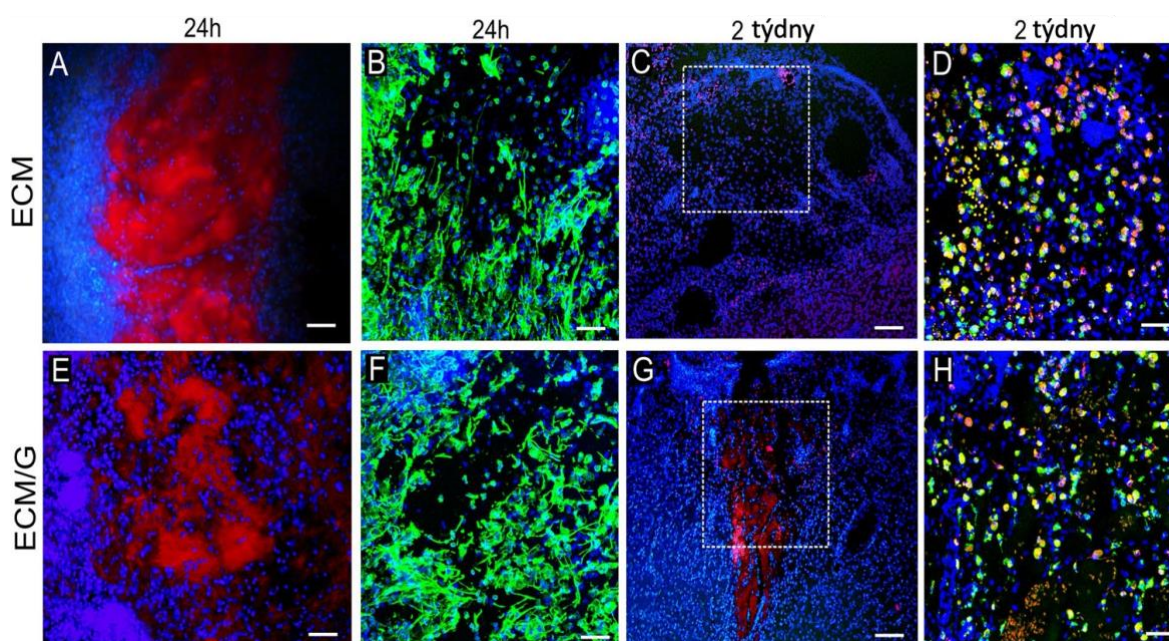
Aby se prokázala *in vivo* biokompatibilita a stabilita ECM a ECM/G, i v této studii jsme po vzoru předešlé práce (Kočí et al., 2017) injikovali hydrogely *in situ* do fokální ischemické léze vytvořené v motorické kůře potkana. ECM a ECM/G vytvořili gely v místě implantace, které byli infiltrovány hostitelskými buňkami. Rovněž bylo sledováno zvýšení retence zesíťovaného hydrogelu ECM/G po dobu 2 týdnů od injekce *in situ* v porovnání s ECM bez genipinu. V minulých studiích je známo, že při *in vivo* aplikaci zesíťovaného ECM kolagenu byla vyvolaná prozánětlivá odpověď, jakou je např. aktivace makrofágů a zvýšení uvolňování prozánětlivých cytokinů, kdy síla nepříznivé reakce hostitele závisí na míře zesíťování (Delgado et al., 2015). Proto pro stanovení zánětlivé reakce v okolí léze ošetřené ECM a ECM/G hydrogelem byl po 2 týdnech analyzován relativní počet mikroglií/makrofágů pozitivních na CD68 (ED1) a CD206 (ED2) v oblasti obklopující léze (**Tab. 1**). Mezi skupinou ECM a ECM/G nebyly nalezeny žádné významné rozdíly v relativním počtu ED1 i CD206 pozitivních buněk, což naznačuje, že genipinové zesíťování hydrogelu ECM nezvýšilo zánětlivou reakci v ischemické kortikální lézi.

Tab. 1 Procento ED1 a CD206 pozitivních buněk v oblasti léze po injekci ECM a ECM/G do ischemické kortikální léze. (*n* = počet zvířat).

	ECM	ECM/G
ED1 (% cell number)	33.84 ± 1.09 (<i>n</i> = 5)	35.56 ± 3.17 (<i>n</i> = 5)
CD206 (% cell number)	28.05 ± 2.97 (<i>n</i> = 5)	30.09 ± 1.91 (<i>n</i> = 5)

V této studii reakce makrofágů neodhalila žádné významné změny, které by naznačovaly zvýšenou imunogenicitu ECM/G ve srovnání s nezesíťovaným ECM. Kromě toho byla prevalence CD206+ makrofágů podobných M2 zjištěna jak ve skupinách ECM, tak ECM/G, podobně jako v našich předchozích studiích (Kočí et al., 2017; Tukmachev et al., 2016). To naznačuje, že při vystavení zánětlivému prostředí subakutní ischemické kortikální léze byla biokompatibilní koncentrace zesíťování genipinem (1 mM) účinná pro gelaci *in situ* a prodloužení odolnosti hydrogelu ECM bez zvýšení zánětlivé reakce. Jak je znázorněno na **Obr. 25A,E** na barvení kolagenu, ECM i ECM/G vytvořily po 24 hodinách kompaktní hydrogel uvnitř léze a ten byl osídlen hostitelskými buňkami, jako jsou fibroblasty nebo makrofágy. Pozoruhodná infiltrace buněk pozitivních na vimentin byla pozorována v hydrogelech ECM i ECM/G (**Obr. 25B,F**). Degradace ECM a hydrogelu ECM/G pak byla

stanovena 2 týdny po implantaci. Zatímco nezesítěný ECM degradoval (**Obr. 25C**), ECM/G byl stále detekován v lézi bez jakékoli známky zesílené zánětlivé reakce fibrotického zjizvení (**Obr. 25G**). Z našich výsledků je zřejmé, že zesíťování genipinem účinně zvýšilo retenci hydrogelu ECM v lézi, zatímco postupná degradace byla zřejmá v okolní tkáni, kde byly fragmenty ECM/G vysoce infiltrovány hostitelskými buňkami. Bohužel jsme kvůli křehkosti oblasti léze nebyli schopni provést kvantitativní analýzu, která by odhalila hydrogelový efekt na kavitaci a buněčnou infiltraci (**Obr. 25D,H**).



Obr. 25 Koronální řezy mozku ilustrující gelaci a buněčnou infiltraci hydrogelů ECM (**A-D**) a ECM/G (**E-H**) *in vivo*, v intervalech (**A,B,E,F**) 1 den a (**C,D,G, H**) 2 týdny po injekci do fototrombotické ischemické léze v motorickém kortexu potkana. (**A,C,E,G**) Barvení na kolagen I (červená) a buněčná jádra (DAPI, modrá). (**B,F**) Barvení na vimentin (zelená) a DAPI (modrá). (**D,H**) Infiltrace makrofágů (ED1, zelená) do léze pomocí (**D**) nezesítěného ECM hydrogelu a (**H**) ECM/G 2 týdny po injekci hydrogelu do oblasti léze. Buněčná jádra byla obarvena na DAPI (modrá). Tečkované čtverečky v C, G ukazují plochu zobrazovanou v D, H. Měřítko: (**A,E,C,G**) 100 μm , (**B,D,F,H**) 50 μm .

5. Závěr

Tato práce sleduje roli extracelulární matrix v modifikaci funkcí nervové soustavy jak pomocí inhibice syntézy hyaluronanu po systematickém podání 4-Methylumbilliferonu, tak i možností použití ECM jako podpůrného lešení po poranění mozkové tkáně.

Extracelulární matrix (ECM) je struktura vyplňující mezibuněčný prostor ve všech typech tkání. V mozku tvoří 20% obsahu a vyskytuje se jak v difuzní, tak i v kondenzované podobě. Tato síť má nejen podpůrnou a strukturální funkci, ale i aktivně zasahuje do fyziologických i patologických procesů v CNS. Je důležitou komunikační cestou mezi neurony a gliovými buňkami. Kromě iontů a jiných anorganických molekul obsahuje makromolekuly, syntetizované v neuronech a gliových buňkách. Iontové prostředí ECM není stále, závisí na neuronové aktivitě a obsahuje difundující neuroaktivní látky, které se vážou i na mimosynaptických vysoce afinitních vazebných místech neuronů, axonů a gliových buněk. Při zkoumání vlivu systémového použití léčiva perorální dávkou 6,7mg/g/den po dobu 6ti měsíců léčby a měsíc po jejím ukončení jsme pozorovaly jak v behaviorálním testování paměti, tak i pomocí imunohistologie a analýzy genové exprese, změny poukazující na snížení množství PNN sítí v mozku i míše.

Behaviorální testování paměti bylo prováděno po 2/3/6 měsících a měsíc po ukončení léčby. Sice jsme nepozorovaly rozdíly v testu spontánní alternace, ani v aktivitě sledovaných jedinců, ale v testu, zaměřeném na krátkodobou paměť (SOR) jsme sledovali trend zlepšení paměti ve všech sledovaných intervalech. Zároveň byl pozorovaný signifikantní rozdíl v 24hodinovém intervalu mezi skupinou testovanou po 6 měsících a to jak vůči kontrolní skupině, tak i skupině měsíc po léčbě. Tyto výsledky naznačují, že účinek 4-MU není permanentní a časem upadá.

Imunohistochemická analýza rovněž podpořila naši hypotézu možností ovlivnění PNN pomocí 4-MU. Barvení neuronů na WFA i agrekan neukazovali snížení počtu neuronů obklopených PNN, ale intenzita barvení na WFA byla vyšší u kontrolní skupiny v porovnání se skupinou léčenou 6 měsíců, tak i skupinou 1 měsíc po léčbě. Podobné výsledky jsme pozorovali při analýze délky a plochy neuronů pokrytých PNN při barvení na agrekan. Tady jsme rovněž pozorovali významní redukci PNN u skupiny léčené 6 měsíců, tak i u skupiny měsíc po léčbě.

Imunohistologické výsledky PNN po měsíci léčby ukázali, že síť nebyli obnoveny po měsíčním intervalu po vysazení léčiva, i když jsme pozorovali behaviorální změny v paměťových testech, kdy se výsledky vrátili na úroveň kontrolní skupiny.

Důvod může být ten, že PNN nejsou jediná struktura, která se projevuje na změnách chování při testování paměti a může to znamenat určitou kompenzaci jiných systémů v neuroplasticitě.

Rovněž genová analýza ukazovala zajímavé výsledky, hlavně v jednom sledovaném genu a to CD44, což je receptor pro HA. Po 6 měsících léčby jsme sledovali signifikantní pokles tohoto receptoru, zatím co 1 měsíc po vysazení léčby byl tento gen signifikantně up-regulován. Toto pozorování také naznačuje, že léčba 4-MU nemá permanentní účinky a po její vysazení se receptory pro HA začínají obnovovat.

Závěrem této práce jsme sledovali negativní účinky systémové léčby na motorické schopnosti myši a histologickou analýzu vybraných orgánů, a to hlavně kloubů.

Důvodem bylo, že perorální léčba 4-MU, který neselektivně inhibuje HAS, když je podávaná systémově, může blokovat tento enzym v tkáních, což může způsobovat různé defekty.

Zaměřily jsme se hlavně na motoriku, z důvodu velkého množství HA v této struktuře.

Motorické testy sice neprokázaly žádné změny po léčbě, ale histologická analýza kloubů poukazovala na atrofii chrupavky. V zbylých sledovaných orgánech (slezina, játra, ledviny) jsme nepozorovaly žádné závažné změny, které by poukazovali na vysokou toxicitu dané léčby i při tak dlouhodobém užívání.

Ve druhé studii, zaměřené na ECM jsme vytvořili materiál pomocí decelularizace lidské pupečnickové tkáně. Jak bylo ukázáno v předešlých částech této práce, věkem narůstá zesíťování ECM v důsledku neenzymatické glykace proteinů (Semba et al., 2010) a ukládání tukové tkáně a fibrózy. Rovněž při použití xenotransplantátů existuje riziko vzniku imunitní odpovědi hostitele proti implantované tkáni či struktuře. Jako vhodné řešení se nabízí použití fetální tkáně z lidských pupečníků. Tato možnost řeší oba předešlé problémy se stářím tkáně a rovněž s xenotransplantáty a je získatelná poměrně jednoduše a bez etických problémů.

V prvním kroku jsme vytvořili hydrogel UC-ECM z pupečníku, kterého vlastnosti byli porovnané se 3 hydrogely derivovanými z prasečích tkání, kterých vlastnosti byli potvrzené už v předešlých studiích. Tento hydrogel byl sledován jak *in vitro* kde bylo prokázána podpora proliferace WJ-MSC (derivované z pupečníku), podpora prorůstání axonů a neurální kmenové buňky, které rostli na hydrogelu UC-ECM a po 7 dnech vykazovaly expresi časného neuronálního markeru NF70. V testu UC-ECM *in vivo* jsme prokázali gelaci *in situ* v místě implantace a rovněž infiltraci hostitelskýma makrofágy.

Vzhledem k poznatkům z minulých studií, které ukazovali, že hydrogely derivované z ECM jsou relativně rychle degradovány, jsme se snažili najít způsob stabilizace, která by zachovala pozitivní vlastnosti ECM a zároveň degradace by byla redukována. Pro tento cíl

jsme si vybrali genipin, který kovalentně síťuje vytvořenou ECM. Zjistili jsme netoxickou koncentraci stabilizátoru, co je 1mM genipin a tento hydrogel jsme opět testovali *in vitro* v porovnání s nezesíťovaným UC-ECM. Nový hydrogel nepotlačoval buněčnou proliferaci MSC, prorůstání axonů ani diferenciaci NSC. Rovněž v *in vivo* aplikaci *in situ* do fototrombotické léze jsme pozorovali gelování, infiltraci hostitelskými makrofágy a existenci gelu ve vytvořené lézi ještě po 2 týdnech od implantace.

V uvedených studiích byl můj přínos jak přípravě a návrhu realizace dílčích studií, tak po realizační stránce, a to v behaviorálních analýzách, přípravách vzorků, v imunohistochemickém a histochemickém vyhodnocování dat, a mikroskopických a molekulárních analýzách.

6. Souhrn

ECM je nejen podpůrná fyzikální struktura nervové soustavy a jiných tkání, ale podle posledních poznatků je to aktivní systém, zapojující se do celkové homeostázy a funkce tkání. Rovněž hydrogely vytvořené z extracelulární matrix jsou schopné, po jejich aplikaci do místa zranění nebo léze, modulovat odpovědi nervového systému. V nervové soustavě je možné její modifikaci na různých úrovních měnit a tím modulovat aktivitu, motilitu i imunitní odpověď organismu na různé vstupy. V této práci jsme překázali, že rozvolnění PNN, které jsou jednou z forem ECM v CNS, pomocí inhibice syntézy hyaluronanu, mělo efekt na struktury, zodpovědné za paměť a podporovalo neuroplasticitu. Tento systémový efekt byl prokázán jak behaviorálním testováním, tak imunohistochemickou a molekulární analýzou. Při zkoumání motorických funkcí jsme nepozorovali rozdíly mezi léčenou a neléčenou skupinou a rovněž při analýze orgánů jsme nezaznamenali patologické změny, které by mohli být způsobeny systémovou inhibicí HA v organismu. V další části práce jsme se snažili vytvořit novou formu hydrogelu z lidského pupečníku, který by svými fetálními vlastnostmi mohl fungovat jako lešení nebo nosič při poraněních nervového systému. Vzhledem k tomu, že samostatné hydrogely tvořené ECM mají relativně rychlou degradaci, našli jsme způsob netoxického kovalentního zesíťování pomocí 1mM genipinu. UC-ECM i G-ECM nevykazovali negativní účinky na MSC proliferaci a axonální růst senzorických neuronů DRG *in vitro* a rovněž vykazovali stabilní gelaci *in situ* po aplikaci do fototrombotické léze *in vivo*. Stejně tak jsme pozorovali kompaktní strukturu gelu v lézi 14 dní po aplikaci ECM/G infiltrovanou hostitelskýma makrofágy, což naznačuje, že kovalentní stabilizace byla úspěšná a podporovala protizánětlivé děje v místě léze.

7. Summary

ECM is not only a supporting physical structure of the nervous system and other tissues, but according to the latest findings, it is an active system involved in general homeostasis and tissue function. Also, hydrogels formed from the extracellular matrix can modulate the nervous system's responses upon their application to the site of injury or lesion. In the nervous system, it is possible to change it at various levels and thus modulate the body's activity, motility, and immune response to various inputs. In this work, we demonstrated that the release of PNNs, which are one of the forms of ECM in the CNS, by inhibiting hyaluronan synthesis affected the structures responsible for memory and promoted neuroplasticity. This systemic effect has been demonstrated by both behavioral testing and immunohistochemical and molecular analysis. We did not observe differences between the treated and untreated groups when examining motor functions, nor did we observe severe defects in organ analysis that could be caused by systemic inhibition of HA in the body. In the next part of the work, we tried to create a new form of hydrogel from the human umbilical cord, which with its fetal properties, could act as a scaffold or carrier for injuries to the nervous system. Since the individual hydrogels formed by ECM have a relatively rapid degradation, we found a method of non-toxic covalent crosslinking using 1 mM genipine. Both UC-ECM and G-ECM did not show adverse effects on MSC proliferation and axonal growth *in vitro* and also showed stable *in situ* gelation after application to a photothrombotic lesion *in vivo*. We also observed a compact gel structure in the lesion 14 days after application of G-ECM infiltrated by host macrophages, suggesting that covalent stabilization was successful and promoted anti-inflammatory events at the lesion site.

8. Literatura

1. Agrawal, V., Brown, B.N., Beattie, A.J., Gilbert, T.W., Badylak, S.F., 2009. Evidence of innervation following extracellular matrix scaffold-mediated remodelling of muscular tissues. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3, 590–600. <https://doi.org/10.1002/term.200>
2. Anděrová, M., Kubinová, Š., Jelítai, M., Neprašová, H., Glogarová, K., Prajerová, I., Urdžiková, L., Chvátal, A., Syková, E., 2006. Transplantation of embryonic neuroectodermal progenitor cells into the site of a photochemical lesion: Immunohistochemical and electrophysiological analysis. *J. Neurobiol.* 66, 1084–1100. <https://doi.org/10.1002/neu.20278>
3. Arranz, A.M., Perkins, K.L., Irie, F., Lewis, D.P., Hrabe, J., Xiao, F., Itano, N., Kimata, K., Hrabetova, S., Yamaguchi, Y., 2014. Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 6164–6176. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3458-13.2014>
4. Aspberg, A., Miura, R., Bourdoulous, S., Shimonaka, M., Heinegård, D., Schachner, M., Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y., 1997. The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein–protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 10116–10121. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10116>
5. Aumailley, M., 2013. The laminin family. *Cell Adhes. Migr.* 7, 48–55. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>
6. Badylak, S., Arnoczky, S., Plouhar, P., Haut, R., Mendenhall, V., Clarke, R., Horvath, C., 1999. Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair. *Clin. Orthop.* S333–343. <https://doi.org/10.1097/00003086-199910001-00032>
7. Badylak, S.F., 2014. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response. *Ann. Biomed. Eng.* 42, 1517–1527. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0963-7>
8. Badylak, S.F., 2004. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl. Immunol.* 12, 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2003.12.016>
9. Badylak, S.F., 2002. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 377–383. <https://doi.org/10.1016/s1084952102000940>
10. Badylak, S.F., Gilbert, T.W., 2008. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin. Immunol.* 20, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.003>
11. Badylak, S.F., Vorp, D.A., Spievack, A.R., Simmons-Byrd, A., Hanke, J., Freytes, D.O., Thapa, A., Gilbert, T.W., Nieponice, A., 2005. Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. *J. Surg. Res.* 128, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.03.002>
12. Banerjee, S.B., Gutzeit, V.A., Baman, J., Aoued, H.S., Doshi, N.K., Liu, R.C., Ressler, K.J., 2017. Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning. *Neuron* 95, 169–179.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.007>
13. Bartko, S.J., Vendrell, I., Saksida, L.M., Bussey, T.J., 2011. A computer-automated touchscreen paired-associates learning (PAL) task for mice: impairments following administration of scopolamine or dicyclomine and improvements following donepezil. *Psychopharmacology (Berl.)* 214, 537–548. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2050-1>

14. Bartus, K., James, N.D., Bosch, K.D., Bradbury, E.J., 2012. Chondroitin sulphate proteoglycans: Key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Exp. Neurol.* 235, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.08.008>
15. Baxter, M.G., 2010. “I’ve seen it all before”: explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). *Behav. Neurosci.* 124, 706–709. <https://doi.org/10.1037/a0021029>
16. Bejjani, G.K., Zabramski, J., Duras Study Group, 2007. Safety and efficacy of the porcine small intestinal submucosa dural substitute: results of a prospective multicenter study and literature review. *J. Neurosurg.* 106, 1028–1033. <https://doi.org/10.3171/jns.2007.106.6.1028>
17. Bekku, Y., Saito, M., Moser, M., Fuchigami, M., Maehara, A., Nakayama, M., Kusachi, S., Ninomiya, Y., Oohashi, T., 2012. Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 520, 1721–1736. <https://doi.org/10.1002/cne.23009>
18. Bekku, Y., Su, W.-D., Hirakawa, S., Fässler, R., Ohtsuka, A., Kang, J.S., Sanders, J., Murakami, T., Ninomiya, Y., Oohashi, T., 2003. Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets☆. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 148–159. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00133-7)
19. Bellamkonda, R., Ranieri, J.P., Bouche, N., Aebischer, P., 1995. Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 663–671. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290514>
20. Bignami, A., Hosley, M., Dahl, D., 1993. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat. Embryol. (Berl.)* 188. <https://doi.org/10.1007/BF00190136>
21. Blosa, M., Sonntag, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Matthews, R.T., Rübsamen, R., Arendt, T., Morawski, M., 2013. Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body – Implications for physiological functions. *Neuroscience* 228, 215–234. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.003>
22. Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z., 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
23. Bosman, F.T., Stamenkovic, I., 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix: Structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200, 423–428. <https://doi.org/10.1002/path.1437>
24. Brakebusch, C., Seidenbecher, C.I., Asztely, F., Rauch, U., Matthies, H., Meyer, H., Krug, M., Böckers, T.M., Zhou, X., Kreutz, M.R., Montag, D., Gundelfinger, E.D., Fässler, R., 2002. Brevican-Deficient Mice Display Impaired Hippocampal CA1 Long-Term Potentiation but Show No Obvious Deficits in Learning and Memory. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7417–7427. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.21.7417-7427.2002>
25. Brown, B.N., Valentin, J.E., Stewart-Akers, A.M., McCabe, G.P., Badylak, S.F., 2009. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* 30, 1482–1491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.040>
26. Brückner, G., Grosche, J., Schmidt, S., Härtig, W., Margolis, R.U., Delpech, B., Seidenbecher, C.I., Czaniera, R., Schachner, M., 2000. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J.*

- Comp. Neurol. 428, 616–629. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001225\)428:4<616::aid-cne3>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001225)428:4<616::aid-cne3>3.0.co;2-k)
27. Brückner, G., Härtig, W., Kacza, J., Seeger, J., Welt, K., Brauer, K., 1996. Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J. Neurocytol.* 25, 333–346. <https://doi.org/10.1007/BF02284806>
 28. Brückner, G., Morawski, M., Arendt, T., 2008. Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience* 151, 489–504. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.033>
 29. Busch, S.A., Silver, J., 2007. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.09.004>
 30. Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J.C.F., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., Andrews, M.R., Deepa, S.S., Glant, T.T., Fawcett, J.W., 2010. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133, 2331–2347. <https://doi.org/10.1093/brain/awq145>
 31. Carulli, D., Rhodes, K.E., Brown, D.J., Bonnert, T.P., Pollack, S.J., Oliver, K., Strata, P., Fawcett, J.W., 2006. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J. Comp. Neurol.* 494, 559–577. <https://doi.org/10.1002/cne.20822>
 32. Chang, M.C., Park, J.M., Pelkey, K.A., Grabenstatter, H.L., Xu, D., Linden, D.J., Sutula, T.P., McBain, C.J., Worley, P.F., 2010. Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons. *Nat. Neurosci.* 13, 1090–1097. <https://doi.org/10.1038/nn.2621>
 33. Crapo, P.M., Gilbert, T.W., Badylak, S.F., 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32, 3233–3243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
 34. Crapo, P.M., Medberry, C.J., Reing, J.E., Tottey, S., van der Merwe, Y., Jones, K.E., Badylak, S.F., 2012. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials* 33, 3539–3547. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.044>
 35. Dauth, S., Grevesse, T., Pantazopoulos, H., Campbell, P.H., Maoz, B.M., Berretta, S., Parker, K.K., 2016. Extracellular matrix protein expression is brain region dependent. *J. Comp. Neurol.* 524, 1309–1336. <https://doi.org/10.1002/cne.23965>
 36. Dedecker, F., Grynberg, M., Staerman, F., 2005. [Small intestinal submucosa (SIS): prospects in urogenital surgery]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* 15, 405–410.
 37. Deepa, S.S., Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., Sugahara, K., Fawcett, J.W., 2006. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 281, 17789–17800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600544200>
 38. Delgado, L.M., Bayon, Y., Pandit, A., Zeugolis, D.I., 2015. To Cross-Link or Not to Cross-Link? Cross-Linking Associated Foreign Body Response of Collagen-Based Devices. *Tissue Eng. Part B Rev.* 21, 298–313. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0290>
 39. DeQuach, J.A., Mezzano, V., Miglani, A., Lange, S., Keller, G.M., Sheikh, F., Christman, K.L., 2010. Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture. *PloS One* 5, e13039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013039>
 40. Dow, K.E., Wang, W., 1998. Cell biology of astrocyte proteoglycans. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 54, 567–581. <https://doi.org/10.1007/s000180050185>
 41. Dubisova, J., Burianova, J.S., Svobodova, L., Makovicky, P., Martinez-Varea, N., Cimpean, A., Fawcett, J.W., Kwok, J.C.F., Kubinova, S., 2022. Oral treatment of 4-

- methylumbelliferone reduced perineuronal nets and improved recognition memory in mice. *Brain Res. Bull.* 181, 144–156.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.011>
42. Duncan, J.A., Foster, R., Kwok, J.C.F., 2019. The potential of memory enhancement through modulation of perineuronal nets. *Br. J. Pharmacol.* 176, 3611–3621. <https://doi.org/10.1111/bph.14672>
 43. Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59.
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)
 44. Faralli, A., Dagna, F., Albera, A., Bekku, Y., Oohashi, T., Albera, R., Rossi, F., Carulli, D., 2016. Modifications of perineuronal nets and remodelling of excitatory and inhibitory afferents during vestibular compensation in the adult mouse. *Brain Struct. Funct.* 221, 3193–3209. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1095-7>
 45. Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C.M., Sánchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H., Rico, B., 2017. Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* 95, 639–655.e10.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.028>
 46. Favuzzi, E., Rico, B., 2018. Molecular diversity underlying cortical excitatory and inhibitory synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 53, 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.03.011>
 47. Fawcett, J.W., Asher, Richard.A., 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 49, 377–391. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00072-6)
 48. Fawcett, J.W., Oohashi, T., Pizzorusso, T., 2019. The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 451–465. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0196-3>
 49. Ferrer-Ferrer, M., Dityatev, A., 2018. Shaping Synapses by the Neural Extracellular Matrix. *Front. Neuroanat.* 12, 40.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00040>
 50. Foscari, S., Ponchione, D., Pajaj, E., Leto, K., Gawlak, M., Wilczynski, G.M., Rossi, F., Carulli, D., 2011. Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *PloS One* 6, e16666.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016666>
 51. Freytes, D.O., Martin, J., Velankar, S.S., Lee, A.S., Badylak, S.F., 2008. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials* 29, 1630–1637.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.014>
 52. Friedlander, D.R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R.K., Margolis, R.U., Grumet, M., 1994. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 125, 669–680.
<https://doi.org/10.1083/jcb.125.3.669>
 53. Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D., Gundelfinger, E.D., 2009. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 12, 897–904.
<https://doi.org/10.1038/nn.2338>
 54. Galili, U., 2015. Avoiding detrimental human immune response against Mammalian extracellular matrix implants. *Tissue Eng. Part B Rev.* 21, 231–241.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0392>

55. Galtrey, C.M., Fawcett, J.W., 2007. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 54, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.09.006>
56. Galtrey, C.M., Kwok, J.C.F., Carulli, D., Rhodes, K.E., Fawcett, J.W., 2008. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1373–1390. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06108.x>
57. Gama, C.I., Tully, S.E., Sotogaku, N., Clark, P.M., Rawat, M., Vaidehi, N., Goddard, W.A., Nishi, A., Hsieh-Wilson, L.C., 2006. Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity. *Nat. Chem. Biol.* 2, 467–473. <https://doi.org/10.1038/nchembio810>
58. Gao, R., Wang, M., Lin, J., Hu, L., Li, Z., Chen, C., Yuan, L., 2018. Spatiotemporal expression patterns of chondroitin sulfate proteoglycan mRNAs in the developing rat brain. *Neuroreport* 29, 517–523. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000957>
59. Geller, H.M., Fawcett, J.W., 2002. Building a Bridge: Engineering Spinal Cord Repair. *Exp. Neurol.* 174, 125–136. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7865>
60. Ghuman, H., Massensini, A.R., Donnelly, J., Kim, S.-M., Medberry, C.J., Badylak, S.F., Modo, M., 2016. ECM hydrogel for the treatment of stroke: Characterization of the host cell infiltrate. *Biomaterials* 91, 166–181. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.014>
61. Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., Herry, C., 2009. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science* 325, 1258–1261. <https://doi.org/10.1126/science.1174146>
62. Goncharova, V., Seroby, N., Iizuka, S., Schraufstatter, I., de Ridder, A., Povaliy, T., Wacker, V., Itano, N., Kimata, K., Orlovskaja, I.A., Yamaguchi, Y., Khaldoyanidi, S., 2012. Hyaluronan expressed by the hematopoietic microenvironment is required for bone marrow hematopoiesis. *J. Biol. Chem.* 287, 25419–25433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376699>
63. Griffiths, S., Scott, H., Glover, C., Bienemann, A., Ghorbel, M.T., Uney, J., Brown, M.W., Warburton, E.C., Bashir, Z.I., 2008. Expression of long-term depression underlies visual recognition memory. *Neuron* 58, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.02.022>
64. Hagihara, K., Miura, R., Kosaki, R., Berglund, E., Ranscht, B., Yamaguchi, Y., 1999. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 410, 256–264.
65. Happel, M.F.K., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L.L., Ohl, F.W., Deliano, M., Frischknecht, R., 2014. Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2800–2805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310272111>
66. Harburger, D.S., Calderwood, D.A., 2009. Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 159–163. <https://doi.org/10.1242/jcs.018093>
67. Hedstrom, K.L., Xu, X., Ogawa, Y., Frischknecht, R., Seidenbecher, C.I., Shrager, P., Rasband, M.N., 2007. Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J. Cell Biol.* 178, 875–886. <https://doi.org/10.1083/jcb.200705119>
68. Hendry, S.H., Jones, E.G., Hockfield, S., McKay, R.D., 1988. Neuronal populations stained with the monoclonal antibody Cat-301 in the mammalian cerebral cortex and thalamus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 8, 518–542.

69. Hendry, S.H.C., Hockfield, S., Jones, E.G., McKay, R., 1984. Monoclonal antibody that identifies subsets of neurones in the central visual system of monkey and cat. *Nature* 307, 267–269. <https://doi.org/10.1038/307267a0>
70. Horn, E.M., Beaumont, M., Shu, X.Z., Harvey, A., Prestwich, G.D., Horn, K.M., Gibson, A.R., Preul, M.C., Panitch, A., 2007. Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine* 6, 133–140. <https://doi.org/10.3171/spi.2007.6.2.133>
71. Howell, M.D., Gottschall, P.E., 2012. Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. *Neuroscience* 217, 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.034>
72. Humphries, J.D., Byron, A., Humphries, M.J., 2006. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 3901–3903. <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>
73. Hylin, M.J., Orsi, S.A., Moore, A.N., Dash, P.K., 2013. Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 20, 267–273. <https://doi.org/10.1101/lm.030197.112>
74. Hynes, R.O., 2002. Integrins. *Cell* 110, 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
75. Ishizuka, S., Askew, E.B., Ishizuka, N., Knudson, C.B., Knudson, W., 2016. 4-Methylumbelliferone Diminishes Catabolically Activated Articular Chondrocytes and Cartilage Explants via a Mechanism Independent of Hyaluronan Inhibition. *J. Biol. Chem.* 291, 12087–12104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709683>
76. Jäger, C., Lendvai, D., Seeger, G., Brückner, G., Matthews, R.T., Arendt, T., Alpár, A., Morawski, M., 2013. Perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in the human spinal cord. *Neuroscience* 238, 168–184. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.014>
77. Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., Penttinen, R., 2009. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 61, 198–223. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001289>
78. Jiang, T., Ren, X.-J., Tang, J.-L., Yin, H., Wang, K.-J., Zhou, C.-L., 2013. Preparation and characterization of genipin-crosslinked rat acellular spinal cord scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 3514–3521. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.046>
79. Johnson, T.D., Dequach, J.A., Gaetani, R., Ungerleider, J., Elhag, D., Nigam, V., Behfar, A., Christman, K.L., 2014. Human versus porcine tissue sourcing for an injectable myocardial matrix hydrogel. *Biomater. Sci.* 2014, 60283D. <https://doi.org/10.1039/C3BM60283D>
80. Jones, F.S., Jones, P.L., 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 218, 235–259. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200006\)218:2<235::AID-DVDY2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<235::AID-DVDY2>3.0.CO;2-G)
81. Karabekmez, F.E., Duymaz, A., Moran, S.L., 2009. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. *Hand N. Y. N* 4, 245–249. <https://doi.org/10.1007/s11552-009-9195-6>
82. Klueva, J., Gundelfinger, E.D., Frischknecht, R.R., Heine, M., 2014. Intracellular Ca²⁺ and not the extracellular matrix determines surface dynamics of AMPA-type glutamate receptors on aspiny neurons. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130605. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0605>

83. Kočí, Z., Výborný, K., Dubišová, J., Vacková, I., Jäger, A., Lunov, O., Jiráková, K., Kubinová, Š., 2017. Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues. *Tissue Eng. Part C Methods* 23, 333–345. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0089>
84. Köppe, G., Brückner, G., Brauer, K., Härtig, W., Bigl, V., 1997. Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. *Cell Tissue Res.* 288, 33–41. <https://doi.org/10.1007/s004410050790>
85. Kubinova, S., 2017. Extracellular matrix based biomaterials for central nervous system tissue repair: the benefits and drawbacks. *Neural Regen. Res.* 12, 1430. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.215249>
86. Kubinová, S., Syková, E., 2012. Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury. *Regen. Med.* 7, 207–224. <https://doi.org/10.2217/rme.11.121>
87. Kuipers, H. F., Nagy, N., Ruppert, S.M., Sunkari, V.G., Marshall, P.L., Gebe, J.A., Ishak, H.D., Keswani, S.G., Bollyky, J., Frymoyer, A.R., Wight, T.N., Steinman, L., Bollyky, P.L., 2016. The pharmacokinetics and dosing of oral 4-methylumbelliferone for inhibition of hyaluronan synthesis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 185, 372–381. <https://doi.org/10.1111/cei.12815>
88. Kuipers, Hedwich F., Rieck, M., Gurevich, I., Nagy, N., Butte, M.J., Negrin, R.S., Wight, T.N., Steinman, L., Bollyky, P.L., 2016. Hyaluronan synthesis is necessary for autoreactive T-cell trafficking, activation, and Th1 polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 1339–1344. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525086113>
89. Kultti, A., Pasonen-Seppänen, S., Jauhiainen, M., Rilla, K.J., Kärnä, R., Pyöriä, E., Tammi, R.H., Tammi, M.I., 2009. 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Exp. Cell Res.* 315, 1914–1923. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.002>
90. Kurtz, A., Oh, S.-J., 2012. Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance. *Prev. Med.* 54 Suppl, S50-56. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2012.01.003>
91. Kwok, J.C.F., Afshari, F., García-Alías, G., Fawcett, J.W., 2008. Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor. Neurol. Neurosci.* 26, 131–145.
92. Kwok, J.C.F., Carulli, D., Fawcett, J.W., 2010. In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J. Neurochem.* 114, 1447–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x>
93. Kwok, J.C.F., Dick, G., Wang, D., Fawcett, J.W., 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev. Neurobiol.* 71, 1073–1089. <https://doi.org/10.1002/dneu.20974>
94. Kwok, J.C.F., Foscari, S., Fawcett, J.W., 2015. Perineuronal Nets: A Special Structure in the Central Nervous System Extracellular Matrix, in: Leach, J.B., Powell, E.M. (Eds.), *Extracellular Matrix, Neuromethods*. Springer New York, New York, NY, pp. 23–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2083-9_3
95. Laabs, T., Carulli, D., Geller, H.M., Fawcett, J.W., 2005. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.014>
96. Lee, S.-J., Wei, M., Zhang, C., Maxeiner, S., Pak, C., Calado Botelho, S., Trotter, J., Sterky, F.H., Südhof, T.C., 2017. Presynaptic Neuronal Pentraxin Receptor

- Organizes Excitatory and Inhibitory Synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 1062–1080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2768-16.2016>
97. Leitingner, B., Hohenester, E., 2007. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 26, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.007>
98. Lensjø, K.K., Lepperød, M.E., Dick, G., Hafting, T., Fyhn, M., 2017. Removal of Perineuronal Nets Unlocks Juvenile Plasticity Through Network Mechanisms of Decreased Inhibition and Increased Gamma Activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 1269–1283. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2504-16.2016>
99. Leung, A., Crombleholme, T.M., Keswani, S.G., 2012. Fetal wound healing: implications for minimal scar formation. *Curr. Opin. Pediatr.* 24, 371–378. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283535790>
100. Lewis, D.A., Curley, A.A., Glausier, J.R., Volk, D.W., 2012. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci.* 35, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.004>
101. Li, Y., Li, L., Hölscher, C., 2016. Therapeutic Potential of Genipin in Central Neurodegenerative Diseases. *CNS Drugs* 30, 889–897. <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0369-9>
102. Lin, R., Rosahl, T.W., Whiting, P.J., Fawcett, J.W., Kwok, J.C.F., 2011. 6-Sulphated Chondroitins Have a Positive Influence on Axonal Regeneration. *PLoS ONE* 6, e21499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021499>
103. Ma, B., Wang, X., Wu, C., Chang, J., 2014. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regen. Biomater.* 1, 81–89. <https://doi.org/10.1093/rb/rbu009>
104. Macaya, D., Ng, K.K., Spector, M., 2011. Injectable Collagen-Genipin Gel for the Treatment of Spinal Cord Injury: In Vitro Studies. *Adv. Funct. Mater.* 21, 4788–4797. <https://doi.org/10.1002/adfm.201101720>
105. Mak, K.M., Chu, E., Lau, K.H.V., Kwong, A.J., 2012. Liver Fibrosis in Elderly Cadavers: Localization of Collagen Types I, III, and IV, α -Smooth Muscle Actin, and Elastic Fibers. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 295, 1159–1167. <https://doi.org/10.1002/ar.22504>
106. Manley, G., Hawksworth, J., 1966. Diagnosis of Hurler's syndrome in the hospital laboratory and the determination of its genetic type. *Arch. Dis. Child.* 41, 91–96. <https://doi.org/10.1136/ad.41.215.91>
107. Massey, P.V., Phythian, D., Narduzzo, K., Warburton, E.C., Brown, M.W., Bashir, Z.I., 2008. Learning-specific changes in long-term depression in adult perirhinal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 7548–7554. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1935-08.2008>
108. Matthews, R.T., Kelly, G.M., Zerillo, C.A., Gray, G., Tiemeyer, M., Hockfield, S., 2002. Aggrecan Glycoforms Contribute to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets. *J. Neurosci.* 22, 7536–7547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-17-07536.2002>
109. Medberry, C.J., Crapo, P.M., Siu, B.F., Carruthers, C.A., Wolf, M.T., Nagarkar, S.P., Agrawal, V., Jones, K.E., Kelly, J., Johnson, S.A., Velankar, S.S., Watkins, S.C., Modo, M., Badylak, S.F., 2013. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials* 34, 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.062>
110. Mikami, T., Kitagawa, H., 2013. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4719–4733. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.006>

111. Mikami, T., Yasunaga, D., Kitagawa, H., 2009. Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *J. Biol. Chem.* 284, 4494–4499. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809227200>
112. Miyata, S., Kitagawa, H., 2017. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1861, 2420–2434. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.06.010>
113. Miyata, S., Nadanaka, S., Igarashi, M., Kitagawa, H., 2018. Structural Variation of Chondroitin Sulfate Chains Contributes to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets. *Front. Integr. Neurosci.* 12, 3. <https://doi.org/10.3389/fnint.2018.00003>
114. Morellini, F., Sivukhina, E., Stoenica, L., Oulianova, E., Bukalo, O., Jakovcevski, I., Dityatev, A., Irintchev, A., Schachner, M., 2010. Improved reversal learning and working memory and enhanced reactivity to novelty in mice with enhanced GABAergic innervation in the dentate gyrus. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 20, 2712–2727. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq017>
115. Morikawa, S., Ikegaya, Y., Narita, M., Tamura, H., 2017. Activation of perineuronal net-expressing excitatory neurons during associative memory encoding and retrieval. *Sci. Rep.* 7, 46024. <https://doi.org/10.1038/srep46024>
116. Mueller, A.M., Yoon, B.H., Sadiq, S.A., 2014. Inhibition of hyaluronan synthesis protects against central nervous system (CNS) autoimmunity and increases CXCL12 expression in the inflamed CNS. *J. Biol. Chem.* 289, 22888–22899. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.559583>
117. Nagy, N., Kuipers, H.F., Frymoyer, A.R., Ishak, H.D., Bollyky, J.B., Wight, T.N., Bollyky, P.L., 2015. 4-Methylumbelliferone Treatment and Hyaluronan Inhibition as a Therapeutic Strategy in Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00123>
118. Okada, M., Payne, T.R., Oshima, H., Momoi, N., Tobita, K., Huard, J., 2010. Differential efficacy of gels derived from small intestinal submucosa as an injectable biomaterial for myocardial infarct repair. *Biomaterials* 31, 7678–7683. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.056>
119. Oohashi, T., Edamatsu, M., Bekku, Y., Carulli, D., 2015. The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Exp. Neurol.* 274, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.010>
120. Oohashi, T., Hirakawa, S., Bekku, Y., Rauch, U., Zimmermann, D.R., Su, W.-D., Ohtsuka, A., Murakami, T., Ninomiya, Y., 2002. Bral1, a Brain-Specific Link Protein, Colocalizing with the Versican V2 Isoform at the Nodes of Ranvier in Developing and Adult Mouse Central Nervous Systems. *Mol. Cell. Neurosci.* 19, 43–57. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1061>
121. Pantazopoulos, H., Berretta, S., 2016. In Sickness and in Health: Perineuronal Nets and Synaptic Plasticity in Psychiatric Disorders. *Neural Plast.* 2016, 9847696. <https://doi.org/10.1155/2016/9847696>
122. Parmaksiz, M., Dogan, A., Odabas, S., Elçin, A.E., Elçin, Y.M., 2016. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* 11, 022003. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/2/022003>
123. Petersen, I., 2010. [Morphological and molecular pathology of lung cancer]. *Pathol.* 31 Suppl 2, 204–210. <https://doi.org/10.1007/s00292-010-1371-5>
124. Pollock, K., Stroemer, P., Patel, S., Stevanato, L., Hope, A., Miljan, E., Dong, Z., Hodges, H., Price, J., Sinden, J.D., 2006. A conditionally immortal clonal

- stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp. Neurol.* 199, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.12.011>
125. Potts, J.R., Campbell, I.D., 1996. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol.* 15, 313–320. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(96\)90133-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(96)90133-X)
 126. Profyris, C., Cheema, S.S., Zang, D., Azari, M.F., Boyle, K., Petratos, S., 2004. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 15, 415–436. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.11.015>
 127. Pu, A., Stephenson, E.L., Yong, V.W., 2018. The extracellular matrix: Focus on oligodendrocyte biology and targeting CSPGs for remyelination therapies. *Glia* 66, 1809–1825. <https://doi.org/10.1002/glia.23333>
 128. Pyka, M., Wetzel, C., Aguado, A., Geissler, M., Hatt, H., Faissner, A., 2011. Chondroitin sulfate proteoglycans regulate astrocyte-dependent synaptogenesis and modulate synaptic activity in primary embryonic hippocampal neurons: Proteoglycans regulate synaptogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 33, 2187–2202. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07690.x>
 129. Raber, J., Olsen, R.H.J., Su, W., Foster, S., Xing, R., Acevedo, S.F., Sherman, L.S., 2014. CD44 is required for spatial memory retention and sensorimotor functions. *Behav. Brain Res.* 275, 146–149. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.010>
 130. Raeder, R.H., Badylak, S.F., Sheehan, C., Kallakury, B., Metzger, D.W., 2002. Natural anti-galactose alpha1,3 galactose antibodies delay, but do not prevent the acceptance of extracellular matrix xenografts. *Transpl. Immunol.* 10, 15–24. [https://doi.org/10.1016/s0966-3274\(01\)00044-2](https://doi.org/10.1016/s0966-3274(01)00044-2)
 131. Rasband, M.N., 2010. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 552–562. <https://doi.org/10.1038/nrn2852>
 132. Rilla, K., Oikari, S., Jokela, T.A., Hyttinen, J.M.T., Kärnä, R., Tammi, R.H., Tammi, M.I., 2013. Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3. *J. Biol. Chem.* 288, 5973–5983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.443879>
 133. Rogers, S.L., Rankin-Gee, E., Risbud, R.M., Porter, B.E., Marsh, E.D., 2018. Normal Development of the Perineuronal Net in Humans; In Patients with and without Epilepsy. *Neuroscience* 384, 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.05.039>
 134. Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M.R., Horner, A.E., Spillantini, M.G., Bussey, T.J., Fawcett, J.W., Pizzorusso, T., Saksida, L.M., 2013. Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 7057–7065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013>
 135. Rowlands, D., Lensjø, K.K., Dinh, T., Yang, S., Andrews, M.R., Hafting, T., Fyhn, M., Fawcett, J.W., Dick, G., 2018. Aggrecan Directs Extracellular Matrix-Mediated Neuronal Plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 38, 10102–10113. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1122-18.2018>
 136. Rozario, T., DeSimone, D.W., 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev. Biol.* 341, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>
 137. Saito, T., Dai, T., Asano, R., 2013. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells. *Oncol. Lett.* 5, 1068–1074. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1124>

138. Saldin, L.T., Cramer, M.C., Velankar, S.S., White, L.J., Badylak, S.F., 2017. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater.* 49, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068>
139. Sale, A., Maya Vetencourt, J.F., Medini, P., Cenni, M.C., Baroncelli, L., De Pasquale, R., Maffei, L., 2007. Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat. Neurosci.* 10, 679–681. <https://doi.org/10.1038/nn1899>
140. Schmidt, C.E., Baier, J.M., 2000. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* 21, 2215–2231. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00148-4](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00148-4)
141. Schmidt, C.E., Leach, J.B., 2003. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5, 293–347. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.5.011303.120731>
142. Schmidt, S., Friedl, P., 2010. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res.* 339, 83–92. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0892-9>
143. Schoen, F.J., Harasaki, H., Kim, K.M., Anderson, H.C., Levy, R.J., 1988. Biomaterial-associated calcification: pathology, mechanisms, and strategies for prevention. *J. Biomed. Mater. Res.* 22, 11–36.
144. Seeger, G., Brauer, K., Härtig, W., Brückner, G., 1994. Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *Neuroscience* 58, 371–388. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90044-2)
145. Seif-Naraghi, S.B., Horn, D., Schup-Magoffin, P.J., Christman, K.L., 2012. Injectable extracellular matrix derived hydrogel provides a platform for enhanced retention and delivery of a heparin-binding growth factor. *Acta Biomater.* 8, 3695–3703. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.030>
146. Semba, R.D., Nicklett, E.J., Ferrucci, L., 2010. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 65, 963–975. <https://doi.org/10.1093/gerona/gdq074>
147. Sicari, B.M., Johnson, S.A., Siu, B.F., Crapo, P.M., Daly, K.A., Jiang, H., Medberry, C.J., Tottey, S., Turner, N.J., Badylak, S.F., 2012. The effect of source animal age upon the in vivo remodeling characteristics of an extracellular matrix scaffold. *Biomaterials* 33, 5524–5533. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.017>
148. Silver, J., Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 146–156. <https://doi.org/10.1038/nrn1326>
149. Singelyn, J.M., Christman, K.L., 2010. Injectable materials for the treatment of myocardial infarction and heart failure: the promise of decellularized matrices. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 3, 478–486. <https://doi.org/10.1007/s12265-010-9202-x>
150. Slaker, M., Churchill, L., Todd, R.P., Blacktop, J.M., Zuloaga, D.G., Raber, J., Darling, R.A., Brown, T.E., Sorg, B.A., 2015. Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 4190–4202. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3592-14.2015>
151. Sorg, B.A., Berretta, S., Blacktop, J.M., Fawcett, J.W., Kitagawa, H., Kwok, J.C.F., Miquel, M., 2016. Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. *J. Neurosci.* 36, 11459–11468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2351-16.2016>

152. Spang, M.T., Christman, K.L., 2018. Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo applications and development. *Acta Biomater.* 68, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.019>
153. Speer, D.P., Chvapil, M., Eskelson, C.D., Ulreich, J., 1980. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 14, 753–764. <https://doi.org/10.1002/jbm.820140607>
154. Šponer, P., Filip, S., Kučera, T., Brtková, J., Urban, K., Palička, V., Kočí, Z., Syka, M., Bezrouk, A., Syková, E., 2016. Utilizing Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and β -Tricalcium Phosphate Scaffold in Human Bone Defects: A Prospective, Controlled Feasibility Trial. *BioMed Res. Int.* 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/2076061>
155. Su, M., Soomro, S.H., Jie, J., Fu, H., 2021. Effects of the extracellular matrix on myelin development and regeneration in the central nervous system. *Tissue Cell* 69, 101444. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101444>
156. Su, W., Foster, S.C., Xing, R., Feistel, K., Olsen, R.H.J., Acevedo, S.F., Raber, J., Sherman, L.S., 2017. CD44 Transmembrane Receptor and Hyaluronan Regulate Adult Hippocampal Neural Stem Cell Quiescence and Differentiation. *J. Biol. Chem.* 292, 4434–4445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774109>
157. Sugahara, K., Mikami, T., 2007. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.015>
158. Sullivan, C.S., Gotthard, I., Wyatt, E.V., Bongu, S., Mohan, V., Weinberg, R.J., Maness, P.F., 2018. Perineuronal Net Protein Neurocan Inhibits NCAM/EphA3 Repellent Signaling in GABAergic Interneurons. *Sci. Rep.* 8, 6143. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24272-8>
159. Sung, H.-W., Chang, W.-H., Ma, C.-Y., Lee, M.-H., 2003. Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *J. Biomed. Mater. Res.* 64A, 427–438. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10346>
160. Sung, H.W., Huang, R.N., Huang, L.L., Tsai, C.C., Chiu, C.T., 1998. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *J. Biomed. Mater. Res.* 42, 560–567. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19981215\)42:4<560::aid-jbm12>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19981215)42:4<560::aid-jbm12>3.0.co;2-i)
161. Sung, H.W., Liang, I.L., Chen, C.N., Huang, R.N., Liang, H.F., 2001. Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *J. Biomed. Mater. Res.* 55, 538–546. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20010615\)55:4<538::aid-jbm1047>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20010615)55:4<538::aid-jbm1047>3.0.co;2-2)
162. Taylor, D.A., 2009. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.016>
163. Thompson, E.H., Lensjø, K.K., Wigstrand, M.B., Malthe-Sørenssen, A., Hafting, T., Fyhn, M., 2018. Removal of perineuronal nets disrupts recall of a remote fear memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 607–612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713530115>
164. Torres-Espín, A., Santos, D., González-Pérez, F., del Valle, J., Navarro, X., 2014. Neurite-J: An Image-J plug-in for axonal growth analysis in organotypic cultures. *J. Neurosci. Methods* 236, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.08.005>
165. Tottey, S., Johnson, S.A., Crapo, P.M., Reing, J.E., Zhang, L., Jiang, H., Medberry, C.J., Reines, B., Badylak, S.F., 2011. The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials* 32, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.006>

166. Trabucchi, E., Baratti, C., Centemero, A., Zuin, M., Rizzitelli, E., Colombo, R., 1986. Controlled study of the effects of tiropamide on biliary dyskinesia. *Pharmatherapeutica* 4, 541–550.
167. Tsien, R.Y., 2013. Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12456–12461. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310158110>
168. Tsilibary, E., Tzinia, A., Radenovic, L., Stamenkovic, V., Lebitko, T., Mucha, M., Pawlak, R., Frischknecht, R., Kaczmarek, L., 2014. Neural ECM proteases in learning and synaptic plasticity. *Prog. Brain Res.* 214, 135–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63486-3.00006-2>
169. Tsuchiya, S., Ohashi, Y., Ishizuka, S., Ishiguro, N., O'Rourke, D.P., Knudson, C.B., Knudson, W., 2020. Suppression of murine osteoarthritis by 4-methylumbelliferone. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 38, 1122–1131. <https://doi.org/10.1002/jor.24541>
170. Tukmachev, D., Forostyak, S., Koci, Z., Zaviskova, K., Vackova, I., Vyborny, K., Sandvig, I., Sandvig, A., Medberry, C.J., Badylak, S.F., Sykova, E., Kubinova, S., 2016. Injectable Extracellular Matrix Hydrogels as Scaffolds for Spinal Cord Injury Repair. *Tissue Eng. Part A* 22, 306–317. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0422>
171. Ungerleider, J.L., Johnson, T.D., Hernandez, M.J., Elhag, D.I., Braden, R.L., Dzieciatkowska, M., Osborn, K.G., Hansen, K.C., Mahmud, E., Christman, K.L., 2016. Extracellular Matrix Hydrogel Promotes Tissue Remodeling, Arteriogenesis, and Perfusion in a Rat Hindlimb Ischemia Model. *JACC Basic Transl. Sci.* 1, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.01.009>
172. Vo, T., Carulli, D., Ehler, E.M.E., Kwok, J.C.F., Dick, G., Mecollari, V., Moloney, E.B., Neufeld, G., de Winter, F., Fawcett, J.W., Verhaagen, J., 2013. The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 56, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.009>
173. Wang, R.M., Christman, K.L., 2016. Decellularized myocardial matrix hydrogels: In basic research and preclinical studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 96, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.002>
174. Wang, T.-W., Spector, M., 2009. Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering. *Acta Biomater.* 5, 2371–2384. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.03.033>
175. Wang, Y., Bao, J., Wu, X., Wu, Q., Li, Y., Zhou, Y., Li, L., Bu, H., 2016. Genipin crosslinking reduced the immunogenicity of xenogeneic decellularized porcine whole-liver matrices through regulation of immune cell proliferation and polarization. *Sci. Rep.* 6, 24779. <https://doi.org/10.1038/srep24779>
176. Wassenaar, J.W., Braden, R.L., Osborn, K.G., Christman, K.L., 2016. Modulating in vivo degradation rate of injectable extracellular matrix hydrogels. *J. Mater. Chem. B* 4, 2794–2802. <https://doi.org/10.1039/C5TB02564H>
177. Wen, T.H., Binder, D.K., Ethell, I.M., Razak, K.A., 2018. The Perineuronal “Safety” Net? Perineuronal Net Abnormalities in Neurological Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 270. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00270>
178. Winters, J.M., Xin Feng, Yu Wang, Johnson, L.M., Foil, J., 2004. Progress toward universal interface technologies for telerehabilitation, in: *The 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. Presented at the 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEEE, San Francisco, CA, USA, pp. 4777–4780. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2004.1404322>

179. Wood, J.D., Simmons-Byrd, A., Spievack, A.R., Badylak, S.F., 2005. Use of a particulate extracellular matrix bioscaffold for treatment of acquired urinary incontinence in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 1095–1097. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1095>
180. Xian, X., Gopal, S., Couchman, J.R., 2010. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 339, 31–46. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0829-3>
181. Xi-xun, Y., Chang-xiu, W., Huai-qing, C., 2008. Preparation and endothelialization of decellularised vascular scaffold for tissue-engineered blood vessel. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19, 319–326. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3157-8>
182. Xu, D., Hopf, C., Reddy, R., Cho, R.W., Guo, L., Lanahan, A., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., O'Brien, R.J., Worley, P., 2003. Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron* 39, 513–528. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00463-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00463-x)
183. Yamaguchi, Y., 2000. Leticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 276–289. <https://doi.org/10.1007/PL00000690>
184. Yang, S., Cacquevel, M., Saksida, L.M., Bussey, T.J., Schneider, B.L., Aebischer, P., Melani, R., Pizzorusso, T., Fawcett, J.W., Spillantini, M.G., 2015. Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology. *Exp. Neurol.* 265, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.11.013>
185. Yang, S., Hilton, S., Alves, J.N., Saksida, L.M., Bussey, T., Matthews, R.T., Kitagawa, H., Spillantini, M.G., Kwok, J.C.F., Fawcett, J.W., 2017. Antibody recognizing 4-sulfated chondroitin sulfate proteoglycans restores memory in tauopathy-induced neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 59, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.08.002>
186. Yiu, G., He, Z., 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 617–627. <https://doi.org/10.1038/nrn1956>
187. Yoshioka, Y., Kozawa, E., Urakawa, H., Arai, E., Futamura, N., Zhuo, L., Kimata, K., Ishiguro, N., Nishida, Y., 2013. Suppression of hyaluronan synthesis alleviates inflammatory responses in murine arthritis and in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 65, 1160–1170. <https://doi.org/10.1002/art.37861>
188. Young, D.A., Ibrahim, D.O., Hu, D., Christman, K.L., 2011. Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate. *Acta Biomater.* 7, 1040–1049. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.09.035>
189. Zantop, T., Gilbert, T.W., Yoder, M.C., Badylak, S.F., 2006. Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 24, 1299–1309. <https://doi.org/10.1002/jor.20071>
190. Zaremba, S., Naegel, J., Barnstable, C., Hockfield, S., 1990. Neuronal subsets express multiple high-molecular-weight cell-surface glycoconjugates defined by monoclonal antibodies Cat-301 and VC1.1. *J. Neurosci.* 10, 2985–2995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-09-02985.1990>
191. Zaviskova, K., Tukmachev, D., Dubisova, J., Vackova, I., Hejcl, A., Bystronova, J., Pravda, M., Scigalkova, I., Sulakova, R., Velebny, V., Wolfova, L., Kubinova, S., 2018. Injectable hydroxyphenyl derivative of hyaluronic acid hydrogel modified with RGD as scaffold for spinal cord injury repair: Hyaluronic

- acid hydrogel for spinal cord injury repair. *J. Biomed. Mater. Res. A* 106, 1129–1140. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36311>
192. Zhang, L., 2010. Glycosaminoglycan (GAG) Biosynthesis and GAG-Binding Proteins, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 1–17. [https://doi.org/10.1016/S1877-1173\(10\)93001-9](https://doi.org/10.1016/S1877-1173(10)93001-9)
193. Zimmermann, D.R., Dours-Zimmermann, M.T., 2008. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem. Cell Biol.* 130, 635–653. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0485-9>
194. Zollinger, A.J., Smith, M.L., 2017. Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol.* 60–61, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.07.011>

9. Původní práce, které jsou podkladem disertační práce

Dubisova, Jana, Jana Svobodova Burianova, Lucie Svobodova, Pavol Makovicky, Noelia Martinez-Varea, Anda Cimpean, James W. Fawcett, Jessica C.F. Kwok, and Sarka Kubinova. 2022. "Oral Treatment of 4-Methylumbelliferone Reduced Perineuronal Nets and Improved Recognition Memory in Mice." *Brain Research Bulletin* 181 (April): 144–56. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.011>.

(IF 4,077)

Kočí, Zuzana, Karel Výborný, Jana Dubišová, Irena Vacková, Aleš Jäger, Oleg Lunov, Klára Jiráková, and Šárka Kubinová. 2017. "Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 23 (6): 333–45. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0089>.

(IF 3.508)

Výborný, Karel, Jana Vallová, Zuzana Kočí, Kristýna Kekulová, Klára Jiráková, Pavla Jendelová, Jiří Hodan, and Šárka Kubinová. 2019. "Genipin and EDC Crosslinking of Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord for Neural Tissue Repair." *Scientific Reports* 9 (1): 10674. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47059-x>.

(IF 4,011)

10. Publikace autorky, které nemají vztah k disertační práci

Krupa, Petr, Barbora Svobodova, Jana Dubisova, Sarka Kubinova, Pavla Jendelova, and Lucia Machova Urdzikova. 2019. "Nano-Formulated Curcumin (LipodisqTM) Modulates the Local Inflammatory Response, Reduces Glial Scar and Preserves the White Matter after Spinal Cord Injury in Rats." *Neuropharmacology* 155 (September): 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.05.018>.

(IF 4,376)

Krupa, Petr, Irena Vackova, Jiri Ruzicka, Kristyna Zaviskova, Jana Dubisova, Zuzana Koci, Karolina Turnovcova, et al. 2018. "The Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly in Spinal Cord Injury Treatment Is Dose-Dependent and Can Be Facilitated by Repeated Application." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (5): 1503. <https://doi.org/10.3390/ijms19051503>.

(IF 4,183)

Machova Urdzikova, Lucia, Kristyna Karova, Jiri Ruzicka, Anna Kloudova, Craig Shannon, Jana Dubisova, Raj Murali, et al. 2015. "The Anti-Inflammatory Compound Curcumin Enhances Locomotor and Sensory Recovery after Spinal Cord Injury in Rats by Immunomodulation." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1): 49. <https://doi.org/10.3390/ijms17010049>.

(IF 3,257)

Machova Urdzikova, Lucia, Jiri Ruzicka, Kristyna Karova, Anna Kloudova, Barbora Svobodova, Anubhav Amin, Jana Dubisova, et al. 2017. "A Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Enhances Neuroregeneration after Spinal Cord Injury by Altering Levels of Inflammatory Cytokines." *Neuropharmacology* 126 (November): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.006>.

(IF 4,249)

Ruzicka, Jiri, Lucia Machova-Urdzikova, John Gillick, Takashi Amemori, Nataliya Romanyuk, Kristyna Karova, Kristyna Zaviskova, et al. 2017. "A Comparative Study of Three Different Types of Stem Cells for Treatment of Rat Spinal Cord Injury." *Cell Transplantation* 26 (4): 585–603. <https://doi.org/10.3727/096368916X693671>.

(IF 2,885)

Ruzicka, Jiri, Lucia Machova Urdzikova, Anna Kloudova, Anubhav G. Amin, Jana Vallova, Sarka Kubinova, Meic H. Schmidt, Meena Jhanwar-Uniyal, and Pavla Jendelova. 2018. "Anti-Inflammatory Compound Curcumin and Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury in Rats." *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 78 (4): 358–74.

(IF 1,529)

Ruzicka, Jiri, Lucia Machova Urdzikova, Barbora Svobodova, Anubhav G. Amin, Kristyna Karova, Jana Dubisova, Kristyna Zaviskova, et al. 2018. "Does Combined Therapy of Curcumin and Epigallocatechin Gallate Have a Synergistic Neuroprotective Effect against Spinal Cord Injury?" *Neural Regeneration Research* 13 (1): 119. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.224379>.

(IF 2,472)

Zaviskova, Kristyna, Dmitry Tukmachev, Jana Dubisova, Irena Vackova, Ales Hejcl, Julie Bystronova, Martin Pravda, et al. 2018. "Injectable Hydroxyphenyl Derivative of Hyaluronic Acid Hydrogel Modified with RGD as Scaffold for Spinal Cord Injury Repair: Hyaluronic Acid Hydrogel for Spinal Cord Injury Repair." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 106 (4): 1129–40.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36311>.

(IF 3,221)