

ANNA LIS¹, DARIUSZ SZAREK^{2,3}, JADWIGA ŁASKA¹

Strategie inżynierii biomateriałów dla regeneracji rdzenia kręgowego: aktualny stan wiedzy

Biomaterials Engineering Strategies for Spinal Cord Regeneration: State of the Art

¹ Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie

² Klinika Neurochirurgii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny we Wrocławiu

³ Katedra Neurochirurgii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Urazowe uszkodzenia rdzenia kręgowego stanowią bardzo poważne obciążenie dla organizmu osób poszkodowanych i są tym dotkliwsze, ponieważ najczęściej dotyczą przede wszystkim ludzi młodych. Spowodowane nimi problemy fizyczne, emocjonalne i ekonomiczne z reguły istotnie ograniczają funkcjonowanie pacjentów i stanowią obciążenie dla społeczeństwa. Rdzeń kręgowy charakteryzuje się niemal brakiem możliwości spontanicznej i funkcjonalnej regeneracji, stąd jego uszkodzenie powoduje poważne i często trwałe kalectwo. Patofizjologia uszkodzenia rdzenia kręgowego jest wynikiem następujących po sobie dwóch zjawisk; urazu pierwotnego oraz wtórnego. Po uszkodzeniach pierwotnych w wyniku urazu mechanicznego następują zmiany patologiczne o podłożu biochemicznym narastające kaskadowo po urazie, które nawzajem się wzmacniają i powodują dalszą destrukcję rdzenia kręgowego. Następuje kaskada procesów patologicznych w tym krwotok, obrzęk, nekroza neuronów, fragmentacja i demielinizacja aksonów i ostatecznie tworzenie się cysty. Ponadto urazy rdzenia kręgowego mogą spowodować natychmiastową śmierć komórek nerwowych oraz zakłócić dopływ krwi do miejsca uszkodzenia. Ważną różnicą pomiędzy obwodowym i centralnym układem nerwowym jest to, że podczas urazu w rdzeniu kręgowym ulegają zniszczeniu zarówno ciała komórek nerwowych i aksony dróg rdzeniowych, podczas gdy w obwodowym układzie nerwowym tylko aksony podlegają uszkodzeniu. W obrębie rdzenia kręgowego jednym z głównych czynników hamujących regenerację jest tworzenie się blizny glejowej. Rozprzestrzeniające się na powierzchni uszkodzenia gęsto upakowane astrocyty hamują skutecznie wzrost aksonów poprzez blokadę wzrostu. Blizna składająca się głównie z nadaktywnych astrocytów i fibroblastów wraz z obecnymi w niej związkami inhibującymi wzrost aksonów, takimi jak proteoglikany (pochodzące z rozpadu uszkodzonych komórek nerwowych), stanowi barierę fizyko-chemiczną dla efektywnej regeneracji aksonów.

Obecny postęp naukowy w medycynie, biologii oraz inżynierii biomateriałów, a w szczególności w dziedzinach neurochirurgii, hodowli komórkowej i inżynierii tkankowej, otwiera możliwość dla rozwoju nowych terapii wspomagających leczenie skutków urazowych uszkodzeń rdzenia kręgowego i zapobiegających dalszym procesom neurodegeneracyjnym. Najbardziej obiecujące wyniki, jak dotąd, uzyskuje się przy zastosowaniu odpowiednio zaprojektowanych konstrukcji polimerowych stanowiących rusztowanie dla regenerujących aksonów, w połączeniu z systemem dostarczania leków lub linii komórek terapeutycznych oraz czynników neurotroficznych.

W niniejszym artykule przeglądowym opisano wybrane zastosowania biomateriałów w regeneracji urazowych uszkodzeń rdzenia kręgowego. Na wstępie opisana została podstawowa budowa anatomiczna rdzenia kręgowego. Następnie porównane zostały mechanizmy uszkodzeń i neuroregeneracji w obwodowym i centralnym układzie nerwowym. Patofizjologia uszkodzeń rdzenia kręgowego, odniesiona została do bieżących strategii inżynierii biomateriałowej w eksperymentalnych terapiach wspomagających neuroregenerację. W podsumowaniu zwrócono uwagę na obiecujące interdyscyplinarne strategie terapeutyczne, mające na celu regenerację rdzenia kręgowego (**Polim. Med. 2013, 43, 2, 59–80**).

Słowa kluczowe: biomateriały, centralny układ nerwowy, rdzeń kręgowy, regeneracja nerwów

Summary

Traumatic spinal cord injuries are very serious burden for the organism of affected human population, and are more critical because mostly touching the young cluster of population. Physical, emotional and economic problems caused by traumatic spinal cord injuries as a general rule significantly limit the individual patient functionality and are burden for the society.

The spinal cord has considerable lack of ability for spontaneous and functional regeneration, hence the spinal cord injury cause a solemn and frequently permanent disabilities. The pathophysiology of spinal cord injury is the results of sequential two phenomena, primary physical and biochemical secondary mechanisms of injury. After physical injury, the spinal cord undergoes a sequential progression in biochemical pathologic deviations increasing after injury, that are mutually deteriorating and cause further damage in the spinal cord. Consequently series of pathological processes lead to haemorrhage, oedema, neuronal necrosis, axonal fragmentation, demyelination of the remaining axons, and formation of ultimately cyst. Furthermore spinal cord injuries can immediately result in neural cells death and cause disruption of the blood supply to the site of the injury. The most important difference between peripheral and central nervous system is the fact that in the spinal cord the neuronal cell bodies are damaged, while in the peripheral nervous system only axons are injured. In the surroundings of the spinal cord, one of the major factors hampering regeneration is the glial scar expansion. The spreading of densely packed astrocytes on the site of injuries effectively inhibit axon growth through the nerve grow blocking. Glial scar, which consists mainly of overactive astrocytes and fibroblasts, as well as the presence of growth-inhibitor molecules such as chondroitin sulphate proteoglycans (derived from the breakdown of damaged nerve cells) form a physicochemical barrier for effective regenerating axons.

The recent scientific progress in medicine, biology and biomaterials engineering, and predominantly in the fields of neurosurgery, cell culture and tissue engineering, creates the opportunity for the development of new therapies, which support healing of the effects of traumatic spinal cord injuries and prevent further neurodegenerative processes. The most promising effects so far have been obtained using well-designed polymer scaffold as structural support for axon regeneration combined with drug delivery system or therapeutic cell line and neurotrophic factors.

This review article focuses on the application of selected biomaterials for the regeneration of traumatic spinal cord injuries. First, the basic anatomical structure of the spinal cord has been described. Then the injury and neurodegenerative mechanisms within the peripheral and central nervous system have been compared. The pathophysiology of the spinal cord damage has been referred to the current strategy of biomaterials engineering in experimental therapies supporting neuroregeneration processes. In the summary, the promising interdisciplinary therapeutic strategies aimed at the regeneration of the spinal cord have been highlighted (**Polim. Med.** 2013, 43, 2, 59–80).

Key words: biomaterials, central nervous system, spinal cord, nerve regeneration

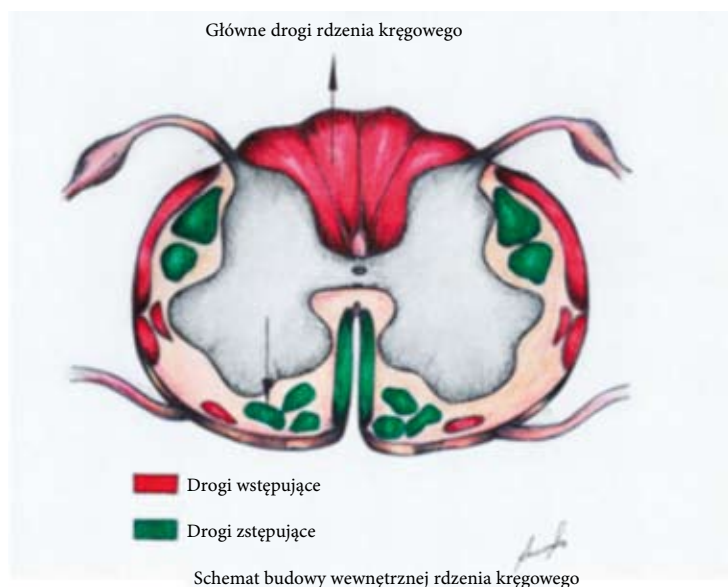
Wprowadzenie

Urazy rdzenia kręgowego są przyczyną poważnego i zwykle nieodwracalnego kalectwa. Ich leczenie jest bardzo trudne, a aktualny stan wiedzy medycznej pozwala na prowadzenie jedynie leczenia ograniczającego skutki urazu rdzenia. Ogromne znaczenie ma przede wszystkim rehabilitacja, która może zwiększać potencjał zachowanych po urazie funkcji dróg nerwowych rdzenia kręgowego. Regeneracja uszkodzonej tkanki nerwowej jest bardzo złożonym i wolno postępującym procesem, z uwagi na jej skomplikowaną budowę anatomiczną i histologiczną oraz obecność wewnętrznych czynników blokujących jej odbudowę co powoduje, że problem regeneracji uszkodzeń rdzenia kręgowego nie został do tej pory rozwiązany [1–4].

Liczne badania prowadzone w wielu ośrodkach naukowych, pokazują złożoność mechanizmów odpowiedzialnych za pobudzanie i hamowanie procesów, zachodzących w tkance nerwowej w uszkodzonym rdzeniu kręgowym. Większość terapii jest w dalszym ciągu na etapie prób i wymagają przeprowadzenia jeszcze wielu złożonych analiz, by mogły być wprowadzone do wykorzystania klinicznego. Aktualne strategie bioinżynierii skupiają się na konstruowaniu rusztowań trójwymiarowych, stwarzających środowisko, w którym mogłaby nastąpić regeneracja uszkodzonej tkanki, w tym pourazowych ubytków rdzenia kręgowego [1–4].

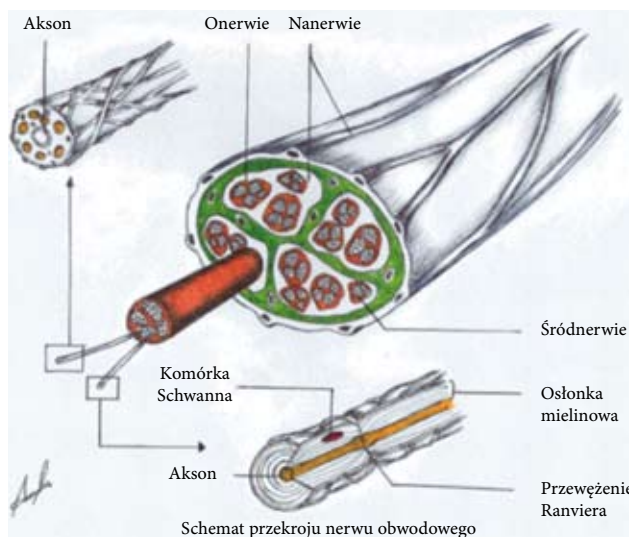
Budowa wewnętrzna rdzenia kręgowego

Struktura (ryc. 1 i 3) i fizjologia ośrodkowego układu nerwowego, stanowi niespotykane skomplikowane i wyjątkowe wyzwanie dla bioinżynierii, zajmującej się



Ryc. 1. Przekrój poprzeczny przez rdzeń kręgowy. Autorka ryciny: Anna Lis

Fig. 1. Cross-section through the spinal cord. Author of the image: Anna Lis



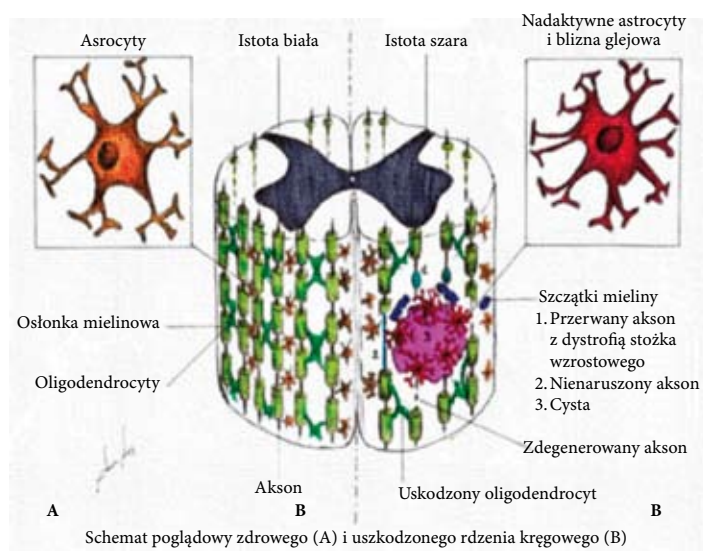
Ryc. 2. Schemat struktury nerwu obwodowego. Autorka ryciny: Anna Lis

Fig. 2. Scheme of peripheral nerve structure. Author of the image: Anna Lis

regeneracją tkanki nerwowej. Tkanka nerwowa nie jest tkanką jednorodną o takiej samej budowie i funkcji w obrębie całego układu nerwowego. Poszczególne ośrodki nerwowe są odpowiedzialne za specyficzne funkcje kontrolujące określone obszary organizmu, przez co po odtworzeniu budowy fizycznej musi nastąpić jeszcze odtworzenie funkcjonalnych połączeń nerwowych [5–6].

Rdzeń kręgowy zbudowany jest z istoty szarej oraz istoty białej. Na przekroju poprzecznym rdzenia, zwraca uwagę istota szara położona centralnie, przyjmująca kształt litery H (ryc. 3). Położona wokół niej jest istota biała, która zawdzięcza swój kolor dużej zawartości mieliny i zbudowana jest z aksonów długich dróg rdzeniowych, oraz zawiera nieliczne komórki nerwowe. Drogi nerwowe rdzenia kręgowego stanowią dwukierunkowy system komunikacji. Drogi wstępujące przewodzą impulsy oraz wrażenia czuciowe z narządów obwodowych do mózgu, drogi zstępujące przewodzą impulsy ruchowe z mózgu do narządów. Włókna nerwowe są specyficzne dla unerwianego obszaru organizmu oraz przekazywanej informacji nerwowej. Istota szara składa się z nagromadzenia komórek nerwowych i w mniejszym stopniu włókien dróg nerwowych. W tym miejscu następuje połączenie impulsów nerwowych z długich dróg nerwowych, biegnących z mózgu na aksony nerwów obwodowych oraz w kierunku odwrotnym, tj. z nerwów obwodowych na drogi rdzeniowe domózgowe.

Zarówno istota szara jak i biała zawierają szkielet zbudowany przez komórki glejowe, stanowiące podstawowe utkanie podporowe tkanek centralnego układu nerwowego. Astrocyty podpierają oraz otaczają neurony, zapewniają dla nich osłonę mechaniczną, a także chemiczną budując barierę krew-mózg/rdzeń kręgowy, która niemal całkowicie separuje ośrodkowy układ ner-



Ryc. 3. Schemat zdrowego i uszkodzonego rdzenia kręgowego. Autorka ryciny: Anna Lis

Fig. 3. Scheme of healthy and injured spinal cord. Author of the image: Anna Lis

wowy od składników krwi. Kolejną ważną grupą komórek są oligodendrocyty, które otaczają i mielinizują aksony w ośrodkowym układzie nerwowym [5, 6].

Urazowe uszkodzenia rdzenia kręgowego

Najczęstszymi przyczynami urazów rdzenia kręgowego są wypadki komunikacyjne lub upadki podczas pracy na wysokości, rzadziej aktywność sportowa w szczególności wyczynowa, w tym niefortunne skoki do wody, zranienia bezpośrednie kręgosłupa i rdzenia, takie jak postrzały i rany kłute. Konsekwencją uszkodzenia rdzenia kręgowego jest na ogół częściowy lub całkowity paraliż, co wiąże się z dysfunkcją układu ruchu i czucia przez całe życie [6–11]. Objawy kliniczne są zależne od rozległości uszkodzenia w obrębie rdzenia, topografii na przekroju poprzecznym oraz segmentu na jakim uraz nastąpił. Charakter i przestrzenna lokalizacja uszkodzenia rdzenia, uzależniona od segmentu wywołują odmienne zespoły neurologiczne [12].

Wyróżnia się dwa główne stopnie uszkodzenia rdzenia kręgowego: całkowite i niecałkowite. Konsekwencją całkowitego uszkodzenia rdzenia kręgowego, jest stan zniesienia wszelkich fizjologicznych funkcji poniżej określonego segmentu rdzenia, na którym nastąpił uraz. Przejawia się to nieodwracalnym zniesieniem wszelkich funkcji sensomotorycznych, a także zaburzeniami funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego. Objawy całkowitego uszkodzenia rdzenia, które utrzymują się przez ponad dobę po urazie zazwyczaj są już nieodwracalne. W przypadku niecałkowitego uszkodzenia rdzenia kręgowego istnieją opisane różne zespoły neurologicz-

ne, stanowiące grupy objawów wynikających z różnego stopnia, mechanizmu, lokalizacji i rozległości uszkodzenia rdzenia kręgowego, np. zespół centralnego uszkodzenia rdzenia kręgowego, zespół Browna-Séquarda, zespół tętnicy rdzeniowej przedniej, zespół połowiczego uszkodzenia rdzenia, zespół sznurów tylnych, i inne [13–20].

Podstawowe pierwotne mechanizmy urazowego uszkodzenia rdzenia kręgowego to wstrząśnienie, stłuczenie, zranienie, zmiążdżenie oraz uszkodzenia naczyniowe. Stłuczeniu, zmiążdżeniu i uszkodzeniu naczyniowemu towarzyszą zmiany mikrostruktury. Wtórne uszkodzenia rdzenia kręgowego są wywołane przyczynami pozardzeniowymi oraz wewnątrzrdzeniowymi [21–25].

Do przyczyn pozardzeniowych zaliczamy wstrząs pourazowy i w jego wyniku spadek ciśnienia tętniczego krwi, co powoduje niedotlenienie oraz niedokrwienie tkanki nerwowej. Może wystąpić również ucisk rdzenia kręgowego poprzez fragmenty kostne kręgosłupa. Zmiany te najczęściej występują po niestabilnych złamaniach kręgosłupa. Przyczyny wewnątrzrdzeniowe wyjaśniane są na podstawie teorii Halla i Wolfa oraz biochemicznego urazu wtórnego [21–25].

Patofizjologia urazów rdzenia kręgowego objawia się urazami pierwotnymi, czyli wystąpieniem nagłego ucisku mechanicznego. Mechanizmy te początkowo obejmują rozprzestrzenianie się krwotoku w miejscu uszkodzenia, oraz apoptozy komórek nerwowych ośrodkowego układu nerwowego. Następstwem pierwotnych urazów rdzenia są wtórne urazy, przejawiające się niedokrwieniem, hemostazą, wystąpieniem stanu zapalnego oraz nekrozy komórek [26–33].

Regeneracja rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych

Regeneracja uszkodzonego nerwu obwodowego (ryc. 2) jest zjawiskiem biologicznie skomplikowanym jednak skutecznym. W układzie nerwowym obwodowym, nerwy mogą regenerować się spontanicznie, a możliwości regeneracyjne uzależnione są od stopnia uszkodzenia opisywanego w skali Sunderlanda. Ciężkie uszkodzenia z przerwaniami ciągłości nerwów muszą być leczone operacyjnie [34, 35]. Pomimo, że uszkodzone nerwy obwodowe mają zdolność do regeneracji, to po urazie rdzenia kręgowego sytuacja jest bardziej dramatyczna. Urazy w ośrodkowym układzie nerwowym są znacznie bardziej skomplikowane [26–33]. Utrata czucia i funkcji motorycznych po uszkodzeniach rdzenia kręgowego od dawna uważane były za nieuleczalne, ze względu na niezdolność neuronów ośrodkowego układu nerwowego do regeneracji ich aksonów. Badania wykazały, że mają one jednak zdolności wewnętrzne do samoregeneracji, są one jednak hamowane przez niesprzyjające środowisko. Ich leczenie jest bardzo trudne, gdyż w strukturze rdzenia kręgowego znajdują się liczne czynniki spowalniające, lub wręcz uniemożliwiające jego odbudowę [26–33].

Uszkodzenie nerwu w obwodowym systemie nerwowym prowadzi początkowo do degeneracji typu Wallera w części dystalnej aksonu, a następnie jego regeneracji. Dwa wymienione wyżej procesy mają miejsce tylko wtedy, gdy ciało komórki nerwowej nie zostało uszkodzone podczas urazu. Po przecięciu nerwu obwodowego powstają dwa kikuty: bliższy i dalszy względem ciała komórki nerwowej. W kikucie dalszym, częściowo też bliższym (degeneracja wstępująca) ciała neuronu dochodzi do degeneracji pierwotnej, zwanej degeneracją Wallerowską [33–37]. Zachodzi rozpad aksonu oraz jego osłonki mielinowej. Zstępująca degeneracja aksonu obejmuje wszystkie odgałęzienia i zakończenia, a także osłonki mielinowe. Fragmenty aksonu są fagocytowane przez makrofagi, co prowadzi do oczyszczenia obszaru degeneracji. Makrofagi wydzielają także cytokinę – interleukinę 1, która stymuluje komórki Schwanna do wydzielania czynnika wzrostu neuronów (NGF - nerve growth factor). Syntetyzują one także błonowe glikoproteiny, które stanowią słabo wiążące receptory dla czynnika wzrostu. W kikucie bliższym krawędzie rozerwanego aksonu łączą się i zamykają kikut bliższy. Resultatem jest wytworzenie tzw. kolbki końcowej. Ciało komórki nerwowej zwiększa swoją objętość przygotowując się do syntezy białek koniecznych do odbudowy utraconego odcinka aksonu.

Następnie dochodzi do regeneracji aksonu poprzez wzrost mininózek/filiposii ze stożka wzrostowego w kierunku dystalnym. W tym samym czasie komórki Schwanna (w obwodowym układzie nerwowym wytwarzają osłonkę mielinową) ulegają wzbudzeniu i licznym podziałom, układają się kolejno wzdłuż osi długiej nerwu tworząc kanały dla regenerujących aksonów. Wzrastający akson ma na błonie komórkowej receptory silnie wiążące czynnik wzrostu nerwów i wydłuża się w kierunku źródła NGF, czyli kikuta dalszego i obecnych w nim wzbudzonych komórek Schwanna produkujących NGF, co zapewnia szybki wzrost aksonu. Po zakończeniu regeneracji ciało komórkowe komórki nerwowej wraca do podstawowego stanu metabolicznego, a po kilku miesiącach wytworzone zostają ostateczne synapsy końcowe [38–43].

W ośrodkowym układzie nerwowym (ryc. 3) jest to znacznie bardziej skomplikowany proces [44–46]. Uszkodzenia tkanki nerwowej w centralnym układzie nerwowym, ze szczególnym uwzględnieniem rdzenia kręgowego, prowadzą do zmian przypominających te mające miejsce w obwodowym systemie nerwowym przez kilka pierwszych godzin. Dochodzi do wytworzenia kikuta bliższego aksonu – kolbki wzrostowej z mininózkami wzrostowymi, degeneracji Wallerowskiej kikuta dalszego (anatomicznie w rdzeniu kręgowym oba procesy są ze sobą wymieszane, gdyż po obu stronach uszkodzenia leżą drogi wstępujące i zstępujące) [47].

W późniejszym okresie proces regeneracji nie postępuje. Powodem zahamowania regeneracji nerwów w centralnym układzie nerwowym jest szereg czynni-

ków, m. in. obecność między wypustkami komórek sieci proteoglikanów [48]. Makrocząsteczki te stanowią przeszkodę dla wzrostu wypustek nerwowych. Po upływie kilku godzin od uszkodzenia, kiedy komórki mikrogleju rozpoczynają oczyszczanie obszaru urazu, dochodzi do aktywizacji astrocytów. Ulegają one podziałowi i wydzielają w dużych ilościach kwaśne włókniste białka glejowe (GFAB – glial fibrillar acidic protein) mnożąc się i tworząc bliznę glejową, a w konsekwencji tworzą się cysty [49–51]. Proteoglikany, blizna glejowa blaszki mielinowej i cysty stanowią mur nie do przebicia dla wzrostu uszkodzonych włókien nerwowych [52–54]. Blizna glejowa to gęsto upakowane astrocyty. Czynnikiem nasilającym uszkodzenie rdzenia kręgowego jest tzw. uraz wtórny – wspomniany szereg mechanizmów kaskady uszkodzenia naczyniowego, metabolicznego, elektrolitowego i przy udziale wolnych rodników, które prowadzą do powiększenia obszaru urazowego [55, 56].

Po ustabilizowaniu się i zatrzymaniu powyższego procesu następuje proces reparacji. W pierwszym etapie komórki mikrogleju i makrofagi naciekające miejsce uszkodzenia usuwają martwą tkankę. Na jej obrzeżach dochodzi do wzbudzenia kikutów uszkodzonych długich dróg rdzeniowych, podobnie do zjawisk obserwowanych w nerwach obwodowych. Wytworzone zostają kolbki wzrostowe i mininóżki/filipodia, które przez niewielki odcinek (poniżej 1 mm) prowadzą wzrost. W wyniku usunięcia przez mikroglej zniszczonej tkanki powstaje jama syringomieliczna. Na jej ścianach w wyniku opisanego powyżej rozplemu astrocytów wytwarza się blizna glejowa, stanowiąca litą ścianę na granicy uszkodzenia rdzenia kręgowego. Kolejnymi czynnikami są białka z grupy NOGO – produkty rozpadu mieliny. Blokują one wtórnie wzrost aksonów podobnie do jamy syringomielicznej i blizny glejowej [55–56].

Uważa się, że powyższe mechanizmy hamowania ośrodkowej neuroregeneracji mogą być ewolucyjnym czynnikiem zabezpieczającym. Jedną z teorii mówi, że wysoki stopień organizacji anatomiczno-funkcjonalnej rdzenia kręgowego powoduje, że w przypadku regeneracji istnieje ryzyko masowych błędnych reinerwacji – przypadkowego wzrastania włókien nerwowych w niewłaściwe kanały oligodendrocytów i wytwarzania niefizjologicznych połączeń w drogach nerwowych. Powyższy fakt stwarza dodatkową trudność w pracach nad uzyskaniem ośrodkowej neuroregeneracji [55–57]. Oczywiście jest wiele innych niezliczonych czynników ograniczających regenerację ośrodkowego układu nerwowego po urazach nie wymienionych powyżej.

Cele regeneracji rdzenia kręgowego

Jak wspomniano absencja spontanicznej regeneracji uszkodzonego rdzenia kręgowego, jest spowodowana ograniczoną zdolnością ośrodkowego układu

nerwowego ssaków do przywrócenia funkcjonalnych połączeń neuronalnych. Na podstawie wyżej opisanych zjawisk neurodegeneracji, możliwości regeneracyjnych i implikacji anatomiczno-fizjologicznych widać, jak wielopłaszczyznowe są mechanizmy odpowiedzialne za stymulację i hamowanie różnorodnych procesów, zachodzących w tkance nerwowej rdzenia kręgowego po urazie. Wydaje się, że zablokowanie przynajmniej niektórych z nich może zmniejszyć liczbę obumierających komórek nerwowych i wzbudzić procesy regeneracyjne uszkodzonej tkanki nerwowej [1–3, 58, 59].

Głównym celem eksperymentów skierowanych na uzyskanie regeneracji uszkodzonego rdzenia kręgowego jest usunięcie przeszkód, takich jak jama pourazowa i blizna glejowa oraz pourazowych stanów zapalnych i obrzęków. Ponadto po zaistnieniu regeneracji aksonów konieczna jest stymulacja ich demielinizacji, ponieważ po urazach rdzenia kręgowego obserwuje się brak neurotroficznego wpływu oligodendrocytów na uszkodzone komórki nerwowe ośrodkowego układu nerwowego. Ostatecznym efektem regeneracji musi być odtworzenie dróg nerwowych istoty białej, istotne dla przywrócenia komunikacji pomiędzy ośrodkowym i obwodowym układem nerwowym i w konsekwencji restytucji funkcji sensorycznych oraz motorycznych. Bardzo ważnym aspektem w związku z tym, jest wspomaganie ukierunkowanej regeneracji aksonów [1–3, 58, 59].

Poza wykorzystaniem możliwości leczenia farmakologicznego, transplantów nerwów obwodowych, komórek terapeutycznych, takich jak komórki macierzyste czy glejowe komórki węchowe, prowadzi się badania nad zastosowaniem implantów biomateriałowych. Poniżej przedstawione są wymagania stawiane biomateriałom i wybrane terapie eksperymentalne, wykorzystujące materiały polimerowe do wspomaganie regeneracji tkanki nerwowej i przywrócenia utraconych funkcji sensomotorycznych po urazie rdzenia kręgowego [1–3, 58, 59].

Materiały wspomagające regenerację uszkodzonego rdzenia kręgowego

W ostatnich latach rozwinęła się koncepcja zastosowania rusztowań polimerowych, w celu wspomaganie neuroregeneracji i przywrócenia funkcji neurologicznych po urazie rdzenia kręgowego [1–3, 58, 59]. Nieobecność fizycznego połączenia uniemożliwia regenerację aksonów rdzeniowych. W związku z powyższym, konieczne jest uzupełnienie ubytków rdzenia kręgowego za pomocą implantów biomateriałowych [1–3, 58, 59].

Rusztowania polimerowe mają za zadanie stworzenie sztucznej macierzy pozakomórkowej, która będzie szkieletem dla kolonizujących ją komórek i regenerujących aksonów. Zadaniem tych komórek jest umożliwienie

nie przerostu aksonów przez miejsce ubytku rdzenia, a także odtworzenie osłonek mielinowych. Równoległym celem implantu jest wspomaganie odbudowy zniszczonych naczyń krwionośnych [60–63]. Według doniesień literaturowych do konstrukcji pomostów stosowanych *in vitro* i *in vivo*, wykorzystuje się zarówno polimery biodegradowalne/bioresorbowalne i nie-degradowalne pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznego w postaci różnorodnych wszczepów [60–63]. Poszczególne materiały charakteryzują się odmiennymi właściwościami i mogą być wykorzystywane na różnych etapach neuroregeneracji rdzenia kręgowego.

W dalszym ciągu jednak istnieje konieczność opracowania nowej kompozycji materiałowej oraz skonstruowania formy implantu, odpowiedniej do uzupełnienia ubytku rdzenia kręgowego i wspomagania regeneracji tkanki nerwowej w jego obrębie. Wzrost aksonów może być wspomagany poprzez wewnętrzne właściwości wybranego polimeru, architektury implantu czy właściwości jego mikrostruktury takich jak pory, kanaliki lub włókna polimerowe, a nawet modyfikacje powierzchni dla zapewnienia lepszej integracji z przerastającą tkanką i rozwoju aksonów [60–64].

Niezależnie od źródła pochodzenia, materiał musi posiadać właściwości warunkujące jego prawidłowe działanie w organizmie żywym. Poniżej opisane zostały najważniejsze cechy jakimi powinien cechować się materiał biomedyczny.

Biokompatybilność. Dużą trudnością podczas selekcji optymalnego biomateriału jest niewiedza o jego biotolerancji w środowisku tkanek i płynów ustrojowych. Zgodność biologiczna, jest zbiorem właściwości warunkujących wykorzystanie biomateriału, jako elementu współpracującego z organizmem żywym. Biomateriały i pozostałości środków stosowanych podczas produkcji, powinny przede wszystkim charakteryzować się wysoką biotolerancją. Materiał powinien być nietoksyczny, mieć neutralny wpływ na układ immunologiczny. Biomateriał nie powinien również implikować działania hemolitycznego, ani wpływać na krzepliwość krwi [65–69].

Biozgodność z rdzeniem kręgowym jest trudniejsza do określenia w porównaniu do innych organów, gdyż wiąże się z niespecyficznym oddziaływaniem tego środowiska biologicznego na materiał. Ośrodkowy układ nerwowy uważany jest za uprzywilejowany pod względem immunologicznym m.in. z powodu występowania szczelnej bariery krew-rdzeń kręgowy. W związku z powyższym, odpowiednio określony skład i czystość chemiczna biomateriału stanowią istotny czynnik decydujący o jego biotolerancji [65–69].

Biodegradowalność/Bioresorbowalność.

Biodegradacja/Bioresorbowalność biomateriału w wyniku działania środowiska biologicznego jest istotnym czynnikiem, warunkującym użyteczność materiału do zastosowań w medycynie. Przed prognozowaniem zachowania

implantu w tkankach, kinetyka degradacji biomateriału musi być odpowiednio poznana. Typowym sygnałem do degradacji polimeru może być zmiana pH, temperatury lub składu chemicznego środowiska [65–71].

W przypadku zastosowania pod postacią implantu tempo biodegradacji materiału musi być zskorelowane z szybkością regeneracji włókien nerwowych. Materiał wykonany z polimeru biodegradowalnego powinien ulegać degradacji proporcjonalnie do wzrostu tkanki nerwowej. Rozkład materiału w wyniku specyficznej aktywności biologicznej systemu nerwowego niekoniecznie może mieć charakter stopniowy, taki jak opisany *in vitro* oraz w badaniach *in vivo* po implantacji w innych tkankach. Może się zdarzyć, że zostanie ona przyspieszona poprzez wodne środowisko płynu mózgowo-rdzeniowego lub aktywność wzrastających aksonów i odkładanie elementów macierzy zewnątrzkomórkowej wspierającej centralny układ nerwowy, a także terapeutyczne linie komórek rozmieszczonych w rusztowaniu [65–71].

Produkty biodegradacji. Należy spodziewać się odmiennych, niż w innych narządach, procesów eliminacji produktów degradacji biomateriału, ze względu na nietypowe środowisko centralnego układu nerwowego. Rdzeń kręgowy jest zanurzony w płynie mózgowo-rdzeniowym, który podlega stałej dobowej wymianie. Czterokrotna wymiana płynu rdzeniowo-mózgowego w ciągu doby może zwiększyć tempo biodegradacji. Ośrodkowy układ nerwowy jest również oddzielony od reszty organizmu przez barierę krew-mózg/rdzeń kręgowy. Wymieniona bariera fizyczna i biochemiczna zabezpiecza przed działaniem szkodliwych czynników, a także umożliwia selektywny transport substancji z krwi do płynu rdzeniowo-mózgowego. Białka, które mogłyby uszkodzić tkankę nerwową są zatrzymywane przez barierę, tym samym nie będą miały możliwości oddziaływania z implantem biomateriałowym oraz produktami jego degradacji [38–42].

Cytotoksyczność. Biomateriał i produkty jego rozkładu nie mogą być toksyczne i alergizujące względem komórek tkanki nerwowej lub ogólnoustrojowo cytotoksyczne. Ważne jest ponadto nie wywoływanie reakcji immunologicznych, które mogłyby prowadzić do rozprzestrzeniania się blizny glejowej i być destrukcyjne zarówno dla samego materiału, jak i regenerującej się tkanki nerwowej [71].

Właściwości mechaniczne. Parametry mechaniczne, m.in. wytrzymałość na rozciąganie i ściskanie, moduł elastyczności odpowiadają za zdolność utrzymania struktury i przyczyniają się do możliwości jego zastosowania klinicznego. Odpowiednio dobrany zespół własności mechanicznych materiału, zapewniający bezpieczną i niezawodną współpracę układu implant-tkanka nerwowa-płyn ustrojowy, w którym realizowany będzie biofizyczny mechanizm obciążeń stanowi fundament. Znajomość właściwości mechanicznych struktur tkankowych oraz stanu obciążeń i odkształceń

w układzie implant-tkanka nerwowa, musi opierać się na przesłankach biomechanicznych zrostu [66, 67, 72].

Rozważać należy jednocześnie biomechanikę na etapie przygotowań implantu, jak i po implantacji. Implant/materiał powinien posiadać porównywalne właściwości mechaniczne w odniesieniu do biomechaniki rdzenia kręgowego. Ze względu na znaczną wrażliwość rdzenia kręgowego na ucisk, implant powinien minimalizować napięcia na granicy implant-tkanka nerwowa rdzenia kręgowego. Ucisk może być przyczyną rozwoju reaktywnej blizny glejowej, która może paradoksalnie oddzielić implant od rdzenia kręgowego i zablokować regenerację włókien nerwowych. Biomateriał konstrukcyjny powinien być miękki, elastyczny, a zarazem wytrzymały na duże wychylenia występujące w obrębie kręgosłupa i rdzenia kręgowego podczas jego ruchów [66, 67, 72].

Geometria. Kontynuując rozważania na kanwie uwarunkowań biomechanicznych i anatomicznych, implant powinien mieć określone optymalne cechy geometryczne. Implant powinien być uniwersalny w użytkowaniu, a jednocześnie uwzględniać rozmiary i kształt pourazowego ubytku. Wymiary geometryczne powinny być tak dopasowane, by nie powodować podrażnień i ucisku tkanki nerwowej, czyli spełniać warunki tolerancji na drażnienie mechaniczne tkanki [66, 67].

Mikrostruktura. Porowatość materiału jest ważną cechą hipotetycznego implantu. Ciągła porowata struktura ściśle naśladująca wewnętrzne właściwości strukturalne i mechaniczne tkanki, może zapewnić lepsze warunki dla regeneracji. Odpowiednio dobrany rozmiar porów jest istotny dla dostępu molekularnego. Istnieje możliwość dostarczania tlenu i substancji odżywczych i jednocześnie możliwość usuwania produktów przemiany materii. Przepuszczalność rusztowania dla komórek o różnych wymiarach jest bardzo istotnym czynnikiem. Duża porowatość, a tym samym powierzchnia właściwa jest niezbędna dla zdolności przyłączania się i wspomagania migracji komórek poprzez strukturę rusztowania. Materiał porowaty pozwala także na unaczynienie regenerującej się tkanki. Przyczynia się również do stabilności połączenia tkanka-implant. Jednocześnie materiał porowaty dzięki mniejszej gęstości w porównaniu do litego materiału, czyni go bardziej lekkim i zarazem atrakcyjniejszym [66, 67, 73–74].

Nanostruktura. Zastosowanie nanostruktur pozwala na uzyskanie implantów o nowych właściwościach, nieosiągalnych dla tradycyjnych rusztowań biomateriałowych z mikrostrukturą. Zmniejszając wymiary podstawowe znanych biomateriałów, polimerów konstrukcyjnych, można otrzymać lepsze właściwości fizykochemiczne, mechaniczne, biologiczne, itp. Na przykład implanty z nanowłókień polimerowych mogą zwiększyć zdolność do adhezji komórek. Pozwalają także na stworzenie biomimetycznych matryc polimerowych, naśladujących strukturę macierzy pozakomórkowej [75–79].

Ukierunkowana regeneracja. Ukierunkowana regeneracja jest jednym z najważniejszych aspektów w regeneracji tkanki nerwowej centralnego układu nerwowego. Dotychczasowe badania wskazują, że odrost aksonów powinien być ukierunkowany. Ustalony przez implant wzrost regenerujących się aksonów rdzenia kręgowego powinien następować w sposób jednoosiowy. Włókna nerwowe regenerujące chaotycznie, nie pozwalają na przywrócenie przerwanych połączeń neuronalnych i niekorzystnie wpływają na ogólne procesy naprawcze. Struktura implantu powinna zawierać zorientowane jednokierunkowe włókna lub kapilary, w celu umożliwienia ukierunkowanego wzrostu komórek nerwowych [80, 81].

Nasiąkliwość/Pęcznienie. Zdolność do wchłaniania płynów przez dany materiał jest również istotnym czynnikiem. Elementy implantu nie powinny powodować ucisku na tkankę żywą biorcy. Stopień w jakim materiał pęcznieje w środowisku wodnym jest ważny, ze względu na możliwość ucisku na regenerujące aksony. Uwzględnić należy zmianę objętości materiału pod wpływem substancji żelującej, a także płynów fizjologicznych w przypadku materiałów żelujących *in situ* oraz gąbczastych. Z tych względów proporcje substancji wyjściowych w przypadku materiałów żelujących *in situ* muszą być odpowiednio wyliczone [82, 83].

Szybkość żelowania. Rozważając możliwość wykorzystania formy hydrożelu żelowanego *in situ* podczas zabiegu operacyjnego, należy przeanalizować także szybkość/czas żelowania materiału [83].

Właściwości powierzchni. Na powierzchni styku implant-tkanka występują wzajemne oddziaływania m. in. z komórkami, białkami oraz płynami fizjologicznymi. Procesy mają naturę molekularną i dotyczą zarówno małych jak i dużych cząsteczek. Optymalna struktura implantu powinna charakteryzować się odpowiednią powierzchnią pod względem chemicznym i topograficznym. Takie cechy jak hydrofobowość/hydrofilowość, chropowatość są znaczące dla możliwości potencjalnego kolonizowania implantu liniami komórek terapeutycznych, lub modyfikacji powierzchniowej np. białkami, dobranymi do właściwości specyficznych dla układu nerwowego [84, 85].

Sterylizacja. Implant nie tylko powinien być czysty pod względem chemicznym, ale i biologicznym. Implant powinien być jałowy, nie zawierać żadnych mikroorganizmów oraz ich form przetrwalnikowych. Z powyższych względów materiał konstrukcyjny powinien umożliwiać łatwą i skuteczną sterylizację. Metody sterylizacji nie mogą mieć zarazem wyraźnego wpływu na właściwości fizykochemiczne implantu [86].

Poręczność chirurgiczna. Łatwość użytkowania i uzupełnienia ubytków tkanki są konsekwencją takich cech jak, giętkość, elastyczność, gładkość, sprężystość, wytrzymałość na ściskanie biomateriału. Właściwości implantu muszą być dobrane również do odpowiednio opracowanej metody implantacji chirurgicznej.

Uwzględnić należy prostą procedurę implantacji. Najbardziej oczekiwana jest forma ostateczna implantu nie wymagająca obróbki mechanicznej w trakcie zabiegu. Ocenic należy przydatność do przeprowadzenia operacji z zastosowaniem technik mikrochirurgicznych [66, 67].

Określenie flagowych własności użytkowych biomateriału wyżej wypunktowanych tylko na gruncie przesłanek anatomicznych, fizjologicznych czy też biochemicznych nie jest adekwatne do rozpoznanych struktur i procesów na innych poziomach [82]. Przytoczone własności korespondują bezpośrednio z zachodzącymi w organizmie procesami m. in. metabolicznymi oraz immunologicznymi. Uogólniając specyficzne własności biomateriału konstrukcyjnego, równocześnie należy włączyć do rozważań poziom struktur submolekularnych i zjawisk bioelektrycznych zachodzących w układzie nerwowym, a także ogólnie w całym organizmie żywym [66, 67].

Polimery naturalne

Polimery naturalne stosowane w implantach do regeneracji rdzenia kręgowego to przede wszystkim włókniste białka oraz polisacharydy, które formują hydrożele. Polimery te posiadają zdolność funkcjonalnego lub strukturalnego wspierania macierzy zewnątrzkomórkowej. Hydrożele polimerowe są atrakcyjnym materiałem do zastosowań w rdzeniu kręgowym. Tworzą one usieciowane żele z nierozpuszczalnych włókien polimerowych, przez które woda może swobodnie przepływać. Mają zdolność do pęcznienia lub kurczenia się w zależności od zawartości wody. Są mikroporowate, miękkie, pozwalają łatwo adherować i migrować komórkom, a produkty przemiany materii są łatwo wymieniane. Mogą łatwo dopasowywać się do kształtu ubytku tkanek, ich elastyczność i biodegradowalność może być regulowana poprzez zmianę odpowiednich parametrów. Jako składniki macierzy pozakomórkowej ECM głównie są stosowane w rdzeniu kręgowym: kolagen i kwas hialuronowy. Stosuje się również takie polimery jak agaroz, alginiany, chitozan czy metylocelulozę [87–90].

Alginiany

Alginiany są biodegradowalnymi polisacharydami szeroko stosowanymi w medycynie, szczególnie w chirurgii rekonstrukcyjnej i plastycznej oraz w inżynierii tkankowej. Alginiany są wykorzystywane w inżynierii tkanki chrzęstnej, kostnej, mięśniowej (mięśnie gładkie), tkanki nerwowej oraz wątroby, jako trójwymiarowe substytuty do wypełnienia ubytków, nośniki leków oraz podłoża do hodowli komórek. Najczęściej są wykorzystywane do immobilizacji komórek, szczególnie gdy wymagane są łagodne warunki, ponieważ łatwo

ulegają żelowaniu pod wpływem dwuwartościowych kationów [91–97]. Alginiany są obiecującym materiałem hydrożelowym do implantacji nerwowych komórek macierzystych, ponieważ prezentują znakomitą kompatybilność z centralnym układem nerwowym w warunkach *in vivo* [98]. Jedną z wad hydrożeli alginianowych jest szybka degradacja w miejscu implantacji, czy też w warunkach *in vitro*.

W związku z powyższym często łączy się alginiany z innymi biomateriałami lub poddaje się je dodatkowemu sieciowaniu, w celu poprawienia ich stabilności w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [99]. Alginiany, mogą być z łatwością stosowane w regeneracji nerwów obwodowych, jak i tkanki nerwowej ośrodkowego układu nerwowego. Ashton i in. [100] prowadząc badania nad hydrożelami alginianowymi, zbadali wpływ właściwości mechanicznych hydrożeli na komórki macierzyste. Zachowanie nerwowych komórek macierzystych enkapsulowanych w trójwymiarowych matrycach z hydrożelu alginianowego, było badane pod kątem ich zdolności do proliferacji i różnicowania się w funkcji zmian modułu Younga. Szybkość proliferacji macierzystych komórek nerwowych maleje wraz ze wzrostem modułu elastyczności hydrożeli, a optymalna wartość modułu elastyczności może zależeć od typu komórek [100]. Matsuura i wsp. [101] w swoich badaniach nad regeneracją nerwów obwodowych, wykorzystali hydrożelowe gąbki na bazie usieciowanego alginianu.

Badania wykazały, że alginianowe żele z łatwością wypełniają ubytki oraz wspomagają regenerację nerwów. Doświadczenia nad regeneracją nerwów obwodowych z wykorzystaniem implantów alginianowych pokazują, że mogą stanowić one dobry materiał do regeneracji tkanki rdzenia kręgowego [101]. Do regeneracji uszkodzonego rdzenia kręgowego dorosłego szczura w odcinku piersiowym, zespół Suzuki [102] wykorzystał gąbki alginianowe ze ścieżkami pokrytymi peroksydazą chrzanową. Po czterech miesiącach po implantacji gąbek alginianowych na długości 3 mm, zaobserwowano wiele wstępujących i zstępujących regenerujących włókien wrastających w implant alginianowy. Zaznaczyć należy jednak, że włókien zstępujących było mniej niż wstępujących. Także te rezultaty sugerują, że alginiany mogą być obiecującym materiałem do wspomagania regeneracji aksonów w uszkodzonym rdzeniu kręgowym [102].

Prang i wsp. opracowali implant hydrożelowy na bazie alginianu sodu z jednokierunkowo zorientowanymi kanalikami (ACH). Równoległe kapilary wprowadzono w celu ukierunkowania wrastających aksonów w uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczurów. Wstępne badania *in vitro* przeprowadzone były na niezmodyfikowanym materiale, natomiast do badań *in vivo* dodatkowo wprowadzone zostały różne składniki substancji międzykomórkowej. Bazując na rezultatach *in vitro* [103] implant został przebadany na zwierzęcym modelu uszkodzonego rdzenia kręgowego. Rdzeń kręgowy szczura został przecięty w części grzbietowej, gdzie wprowadzono hydrożel-

le alginianowe. Hydrożel wykonany na bazie alginianu z anizotropowymi kapilarami na całej długości z małą porowatością stymulował regenerację aksonów. Równoległe kapilary wspomogły ukierunkowany odrost aksonów poprzez implant [103].

Zespół Pawara i Pranga kontynuując swoje badania nad implantami ACH, które wspomagały zorientowaną regenerację aksonów CNS w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* wprowadzili kanaliki o różnej średnicy. Zbadali wpływ wielkości kapilar i dodatku żelatyny na regenerację aksonów oraz komórki Schwanna. Wrastanie aksonów do hydrożelu w obecności komórek Schwanna było efektywniejsze wraz ze wzrostem średnicy kapilar. Dodatek żelatyny nie powodował znaczącego wzrostu gęstości aksonów, natomiast obserwowano wydłużenie się aksonów w kanałkach [104].

Agaroza

Większość strategii mających na celu regenerację aksonów uszkodzonego rdzenia kręgowego opiera się na strukturach, powodujących ogólnie niezorganizowany, wielokierunkowy wzrost aksonów. Biokompatybilne matryce, które wspomagają ukierunkowaną regenerację aksonów poprzez uszkodzone miejsce rdzenia, są kluczowe do jego prawidłowej regeneracji. Stokolos i in. [105, 106] opracowali nowe implanty agarozowe z równoległymi kanałami o sprecyzowanej średnicy i grubości ścian na całej długości konstrukcji. Implanty przetestowano w warunkach *in vivo* na modelu zwierzęcym. Rezultaty wykazały bardzo dobrą integrację z tkanką gospodarza i wsparcie dla liniowego wzrostu aksonów wzdłuż kanałów. Implanty wzbogacone w komórki szpiku kostnego zmodyfikowane genetycznie tak, by wytwarzały neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego, wykazywały jeszcze lepsze właściwości neurodegeneracyjne, w porównaniu do niezmodyfikowanego wszczepu. Obserwowano zwiększenie się liczby liniowo penetrujących implant agarozowy aksonów [105–106].

Badania na modelu zwierzęcym z użyciem implantów agarozowych z równoległymi kanałkami były kontynuowane tak, by uzyskać wzrost aksonów w i poza miejscem uszkodzenia. Przecięte zostały wstępujące aksony czuciowe od strony grzbietowej rdzenia kręgowego w odcinku szyjnym. Zastosowano kombinowaną terapię m. in. z autologicznymi komórkami szpiku kostnego, wytwarzającymi czynnik wzrostu – neurotrofinę -3 (NT-3). Matryce agarozowe zawierające zorientowane kanaliki, zwiększały o prawie 85% ukierunkowany przerost aksonów na całej długości implantu umiejscowionego w ubytku tkanki nerwowej rdzenia, w porównaniu do matryc z nieuporządkowaną strukturą. Jakkolwiek czynne komórki, które formowały się na granicy powierzchni implantu z tkanką rdzenia kręgowego ograniczały regenerację, co pozostaje w związku z obserwacją

mi roli blizny glejowej w miejscu uszkodzenia rdzenia kręgowego [107]. Zespół Zuidema przeanalizował dekstran i chitozan wprowadzony do hydrożelu z blendy metylocelulozy i agarozy. Hodowle neuronów pochodzących z kory mózgu na hydrożelach wykazały bardzo dobrą kompatybilność z komórkami nerwowymi. Rezultaty pokazały również, że miękkie hydrożele polisacharydowe pozwalają na lepszą przyczepność komórek i rozprzestrzenianie się wrastających aksonów [108].

Chitozan

W pracy Cromptona [109] opisano zachowanie się mysich komórek nerwowych pochodzących z kory mózgu. Hodowane były na dwu- i trójwymiarowych podłożach z hydrożeli wykonanych na bazie chitozanu z glicerofosforanem. Biokompatybilność dwuwymiarowych hydrożeli określono na podstawie liczebności komórek oraz liczby neurytów na komórkę. Osmolarność hydrożelu miała znaczący wpływ na żywotność komórek nerwowych. Izotoniczne stężenie glicerofosforanu było najbardziej optymalne dla komórek. Aby poprawić adhezję komórek oraz zdolności aksonów do wzrostu dodano poli-D-lizyny (PDL). Dodatek PDL poprawiał żywotność komórek. Otrzymane rezultaty wskazują na możliwość zastosowania chitozanu z glicerofosforanem, jako materiału do konstrukcji implantu wspomagającego regenerację tkanki nerwowej [109]. Nerwowe komórki macierzyste (NSC) są obecnie badane jako kandydat komórkowy do regeneracji zarówno rdzenia kręgowego, jak i nerwów obwodowych [110]. Kultury płodowych szczurzych nerwowych komórek macierzystych z wykorzystaniem chitozanu posłużyły do oceny powinowactwa materiału z komórkami. Materiały wykonano metodami odlewania i liofilizacji oraz wyplatania.

Rezultaty pokazały, że nerwowe komórki macierzyste dobrze rosną i proliferują na foliach chitozanowych. Większość z nich różnicowała się do komórek nerwowo-podobnych po czterech dniach hodowli. Implanty chitozanowe nie wykazywały działania toksycznego na komórki. Przewody z liofilizowanego chitozanu były bardziej miękkie i elastyczne w porównaniu do plecionych, te drugie posiadały jednak lepsze właściwości mechaniczne. Te właściwości wskazują na możliwość zastosowania tego typu materiałów do regeneracji tkanki nerwowej, w zakresie nerwów obwodowych jak i rdzenia kręgowego [110].

Do badań *in vivo* z użyciem chitozanu, zespół Mo wykorzystał model zwierzęcy z mechanicznym uszkodzeniem tkanki nerwowej w obrębie hipokampa u dorosłego szczura. W miejsce ubytku wszczepiono konstrukcję chitozanową wypełnioną neurotrofiną NT-3 oraz dla porównania czysty materiał. Rezultaty pokazały, że chitozanowa matryca wypełniona NT-3 stymuluje regenerację na stosunkowo dużym obszarze tkan-

ki nerwowej mózgu, w którym zaobserwowano nowe włókna nerwowe oraz komórki neuropodobne, efektem czego była poprawa funkcji poznawczych. Badania te wykazały, iż matryca chitozan/NT-3 jest materiałem o dużej biogodności [111]. Dalsze badania zespołu Mo i Yanga [112], były skupione na określeniu optymalnego stężenia NT-3 w formie rozpuszczalnej lub immobilizowanej w matrycy chitozanowej, która wspierałaby żywotność, proliferację nerwowych komórek macierzystych i indukowała ich różnicowanie do określonych typów komórek. NSC były hodowane w matrycach chitozanowych z różną ilością neurotrofyny-3.

Przeprowadzone analizy wykazały, że znacząca redukcja dodatku NT-3 jest wymagana do wspomagania przeżywalności, proliferacji oraz różnicowania się NSCs w warunkach *in vitro*. Materiał chitozanowy sam w sobie dowodzi wewnętrznych idealnych właściwości do budowy trójwymiarowych konstrukcji. Wyniki tych doświadczeń stwarzają nowe możliwości wzmocnienia działania komórek macierzystych *in vitro* i zastąpienia utraconej tkanki nerwowej jej komórkami. Jednocześnie istnieje możliwość minimalizacji ilości wykorzystywanych czynników neurotroficznych, potrzebnych do terapii transplantacyjnych w obrębie tkanki nerwowej mózgu i rdzenia kręgowego [112].

Fibronektyna oraz Fibryna-Fibrynogen

Polimery pochodzące z krwi, stanowią potencjalny materiał do konstrukcji struktur dwu- i trójwymiarowych do regeneracji rdzenia kręgowego. Fibrynogen jest rozpuszczalną glikoproteiną pochodzącą z osocza, syntetyzowaną przez wątrobę i jest przetwarzany w wyniku działania trombiny w fibrynę. Fibryna jest włóknistą, nieglobularną proteiną wchodzącą w skład tworzących się skrzepów krwi [113–116]. Fibronektyna jest glikoproteiną adhezyjną powszechnie obecną m.in. na powierzchni komórek. Materiały z fibronektyny są wykorzystywane w różnych formach jako substraty do inżynierii tkankowej. Agregaty rozpuszczalnych protein zawartych w nierozpuszczalnej włóknistej strukturze wspomagają adhezję i migrację komórek [113–116]. Przydatność materiału fibrynowego do regeneracji centralnego układu nerwowego sprawdził Philipps [117] w badaniach *in vitro* przy użyciu fibroblastów, komórek Schwanna oraz immunoreaktywnych astrocytów. Rezultaty badań *in vitro* wykazały, że materiał pomagający stwarza sprzyjające warunki do ukierunkowanego wzrostu aksonów w uszkodzonej tkance nerwowej w centralnym układzie nerwowym [117].

Maty na bazie fibronektyny zawierające liniowo zorientowane włókna, zostały przebadane przez Kinga [118] pod kątem ich zdolności do wspomagania ukierunkowanego wzrostu aksonów. Z badań wynika, że materiał może prowadzić do regeneracji uszkodzo-

nego rdzenia kręgowego lub służyć jako pomost wypełniający miejsce ubytku [118]. King i in. w dalszych badaniach wykorzystali cztery biomateriały w formie do iniekcji, w celu wspomżenia regeneracji uszkodzeń rdzenia kręgowego: kolagen, lepką fibronektynę, fibrynę oraz kompozycję fibryna/fibronektyna. Biomateriały zostały przetestowane w warunkach *in vivo* na modelu szczurzego przecięcia rdzenia kręgowego. Zarówno żel z lepkiej fibryny jak i kolagenu wspomagał dobry wzrost aksonów, ale zawierał zagęszczenia w objętości oraz ubytki na granicy z rdzeniem kręgowym. Stanowiło to przeszkodę w skutecznym połączeniu żelu z tkanką rdzenia. Dla porównania żel fibrynowy oraz fibrynowo/fibronektynowy prezentują dobrą integrację z rdzeniem kręgowym oraz wzrastającymi aksonami. Z tych dwóch materiałów hydrożelowych, lepszy wzrost aksonów obserwuje się dla kompozycji fibryna/fibronektyna [119]. Fibronektyna może być również modyfikowana jonami, takimi jak jony miedzi czy cynku, w celu poprawienia jej stabilności i szybkości resorpcji.

Przewód w postaci rurki na bazie fibronektyny, zawierający stabilizujące jony Cu i Zn ze spiralnie zorientowanymi i minimalnie porowatymi filamentami oraz wewnętrznym rdzeniem z wielu cienkich równoległych włókien, przebadał Ahmed z zespołem [120]. Rezultaty badań *in vivo* przeprowadzonych na szczurach pokazują, że implantacja wszczepów z fibronektyny jest obiecująca dla regeneracji rdzenia kręgowego [120–123]. System zawierający trzy komponenty; immobilizowane peptydy wiążące heparynę oraz neurotrofinę-3 (HBDS) (heparin-based delivery system), były badane również pod kątem ich zastosowania jako systemu do spowolnionego dostarczania czynników wzrostu takich jak neurotrofyny-3 [124]. Miejsce uszkodzenia tkanki nerwowej rdzenia szczura zostało uzupełnione żelem fibrynowym powstałym w wyniku sieciowania kowalencyjnego peptydów, zawierających czynnik krzepnięcia XII podczas polimeryzacji. W czasie degradacji materiału zaobserwowano jego stymulujący wpływ na infiltrację komórek, oraz blokowanie formowania się blizny glowej. Żele fibrynowe uwalniające neurotrofine-3 stymulowały odrost aksonów. Zwiększała się gęstość włókien nerwowych w miejscu ubytku rdzenia kręgowego w porównaniu do niezmodyfikowanej fibryny [124].

Kwas hialuronowy i jego sole

Biomateriały pochodzące z substancji międzykomórkowej (ECM) są często wykorzystywane w konstrukcji matryc w inżynierii tkankowej. Kwas hialuronowy jest polimerem pochodzenia naturalnego, występującym w substancji międzykomórkowej, gdzie tworzy mniejsze struktury ECM. Hialuronian jako sól kwasu hialuronowego wydaje się więc właściwym materiałem do wytwarzania hydrożeli, ze względu na jego biokompatybilność oraz wyjątkowe powinowactwo do wody (w tkankach

pełni rolę regulatora ilości wody). Materiał złożony z hialuronianu tworzy warunki sprzyjające regeneracji tkanki. Jest szeroko stosowany w medycynie; opatrunki skóry i uzupełnienia defektów tkanki chrzęstnej.

Kwas hialuronowy stosowany jest także do hodowli komórek glejowych [125]. Eng i in. [126] zbadali wpływ usieciowanego hydrożelu z soli kwasu hialuronowego na komórki pochodzące z kory mózgu. Przeanalizowali zależność wzrostu neuronów w funkcji właściwości mechanicznych. Rezultaty pokazują, że bioaktywność matryc hialuronianowych określona przez stopień modyfikacji tiolami, miała większy wpływ na wzrost aksonów niż ich sztywność. Odrost aksonów uzależniony był również od sztywności hydrożeli związanej ze stężeniem samego kwasu hialuronowego w żelu. Żele o mniejszej sztywności miały lepszy wpływ na odrost aksonów, w porównaniu do substytutów o większej [126]. Miejscowe dostarczanie leków do uszkodzonego rdzenia kręgowego może być w przyszłości wspomagane poprzez użycie mało inwazyjnych matryc z biopolimerów takich jak metyloceluloza czy też hialuronian, wypełniających miejsce ubytku tkanki rdzenia [127].

Baumann i in. opracowali kompozyt hydrożelowy, składający się z wyżej wymienionych polisacharydów z dyspergowanymi nanocząstkami z poli(laktydu-ko-glikolidu). Inkluzja nanocząstek poli(laktydu-ko-glikolidu) w hydrożelach z metylocelulozą i hialuronianem, znacząco poprawia właściwości reologiczne kompozytu hydrożelowego. Hydrożele oraz nanocząstki były dobrze tolerowane w warunkach *in vivo* w modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego szczura. Rezultaty wskazują na pozytywny wpływ materiału kompozytowego z hialuronianem lub metylocelulozą w połączeniu z poli(laktydem-ko-glikolidem) na regenerację. Nie obserwowano znaczącego wpływu materiału na wzrost aktywności mikrogleju, odpowiedzi astrocytów oraz zwiększania się objętości ubytku. Nowa kompozycja może wspomóc regenerację uszkodzonego rdzenia kręgowego w połączeniu z innymi terapiami [127].

Strategie terapeutyczne mające na celu naprawę rdzenia kręgowego, są ograniczone między innymi przez ograniczone techniki dostarczania leków. Nowy system dostarczający leki został opracowany przez grupę Gupty. Stworzyli oni żel do iniekcji przeznaczony do miejscowego uwalniania leków. Szybko żelujący materiał z kompozycji hialuronian/metyloceluloza, degradowalny i biokompatybilny, przetestowany został w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Badania *in vivo* na grupie szczurów po miesiącu po implantacji pokazały pozytywny wpływ na neuroregenerację. Ocena zachowania zwierząt przeprowadzono z wykorzystaniem skali Basso-Beattie-Brensnaham. Rezultaty wskazują, że kompozycja hialuronian/metyloceluloza jest obiecującym materiałem żelowym do miejscowego uwalniania komórek terapeutycznych, czynników neurotroficznych i środków farmakologicznych do uszkodzonego rdzenia kręgowego [128].

Kolagen

Kolagen jako główny składnik substancji międzykomórkowej jest często wykorzystywany jako komponent implantów, by wzmocnić biologiczne interakcję pomiędzy biomateriałem a tkanką. Kolagen może wspomagać adhezję komórek, proliferację oraz różnicowanie. Jest nieimmunogeniczny, a produkty jego biodegradacji nie są toksyczne dla organizmu. Stosowany w regeneracji nerwów obwodowych i ośrodkowego układu nerwowego wspomagał procesy naprawcze. Dodatek do implantu biomateriałowego czynników neurotroficznych oraz linii komórek terapeutycznych, może wspierać regenerację nerwów [129, 130]. Wang i wsp. [131] przetestowali dwuwymiarowe i trójwymiarowe porowate konstrukcje kolagenowe pod względem ich możliwości neuroregeneracyjnych w warunkach *in vitro*. Hodowle komórkowe przeprowadzono z wykorzystaniem glejowych komórek węchowych (GKW), których transplantacja jest obiecującą strategią terapeutyczną dla regeneracji rdzenia kręgowego [132]. Wyniki pokazały, że kolagenowe matryce wspomagały adhezję, proliferację oraz redukowały apoptozę glejowych komórek węchowych [133]. Na matrycach trójwymiarowych zaobserwowano większą proliferację komórek w porównaniu do matryc dwuwymiarowych. Na kolagenowych rusztowaniach trójwymiarowych, komórki przybierały specyficzny dla nich wrzecionowaty kształt. Ponadto trójwymiarowe matryce redukowały w większym stopniu apoptozę komórek, podczas długoterminowej hodowli (30 dni) w odniesieniu do dwuwymiarowych. Ponadto kolagenowe matryce znacząco zwiększały ekspresję genu czynnika wzrostu nerwów (NGF), czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) oraz mielinowych białek proteolipidowych (PLP), podczas hodowli glejowych komórek węchowych [133].

Transplantacja komórek glejowych jest utrudniona ze względu na ich ograniczoną dostępność. Tłuszczowe komórki macierzyste (ADSC) zostały wytypowane jako alternatywne źródło pozyskiwania dojrzałych komórek nerwowych do zastosowań w regeneracji tkanki nerwowej z wykorzystaniem matryc kolagenowych [134]. Han i in. przeanalizowali możliwość zastosowania porowatych trójwymiarowych rusztowań kolagenowych, jako podłoża do hodowli tłuszczowych komórek macierzystych w ko-kulturach z glejowymi komórkami węchowymi [134]. W rezultacie tych badań na matrycy kolagenowej uzyskano komórki z morfologią i antygenowym fenotypem, charakterystycznym dla glejowych komórek węchowych [134].

Zespół Lianga [135] przetestował w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* trójfunkcjonalny biomateriał na bazie liniowo uporządkowanego kolagenu (LOCS) wraz z czynnikiem neurotroficznym pochodzenia mózgowego połączonego z domenami wiążącymi kolagen, by uzyskać wyraźny efekt neuroprotektoryjny (CBD). Hodowle komórkowe *in vitro* przeprowadzono z wykorzystaniem

szczurzych zwojów korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych (DRG). Badania *in vivo* zostały wykonane na połowicznym modelu urazowego uszkodzenia rdzenia kręgowego szczura na odcinku o długości 6 mm. Czynniki wzrostu pochodzenia mózgowego wraz z domenami wiążącymi kolagen w połączeniu z kolagenem podtrzymywał i promował wzrost włókien nerwowych, oraz neutralizował czynniki inhibujące regenerację. Zaobserwowano również przywrócenie przekazywania elektrycznego w synapsach i zapobieganie formowaniu się blizny gлевой [135]. Liang i in. w swoich poprzednich badaniach wykazali, że czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego w połączeniu z domeną wiążącą kolagen (CBD), może łączyć się z kolagenem i wzmacniać efekt neuroprotekcji i neuroregeneracji. Obszerny ubytek tkanki nerwowej po urazie rdzenia kręgowego wypełniony matrycą zawierającą kolagen, może stanowić rusztowanie dla regeneracji nerwów. Jednocześnie czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego wraz z domenami wiążącymi kolagen w miejscu ubytku dodany do matrycy kolagenowej, wspierałby regenerację i przywrócenie funkcji lokomocyjnych [135].

Grupa Petter-Puchnera porównała matryce kolagenowe z fibrynowymi w procesie regeneracji odcinka piersiowego rdzenia kręgowego szczurów [136]. Odrost aksonów został zaobserwowany w obu materiałach, przy czym odrostowi aksonów w obecności kolagenu towarzyszył proces mielinizacji oraz angiogenezy. Zarówno fibryna jak i kolagen poprawiły możliwości regeneracyjne w porównaniu do grupy kontrolnej i mogą stanowić dobry materiał do wypełniania ubytków rdzenia kręgowego [136]. Badania Fuhrmanna i zespołu wykazały lepsze możliwości wzrostu aksonów przez dwu- i trójwymiarowe matryce kolagenowe. Przeprowadzone zostały hodowle komórkowe z wykorzystaniem astrocytów pochodzenia ludzkiego. Ponadto interakcje z różnego rodzaju komórkami na matrycach kolagenowych pokazały, że konstrukcje o zorientowanej mikroarchitekturze, na przykład liniowo zorientowanym kolagenie, mają fundamentalny wpływ na możliwości regeneracyjne [137].

Polimery biomedyczne syntetyczne

Zastosowanie polimerów syntetycznych zwiększa możliwości dopasowania właściwości materiału do potrzeb. Polimery syntetyczne mogą być otrzymywane i przetwarzane w warunkach kontrolowanych. Przede wszystkim ważna jest możliwość odtwarzalności właściwości mechanicznych, fizycznych i chemicznych takich jak: wytrzymałość na naprężenia, moduł elastyczności oraz szybkość degradacji. Ostatnia wymieniona cecha jest bardzo ważna z punktu widzenia inżynierii tkankowej. Istnieje możliwość kontrolowania zanieczyszczeń, w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia infekcji,

czy też innych niepożądanych odpowiedzi immunologicznych [138–150]. Do najważniejszych polimerów syntetycznych stosowanych w regeneracji rdzenia kręgowego są zaliczane m.in. poliestry, polihydroksyalkanolany i poliakrylany.

Poli (ε-kaprolakton)

Produkcja blend polimerowych jest jednym z bardziej efektywnych działań w celu modyfikacji właściwości znanych biomateriałów polimerowych. Ghasemi-Mobarakeh i in. wykonali nanowłókniste rusztowania w oparciu o blendy poli(ε-kaprolakton)(PCL)/żelatyna, różniące się udziałami procentowymi poszczególnych składników. Nanowłókna w kompozycji zorientowane były jednokierunkowo i wielokierunkowo. Najlepsze wyniki w badaniach *in vitro* z udziałem nerwowych komórek macierzystych C17.2 otrzymano dla blendy PCL/żelatyna 70/30 (% wag). Analiza aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTS) oraz skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) pokazały, że badane rusztowania znacznie bardziej wspomagają różnicowanie i proliferację komórek nerwowych w porównaniu do włóknistej matrycy wykonanej z czystego polikaprolaktonu. Stwierdzono także, że dla jednokierunkowo zorientowanych włókien wzrost aksonów jest równoległy do nich. Komórki także zajmowały miejsca wzdłuż anizotropowej struktury włóknistej [151].

Bechara i wsp. otrzymali materiał, którego powierzchnię stanowiły nanostruktury z poli(ε-kaprolaktonu). Materiał przebadano z wykorzystaniem komórek PC12, oceniono żywotność oraz zdolność PC12 do adhezji i proliferacji w okresie 4 dni. Badania *in vitro* pokazały zwiększoną adhezję komórek, a także znaczną żywotność i proliferację komórek PC12 w porównaniu do powierzchni bez nanoarchitektury. Po 7 dniach hodowli zaobserwowano formowanie się sieci neuronalnej oraz ekspresję markerów neuronalnych [152]. Runge i inni opisali syntezę i scharakteryzowali kompozycje z polikaprolaktonu i polipirołu. Badania *in vitro* pokazały, że materiał ten wspomaga rozrost komórek PC12 oraz aksonów zwoi korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych. Materiał kompozytowy sprzyja adhezji komórek, proliferacji i rozprzestrzenianiu się neurytów. Wyniki tych badań pokazały, że materiał może być również wykorzystany przy elektrostymulacji [153].

Poli(laktyd-ko-glikolid)

Moore i in. [154] opracowali wielokanałowy, biodegradowalny implant, który ma za zadanie stymulować odrost aksonów poprzez jego strukturę, a jednocześnie umożliwić transplantację komórek i dostarczanie substancji neuroprotektoryjnych. Implant z kopolimeru laktydu z glikolidem (PLG) w stosunku 85/15 posiadający

równoległe kanaliki, został przebadany w warunkach *in vitro*, a następnie uzupełniony implant (o komórki Schwanna ulokowane w kanałkach) został zaimplantowany w przeciętym szczurzym rdzeniu kręgowym. Miesiąc po implantacji na podstawie rekonstrukcji histologicznej stwierdzono obecność regenerujących się aksonów, wzrastających wzdłuż kanałków [154]. Tuinstra i wsp. opracowali wielokanałowy implant z kopolimeru laktydu z glikolidem dostarczający lentiwirusy [155]. Przeprowadzono badania *in vivo* na połowicznym przecięciu rdzenia kręgowego szczura. Pomost z poli(laktydu-ko-glikolidu) indukował wzrost aksonów poprzez kanaliki w kierunku dystalnym. Dostarczanie wraz z pomostem wektorów lentiwirusa z zakodowanym czynnikiem neurotroficznym – neurotrofina-3 (NT-3) i czynnikiem neurotroficznym pochodzenia mózgowego (BDNF), wspomagało regenerację aksonów i rozprzestrzenianie się aksonów zmielinizowanych. Imobilizacja lentiwirusów w wielokanałowym implancie wspomagała utrzymującą się przez 4 tygodnie ekspresję transgeniczną, zarówno w części przedniej jak i tylnej pomostu biomateriałowego. Barwienia immunohistochemiczne wskazały możliwość transdukcji makrofagów, komórek Schwanna, fibroblastów oraz astrocytów wokół pomostu oraz przylegającej do niego tkanki. Jest to nowa strategia, która w przyszłości może mieć znaczenie przełomowe [155].

W pracy Shina i in. opisany został system dostarczający miejscowo lentiwirusy do zastosowań biomedycznych, bazujących na matrycy z PLG uzupełnionej o fosfatydyloserynę (PS) wytwarzającą specyficzne wiązania. Mikrosfery PLG-PS wraz lentiwirusami zostały przetestowane jako pomost zwiększający ekspresję genów w implancie dordzeniowym. Imobilizowane lentiwirusy w mikrosferach zwiększyły transdukcję komórek oraz transgeniczną ekspresję genów w porównaniu do samego wirusa [156]. De Laporte i in. w swoich badaniach nad regeneracją rdzenia kręgowego, wykorzystali skomplikowaną wielokanałową konstrukcję z kopolimeru laktydu z glikolidem (PLG) z warstwami białkowymi (fibronektyna, kolagen, laminina) do dostarczania lipopleksów. Imobilizacja lipopleksów w PLG prowadzi do wysokiego poziomu ekspresji w warunkach *in vitro*. Implant tego typu został również przebadany w warunkach *in vivo*. Wszczepy na bazie PLG z lipopleksami wzmacniają efekt ekspresji transgenicznej w połowicznie przeciętym rdzeniu kręgowym szczura [157].

Nojehdehian i in. w swoich badaniach użyli mikrosfery z poli(laktydu-ko-glikolidu) (PLG) pokryte warstwą poli-L-lizyny (PLL) zawierające kwas retinowy (RA), na których przeprowadzono hodowle komórkowe z wykorzystaniem pluripotentnych komórek nowotworowych P19, przypominających komórki macierzyste pod względem ich możliwości nieustannego proliferowania. Badania *in vitro* obejmujące pomiar zahamowania wzrostu liczby komórek z wykorzysta-

niem aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów – metoda MTT (formazan błękitu triazolowego), badania mikroskopowe, barwienia immonofluorescencyjne, histologiczne oraz reakcję łańcuchowej polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR), potwierdziły przydatność mikrosfer w inżynierii tkanki nerwowej. Rezultaty pokazały, iż materiał ten może stanowić zarówno system dostarczający czynniki bioaktywne, jak i wspomagać różnicowanie się komórek nowotworowych do komórek nerwowych [158]. Zorientowane przypadkowo i jednokierunkowo włókna otrzymane metodą elektroprzędzenia z kopolimeru kwasu mlekowego z glikolowym (PLG) z polimerową warstwą przewodzącą wykonaną z polipirolu (PPy), zostały przebadane *in vitro*. Wspomagały wzrost i różnicowanie się szczurzych komórek chromochłonnych PC12 oraz neuronów hipokampa, w porównaniu do włókien kontrolnych z PLG nie pokrytych polimerem przewodzącym i pozwalają na zastosowanie elektrostymulacji [159].

Polilaktyd

Wpływ piankowego implantu z poli(D,L-laktydu) na żywotność neuronów i regenerację aksonów z dodatkiem lub bez czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego, został przebadany przez Patista i jego współpracowników [160]. Badania *in vivo* przeprowadzono na całkowicie uszkodzonym rdzeniu kręgowym szczura na odcinku piersiowym. Pianka została wypełniona klejem fibrynowym zawierającym kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów. Pianka polilaktydowa była dobrze tolerowana w środowisku rdzenia kręgowego. Dodatkowe uzupełnienie implantu o czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF) zwiększyło żywotność komórek oraz proces angiogenezy. Implantacja pianek polilaktydowych z BDNF stanowiła ochronę dla neuronów. Proces tworzenia się blizny glejowej i stany zapalne nie zostały odnotowane. Wprowadzenie do implantu komórek Schwanna dodatkowo zwiększyło proces mielinizacji [160].

Makroporowate polilaktydowe rusztowania uzupełnione fibryną i komórkami Schwanna zostały przebadane w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* przez zespół Hurtado [161]. Ubytek całkowicie przeciętego piersiowego odcinka rdzenia kręgowego szczura wypełniono implantem polilaktydowym. Rezultaty pokazały, że generujące aksony nie przedostawały się do części tylnej uszkodzonego rdzenia, a znaczna liczba komórek ulegała apoptozie. Badania porowatych implantów uzupełnionych o komórki Schwanna i fibrynę są jednak dopiero w fazie początkowej [161]. Opracowane zostały także biodegradowalne, porowate, nanowłókniste polimerowe matryce z poli(L-laktydu). Materiał ten został przeanalizowany w warunkach *in vitro* podczas hodowli nerwowych komórek macierzystych (NSC). Konstrukcja z poli-L-laktydu naśladowała architekturę substancji

międzykomórkowej. Badania *in vitro* z NSC pokazały, że komórki różnicują się na porowatej nanostrukturze z poli-L-laktydu. Stwierdzono, że materiał pozytywnie wpływa na odrastające aksony.

Rezultaty badań Yanga i in. wskazują na możliwość zastosowania nanostruktury jako nośnika do uwalniania komórek terapeutycznych [162]. Zorientowane włókna otrzymane metodą elektroprzędzenia, stanowią interesujące rozwiązanie jako rusztowania dla ukierunkowanego wzrostu aksonów w otoczeniu komórek oraz w modelach zwierzęcych. Jak wiadomo średnica włókien ma wpływ na zachowanie komórek, ale nie wiadomo jak zorientowane włókna w matrycy o określonych średnicach, wpływają na wzrost aksonów oraz migrację komórek Schwanna.

Wang i in. w celu określenia zależności pomiędzy wielkością/orientacją włókien a zdolnościami neurodegeneracyjnymi, wyprodukowali włókna z poli-L-laktydu o różnej grubości. Na włóknistych materiałach przeprowadzono badania *in vitro* z użyciem neuronów zwojów korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych. Określono długość aksonów oraz dystans migracji komórek Schwanna. Na włóknach o małej średnicy, obserwowano długość neurytów o ok. 40 % krótszą niż dla włókien o większych rozmiarach. Migracja komórek Schwanna nie była skorelowana w żadnym przypadku z rozprzestrzenianiem się aksonów. Wyniki obserwacji wskazują, iż średnica włókien jest ważnym parametrem dla konstrukcji zorientowanych włókien do regeneracji nerwów [163]. Wang i wsp. w swoich badaniach wykorzystali wszczepy bazujące na jednokierunkowych mikrowłóknach z polilaktydu. Folie oraz wszczepy z wielokierunkowo i jednokierunkowo zorientowanymi włóknami zaimplantowano do rdzenia kręgowego. W odcinku piersiowym rdzenia kręgowego szczura przecięto kompletnie rdzeń z wytworzeniem ubytku o długości 3 mm. Po czterech tygodniach obserwacji można było zobaczyć tkankę infiltrującą włókniste implanty, a miejsce ubytku zostało zamknięte poprzez populację endogennych komórek. Reakcja tkanki współgrała z regenerującymi aksonami i astrocytami. Jednokierunkowo ułożone włókna wspomagały tylnopřednią regenerację aksonów na dłuższym odcinku, w porównaniu do matryc z wielokierunkowymi włóknami i kontrolnymi foliami polilaktydowymi [164].

Polihidroksyalkanolany

Polihidroksyalkanolany (PHA) są badane jako materiał do zastosowań biomedycznych dzięki odpowiednim właściwościom mechanicznym, jak również są tolerowane dobrze przez tkanki oraz ulegają biodegradacji w warunkach *in vivo* [165–168]. Novikov i in. [165] zastosowali w swoich badaniach biodegradowalne implanty z polihidroksymaślanu (PHB) w postaci włókien. Implanty te miały stanowić nośnik dla

komponentów wspierających przeżywalność linii komórek nerwowych i regenerację uszkodzonego rdzenia kręgowego. Modelem badawczym było uszkodzenie rdzenia kręgowego dorosłych szczurów w odcinku szyjnym. Wszczep z włókien PHB pokryty warstwą hydrożelu alginianowego zawierającego fibronektynę wprowadzono w miejsce ubytku rdzenia kręgowego. Dodatkowo, w celach porównawczych leczono także zwierzęta za pomocą czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego i neurotrofyny-3. Jako model eksperymentalny posłużyły neurony drogi czerwienno-rdzeniowej. U nieleczonych zwierząt prawie połowa uszkodzonych neuronów drogą czerwienno-rdzeniowej obumarła lub była nieaktywna po ośmiu tygodniach od operacji. Implantacja włókien PHB zredukowała umieralność neuronów drogi czerwienno-rdzeniowej o 50%, podobnie jak w przypadku leczenia z użyciem czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego oraz neurotrofyny-3.

W grupie zwierząt z wszczepionym dla porównania hydrożelem z mieszaniny kwasu hialuronowego i fibryny bez PHB, nie wykazano żywotności neuronów drogi czerwienno-rdzeniowej. Zmodyfikowany implant PHB o komórki Schwanna wspomagał regenerację aksonów. Zauważono również, że aksony przedostają się na drugą stronę od kikuta dalszego wzdłuż implantu. Novikov i in. wykazali, że użycie implantu z włókien uzupełnionych o kwas hialuronowy/fibrynę oraz komórki Schwanna, mogą wspierać przeżywalność komórek nerwowych oraz regenerację rdzenia kręgowego [165].

Macierzyste komórki nerwowe (NSC) porastające w matrycy z PHA mogą być użyteczne w naprawie uszkodzeń centralnego układu nerwowego. Na różnych włóknistych materiałach przeprowadzono hodowle szczurzych NSC i scharakteryzowano ich zdolność do różnicowania się. Wszystkie materiały PHA, wliczając polihidroksymaślan (PHB), kopolimer 3-hidroksymaślanu z 4-hidroksymaślanem (P3HB4HB) oraz kopolimer 3-hidroksymaślanu z 3-hidroksyheksanianem (PHBHHx) wspomagały wzrost i różnicowanie się NSC zarówno na cienkich foliach 2D oraz strukturach 3D. PHBHHx wykazał najlepszy potencjał do różnicowania się NSC do neuronów, które mają istotne znaczenie w naprawie CNS. Porównano konstrukcje nanowłókniste 2D z 3D jako materiały umożliwiające adhezję komórek wraz z jednoczesnym wzrostem synaps. Konstrukcje 3D wykazywały lepsze właściwości dla adhezji i przeżywalności komórek. Matryca wykonana z PHBHHx była lepsza, niż PHB i P3HB4HB w wspomaganiu różnicowania się NSC do komórek neuropodobnych. Kombinacja biodegradowalności z dużą wytrzymałością oraz wysoką biogodnością w obrębie tkanki nerwowej, daje PHA duże szanse zastosowania w leczeniu uszkodzeń rdzenia kręgowego [166].

Porównanie terpoliesteru polihidroksymaślanu-ko-walerrianianu-ko-kapropnianu (PHBVHHx) z polilaktydem (PLA) i kopoliestrem 3-hidroksymaślanu

z 3-hydroheksanianu (PHBHHx) w odniesieniu do zdolności wspomagania różnicowania komórek mezenchymalnych szpiku kostnego (hBMSC) pochodzenia ludzkiego do komórek nerwowych pokazało, że w obu przypadkach trójwymiarowe matryce wspomagają różnicowanie się hBMSC do komórek nerwowych w większym stopniu niż filmy z tych samych polimerów, przy czym mniejsze rozmiary porów w strukturze zwiększają różnicowanie się komórek, podczas gdy zmniejsza się ich zdolność do proliferacji. Folie z PHBVHHx wspomagają adhezję komórek hBMSC, proliferację i różnicowanie się w porównaniu do przebadanego PLA i PHBHHx. Matryce PHBVHHx z odpowiednimi mikroporami mogłyby być wykorzystane w inżynierii tkanki nerwowej w leczeniu uszkodzeń nerwów [167]. Implant nerwowy zawierający wysoce zorientowaną strukturę, która naśladuje naturalną tkankę, jest niezbędny do skutecznej regeneracji uszkodzonych nerwów. Yucel i in. w swoich badaniach wykorzystali biodegradowalne implanty wykonane poprzez zwinięcie porowatych mikrostrukturalnych folii z poli(3-hydroksymaślanu-ko-3-hydroksywalerianu – poli (L-D, L) laktydu – kopolimeru kwasu mlekowego z kwasem glikolowym (PHBV-P(L-D,L)LA-PLG) wokół liniowo zorientowanych włókien z poli(3-hydroksymaślanu-ko-3-hydroksywalerianu i kopolimeru kwasu mlekowego z kwasem glikolowym (PHBV-PLG) otrzymanych metodą elektroprzędzenia. Mechaniczne właściwości materiału/wszczepu były odpowiednie by wspierać regenerujące nerwy. Rezultaty badań pokazały, że folie wspomagają migrację oraz przeżywalność komórek. Oba elementy implantu o zorientowanej strukturze wspomagają mogą ukierunkowaną regenerację, zarówno w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [168].

Glikol polietylenowy

Znaczącym czynnikiem ograniczającym zastosowanie danego materiału jest czas degradacji. Mahoney wraz ze wsp. zakapsułkowali macierzyste komórki nerwowe (NSC) w degradowalnym hydrożelu z glikolu polietylenowego (PEG). W obserwacjach mikroskopowych stwierdzono, że kultury komórek w trójwymiarowej sieci polimerowej tworzą własne mikrośrodowisko do przetrwania, proliferacji i różnicowania się do komórek nerwowych oraz glejowych, które elektrofizjologicznie reagują na neurotransmitery. Powyższe obserwacje wskazują, że hydrożel z PEG może być przydatnym materiałem dostarczającym komórki w regeneracji tkanki nerwowej [169]. Trójwymiarowe polimerowe matryce PEG są wykorzystywane jako podłoże do hodowli komórek nerwowych, które jednocześnie mogą stanowić materiał wspomagający procesy naprawcze w tkance nerwowej. Obiecującym materiałem jak już zaznaczono jest glikol polietylenowy zdolny do tworzenia żeli. Namba i in. opisali alternatywną metodę otrzymywania

żelu z PEG, zawierający sieć fibrynową oraz kapsułkowany w nim roztwór z komórkami nerwowymi. Fibryna, która zdegradowała do nietoksycznych produktów, pozostawiła po sobie sieć połączonych porów. Badania pokazują, że komórkami można zasiedlić strukturę w trakcie jej wytwarzania, bez znaczących konsekwencji dla komórek [170].

Istniejąca bariera krew-rdzeń kręgowy stanowi przeszkodę dla makrocząsteczkowych czynników terapeutycznych, takich jak leki, proteiny i geny. Czynniki te nie mogą samodzielnie pokonać tej bariery by wzbogacić uszkodzony rdzeń kręgowy, co ogranicza możliwość leczenia uszkodzonego rdzenia kręgowego. Glikol polietylenowy połączony z polimerowymi liposomami o właściwościach magnetycznych (MPL) (Magnetic Polymeric Liposomes) oraz sprzężony z białkowymi domenami inicjującymi szlaki transdukcji sygnałów transaktywujących transkrypcję polipeptydów (TAT) (Transactivating-Transduction Protein), został zbadany jako system dostarczający czynniki terapeutyczne do rdzenia. Konstrukcja ta miała na celu przekroczyć barierę krew-mózg-rdzeń kręgowy i uzupełnić miejsce ubytku powstałe w uszkodzonym rdzeniu. Formułę nanocząstek, wykazującą znaczące właściwości supermagnetyzmu oceniono w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Rezultaty pokazują że TAT-PEG-MPL nie tylko kumuluje się w miejscu ubytku w wyniku działania sił magnetycznych, ale również może być wykorzystany jako środek kontrastujący w szczurzym, eksperymentalnym modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego. Połączenie TAT z PEG-MPL może pomóc w pokonaniu bariery krew-mózg-rdzeń kręgowy i penetracji materiału przez otaczającą tkankę i komórki nerwowe. Nanocząstki TAT-PEG-MPL są zdolne do przemieszczenia się w głąb rdzenia kręgowego, co stwarza nowe rozwiązania w leczeniu urazów rdzenia kręgowego [171].

Poliakrylany

Biokompatybilne hydrożele z poli(metakrylamidu N-2-hydroksypropyleny) (PHPMA) zawierającym sekwencje peptydowe (argininę, glicynę i kwas asparaginowy - Arg-Gly-Asp) RGD wspomagające adhezję komórek, zostały scharakteryzowane pod kątem potencjalnego przeznaczenia do regeneracji uszkodzonego rdzenia kręgowego. Zdolności neuroregeneracyjne hydrożelu PHPMA-RGD oraz wpływ na odrost aksonów zostały przebadane *in vivo* na modelu urazowego uszkodzenia rdzenia kręgowego szczura. Struktura hydrożelu z połączonymi porami, właściwościami lepko-sprężystymi zbliżonymi do tkanki nerwowej, stanowi trójwymiarową kontynuację wzdłuż miejsca ubytku tkanki. Ułatwia migrację i reorganizację miejscową komórek, jak i rozrost tkanki w miejscu ubytku rdzenia kręgowego, angiogenezę i wzrost aksonów. W dodatku hydrożelowa matryca redukowała nekrozę i kavitację w sąsiadującej substancji białej i szarej [172].

Flynn i in. opracowali metodę wytwarzania hydrożeli z poli(metakrylanu-2-hydroksyetylu) (PHEMA) z równolegle zorientowanymi kanalikami dla inżynierii tkanki nerwowej. Taka konstrukcja hydrożelu mogłaby wspomagać regenerację nerwów po uszkodzeniu zarówno rdzenia kręgowego, jaki i nerwów obwodowych. Wzrost wolnej przestrzeni w strukturze, którą uzyskano w wyniku wprowadzenia kanalików miałyby spowodować ukierunkowany wzrost aksonów poprzez kanałiki oraz lepszą infiltrację komórek [173]. Taki implant może być wykorzystany do ukierunkowanej regeneracji zarówno w obwodowym jak i ośrodkowym układzie nerwowym.

Posumowanie

Inżynieria biomateriałów może doprowadzić do stworzenia odpowiednich warunków regeneracyjnych jednak to nie wystarczy. Liczne badania dowodzą, że za odbudowę tkanki nerwowej odpowiada wiele czynników równocześnie. Są to skomplikowane mechanizmy,

które muszą być w pełni zrozumiałe, by rozwiązać problem uszkodzeń rdzenia kręgowego. Działając tylko na jeden z mechanizmów nie uzyskamy pełnych szans na całkowitą odbudowę tkanki nerwowej. Rozwiązaniem przyszłości, które budzi nadzieję, jest połączenie różnych metod terapii, zarówno tych oddziałujących na poziomie molekularnym, jak i tych działających na całym obszarze tkanki nerwowej. Transplantacje komórek, w połączeniu z trójwymiarowymi matrycami biomateriałowymi lub czynnikami neurotroficznymi, będą dominującym przedmiotem badań inżynierii tkanki nerwowej w najbliższym czasie. Ważne jest, aby terapie neuroprotekcyjne, wspomóc poprzez przywrócenie ciągłości rdzenia poprzez połączenie uszkodzonych końców rdzenia kręgowego.

Przyszłościowe strategię mają na celu zwiększenie liczby regenerujących się aksonów wstępujących i zstępujących, poprawienie zdolności do remielinizacji regenerujących się aksonów oraz ostatecznie stworzenie środowiska, umożliwiającego ukierunkowaną regenerację aksonów dla przywrócenia odpowiednich połączeń w rdzeniu kręgowym.

Literatura

- [1] **Batchelor P.E., Howells D.W.:** CNS regeneration: clinical possibility or basic science fantasy? Review, *Journal of Clinical Neuroscience*, (2003), 10 (5), 523–534.
- [2] **Dietz V., Curt A.:** Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges. Review, *Lancet Neurol*, (2006), 5, 688–694.
- [3] **Bergman B.S.:** Regeneration in the spinal cord. *Current Opinion in Neurobiology*, (1998), 8, 800–807.
- [5] **Gruener G., Biller J.:** Spinal Cord Anatomy, Localization, and Overview of Spinal Cord Syndromes. *Continuum: Lifelong Learning Neurol*, (2008), 14(3), 11–35.
- [6] **Craven J.:** Spinal Cord – Anatomy, Anesthesia and Intensive Care Medicine. The Medicine Publishing Company (2004) 144–146.
- [7] **Burt A.A.:** The epidemiology, natural history and prognosis of spinal cord injury. *Mini-Symposium: Spinal Trauma, Current Orthopaedics*, (2004), 18, 26–32.
- [8] **Taoka Y., Okajama K.:** Spinal Cord Injury in the Rat. *Progress in Neurobiology*, (1998), 56, 341–358.
- [9] **O'Connor P.:** Injury to the spinal cord in motor vehicle traffic crashes. *Accident Analysis and Prevention*, (2002), 34, 477–485.
- [10] **Pickett G.E., Campos-Benitez M., Keller J., L., Duggal N.:** Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in Canada, *Spine*, (2006), 31(7), 799–805.
- [11] **Fehlings M.G., Baptiste D.C.:** Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury International Journal of the Care of the Injured*, (2005), 36, 113–122.
- [12] **Finnerup N.B., Bastrup C., Jensen T.S.:** Neuropathic pain following spinal cord injury pain: mechanisms and treatment. *Scandinavian Journal of Pain*, (2009), 1, 3–11.
- [13] **Chang W.L., Ke D., S., Cheng T., J.:** Lateral Medullary Infraction Presenting as Brown-Sequard Syndrome like Manifestation. A case Report and Literature Review, *Acta Neurologia Taiwanica*, (2010), 18, 204–207.
- [14] **Sathirapanya P., Taweelarp A., Sae Heng S., Riabroi K.:** Case Report Brown-Sequard syndrome from cervical disc herniation, a case report and review of literature. *Neurology Asia*, (2007), 38; 65–67.
- [15] **Garcia-Manzanares M.D., Belda-Sanchis J.L., Giner-Pascual M., Miguel-Leon I., Delgado-Calvo M., Alio y Sanz J.L.:** Brown-Sequard syndrome associated with Horner's syndrome after penetrating trauma at the cervicomedullary junction. *Case Report, Spinal Cord*, (2000), 38, 705–707.
- [16] **Zubair M., Ravidran T., Chan C.Y.W., Saw L.B., Kwan M.K.:** Acute Brown-Sequard syndrome following brachial plexus avulsion injury. A report of two cases. *Hong Kong Journal of Emergency Medicine*, (2011), 18, 347–351.
- [17] **Newey M.L., Sen P., K., Fraser R., D.:** The long-term outcome after central cord syndrome. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, (2000), 82, 851–855.
- [18] **Harrop J.S., Sharan A., Raliff J.:** Central cord injury; pathophysiology, management, and outcomes. *The Spine Journal*, (2006), 6, 198–206.
- [19] **Omac O.K., Karadeniz M., Kesikburun S., Yasar E., Yilmaz B., Alaca R.:** Posterior Cord Syndrome Associated with Dural

- Ectasia, Arachnoid Cyst and Spinal Cord Atrophy in Patient with Marfan Syndrome: Case Report, *Journal of Physical Medicine and Rehabilitation Sciences*, (2010), 13, 069–071.
- [20] **Bennet D.S., Alo K., M., Oakley J. C., A., Feler C.A.**: Spinal Cord Stimulation for Complex Regional Pain Syndrome (RSD): a Retrospective Multicenter Experience from 1995–1998 of 101 Patients. *Neuromodulation*, (1999), 2(3), 2002–210.
- [21] **Ptaszyńska-Sarosiek I.**, Niemcunowicz-Janica A., Janica J.: Urazy kręgosłupa z uszkodzeniem rdzenia kręgowego – poglądy reprezentowane przez neurologów (Spinal cord injuries – opinions represented by neurologists). *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* (2007), LVII, 294–297.
- [22] **Hall E.D., Wolf D.L.**: A pharmacological analysis of the pathological mechanisms of post traumatic spinal cord ischemia. *Journal of Neurosurgery* (1986), 64, 951–961.
- [23] **Dumont R.J., Okonkwo D.O., Verma S., Hulbert R.J., Boulos P.T., Ellegala D.B., Dumont A.S.**: Acute Spinal Cord Injury. Part I: Pathophysiologic Mechanisms, *Clinical Neuropharmacology* (2001), 24 (5), 254–264.
- [24] **Hall E.D., Braughler J.M.**: Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surgical Neurology* (1982), 18, 320–327.
- [25] **Fehlings M.G., Nguyen D.H.**: Immunoglobulin G: a potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. *Journal of Clinical Immunology* (2010), 1, 109–112.
- [26] **Dumont R.J., Verma S., Onkwo D.O., Hulbert R.J., Boulos P.T., Ellegala D.B., Dumont A.S.**: Acute Spinal Cord Injury, Part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clinical Neuropharmacology* (2001), 24 (5), 265–279.
- [27] **Schnell L., Feam S., Klassen H., Schwab M.E., Perry V.H.**: Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: Differences between brain and spinal cord. *European Journal of Neuroscience* (1999), 11, 3648–3658.
- [28] **Ray S.K., Dixon C.E., Banik N.L.**: Molecular mechanism in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histology and Histopathology* (2002), 17, 1137–1152.
- [29] **Rossingnal S., Schwab M., Schwartz M., Fehlings G.**: Spinal Cord Injury: Time to Move? *Journal of Neuroscience* (2007), 27, 11782–11792.
- [30] **Hulsebosch C.E.**: Recent advance in pathophysiology and treatment of spinal cord injury *Advances in Physiology Education* (2002), 26, 238–255.
- [31] **Tator C.H., Mc Cormick P.C., Piepmeier J.M., Benzel E.C., Young W.**: Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery* (1998), 42, 696–708.
- [32] **Tator C.H.**: Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury. *Injury Prevention* (2002), 8, 33–36.
- [33] **Schwab M.E., Bartholdi D.**: Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiological Reviews* (1996), 76, 319–370.
- [34] **Seddon H.J.**, Classification of nerve injuries. *Brit med J.* (1942)/II., 237–239.
- [35] **Sunderland S.**: Nerve and Nerve Injuries. *Edinburg: Churchill-Livingstone* (1978).
- [36] **Lee S.K., Wolfe S.W.**: Peripheral Nerve Injury and Repair. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, (2000), 8(4), 243–252.
- [37] **Waller A.**: Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produces thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Transact Royal Soc London*, (1850), 140, 423–429.
- [38] **Lee S.K., Wolfe S.W.**, Peripheral Nerve Injury Repair *Journal of American Academy of Orthopaedic Surgeons* (2000), 8, 243–252.
- [39] **Hoke A.**: Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nature Clinical Practice, Neurology* (2006) 2(8), 448–454.
- [40] **Belkas J.S., Schoichet M.S., Midha R.**: Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurological Research* (2004), 26, 1–10.
- [41] **Hall S.**: The response to injury in the peripheral nervous system – review. *The Journal of Bone and Joint Surgery* (2005), 8(10), 1309–1319.
- [42] **Burnett M.G., Zager E.L.**: Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgery Focus* (2004), 16, 5, 1–7.
- [43] **Deumens R., Bozkut A., Meek M.F., Marcus M.A.E., Joosten E.A.J., Weis J., Brook G.A.**: Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. *Progress in Neurobiology* (2010), 92, 245–276.
- [44] **Priestley J.V., Ramer M.S., King V.R., McMahon S.B., Brown R.A.**: Stimulating regeneration in the damaged spinal cord. *Journal of Physiology – Paris*, (2002), 96, 123–133.
- [45] **Reier P.J.**: Cellular Transplantation Strategies for Spinal Cord Injury and Translational Neurobiology. *The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics*, (2004), 1, 424–451.
- [46] **Horner P.J., Gage F.H.**: Regenerating the damaged central nervous system – Review article. *Nature*, (2000), 407, 963–970.
- [47] **Schwab J.M., Brichtel K., Mueller Ch.-A., Failli V., Kaps H.-P., Tuli S.K., Schluesener H.J.**: Experimental strategies to promote spinal cord regeneration – an integrative perspective. *Progress in Neurobiology* (2006) 91–116.
- [48] **Abu-Rub M., McMahon S., Zeugolis D.I., Windebank A., Pandit A.**: Spinal cord injury in vitro: modelling axon growth inhibition, *Drug Discovery Today*, 2010, (15), 438–443.
- [49] **Deumens R., Koopmans G.C., Joosten E.A.J.**: Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*, (2005) 57–89.
- [50] **Kang K. N., Kim D.Y., Yoon S.M., Lee J.Y., Lee B.N., Kwon J.S., H. Seo H.W., Lee I.W., Shin H.C., Kim Y.M., Kim H.S., Kim J.H., Min B.H., Lee H.B., Kim M.S.**: Tissue engineered regeneration of completely transected spinal cord using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* (2012), 33, 4828–4835.
- [51] **Willerth S., Sakiyama-Elbert S.E.**: Cell therapy for spinal cord regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2008), 60, 263–276.

- [52] **Lu P., Jones L.L., Tuszynski M.H.:** Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, (2007), 203, 8–21.
- [53] **Novikova L.N., Lobov S., Wiberg M., Novikov L.N.:** Efficacy of olfactory ensheathing cells to support regeneration after spinal cord injury is influenced by method of culture preparation. *Experimental Neurology*, (2011), 299, 132–142.
- [54] **Mann C.M., Kwon B.K.:** An Update on the Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. *Seminars in Spine Surgery*, (2007), 19, 272–279.
- [55] **Profyris C., Cheema S.S., Zang D.W., Azari M.F., Boyle K., Petratos S.:** Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury – Review. *Neurobiology of Disease*, (2004), 15, 415–436.
- [56] **Bauchet L., Lonjon N., Perrin F.E., Gilbert C., Privat A., Fattal C.:** Strategies for spinal cord repair after injury: A review of the literature and information. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, (2009), 52, 330–351.
- [57] **Wilcox J.T., Cadotte D., Fehlings M.G.:** Spinal cord clinical trials and the role for bioengineering – Review. *Neuroscience Letters*, (2012), 519, 93–102.
- [58] **He J., Wang X.M., Spector M., Cui F.Z.:** Scaffolds for central nervous system tissue engineering. *Frontier of Material Science* (2012), 6(1), 1–25.
- [59] **Lu P., Jones L.L., Tuszynski M.H.:** Axon regeneration through scar and into site of chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology* (2007), 203, 8–21.
- [60] **Madigan N.N., McMahon S., O'Brien T., Yaszemski M.J., Windebank A.J.:** Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds – *Frontiers Review. Respiratory Physiology & Neurobiology*, (2009), 169, 183–199.
- [61] **Tabesh H., Amoabediny Gh., Nik N.S., Heydari M., Yosefifard M., Ranaei Siadat S.O., Mottaghy K.:** The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration. *Neurochemistry International*, (2009), 54, 73–83.
- [62] **Samadikuchaksaraei A.:** An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injuries – Review. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, (2007), 4:15.
- [63] **Stichel C.C., Werner Muller H.:** Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Progress in Neurobiology*, (1998), 56, 119–148.
- [64] **Geller H.M., Fawcett J.W.:** Building a Bridge: Engineering Spinal Cord Repair – Review. *Experimental Neurology*, (2002) 174, 125–136.
- [65] **Onuki Y., Bhardwaj U., Papadimitrakopoulos F., Burgens D.J.:** A review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response. *Journal Diabetes Science and Technology* (2008), 2(6), 1003–1015.
- [66] **Błażewicz S.:** Nazewnictwo i definicje dotyczące problematyki biomateriałów, w: *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000*, tom 4 – Biomateriały, pod red. S. Błażewicza i L. Stocha, AOW EXIT (2003) 597–607.
- [67] **Marciniak J.:** Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice (2002), Rozdział I.
- [68] **Bhat S., Kumar A.:** Biomaterials in Regenerative Medicine. *Journal of Postgraduate Medicine Education Research* (2012), 46(2), 81–89.
- [69] **Patel N.R., Gohil P.P.:** A review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance, *International Journal of Emerging Technology and Advanced engineering* (2012), 2(4), 2450–2459.
- [70] **Gogolewski S.:** Produkty degradacji, w: *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000*, tom 4 – Biomateriały, pod red. S. Błażewicza i L. Stocha, AOW EXIT (2003) 257–330.
- [71] **Pielka S., Paluch D., Staniszevska-Kuś J., Solski L., Lewandowska-Szumieł M.:** Badania biogodności materiałów implantacyjnych, w: *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000*, tom 4 – Biomateriały, pod red. S. Błażewicza i L. Stocha, AOW EXIT (2003) 437–439.
- [72] **Będziński R., Pezowicz C., Szust A.:** Biomechanika kręgosłupa, w: *Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna*, tom 5 – Biomechanika, pod redakcją R. Będzińskiego, K. Kędziora, J. Kiwerskiego, A. Moreckiego, K. Skalskiego, A. Walla oraz A. Wita, AOW EXIT (2004) 113–158.
- [73] **Li Y., Yang S.-T.:** Effects of Three-dimensional Scaffolds on Cell Organization and Tissue Development. *Biotechnol. Bio-process Eng.*, (2001), 6, 311–325.
- [74] **Hou Q., Gijpma D.W., Feijen J.:** Preparation of Interconnected Highly Porous Polymeric Structures by a Replication and Freeze-Drying Process.
- [75] **Liu W., Themopoulos S., Xia Y.:** Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Advanced Health Materials* (2012), 1(1), 10–25.
- [76] **Martins A., Aranjó J.V., Reis R.L., Neves N.M.:** Electrospun nanostructured scaffold for tissue engineering applications. *Nanomedicine* (2007), 2(6), 929–942.
- [77] **Sill T.J., von Recum H.A.:** Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* (2008), 29(13), 1989–2006.
- [78] **Kumbar S.G., James R., Nukavarapu S.P., Laurecin C.T.:** Electrospun nanofiber scaffolds engineering soft tissues. *Biomedical Materials* (2008), 3, 3.
- [79] **Zhang Y.Z., Su B., Venugopal J., Ramakrishna S., Lim C.T.:** Biomimetic and bioactive nanofibers scaffolds from electrospun composite nanofibers. *International Journal of Nanomedicine* (2007), 2(4), 623–638.
- [80] **Schmalenberg K.E., Uhrich K.E.:** Micropatterned polymer substrates control alignment of proliferation Schwann cells to direct neuronal regeneration. *Biomaterials* (2005), 26, 1423–1430.

- [81] Thomas A.M., Kubilius M.B., Holland S.J., Seidlits S.K., Boehler R.M., Anderson A.J., Cummings B.J., Shea L.D.: Channel density and porosity of degradable bridging scaffolds on axon growth after spinal cord. *Biomaterials* (2013), 34, 2213–2220.
- [82] Khare A.R., Peppas N.A.: Swelling/deswelling of ionic copolymer gels. *Biomaterials* (1995) 16, 559–567.
- [83] Van Tomme S.R., Storm G., Hennik W.E.: In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* (2008), 355, 1–18.
- [84] Baier R.E.: Surface behaviour of biomaterials: The theta surface for biocompatibility. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* (2006), 17, 1057–1062.
- [85] Roach P., Parker T., Gadegaard N., Alexander M.R.: Surface strategies for control of neuronal cell adhesion: A review. *Surface Science Reports* (2010), 65, 145–173.
- [86] Gogolewski S.: Metody przetwarzania polimerów na wyroby medyczne - Sterylizacja wyrobów polimerowych, w: *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000, tom 4 – Biomateriały*, pod red. S. Błażewicza i L. Stocha, AOW EXIT (2003) 286–287.
- [87] Ratajska M., Boryniec S.: Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. *Reactive & Functional Polymers*, (1998), 38, 35–49.
- [88] Dang Y.M., Leong K.W.: Natural polymers for gene delivery and tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, (2006), 58, 487–499.
- [89] Nair L.S., Laurecin C.T.: Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, (2007), 32, 762–798.
- [90] Lloyd L.L., Kennedy J.F., Methacanon P., Peterson M., Knill C.J.: Carbohydrate polymers as wound management aids. *Carbohydrate Polymers* 37 (1998) 315–322.
- [91] Elbert D.L.: Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. *Acta Biomaterialia*, (2011), 7, 31–56.
- [92] Eiselt P., Yeh J., Latvala R.K., Shea L.D., Mooney D.J.: Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials*, (2000), 21, 1921–1927.
- [93] Kong H.J., Smith M.K., Mooney D.J.: Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials*, (2003), 24, 4023–4029.
- [94] Drury J.L., Mooney D.J.: Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, (2003), 24, 4337–4351.
- [95] Sheridan M.H., Shea L.D., Peters M.C., Mooney D.J.: Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *Journal of Controlled Release*, (2000), 64, 91–102.
- [96] Kuo C.K., Ma P.X.: Ionically cross-linked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, (2001) 22, 511–521.
- [97] Koc M.L., Ozdemir U., Imren D.: Prediction of the pH and the temperature-dependent swelling behavior of Ca^{2+} - alginate hydrogels by artificial neural networks. *Chemical Engineering Science*, (2008), 63, 2913–2919.
- [98] Szarek D., Laska J., Jarmundowicz W., Błażewicz S., Tabakow P., Kaliński K., Woźniak Z., Mierzwa J.: Influence of Alginates on Tube Grafts of Different Elasticity – Preliminary In Vivo Study, *Journal of Biomaterials and Nanotechnology*, (2012), 3, 20–30.
- [99] Ashton R.S., Banerjee A., Punyani S., Schaffer D.V., Kane R.S.: Scaffolds based on degradable alginate hydrogels and poly(lactide-co-glycolide) microspheres for stem cell culture. *Biomaterials*, (2007), 28, 5518–5525.
- [100] Banerjee A., Arha M., Choudhary S., Ashton S.R., Bhatia R.S., Schaffer D.V., Kane R.S.: The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials*, (2009), 30, 4695–4699.
- [101] Matsuura Sh., Obara T., Tsuchiya N., Suzuki Y., Habuchi T.: Carvenous nerve regeneration by biodegradable alginate gel sponge sheet replacement without sutures. *Urology*, (2006), 68, 1366–1371.
- [102] Suzuki Y., Kitamura M., Wu S., Kataoka K., Suzuki K., Endo K., Nishimura Y., Ide Ch.: Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord. *Neuroscience Letters*, (2002), 138, 121–124.
- [103] Prang P., Mueller R., Eljaouhari A., Heckmann K., Kunz W., Weber T., Faber C., Vroemen M., Bogdahn U., Weidner N.: The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials*, (2006), 27, 3560–3569.
- [104] Pawar K., Muelle R., Caioni M., Prang P., Bogdahn U., Kunz W., Weidner N.: Increasing capillary diameter and the incorporation of gelatin enhance axon outgrowth in alginate-based anisotropic hydrogels. *Acta Biomaterialia* (2011) 7, 2826–2834.
- [105] Stokolos S., Sakamoto J., Breckon Ch., Holt T., Weiss J., Tuszynski M.H.: Templated Agarose Scaffolds Support Linear Axonal Regeneration. *Tissue Engineering*, (2006), 12, 2777–2787.
- [106] Stokolos S., Tuszynski M.H.: Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury. *Biomaterials*, (2006) 27, 443–451.
- [107] Gros T., Sakamoto J.S., Blesch A., Havton L.A., Tuszynski M.H.: Regeneration of long-tract axons through sites of spinal cord injury using templated agarose scaffolds. *Biomaterials*, (2010), 31, 6719–6729.
- [108] Zuidema M.J., Pap M.M., Jaroch B.D., Morisson F.A., Gillbert R.J.: Fabrication and characterization of tunable hydrogels blends for neural repair. *Acta Biomaterialia*, (2011) 7, 1634–1643.
- [109] Crompton K.E., Goud J.D., Bellamkonda R.V., Gengenbach T.R., Finkelstein D.I., Horne M.K., Forsythe J.S.: Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials*, (2008), 28, 441–449.

- [110] Wang A., Ao Q., He Q., Gong X., Gong K., Gong Y., Zhao N., Zhang X.: Neural Stem Cell Affinity of Chitosan and Feasibility of Chitosan-Based Porous Conduits as Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *Tsingua Science and Technology*, (2006), 11/4, 415–420.
- [111] Mo L., Yang Z., Zhang A., Li X.: The repair of the injured adult rat hippocampus with NT-3-chitosan carriers. *Biomaterials*, (2010), 31, 2184–2192.
- [112] Yang Z., Duan H., Mo L., Qiao H., Li X.: The effect of the dosage of NT-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials*, (2010) 31, 4846–4854.
- [113] Everse S.J., Spraggan G., Veerapandin L., Riley M., Doolittle R.F.: Crystal structure a fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry* (1998); 37(24), 8637–8642.
- [114] Muszbek L., Bagdy Z., Bereczky Z., Katona E.: The involvement of blood coagulation factor XIII in fibrinolysis and thrombosis. *Cardiovascular & Haematological Agents in Medical Chemistry*, (2008), 6(3), 190–205.
- [115] Ahmed T.A., Dare E.V., Hincke M.: Fibrin a: Versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Engineering. Part B Reviews*, (2008), 14, 199–215.
- [116] Evans S.A., Ferguson K.H., Foley J.P., Rozanski T.A., Morey A.F.: Fibrin sealant for the management of genitourinary injuries, fistulas and surgical complications. *The Journal of Urology*, (2003), 169, 1360–1362.
- [117] Philips J.B., King V.R., Ward Z., Porter R.A., Priestley J.V., Brown R.A.: Fluid shear in viscous fibronectin gels allows aggregation of fibrous materials for CNS tissue engineering. *Biomaterials*, (2004), 25 (14), 2769–79.
- [118] King V.R., Hensler M., Brown R.A., Priestley J.V.: Mats made from fibronectin support oriented growth of axons in the damaged spinal cord of the adult rat. *Experimental neurology*, (2003), 182, 383–398.
- [119] King V.R., Alovskaya A., Wei D.Y.T., Brown R.A., Priestley J.V.: The use of injectable forms of fibrin and fibronectin to support axonal ingrowth after spinal cord injury. *Biomaterials*, (2010), 31, 4447–4456.
- [120] Ahmed Z., Idowu B.D., Brown R.A.: Stabilization of fibronectin mats with micromolar concentrations of copper. *Biomaterials*, (1999), 20, 201–209.
- [121] King V.R., Philips J.B., Hunt-Grubbe H., Brown R., Priestley J.V.: Characterization of non-neuronal elements within fibronectin mats implanted into the damaged adult rat spinal cord. *Biomaterials*, (2006), 27, 485–496.
- [122] King V.R., Philips J.B., Brown R.A., Priestley J.V.: The effect of treatment with antibodies to transforming growth factor beta 1 and beta 2 following spinal cord damage in the adult rat. *Neuroscience*, (2004), 126, 173–183.
- [123] Soon A.S.C., Stabenfeldt S.E., Brown W.E., Barker T.H.: Engineering fibrin matrices: The engagement of polymerization pockets through fibrin knob technology for the delivery and retention of therapeutic proteins. *Biomaterials*, (2010), 31, 1944–1954.
- [124] Taylor S.J., J. McDonald J.W. III, Sakiyama-Elbert S.E.: Controlled release of neurotrophin-3 from fibrin gels for spinal cord injury. *Journal of Control Release*, (2004), 98, 281–294.
- [125] Price R.D., Berry M.G., Navsaria H.A.: Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, (2007), 60, 1110–1119.
- [126] Eng D., Caplan M., Preul M., Panitch A.: Hyaluronan scaffolds: A balance between backbone functionalization a bioactivity. *Acta Biomaterialia*, (2010), 6, 2407–2414.
- [127] Baumann M.D., Kang C.E., Tator C.H., Shoichet M.S.: Intrathecal delivery of a polymeric nanocomposites hydrogel after spinal cord injury. *Biomaterials*, (2010), 31, 7631–7639.
- [128] Gupta D., Tator C.H., Shoichet M.S.: Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord. *Biomaterials*, (2006), 27, 2370–2379.
- [129] Schnell E., Klinkhammer K., Balzer S., Brook G., Klee D., Dalton P., Mey J.: Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend. *Biomaterials*, (2007), 28, 3012–3025.
- [130] Ding T., Luo Z.J., Zheng Y., Hu X-Y., Ye Z.X.: Rapid repair and regeneration of damaged rabbit sciatic nerves by tissue-engineered scaffold made from nano-silver and collagen type I. *Injury. Int. J. Care Injured*, (2010), 41, 522–527.
- [131] Wang B., Zhao Y., Lin H., Chen B., Jing Z., Zhang J., Wang X., Zhao W., Dai J.: Phenotypical analysis of adult rat olfactory ensheathing cell on 3-D collagen scaffolds. *Neuroscience Letters*, (2006), 401, 65–70.
- [132] Jarmundowicz W., Tabakow P., Czapiga B., Międzybrodzki R., Fortuna W., Górski A.: Glejowe komórki węchowe – nadzieja w leczeniu urazów rdzenia kręgowego (Olfactory glial cells: hope in the treatment of spinal cord injuries). *Neurologia i Neurochirurgia Polska* (2004), 38(5), 413–420.
- [133] Wang B., Han J., Gao Y., Xiao Z., Chen B., Wang X., Zhao W., Dai J.: The differentiation of rat adipose-derived stem cells into OEC-like cells on collagen scaffolds by co-culturing with OECs. *Neuroscience Letters*, (2007), 421, 191–196.
- [134] Han Q., Jin W., Xiao Z., Ni H., Wang J., Kong J., Wu J., Liang W., Chen L., Zhao B., Dai J.: The promotion of neural regeneration in an extreme rat spinal cord injury model using a collagen scaffold containing a collagen binding neuroprotective protein and an EGFR neutralizing antibody. *Biomaterials*, (2010), 31, 9212–9220.
- [135] Liang W., Han Q., Jin W., Xiao Z., Huang J., Ni H., Chen B., Kong J., Wu J., Dai J.: The promotion of neurological recovery in the rat spinal cord crushed injury model by collagen-binding BDNF. *Biomaterials*, (2010), 31, 8634–8641.
- [136] Petter-Puchner A.H., Froetscher W., Krametter-Froetscher R., Lorinson D., Redl H., van Griensven M.: The long-term neurocompatibility of human fibrin sealant and equine collagen as biomaterials in experimental spinal cord injury. *Experimental and Toxicologic Pathology*, (2007), 58, 237–245.
- [137] Fuhrmann T., Hillen L.M., Montzka K., Woltje M., Brook G.A.: Cell-Cell interactions of human neural progenitor-derived astrocytes within a microstructured 3D-scaffold. *Biomaterials*, (2010), 31, 7705–7715.

- [138] **Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini.** Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, (2006), 27, 3413–3431.
- [139] **Wu L., Ding J.** In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L – lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, (2004), 25, 5821–5830.
- [140] **Kim H.D., Bae E.H., Kwon I.C.** Effect of PEG-PLA diblock copolymer on macroporous PLLA scaffolds by thermally induced phase separation. *Biomaterials*, 2004, 25, 2319–2329.
- [141] **Yang F., Qu X., Ciu W., Bei J., Yu F., Lu S., Wang S.** Manufacturing and morphology structure of polylactide-type microturbules orientation structured scaffolds. *Biomaterials* (2006), 27, 4923–4933.
- [142] **Freed L., Marquis J.C., Nohina A., Emmanuel J., Kikos A.G., Langer R.** Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J. Biomed Mater Res*, (1993), 23, 11–23.
- [143] **Mikos A.G., Bao Y., Cima L.G.** Preparation of poly(glycolic-acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *J. Biomed Mater Res*, (1993), 27, 183–189.
- [144] **Nam Y.S., Park T.G.** Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials*, (1999), 20, 1783–1790.
- [145] **Shi G.X., Cai Q., Wang C.X.** Fabrication of cell scaffold of poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) and biocompatibility. *Polymer Advanced Technology*, (2002), 13, 227–232.
- [146] **Yang I., Wan Y.Q., Tu C.F.** Enhancing the cell affinity of macroporous poly(L-lactide) cel scaffold by a convenient surface modification method. *Polym Inter*, (2003), 52, 1892–1898.
- [147] **Kim B.S., Mooney D.J.** Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* (1998), 16, 224–230.
- [148] **Vacanti C., Longer R., Schloo B., Vacanti J.P.** Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg*, (1991), 88, 753–759.
- [149] **Freed L., Grand D., Lingbin Z., Emmanuel J., Marquis J.C., Langer R.** Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* (1994), 28, 891–899.
- [150] **Tu C.F., Cai Q., Yang I.** The fabrication and characterization of poly(lactic-acid) scaffolds for tissue engineering by improved solid-liquid phase separation. *Polymer Advanced Technology*, (2003), 29, 565–573.
- [151] **Ghasemi-Mobarakeh L., Prabhakaran M.P., Morshed M., Nasr-Esfahani M-H, Ramakrishna S.** Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, (2008), 29, 4532–4539.
- [152] **Bechara S.L., Judson A., Popat K.C.** Template synthesized poly(ϵ -caprolactone) nanowire surface for neural tissue engineering. *Biomaterials*, (2010), 31, 3492–3510.
- [153] **Runge M. B., Dadsetan M., Baltrusaitis J., Knight A.M., Ruesink T., Lazcano E.A., Windebank A.J., Yaszemski M.J.** The development of electrically conductive polycaprolactone fumurate – polypyrrole composites materials for nerve regeneration. *Biomaterials*, (2010), 31, 5916–5926.
- [154] **Moore M.J., Friedman J.A., Lewellyn E.B., Mantila S.M., Krych A.J., Ameenuddin S., Knight M., Lu L., Currier B.L., Spinner R.J., Marsh R.W., Windebank A.J., Yaszemski M.J.** Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. *Biomaterials*, (2006), 27, 419–429.
- [155] **Tuinstra H.M., Aviles M.O., Shin S., Holland S.J., Zeliyanskaya M.L., Fast A.G., Ko S.Y., Margul D.J., Bartels A.K., Boehler R.M., Cummings B.J., Anderson A.J., Shea L.D.** Multifunctional, multichannel bridges that deliver neurotrophin encoding lentivirus for regeneration following spinal cord injury. *Biomaterials*, (2012), 33, 1618–1626.
- [156] **Shin S., Tuinstra H.M., Salvay D.M., Shea L.D.** Phoshatidysertine immobilization of lentivirus for localized gene transfer. *Biomaterials*, (2010), 31, 4353–4359.
- [157] **De Laporte L., Lei Yan A., Shea D.L.** Local gene delivery from ECM-coated poly(lactide-co-glycolide) multiple channel bridges after spinal cord injury. *Biomaterials*, (2009), 30, 2361–2368.
- [158] **Nojehdehian H., Moztarzadeh F., Baharvand H., Nazarian H., Tahriri M.** Preparation and surface characterization of poly-L-lysine-coated PLGA microsphere scaffold containing retinoic acid for nerve tissue engineering: In vitro study. *Colloids and Surface B: Biointefaces*, (2009), 73, 23–29.
- [159] **Lee J.Y., Bashur C.A., Goldstein A.S., Schmidt C.E.** Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*, (2009), 30, 4325–4335.
- [160] **Patist C.M., Mulder Borgerhoff M., Gautier S.E., Maquet V., Jerome R., Oudega M.** Freeze-dried poly(D,L – lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*, (2004), 25, 1569–1582.
- [161] **Hurtado A., Moon L.D.F., Maquet V., Blits B., Jerome R., Oudega M.** Poly (D,L – lactic acid) macroporous guidance scaffolds seeded with Schwann cells genetically modified to secrete a bi-functional neurotrophin implanted in the completely transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*, (2006), 27, 430–442.
- [162] **Yang F., Murugan R., Ramakrishna S., Wang X., Ma Y. H., Wang S.** Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, (2004), 25, 1891–1900.
- [163] **Wang H.B., Mullins M.E., Cregg J.M., McCarthy C.W., Gilbert R.J.** Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration. *Acta Biomaterials*, (2010), 6, 2970–2978.
- [164] **Hurtado A., Cregg J.M., Wang H.B., Wendell D.F., Oudega M., Gilbert R.J., McDonald J.W.** Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-L-lactic acid microfibers. *Biomaterials*, (2011), 32, 6068–6079.
- [165] **Novikov L.N., Novikova L.N., Mosahebi A., Wiberg M., Terenghi G., Kellerth J.O.** A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials*, (2002), 23, 3369–3376.

- [166] **Xu X.Y., Li X.T., Peng S.W., Xiao J.-F., Liu C., Fang G., Chen K.C., Chen G.-Q.:** The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds. *Biomaterials*, (2010), 31, 3967–3975.
- [167] **Wang L., Wang Z.-H., Shen C.Y., You M.L., Xiao J.F., Chen G.Q.:** Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. *Biomaterials*, (2010), 31, 1691–1698.
- [168] **Yucel D., Kose G.T., Hasirci V.:** Polyester based nerve guidance conduit design. *Biomaterials*, (2010), 31, 1596–1603.
- [169] **Mahoney J.M., Anseth K.S.:** Three-dimensional growth and function of neural tissue in degradable polyethylene glycol hydrogels. *Biomaterials*, (2006), 27, 2265–2274.
- [170] **Namba R.M., Cole A.A., Bjugstad K.B., Mahoney M.J.:** Development of porous PEG hydrogels that enable efficient, uniform cell-seeding and permit early neural process extension. *Acta Biomaterialia*, (2009) 5, 1884–1897.
- [171] **Wang H., Zhang S., Liao Z., Wang C., Liu Y., Feng S., Jiang X., Chang J.:** PEGlated magnetic polymeric liposome anchored with TAT for delivery of drugs across the blood-spinal cord barrier. *Biomaterials*, (2010), 31, 6589–6596.
- [172] **Woerly S., Pinet E., de Robertis L., Van Diep D. Bousmina:** Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGelTM). *Biomaterials*, (2011) 22, 1095–1111.
- [173] **Flynn L., Dalton P.D., Schoichet M.S.:** Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials*, (2003), 24, 4265–4272.

Adres do korespondencji:

Anna Lis, Jadwiga Laska
Akademia Górniczo-Hutnicza
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów
Al. Mickiewicza 30
30-059 Kraków
Tel: 12 617 47 44, 12 617 23 31
E-mail: annal@agh.edu.pl, jlaska@agh.edu.pl