

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Hydrogeelit hermosolujen kasvatuksessa

Kandidaatintutkielma

20.9.2019

Elsa Korhonen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tässä kirjallisuuskatsauksessa käsitellään hermosolukasvatukseen soveltuvia hydrogeelejä, jotka on jaettu synteettisiin ja luontaisiin hydrogeeleihin sekä grafeeni- ja hiilinanoputkipohjaisiin hybridihydrogeeleihin. Tutkielmassa keskitytään siihen, miten hydrogeelien ominaisuudet, kuten hajoamisnopeus, huokoskoko ja sähkönjohtokyky, vaikuttavat hermosolujen kasvuun. Tutkimusten perusteella hermosoluille suotuisin kasvualusta on hybridihydrogeelit, jotka sisältävät vähintään kahta seuraavista komponenteista: hiilinanoputkia, grafeenikomponentteja, synteettisiä tai luontaisia polymeerejä.

Esipuhe

Kandidaatintutkielman kirjallisuuskatsaus aloitettiin kesäkuussa 2019 ja saatiin valmiiksi syyskuussa 2019. Tiedonhakuun käytettiin pääasiassa SciFinder-tietokantaa ja Google Scholar-hakukonetta. Tutkielman ohjaajana toimi professori Maija Nissinen. Tämä tutkielma käsittelee hermosolujen ja niiden kaltaisten solujen kasvatusta hydrogeeleissä. Aiheen rajaukseen vaikutti olennaisesti tutkimusnäytön rajallisuus ja artikkelien saatavuus. Tähän tutkielmaan on koottu sellaiset polymeeri- ja hybridihydrogeelit, joissa on tehty hermosolujen kasvuun keskittyviä kokeita. Kantasolujen ja niistä erilaistuvien hermosolujen kasvatusta ei käsitellä tässä tutkielmassa.

Haluan kiittää professori Maija Nissistä rakentavasta palautteesta kirjoitusprosessin aikana sekä kemiaan ja solubiologiaan liittyvästä mielenkiintoisesta ja sopivan haastavasta aiheesta. Haluan kiittää myös kurssikavereita hyödyllisen vertaispalautteen antamisesta.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	i
Esipuhe	ii
Sisällysluettelo	iii
Käytetyt lyhenteet.....	iv
1 Johdanto	1
2 Siltasitoutuminen hydrogeeleissä	2
3 Synteettiset hydrogeelit.....	3
3.1 Polyetyleeniglykolihydrogeelit.....	3
3.2 Polyvinyylialkoholihydrogeelit	5
4 Luontaiset hydrogeelit	6
4.1 Kollageenihydrogeelit.....	6
4.2 Silkkifibroinihydrogeelit.....	8
4.3 Gelatiinihydrogeelit	10
5 Grafeeni- ja hiilinanoputkipohjaiset hybridihydrogeelit	12
5.1 Synteettisiä polymeerejä sisältävät hybridihydrogeelit	12
5.2 Kitiini- ja kitosaanihybridihydrogeelit.....	14
Yhteenveto	16
Lähdeluettelo.....	18

Käytetyt lyhenteet

AD	aniliinidimeeri
AM	akryyliamidi
DRG	dorsaalinen hermosolmu (dorsal root ganglion)
Ch	kitiini
CNT	hiilinanoputki
COL	kollageenigeeli
CRM	konfokaalinen heijastusmikroskopia
Cs	kitosaani
EDOT	3,4-etyleenidioksitefeeni
EG	etyleeniglykoli
Gel	gelatiini
GOa	grafeenioksidiaakrylaatti
GO	grafeenioksidi
MCCG	monikanavainen kollageenigeeli
MNP	magneettinen nanopartikkeli
MP	magneettinen partikkeli
MTAC	2-(metakryloyyloksi)etyylitrimetyyliammoniumkloridi
MWCNT	moniseinäinen hiilinanoputki
NIPAAm	N-isopropyliakryyliamidi
OPF	oligo(polyetyleeniglykoli)fumaraatti
PEDOT	poly(3,4-etyleenidioksitefeeni)

PEG	polyetyleeniglykoli
pega	poly(etyleeniglykoli)akrylaatti
PNIPAAm	poly(isopropyyliakryyliamidi)
PU	polyuretaani
PVA	polyvinyylialkoholi
S	serisiini
SEM	pyyhkäisyelektronimikroskopia

1 Johdanto

Geelillä tarkoitetaan vähintään kahden yhdisteen seosta, jossa toinen on nestemäisessä ja toinen kiinteässä olomuodossa, mutta geelin mekaaniset ominaisuudet ovat vastaavat kuin kiinteillä aineilla.¹ Hydrogeelit ovat veteen liukenemattomia pehmeitä materiaaleja (soft material) ja koostuvat polymeeriketjujen muodostamista verkkorakenteista, jotka pysyvät koossa siltasidoksilla. Hydrogeeleissä verkkorakenteiden väleihin muodostuneet huokokset täyttyvät vedellä ja siihen liuenneilla aineilla, minkä seurauksena geelin koostumus on hyytelömäinen.² Hydrogeelit voidaan jakaa synteettisiin ja luonnossa esiintyviin hydrogeeleihin sen mukaan, mistä polymeeristä ne rakentuvat. Luonnossa esiintyviä polymeerejä on korvattu synteettisillä polymeereillä niiden paremman kestävyuden ja muokattavuuden vuoksi.³

Hydrogeelien kokonaisvesimäärä koostuu sitoutuneesta ja vapaasta vedestä. Kun vettä absorboituu vetysitoutumisen kautta hydrogeelin sisään, vesimolekyylit sitoutuvat hydrogeelin polaarisiin ja hydrofiilisiin funktionaalisiin ryhmiin. Sen seurauksena geelin polymeeriverkko turpoo ja myös polymeeriverkon vähemmän hydrofiiliset ryhmät vuorovaikuttavat vesimolekyylien kanssa. Näiden vuorovaikutusten jälkeen polymeeriverkko imee edelleen vettä sisään osmoottisen pakotevoiman vuoksi, jota rajoittavat kovalenttiset tai fysikaaliset siltasidokset. Polymeeriverkon elastisuus aiheutuu juuri osmoottisesta pakotevoimasta ja sen vastavoimasta.⁴

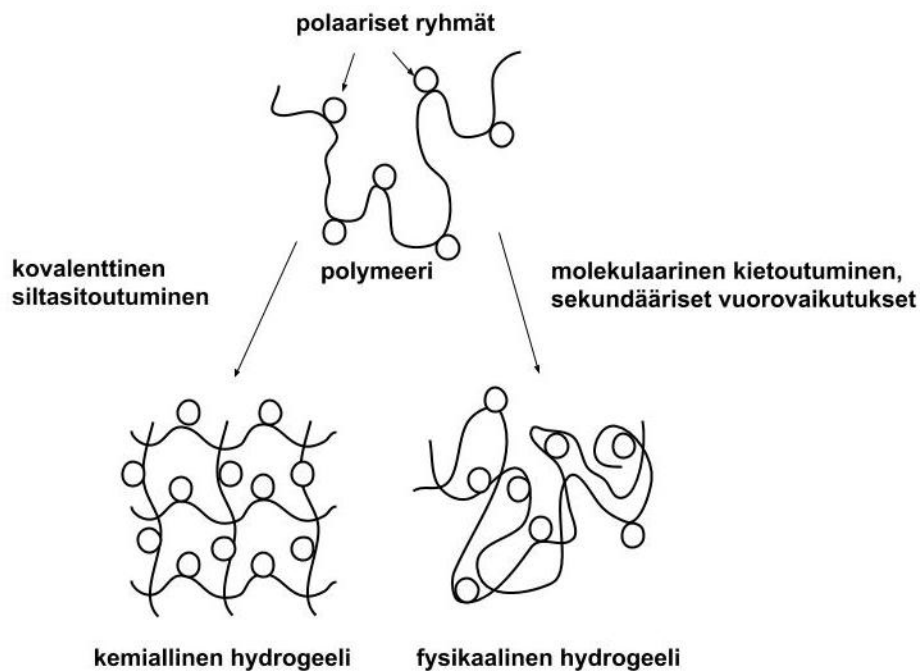
Hydrogeelit ovat soveltuvia malliyhdisteitä soluväliaineen (extracellular matrix) suuren vesipitoisuuden jäljittelyyn, sillä hydrogeelit pystyvät pitämään sisällään omaan kuivapainoonsa verrattuna moninkertaisia vesimääriä.⁴ Suuren vesipitoisuuden takia hydrogeelien mekaaniset ominaisuudet ovat hyvin samankaltaisia soluväliaineen ja pehmytkudoksen kanssa, minkä vuoksi ne ovat myös bioyhteensopivia.⁵ Lisäksi vesi mahdollistaa ravinteiden pääsyn geelin sisään ja solutuotteiden pääsyn ulos geelistä.⁴ Hydrogeeleillä on myös vesipitoisuuden jäljittelyn lisäksi muita ominaisuuksia, minkä vuoksi ne soveltuvat hyvin hermokudosteknologian sovelluksiin ja erityisesti hermosolujen kasvatukseen. Hydrogeelit tarjoavat hermosoluille 3D-tukirakenteen, joka ohjaa niiden kasvua. Hermosolut tarvitsevat fysikaalisia vihjeitä, kuten 3D-tukirankaa, järjestäytyneeseen sekä haluttua kudosta tai toimintaa vastaavaan solukasvuun.⁶ Lisäksi hydrogeelien alhainen rajapintajännitys mahdollistaa solujen liikkumisen kudoksen ja implantin välillä.⁷

Tässä kirjallisuuskatsauksessa käsitellään synteettisistä ja luonnossa esiintyvistä polymeereistä sekä grafeenista ja hiilinanoputkista koostuvia hydrogeelejä hermosolukasvatuksessa.

Tavoitteena on löytää kasvualustoja, jotka olisivat suotuisia hermosolujen kasvulle ja joita voitaisiin hyödyntää esimerkiksi vaurioituneen hermokudoksen korvaamisessa.

2 Siltasitoutuminen hydrogeeleissä

Hydrogeelit voidaan jakaa fysikaalisiin ja kemiallisiin hydrogeeleihin (kuva 1) niiden siltasitoutumisen mekanismin mukaan.^{4,8} Fysikaaliset hydrogeelit hajoavat ajan kuluessa, ja ne koostuvat polymeeriverkoista, jotka pysyvät koossa ei-kovalenttisilla vuorovaikutuksilla (physical cross-linking). Tärkein näistä rakenteen koossa pitävistä vuorovaikutuksista on molekulaarinen kietoutuminen (molecular entanglement), jonka lisäksi voi esiintyä sekundäärisiä vuorovaikutuksia, kuten vetysitoutumista tai ionisia ja hydrofobisia vuorovaikutuksia.⁴ Suurin osa peptidi- tai proteiinipohjaisista hydrogeeleistä muodostuu fysikaalisen siltasitoutumisen kautta.⁸ Kemialliset hydrogeelit ovat kemiallisesti stabiileja ja ne sisältävät kovalenttisia siltasidoksia (chemical cross-linking) polymeeriverkossaan.⁴



Kuva 1. Kaaviokuva kemiallisten ja fysikaalisten hydrogeelien muodostumisesta.

Fysikaaliset ja kemialliset hydrogeelit ovat rakenteeltaan epähomogeenisia. Fysikaalisissa hydrogeeleissä epähomogeenisuuden voivat aiheuttaa molekulaarisen kietoutumisen seurauksena muodostuneet klusterit ja hydrofobisesti tai ionisesti toisiinsa liittyneet domeenit, jotka ovat yhdisteen rakenteellisesti itsenäisiä osia. Kemiallisissa hydrogeeleissä voi olla alueita, joissa turpoaminen on alhaista vähäisen absorboituneen veden vuoksi. Tämän on arveltu aiheutuvan korkeasta silloitustiheydestä, joka voi johtaa silloittajien hydrofobiseen keräytymiseen aiheuttaen hydrogeelin rakenteen epähomogeenisuuden.⁴

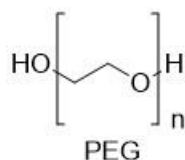
Siltasitoutuminen vaikuttaa polymeerien ja sitä kautta hydrogeelien ominaisuuksiin. Hydrogeelien elastisuus aiheutuu polymeerien välisistä siltasidoksista, joita on sopivassa suhteessa. Liiallinen siltasidosten määrä tekee hydrogeelistä jäykän elastisuuden vähetessä.⁹ Hydrogeelin mekaaniset ominaisuudet vaikuttavat sen rakenteen stabiilisuuteen,⁵ joten elastisuuden vähentyessä myös stabiilisuus heikkenee. Elastisuuteen vaikuttaa myös polymeerien liukenemattomuus liuottimeen – hydrogeelien tapauksessa veteen. Liukenemattomuus johtuu polymeerien välisistä vahvoista kovalenttisista sidoksista, minkä ansiosta polymeeriverkko voi absorboida liuotinta verkkorakenteiden väleihin. Ilman siltasitoutumista polymeeri saattaisi liueta liuottimeen, johon silloitettu polymeeri ei liukene.⁹ Lisäksi siltasidoksilla koossa pysyvä polymeeriverkko muodostaa hydrogeeliin huokoisen rakenteen, joka mahdollistaa ravinteiden ja hapen liikkumisen geelissä.¹⁰

Hydrogeelin hajoaminen voi tapahtua joko hydrolyyttisellä tai entsyymaattisella mekanismilla. Hydrolyyttinen hajoaminen tapahtuu kauttaaltaan hydrogeelissä, kun hydrolyyttisesti epästabiilit sidokset katkeavat. Entsyymaattinen hajoaminen paikallistuu entsyymien läheisyyteen. Solujen omat entsyymit hajottavat luontaiset hydrogeelit, ja synteettisiä hydrogeelejä on pyritty yhä enemmän suunnittelemaan niin, että solujen entsyymit kykenisivät hajottamaan ne.⁸ Hydrogeelit voivat hajota myös jonkin ulkoisen ärsykkeen seurauksena. Esimerkiksi valon vaikutuksesta hajoavassa hydrogeelissä polymeeriverkon silloitustiheys alenee sidosten katketessa.¹¹

3 Synteettiset hydrogeelit

3.1 Polyetyleeniglykolihydrogeelit

Synteettiset polyetyleeniglykoli- (kuva 2) eli PEG-hydrogeelit ovat potentiaalisia 3D-kasvualustoja hermokudosteknologian sovelluksissa. PEG:n gelaatio voi tapahtua myös kasvatettavien solujen läsnä ollessa siten, että geeliin muodostuu edelleen tasakoosteinen rakenne. PEG-hydrogeelien hajoamisnopeutta ja mekaanisia ominaisuuksia voidaan muokata ja kontrolloida tarpeen mukaan. PEG-hydrogeelit ovat bioyhteensopivia ja ihmisen puolustusjärjestelmä ei tunnista niitä, jolloin ne eivät aiheuta tulehdusreaktiota elimistössä.¹²



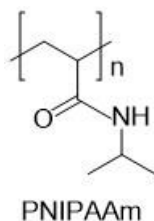
Kuva 2. Polyetyleeniglykolin rakennekaava.

PEG-polymeeriverkkojen hajoamisnopeuden ja huokoskoon on havaittu vaikuttavan hermosolujen kehittymiseen PEG-hydrogeelissä. Soluviljelyn ensimmäisen viikon aikana hermoesiastesolut ja niistä erilaistuneet hermosolut muodostivat hydrogeelissä mikrokudoksia,¹³ jotka koostuvat hermosoluista ja hermotukisoluista. Hydrogeelin hajotessa mikrokudokset alkavat liittyä toisiinsa muodostaen hermokudosta ja toimivia hermoratoja.¹⁴ Tutkimuksessa havaittiin, että soluviljelyn ensimmäisen viikon aikana PEG-polymeeriketjujen hajoaminen oli vielä alkuvaiheessa, minkä vuoksi geelin huokoskoko ei ollut riittävä hermosolujen aksonien muodostumiselle. Toisen viikon soluviljelyn jälkeen aksonit olivat kehittyneet ja levittäytyneet hydrogeeliin, minkä perusteella voitiin päteellä, että PEG-polymeeriverkkojen hajoamisen seurauksena geeliin oli vapautunut riittävästi tilaa hermosolujen kehittymiselle. Hermosolut jatkoivat kasvua ja kehittymistään kunnes hydrogeeli oli täysin hajonnut hydrolyysin seurauksena. Hermokudoksen kehittymistä voitiin säädellä muuntelemalla polymeeriverkon koostumusta siten, että sen hajoamisnopeus muuttui.¹³ PEG-polymeeriverkko ei merkittävästi hidastanut hermosolujen kehittymistä verrattuna vastaavanlaiseen 2D-kasvualustaan.

PEG-hydrogeelien ominaisuuksia hermosolukasvatuksen kannalta on pyritty parantamaan lisäämällä geeliin soluväliaineessa luonnollisesti esiintyviä molekyylejä, kuten tyyppin I kollageenia ja bFGF-2-kasvutekijää (basic fibroblast growth factor).¹⁵ Kasvutekijät stimuloivat solujen kasvua ja eloonjäämistä.¹⁶ Kollageenin ei havaittu heikentävän PEG-hydrogeelin mekaanista kestävyyttä, vaikka kollageenipohjaiset hydrogeelit ovat yleensä lujuudeltaan heikompia. Tämän arveltiin johtuvan siitä, että kollageeni ja hermosolut suspendoitiin yhdessä jo muodostuneeseen PEG-polymeeriverkkoon. Samasta syystä ainoastaan PEG-polymeeriverkko toimi solujen kasvuille tukirankana. Soluviljelykokeissa havaittiin, että pelkän kollageenin lisääminen PEG-hydrogeeliin ei parantanut selkeästi hermoesiastesolujen kasvua, vaan solujen lisääntyminen ja eloonjääminen oli parhainta PEG-hydrogeelissä, joka sisälsi sekä kollageenia että bFGF-2- kasvutekijää. Vaikutukset olivat erilaisia kuin kollageenin ja bFGF-2-kasvutekijän aiheuttamat erilliset vaikutukset, mikä voisi viitata yhtäaikaisen esiintymisen aiheuttamiin muutoksiin niiden kemiallisissa ominaisuuksissa.¹⁵

N-isopropyyliakryyliamidi- (NIPAAm) (kuva 3) ja etyleeniglykolimonomeerien (EG) yhteispolymeeristä (700:1) rakentuvaa hydrogeeliä on tutkittu potentiaalisena kasvualustana hermokudosteknologiassa. Lämpöherkällä NIPAAm-polymeerillä on lukuisia biolääketieteen kannalta hyödyllisiä ominaisuuksia: sen faasimuutos tapahtuu ympäristön ja kehon lämpötilan välissä, ja NIPAAm-polymeerin ja erilaisten monomeerien yhteispolymeerisaation seurauksena voidaan kehittää haluttuja ominaisuuksia omaavia materiaaleja.¹⁷ Valmistettu PNIPAAm-PEG-

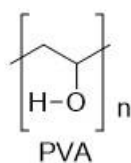
hydrogeeli ei ole biohajoava, mutta se lisää solujen tarttumista ja geelin bioyhteensopivuutta. Tässä tapauksessa geelin hajoaminen ajan kuluessa olisi haitallista, sillä hydrogeelin muodostama 3D-tukiranka tarjoaa mekaanista tukea hermokudoksen muodostumiselle. PNIPAAm-pohjaiset hydrogeelit muodostuvat *in situ* ilman ristisitoutumista, minkä vuoksi geelit voisivat muotoutua myös epäsäännöllisen muotoiseen hermovauriokohtaan.¹⁸



Kuva 3. Poly(N-isopropyyliakryyliamidin) rakennekaava.

3.2 Polyvinyylialkoholi hydrogeelit

Polyvinyylialkoholi (PVA) on suhteessa muihin polymeereihin vaivattomasti muokattava ja funktionalisoitava sekä myös hydrofiilinen ja bioyhteensopiva (kuva 4). Martens *et al.*¹⁹ ovat tutkineet, miten PVA:n määrän, hydrolyysin, pääketjun molekyylipainon ja funktionaalisten ryhmien tiheyden muuttaminen vaikuttaa PVA-hydrogeelin vetomekaanisiin ominaisuuksiin. Kaikki neljä tutkittua tekijää vaikuttivat PVA-hydrogeelin turpoamiseen, mutta PVA-polymeerin prosentuaalisella määrällä hydrogeelissä oli siihen suurin vaikutus. Kun PVA:n määrää kasvatettiin, hydrogeelistä tuli lujempi, mikä johtuu siitä, että PVA-ketjujen määrän kasvaessa polymeeriketjujen fysikaalisen kietoutumisen todennäköisyys kasvaa. Vähemmän hydrolysoituneen (83%) PVA-hydrogeelin havaittiin olevan hieman lujempi kuin 98% hydrolysoituneen geelin, sillä PVA-pääketjun hydrolyysi vaikuttaa ketjuissa ja ketjujen välillä oleviin vetysidoksiin. Muutokset ketjuvuorovaikutuksissa ennen polymerisaatiota vaikuttavat lopulliseen PVA-hydrogeelin verkkorakenteeseen. PVA-pääketjun molekyylipainon kasvattamisen seurauksena hydrogeelin viskositeetti kasvoi. PVA:n funktionaalisten ryhmien tiheyden kasvattaminen vähensi geelin turpoamista, minkä seurauksena geelin rakenne vahvistui.¹⁹



Kuva 4. Polyvinyylialkoholin rakennekaava.

PVA-hydrogeeli voi tukea mekaanisesti hermosolujen kasvua, mutta funktionalisoimattomana se ei kykene edistämään solujen selviytymistä ja kehittymistä. Funktionalisoimalla PVA-hydrogeeli gelatiinilla (Gel) ja serisiinillä (S) hermosolut pystyvät tarttumaan geeliin ja solujen elinkyky paranee.²⁰ Neuronien ja gliasolujen eli hermotukisolujen onkin havaittu kasvavan ja erilaistuvan tällaisessa hajoavassa PVA-pohjaisessa hydrogeelissä.²¹ Tutkimuksessa gliasolut edistivät hermosolujen kasvua. Kun gliasoluja kasvatettiin yhtäaikaaisesti hermosolujen kaltaisten PC12-solujen kanssa PVA-SGel-hydrogeelissä, soluilla oli hyvä elinkyky ja PC12-solut erilaistuivat toiminnallisiksi hermosoluiksi. Gliasolut tarjosivat PC12-soluille fysikaalista tukea, sillä niiden aksonien pituuskasvu tehostui huomattavasti ja neuronit järjestäytyivät hermoverkkorakenteiksi. Viereiset hermoverkot liittyivät toisiinsa ja muodostivat suuremman, kauttaaltaan PVA-SGel-hydrogeeliin levittäytyneen hermoverkoston. PVA-SGel-hydrogeelin hajoaminen ei estänyt hermoverkkojen muodostumista. Kun PC12-soluja kasvatettiin ilman gliasoluja, aksoneilla havaittiin ainoastaan tehostunutta kasvua, ei järjestäytymistä eikä hermoverkoston muodostumista.²¹

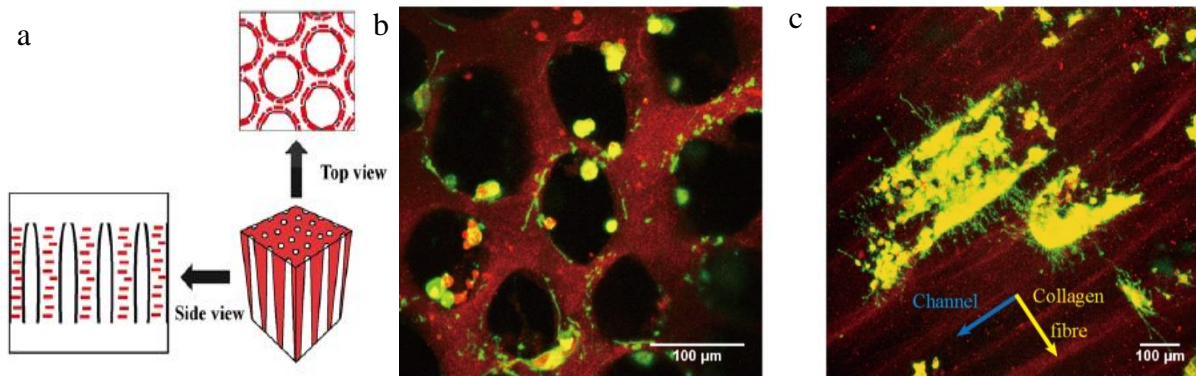
4 Luontaiset hydrogeelit

4.1 Kollageenihydrogeelit

Kollageeni on sidekudoksen ja soluväliaineen yleisin proteiini. Kaikki kollageenin tyypit koostuvat kolmesta polypeptidiketjusta muodostuvasta kolmoiskierteestä. Tässä alaluvussa käsiteltävät kollageenihydrogeelit koostuvat tyypin I kollageenista, joka on nisäkkäissä yleisimmin esiintyvä ja säikeitä muodostava kollageenin tyyppi.²² Kollageenihydrogeelien biohajoavuuden ja bioyhteensopivuuden vuoksi ne ovat sopivia materiaaleja luonnollisen hermosoluväliaineen jäljittelyyn.^{23,24} Jo vuonna 2000 kollageenihydrogeelien on havaittu tukevan hermoesiastesolujen kasvua kasvutekijän läsnä ollessa ja myös tukevan hermosolujen erilaistumista.²⁵

Koh *et al.*²³ ovat tutkineet hermosolujen kaltaisten PC12-solujen kasvua monikanavaisessa kollageenihydrogeelissä (MCCG). Kontrollina solukokeille käytettiin vastaavaa soluviljelmää normaalissa kollageenihydrogeelissä (COL). MCCG:ssa kollageenisäikeet ovat suuntautuneet kehämäisesti kanavarakenteiden ympärille (kuva 5a). Solujen havaittiin olevan kanava-alueilla ja aksonien kasvavan kanavia ympäröivässä kollageenimatriisissa. Solujen kasvussa kiinnitettiin erityisesti huomiota aksonien kaltaisten haarakkeiden kasvuun geeleissä. Tutkimuksessa havaittiin MCCG:n ohjaavan aksonien suuntautumista. MCCG:ssä aksonit

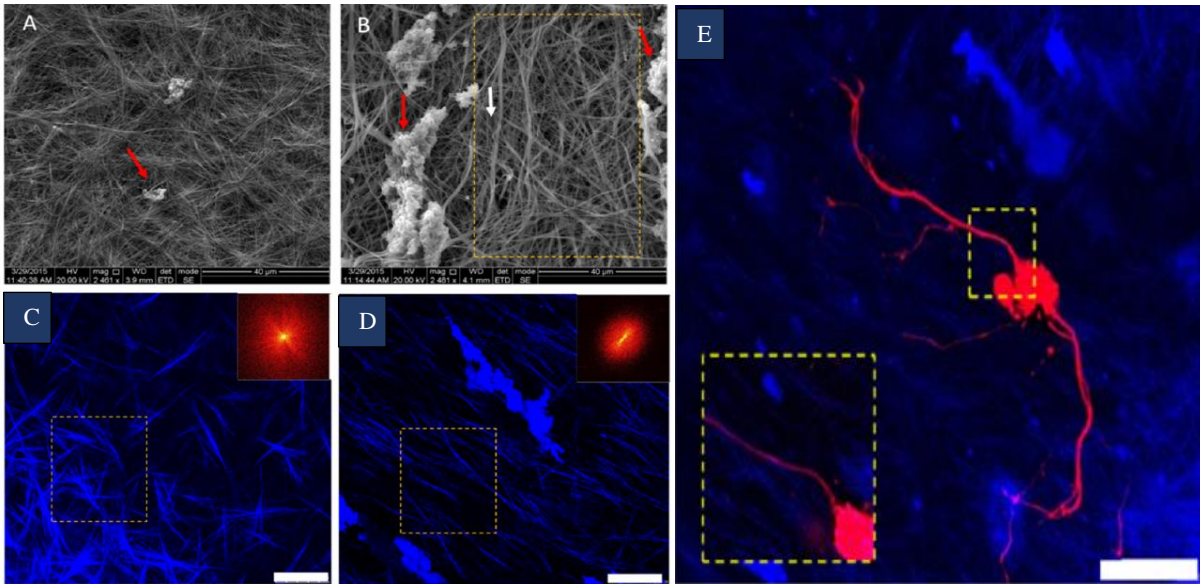
kasvoivat järjestäytyneemmin kuin COL:ssa. MCCG:n pinnan lähellä aksonit pidentyivät yhdensuuntaisesti ja pitkin kanavien pintaa (kuva 5b). Sivulta katsottuna aksonit levisivät kohtisuoraan kanavarakenteisiin nähden ja kollageenikuituja pitkin (kuva 5c).²³



Kuva 5. a) Kollageenisäikeiden (punainen) ja kanavien (valkoinen) sijoittuminen MCCG:ssa sivusta ja ylhäältä katsottuna. b) Aksonien (keltainen/vihreä) suuntautuminen lähellä MCCG:n kanavien pintaa ylhäältä katsottuna. c) Sivulta katsottuna aksonien levittäytymistä MCCG:ssa kollageenisäikeiden suuntaisesti (keltainen nuoli) ja kohtisuoraan kanaviin nähden (sininen nuoli).²³ <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Kun kollageenihydrogeeliin lisätään magneettisia partikkeleita (MP) ennen geeliytymistä, pystytään kollageenisäikeitä ja magneettisia partikkeleita suuntaamaan magneettikentän avulla.²⁴ Geelinmuodostuksen aikana partikkelit keräytyvät ketjuiksi, jotka suuntautuvat magneettikentän kenttäviivojen suuntaisesti (kuva 6b, d). Kollageenisäikeiden suuntautumisen on havaittu korreloivan MP-ketjujen suuntautumisen kanssa, kun gelaatio tapahtuu magneettikentän vaikutuksessa. Magneettiset nanopartikkelit (MNP) eivät ilman magneettikenttää kykene suuntaamaan kollageenisäikeitä yhdensuuntaisesti (kuva 6a).²⁴

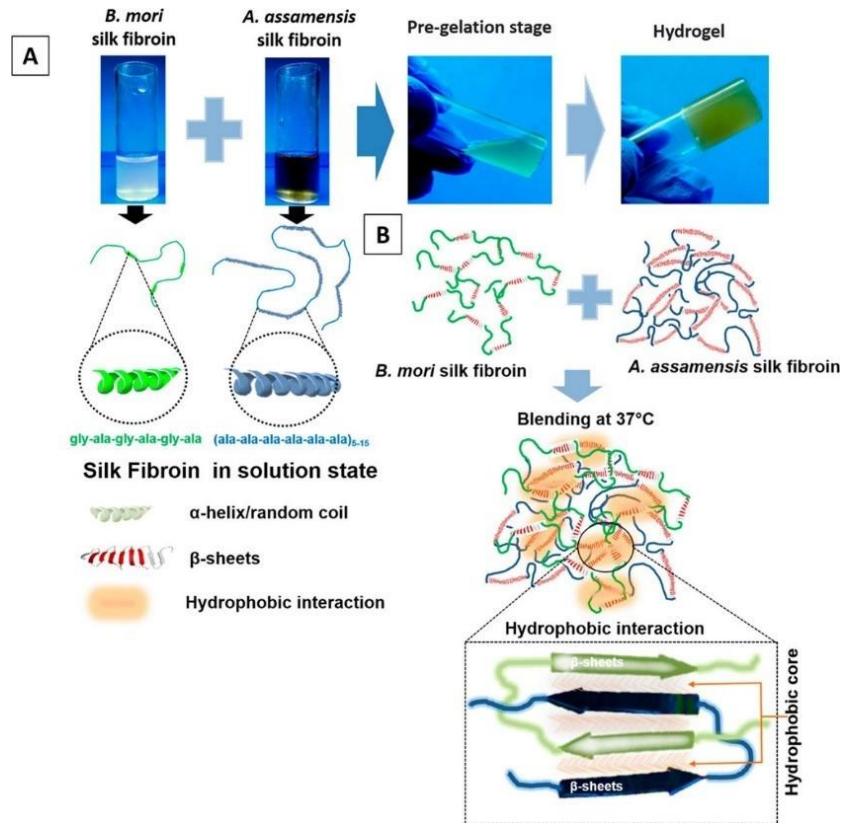
On esitetty, että säännönmukaisesti järjestäytyneet kollageenisäikeet voisivat vaikuttaa siihen, mihin suuntaan hermosolujen viejähaarakkeet kasvaisivat geelissä.²⁴ Neuronien kasvua tutkittiin järjestäytyneistä kollageenisäikeistä ja MP-ketjuista koostuvassa hydrogeelissä (kuva 6b, d). Kontrollina käytettiin muuten vastaavanlaista hydrogeeliä, mutta siinä kollageenisäikeet olivat sattumanvaraisesti suuntautuneita (kuva 6c). Solut laitettiin jo ennen geeliytymistä kollageenista ja MP:sta koostuvaan suspensioon, jotta solujen kasvu ja geeliytyminen tapahtuisivat samanaikaisesti. Neuroneiden havaittiin olevan pidempiä ja paremman suuntatarkkuuden omaavia, kun ne olivat kasvaneet järjestäytyneiden kollageenisäikeiden ja MP-ketjujen joukossa (kuva 6e). Neuroneista merkittävä osa oli suuntautunut magneettikentän suuntaisesti.²⁴ Tämän perusteella kollageenisäikeiden suuntautuminen vaikuttaa hermosolujen kasvuun, mutta MP-ketjujen suuntautuminen ei.



Kuva 6. a) Pyyhkäiselektronimikroskooppikuva (SEM) MNP:ta sisältävästä kollageenihydrogeelistä. b) SEM-kuva samasta geelistä, mutta magneettikentän vaikutuksessa. Valkoinen nuoli osoittaa kollageenisäikeiden osittaista suuntautumista ja punainen nuoli magneettisten partikkelien keräytymistä ketjuiksi. Kokoluokka = 40 μm . c) Konfokaalinen heijastusmikroskooppikuva (CRM) magneettikentän vaikutuksessa geeliytyneestä kollageenihydrogeelistä (vaaleansininen) ilman MNP:ta ja d) MNP:n läsnä ollessa. Kokoluokka = 75 μm . e) CRM-kuva magneettisesti suunnatussa, MNP:ta sisältävässä kollageenihydrogeelissä 7 päivän aikana kasvaneesta hermosolusta. Keltainen katkoviiva kuvaa aksonin ja kollageenisäikeiden yhdensuuntaisuutta. Kokoluokka 100 μm . Adapted with permission from ref. 24. Copyright 2016 American Chemical Society.

4.2 Silkkifibroinihydrogeelit

Silkki on luonnossa esiintyvä polymeeri, joka koostuu fibroini- ja serisiini proteiineista, Fibroini on silkin rakenteellinen proteiini, ja vesiliukoinen serisiini sitoo fibroinikuidut yhteen. Silkkifibroiniinipohjaiset hydrogeelit soveltuvat pitkäaikaiseen soluviljelyyn niiden kemiallisen stabiilisuuden ja optisen läpinäkyvyyden vuoksi.²⁶ Tässä alaluvussa käsiteltävät silkkihydrogeelit sisälsivät *Bombyx mori* -silkkitoukan silkkifibroiniä (kuva 7a).



Kuva 7. Kahden eri aminohappojärjestyksen omaavien silkkifibroiniinien rakenteet ja vuorovaikutukset gelaation aikana. a) Silkkihydrogeelin muodostuminen vaiheittain. b) Kaaviokuva gelaatiomekanismista. Adapted with permission from Bhunia, B. K. and Mandal, B. B., Exploring gelation and physicochemical behavior of in situ bioresponsive silk hydrogels for disc degeneration therapy, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2018**, 5, 870-886.

Copyright 2018 American Chemical Society.

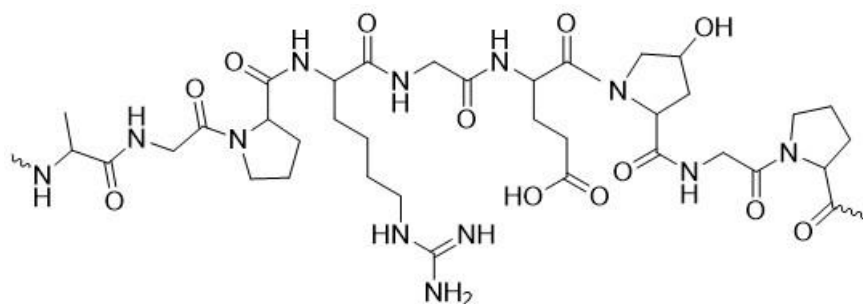
Silkkihydrogeelit muodostuvat fysikaalisen ristositoutumisen seurauksena. Ristositoutuminen tapahtuu β -levyjen muodostavien aminohappojen hydrofobisten kokonaisuuksien välillä (kuva 7b). Ympäristössä tapahtuvat muutokset, kuten pH:n aleneminen, lämpötilan kasvaminen, muutokset osmolariteetissa tai aiheutunut leikkausjännitys, aktivoivat ristositoutumisen.²⁷ Silkkihydrogeelien on havaittu hajoavan hitaasti verrattuna muihin hydrogeeleihin: hajoaminen voi kestää useista viikoista kuukausiin, kun taas fibriinihydrogeelin on havaittu hajoavan täysin kuudessa päivässä ja kollageenigeelistä oli jäljellä vain 17 % 12 päivän jälkeen. Hitaan hajoamisen vuoksi silkkipohjaiset hydrogeelit antaisivat hermovaurioille enemmän aikaa korjaantua *in vivo*.²⁶

Silkkihydrogeeleissä (pitoisuudet 1,2,4, ja 8%) linnun alkion dorsaalisen hermosolukertymän (cDRG) neuroiitit olivat kasvaneet enemmän ja tiheämmin kuin kollageenigeelissä. cDRG:tä käytetään yleisesti hermosolujen kasvamisen ja uusiutumisen mallina. Vaikka

silkkihydrogeelien elastisuus vastasi hermosolujen ja hermokudoksen elastisuutta, neuriittien kasvunopeudessa havaittiin merkittävä ero pitoisuuksiltaan erilaisten silkkihydrogeelien välillä. Tämän on arveltu johtuvan monien tekijöiden yhdistelmästä, kuten kasvualustan fysikaalisista ominaisuuksista ja solujen biologisista vasteista.²⁶

4.3 Gelatiinihydrogeelit

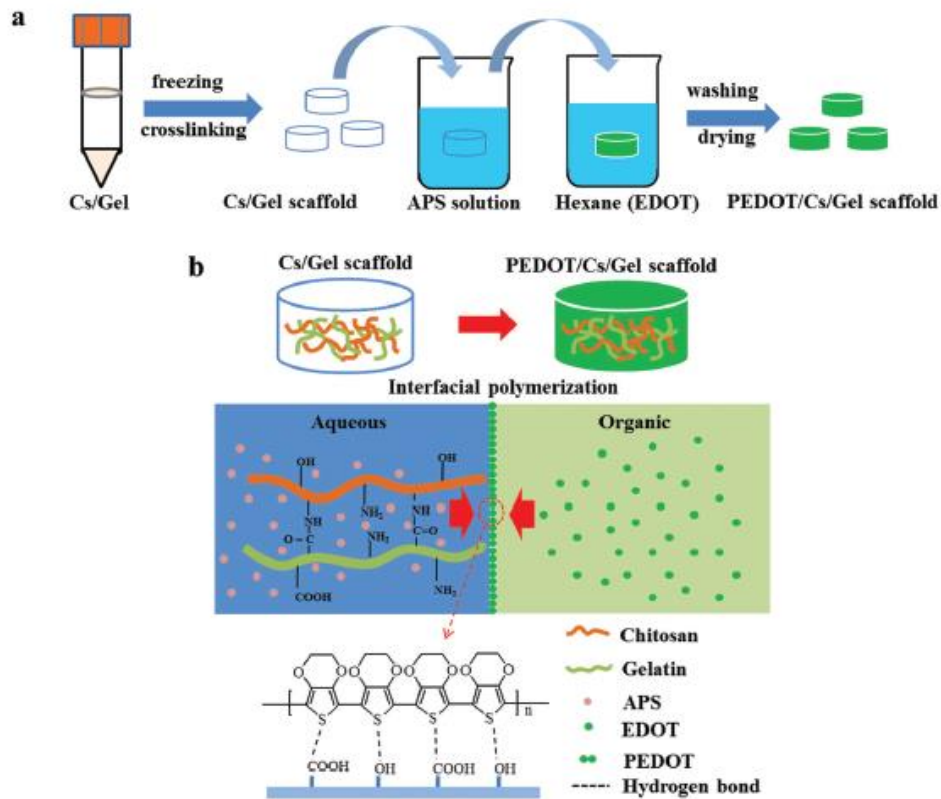
Gelatiinipohjaisen hydrogeelin sähkön- ja ionijohtavuutta on parannettu lisäämällä geeliin aniliinidimeeriä (AD), jonka johtavuus on kymmenkertainen verrattuna gelatiiniin (kuva 8). AD:lla on useita suotuisia vaikutuksia gelatiinihydrogeelin ominaisuuksiin: AD:n alhaisen molekyylipainon vuoksi se hajoaa, ja puhdistetaan munuaistoiminnan kautta. Lisäksi gelatiini-AD:n hajoamisnopeutta hydrogeelissä voidaan säädellä muuttamalla AD:n pitoisuutta. AD on hydrofobinen yhdiste ja estää näin veden diffuusion geeliin vettä hylkivien vuorovaikutusten seurauksena. Tutkimuksissa havaittiin, että PC12-solujen toiminta oli ihanteellista AD:ta sisältävässä gelatiinihydrogeelissä. Solujen tarttuminen ja neuriittien kasvu oli solujen toiminnan kannalta suotuisaa.²⁸



Kuva 8. Gelatiinin rakennekaava.

Toisaalta poly(3,4-etyleenidioksitiofeeni):n (PEDOT) sisällyttämisen kitosaanigelatiinihydrogeeliin (Cs/Gel) on myös havaittu parantavan geelin sähkönjohtavuutta.²⁹ PEDOT/Cs/Gel-tukiranka muodostui rajapintapolymeroinnin seurauksena: Cs/Gel-hydrogeelin polymeeriketjujen pinnoille lisättiin PEDOT-nanopartikkeleja (kuva 9). Jotta Cs/Gel-hydrogeelin soluille suotuisa huokoinen 3D-rakenne saatiin säilytettyä, EDOT:n polymerisointi tapahtui *in situ* Cs/Gel-hydrogeelissä. PEDOT:n havaittiin sähkönjohtavuuden lisäksi parantavan hydrogeelin stabiilisuutta: PEDOT tiivisti Cs/Gel-hydrogeelin rakennetta ja PEDOT:ia sisältävät Cs/Gel-hydrogeelit hajosivat entsyymaattisesti hitaammin kuin Cs/Gel-hydrogeelit. Lisäksi PEDOT vahvisti hydrogeelin

termodynaamisia ominaisuuksia eikä solujen lisääminen PEDOT/Cs/Gel-tukirankaan muuttanut sen sähkönjohtavuutta.²⁹



Kuva 9. a) PEDOT/Cs/Gel-tukirangan synteesireitti. b) Rajapintapolymeroinnin seurauksena muodostuneet PEDOT:n vetysidokset Cs/Gel-tukirangan pinnalla. Republished with permission of Royal Society of Chemistry from ref. 29; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Solukokeissa PEDOT:n havaittiin parantavan Cs/Gel-hydrogeelien bioyhteensopivuutta, hermosolujen ja neuriittien kasvua sekä hermosolujen kiinnittymistä geelin rakenteiden pinnoille.²⁹ PEDOT:n pääteltiin lisäävän Cs/Gel-hydrogeelien bioyhteensopivuutta sen hydrofiilisuuksi lisäävän vaikutuksen vuoksi, sillä hydrofiilinen kasvualustan pinta on suotuisa solujen kiinnittymiselle ja kasvulle. Vaikka PEDOT on hydrofobinen polymeeri, PEDOT/Cs/Gel-tukiranka oli hydrofiilisempi verrattuna Cs/Gel-tukirankaan. Tämän arveltiin johtuvan PEDOT:n lisäämästä hydrogeelin pinnan epätasaisuudesta, joka kasvattaa hydrofiilisuuksi. PEDOT:n havaittiin lisäävän solujen kiinnittymistä tukirangan pintaan, minkä arveltiin johtuvan PEDOT:n nanokokoluokan rakenteesta. Lisäksi tukirangan sähkönjohtavuus lisää solujen kiinnittymistä. Hermosolujen kasvaessa ne levittyivät hydrogeelin rakenteiden pinnoille, ja SEM-kuvista havaittiin pintojen olevan pääosin hermosolujen peitossa.

Hermosolujen elinkykyyn keskittyvissä kokeissa Cs/Gel-hydrogeelin hajoamistuotteiden ei havaittu olevan solumyrkyllisiä.²⁹

5 Grafeeni- ja hiilinanoputkipohjaiset hybridihydrogeelit

Grafeeni ja siitä koostuvat hiilinanoputket (CNT) lisäävät hermosolujen kiinnittymistä hydrogeeliin ja parantavat geelin johtavuusominaisuuksia, mikä on suotuisaa hermosolujen kehittymisen ja toimivien hermoverkkojen muodostumisen kannalta. Lisäksi hiilinanoputkien bioyhteensopivuutta lisää niiden sylinterimäinen muoto, joka muistuttaa hermosolujen aksoneiden rakennetta.³⁰

5.1 Synteettisiä polymeerejä sisältävät hybridihydrogeelit

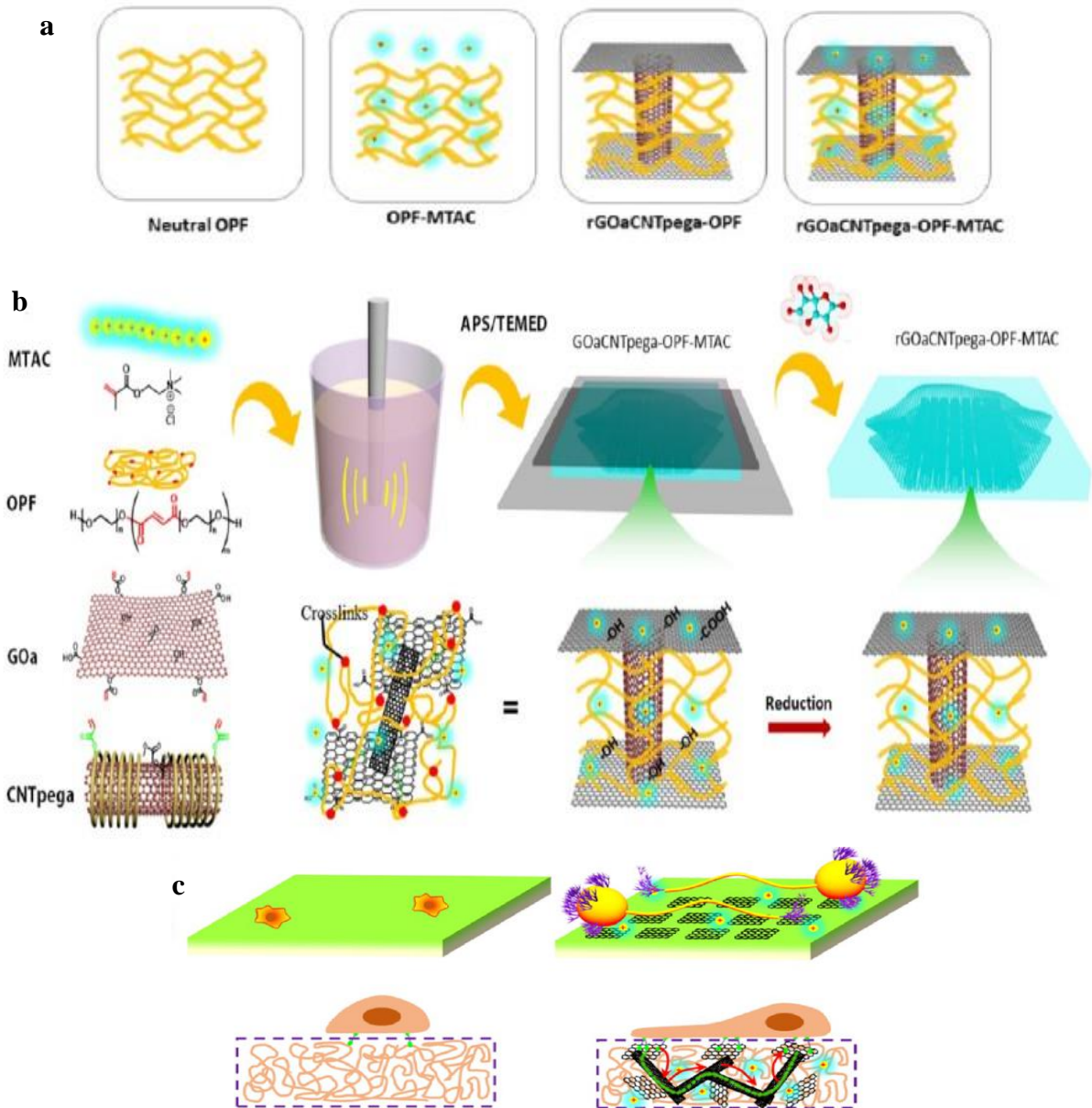
Grafeenin on havaittu parantavan huomattavasti polyakryyliamidi (AM)-hydrogeelien ominaisuuksia hermosolukasvatuksen kannalta. AM-hydrogeelien huokoskoko pystytään muuntelemaan säätämällä grafeenin pitoisuutta geelissä: kasvattamalla grafeenin pitoisuutta saadaan huokoskoko pienennettyä. Huokoskoko vaikuttaa geelin turpoamisasteeseen siten, että mitä pienempi huokoskoko, sitä alhaisempi geelin turpoamisaste on. Grafeenin on havaittu mahdollistavan hermosolujen kiinnittymisen ja aktiivisten synaptisten verkkojen muodostumisen AM-hydrogeeleissä, mikä ei ole yhtä tehokasta ilman grafeenia. Tehokkaamman solujen kiinnittymisen on arveltu aiheutuvan proteiinien eri adsorptioasteista eli miten tehokkaasti ne kiinnittyvät johonkin pintaan. Grafeeni tehostaa mahdollisesti proteiinien kiinnittymistä.³¹

Moniseinäisten hiilinanoputkien (MWCNT) ja polyuretaanin (PU) sisällyttämisen fibriinihydrogeeliin on havaittu lisäävän sen sähkönjohtavuutta ja lujuutta sekä hidastavan geelin hajoamisnopeutta. MWCNT:n lisääminen PU-säikeisiin kavensi niiden halkaisijaa, millä voi olla suotuisa vaikutus solujen tarttumiseen ja erilaistumiseen. Näiden ominaisuuksien ansiosta fibriini-PU-MWCNT-hydrogeeli muodosti kantasoluille kasvu ympäristön, joka edisti solujen tarttumista, elinkykyisyyttä ja kasvua, joka on suotuisa kasvu ympäristö myös hermosoluille. Kantasolut alkoivat kuitenkin muistuttaa muodoltaan sidekudossoluja, joten tällainen kasvu ympäristö voisi soveltua kasvualustaksi jo erilaistuneille hermosoluille.³²

Liu *et al.*³³ ovat tutkineet, miten grafeeni- ja hiilinanoputkikomponentteja sisältävä johtava ja positiivisesti varautunut kasvualusta vaikuttaa hermosolujen kasvuun. Johtavan ja positiivisesti varautuneen pinnan omaavan hydrogeelin havaittiin parantavan hermosolujen kiinnittymistä,

erilaistumista ja kasvua. Hermosolujen on aiemmin vahvistettu suosivan johtavia kasvualustoja, jotka voivat edistää solun sisällä ja solujen välillä tapahtuvaa sähköstimulaatiota. PC12-solujen kasvua tutkittiin oligo(polyetyleeniglykoli)fumaraatti (OPF) pohjaisissa hydrogeeleissä (kuva 10a). OPF-hydrogeelistä saatiin johtava lisäämällä siihen grafeenioksidiaakrylaattilevyjä (GOa sheets) ja poly(etyleeniglykoli)akrylaattia sisältäviä hiilinanoputkia (CNTpega). Positiivisesti varautunut hydrogeelin pinta saatiin lisäämällä 2-(metakryloyyloksi)etyylitrimetyyliammoniumkloridia (MTAC). Kontrollina kokeissa käytettiin OPF-hydrogeeliä, joka on varaukseton eikä johtavaa materiaalia.³³

Positiivisesti varautuneessa ja johtavassa rGOaCNTpega-OPF-MTAC-hydrogeelissä (kuva 10b) hermosoluja tarttui enemmän hydrogeelin pinnalle, ja ne levisivät laajemmalle alueelle kuin OPF-hydrogeeleissä vastaavat kasvatetut hermosolut. Hermosolujen aksonit olivat myös selvästi pidempiä rGOaCNTpega-OPF-MTAC-hydrogeelissä ja hydrogeelin johtavuuden havaittiin olevan lähellä luontaisen hermokudoksen johtavuutta. Havaintojen perusteella näyttää siltä, että GOa-levyt ja CNTpega yhdessä edistäisivät hermosolujen toimintaa ja kehittymistä. Tutkimuksen mukaan GOa-levyt ja CNTpega tekevät hydrogeelistä mekaanisesti kestävämmän ja estävät osittain polymeeriketjuja kiteytymästä, lisäten hydrogeelin rakenteen stabiilisuutta. Lisäksi GOa-levyt ja CNTpega-komponentit tekevät hydrogeelin pinnasta tiiviimmän ja positiivisesti varautuneen, mikä on suotuisaa hermosolujen kiinnittymisen ja levittäytymisen kannalta hydrogeelin pinnalla. Neutraalin OPF-hydrogeelin pinnalla hermosoluille on vähemmän suotuisia kiinnittymispaikkoja johtuen tukevien rakenteiden puutteesta ja PEG-ketjujen hylkivistä vuorovaikutuksista. Hermosolujen kasvun ero neutraalissa hydrogeelissä verrattuna johtavassa ja positiivisen pintavarauksen omaavassa hydrogeelissä on havainnollistettu kuvassa 10 c.³³



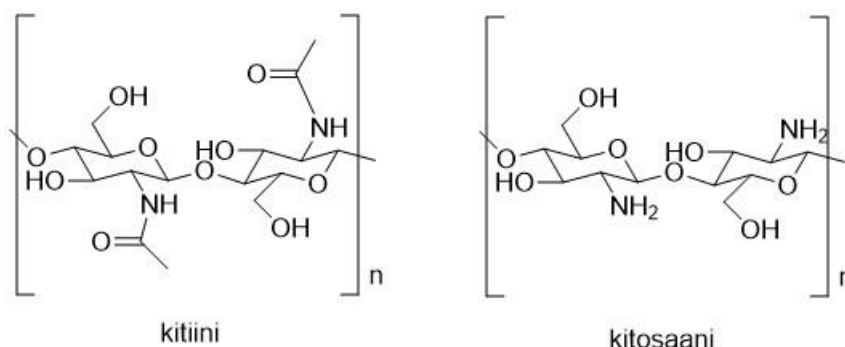
Kuva 10. a) Tutkimuksessa valmistettujen hydrogeelien rakenteet. b) rGOaCNTpega-OPF-MTAC-hydrogeelin valmistus vaiheittain. c) Kaaviokuva hermosolujen kasvusta hydrogeelin pinnalla (vasen) ja hiilinanoputkia sekä grafeenilevyjä sisältävän hydrogeelin pinnalla (oikea).

Adapted with permission from ref. 33. Copyright 2018 American Chemical Society.

5.2 Kitiiniä tai kitosaania sisältävät hybridihydrogeelit

Kitiini on polysakkaridi ja se koostuu N-asetyyli-D-glukosamiinimonomeereistä. Kitosaani on puolestaan kitiinin deasetyloitu muoto. Kitiini ja kitosaani (kuva 11) ovat kemialliselta rakenteeltaan hyvin samankaltaisia soluväliaineen tärkeiden komponenttien, glukosaminoglykaanien kanssa, mikä parantaa niiden biologista yhteensopivuutta. Lisäksi

kitiiniä on runsaasti saatavilla luonnossa, kuten esimerkiksi niveljalkaisten ulkoinen tukiranka ja äyriäisten kuoret sisältävät kitiiniä.³⁴



Kuva 11. Kitiinin ja kitosaanin rakennekaavat.

Kitiinipohjaisten hydrogeelien sopivuutta hermokudosteknologiaan on tutkittu kitiinin bioyhteensopivuuden ja lujuuden vuoksi. Kitiinihydrogeelissä hermosolut muodostavat klustereita, koska hermosolujen välinen affiniteetti on suurempi verrattuna solujen ja geelin pinnan väliseen affiniteettiin. Tämän vuoksi hermosolujen kiinnittyminen geelin pintaan on vähäistä, mikä edelleen vähentää aksonien kasvua, sillä vuorovaikutukset kasvualustan ja solun välillä ovat tärkeitä sen kasvun ja kehittymisen kannalta.³⁵ Kitiinipohjaiset hybridihydrogeelit, jotka sisältävät muunneltuja hiilinanoputkia (Ch/CNTs), omaavat hermosolukasvatuksen kannalta parempia ominaisuuksia verrattuna kitiinihydrogeeleihin.³⁶ Näissä hybridihydrogeeleissä kitiini esiintyy molekyylimuunneltuina, jotka vuorovaikuttavat hiilinanoputkien kanssa pitäen geelin rakenteen koossa. Tärkeimpiä Ch/CNT-hydrogeelin koossa pitävistä vuorovaikutuksista ovat elektrostaattiset vuorovaikutukset ja vetysitoutuminen. Sekä kitiini että hiilinanoputket sisältävät hydrofiilisiä ja hydrofobisia rakenneyksiköitä, joten myös amfiifiiliset vuorovaikutukset ovat keskeisiä geelin rakenteen kannalta. Tutkimuksissa havaittiin Ch/CNT-geelien olevan vahvempia kuin kitiinigeelit ja niiden biologinen hajoaminen oli hitaampaa verrattuna kitiinigeeliin. Erot johtuvat kitiinin ja hiilinanoputkien välisistä vuorovaikutuksista. Myös fysikaalisia ristisidoksia on enemmän ja tiheämmin kitiinimolekyylien välillä.³⁶

Kitiinihydrogeelien hajoamistuotteiden, glukoosiamiinin ja N-asetyyliglukoosiamiinin, ei ole havaittu olevan soluille haitallisia. Biologisen hajoamisen seurauksena muodostuvat liuenneet CNT:t poistuvat virtsan mukana elimistöstä. Soluviljelykokeissa PC12-solujen elinkyvyn todettiin kasvavan, kun soluviljelyn kesto ja CNT:n pitoisuutta nostettiin. Tämän perusteella oletettiin Ch/CNT-geelien olevan biohajoavia ja soluille myrkyttömiä. Ch/CNT:ien havaittiin lisäävän hermosolujen kiinnittymistä hydrogeeliin ja edistävän hermosolujen neuriittien

kasvua. Vastaavaa ei havaittu kitiinigeeleissä. Ch/CNT-geelit, joissa CNT-pitoisuus oli suurempi (3 ja 5 wt-% verrattuna 1 wt-%) hermosolut muodostivat laajoja hermoverkkoja aksonien ympärille.³⁶

Valokemiallisen ristisitoutumisen seurauksena muodostuvan kitosaanipohjaisen hydrogeelin on havaittu tukevan neuriittien kolmiulotteista kasvua ja neuronien erilaistumista.³⁷ Valokemiallisessa ristisitoutumisessa kovalenttisten siltasidosten muodostuminen aktivoituu valon vaikutuksesta. Kitosaanilla on positiivinen pintavaraus fysikaalisissa olosuhteissa, mikä edistää neuronien kiinnittymistä. Lisäksi se hajoo vain entsyymien vaikutuksesta ja on soluille myrkytön.³⁸ Tutkimuksessa käytetty kitosaani funktionalisoitiin 2-aminoetyylimetakrylaatilla ennen gelaatiota, ja sen gelaatio tapahtuu *in situ*. Tällainen hydrogeeli on fysikaalisilta ominaisuuksiltaan ja gelaatioon kuluvalta ajaltaan muunneltavampi kuin kitosaanihydrogeeli. Solukokeissa kontrollina kitosaanihydrogeelille käytettiin mekaanisilta ominaisuuksiltaan vastaavaa agarosihydrogeeliä. Hermosolujen havaittiin muodostavan 5-10 solun ryhmittymiä kitosaanigeelissä, mutta vastaavaa ei havaittu agarosigeelissä. Lisäksi kitosaanihydrogeelissä hermosolukimpuilla havaittiin neuriitteja määrällisesti enemmän ja ne olivat pidempiä.³⁷ Agarosipohjaisiin hydrogeeleihin on aikaisemmin lisätty kitosania edistämään solujen kiinnittymistä geeliin, sillä solut tarttuvat huonosti agarosimolekyylien pinnalle.³⁸

Yhteenveto

Hermosolujen kasvua on tutkittu niin synteettisissä kuin luontaisissakin hydrogeeleissä. Synteettiset hydrogeelit ovat usein muunneltavampia luontaisiin hydrogeeleihin verrattuna, kun taas luontaiset hydrogeelit ovat yleensä mekaaniselta kestävyydeltään heikompia. Sekä synteettiset että luontaiset hydrogeelit ovat usein huonosti sähköä johtavia, mutta niiden sähkönjohtavuutta voidaan parantaa lisäämällä niihin hiilinanoputkista tai grafeenista koostuvia komponentteja. Tutkimusten perusteella myös AD- ja PEDOT-yhdisteiden lisääminen parantaa luontaisten hydrogeelien sähkönjohtavuutta. Hermosolujen on havaittu kasvavan enemmän ja levittäytyvän laajemmin paremman sähkönjohtavuuden omaavissa hydrogeeleissä.

Hydrogeelien ominaisuuksia voidaan muunnella hermosolujen kasvatuksen kannalta suotuisiksi. Hydrogeelit ovat vaikeita käsitellä ja rakenteeltaan heikkoja niiden suuren vesipitoisuuden vuoksi. Vesipitoisuutta voidaan muunnella kasvattamalla polymeerien määrää ja pienentämällä siten geelin huokoskokoa, jolloin vesimäärä vähenee ja geelistä tulee kestävämpi. Polymeerien määrä ei saa olla kuitenkaan liian suuri, jolloin hermosoluille ei jäisi tarpeeksi tilaa kasvaa. Hydrogeelien hajoamisnopeuden täytyy soveltua hermosolujen

kehittymiseen kuluvaan aikaan, sillä hydrogeelit antavat fysikaalisia ja biokemiallisia vihjeitä hermosoluille. Nämä vihjeet määrittävät sen, miten hermosolut kehittyvät. Hydrogeelin hajoaminen ei ole välttämätön ominaisuus soluviljelyn kannalta, mutta toivottava ominaisuus kudosisplanteissa, kuten hermokudossiirteissä.

Tutkimusten perusteella suotuisimpia hydrogeelejä hermosolujen kasvatukseen ovat hybridihydrogeelit. Hiilinanoputkia, grafeenikomponentteja sekä synteettisiä tai luontaisia polymeerejä sisältävät hybridihydrogeelit pärjäsivät parhaiten hermosolukasvatuskokeissa. Positiiviset ja hyvän sähkönjohtokyvyn omaavat komponentit kuten grafeenikomponentit sekä AD- ja PEDOT-yhdisteet tehostavat solujen kiinnittymistä hydrogeelin rakenteisiin. Tällainen fysikaalinen vihje ohjaa ja tehostaa hermosolujen kasvua.

Hydrogeelit kehitettiin korvaamaan perinteiset soluviljelyalustat, jotta kasvatusolosuhteet vastaisivat enemmän solujen luonnollista kasvuympäristöä. Hydrogeeleillä on myös sovelluksia esimerkiksi kudosteknologiassa ja biolääketieteessä, missä niitä käytetään muun muassa kudosisplanteina ja lääkeaineiden kontrolloidussa kuljetuksessa. Hydrogeeleistä ollaan kehittämässä ratkaisua hitaasti parantuvien hermovaurioiden korjaamiseen ja uuden hermokudoksen muodostamiseen.

Lähdeluettelo

1. Lan, Y.; Corradini, M. G.; Weiss, R. G.; Raghavan, S. R. ja Rogers, M. A., To gel or not to gel, correlating molecular gelation with solvent parameters, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 6035-6058.
2. Ahmed, E. M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.*, **2015**, *6*, 105-121.
3. Burdick, J. A. ja Murphy, W. L., Moving from static to dynamic complexity in hydrogel design, *Nat. Commun.*, **2012**, *3*: 1296.
4. Hoffman, A. S., Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2012**, *64*, 18-23.
5. Verhulsel, M.; Vignes, M.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Vignjevic, D., M. ja Viovy, J., A review of microfabrication and hydrogel engineering for micro-organs on chips, *Biomaterials*, **2014**, *35*, 1816-1832.
6. Yu, L. M. Y.; Leipzig, N. D. ja Shoichet, M. S., Promoting neuron adhesion and growth, *Mater. Today*, **2008**, *11*, 36-43.
7. Ratner, B. D. ja Hoffman, A. S., Synthetic hydrogels for biomedical applications. Kirjassa: Andrade, J. D. (toim.), *Hydrogels for medical and related applications*, ACS, Washington, 1976, ss. 1-36.
8. Caliarì, S. R. ja Burdick, J. A., A practical guide to hydrogels for cell culture, *Nat. Methods*, **2016**, *13*, 405-414.
9. Maitra, J. ja Shukla, V. K., Cross-linking in hydrogels - A review, *Am. J. Polym. Sci.*, **2014**, *4*, 25-31.
10. Annabi, N.; Nichol, J. W.; Zhong, X.; Ji, C.; Koshy, S.; Khademhosseini, A. ja Dehghani, F., Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering, *Tissue Eng., Part B*, **2010**, *16*, 371-383.
11. Kloxin, A. M.; Kasko, A. M.; Salinas, C. N. ja Anseth, K. S., Photodegradable hydrogels for dynamic tuning of physical and chemical properties, *Science*, **2009**, *324*, 59-63.
12. Sawhney, A. S.; Pathak, C. P. ja Hubbell, J. A., Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(a-hydroxy acid) diacrylate macromers, *Macromolecules*, **1993**, *26*, 581-587.
13. Mahoney, M. J. ja Anseth, K. S., Three-dimensional growth and function of neural tissue in degradable polyethylene glycol hydrogels, *Biomaterials*, **2006**, *27*, 2265-2274.
14. Dai, W.; Belt, J. ja Saltzman, W. M., Cell-binding peptides conjugated to poly(ethylene glycol) promote neural cell aggregation, *Nat. Biotechnol.*, **1994**, *12*, 797-801.

15. Mahoney, M. J. ja Anseth, K. S., Contrasting effects of collagen and bFGF-2 on neural cell function in degradable synthetic PEG hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **2007**, *81*, 269-278.
16. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K. ja Walter, K., *Molecular Biology of the Cell*, 6. painos, Garland Science, Yhdysvallat, 2015, ss. 1017-1018.
17. Yoshioka, H.; Mori, Y.; Tsukikawa, S. ja Kubota, S., Thermoreversible gelation on cooling and on heating of an aqueous gelatin-poly(N-isopropylacrylamide)conjugate, *Polym. adv. Technol.*, **1998**, *9*, 155-158.
18. Comolli, N.; Neuhuber, B.; Fischer, I. ja Lowman, A., In vitro analysis of PNIPAAm-PEG, a novel, injectable scaffold for spinal cord repair, *Acta Biomater.*, **2009**, *5*, 1046-1055.
19. Martens, P.; Blundo, J.; Nilasaroya, A. O., R. A.; Cooper-White, J. ja Poole-Warren, L. A., Effect of poly(vinyl alcohol) macromer chemistry and chain interactions on hydrogel mechanical properties, *Chem. Mater.*, **2007**, *19*, 2641-2648.
20. Zhu, J. ja Marchant, R. E., Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds, *Expert Rev. Med. Devices*, **2011**, *8*, 607-626.
21. Aregueta-Robles, U. A.; Martens, P. J.; Poole-Warren, L. A. ja Green, R. A., Tissue engineered hydrogels supporting 3D neural networks, *Acta biomater.*, **2018**, *95*, 269-284.
22. Gelse, K.; Pöschl, E. ja Aigner, T., Collagens – structure, function, and biosynthesis, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2003**, *55*, 1531-1546.
23. Koh, I.; Furusawa, K. ja Haga, H., Anisotropic multi-channel collagen gel (MCCG) guides the growth direction of the neurite-like processes of PC12 cells, *Sci. Rep.*, **2018**, *8*: 13901.
24. Antman-Passig, M. ja Shefi, O., Remote magnetic orientation of 3D collagen hydrogels for directed neuronal regeneration, *Nano Lett.*, **2016**, *16*, 2567-2573.
25. O'Connor, S. M.; Stenger, D. A.; Shaffer, K. M.; Maric, D.; Barker, J. L. ja Ma, W., Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic ca^{2+} response in three-dimensional collagen gel, *J. Neurosci. Methods*, **2000**, *102*, 187-195.
26. Hopkins, A. M; De Laporte, L.; Tortelli, F.; Spedden, E.; Staii, C.; Atherton, T. J.; Hubbell, J. A. ja Kaplan, D. L., Silk hydrogels as soft substrates for neural tissue engineering, *Adv. Funct. Mater.*, **2013**, *23*, 5140-5149.
27. Kim, U.; Park, J.; Li, C.; Jin, H.; Valluzzi, R. ja Kaplan, D. L., Structure and properties of silk hydrogels, *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 786-792.
28. Zarrintaj, P.; Urbanska, A. M.; Gholizadeh, S. S.; Goodarzi, V.; Saeb, M. R. ja Mozafari, M., A facile route to the synthesis of anilinic electroactive colloidal hydrogels for neural tissue engineering applications, *J. Colloid Interface Sci.*, **2018**, *516*, 57-66.
29. Wang, S.; Sun, C.; Guan, S.; Li, W.; Xu, J.; Ge, D.; Zhuang, M.; Liu, T. ja Ma, X., Chitosan/gelatin porous scaffolds assembled with conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanoparticles for neural tissue engineering, *J. Mater. Chem. B*, **2017**, *5*, 4774-4788.

30. Fabbro, A.; Prato, M. ja Ballerini, L., Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2013**, *65*, 2034-2044.
31. Martín, C.; Merino, S.; González-Domínguez, J. M.; Rauti, R.; Ballerini, L.; Prato, M. ja Vázquez, E., Graphene improves the biocompatibility of polyacrylamide hydrogels: 3D polymeric scaffolds for neuronal growth, *Sci. Rep.*, **2017**, *7*: 10942.
32. Hasanzadeh, E.; Ebrahimi-Barough, S.; Mirzaei, E.; Azami, M.; Tavangar, S. M.; Mahmoodi, N.; Basiri, A. ja Ai, J., Preparation of fibrin gel scaffolds containing MWCNT/PU nanofibers for neural tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **2018**, *107*, 802-814.
33. Liu, X.; Miller, A. L.; Waletzki, B. E. ja Lu, L., Functionalized carbon nanotube and graphene oxide embedded electrically conductive hydrogel synergistically stimulates nerve cell differentiation, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **2018**, *106*, 1247-1257.
34. Crini, G. ja Badot, P., Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature, *Prog. Polym. Sci.*, **2008**, *33*, 399-447.
35. Freier, T.; Montenegro, R.; Shan Koh, H. ja Shoichet, M. S., Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system, *Biomaterials*, **2005**, *26*, 4624-4632.
36. Wu, S.; Duan, B.; Lu, A.; Wang, Y.; Ye, Q. ja Zhang, L., Biocompatible chitin/carbon nanotubes composite hydrogels as neuronal growth substrates, *Carbohydr. Polym.*, **2017**, *174*, 830-840.
37. Valmikinathan, C. M.; Mukhatyar, V. J.; Jain, A.; Karumbaiah, L.; Dasari, M. ja Bellamkonda, R. V., Photocrosslinkable chitosan based hydrogels for neural tissue engineering, *Soft Matter*, **2012**, *8*, 1964-1976.
38. Cao, Z.; Gilbert, R. J. ja He, W., Simple Agarose-Chitosan gel composite system for enhanced neuronal growth in three dimensions, *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 2954-2959.