

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Gabriela Korbelová

Koaxiální a emulzní nanovlákná pro biomedicínské použití

Coaxial and emulsion nanofibers for biomedical use

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Matěj Buzgo

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 20.8.2014

Poděkování:

Děkuji mému školiteli Mgr. Matěji Buzgovi za trpělivost při vedení mé bakalářské práce a četné konzultace a rady při jejím zhotovování.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým, kteří mě při práci podporovali a Mgr. Andreji Míčkové, která mi byla oporou hlavně v začátcích při seznámení s tématem.

ABSTRAKT

Současná léčba poranění tkání se potýká s četnými problémy, jako jsou omezená regenerační kapacita a imunitní reakce těla na cizorodá tělesa. V mnohých případech tak neumožňuje plnohodnotnou regeneraci tkání a plné obnovení jejich původní funkce. Řízené dodávání růstových faktorů má značnou signifikanci pro navození hojení ran u širokého spektra defektů. Biokompatibilní a biodegradabilní nanovláknenné nosiče připravené metodou elektrostatického zvlákňování představují univerzální platformu pro dodání široké škály látek regulovaným způsobem. Cílem práce je vytvořit přehled a zhodnocení vlastností nanovláknenných systémů pro řízené uvolňování léčiv vytvořených elektrostatickým zvlákňováním. Práce se zaměřuje zejména na využití růstových faktorů jako aktivních látek navozujících hojení tkáně. Nanovláknenné nosiče nabízí řadu výhod, jsou schopné trvale dodávat bioaktivní látku do místa tkáňového defektu, zachovávat bioaktivitu uvolňované látky a tím stimulovat adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk na svém povrchu. Oproti klasickým metodám tkáňového inženýrství využívajících tkáňové štěpy s rizikem jejich imunitního odmítnutí nabízí tyto funkcionalizované biodegradabilní nosiče možnost tvorby tzv. bezbuněčných nosičových systémů bez nutnosti izolace hostitelských buněk, kdy je daná tkáň regenerována *in vivo* a tím lze minimalizovat imunitní odpověď. Práce je členěna do 4 kapitol pojednávajících o metodách přípravy nanovláknenných nosičů, regulaci jejich farmakokinetického uvolňovacího profilu a aplikaci nanovláken se zaměřením zejména na osteochondrální tkáňové inženýrství.

KLÍČOVÁ SLOVA: nanovláknenné nosiče, koaxiální zvlákňování, emulzní zvlákňování řízené uvolňování léků, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

The current treatment of tissue injuries deal with numerous problems, such as limited healing capacity and immune response of the body. In many cases such obstacles does not allow a full regeneration of the injured tissues and the full resumption of its original features. Controlled delivery of growth factors has considerable importance for inducing wound healing for a wide range of defects. Biocompatible and biodegradable nanofibrous carriers prepared by electrospinning represent a universal platform for the delivery of a wide range of substances in regulated manner. The goal of this thesis is to create an overview and assessment of the nanofibrous systems for controlled drug release created by electrospinning with a focus on growth factors delivery. Nanofiber carrier offers a number of advantages, they are able to consistently deliver bioactive substance into the site of injury, maintain bioactivity of the substance and stimulate the adhesion, proliferation and differentiation of target cells. Compared to the classic methods of tissue engineering using tissue grafts with the risk of their immune rejection these funkcionalized biodegradable carriers offers the possibility to create cell-free carrier systems. The work is divided into 4 chapters concerning the methods of preparation of nanofibrous media, the regulation of their pharmacokinetic release profile and tissue engineering applications of nanofibers.

KEY WORDS: nanofiber scaffold, coaxial electrospinning, emulsion electrospinning, drug delivery, tissue engineering

SEZNAM ZKRATEK

bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenic protein
BSA	hovězí sérový albumin
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermal growth factor
GDF5	growth and differentiation factor 5
HAp	hydroxyapatit
HRP	křenuv peroxidza
IGF-I	insulin-like growth factor
IL	interleukin
MCSF	macrophage colony-stimulating factor
MSC	mezenchymln kmenové buky
NGF	nerve growth factor
PC12	my feochromocytomrn buky
PCL	polykaprolakton (polycaprolakton)
PCL/PEO	polykaprolakton-co-polyethylenoxid
PCL/PVA	polykaprolakton-co-polyvinylalkohol
PDGF	platelet-derived growth factor
PEG	polyethylenglykol
PEG/PCL	polyethylenglykol-co-kaprolakton
PEI	polyethylenimin
PEO/PLA	polyethylenoxid-co-polylaktid
PHEMA	poly(2-hydroxyethyl)methakrylt
PLA	polylaktid, polymln kyselina (polylactic acid)
PLA/PEG	polylaktid-co- polyethylenglykol
PLCL	polylaktid-co-kaprolakton (polylactic acid-co-polycaprolakton)
PLGA	polylaktid-co-glykolová kyselina (polylactic-co-glycolic acid)
PVA	polyvinyl alcohol
SDF 1	stromal derived factor 1
TGF- β	transforming growth factor β
TNF α	tumor necrosis factor α
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	hladkosvalov buňky

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ	2
2.1 Charakteristika nanovláken	2
2.2 Postup výroby	3
2.2.1 Jehlové zvlákňování	3
2.2.2 Hladinové (bezjehlové) zvlákňování	4
2.2.3 Kolektory	5
2.3 Parametry	5
3. NANOVLÁKNA JAKO NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK	7
3.1 Adsorbce na povrch nanovláken	9
3.1 Směsné elektrostatické zvlákňování	10
3.2 Emulzní elektrostatické zvlákňování	11
3.3 Koaxiální elektrostatické zvlákňování	14
4. APLIKACE NANOVLÁKEN S RŮSTOVÝMI FAKTORY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ	18
4.1 Kostní tkáňové inženýrství	18
3.4 Chondrální regenerace	22
4.3 Využití v dalších oblastech tkáňového inženýrství	25
5. VÝZVY V ŘÍZENÉM DODÁVÁNÍ LÁTEK PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	28
6. ZÁVĚR	31
7. REFERENCE	32

1. ÚVOD

Nanovlákná se díky svým unikátním vlastnostem a rozměrům stala předmětem zájmu mnoha oborů. Ve své práci se zaměřuji na jejich biomedicínské využití, zejména jakožto nosiče pro řízené uvolňování léčiv. Díky metodě elektrostatického zvlákňování je možné projektovat polymerní mikro- a nano-sítě o veliké porozitě podobné přirozené extracelulární matrix (ECM) s různou morfologií a velikostí vláken. Tyto vlastnosti předurčují použití nanovláken jako nosičů pro tkáňové inženýrství. Kromě tvorby samotného nosiče lze metodou elektrostatického zvlákňování do jeho struktury zainkorporovat bioaktivní látky. Z takto vytvořeného nosiče implantovaného do určité tkáně se poté mohou inkorporované látky místně uvolňovat, čímž je výrazně zvýšena efektivita jejich působení. Látky mohou napomáhat při hojení či výstavbě tkáně nové.

Cílem práce je popsat způsob výroby a vlastnosti nanovláknenných nosičů se zaměřením na použití v tkáňovém inženýrství jako systémů pro doručování růstových faktorů.

Práce je členěna na 4 kapitoly. V první kapitole se zabývám představením metody elektrostatického zvlákňování. Jsou zde představeny základní vlastnosti a parametry řídící tvorbu nanovláknenných nosičů. Druhá kapitola pojednává o mechanismech řízeného uvolňování látek z nanovláknenného nosiče. Jedná se o přehled přístupů využívajících nanovlákná pro dodávání látek v tkáňovém inženýrství. Kapitola třetí se věnuje biologickým aplikacím těchto nosičů v tkáňovém inženýrství. Je zde kladen důraz zejména na aplikace v osteochondrálním tkáňovém inženýrství. Dále je zde pojednáno i o využití nosičů v tkáňovém inženýrství srdce, cév a nervové tkáně. V poslední kapitole jsou diskutovány současné znalosti a předeštěny perspektivy dalšího rozvoje.

2. ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ

Metoda elektrostatického zvlákňování nabízí možnost přípravy jemných vláken z různých materiálů, jako jsou syntetické a přírodní polymery, polymerní slitiny, jakož i kovy a keramické materiály.[1] Jedná se o zatím nejefektivnější metodu přípravy nanovláken. Úspěšně se podařilo zvláknit různé typy polymerů, většinou v roztocích rozpouštědla a některé ve formě taveniny.[2] Připravovat lze nejen jednotlivá vlákna, ale především uspořádané struktury mnoha vláken, což umožňuje kontrolu nad hromadnými mechanickými vlastnostmi a biologickou reakcí na daný nosič.[2] Při výrobním procesu lze nastavením parametrů ovládat průměr, morfologii, složení, sekundární strukturu i prostorové vyrovnání nanovláken.[1]

2.1 Charakteristika nanovláken

Nanovláken se stala centrem pozornosti vědců především díky svým submikroskopickým rozměrům, vysokému specifickému povrchu (vysoký poměr povrchu a objemu), vysoké porozitě, vysoké propojenosti pórů a možnosti vytvořit trojrozměrnou strukturu.[3] Tyto vlastnosti předurčují využití v širokém spektru biomedicínských aplikací. Bylo zjištěno, že porozita nanovlákeného nosiče dosahuje až 91 % a póry jsou značně propojeny. Díky tomu dochází k jednoduché difuzi živin a odpadních látek mezi nosičem a prostředím.[2] Submikrometrový průměr s vysokou propojeností nanovlákené sítě mimikuje strukturu extracelulární matrix (ECM) a umožňuje adhezi a proliferaci buněk.[3] Zároveň je však velikost pórů poměrně malá, což znesnadňuje jejich pohyb, penetraci a migraci do hlubších vrstev nosiče.[2, 3] Mechanické vlastnosti nanovlákené matrix jsou důležité zejména pro biomedicínské aplikace, neboť nosič musí být schopen odolávat silám vyvíjející se rostoucí tkáň. Dále pak musí odpovídat specifickým biomechanickým požadavkům během její fyziologické aktivity, např. pulsnímu průtoku krve.[3] Mechanika nanovlákených vrstev je daná jejich chemickým složením a orientací vláken.[4]

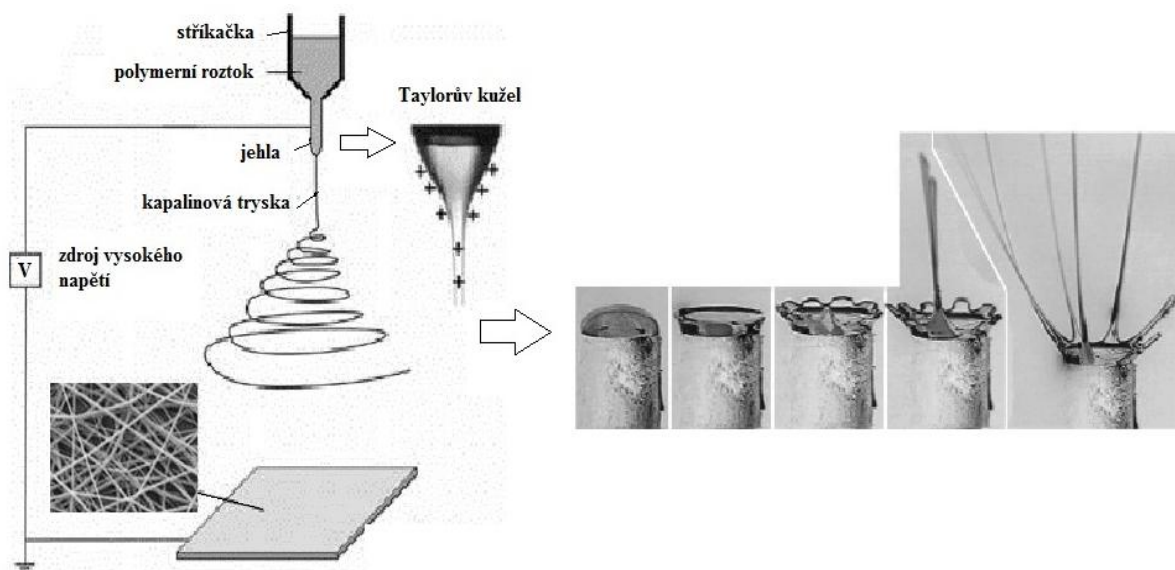
Nanovláken zvlákněná metodou elektrostatického zvlákňování jsou využívána v biomedicínských aplikacích, především v tkáňovém inženýrství, jako nosiče, dále na léčení ran, podávání léků, jako afinitní membrány, v imobilizaci enzymů apod. Kromě pole biomedicínského nacházejí nanovláken uplatnění ve filtračních systémech, v biotechnologiích, v environmentálním inženýrství, v obraně a bezpečnosti; mohou být využívány také pro skladování energie a její generování.[3]

2.2 Postup výroby

Elektrostatické zvlákňování lze dělit na jehelné a bezjehelné. Základní aparatura pro jehelné elektrostatické zvlákňování se skládá ze zdroje vysokého napětí, zvlákňovací elektrody (kovová jehla na konci injekční stříkačky s polymerním roztokem) a kolektoru (uzemněného vodiče).[1] Zvlákňovací elektroda je místo, kde se nanovlákná vytváří z polymerního roztoku, a kolektor je místo, kde se již suchá vytvořená vlákna sbírají. Polymerní roztok, ze kterého chceme nanovlákná připravit, je uzavřen ve stříkačce připojené ke spinneru a připojen k jedné elektrodě vysokého napětí, umístěné přímo v roztoku, zatímco kolektor je připojen k elektrodě opačné (Obr. č. 1).[2]

2.2.1 Jehlové zvlákňování

Při elektrostatickém zvlákňování dochází působením elektrického pole k vytvoření nabitého kapalinového proudu z polymerního roztoku. Při jehlovém zvlákňování je jako emitor použita jehla. Na kapku polymerního roztoku na konci kapiláry působí dva druhy sil. Jednak jsou to síly povrchového napětí, díky kterým kapka drží tvar a které se snaží o vytvoření co nejmenšího povrchu vůči objemu. Poté, co je kapka vystavena elektrickému poli, se na jejím povrchu vytvoří elektrický náboj a začnou na ní působit síly elektrostatické. Tyto síly vychylují kapku z jejího tvaru tím, že přitahují její náboj na povrchu k opačně nabitě elektrodě na kolektoru.[1] Při zvyšování intenzity elektrického pole dochází k indukci elektrostatických sil, které přitahují elektricky nabitý polymerní roztok na opačnou elektrodu. Polokulovitý tvar kapky na kapiláře se začne prodlužovat a vytvoří kuželovitý tvar, též známý jako Taylorův kužel (Obr.1).[5] V této chvíli se síly povrchového napětí rovnají silám elektrostatickým. Jakmile dojde k překročení určité kritické hodnoty intenzity elektrického pole, elektrostatické síly převládnu a z Taylorova kužele začnou tryskat nabitě kapalinové proudy polymerního roztoku.[6]



Obr. 1 - Schéma metody elektrostatického zvlákňování [1] a tvorby Taylorova kužele [5]

Polymerní tryska se skládá ze zóny stabilní a nestabilní, s převahou tzv. bičující nestability, která způsobuje rotační vychýlení trysky a uvolnění polymerních kapiček, které putují k opačné elektrodě. Během cesty ke kolektoru se rozpouštědlo vypařuje a suchá, nabitá polymerová vlákna jsou přitahována ke kolektoru.[6] Odpaření rozpouštědla je možné také díky mechanismu bičující nestability, který zvětšuje povrch nanovláknů a tím umožňuje lepší vysychání rozpouštědla. Na kolektoru se náboj vláken vybije, neboť kolektor je uzemněn nebo opačně nabíjen. Postupně vznikají na kolektoru nanovlákněné vrstvy, které mohou být dále použity k dalším aplikacím.[5] Pro proces jehlového elektrostatického zvlákňování lze použít buď jednu jehlu, nebo systém více jehel, kdy je možné použít výrazně nižší elektrické napětí, avšak jehly se mezi sebou mohou navzájem ovlivňovat [1].

2.2.2 Hladinové (bezjehlové) zvlákňování

Při bezjehlovém elektrostatickém zvlákňování se místo jehly používá hladinová elektroda. Zjistilo se, že vlákněné trysky se mohou vytvářet i na volném povrchu kapaliny. Vlákněné trysky se na povrchu nabitě kapaliny samoorganizují v podobě odpovídající lineární vlně s lokálními minimy, s převahou sil povrchového napětí a lokálními maximy, s převahou elektrostatických sil. V oblastech lokálních maxim dochází ke vzniku vlákněných trysek. Příkladem hladinové elektrody je váleček či drátek ponořený do polymerního roztoku.[5] Hladinové elektrostatické zvlákňování je účinnější než zvlákňování pomocí jehly, neboť vlákněných trysek se může na hladině vytvořit více najednou a vlákněné trysky se mohou optimálně rozložit na elektrodě s ohledem na okolní podmínky.[7]

2.2.3 Kolektory

Vlákna vznikající při elektrostatickém zvlákňování jsou zachytávána na kolektor. Ten může být buď uzemněn, nebo je nabitý a nese opačný náboj než zvlákňovací elektroda. Kolektory můžeme dělit na statické, rotační, speciální a imerzní. Bývají vyrobeny z vodivých materiálů, především kovů, ale jako kolektor může sloužit i např. hladina vody v nádobě (tzv. imerzní kolektor). Tvar kolektoru hraje důležitou roli při utváření morfologie vlákenných vrstev. Jednoduché kolektory s plochým tvarem umožňují rovnoměrné rozložení elektrického pole a na tyto povrchy se vlákna ukládají v náhodné orientaci. Bylo zjištěno, že pomocí rotačních kolektorů lze vytvářet paralelizované vlákenné vrstvy s vysokým stupněm usměrnění vláken.[2, 8] Buňky kultivované na těchto paralelizovaných nosičích, byly rozprostřené ve směru orientace vláken. [8] S rostoucí rotací je patrný efekt většího zarovnání vláken, při nižších rotacích lze pozorovat orientované jenom shluky vláken. Na tento efekt poukázal Matthews et al. [9] při studiu kolagenních vláken.

2.3 Parametry

Proces elektrostatického zvlákňování je ovlivněn celou řadou parametrů. Ty můžeme dělit na parametry fyzikální, chemické a environmentální.

Mezi fyzikální parametry lze zařadit aplikované elektrické napětí, typy používaných kolektorů a vzdálenost kolektoru od zvlákňovací elektrody. Elektrické napětí aplikované na polymerní roztok musí překročit prahovou hodnotu, aby docházelo ke vzniku Taylorova kužele, a hraje tedy zásadní roli při utváření nanovláknů a jeho struktury. Vzdálenost od kolektoru umožňuje kontrolovat průměr vláken a jeho morfologii.[3] Doshi a Reneker [6] zjistili, že se zvyšováním vzdálenosti kolektoru od Taylorova kužele se průměr vlákna zmenšuje. Toto pozorování je vysvětleno prodloužením trajektorie vlákna a tím i prodloužením doby umožňující větší elongaci vláken.

Mezi parametry chemické řadíme molekulovou hmotnost, koncentraci, vodivost, viskozitu a povrchové napětí použitého polymeru. Tyto parametry jsou do značné míry provázané. Pro vytvoření vlákna je zapotřebí určitá minimální koncentrace roztoku polymeru.[3] Při nízkých koncentracích roztoku polymeru dochází k slabé interakci mezi molekulami polymeru a vytváří se kulovité částice. Dochází k jevu, který se v literatuře nazývá jako elektrospraying. Se zvyšováním koncentrace se postupně kulatý tvar kapiček protahuje, až dojde k vytvoření vláken.[3] Molekulová hmotnost ovlivňuje interakci polymerních řetězců v roztoku, které,

jak jsme viděli v případě efektu koncentrace, hrají důležitou roli v procesu elektrostatického zvlákňování. Nízká molekulová hmotnost roztoku polymeru vede opět ke kapičkové morfologii, s jejím postupným zvyšováním roste vlákněný charakter vznikajících částic. Molekulární hmotnost polymeru a jeho koncentrace tvoří provázaný systém projevující se v rheologických vlastnostech polymerních roztoků. Tato provázanost tedy umožňuje, že například i přes nízkou koncentraci může vysoká molekulová hmotnost roztoku polymeru zajistit dostatečnou viskozitu pro tvorbu nanovláken a naopak i při vysoké koncentraci můžou polymery s nízkou molekulární vahou tvořit kuličky.[3] Dalším chemickým parametrem je povrchové napětí roztoků. Síly povrchového napětí vytváří protipól k silám elektrostatickým, při zvýšeném povrchovém napětí se bude obtížněji formovat vlákněná tryska. Nízké povrchové napětí naopak napomáhá tvorbě kapalinových trysek a zahájení elektrostatického zvlákňování i při nižší hodnotě elektrického pole.[10] Povrchové napětí lze kontrolovat pomocí vhodného přidaného rozpouštědla nebo sufraktantu. Elektrochemické vlastnosti roztoku také ovlivňují proces zvlákňování. Vodivost polymerního roztoku je dána typem polymeru, použitým rozpouštědlem a dostupností ionizovaných solí. S nárůstem elektrické vodivosti je polymerní kapalinová tryska elektrickými silami více natahována, čímž se zužuje průměr vlákna. Se snížením elektrické vodivosti nejsou elektrické síly dostačující pro natažení polymerní kapalinové trysky do jednotného vlákna a dochází ke vzniku kapičkové morfologie.[3]

K environmentálním parametrům patří především vlhkost a teplota okolního prostředí. Uppatham et al. [11] zjistil při studiu vláken z polyamidu-6, že při zvýšení teploty okolí vlákna zmenšovala svůj průměr, což se zároveň projevovalo snížením viskozity polymerního roztoku. Tento výsledek poukazuje na hlavní efekt teploty na průběh zvlákňování, kdy při jejím zvýšení dochází k rychlejšímu odpařování rozpouštědla. Na teplotě je značně závislá i viskozita, která u většiny polymerních roztoků s nárůstem teploty klesá. Z pohledu vlhkosti se jedná zejména o efekt na odpařování rozpouštědel. Bylo zjištěno, že při nízké vlhkosti vzduchu se rozpouštědlo z vlákna odpařuje mnohem rychleji.

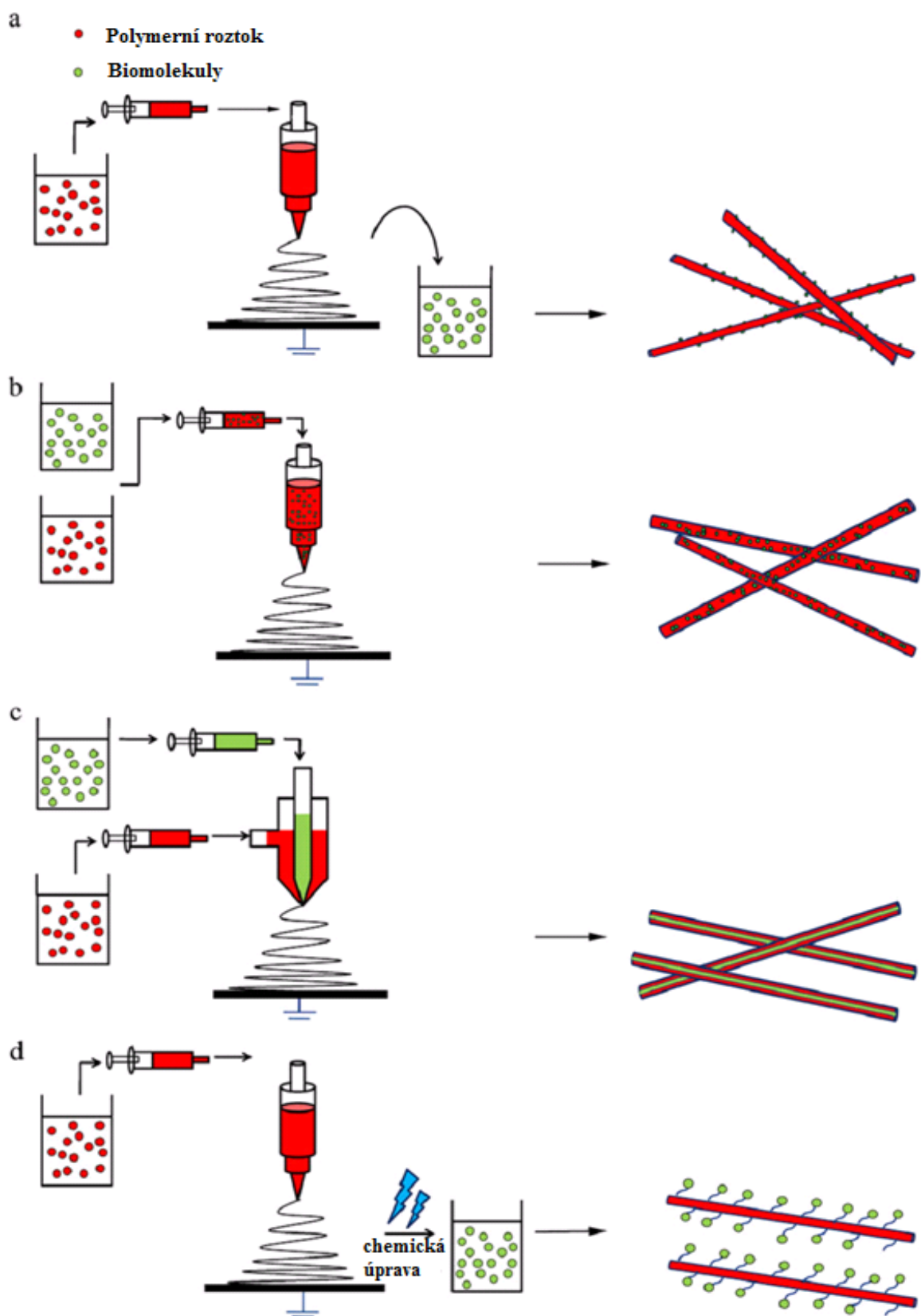
Každý z těchto parametrů ovlivňuje výslednou morfologii vlákna a manipulací s nimi lze dosáhnout požadované morfologie a průměru vláken.[3]

3. NANOVLÁKNA JAKO NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK

Nanovlákná tvořená elektrostatickým zvlákňováním vykazují široké spektrum unikátních vlastností, jako je vysoká porozita, vysoký poměr mezi povrchem a objemem a rozměr připomínající strukturu ECM. Díky těmto vlastnostem jsou nosiče užívány jako substrát pro kultivaci buněk nebo jako nosičový systém s podpůrnou funkcí při regeneraci tkání.[2]

Kromě využití jako podpůrné struktury pro růst buněk umožňuje proces zvlákňování i funkcionalizaci nanovláken pomocí aktivních látek. Kombinace nanovláken s aktivními látkami modifikuje farmakokinetický profil uvolnění dané látky v místě aplikace. Řízené dodávání a uvolňování léčiv je umožněno vazbou na biodegradabilní (biologicky rozložitelné) polymery a jejich modifikací je možné kontrolovat místní a časové (spatio-temporální) působení léku i čas, po který se lék bude z polymeru uvolňovat.[3] Látky mohou být buď adherovány přímo na nanovláknenný povrch, kdy dochází k jejich uvolnění prostou difuzí s ohledem na jejich vzájemnou interaci a sílu vazby, či mohou být začleněny přímo dovnitř nanovlákná, kdy je uvolnění pomalejší a dochází k závislosti na rheologických vlastnostech polymerní matrice, povaze aktivní látky a degradabilitě systému. V závislosti na použitém polymeru a metodě funkcionalizace lze vytvořit systémy s rychlým, okamžitým, opožděným či upraveným uvolňováním léku do místa působení.[12]

Pro vytvoření systémů pro řízené dodávání léčiv s využitím nanovláken lze aplikovat různé metody jako je fyzikální adsorpce na nanovlákná, směsné elektrostatické zvlákňování, emulzní elektrostatické zvlákňování a koaxiální elektrostatické zvlákňování (Obr. 2).



Obr. 2: Metody funkcionalizace nanovláken: a) směsné zvláknění, b) emulzní zvláknění, c) koaxiální zvláknění, d) povrchová adheze. Upraveno dle Ji et al. [13]

3.1 Adsorbce na povrch nanovláken

Fyzikální adsorbce na nanovlákná představuje jednoduchý způsob, jakým může být na vysoký specifický povrch nanovláken adsorbováno velké množství molekul. Metoda adheze byla použita pro vazbu vitaminů, léčiv, antibiotik, nukleových kyselin i proteinů [2]. Problémem metody však zůstává velmi rychlé uvolnění látky, která navíc není chráněna proti degradaci v okolním prostředí. Nie et al. [14] ve své studii ukázal, že imobilizace bone morphogenetic proteinu 2 (BMP-2) na povrch nanovláken metodou fyzikální adsorbce mělo za následek 75% uvolnění látky během prvních 5 dnů, což je doba výrazně rychlejší, než při použití směsného elektrostatického zvlákňování.

Metoda adsorbce na povrch vláken se tedy používá především pro rychlé a krátkodobé dodání látek. Pokud však chceme prodloužit čas, po který se látka uvolňuje, musíme na povrch nanovláken zavést speciální molekulární motivy, které zvýší afinitu vazby aktivní molekuly a umožní prodloužení doby interakce aktivní látky a vlákna. Příkladem může být využití heparinových motivů pro vazbu proteinů nebo polyetyleniminu (PEI) pro vazbu nukleových kyselin. V nedávné studii byl na povrch polykaprolakton/želatinových (PCL/želatinových) vláken kovalentně konjugovaný heparin.[15] Motiv heparinu na povrchu vláken stimuloval vazbu basic fibroblast growth faktoru (bFGF), který interagoval s hydroxylovými skupinami heparinu. V důsledku specifických interakcí bFGF a heparinu se uvolnění bFGF z vlákna zpomalilo až o 4 týdny. Kromě toho, fyzikální adsorbce by mohla být využita pro imobilizaci dalších systémů pro dodávání léků.

Na povrch nanovláken lze adherovat i větší struktury s inkorporovanou látkou. U těchto systémů pak nanovlákná slouží jako mechanická podpora a adherovaná struktura slouží jako systém s řízeným uvolňováním aktivní látky. Rampichova et al. [16] připravili lipozomy s fetálním bovinním sérem, které byly adsorbovány na poly(2-hydroxyethyl)methakrylátová (PHEMA) nanovlákná. Díky adhezi lipozomů došlo k jejich imobilizaci a lokalizaci uvolnění aktivní látky. V podmínkách *in vitro* testování došlo při kultivaci buněk na těchto nosičích k zlepšení adheze a proliferace chondrocytů. K dalším případům adsorbce patří kombinace nanovláken s mikročásticemi tvořenými electrospayingem [17].

3.1 Směsné elektrostatické zvlákňování

Základní způsob inkorporace aktivní látky do nanovláken je tvorba směsí se zvlákňovaným polymerem. Při směsném elektrostatickém zvlákňování je nejprve vytvořena mísitelná směs polymeru a bioaktivní látky. Pro zlepšení rozpustnosti aktivní látky je aplikované mechanické míchání nebo ultrazvuk, a tato homogenní směs je posléze zvlákněna. Vytvořená směsná nanovláknina byla použita pro řízené dodávání léků a dalších molekul, např. antibiotik, cytostatických látek, proteinů a siRNA. Příkladem můžou být dexamethazonem obohacená polylaktid-co-glykolová PLGA nanovláknina připravená směsným elektrostatickým zvlákňováním, která byla použita pro stimulaci osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk (MSC) z tukové tkáně.[18]

Z farmakokinetického pohledu závisí u směsných vláken uvolnění aktivní látky na několika parametrech. Základním parametrem je interakce mezi polymerem a aktivní látkou. Při studiu uvolňovací kinetiky ze směsných polylaktidových (PLA) vláken se zapouzdřenými látkami paclitaxelem, doxorubicin hydrochloridem a doxorubicinovou bází bylo zjištěno, že hlavními faktory pro zajištění konstantního uvolňování léku je rozpustnost a kompatibilita léku v systému lék/polymer/rozpouštědlo.[19] V případě hydrofobních léčiv u paclitaxelu, a doxorubicinové báze došlo k homogennímu rozložení látky v hydrofobních vláknech z PLGA. Lipofilní léky paclitaxel a doxorubicinová báze vykazovaly pomalejší uvolnění díky lepší kompatibilitě s PLA a jejich dobré rozpustnosti v chloroform/acetonových rozpouštědlech. Jejich uvolnění z nanovláken přímo korelovalo s degradací vláken, zatímco hydrofilní doxorubicin hydrochlorid byl pozorován blíže k povrchům vláken a bylo u něj pozorováno vysoké počáteční uvolnění. Tento jev souvisí s fázovou separací a vnesením hydrofilní látky na povrch vláken. K rychlému uvolnění posléze došlo díky vyšší míře difuze z povrchu vláken. Pro zajištění trvalého uvolňování léku i jeho správného zapouzdření do nanovláken by měly být lipofilní polymery zvoleny jako vláknenný materiál pro lipofilní léčiva, zatímco hydrofilní polymery by měly být použity pro hydrofilní léky a rozpouštědla.

Hlavním omezením metody pro řízené dodávání proteinů zůstává snížení jejich aktivity. Biokompatibilní polymery, například polykaprolakton (PCL), polylaktid-co-glykolová kyselina (PLGA) a polyuretan (PU) apod. podporující adhezi buněk, jsou většinou hydrofobní a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech.[2] Jedná se tedy o prostředí odlišné od vodného, díky čemuž dochází ke změnám především sekundární a terciální struktury proteinů. V důsledku interakce bioaktivní látky s rozpouštědlem, při použití organických rozpouštědel

a proteinu – jako bioaktivní látky, dochází obvykle k jeho denaturaci a následnému snížení aktivity látky. Na druhou stranu, polymery zvlákněné z vodného rozpouštědla umožňují zachování bílkovin v nativním stavu. Nicméně, tyto hydrofilní polymery příliš nepodporují buněčnou adhezi a proliferaci a mají omezenou stabilitu ve fyziologických tekutinách.

Schopnost směsných nanovláken na bázi polyvinylalkoholu (PVA) a fibroinu zachovávat enzymatickou aktivitu byla prokázána začleněním proteinů, jako je lipáza a kasein [20] a křenová peroxidáza (HRP) [21] do různých nanovláken připravených z rychle rozložitelných polymerů rozpuštěných v polárních rozpouštědlech. Metoda směsného elektrostatického zvláknění se používá pro dodání malých bioaktivních molekul s vysokou efektivitou a může být úspěšně použita i pro dodání proteinů, kdy je ale nutno použít specifické polymery. Mezi polymery zvláknitelné z vodných roztoků patří hedvábní či fibroin podporující adhezi a proliferaci buněk. Nanovláknenné nosiče založené na fibroinu připravené směsným elektrostatickým zvlákněním byly využity pro dodání bone morphogenic proteinu-2 (BMP-2). Studie prokázala zachování bioaktivity BMP-2, lepší proliferaci mezenchymálních kmenových buněk (MSC) a jejich osteogenní diferenciaci *in vitro*. [22]

3.2 Emulzní elektrostatické zvláknění

Jak již bylo zmíněno výše, směsné elektrostatické zvláknění proteinů z nevodných rozpouštědel obvykle vyústí v pokles enzymatické činnosti těchto látek. Emulzní elektrostatické zvláknění navazuje na zvláknění směsné, metoda je však založena na mísení nemísitelných rozpouštědel, kdy v emulzi rozptýlené kapky tvoří jádro nanovláknena a zbylá kontinuální fáze polymeru vytváří plášť. V průběhu zvláknění dochází k tvorbě kompozitního kužele, který obsahuje dvě fáze roztoků. Zvlákněná vlákna tak získávají morfologii, kde kontinuální fáze dává vznik obalové složce vláken a emulzní fáze složce jádrové.[23]

Hlavní výhoda vláken se strukturou jádro/obal oproti vláknům tvořeným směsným zvlákněním spočívá v možnosti využití kombinace nepolárních obalových polymerů a polárních polymerů pro tvorbu jádrového polymeru, což umožňuje zapouzdření hydrofilních léků a zvýšení stability zapouzdřených molekul. Struktura jádro/plášť umožňuje efektivní zapouzdření dodávaných molekul, snižuje nežádoucí rychlé uvolnění látek a vede k jejich postupnému uvolnění. Yan et al. [24] připravili koaxiální nanovláknena z poly(laktid-co-kaprolaktonu) (PLCL) emulgací s vodou. Výsledky uvolňovací studie ukázaly, že v případě

inkorporace Rhodaminu B do emulzní fáze (tvořící jádro vláken) došlo k zpomalení rychlosti uvolnění ve srovnání se skupinou, kde byl Rhodamin B inkorporován do obalové fáze. Pro úspěšný průběh emulzního zvlákňování je důležitá stabilita emulze, neboť při nižších stabilitách kapky budoucího jádra nanovlákná tvoří na povrchu vláken aglomeráty, ze kterých je látka rychle, nehomogenně a masivně uvolněna.[25] Morfologie jádrové složky vzniklých vláken se řídí především viskozitou jádrového polymeru. Vyšší viskozity polymeru pláště mohou vyústit v kontinuální morfologii jádra nanovlákná.[25] Naproti tomu lze formovat i vlákna s nekontinuální morfologií jádra. Bylo také pozorováno, že emulzní zvlákňování produkuje nanovlákná typu jádro/plášť s užším průměrem v porovnání s užitím obvyklých elektrovlákňovacích metod.[26]

Procesem emulzního elektrostatického zvlákňování lze vytvářet emulzní vlákna typu jádro/plášť, u kterých bylo prokázáno, že látky inkorporované zachovávaly svoji bioaktivitu. Li et al. [27] připravili polylaktid-co-polyethylenglykolová (PLA-PEG) kompozitní nanovlákná s inkorporovanou proteázou K pomocí emulzního elektrostatického zvlákňování. Uvolněná proteáza K si zachovala aktivitu a urychlovala biodegradaci nosiče. Briggs et al. [28] hodnotil účinek ultrazvuku a surfaktantů na činnost lysozymu enkapsulovaného do emulzních vláken. Výsledky ukázaly, že přídavek polárního polymeru do zvlákňované jádrové směsi vede k vyšší lysozymální činnosti po uvolnění z nanovláken. Dále pozoroval, že sonikace směsi umožňuje zlepšení aktivity enzymu, a to díky uniformnější micelarizaci emulzní složky zvlákňovaného roztoku. Yang et al. [29] porovnávali uvolňovací kinetiku a aktivitu lysozymu při imobilizaci pomocí adheze na vlákna a inkorporaci pomocí emulzního zvlákňování. Výsledky opět poukázaly na ochranu strukturální integrity látky i její trvalé uvolnění z emulzních vláken. Sonikace ani proces elektrovlákňování nezpůsobily výrazné denaturace ani strukturální změny proteinu vzhledem k jádroplášťové struktuře vláken. Při emulzifikačním procesu bylo ztraceno okolo 16 % specifické aktivity, zatímco při pouhém uchycení na vlákna byly ztráty aktivity výrazně vyšší a docházelo k degradaci lysozymu projevujícího se snížením molekulární hmotnosti.

Nicméně, tato metoda má také několik nevýhod a omezení. Pokud probíhá elektrostatické zvlákňování z polymerních roztoků s malými mezifázovými napětími, nemůže být emulzní elektrostatické zvlákňování uplatněno. Navíc, příprava emulze mechanickým mícháním nebo ultrazvukem by mohla mít vliv na struktury vestavěných molekul a polymerů. Yang et al. [29] poukázal na fakt, že ultrazvuk aplikovaný při tvorbě emulze měl větší vliv na sekundární

strukturu molekul hovězího sérového albuminu (BSA) než proces elektrostatického zvlákňování.

Emulzní elektrostatické zvlákňování bylo využito i pro řízené dodávání malých molekul a proteinů. Xu et al. [25] připravili nanovlákná z amfifilního polyethylenoxid-co-polylaktidu (PEO-PLA) s vodní kapalnou fází a doxorubicinem. Výsledky ukázaly trvalé uvolnění dvěma způsoby, jednak desorpcí z polymerní matrice a také degradací PEO-PLA pláště. Podobná studie ukázala, trvalé dodávání látky leviraceramu z PLGA nanovláknem s emulzní vodní fází.[1] Vzhledem k vysokému povrchovému napětí mezi fázemi jádra a pláště je pohyblivost molekul nízká a kontakt mezi náchylnými bioaktivními molekulami a nepolárním rozpouštědlem je výrazně snížen. Li et al. [1] použili emulzní systém pro studium uvolňovací kinetiky nervového růstového faktoru (NGF) a hovězího sérového albuminu BSA z PLCL vláken připravených emulzním elektrostatickým zvlákňováním. Uvolnění BSA obsaženého ve sférách vodné fáze bylo pozorováno na emulzních i směsných vláknech. V případě směsných vláken docházelo k velkému počátečnímu uvolnění látky, okolo 60-70 %, kdy posléze došlo ke zpomalení uvolnění zbytku BSA po dobu 12 dní. Tento jev si vysvětlujeme lokalizací BSA na povrchu vláken v důsledku radiálního vytlačení polárního proteinu v nepolárním zvlákňovacím roztoku. V případě emulzního zvlákňování mělo BSA pomalejší a trvalejší uvolňovací profil. I zde bylo pozorováno počáteční uvolnění látky, kdy bylo BSA lokalizováno blíže k povrchu vláken, avšak činilo pouze okolo 10-20 %. Během 12 denního testu bylo trvale uvolněno 70 % látky, zbylé množství látek bylo pravděpodobně deponováno ve vlákenné matrix. Jak bylo zmíněno v předchozích oddílech, uvolnění z polymerní matrix je závislé jak na degradaci tak difuzi z vlákenné struktury. Emulzní nanovlákná se také osvědčila v lepším zachování bioaktivity látky, zde např. NGF uvolněný z PLCL emulzních vláken vykazoval vyšší stupeň bioaktivity než kontrolní vzorek ze směsného zvlákňování.

Elektrostatickým zvlákňováním lze do polymerních nanovláken vložit také mikro- a nanočástice v pevné podobě, mluvíme pak o disperzním elektrostatickém zvlákňování. Nedávná studie ukázala, že hydroxyapatitové (HAp) částice s navázaným BMP-2 vložené do PLGA pomocí disperzního elektrostatického zvlákňování, umožnily dodávání BMP-2 bez ztráty bioaktivity.[30]

3.3 Koaxiální elektrostatické zvlákňování

Na rozdíl od použití smíšeného elektrostatického zvlákňování, koaxiální elektrostatické zvlákňování představuje novou, sofistikovanou a perspektivní metodu, kterou je možné vytvářet novou generaci jádro-plášťových nanovláken.[31] Na rozdíl od klasického jehlového elektrostatického zvlákňování slouží jako elektroda dvě kapiláry v souose, kdy jedna je umístěna uvnitř druhé a do nichž můžeme vložit dva rozdílné polymery.[5] Plášťový roztok se vstříkuje do vnější jehly a je pro něj vhodné použít roztoky polymerů a látky zvláknitelné, kdežto jádrový roztok je aplikován do vnitřní jehly a může být tvořen nepolymerními kapalinami, či dokonce práškem a látkami běžně nezvláknitelnými.[31] Jádrové a plášťové roztoky mohou být buď mísitelné, nebo nemísitelné, protože krátká doba tuhnutí vláken výrazně zabraňuje míchání tekutin. Koaxiální morfologie nanovláken byla dokázána přípravou dutých interiérů nanovláken.[32]

Metoda koaxiálního zvlákňování se od metody emulzního zvlákňování liší zejména ve způsobu vzniku kompozitní vlákně trysky. U emulzního zvlákňování dochází ke vzniku kompozitní vlákně trysky díky fázové separaci kontinuální a emulzní fáze, které posléze dávají vzniknout jádru a plášti nanovláken. V případě koaxiálního zvlákňování dochází k vzniku kompozitní zvlákňovací trysky díky geometrii zvlákňovací elektrody. Koaxiální uspořádání jehel vytváří oddělené kapalné vrstvy jádrového a obalového polymeru. Pokud je rychlost difuze mezi oběma polymerními roztoky (relaxační čas) delší, než doba zvlákňování, nedochází k smíchání roztoků a vznikají tak vlákna se strukturou jádro/obal. Hlavní výhodou koaxiálního zvlákňování je možnost použití mísitelných polymerních roztoků pro vznik koaxiálních vláken, pokud je jejich relaxační čas delší než doba zvlákňování. Tento proces u emulzních vláken není pravděpodobný a dobře realizovatelný.

Mezi klíčové parametry, kterými se řídí úspěšná příprava koaxiálního nanovlákně, patří kompatibilita polymerů a rozpouštědel a rychlost difuze jádrového polymeru. Pro vytvoření koaxiálního nanovlákně by plášťový polymer a rozpouštědlo měly být propustné pro páry jádrového rozpouštědla.[33] Pokud se využívá vodní jádrová fáze, je pro formaci koaxiálních vláken vhodné použití polárního rozpouštědla i v obalové fázi. Příkladem může být systém založený na polykaprolakton-co-polyvinylalkoholu PCL/PVA. PVA představuje vodní jádrovou fázi. Pro tvorbu vláken je nutné, aby v obalové PCL fázi bylo kromě nepolárního rozpouštědla (např. chloroform) přítomné i polární rozpouštědlo (např. etanol). Díky jeho

přítomnosti dochází k difuzi vodních par skrz obalový polymerní roztok a vznikají pevná koaxiální vlákna.

Vzhledem ke složitosti celého procesu se metoda začala používat teprve nedávno, již dnes je však často využívána především proto, že jádro-plášťová vlákna zachovávají bioaktivitu zainkorporovaných proteinů/látek během procesu zvlákňování pomocí ochranného polymerního pláště. Mickova et al. [34] porovnali směsné a koaxiální zvlákňování z pohledu zachování aktivity modelového enzymu. V jednom systému bylo použito směsné elektrostatické zvlákňování, kdy vzniklá směs i s pozorovanou látkou byla zvlákněna, kdežto u druhého systému bylo využito techniky koaxiálního elektrostatického zvlákňování a látka byla během tohoto procesu inkorporována do jádra vzniklého nanovlákná. Tato studie porovnávala enzymatickou aktivitu křenové peroxidázy (HRP) v průběhu koaxiálního a směsného zvlákňování PVA. Výsledky ukázaly zvýšenou aktivitu HRP u koaxiálního zvlákňování.

Do jádra koaxiálních nanovláken už byla zapouzdřena celá řada bioaktivních látek, přes proteiny, antibiotika (např. tetracyklin, gentamicyn), léky (např. resveratrol), lysozym, BSA, a růstové faktory (např. nerve growth faktor (NGF), basic fibroblast growth faktor (bFGF) a platelet derived growth faktor (PDGF)[31]). Růstové faktory uvolněné z těchto koaxiálních nanovláken měly zachovanou bioaktivitu a stimulovaly buňky k proliferaci.

Nanovlákná připravená metodou koaxiálního elektrostatického zvlákňování mají v porovnání s vlákny směsnými obecně trvalejší profil uvolňování látky a její výrazně nižší počáteční uvolnění. Proteiny jsou rozmístěny po celé délce vláken a degradací plášťového polymeru na povrchu nanovláken mohou být řízeně dodávány do místa působení. Vhodným výběrem plášťového polymeru lze tedy regulovat či prodloužit čas uvolňování zainkorporované látky z nanovláken. Při studiu uvolňovací kinetiky u koaxiálních vláken byl pozorován účinek vybraného vláknenného polymeru na rychlost uvolňování látky z nanovláken. Tiwari et al. [35] pozorovali uvolňování hydrofilního léku metoclopramidu hydrochloridu z nanovláken tvořených různými polymery jako PLA, PCL, PLGA 80/20 (kopolymer s poměrem polylaktid:polyglykolová kyselina 80:20) a PVA. Počáteční rychlé uvolnění látky z nanovlákná během prvních 6 hodin se zmenšovalo v pořadí: PVA>PCL>PLGA> 80/20>PLA. Je tedy patrné, že např. při použití PVA koaxiálních nanovláken nemáme nad uvolněním látky žádnou kontrolu, více než 90 % se uvolní hned na

začátku, což lze přisuzovat především vysoké hydrofilitě PVA. U ostatních polymerů k počátečnímu uvolnění rovněž dochází, především kvůli nerozpuštěným částicím léku na jejich povrchu, především u PCL vláken, je však výrazně nižší než např. u PVA. Po umístění léku do hydrofilního PVA jádra PVA/PCL vlákna lze snížit počáteční uvolnění až na 55 %. Yan et al. [24] pozoroval chování látky heparinu v obou systémech s PLCL nanovláknem, kdy u směsných nanovláken docházelo k vysokému počátečnímu uvolnění látky, kdežto 80 % enkapsulovaného heparinu v koaxiálních vláknech bylo stabilně uvolňováno po dobu 14 dní difuzními mechanismy. Sahoo et al. [36] připravili koaxiální PLGA nanovláknem s inkorporovaným bFGF, a směsná PLGA nanovláknem s bFGF. Oba nosiče ukázaly podobné uvolnění i aktivitu látky. Nicméně uvolnění z koaxiálních nanovláken bylo prodlouženo oproti vláknům směsným. Li et al. [37] připravili koaxiální nanovláknem z PLCL s látkami dextranem a PDGF v jádře. Výsledky studie ukázaly intenzivní počáteční uvolnění, což je v rozporu se závěry jiných studií. Na druhé straně se koaxiální nosič ukázal lepší pro adhezi a proliferaci buněk na jejich povrchu. Liao et al. 2006 [38] připravili koaxiální nanovláknem z PCL s polyethylenglykolem (PEG) jako porogelem. Jádro obsahovalo BSA a PDGF pro stanovení uvolňovacího charakteru a demonstraci bioaktivity. Studie prokázala vliv různých molárních hmotností PEG porogenu na uvolňovací charakter jádrových proteinů. Při zvyšování molekulární hmotnosti PEG bylo uvolnění BSA z vlákna pomalejší. Tento jev mohl být způsoben pomalejším rozpuštěním PEG s vyšší molekulární hmotností. Navíc, pokud se zvyšovala koncentrace PEG, bylo uvolnění BSA z vlákna naopak rychlejší. Tento jev byl způsoben zvýšením porozity PCL obalu a tím i zvýšením kontaktu, což mělo za následek rychlejší uvolnění. Analýza kontrolní skupiny ukázala, že pevně vázané molekuly BSA v nanovláknem bez porogenu se uvolňovaly z vláken pomaleji. Jia et al. 2011 [39] představili PLGA nanovláknem s inkorporovaným dextranem v jádru spolu s vascular endothelial growth faktorem (VEGF) pro aplikace cévního tkáňového inženýrství. Ta prokázala trvalé uvolňování z vlákna po dobu 28 dní a stimulaci buněčné proliferace in vitro.

Při porovnání s předchozími metodami zachovávají koaxiální vlákna ve větší míře intaktnost zainkorporovaných látek, jak již bylo zmíněno výše při studiu liposomů a jejich inkorporace do vláken.[34] Koaxiální elektrostatické zvlákňování umožnilo zachování liposomů i jejich vnitřního vodného prostředí a enzymy v nich obsažené tak mohou lépe přežít proces elektrozvlákňování, pravděpodobně díky ochrannému stínění lipidické sféry. Rekombinantní faktory zainkorporované do liposomů v této studii byly více účinné při stimulaci MSC proliferace, než v koaxiálním systému bez liposomů. Podobná studie rovněž

potvrdila zachování intaktnosti a bioaktivity zainkorporovaných látek v koaxiálních vláknech. Studie se však zabývala α -granulemi izolovanými z trombocytů obsahující velké množství růstových faktorů indukujících opravu tkáně. Daný systém zachovával bioaktivitu růstových faktorů z α -granulí a stimuloval chondrogenickou diferenciaci MSC.[40]

Výsledky studií uvolňování léčiv s koaxiálními nanovláknami prokazují všestrannost metody. Hlavní výhody tohoto procesu jsou možnost vytvářet jádroplášťové nanovláknenné formace z mísitelných a nemísitelných polymerů, trvalé uvolnění z vláken a obecně méně radikální proces umožňující inkorporaci i sloučenin náchylnějších k denaturaci či degradaci. Nicméně, oproti četným výhodám koaxiálního elektrostatického zvlákňování, jakožto metody vhodnější pro zapouzdření bílkovin a růstových faktorů, má proces i několik nevýhod, které omezují jeho komerční využití. Hlavní nevýhody vyplývají z malé reprodukovatelnosti procesu a četným vadám měnící rychlost uvolňování molekul. Stabilní uvolňovací profil je nezbytný pro další klinické použití léků přenášených těmito systémy. Kromě toho, produktivita koaxiálního elektrostatického zvlákňování je výrazně omezená, vzhledem k tomu, že je proces založen pouze na jedné jehle. Multiplexování koaxiální elektrody by mělo tyto problémy vyřešit a tím i zlepšit aplikační potenciál metody koaxiálního elektrostatického zvlákňování pro komerční potřeby.

4. APLIKACE NANOVLÁKEN S RŮSTOVÝMI FAKTORY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

4.1 Kostní tkáňové inženýrství

Kostní tkáň je základem opěrné soustavy a integrita kostí je nutná pro správnou funkci pohybového aparátu člověka. Při úrazech nebo nehodách dochází k častému porušení integrity kostní tkáně, v důsledku čehož dochází k omezení činnosti pacienta. V porovnání s jinými tkáněmi má kost relativně vysokou regenerativní kapacitu, regenerace větších defektů je však omezená a zůstává zásadním terapeutickým problémem.[41]

Kostní tkáň se skládá z minoritní buněčné složky a majoritní extracelulární matrix, která tyto buňky obklopuje. V kosti se nacházejí četné typy buněk, jako jsou osteoblasty, osteoklasty, osteocyty nebo osteoprogenitorové buňky. Osteoblasty produkují kostní extracelulární matrix a během svého života se postupně mění na osteocyty. Význam osteocytů je především ve vylučování kolagenu typu I a nekolagenních bílkovin, jako jsou osteokalcin, kostní sialoprotein a osteopontin, čímž podporují proces mineralizace. Osteoklasty zahrnují převážně činnost resorpce kostní extracelulární matrix. Jedná se o mnohojaderné buňky, jejichž původ stále není jasný, nedávné studie však poukazují na jejich možný vývoj z monocytů, a to sloučením několika těchto buněk. Osteoprogenitorové buňky jsou považovány za prekurzorové buňky osteoblastů a jsou odvozené od mezenchymálních kmenových buněk. Kromě těchto základních buněk však kost obsahuje i další typy buněk, především je výrazně vaskularizovaná a obsahuje tedy buněčné komponenty cév jako jsou endoteliální buňky (VEC) a hladké svalové buňky (VSMC); a dále buňky kostní dřeně (např. hematopoetické kmenové buňky (HSC) a mesenchymální kmenové buňky (MSC)).[42]

Hlavní složky extracelulární matrix kosti jsou krystaly hydroxyapatitu (HA) (zastoupením asi z 69-80 hm.%) a kolagenu typu I (17-20 hm.%). Minoritními složkami jsou již vzpomínané proteiny jako osteokalcin, osteopontin a kostní sialoprotein.[43] Komponenty extracelulární matrix jsou v kosti uspořádané v kompaktních útvarech s vysokou hustotou kostní tkáně nebo v trámcových strukturách s vysokou mírou organizace. Díky vysokému zastoupení minerální složky a pečlivé organizaci od úrovně molekul ECM po trámce kostí vykazuje kost extrémně vysokou mechanickou pevnost.[43]

Ideální nosič musí splňovat kritické parametry potřebné pro kostní regeneraci, musí mít především vhodné mechanické, strukturální, chemické a povrchové vlastnosti. Další klíčovou vlastností je především biokompatibilita a biodegradabilita nosiče srovnatelná s úrovní potřebnou při přirozené remodelaci kosti.[44] Neméně důležitým parametrem je i správná velikost pórů umožňující migraci a proliferaci osteoblastů a mesenchymálních buněk (resp. progenitorových buněk), stejně jako vaskularizaci.[45] Za tímto účelem byly navrženy polymerní nosiče v několika strukturálních formách pomocí různých výrobních technik, jedná se např. o hydrogely, porézní pěny nebo nanovlákná. Vhodné materiály pro kostní tkáňové inženýrství zahrnují biopolymery (např. kolagen, fibroin, chitosan), syntetické polymery (např. PCL, PLA, PLGA), kovy (např. titan a jeho slitiny) a keramické materiály (např. hydroxyapatit, trikalciumfosfát). Použití přírodních polymerů (např. kolagen, fibroin) je výhodné vzhledem k jejich vysoké biokompatibilitě a biodegradabilitě, avšak kvůli jejich nízké mechanické pevnosti a vysoké míře degradace je nutno je použít ve formě kompozitů nebo je chemicky modifikovat síťováním. Předností polymerů syntetických (např. PCL, PLGA, PLCL, polyuretany) zůstává jejich vysoká produktivita, řízená reprodukovatelnost a nízká cena, jejich použití však omezuje snížená biokompatibilita a biodegradabilita oproti polymerům přírodním.[46]

Výhodou nanovláknenných nosičů oproti jiným strukturám je usnadnění buněčné adheze a proliferace buněk vzhledem k jejich velkému poměru povrchu ku objemu, dále použití širokého množství polymerních materiálů i možnost povrchových chemických modifikací nosičů pomocí bioaktivních molekul, které mohou zlepšit adhezi a proliferaci buněk.[3] Problémem využití nanovláken v regeneraci kostních defektů o kritické velikosti je jejich nedostatečná mechanická pevnost a 2D struktura, která brání průniku kmenových buněk nosičem a umožňuje pouze povrchový růst kultivovaných buněk.[47] Více perspektivní systém pro kostní regeneraci proto představují kompozity nanovláken s hydrogely či polymerními pěny vytvářející 3D systémy. Nanovlákná v těchto systémech však hrají významnou roli jako systémy pro řízené dodávání léků. Snahou tkáňového inženýrství je především vytvoření systémů, které budou místně i časově poskytovat potřebné vhodné koncentrace jednoho či více růstových faktorů, schopné správně působit na buňky původní tkáně i buňky implantované a úspěšně podporovat regeneraci kosti.[42, 46] Kaskáda hojení kostní tkáně je zpracována dle přehledového článku od Mehta et al.[42]

Při normálním hojení kosti se nejdříve vytváří hematoma a posléze zánět. Prasklé cévy v kostní zlomenině zajišťují průtok krve. Dochází k aktivaci krevních destiček a dochází k uvolnění růstových faktorů (zejména transforming growth factor β (TGF- β), insulin-like growth factor IGF-I, endodermální růstový faktor (EGF), bFGF, PDGF, VEGF) a k vzniku fibrinové zátky (tzv. ECM hematoma). Do ECM hematoma přes cévy a kostní dřeň dále migrují buňky vyvolávající zánět, jako jsou neutrofilové, monocytové a lymfocytové. Tyto buňky sekretují velké množství cytokinů a chemokinů, jako jsou tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-11 a IL-18. Pro hojení je klíčová aktivace a stimulace migrace prekurzorových buněk. Mesenchymální progenitorové buňky z kostní dřene jsou atrahovány signálními molekulami, jako je IL-6, TNF α , stromal derived faktor (SDF 1) a macrophage colony stimulating faktor (M-CSF). Po aktivaci migrují MSC do místa poranění a diferencují se v osteoblasty a chondrocyty. Diferenciace v osteoblasty je pod kontrolou mnohých transkripčních, růstových faktorů a hormonů. Transforming growth factor- β (TGF- β) rodina zahrnující bone morphogenic proteiny (BMP) přímo ovlivňuje aktivitu osteoblastů a progenitorových buněk. Hlavním efektem BMP (BMP-2, BMP-4) je zlepšení proliferace a diferenciace osteoprogenitorových buněk. Další členové rodiny TGF- β kontrolují funkce již diferencovaných buněk (proliferace, syntéza ECM). Působením proteinů z rodiny TGF- β dochází k vysoké produkci proteinů ECM (zejména kolagen typu I, kolagen typu II apod.). Chondrocyty v nově tvořené kosti proliferují, stávají se hypertrofickými, zatímco se okolní ECM kalcifikuje. V tomto procesu hraje klíčovou úlohu zejména TGF- β 2, TGF- β 3 and growth and differentiation factor 5 (GDF5). V osteogenní matrix je posléze dominantní exprese kolagenu I, osteokalcinu a alkalinní fosfatázy. Dalším klíčovým faktorem ovlivňujícím přestavbu na vaskularizovanou kostní tkáň je exprese VEGF. Lamelární kost představující konečnou vysoce organizovanou strukturu zajišťuje mechanickou a biologickou obnovu kostní funkce. Celý proces léčebné kaskády je velmi přísně regulovaný a i drobné nedostatky v jakékoli fázi mohou negativně ovlivnit výslednou morfologii kostní tkáň.

Nanovláknenné nosiče byly využity pro řízené dodávání růstových faktorů pro léčbu kostních lézí. Velká část studií se zabývala vytvořením nosičů, které by umožnily urychlení regenerace kostní tkáň pomocí navození osteogenní diferenciace MSC. Mezenchymální kmenové buňky diferencují na osteogenní buňky při působení růstových faktorů (např. TGF- β , IGF-I, bFGF a BMP-2) nebo malých molekul (vitamin C, vitamin D a dexametazon) [48]. Su et al. [49] připravili směsná a koaxiální PLCL/kolagenová (3:1) nanovláknna ve směsi s BMP-2, BSA a dexamethazonem (DEX). DEX byl u koaxiálních vláken inkorporován

u jedné skupiny koaxiálních vláken do obalu, přičemž BMP-2 bylo inkorporováno v jádře. Uvolňovací testy ukázaly rychlé počáteční uvolnění u DEX z obalu. U druhé skupiny koaxiálních vláken byly obě aktivní látky inkorporovány do jádra, přičemž u obou látek bylo sledováno postupné uvolnění. Kinetika uvolňování léčiv z nanovláken typu jádro-plášť ukázala více kontrolované uvolnění růstových faktorů než z vláken směsných. Koaxiální PLCL/kolagenové nosiče byly schopné *in vitro* osteogenní diferenciaci lidských MSC. Během uvolňování BMP-2 a DEX došlo k zvýšení markerů osteogeneze, vzrostla exprese exogenní alkalické fosfatázy a osteokalcinu a došlo ke stimulaci depozice minerálů na nosiči. Diferenciace byla pozorována zejména 14. den po nasazení. U kontrolních nosičů tvořených směsným zvlákňováním byla pozorována nižší míra osteogenní diferenciaci. Systém využívající koaxiální nanovláčka se zapouzdřeným BMP-2 a DEX má potenciál ve využití v kostní regeneraci, neboť pomalé trvalé uvolňování s dostatečným množstvím dodávaných růstových faktorů může stimulovat osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk (hMSC). Briggs et al. [28] připravili emulzní polykaprolakton-co-polyethylenoxidová PCL/PEO nanovláčka obohacená o PDGF. Ukázalo se, že hydrofilní polymer PEO stabilizoval konformaci proteinu během procesu emulzifikace. Výsledky studie ukázaly, že PDGF uvolněný z nosiče si zachovával svou bioaktivitu a zlepšoval osteogenní diferenciaci hMSC. Podobně byl DEX inkorporován do PCL nanovláken připravených směsným zvlákňováním. Vláčka byla připravená z roztoků s různou koncentrací PCL polymeru (5, 10, 15 a 20 hm. %). Trvalé uvolňování DEX bylo pozorováno po 15 dní na 15 % PCL, přičemž tyto vláčka stimulovala osteogenní diferenciaci MSC.

Výsledky pokusů indikují, že nanovláčkové nosiče obohacené o růstové faktory dokážou efektivně stimulovat diferenciaci MSC na osteogenní buňky. Jako vhodnější se dle výsledků experimentů jeví nosiče tvořené hladinovým nebo koaxiálním zvlákňováním. Kromě *in vitro* experimentů bylo publikováno několik *in vivo* experimentů s využitím nanovláken jako systémů pro řízené dodávání léčiv. Zhu et al. [50] připravili koaxiálním zvlákňováním polyethylenglykol-co-kaprolaktonového PEG/PCL nanovláčka obohacená o BMP-2. Vláčka stabilně uvolňovala 500 pg BMP-2/den. Při kultivaci MSC byla sledována stimulace osteogenní diferenciaci ve srovnání s kontrolním vzorkem bez růstových faktorů. K zlepšení došlo i při hojení kritického kostního defektu u králíků. Nie et al. [14] vyvinuli PLGA nanovláčka s inkorporovanými hydroxyapatitovými nanočásticemi (HAp) pomocí disperzního zvlákňování. HAp částice byly funkcionalizované adhezí BMP-2 a po zvlákňování byly rozmístěny homogenně v PLGA matrix. Díky stabilizaci po adhezí na nanočástice si BMP-2

zachovával svou integritu a konformaci i po procesu zvláknění. Delší kontakt BMP-2 s organickým rozpouštědlem dichlormethanem způsobil částečnou denaturaci, jež byla nepřímou úměrnou množství hydroxyapatitu. Zvýšení koncentrace hydroxyapatitových částic ve vodné fázi zrychlovalo míru uvolňování BMP-2 a zvyšovalo dózi dodaných částic. Výsledky *in vitro* testů ukázaly stimulaci osteogenní diferenciaci. V následné studii *in vivo* Fu et al. [51] vytvořili emulzní PLGA/hydroxyapatitová nanovlákna obsahující BMP-2, která byla implantována do kritických kostních defektů v holenní kosti u myši. Uvolněné BMP-2 zlepšovalo tvorbu nové kosti v defektu. Výsledky ukázaly, že adheze na nanočástice vedla k pozitivnímu efektu na hojení kostního defektu na rozdíl od směsných vláken, u kterých nedošlo k tak pozitivnímu výsledku hojení.

Obecně lze tedy zhodnotit, že nanovlákna obohacená o aktivní látky včetně růstových faktorů umožňují efektivní stimulaci hojení kostních kritických defektů *in vitro*. Žádná ze studií však nebyla provedena na modelu velkého zvířete. Potenciál pro praktické užití tak zatím nebyl dostatečně ověřen a představuje pole pro další zkoumání. Jak již bylo uvedeno v předešlých oddílech, nanovlákna nemají dostatečné mechanické vlastnosti pro samotné použití v kritických kostních defektech. Nadějným se tedy jeví jejich použití v kompozitních systémech s polymerními nebo keramickými pěny, které zprostředkovávají mechanickou pevnost.[52] Ve studii byly zkoumány optimalizované kompozitní pěny na bázi kolagenu a hydroxyapatitu s nastříhanými nanovláknem na bázi PCL. Kompozitní pěny byly funkcionalizovány trombocyty jakožto zdrojem růstových faktorů. Výsledky ukázaly zlepšení mechanických vlastností kompozitu a výrazně lepší osteogenní diferenciaci MSC v *in vitro* podmínkách.[52] V oblasti využití nanovláken v tkáňovém inženýrství kostní tkáň tedy vidím zajímavou perspektivu v oblasti využití vláken obohacených o růstové faktory v kompozitních systémech kombinujících regulované uvolnění z vláken s vhodnými mechanickými vlastnostmi polymerních pěn.

4.1 Chondrální regenerace

Další oblastí tkáňového inženýrství, ve které nanovlákna nacházejí uplatnění, je regenerace chrupavčitých defektů. Hyalinní chrupavka je bezcévná tkáň, obsahující pouze 1 % specializovaných buněk, chondrocytů a extracelulární matrix. Hlavní složky extracelulární matrix jsou kolagen typu II (~60 % sušiny), kyselina hyaluronová, proteoglykany (~25 %) a další proteiny a glykoproteiny (~15 %).[53] Voda přispívá asi k 80 % čerstvé hmotnosti kloubní chrupavky. Struktura kloubní chrupavky a nízká metabolická aktivita chondrocytů je

způsobena její limitovanou regenerační kapacitou. Kloubní chrupavky musí odolat vysokému mechanickému zatížení. Proto musí mít chrupavčité implantáty podobné viskoelastické vlastnosti jako přírodní tkáň. Navíc musí podporovat migraci a proliferaci buněk a být schopné dodávat živiny. Tyto požadavky jsou splněny v tří-dimenzionálním porézním nosiči, jako jsou hydrogely nebo pěny. Nová strategie, nazývaná též tzv. matrix-asociovaná chondrocytární implantace (MACI), využívá tří-dimenzionální nosič pro implantaci chondrocytů a implantaci tohoto nosiče na chondrální defekty.[54] V kontrole buněčné adheze a proliferace je důležité také chemické složení nosiče, které určuje i jeho degradaci. Rychlost rozkladu polymeru musí být v rovnováze se syntézou nově vznikající chrupavčité tkáň, polymery nebiodegradabilní či pomalu rozložitelné mohou vyvolat imunitní odpověď.[46]

Chondrocyty, jakožto terminálně diferencované buňky, nevykazují vysokou proliferační kapacitu. Z tohoto pohledu je pro dosažení úspěšné regenerace důležitá stimulace proliferace a diferenciací chondrocytů a progenitorových buněk v místě implantace. Diferenciací chondrocytů a kmenových buněk je ovlivněna současně přítomnými růstovými faktory.[48] Nejvíce běžných růstových faktorů indukujících chondrogenní diferenciaci pochází z rodiny TGF- β , konkrétně se podle nedávných výzkumů zdá být v této diferenciaci nejvíce účinným TGF- β 3 a BMP-6.[55] Dalšími růstovými faktory, které stimulují chondrogenní diferenciaci MSC, patří IGF-I, které působí synergicky s TGF- β . Působení TGF- β působí pozitivně na chondrogenní diferenciaci, zejména v časných fázích regenerace, při působení v pozdních fázích dochází k hypertrofování chondrocytů.[55] Pozitivní vliv na regeneraci chrupavky s využitím MSC má i bFGF, které stimuluje jak diferenciaci MSC, tak jejich proliferaci. Dalšími stimulačními molekulami pro regeneraci chrupavky jsou dexametazon a askorbát.[48]

Vývoj nových systémů pro řízené dodávání léčiv na bázi nanovláken je novým přístupem v tkáňové regeneraci chrupavky. Nanovlákná umožňují stabilizaci léků, bioaktivních molekul a růstových faktorů a jejich pozvolné uvolňování. Nedávno byly zveřejněny různé studie *in vitro* s potenciálem pro chondrální nebo osteochondrální regeneraci. Nanovlákná byla využita pro dodávání malých léků a antibiotik přímo v místě zranění. Dodávání antibiotik je významné hlavně během prvních dnů po implantaci a jejich dlouhodobé uvolnění není nutné. Antibiotikum ampicilin vložené v jádru poly(methylmethakrylátových-nylon6 vláken vykazovalo snížené počáteční uvolnění a bylo postupně uvolňované z vláken [56]. Naopak

v případě inkorporace cefoxitimu do PLGA nanovláken [57] došlo k rychlému uvolňování léčiva během prvních 6 hodin. Tento jev ukazuje na nízkou fyzickou interakci mezi lékem a polymerem a také lokalizaci léku na povrchu nanovláken, což vede k vysokému počátečnímu uvolnění.

Kromě dodávání malých molekul byla nanovlákná využita i pro dodání růstových faktorů potřebných pro regeneraci chrupavky. Jednoduchá fyzikální adsorpce TGF- β na PCL-hyaluronátové nosiče byla dostačující pro podporu tvorby chondrogenického markeru - kolagenu typu II v *in vitro* studii [58]. Filova et al. [59] připravili směs PVA nanovláken s fosfatidylcholinem. Inzulín a bFGF byly fyzicky adsorbované na povrch sesíťovaných vláken. Přítomnost fosfatidylcholinu na povrchu vláken stimulovala nekovalentní vazby inzulínu a zvýšila množství navázaného inzulínu ve srovnání s PVA vzorkem bez fosfatidylcholinu. PVA-fosfatidylcholinová nanovlákná vložená v bezbuněčném hyaluronát/kolagen typu I/fibrinovém nosiči zlepšila regeneraci osteochondrálních defektů u miniaturních prasat.

Dále byla při regeneraci chrupavky použita i koaxiální nanovlákná. Zapouzdření růstových faktorů usnadňuje jejich trvalé uvolnění a chrání je před poškozením v okolním prostředí. Mickova et al. [34] připravili koaxiální PCL/PVA nanovlákná s vloženými lipozomy. Zajímavé je, že lipozomy přežily proces elektrostatického zvlákňování a zůstaly zakotvené v PVA jádru. Navíc liposomy zachovávaly enzymatickou aktivitu křenové peroxidázy a zároveň bioaktivitu začleněných chondrogenických růstových faktorů zajišťujících proliferaci mezenchymálních kmenových buněk. V následné studii PVA/PCL nanovlákná typu jádro-obal s vloženými alfa granulemi z krevních destiček jako zdrojem růstových faktorů stimulovaly proliferaci a chondrogenickou diferenciaci chondrocytů a mesenchymálních kmenových buněk v *in vitro* experimentech.[40] Výsledky z těchto studií však dosud nebyly ověřeny *in vivo* a prokázání účinnosti koaxiálních nanovláken pro hojení chrupavčitých defektů v podmínkách *in vivo* dosud chybí.

Z výsledků studií je zřejmé, že nanovláknenné nosiče úspěšně umožňují vylepšení vlastností klasických hydrogelů. Umožňují jak zlepšení jejich elasticity a mechanické pevnosti, tak i řízenou stimulaci hojení chrupavčité tkáně pomocí dodávání antibiotik, protizánětlivých látek nebo růstových faktorů.

4.3 Využití v dalších oblastech tkáňového inženýrství

V oblasti **kardiovaskulární regenerace** mohou nanovlákná sloužit jak pro regeneraci srdečního svalu, tak pro regeneraci cév. Lidský srdeční sval má omezenou schopnost regenerace poškozených částí oproti svalům kosterním. Po odumření tkáně, např. v důsledku ischemických poškození či post-infarktického stavu, lidské kardiomyocyty špatně regenerují, nejsou schopny znovu zrekonstruovat nekrotickou tkáň a jsou proto nahrazeny fibroblasty. Masivní ztráta funkce kardiomyocytů může posléze vést až k chronickým poškozením srdce či smrti. Řešením může být transplantace srdce, která je ovšem omezená nedostatkem dárců i obrannými imunitními reakcemi hostitele na tyto štepy. Alternativní řešení nabízí buněčná terapie s potenciálem regenerovat poškozenou srdeční tkáň. MSC z dospělých tkání využívané v buněčné terapii nabízejí mnoho výhod, např. se mohou diferencovat do různých buněčných linií a samoobnovovat se a mají imunomodulační vlastnosti.

Pro diferenciaci MSC na kardiomyocyty se v podmínkách *in vitro* využívá stimulace 5-azacytidinem.[48] Z růstových faktorů hraje v regeneraci srdce hlavní roli VEGF. VEGF stimuluje kardiomyocytovou diferenciaci u MSC a jejich subpopulace: kmenových buněk srdce (cardiac stem cells – CSC). Dále stimuluje expresi markerů srdeční diferenciace, jako jsou srdeční myosin a alfa aktin. Nepřímou funkcí pro obnovu srdeční činnosti je stimulace angiogeneze a tím i zlepšení prokrvení srdečné tkáně. Tian et al. [60] se ve své studii zaměřili na kardiomyogennou diferenciaci MSC. Pomocí emulzního elektrostatického zvláknování zapouzdřili do jádra PLCL/želatinových nanovláken VEGF, jehož bioaktivitu zkoumali na lidských MSC. Pro porovnání byla vytvořena i směsná PLCL nanovlákná s tímto růstovým faktorem.

Výsledky ukazují, že větší procento buněk se diferencovalo do kardiomyocytů na PLCL/želatinovém nanovlákném nosiči, což přímo souvisí s trvalejším uvolňováním VEGF z tohoto emulzního nosiče, než z nosiče směsného. Zajištění dlouhodobého uvolňování VEGF je důležité především proto, že VEGF má krátký poločas života, na rozdíl od dlouhé periody potřebné k diferenciaci MSC do kardiomyocytů. Po 10 dnech osázení nosiče buňkami bylo patrné, že PLCL/želatinový nosič představuje vhodné mikroprostředí s propojenými póry pro

adhezi a proliferaci buněk. Kmenové buňky diferencující se do kardiomyocytů měly na tomto nosiči větší velikost se změněným protáhlým tvarem typickým pro MSC a vytvářely sítě mezi sebou navzájem, buňky zde pokryly celý povrch emulzního nosiče, oproti PLCL nosiči, na kterém se uchytilo a přežilo jen velmi málo buněk, které rostly separovaně a měly spíše dlouhý a úzký tvar.

Tkáňové inženýrství cévní tkáně je poměrně složité a představuje výzvu zejména pro cévy s úzkým průměrem. Krevní cévy, mezi něž řadíme tepny, vlasečnice a žíly, jsou zodpovědné za rozvod krve a látek s ní vázaných po celém organismu. Mají trubicovitý tvar a skládají se ze tří vrstev. Vrstva nejbližší středu se nazývá *tunica intima* a je tvořena jednou vrstvou endoteliálních buněk (EC). Nad ní se nachází *tunica media* obsahující buňky hladké svaloviny (SMC) a extracelulární matrix (ECM) jimi vylučovanou (především kolagenní a elastická vlákna). Svrchní vrstva, *tunica adventitia*, obsahuje fibroblasty spolu s kolagenními a elastickými vlákny podobně jako v *tunica media*. Tepny mají na svém průřezu větší množství vaziva než žíly. Obecně platí, že cévy musí být dostatečně pružné, aby mohly zajistit proudění krve. Cévní nosič by se měl skládat z odolného kompatibilního biomateriálu schopného odolávat fyziologickým a hemodynamickým silám a tlaku se zachováním strukturální integrity během celé doby růstu nové tkáně až do její finální podoby. Při tvorbě krevních cév je důležitá signalizace spojená s VEGF a bFGF. Proces utváření cév trvá týdny až měsíce a vyžaduje během této doby dodávání vysoké hladiny VEGF. Při cévní regeneraci vzrostl tedy požadavek na jeho dodávání v místní oblasti v odpovídající koncentraci.

Vzhledem k tomu, že VEGF a bFGF mají vysokou afinitu k heparinu, je možným řešením adheze heparinu na povrch nanovláken a tím i reverzibilní ukotvení těchto růstových faktorů na jeho domény, čímž lze snížit počáteční uvolnění z nanovláken a zajistit jejich dlouhodobější uvolňování.[15] Další zajímavý systém pro uvolňování VEGF vytvořili Zhang et al. [61] na *in vitro* dvojvrstevných membránách osazených buňkami a posléze implantovaných *in vivo*. Do nosiče byly zapouzdřeny růstové faktory VEGF a PDGF pro regulaci proliferace hladkosvalových (VSMC) a endoteliálních (VEC) buněk. Membrána byla složená z kompozitu chitosanového hydrogelu a bifázické vrstvy nanovláken. Vnitřní nanovlákněná vrstva obsahovala emulzně enkapsulovaný VEGF a vnější vlákněná vrstva obsahovala enkapsulovaný PDGF. Dodávání obou růstových faktorů najednou mohlo urychlit proliferaci VEC v prvních 6 dnech a regulovat pomalou proliferaci VSMC v prvních 3 dnech

a následné zrychlení proliferace po 6. dni. Tento model je výhodný z hlediska cévní regenerace. *In vivo* implantace do králičí tepny po 4 týdnech ukázala morfologii podobnou cévní bez pozorovaných defektů.

Další oblastí využití koaxiálních vláken je **nervové tkáňové inženýrství**. Oprava neuronálních defektů je extrémně složitý proces. Nervový systém má omezenou regenerační schopnost, zranění a traumata v nervovém systému mohou vést ke ztrátě senzorických či motorických funkcí či neuropatické bolesti. V periferním nervovém systému mohou být menší nervová zranění chirurgicky sešitá. Pro větší defekty a mezery mezi nervy je nutné použít autografy schopné je přemostit a spojit. Autografy jsou však limitovány nedostatkem dárcovských štěpů, ztrátou funkce (způsobenou např. špatným propojením nervových vláken či zpožděním léčby) či nutností dalších složitých operací.

Nosič vhodný pro regeneraci nervové tkáně by měl být biokompatibilní, biodegradabilní, mechanicky robustní, s velkou plochou povrchu, malým průměrem vláken, schopný regenerovat dorůstající axony v neurálních defektech. Kromě těchto vlastností by měl také být vysoce porézní s propojenými póry pro zajištění většího prostoru k migraci buněk a lepší výměnu živin a zplodin metabolismu mezi nosičem a okolní tkání. Vítanou vlastností je orientace vláken a jejich elektrická vodivost. [62] Li et al. [1] vytvořili PLCL emulzní nanovlákná s inkorporovaným NGF. Bioaktivita uvolněného NGF z nanovláken byla zkoumána na růstu neuritů myších feochromocytomárních buněk (PC12), které v přítomnosti bioaktivního NGF diferencují na neuronální fenotyp. Bylo prokázáno, že se PC12 diferencovaly do neuronů, NGF si tedy zachovával svou bioaktivitu i po procesu zvláknování a uvolnění z nanovláknenné matrice.

Celkově lze zhodnotit, že nanovlákná obohacená o růstové faktory nacházejí uplatnění v širokém spektru oblastí tkáňového inženýrství. Jelikož se jedná o novou technologii, není zatím dostupné dostatečné množství relevantní literatury zabývající se touto oblastí. Z toho důvodu je v budoucnu nutné prozkoumat další možnosti využití nanovláknenných nosičů obohacených o růstové faktory v tkáňovém inženýrství.

5. VÝZVY V ŘÍZENÉM DODÁVÁNÍ LÁTEK PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Elektrostatické zvlákňování je nová, perspektivní metoda pro tvorbu nanovláknenných nosičů se strukturou napodobující ECM a možností inkorporace široké škály bioaktivních látek. Tyto funkcionalizované nanovláknenné nosiče skýtají obrovský potenciál při využití v tkáňovém inženýrství a otevírají prostor pro tvorbu nových alternativních léčebných postupů v regenerativní medicíně. Metody přípravy nosičů zahrnují adsorpci látek na povrch nanovláken a dále směsné, emulzní a koaxiální elektrostatické zvlákňování. Hlavním cílem při výběru metody je přizpůsobení uvolňovací kinetiky potřebám tkáně a snížení jejího vysokého počátečního uvolnění. Těmto cílům nejlépe vyhovovala koaxiální struktura vytvořená pomocí koaxiálního [35, 36] nebo emulzního zvlákňování. [24, 29]

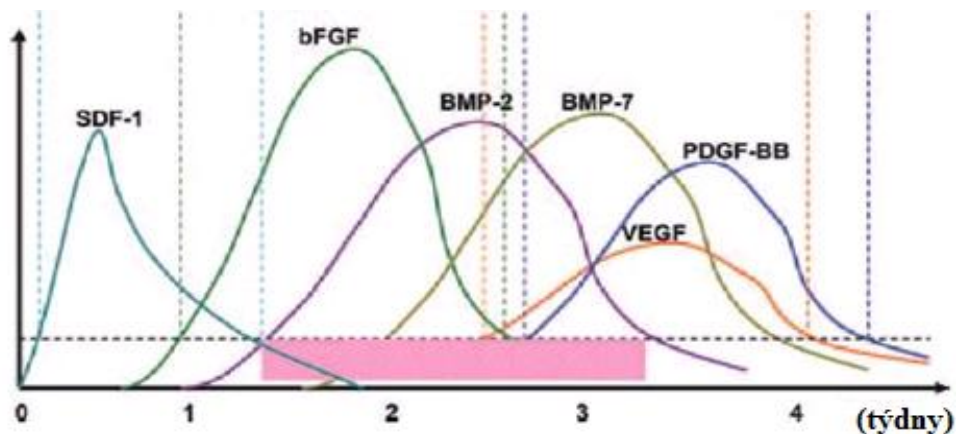
Pro efektivní účinek látky je klíčové udržení její bioaktivity. Při směsném zvlákňování může docházet ke kontaktu látky s rozpouštědlem a tím k její denaturaci. Oproti tomu systémy s vlákny typu jádro-plášť se projeví jako vhodnější pro zachování bioaktivity látky, která je zde zainkorporovaná v jádře nanovláknena a tím je lépe chráněna její strukturální integrita během procesu zvlákňování.[29, 34] Z těchto výsledků jasně vyplývá, že koaxiální nanovláknena jsou pro využití v řízeném dodávání aktivních látek výhodnější než vlákna směsná nebo adheze na povrch vláken.

Ověření systémů pro řízené uvolňování léčiv s využitím koaxiálních a emulzních nanovláken bylo zatím demonstrováno jenom v podmínkách *in vitro* nebo na modelu malých zvířat. Pro posouzení klinické aplikace v humánní medicíně je nutné další ověření na modelu velkých zvířat. Aplikovatelnost těchto nosičů se do značné míry opírá o možnost klinického použití komponent systému. V současné době je pro medicínské použití schválena jenom část polymerů (např. PCL, PLA, chitosan, želatina, alginát) a malé množství růstových faktorů (např. bFGF).[63] Při konstrukci systému řízeného dodávání léčiv určeného pro klinickou aplikaci je tudíž nutné pamatovat na tyto omezení. Z pohledu aktivních látek se pak jako vhodná možnost jeví použití trombocytů, které jsou v současné době používané v transfuzní a regenerativní medicíně a představují zdroj růstových faktorů pro osteochondrální a kožní užití.[64]

Klasické přístupy v tkáňovém inženýrství využívají pro náhradu tkáně tzv. tkáňové štěpy [65], tato metoda zahrnuje izolaci vlastních kmenových buněk, jejich kultivaci *in vitro* a následnou inkorporaci zpět do místa defektu. Na hostitelské buňky přítomné mimo tělo působí velké množství stresových faktorů přítomných v *in vitro* podmínkách a po jejich kultivaci už buňky nejsou stejné jako při počáteční izolaci, což může způsobit imunitní odmítnutí tkáňového štěpu. Oproti tomu lze pomocí nanovláčkových nosičů vytvářet tzv. bezbuněčné systémy, kdy po implantaci biodegradabilního nosiče do těla dochází díky postupnému a regulovanému uvolňování růstových faktorů a dalších látek z nosiče. Kmenové a progenitorové buňky jsou při této strategii atrahovány do místa poškození a zde posléze diferencovány na buňky cílové tkáně.[65] Z podstaty věci tento systém regenerace klade vyšší nároky na vlastnosti nosiče.

Nanovláčkové systémy pro řízené uvolňování léčiv vytvořené elektrostatickým zvlákněním nabízí možnost regenerace tkáňových defektů v těle pacienta, pro jejich klinické využití je však potřeba dalších studií a lepší porozumění kaskádám regeneračního procesu. Příkladem může být hojení kostní tkáně, jak je demonstrováno v podkapitole 4.1. Během procesu rekonstrukce tkáně hrají klíčovou úlohu růstové faktory účastníci se celé regenerační kaskády od stimulace chemotaxe, buněčné proliferace a diferenciace, vaskularizace i výsledné remodelace tkáně. V každé fázi regeneračního procesu jsou zapotřebí specifické růstové faktory, jejich rozdílná koncentrace i načasování jejich dodávání. Růstové faktory se tedy musíme naučit uvolňovat sekvenčně, abychom mohli mimikovat přirozené fyziologické prostředí a procesy u hojící se tkáně. Z tohoto důvodu se nyní pozornost zaměřuje právě na vývoj biomateriálů navržených tak, aby byly schopné místního i časově specifického uvolňování především více signálních molekul a růstových faktorů, a to v různých koncentracích během jednotlivých fází hojení (Obr.3).

Na úplném počátku bezbuněčného regeneračního procesu kostní tkáně je vhodné z nanovláčkových nosičů uvolňovat chemokiny, které zajistí migraci MSC do místa defektu (např. SDF1). V pozdější fázi má smysl dodávat především růstové faktory pro stimulaci proliferace MSC (např. bFGF), diferenciace do osteogenní buněčné linie (např. BMP-2, BMP-7), stimulaci vaskularizace (např. VEGF) a zahájení produkce ECM (např. PDGF). [42, 65] Identifikace klíčových růstových faktorů v různých fázích regenerační kaskády má značnou signifikanci pro budoucí vývoj šetrnějších a efektivnějších systémů pro řízené dodávání bioaktivních látek s možností regenerovat široké množství tkáňových defektů.



Obr. č. 3 – Hypotetický model postupného uvolňování růstových faktorů v kostní regeneraci – upraveno dle Sun et al.[65]

Biodegradabilní nanovláknenné nosiče řízeně uvolňující bioaktivní látky dle potřeb regenerované tkáně endogenní stimulaci kmenových buněk, nabízí obrovský potenciál v regenerativní medicíně a klinických aplikacích. V současné době, však zatím takové systémy nebyli vytvořené. U recentních systémů dochází k spontánnímu uvolnění aktivních látek řízených zejména fyzikálně-chemickou interakcí mezi látkou a nosičem. Schopnost řízení uvolnění je u takových systémů poměrně nízká. Z mého pohledu, se bude vývoj nosičů v budoucnu orientovat k vyšší kontrole nad kinetikou uvolnění a kombinaci nosičů pro dosažení optimálních uvolňovacích profilů.

6. ZÁVĚR

Řízené a trvalé uvolňování růstových faktorů a bioaktivních látek z biodegradabilních nanovláknenných nosičů je novým slibným přístupem v tkáňovém inženýrství. Bylo provedeno porovnání hlavních metod výroby a funkcionalizace nanovláknenných nosičů – adsorpcí na nanovláknenný povrch, směsným, emulzním a koaxiálním elektrostatickým zvlákňováním. Z přehledu vyplývá, že vlákna typu jádro/obal lépe zachovávala bioaktivitu a strukturální integritu zainkorporovaných látek oproti vláknům směsným. Tento typ vláken je možné připravit metodami koaxiálního a emulzního zvlákňování. Vlákna vytvořená těmito metodami vykazovala postupné uvolnění látek s nízkým počátečním uvolněním. Tato vlákna byla testována pro účely tkáňové regenerace kosti, chrupavky, srdce, cév a nervové tkáně.

Perspektivní se jeví tvorba tzv. bezbuněčných systémů na bázi funkcionalizovaných nanovláken, kdy je nosič implantován do místa defektu a aktivní látky z něj uvolňované mohou stimulovat *in vivo* chemotaxi, proliferaci a diferenciaci kmenových a progenitorových buněk. Systémy pro řízené uvolňování léčiv se zatím testují v zejména v podmínkách *in vitro* a na modelu malých zvířat. Pro jejich klinickou aplikaci je nutné další testování na modelech větších zvířat. Pro regeneraci komplexních tkání je však nutný další rozvoj systémů, které spojují biodegradabilní nanovláknenné nosiče trvale uvolňující bioaktivní látky a endogenní stimulaci kmenových buněk. Tyto nosiče nabízí obrovský potenciál v regenerativní medicíně.

7. REFERENCE

1. Li, D. and Y.N. Xia, *Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?* Advanced Materials, 2004. **16**(14): p. 1151-1170.
2. Sill, T.J. and H.A. von Recum, *Electro spinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(13): p. 1989-2006.
3. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(3): p. 325-347.
4. Lee, K.H., et al., *Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N,N-dimethylformamide on electrospun poly(vinyl chloride) nonwoven mats*. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 2002. **40**(19): p. 2259-2268.
5. Lukáš, D., et al., *Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)*. Textile Progress, 2009. **41**(2): p. 59-140.
6. Doshi, J. and D.H. Reneker, *ELECTROSPINNING PROCESS AND APPLICATIONS OF ELECTROSPUN FIBERS*. Journal of Electrostatics, 1995. **35**(2-3): p. 151-160.
7. Lukas, D., A. Sarkar, and P. Pokorny, *Self-organization of jets in electrospinning from free liquid surface: A generalized approach*. Journal of Applied Physics, 2008. **103**(8): p. -.
8. Teo, W.E. and S. Ramakrishna, *A review on electrospinning design and nanofibre assemblies*. Nanotechnology, 2006. **17**(14): p. R89-R106.
9. Matthews, J.A., et al., *Electrospinning of collagen nanofibers*. Biomacromolecules, 2002. **3**(2): p. 232-238.
10. Haghi, A.K. and M. Akbari, *Trends in electrospinning of natural nanofibers*. Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science, 2007. **204**(6): p. 1830-1834.
11. Mit-uppatham, C., M. Nithitanakul, and P. Supaphol, *Ultrathin electrospun polyamide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2004. **205**(17): p. 2327-2338.
12. Agarwal, S., J.H. Wendorff, and A. Greiner, *Use of electrospinning technique for biomedical applications*. Polymer, 2008. **49**(26): p. 5603-5621.
13. Ji, W., et al., *Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications*. Pharmaceutical Research, 2011. **28**(6): p. 1259-1272.
14. Nie, H., et al., *Three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffold for BMP-2 delivery*. Biotechnology and Bioengineering, 2008. **99**(1): p. 223-234.

15. Kim, M.S., et al., *Development of functional fibrous matrices for the controlled release of basic fibroblast growth factor to improve therapeutic angiogenesis*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(10): p. 2999-3010.
16. Rampichova, M., et al., *A simple drug anchoring microfiber scaffold for chondrocyte seeding and proliferation*. J Mater Sci Mater Med, 2012. **23**(2): p. 555-63.
17. Yanilmaz, M., et al., *Nanoparticle-on-nanofiber hybrid membrane separators for lithium-ion batteries via combining electrospraying and electrospinning techniques*. Journal of Membrane Science, 2014. **456**(0): p. 57-65.
18. Martins, A., et al., *Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality*. Biomaterials, 2010. **31**(22): p. 5875-85.
19. Zeng, J., et al., *Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation*. Journal of Controlled Release, 2005. **105**(1–2): p. 43-51.
20. Xie, J.B. and Y.L. Hsieh, *Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: casein and lipase enzyme*. Journal of Materials Science, 2003. **38**(10): p. 2125-2133.
21. Patel, A.C., et al., *In situ encapsulation of horseradish peroxidase in electrospun porous silica fibers for potential biosensor applications*. Nano Letters, 2006. **6**(5): p. 1042-6.
22. Li, C., et al., *Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(16): p. 3115-3124.
23. Bazilevsky, A.V., A.L. Yarin, and C.M. Megaridis, *Co-electrospinning of Core–Shell Fibers Using a Single-Nozzle Technique*. Langmuir, 2007. **23**(5): p. 2311-2314.
24. Yan, S., et al., *Controlled release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **73**(2): p. 376-381.
25. Xu, X., et al., *Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions*. Journal of Controlled Release, 2005. **108**(1): p. 33-42.
26. Tian, L., et al., *Emulsion electrospun nanofibers as substrates for cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2013. **24**(11): p. 2577-2587.
27. Li, X., et al., *Self-accelerated biodegradation of electrospun poly(ethylene glycol)–poly(L-lactide) membranes by loading proteinase K*. Polymer Degradation and Stability, 2008. **93**(3): p. 618-626.

28. Briggs, T. and T.L. Arinzeh, *Examining the formulation of emulsion electrospinning for improving the release of bioactive proteins from electrospun fibers*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014. **102**(3): p. 674-684.
29. Yang, Y., et al., *Release pattern and structural integrity of lysozyme encapsulated in core–sheath structured poly(dl-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **69**(1): p. 106-116.
30. Wang, Y., et al., *Electrospun composite nanofibers containing nanoparticles for the programmable release of dual drugs*. Polymer Journal, 2011. **43**(5): p. 478-483.
31. Yarin, A.L., *Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core–shell fibers*. Polymers for Advanced Technologies, 2011. **22**(3): p. 310-317.
32. Dror, Y., et al., *One-Step Production of Polymeric Microtubes by Co-electrospinning*. Small, 2007. **3**(6): p. 1064-1073.
33. Reddy, C.S., et al., *Fabrication of thermoset polymer nanofibers by co-electrospinning of uniform core-shell structures*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(39): p. 7198-7201.
34. Mickova, A., et al., *Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system*. Biomacromolecules, 2012. **13**(4): p. 952-62.
35. Tiwari, S.K., et al., *Optimizing partition-controlled drug release from electrospun core–shell fibers*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **392**(1–2): p. 209-217.
36. Sahoo, S., et al., *Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **93A**(4): p. 1539-1550.
37. Li, H., et al., *Controlled release of PDGF-bb by coaxial electrospun dextran/poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) fibers with an ultrafine core/shell structure*. J Biomater Sci Polym Ed, 2010. **21**(6): p. 803-19.
38. Liao, I.C., S.Y. Chew, and K.W. Leong, *Aligned core–shell nanofibers delivering bioactive proteins*. Nanomedicine, 2006. **1**(4): p. 465-471.
39. Jia, X., et al., *Sustained Release of VEGF by Coaxial Electrospun Dextran/PLGA Fibrous Membranes in Vascular Tissue Engineering*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2011. **22**(13): p. 1811-1827.
40. Buzgo, M., et al., *Time-regulated drug delivery system based on coaxially incorporated platelet alpha-granules for biomedical use*. Nanomedicine, 2013. **8**(7): p. 1137-1154.

41. Zhang, X., et al., *Flexible Generation of Gradient Electrospinning Nanofibers Using a Microfluidic Assisted Approach*. Langmuir, 2012. **28**(26): p. 10026-10032.
42. Mehta, M., et al., *Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(12): p. 1257-76.
43. Ferreira, A.M., et al., *Collagen for bone tissue regeneration*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(9): p. 3191-200.
44. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-91.
45. Kuboki, Y., Q. Jin, and H. Takita, *Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis*. J Bone Joint Surg Am, 2001. **1**(Pt 2): p. S105-15.
46. Puppi, D., et al., *Polymeric materials for bone and cartilage repair*. Progress in Polymer Science, 2010. **35**(4): p. 403-440.
47. Badami, A.S., et al., *Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates*. Biomaterials, 2006. **27**(4): p. 596-606.
48. Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan, *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(1): p. 204.
49. Su, Y., et al., *Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(2): p. 763-71.
50. Zhu, H., et al., *Biological activity of a nanofibrous barrier membrane containing bone morphogenetic protein formed by core-shell electrospinning as a sustained delivery vehicle*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2013. **101**(4): p. 541-52.
51. Fu, Y.-C., et al., *Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2*. Biotechnology and Bioengineering, 2008. **99**(4): p. 996-1006.
52. Prosecká, E., et al., *Optimized conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2011. **99A**(2): p. 307-315.
53. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions*. Instr Course Lect, 1998a. **47**: p. 477-86.

54. Berninger, M.T., et al., *Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for remodeling and repair of chondral defects in a rabbit model*. J Vis Exp, 2013. **21**(75).
55. Puetzer, J.L., J.N. Petite, and E.G. Lobo, *Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(4): p. 435-44.
56. Sohrabi, A., et al., *Sustained drug release and antibacterial activity of ampicillin incorporated poly(methyl methacrylate)–nylon6 core/shell nanofibers*. Polymer, 2013. **54**(11): p. 2699-2705.
57. Kim, K., et al., *Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds*. J Control Release, 2004. **98**(1): p. 47-56.
58. Schagemann, J.C., et al., *Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells via biomimetic and bioactive poly-epsilon-caprolactone scaffolds*. J Biomed Mater Res A, 2013. **101**(6): p. 1620-8.
59. Filova, E., et al., *A cell-free nanofiber composite scaffold regenerated osteochondral defects in miniature pigs*. Int J Pharm, 2013. **447**(1-2): p. 139-49.
60. Tian, L., et al., *Emulsion electrospun vascular endothelial growth factor encapsulated poly(l-lactic acid-co-epsilon-caprolactone) nanofibers for sustained release in cardiac tissue engineering*. Journal of Materials Science, 2012. **47**(7): p. 3272-3281.
61. Zhang, H., et al., *Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration*. Biomaterials, 2013. **34**(9): p. 2202-12.
62. Schnell, E., et al., *Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend*. Biomaterials, 2007. **28**(19): p. 3012-25.
63. Amler, E., A. Mickova, and M. Buzgo, *Electrospun core/shell nanofibers: a promising system for cartilage and tissue engineering?* Nanomedicine (Lond), 2013. **8**(4): p. 509-12.
64. Dohan Ehrenfest, D.M., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Trends in Biotechnology. **27**(3): p. 158-167.
65. Sun, H.H., et al., *Designing biomaterials for in situ periodontal tissue regeneration*. Biotechnol Prog, 2012. **28**(1): p. 3-20.