

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**BAKALÁRSKA PRÁCA**

**2009**

**Bc. Katarína Jančoková**

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**  
**KBBV**

**Využitie nanovláknenných materiálov v biomedicíne**

**Bc. Katarína Jančoková**

**Bakalárska práca**  
**2009**

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, najmä zo skutočností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že ak príde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré som na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa 8.7.2009

Katarína Jančoková

Pod'akovanie:

Za pomoc a cenné pripomienky pri vypracovaní bakalárskej skúšky by som chcela poďakovať vedúcej práce Mgr. Marcele Slovákovej, PhD z KBBV.

## Abstrakt

Témou tejto práce boli nanovlákná v biomedicíne a ich použitie hlavne v tkanivovom inžinierstve. Snažila som sa skĺbiť všetky podstatné informácie ohľadom sľubne sa rozvíjajúceho biomedicínskeho oboru, a to od polymérnych materiálov a výroby kostier metódou electrospinningu, fázovej separácie a samozostavovaním, cez použité pomocné komponenty, ako sú kmeňové bunky a rastové faktory, až po aplikácie jednotlivých typov bunkami posiatych matric pri konkrétnom poškodení, úraze alebo strate určitých častí tela. Text tiež podáva informácie o veľkých výhodách tejto novej terapie a poukazuje aj na vlastnosti vybraných materiálov, a síce ich biodegradabilitu, biokompatibilitu a biomimetiku, ktoré sú nezbytné pre úspešnú liečbu.

Kľúčové slová:

tkanivové inžinierstvo, kostry, biodegradabilita, biomimetika, biokompatibilita, polyméry, kmeňové bunky

## Abstract

The topic of this work was application of new material - nanofibres in biomedicine and their use mostly in tissue engineering. I have joint all substantial information about promisingly developing biomedical branch, from polymer materials and fabrication of scaffolds using method of electrospinning, phase separation and self-assembly, through helpful components, as stem cells and growth factors applied here, to application of particular types of cells seeded frameworks in specific damage, trauma or loss some parts of body. Text also handle information about great advantages of this new therapy and suggest character of selected materials, biodegradability, biocompatibility and biomimetic, too.

Key Words:

Tissue engineering, scaffolds, biodegradability, biocompatibility, polymers, stem cells

## Zoznam skratiek:

2D	dvojdimenzionálne
3D	trojdimenzionálne
bFGF	bázický fibroblastový rastový faktor
bPA	vetvené peptidové amfifily
BMP	kostný morfogenetický proteín
CP	peletová kultúra buniek
DDS	system cieľenej dopravy liečiv
EC	endotelové bunky
ECM	extracelulárny matrix
EG	embryonálne zárodočné bunky
ES	embryonálne kmeňové bunky
FMCC	fetálne kortikálne bunky myši
GaG	glykoaminoglykán
GF	rastový faktor
GP	glycerofosátová soľ
HA	kyselina hyaluronová
HAP	hydroxyapatit
hMSC	ľudské mezenchymové kmeňové bunky
HSC	hematopoetické kmeňové bunky
i.v.	intravenózne
MSC	mezenchymové kmeňové bunky
nHAP	nano-hydroxyapatit
NHEK	normálne ľudské epidermálne keratinocyty
NHOK	normálne ľudské orálne keratinocyty
NSC	neurálne kmeňové bunky
PA	peptidové amfifily
PCL	poly- $\epsilon$ -kaprolaktón
PDGF	rastový faktor odvodený od doštičiek
PDLA	poly-D-laktónová kyselina
PEG	polyetylén glykol

PEO	polyetylénoxid
PET	polyetyléntereftalát
PGA	polyglykolová kyselina
PLA	polylaktidová kyselina
PLGA	kopolymér kyseliny laktidovej a glykolovej
PLLA	poly-L-laktidová kyselina
POE	polyortoester
PPF	polyfumarát
PTFE	polytetrafluóretylén
PU	polyuretán
PVA	polyvinylalkohol
PVAC	polyvinylacetát
RGD	kombinácia aminokyselín Arg-Gly-Asp
rh-BMP-2	rekombinantný ľudský kostný morfogenetický proteín
ROBS	kyslíkovo-permeabilný reaktorový systém
SEM	skenujúca elektrónová mikroskopia
SF	hodvábny fibrín
SMC	hladké svalové bunky
TCP	trikalcium fosfát
TCPS	tkanivový kultivačný polystyrén
TEM	transmisívna elektrónová mikroskopia
TGF- $\beta$ 1	transformačný rastový faktor $\beta$ 1
TGF- $\beta$ 3	transformačný rastový faktor $\beta$ 3
VEGF	cievny epitelový rastový faktor

## Obsah:

1. Úvod.....	9
2. Nanotechnológie.....	10
2.1. Začiatky nanotechnológie.....	10
2.2. Nanovlákná.....	10
2.2.1. Ovplyvnenie priemeru a morfológie.....	12
2.2.2. Kontrola orientácie nanovláknien.....	13
3. Biomedicína.....	14
3.1. Tkanivové inžinierstvo.....	14
3.1.1. Bunky.....	15
3.1.2. Rastové faktory.....	18
3.1.3. Spôsob výroby kostier.....	21
3.1.3.1. Úvod.....	21
3.1.3.2. Electrospinning.....	22
3.1.3.3. Samozostavovanie.....	22
3.1.3.4. Fázová separácia.....	26
3.1.3.5. Materiály na kostry.....	29
3.1.4. Tkanivové inžinierstvo vybraných častí tela.....	31
3.2. Systém cieleného doručenia liečiv.....	39
4. Záver.....	40
5. Zoznam použitej literatúry.....	41

## 1. Úvod

Nanotechnológie predstavujú novodobý smer, ktorý v blízkej budúcnosti obsiahne takmer každú oblasť technológií, postupov ako aj produktov, manipulujúcich s hmotou na úrovni atómov. Jednou s takýchto oblastí je aj oblasť medicíny a farmácie.

Väčšina procesov vyskytujúcich sa v ľudskom tele prebieha na úrovni molekúl a atómov, a preto sa výsledky nanotechnologického výskumu môžu skvele uplatniť práve tu.

Nanomedicína sa skladá s viacerých častí. Molekulárna medicína slúži k detekcii choroby, náhrade tkanív a orgánov, regeneračná medicína používa biokompatibilné materiály, chirurgia pracujúca v nanomerítke, systémy pre cielený transport liečiv, génovú terapiu a vplyv nanoobjektov na životné prostredie.

Sľubne rozvíjajúcim sa oborom je tkanivové inžinierstvo, schopné za pomoci multi alebo pluripotentných buniek a príslušných rastových faktorov obnoviť alebo plne nahradiť poškodené tkanivo. Jedná sa hlavne o tkanivové inžinierstvo kože, kostí, chrupaviek, srdca, ciev a nervov, pričom spektrum využitia sa stále zväčšuje. Dôležitým prvkom, slúžiacim ako templát sú prírodné a syntetické polyméry pripravené metódou electrospinningu, fázovej separácie a samozostavovania. Každá metóda má svoje výhody a špecifiky použitia.

U materiálu zohráva dôležitú úlohu čo najväčšia podobnosť k pôvodnému extracelulárnemu matrixu (ECM), ďalej schopnosť zabrániť reakciám imunitného systému a akási podriaditeľnosť materiálu k výrobe kostry žiadaných vlastností, ako je napríklad rýchlosť degradácie. Posledná vlastnosť sa dá upraviť nastaveniami procesu výroby, lebo ako bude spomenuté, hrúbka a usmernenie nanovlákien silne ovplyvňuje prichytenie kľúčových buniek a ich migráciu, proliferáciu a diferenciáciu v pripravenom tkanive.

K nanomedicíne patrí aj systém cieleného transportu liečiv. Cieľom tejto oblasti je vylepšiť farmakokinetiku a farmakodynamiku lieku, poprípade bioaktívnej molekuly, a tým zvýšiť účinnosť látky na požadovanom mieste, pričom sa súčasne zníži jeho toxicita voči ostatným tkanivám. Typickým príkladom by mohlo byť napríklad liečenie rakoviny.

Dôležité je uvedomiť si, že všetky vyššie popísané procesy prebiehajú na úrovni menšej ako 1000 nm, či už sa jedná o priemer vlákien, alebo veľkosť častíc.

## 2. Nanotechnológie

### 2.1. Začiatky nanotechnológií

Pojem nanotechnológie, nanoštruktúry bol známy už od roku 1965, kedy ho zaviedol do povedomia americký fyzik R. P. Feynman, neskorší nositeľ Nobelovej ceny za fyziku.

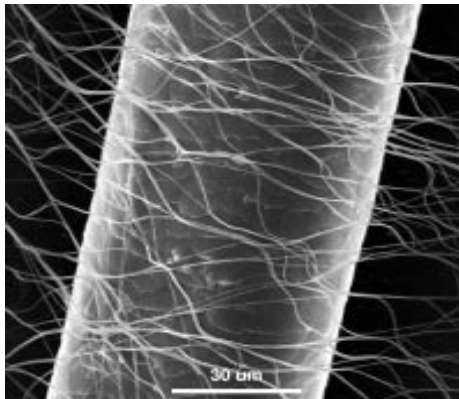
Predstavoval súhrn všetkých elementov, ktorých veľkosť nepresahovala 1  $\mu\text{m}$ . Jednalo sa teda o atómové a molekulové rozmery. Feynman vyjadril presvedčenie, že ľudia v blízkej budúcnosti nanosvet poznajú a ovládnu.

V dnešnej dobe predstavujú nanotechnológie súčasť štyroch hlavných oblastí, a to mikroskopie, pracujúcej s rozlíšením v nanometroch, nanoelektroniky, molekulárnej nanotechnológie a nanomateriálov.

Jednou z interdisciplinárnych sfér, ktorá v súčasnosti začína 'zbierať plody svojej činnosti', je rozhranie medzi biologickými vedami a nanotechnológiami. Konvergencia oboch vyššie spomenutých vied je doménou bionanotechnológií, eventuálne nanobiotechnológií [1].

### 2.2. Nanovlákná

Najperspektívnejšie uplatnenie predstavujú polymérne nanovlákná. Polymérne nanovlákná je pojem používaný pre vlákno o priemere menšom než je 1  $\mu\text{m}$  (Obr.č.1). Dnes sú to najmä rozmery od 40 do 200 nm.



Obr.č.1- Porovnanie veľkosti nanovlákien s ľudským vlasom (prevzaté z Sodomka L.: Nanovlákná-štruktúra, vlastnosti, technológie, použitie )

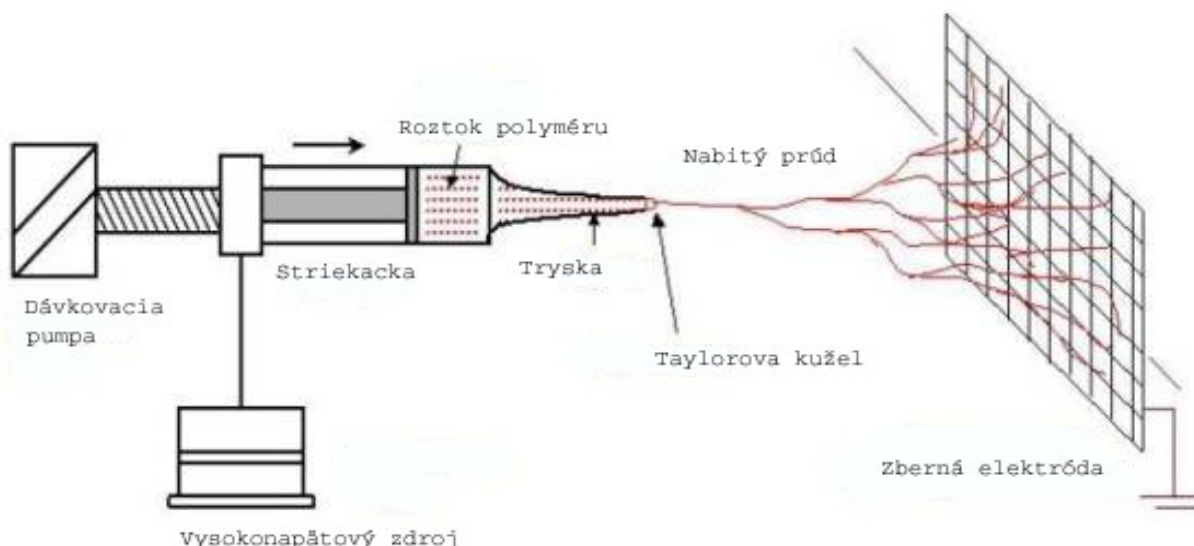
Prvé pokusy o výrobu nanovlákien boli realizované v rokoch 1934-1944 a to za pomoci elektrostatickej sily (firma Formhals). Proces sa postupne zdokonaľoval, a na všetkých

bádateľov v tejto oblasti ( Vonnegut a Neubauer, Drozin, Simon, Baumgarten) naviazal výskumný tím profesora Oldřicha Jirsáka z Technickej univerzity v Liberci. Výsledkom bola technológia, ktorá umožňuje priemyselnú výrobu nanovlákien, kľúčového materiálu tretieho tisícročia, najmä v biomedicíne.

Najpoužívanejším spôsobom výroby nanovlákien je elektrostatické zvlákňovanie, electrospinning, metóda tiež známa už od roku 1934, no značne vylepšená s ohľadom na kvantitu nanovlákien.

Prístroj, ktorý slúži na výrobu nanovlákien sa nazýva nanospider. Jeho súčasťou sú 2 elektródy, medzi ktorými vzniká elektrostatické pole. Jedna z elektród je ponorená do taveniny alebo častejšie do roztoku polyméru, druhá protiľahlá elektróda s opačným nábojom predstavuje kolektor, teda zberač nanovlákien. Elektrostatické pole vzniká pripojením vysokého napätia. Proces je založený na princípe, že silné elektrostatické sily prekonajú slabšie sily predstavované povrchovým napätím v nabitom polymérom roztoku [2]. Ten sa nachádza v podobe kvapky na konci trysky, kam je pumpovaný prostredníctvom striekačky z roztoku polyméru. Po prekonaní týchto síl je kvapka preťahovaná a vzniká jemný nabitý prúd smerujúci od konca trysky k uzemnenému kolektoru. Počas tejto transportnej fázy prúd podlieha elektricky stimulovaným kruhovým pohybom, ktoré spôsobujú výrazné predlžovanie, súčasne dochádza k vyparovaniu roztoku a formovaniu pevného nanovlákná ukladajúceho sa na zbernú elektródu (Obr.č.2) [3]. Tieto procesy sú iniciované z nestability systému, čo má za následok ohýbanie a naťahovanie prúdu, a teda podieľa sa na znižovaní priemeru vlákna.

U technológii electrospinningu sa dajú použiť rôzne modifikácie, a to v polohe tryska-protielektróda, ktorá môže byť tak horizontálna, ako vertikálna, a v pozícii kolektoru, ktorý môže byť statický alebo pohyblivý. Vlákna môžu byť ukladané do zámotku alebo navíjané ako monofil na priadze [4]. Boli taktiež vyvinuté systémy na tvorbu trubičkových vlákien.



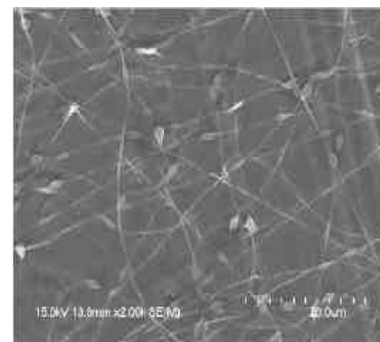
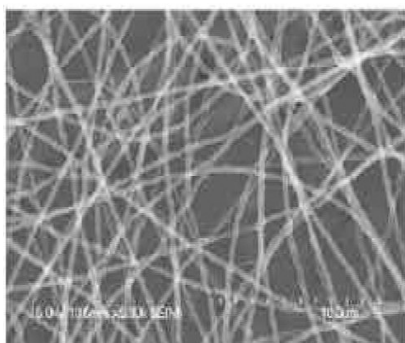
Obr.č.2-schéma elektrostatičkého zvlákňovania (prevzaté z [www.google.com](http://www.google.com): Electrospinning setup, stiahnuté 20.2 2009)

### 2.2.1.Ovplyvnenie priemeru a morfológie nanovlákien

Priemer nanovlákien, takisto ako aj povrchová topológia (hladká či porózna), závisia na systémových a procesných parametroch. Medzi systémové parametre patrí molekulová hmotnosť polyméru, vlastnosti jeho roztoku, a síce koncentrácia, vodivosť, viskozita a povrchové napätie. Týmito vlastnosťami sa dá predurčiť priemer nanovláki, tiež sa dá predchádzať vzniku zhrubnutia do tvaru kvapky v určitých miestach nanovláki ( bead formation). Parametre procesu ako rýchlosť toku polymérneho roztoku, elektrický potenciál, priemer trysky alebo vzdialenosť medzi tryskou a kolektorom a jeho pohyb tiež ovplyvňujú vlastnosti a tvar vlákna [5].

Mnohé s týchto parametrov vopred predurčujú schopnosť kvapaliny zúčastniť sa procesu electrospinningu. Bolo zistené, že pri strednej koncentrácii polyméru v roztoku a strednej molekulovej hmotnosti , boli nanovláki v určitých miestach zhrubnuté (tvar kvapky)(Obr.č.5), čo sa dalo potlačiť napríklad pridaním soli [2].

Na základe ovplyvnenia vyššie spomenutých vlastností boli tiež získané nanovláki v tvare pásov (ribbon-like) (Obr.č.4) alebo v priečne zloženom tvare.



Obr.č.3-nanovlákná

Obr.č.4-nanovlákná v tvare  
stuhý

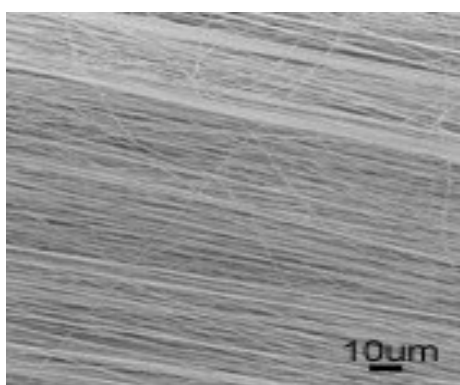
Obr.č.5-kvapkový tvar  
nanovlákná

(prevzaté z SY Chew et al: The Role of Electrospinning in the Emerging field of Nanomedicine)

Zaistenie a možnosť vytvoriť požadované nanovlákná čo do tvaru a porozity má pre biomedicínske účely veľký význam.

### 2.2.2.Kontrola orientácie nanovláknien

Bežným electrospinningom sa dajú získať vlákna, ktoré sú orientované náhodne. Pre širšie použitie v biomedicíne je nutné, aby orientácia nanovláknien bola usmernená ( obr.č.6). Preto boli vyvinuté ďalšie metódy, zaoberajúce sa touto problematikou. Ako najvhodnejšou metódou sa javí použitie separačných kolektorových elektród, ktoré dokážu vytvoriť usporiadané nanovláknenné zoskupenia alebo pláty, ktoré sú vhodným terminálnym produktom napríklad v tkanivovom inžinierstve. Celý proces tak vedie k tvorbe vysoko upravených trojdimenzionálnych (3D) štruktúr [2].



Obr.č.6-usporiadané nanovlákná (prevzaté z [www.google scholar.com](http://www.google scholar.com) : aligned nanofibres, stiahnuté 20.2 2009)

### 3. Využitie nanovlákién v biomedicíne

Hlavnými oblasťami využitia nanovlákién sú tkanivové inžinierstvo, regeneračná medicína a systémy uvoľňovania liečiv.

#### 3.1. Tkanivové inžinierstvo

Obnova tkaniva alebo orgánu poškodeného úrazom, vrodenu anomáliou alebo rakovinou autológnyimi bunkami, tzv. tkanivová transplantácia, je jednou z najslubnejších techník tkanivovej regenerácie. Avšak, i autológne (telu vlastné) štepy sú spojené s obmedzeniami, a síce morbidita na strane donoru a limitovaná vhodnosť transplantátu. Alternatívou k autológnyim štepom sú aloštepy, kedy je darcom tkaniva iný jedinec rovnakého druhu. Ale aj v tomto prípade existujú obmedzenia v podobe odmietnutia transplantátu príjemcom a možného prenosu choroby. V prípade celých orgánov je to ich nedostatok a tiež možná silná imunitná odpoveď príjemcu eventuálne doživotná imunosupresívna terapia.

Približne 3 desaťročia dozadu sa vyskytla nová forma alternatívneho prístupu ku tkanivovým a orgánovým obnovám. Tou formou je tkanivové inžinierstvo. Jeho výhodou je schopnosť obísť prípadné vyššie spomenuté nedostatky autológnej a alogénnej obnovy tkaniva, a tým zabezpečiť opravu a regeneráciu. Jedná sa o interdisciplinárny odbor aplikujúci poznatky z biológie, chémie a inžinierskych vied na vývoj biologických náhrad z cieľom obnoviť, zachovať alebo zlepšiť funkciu tkaniva. K formovaniu nových tkanív toto biomedicínske inžinierstvo využíva 3 základné zložky: bunky, rastové faktory a patričný skelet. Tieto zložky môžu byť použité buď samotné, alebo v kombinácii. Napríklad k regenerácii kosti sa využíva len kostný morfogenetický proteín (BMP), kým k regenerácii kože stačí kolagénna porózna štruktúra bez rastových faktorov [6]

Stratégia tkanivového inžinierstva zahrňuje izoláciu zdravých buniek z pacienta s následným zväčšením a pomnožením buniek *in vitro*. Takto pripravené bunky sú implantované do 3D biodegradabilného skeletu, ktorý poskytuje bunkám oporu a slúži tiež ako rezervoár pre bioaktívne molekuly- rastové faktory (GF). Skelet musí poskytnúť vhodné podmienky pre ďalšiu rast, diferenciáciu a migráciu buniek. Tiež musí byť tvarovo upraviteľný podľa miesta použitia. Veľká povrchová plocha skeletu napomáha bunkovej adhézii.

### 3.1.1. Bunky a ich použitie v tkanivovom inžinierstve

Zo schopnosťou formovať nanovláknenné kostry sa začalo formovať úsilie napodobniť extracelulárny matrix (ECM) a vytvoriť tým umelý, vhodný pre tkaninové inžinierstvo. ECM nepredstavuje len fyzickú podporu pre bunky, ale taktiež poskytuje prirodzené prostredie pre bunkovú proliferáciu, diferenciáciu alebo morfogenézu, čo prispieva k regenerácii a organogenéze tkaniva z podkladom buniek [7].

Takáto štruktúra by napodobňovala kolagén, látku prirodzene sa vyskytujúcu v ECM skoro každého tkaniva. Príkladom sú kosti, koža, šľachy, krvné cievy a ligamentúry. Oblasť výskumu sa tiež zameriava na vytvorenie chrupavky, regeneráciu buniek pankreasu, buniek nervového systému eventuálne buniek pečene, a to najmä prostredníctvom kmeňových buniek (SC) [6].

Bunky sa spravidla delia na autológne, pochádzajúce s rovnakého pacienta, ktorému sú znovu reimplantované. Potom sú to bunky alogenické, pochádzajúce od darcu rovnakého živočíšneho druhu a nakoniec sú to bunky xenogénne, izolované z jedinca iného druhu [1] používané hlavne ako vyživovacie bunky v tkanivovom inžinierstve kože. Ako najvýhodnejšie sa zdajú byť bunky autológne. Zachovávajú si vysokú aktivitu a nevyvolávajú imunitnú odpoveď. Kmeňové bunky sa dajú rozdeliť na základe rozdielu v rozsahu diferenciácie, teda v rozsahu vzniku viac špecializovaných buniek z pôvodne menej diferenciovaných elementov.

Medzi bunky nediferenciované patria embryonálne kmeňové bunky (ES), odvodené od embryoblastu blastocysty vyvíjajúceho sa embrya. Tiež sem patria embryonálne zárodočné bunky (EG), primitívne pluripotentné kmeňové bunky odvodené z prvopohlavných buniek plica genitális časného embrya [8]. Obe sú schopné produkovať množstvo diferenciovaných buniek tela a obnovovať sa. Majú tiež potenciál zväčšovať celkový počet buniek bez obmedzenia. Hovorí sa o tzv. pluripotencii ( prípadne totipotencii), ktorá je hlavným dôvodom použitia týchto buniek. Avšak, použitie nediferenciovaných buniek zahŕňa množstvo problémov v prípade liečby pacientov. Príkladom sú ES bunky získané z nadbytočných embryí, ktoré sú produkované na klinikách umelého oplodnenia. Vo veľmi rannej fázi vývoja, v ktorej je embryo tvorené zhruba 1000 bunkami, môžu byť oddelené a rozmnožené v tkanivových kultúrach [9]. Takéto kmeňové bunky predstavujú nežiaduce účinky v podobe odmietnutia bunkového transplantátu imunitným systémom príjemcu.

Jednou z možností odstrániť tento problém je prenesenie jadra somatickej bunky príjemcu do bezjadrovej embryonálnej kmeňovej bunky. Táto technológia ale nastoľuje otázku etiky [8] a možného zneužitia v oblasti klonovania.

Druhou skupinou buniek sú bunky už diferenciované, ale súčasne schopné ďalšej diferenciacie. Takéto kmeňové bunky sa vyskytujú v kostnej dreni dospelých jedincov, boli zistené aj v tukovom tkanive. Dospelé kmeňové bunky môžu diferenciovať do mnohých línií vzhľadom na prítomné podmienky [6], hovorí sa o ich multipotencii. Ich úlohou už nie je zvyšovať počet, ako to bolo v predchádzajúcom prípade ES a EG buniek, ale udržať konštantný počet diferenciovaných buniek v danom tkanive.

Najviac preštudovanými bunkami sú hematopoetické kmeňové bunky (HSC), nachádzajúce sa tiež v kostnej dreni. Bunky sú schopné vytvárať eosinofily, bazofily, neutrofile, erytrocyty, megakaryocyty, tiež osteoklasty a T- a B-lymfocyty. Kostná dreň tiež obsahuje mesenchymatické kmeňové bunky (MSC), ktoré diferenciujú do niekoľkých typov buniek spojovacieho tkaniva, ako sú osteocyty, chondrocyty, adipocyty, myocyty, tenocyty a bunky strómy kostnej drene. Nedávne štúdie tiež odhalili schopnosť diferenciacie aj do ďalších typovo špecifických buniek, ako sú kardiomyocyty, endotelové bunky, hepatocyty a nervové bunky.

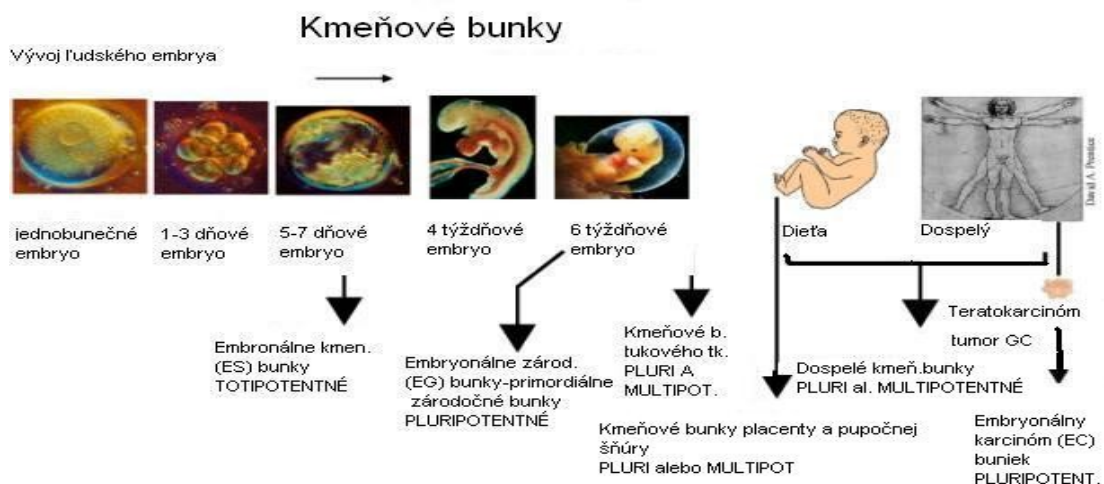
Takéto kmeňové bunky majú schopnosť buď ostať kmeňovou bunkou (self-renewal), alebo sa stať ďalším typom bunky s viac špecializovanou funkciou. V prípade ES buniek vedci zistili, že väčšina buniek je na začiatku množenia v poriadku, počas kopírovania genetickej informácie ale dochádza k chybám. Čím dlhšie sú bunky kultivované, tým viac podliehajú bunkovému deleniu a zvyšujú tak množstvo mutácií vo svojich génoch. Niektoré z mutácií hrajú hlavnú rolu v premene normálnych buniek na rapídne sa množiace rakovinové bunky- teratómy[10]. Výskumnému tímu Hebrejskej univerzity v Jeruzaleme sa podarilo zistiť, že inhibíciou kľúčového génu môžu predísť tvorbe terátomu.

Výhodou MSC je, že môžu byť stimulované *in vitro* a *in vivo* k diferenciacii nie len do rôznych typov mezodermálnych buniek, ale aj do ektodermálnych a endodermálnych buniek [8], ďalej vysoká bezpečnosť v porovnaní s ES bunkami, ktoré môžu zapríčiniť vznik terátomu, ak sú transplantované pred samotnou diferenciaciou do určitej požadovanej línie.

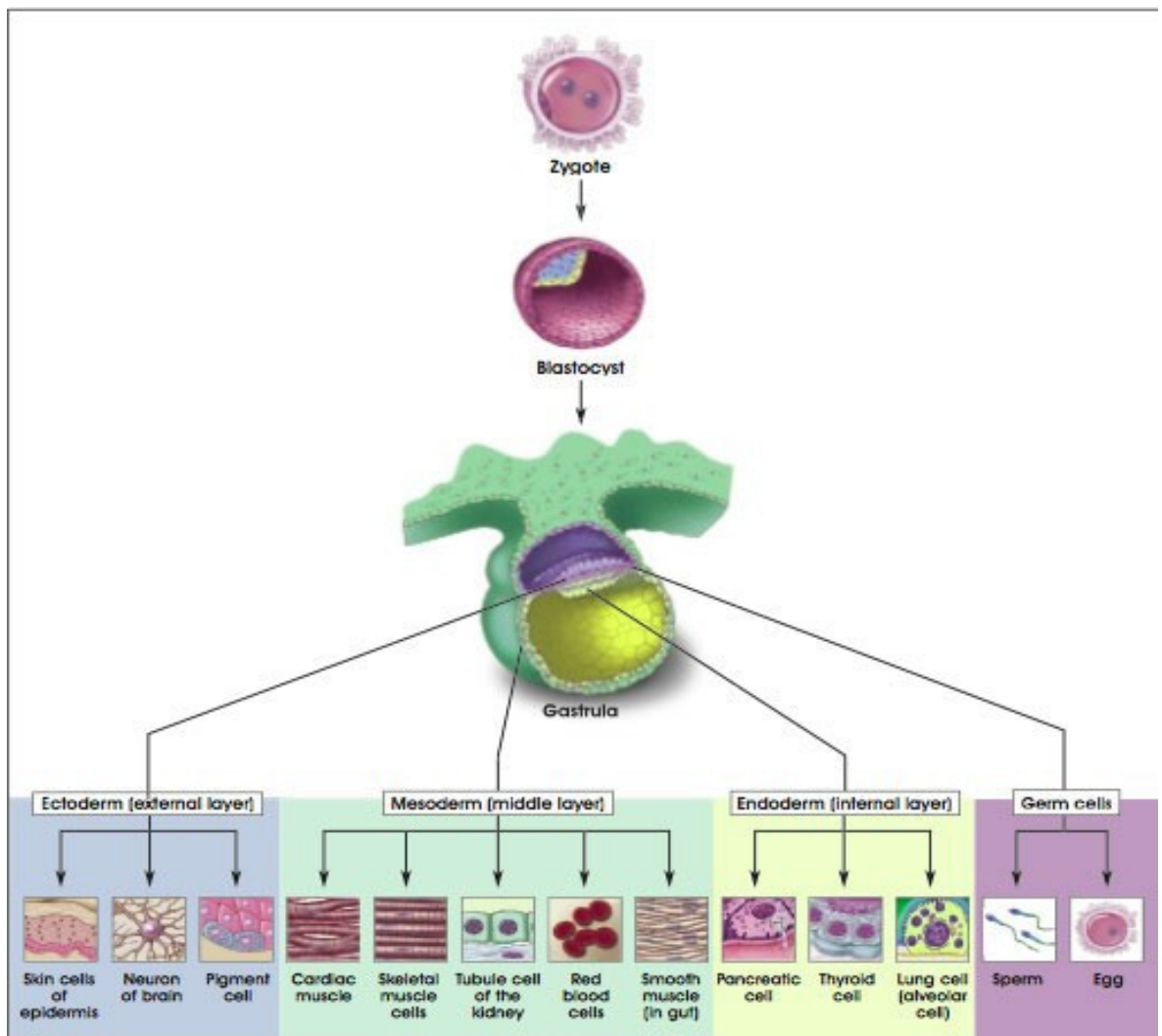
Z vyššie uvedeného vyplýva, že kompletná diferenciacia a ošetrovanie buniek odvodených od ES je nezbytným predpokladom pre ich klinické použitie. Je nutné tiež poznamenať

zaujímavosť, že bunky kostnej drene dokážu špecificky regenerovať tkanivo miesta, kam boli transplantované, hoci kostná dreň obsahuje rôzne druhy kmeňových buniek. Bunky kostnej drene sa dajú získať relatívne ľahko a ľahko aj expandujú [6] A vzhľadom nato, že pacientovi by boli odobrané jeho vlastné bunky, imunologické odmietnutie by už viac nebolo otázkou. Vďaka vretenovitému tvaru podobnému fibroblastom adherujú na dno misky s kultúrou *in vitro* pomerne ľahko, a preto boli všetky bunky MSC definované ako adherujúce bunky z kostnej drene s profilom fibroblastov (alebo tiež mezenchymové progenitorové bunky) [11]. Ak môžu podliehať transdiferenciácii, čo je schopnosť určitej zadanej bunky diferenciovať v elementy patriace inému tkanivu [8] pod vplyvom správneho signálu, môžu sa stať univerzálnymi kmeňovými bunkami.

Počet odobraných dospelých kmeňových buniek, avšak, v mnohých prípadoch nie je postačujúci pre klinické vyžitie. Preto je nutné zvýšiť počet buniek za pomoci bunkovej kultúry. Po 16 dňoch pestovania buniek bolo získaných 100 miliónov MSC z iba 3 ml čerstvej ľudskej drene [11]. Ak sú bunky kultivované na dvojdimenzionálnej (2D) štruktúre, proliferujú postupne primeranou rýchlosťou, ale ich kultivácia je sprevádzaná de-diferenciáciou. Naproti tomu, de-diferenciácia sa nevyskytuje, keď sú kmeňové bunky kultivované na trojdimenzionálnom (3D) skelete, ale na úkor rýchlosti proliferácie, ktorá je nižšia.



Obr.č.7-získavanie a potenciál kmeňových buniek (prevzaté z [www.google.com](http://www.google.com): Stem cells, stiahnuté 15.3.2009)



Obr.č.8- vývoj bunčných línii (prevzaté z [www.google.com](http://www.google.com): Stem cells, stiahnuté 15.3 2009)

### 3.1.2.Rastové faktory

Výhodou kožného tkaniva získaného v procese tkaninového inžinierstva, hoci aj alogénického pôvodu, v porovnaní s klasickými náplastami je prítomnosť a pôsobenie rastových faktorov na poranenú oblasť.

Rastové faktory sú cytokíny, ktoré sú sekretované mnohými typmi buniek a slúžia ako biosignálne molekuly. Podporujú alebo predchádzajú bunkovej adhézii, proliferácii, migrácii a diferenciácii up a down-reguláciou tvorby proteínov, iných rastových faktorov a receptorov . Pôsobia teda buď stimulačne alebo inhibične. Tieto proteíny sú endogénne látky vylučované do tela bunkami a to buď samotnými, na ktoré pôsobia (autokrinné bunky), alebo predstavujú výsledok komunikácie s okolitými bunkami (parakrinné bunky) [6]. Pre úplnosť existujú ešte bunky endokrinné, juxtakrinné a intrakrinné. Mnohé bunkové typy dokážu produkovať rovnaké rastové faktory a jeden rastový faktor môže pôsobiť na viacero typov buniek s rovnakým ale a iným efektom. Tiež je možné pomocou jedného rastového faktoru ovplyvniť sekréciu a účinok iných rastových faktorov (synergizmus, antagonizmus).

Rastové faktory sa nenachádzajú v organizme ako predvytvorené, ale tvoria sa až na základe určitého signálu. Rastové faktory sprostredkujú svoju účinnosť na cieľových bunkách prostredníctvom receptorov na ich povrchu. Ich polčas života je však krátky, preto sú účinné len v určitom časovom intervale. Napríklad rastový faktor izolovaný z krvných doštičiek (PDGF) vykazuje po i.v. podaní polčas života len 2 minúty, nemôže byť preto detekovaný v krvnom obehú [12].

Proteíny, ktoré sú často používané v procese tkaninového inžinierstva zahŕňujú bázický fibroblastový rastový faktor (bFGF alebo FGF-2), cievny epitelový rastový faktor (VEGF) a kostný morfogenetický proteín (BMP), ktorý vyvoláva hojenie a regeneráciu kostí. bFGF je jedným z angiogénových faktorov a má schopnosť zvyšovať hojenie rany, regeneráciu kostí, chrupaviek, kože, nervového a tukového tkaniva prostredníctvom vyvolania angiogénny, novotvorby ciev. VEGF je tiež proteínom stimulujúcim angiogénny. Bolo ale zistené, že krvné cievy regenerované za pomoci VEGF boli jemnejšie a tento faktor vyvolával vznik edému. Z tohoto dôvodu je preferovaný skôr bFGF [7].

Obdivuhodná schopnosť rastových faktorov môže byť predpokladaná tiež z faktu, že BMP a bFGF aj samotné dokážu vyvolať kostnú a cievnu regeneráciu, bez prítomnosti skeletu alebo implantovaných buniek. Očividne, prídavok vhodných rastových faktorov do skeletu s bunkami musí prirodzene zlepšiť tkanivovú regeneráciu v porovnaní so skeletom len s bunkovou kultúrou [6].

Boli vyvinuté tri metódy pre doručenie rastových faktorov. Jednou je použitie DNA plazmidov, ktoré obsahujú zakódovanú genetickú informáciu k požadovaným rastovým

faktorom. Po vložení takéhoto plazmidu do tela, začne plazmid syntetizovať faktory a tie sa následne vylučujú z bunky, v ktorej sa nachádza plazmid, kým je aktívny. Druhá metóda tiež využíva genetické technológie. Gén kódujúci rastový faktor je transferovaný do špecifického typu buniek pomocou nejakého vektora (napríklad vírového). Bunky sú následne transplantované na miesto, kde majú byť príslušné rastové proteíny vyvíjané. V tretej metóde, rastový proteín je priamo aplikovaný spolu s nosičom. Tento prístup je najvhodnejší pre tkanivové inžinierstvo. Rastové faktory na jednej strane dopomáhajú ku kultivácii buniek na polymérnej štruktúre, na strane druhej dokážu zlepšiť tkanivovú regeneráciu.

Výber nosiča veľmi ovplyvňuje uvoľňovaciu kinetiku rastového faktoru [6]. Tiež zabezpečuje ochranu rastového faktoru proti proteolýze ako aj predlžuje jeho aktivitu *in vivo* zadržiavaním [7]. Praktickým príkladom aplikácie je použitie v DDS (kap.č.3.2).

K faktorom zvýšenia účinnosti rastových polypeptidov *in vivo* patrí umožnenie neprerušeného uvoľňovania bioaktívnych molekúl v širšom časovom intervale pomocou rôznych mechanizmov, tiež nutnosť zábrany eventuálne zníženia stupňa denaturácie a agregácie proteínov počas prípravných fáz na minimum, zaistenie schopnosti absorbancie rastových faktorov do tela a súčasne zabezpečiť biodegradabilitu polymérnej štruktúry, vystupujúcej ako nosič, ktorá definuje kapacitu novoformovaného tkaniva. Trvanie uvoľňovania proteínov z matrixu kostry polyméru okrem spomenutej štruktúry nosiča ovplyvňuje prirodzene aj ich koncentrácia a vlastnosti procesu.

Ku konkrétnym materiálom využívaným ako nosiče sa osvedčili najmä hydrogély, vzhľadom na ich biobezpečnosť a vysokú inertnosť k proteínovým látkam.

Príkladom polymérneho materiálu je želatína, biokompatibilný derivát kolagénu. Komerčne dostupné sú dva typy želatíny, a to kyslá a zásaditá. Kyslá forma má schopnosť viazať sa do komplexu zo zásaditými proteínmi a naopak. Je preto očakávané, že bFGF bude uvoľňovaný z komplexu vzniknutého zmiešaním kyslej želatíny a bázického rastového faktoru po implantovaní do tela, ako výsledok enzymatického odbúravania želatíny. Použitím tohoto hydrogélu bolo zistené kontrolované uvoľňovanie rastových faktorov v časovom intervale od 5 dní po 3 mesiace [7].

Aplikácia rastových faktorov v tkanivovom inžinierstve bude urýchlená, keď sa rastové faktory stanú viac dostupnejšie a menej drahé.

### 3.1.3. Spôsoby výroby kostier pre tkanivové inžinierstvo

#### 3.1.3.1. Úvod

Vytvorenie štruktúr, ktoré napodobňujú architektúru tkaniva v nanorozmeroch je jednou z hlavných výziev v oblasti tkanivového inžinierstva [5].

Prirodzene, tkanivo tela sa skladá z dvoch kompartmentov, a síce z buniek a okolitého prostredia. Prostredie zahŕňa extacelulárny matrix (ECM) pre bunečnú proliferáciu a diferenciáciu (akási prírodná "kostra"), teda miesto pre život buniek a biosignálnych molekúl ako ich živín [7].

Bolo by veľmi výhodné pre pacientov aj lekárov, ak by zdevastované tkanivá alebo orgány pacientov mohli byť regenerované jednoduchou bunkovou injekciou do cieľového miesta, ale také prípady sú pomerne zriedkavé. Väčšina väčších poškodených tkanív alebo orgánov s jasnou 3D štruktúrou bude vyžadovať podporu pre ich obnovu z buniek. Touto podporou je kostra, templát, alebo umelý ECM. Hlavnou funkciou tejto kostry, prirodzene ako je funkcia prírodného ECM, je asistovať v proliferácii, diferenciácii a biosyntéze buniek [6].

Aby boli zaistené správne funkcie podpornej kostry v tkanivovom inžinierstve, musí kostra zahŕňať množstvo požiadavok. Po prvé, mala by mať prepojené mikropóry, čo umožňuje naočkovať veľké množstvo buniek, môžu migrovať do vnútra štruktúry, môžu sa deliť a byť vyživované množstvom živín. Mikropóry umožňujú tiež odvod katabolitov. Toto všetko je dôležité pre prežitie buniek. Optimálna veľkosť póru je v rozmedzí 100-500  $\mu\text{m}$ . Okrem optimálnej porozity by mala mať kostra adekvátnu povrchovú plochu a mechanickú silu. Absorpčná kinetika je tiež kritická a závisí na tkanive, ktoré má byť regenerované [6].

Ako biomateriály boli skúmané a použité rôznymi spôsobmi rozmanité syntetické a prírodné polyméry, keramické látky a kovy alebo ich zmesi. Z praktického hľadiska, kovy a keramické látky, okrem karbidu vápenatého a trikalcia fosfátu, nie sú biodegradateľné. Naproti tomu niektoré polyméry predstavujú biodegradateľné materiály. Slovo biodegradácia je definované ako fenomén, kde materiál je rozložený alebo rozpustený vo vode hocijakým procesom v tele, aby sa tým odstránil z miesta kde bol implantovaný [7]. Kostra a jej degradačné fragmenty by nemali byť ani cytotoxické, ani by nemali spôsobiť imunitnú, zápalovú, trombogénnu odpoveď [13].

Existujú dve cesty ako odbúrať materiál. Po prvé, hlavný reťazec materiálu je hydrolyzovaný alebo enzymaticky natrávený a tým sa znižuje jeho molekulová hmotnosť, až sa stratí úplne. Po druhé, materiál je chemicky zosieťovaný aby vytvoril hydrogél, nerozpustný vo vode. Keď je priečna väzba (tvoriaca zosietenie) narušená, vznikajú fragmenty rozpustné vo vode a môžu byť postupne odplavené z miesta implantácie. Syntetické polyméry sú vo všeobecnosti degradované jednoduchou hydrolýzou, kým prírodné polyméry sú rozkladané hlavne enzymaticky. Tiež bolo zistené, že syntetické polyméry sú hydrofóbne a mechanicky silné v porovnaní s prírodnými polymérmi. Na druhej strane, rýchlosť ich degradácie je porovnateľne nižšia [7].

V súčasnosti existujú tri techniky vhodné pre syntézu nanovlákiem ako biologických kostier napodobňujúcich ECM, s rôznymi stupňami úspešnosti. Je to electrospinning, samozostavovanie, a fázová separácia.

#### 3.1.3.2. Electrospinning

Electrospinning je najviac preštudovanou technikou a tiež ukázal najsľubnejšie výsledky z hľadiska aplikácie v tkanivovom inžinierstve. Technika poskytuje možnosť kontroly hrúbky a zloženia nanovlákiem spolu s porozitou nanovláknenných sietí použitím relatívne jednoduchej experimentálnej zostavy (princíp v kap.2.2.) [5].

Množstvo prírodných makromolekúl (kolagén, hodváb, fibrinogén,...) a syntetických polymérov (kyselina polyglykolová PGA, kyselina poly-L-laktidová PLLA, kopolymér predchádzajúcich dvoch polymérov PLGA, polykaprolaktón PCL,...) bolo spracovaných touto technikou do jemných netkaných vlákien pre výskum v tkanivovom inžinierstve. Bolo ohlásené, že na electrospinningom vytvorených nanovláknach adherovali, proliferovali a diferencovali mnohé bunky a tiež si dokázali zachovať svoj fenotyp [14].

#### 3.1.3.3. Samozostavovanie

Samozostavovanie je voľne definované ako autonómne organizovanie komponent do určitých vzorov alebo štruktúr bez ľudského zásahu [14]. Vzory vzniknuté pri samozostavovaní majú presnú štruktúru, veľkosť a tvar [1].

Úspech samozostavovania v molekulovom systéme je určený piatimi charakteristikami:

a) zložky systému:

Samozostavovací systém pozostáva zo skupiny molekúl alebo častí molekúl, ktoré medzi sebou interagujú. Tieto molekuly alebo časti molekúl môžu byť buď rovnaké, alebo

rozdielne. Ich interakcia vedie k tomu, že systém prechádza z menej usporiadaného stavu (roztok, neusporiadané agregáty, náhodné zvitky) ku konečnému viac usporiadanému stavu (kryštál alebo zložená makromolekula).

b) interakcie:

Samozostavovanie nastáva, keď molekuly interagujú medzi sebou prostredníctvom rovnováhy príťažlivých a odpudivých síl. Tieto sily sú vo všeobecnosti slabé a nekovalentné (van der Waalove sily a Coulombove interakcie, hydrofóbne interakcie, vodíkové mostíky), ale boli pozorované aj slabé kovalentné väzby (koordinačné väzby). Komplementarita v tvaroch komponent je tiež kľúčová.

c) reverzibilita (alebo prispôsobivosť):

Pri samozostavovaní usporiadania štruktúr, združovanie zložiek musí byť buď reverzibilné, alebo musí dovoliť komponentom prispôbiť ich polohy vrámci agregátu, ktorý vytvárajú. Pevnosť väzieb medzi zložkami preto musí byť zrovnateľná silám vedúcim k ich rozrušeniu. V prípade molekúl, sily sú vytvárané tepelným pohybom. Platí, že procesy, v ktorých kolízia medzi molekulami vedie k nevratnému bráneniu pohybu zložiek, vytvárajú sklá, nie kryštály.

d) prostredie:

Samozostavovanie molekúl je normálne uskutočňované v roztoku alebo na rozhraní, ktoré dovoľuje požadovaný pohyb zložiek. Interakcia zložiek s prostredím, v ktorom sa nachádzajú, môže silno ovplyvniť priebeh procesu.

e) transport hmoty a agitácia:

Aby prebehlo samozostavovanie, molekuly musia byť pohyblivé. V roztoku, hlavnú časť pohybu, nutnú k uvedeniu molekúl do kontaktu, zabezpečuje tepelný pohyb [15].

Molekulami, ktoré spĺňajú v prírode tieto podmienky, sú fosfolipidy, ktoré v roztoku dokážu vytvárať vezikuly alebo micely.

K vytvoreniu nanovláčien boli skúmané amfifilné molekuly peptidu (peptidové amfifily PA).

Molekula PA pozostáva z kolagénnej, hydrofilnej sekvencie Gly-Val-Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Asn-Pro-Gly-Trp-Pro-Gly-Ala-Pro [IV-H1], ktorá je podobná k ľudskej  $\alpha 1(IV)$  1263-1277 kolagénnej sekvencii [5]. K mono- alebo dialkylu esteru je prepojená cez N- aminoskupinu. Kolagénna sekvencia peptidu, a síce hlavná skupina, tvorí trojšroubovnicovú

štruktúru, kým lipofilný zvyšok sa združuje pomocou hydrofóbných interakcií a vyvolá alebo stabilizuje 3D štruktúru kolagénnej sekvencie hlavnej skupiny [14]. K ohodnoteniu biologickej aktivity PA boli vybrané melanómové bunky. Bolo ukázané, že tieto bunky adherovali a množili sa na IV-H1 sekvencii. Obe aktivity boli umocnené, keď sa ligand nachádzal v trojšroubovnicovej konformácii [16].

Ani peptid, ani hydrofóbne zvyšky sami o sebe nevykazovali významnú adhéziu, avšak, samozostavená trojšroubovnicová štruktúra významne ju významne podporila [14].

Okrem týchto samostatných molekulových jednotiek, je známe že sa molekuly PA samozostavujú aj do listov, gúľ, tyčiniek, diskov alebo kanálikov v závislosti na tvare, náboji a prostredí, v ktorom sa nachádzajú. Taktiež boli vyvinuté dvoj- a troj-bloky PA s architektúrou tyčinky za pomoci účinnej aniónovej polymerizácie. Tieto dvoj- a troj-bloky preukázali trojšroubovnicový tvar, dokonca niektoré z nich boli schopné vytvoriť aj vlákna [17].

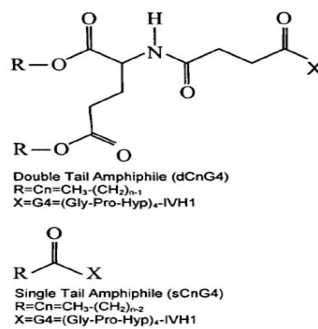
Formovanie nanovlákných PA je navrhnuté 5 kľúčovými štrukturálnymi črtami, ktoré zahŕňujú:

- a) dlhý alkylový reťazec, ktorý reprezentuje hydrofóbne vlastnosti molekuly
- b) štyri za sebou idúce cysteínové zvyšky, ktoré vytvárajú disulfidické mostíky k polymerácii štruktúry
- c) spojovaciu časť, obsahujúcu tri glycínové zvyšky slúžiace k poskytnutiu flexibility hydrofilnej hlavnej skupine
- d) fosforylovaný serínový zvyšok, ktorý silno interaguje s iónmi  $\text{Ca}^{2+}$  a pomáha usmerňovať mineralizáciu hydroxyapatitu (HAP)
- e) Arg-Gly-Asp (RGD), čo je ligand bunecnej adhézie

Cysteín, fosforylovaný serín a RGD sekvencia sú špecifickými charakteristikami peptidovej časti PA [17].

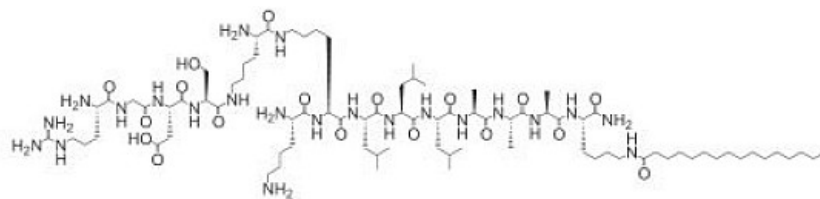
Príprava nanovlákn zahŕňa redukciiu cysteínových zvyškov PA na voľné thiolové skupiny použitím dithiotriteritolu s následným oksylením pod pH 4 k simulácii samozostavovania PA do cylindrických micel, teda nanovlákn [5]. V tomto tvare, amfifilné molekuly sú kolmé k nanovláknam s hydrofóbnou časťou vo vnútri a hydrofilnou časťou na povrchu [17]. Takto vytvorené nanovlákná majú priemer 5-8 nm a dĺžku cez 1  $\mu\text{m}$ .

Boli uskutočnené rôzne štúdie ohľadne pozmeňovania štruktúry PA. Napríklad, dialkylový reťazec bol zamenený za monoalkylový. Ukázalo sa, že so zväčšujúcou sa dĺžkou monoalkylového reťazca z C 6 na C16 sa zvýšila termálna stabilita vzhľadom k hydrofóbnym interakciám medzi alkylovými reťazcami. Tiež bolo dokázané, že sa mení pH citlivosť monovlákién, ktorá ovplyvňuje samozostavovanie. Obe , aj mono aj dialkylové reťazce vytvorili na rozhraní kvapalina-vzduch vo vodnom roztoku stabilné trojšroubovnicové usporiadanie [5].



Obr.č. 9 Chemická štruktúra molekuly PA mono a dialkylovej ( Tushar Gore et al: Self-Assembly of Model Collagen Peptide Amphiphiles)

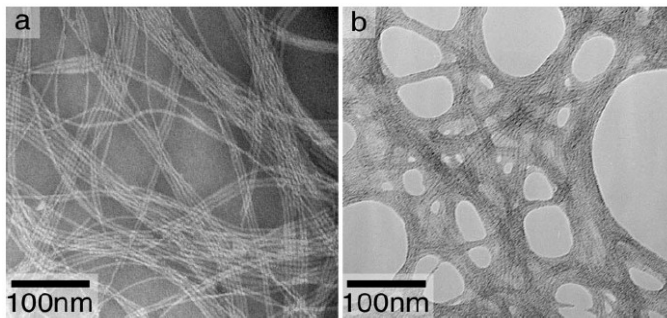
Bola opísaná aj aplikácia vetvených PA molekúl (bPA) ako samozostavujúcich sa povrchových filmov pre vlákna tvoriace kostry (napr. PGA) [18]. Použitie sa predpokladá najmä v oblasti tkanivovej regenerácie močového mechúra.



Obr.č.10 Vetvená molekula s jedným RGD ( Harrington et al: Branched peptide amphiphiles as self-assembling coatings for tissue engineering scaffolds)

Je známy aj mineralizačný potenciál PA, ktorý vzniká zabudovaním HAP do štruktúry z cieľom obnovy nanoštruktúry kosti [19], alebo iných mineralizovaných tkanív.

Kostry tkanivového inžinierstva by mali ideálne obsahovať dostatočne veľké póry, aby po inkorporácii buniek nasledovala ich proliferácia a migrácia. Jedným z obmedzení súčasných samozostavujúcich sa kostier je ich neschopnosť kontrolovane tvoriť makropóry. Ďalším obmedzením je, že sa netvorí stabilná 3D štruktúra a degradácia potrebuje byť ešte overená. Naproti tomu, samozostavujúce sa systémy majú často formu hydrogélu, preto sú výhodné pre injekčné aplikácie [14].



Obr.č.11 Obrázky získané prostredníctvom transmisívnej elektrónovej mikroskopie (TEM), a) nanovlákná formované z molekuly PA, ktoré sa samozostavovali vysúšaním priamo na mriežke TEM bez úpravy pH, b) samozostavená molekula s prídavkom  $\text{CaCl}_2$  (prevzaté z Hartgerink et al: Peptide-amphiphile nanofibers: A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials)

#### 3.1.3.4. Fázová separácia

Fázová separácia nastáva, keď sa homogénny multikomponentný systém stane nestabilným pod vplyvom určitých podmienok a komponenty majú sklon separovať sa do multifázového systému za účelom zníženia jeho voľnej energie [14].

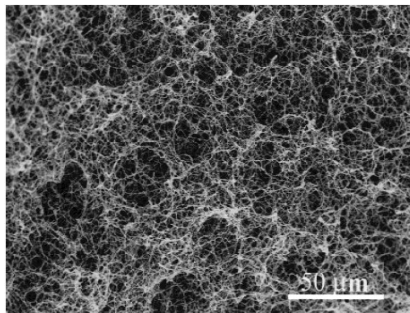
Použitím procesu termálne indukovanej fázovej separácie môže byť vytvorený nanovláknenný penovitý materiál [17]. Separácia nastáva v systéme kvapalina-kvapalina a v prípade polymérnych roztokov bola preskúmaná k tvorbe poróznych štruktúr ako kostier tkanivového inžinierstva.

Táto technika zahŕňa päť základných krokov [5]:

- 1) rozpustenie polyméru
- 2) proces separácie v systéme kvapalina-kvapalina
- 3) gelácia polyméru
- 4) extrakcia roztoku z gélu pomocou vody
- 5) zamrznutie a lyofilizácia vo vákuu

Pri separácii fáz sa roztok polyméru delí do dvoch fáz, a to na fázu s vysokou koncentráciou polyméru ( rich phase) a fázu s nízkou koncentráciou polyméru (poor phase). Po tom, čo je odobrané rozpúšťadlo z fázy s vysokou koncentráciou materiálu, polymér zatuhne [14].

Bolo zistené, že gelácia je kritický krok, ktorý kontroluje poróznu morfológiu materiálu. Nízke teploty počas gelácie viedli k vytvoreniu nanorozmernej vláknitej siete [5], kým vyššia teplota spôsobila vytvorenie doštičkovitých štruktúr vzhľadom k naočkovaniu kryštálov a ich rast.



Obr.č.12: Nanovláknenná pena PLLA získaná geláciou pri 8°C z 2,5 % PLLA/THF roztoku. 500 x zväčšené (prevzaté z Peter X. Ma, Ruiyun Zhang: Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix)

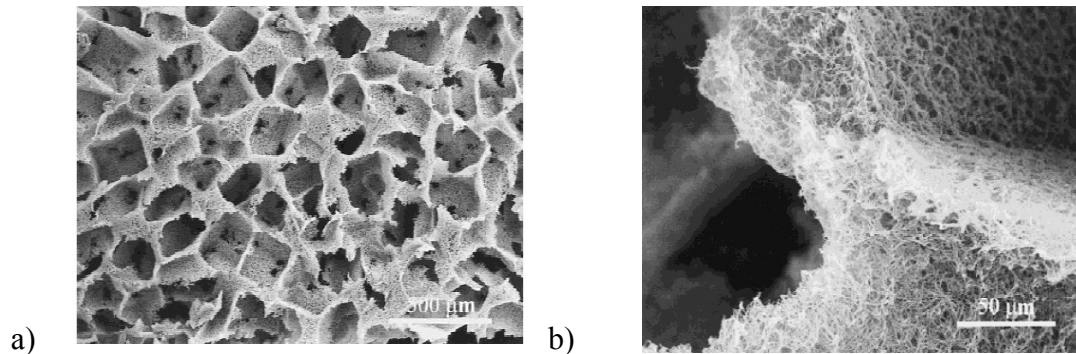
Avšak, ostatné procesné zmeny, ako roztok, typ polyméru, jeho koncentrácia, výmena rozpúšťadiel, teplotné ošetrenie a poradie procedúr môžu tiež ovplyvniť morfológiu peny [17].

Napríklad vzrast koncentrácie polyméru znižuje porozitu a zvyšuje mechanické vlastnosti [5].

V závislosti na vlastnostiach systému fázovej separácie môže byť výsledná fyzická podoba materiálov rôzna, a síce prášok, pena s otvorenými pórmí alebo pena s uzatvorenými pórmí. Iba penovité materiály s otvorenými pórmí sú vhodné pre aplikácie v tkanivovom inžinierstve [14].

Bohužiaľ, samotný proces fázovej separácie nedovoľuje vytvoriť dostatočné množstvo makropórov. Preto sa do systému zavádzajú anorganické soli, parafínové kvapôčky alebo cukor ako porogény vnesené do zmesi polymérneho roztoku počas fázovej separácie k

d'alšiemu zvýšeniu porozity. Podobne môžu byť vytvorené tubulárne alebo rôzne nepravidelné póry [17].



Obr.č.13 Obrázky získané skenujúcou elektrónovou mikroskopiou (SEM). Nanovláknenný matrix PLLA s makropórmi pripravenými s PLLA/THF a cukorných častíc a) veľkosť častíc 100-250μm, 50x zväčšené, b) veľkosť častíc 250-500 μm, 500x zväčšené (prevzaté z Ruiyun Zhang, I Peter X. MaSynthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures)

Kostra získaná touto metódou má tri úrovne štruktúry:

- a) makroporózna úroveň, kde veľkosť a tvar pórov je kontrolovaný porogénom
- b) medzivláknenná vzdialenosť ovplyvnená koncentráciou polyméru
- c) priemer vlákien, pohybujúci sa od 50-500 nm

Takto vzniknutá kostra bola skúmaná s ohľadom na bunkovú adhéziu s osteoblastami. Bolo zistené, že nanovláknna zvýšili bunkovú adhéziu aj proteínovú adsorpciu.

Výhodou fázovej separácie je relatívna jednoduchosť procedúry, kde požiadavky na aparátúru sú minimálne. Je tiež možné vyrobiť štruktúru pre žiadaný anatomický tvar tela a to prostredníctvom počítačom asistovaného dizajnu a počítačom asistovanej výroby. Ďalšou výhodou je súčasná prítomnosť nano a makroarchitektúry, ktorá môže byť výhodná vzhľadom na bunkovú odpoveď na úrovni nanovláknna, a vzhľadom na bunkovú distribúciu a tkanivovú architektúru na úrovni makroporozity [5].

### 3.1.3.5. Materiály používané na kostry

Polyméry používané v tkanivovom inžinierstve sa spravidla delia na prírodné a syntetické.

Prírodné polyméry poskytujú výhodu byť veľmi podobné, často identické k makromolekulovým substanciam nachádzajúcim sa v ľudskom tele. Preto je biologické prostredie pripravené rozpoznať a priaznivo interagovať s prírodnými polymérmi [5]. Medzi najznámejšie polyméry patria kolagén, chitosan, elastín, hodváb a kyselina hyaluronová.

Kolagén predstavuje základnú súčasť ECM. Je používaný v mnohých aplikáciách tkanivového inžinierstva. Môže byť izolovaný z rôznych miest tela, je ľahko uchovávaný a relatívne neimunogénny [20]. Zo všetkých typov kolagénov sú vyrábané kolagén typu I, II a III, a to najmä pre tkanivové kostry k rastu buniek a ich penetrácii [21]. Kolagénne nanovlákná preukázali kompatibilitu s mnohými typmi buniek, vrátane myoblastov a osteoblastov pre regeneráciu kostí s rh-BMP-2 [22, 23]. Bolo zistené, že mechanická sila nanovláknenného systému bola významne zvýšená miešaním kolagénu typu I s polyethylénoxidom (PEO) [5].

Chitosan je kryštálový polysacharid. Jedná sa o čiastočne deacetylovaný derivát chitínu, ktorý je primárnou štruktúrou exoskeletu článkonožcov [24]. Podobne ako kolagén je neantigénny a použiteľný v mnohých oblastiach medicíny. Bolo potvrdené prostredníctvom skenujúcej elektrónovej mikroskopie (SEM), že nanovlákná chitosan/PEO ukázali adhéziu chondrocytov a osteoblastov, a bunky si zachovali svoju morfológiu a tým bunecný fenotyp. Môžu preto slúžiť ako potencionálni kandidáti tkanivového inžinierstva kostí [25].

Elastín je proteín zodpovedný za elastické vlastnosti tkanív stavovcov [26]. Elastínový biomateriál je odporúčaný pre širokú škálu aplikácií, a síce náhrady kože, cievne štepy, srdečné chlopne a elastická chrupavka.

Hodvábne vlákna sú získavané z hodvábnika (*Bombyx mori*) a pozostávajú z 2 proteínových častí. Fibrín je štruktúrny proteín hodvábnych vlákien a sericín je vo vode rozpustný glejový proteín, ktorý viaže fibrínové vlákna dokopy [27]. Bolo zistené, že hodvábny fibrín (SF), po vhodnej extrakcii od sericínu, je neimunogénny, biokompatibilný a vhodný k podpore pripútaniu stromálnych buniek kostnej drene, ich šíreniu, rastu a diferenciácii ako aj k získaniu zanedbateľnej odpovedi počas štandardného *in vitro* makrofágového testu [28]. K ohodnoteniu bunkovej adhézie na SF nanovlákná boli použité

Ľudské keratinocyty (NHOK, NHEK) a ľudské fibroblasty. Následne bola pozorovaná rapídna proliferácia buniek [29].

Kyselina hyaluronová (HA) je prirodzenou komponentou ECM tkaniva [5]. Patrí medzi polyméry zásadne asociované s vodným roztokom a vykazuje v ňom vysokú viskozitu [21]. Bolo pozorované, že elektrospinning HA nevedol k jednotnej produkcii vysoko kvalitných netkaných vlákien [5]. Preto boli postupne hodnotené rôzne prostriedky k modifikácii metódy electrospinningu za účelom vytvorenia procesu pre vysokoporózne roztoky ako HA. Technika bola nazvaná elektroblowing [30]. Použitie HA je najmä v kostnej a kožnej medicíne.

K ďalším prirodzene sa vyskytujúcim polymérom patria napríklad algináty, želatína, celulóza, fibronektín, glykoaminoglykán.

Biodegradabilné syntetické polyméry poskytujú množstvo výhod vzhľadom k ostatným materiálom pre vývoj kostier v tkanivovom inžinierstve. Kľúčové výhody zahŕňujú schopnosť vytvoriť také mechanické vlastnosti a degradačnú kinetiku, aby vyhovovala rozličným aplikáciám. Atraktivitu zvyšuje fakt, že syntetické polyméry môžu byť vytvarované do rôznych tvarov a navyše zo žiadaným morfológickým tvarom pórov k lepšej penetrácii tkaniva. Okrem toho, polyméry môžu byť tvorené s rôznymi chemickými funkčnými skupinami, ktoré tiež môžu napomáhať vrastaniu tkaniva [31].

Medzi najčastejšie používané syntetické polyméry patria polymér kyseliny glykolovej (PGA), polylaktidová (poly-mliečna) kyselina (PLA), ich kombinácia PLGA, polykaprolaktón (PCL), polyetylénglykol (PEG) a polyfumaráty (PPF).

Medzi alifatické lineárne polyestery patria PGA a PLA. Ich výhodou je biodegradabilita jednoduchou hydrolýzou esterovej väzby vo vodnom prostredí, aký sú napríklad telové tekutiny. Okrem toho, produkty degradácie sú ihneď metabolizované na oxid uhličitý a vodu, alebo sú vylúčené močovým systémom. PLA-PGA materiály sú intenzívne používané k výrobe štruktúr pre inžinierstvo svalovo-kostrového tkaniva [32]. Rýchlosť degradácie je podmienená faktormi ako sú konfiguračná štruktúra, pomer kopolymérov, kryštalickosť, molekulová hmotnosť, morfológia, napätie, hodnota reziduálneho monoméru, porozita a miesto implantácie [31].

PCL je semikryštalický polymér zlučiteľný s mnohými inými polymérmi. Degraduje omnoho menšou rýchlosťou ako PLA a je vhodným základným polymérom pre systém

cielenej dopravy liečiv (DDS) [31]. Avšak, PCL spolu s inými materiálmi môže mať mechanické vlastnosti, aby slúžil ako kostra a bol použitý v aplikáciach, kde je potreba viac pružný materiál [33].

PEG je netoxický, biokompatibilný materiál pre orálne i lokálne aplikácie. Má mnoho štruktúrnych, chemických a fyzikálnych vlastností blízkyh ECM. Používa sa a stále skúma k úprave povrchov a objemových materiálov v biomedicínskych aplikáciach *in vitro* aj *in vivo*, v DDS aj tkanivovom inžinierstve [1].

Degradáciou PPF vzniká kyselina fumarová, prirodzene sa vyskytujúca v Krebsovom cykle, a propylénglykol [31]. Bolo zistené, že má podobné mechanické vlastnosti ako špongiózna kosť, preto má schopnosť vyplniť defekty skeletu [33]. Ďalšími skupinami sú polyortoestery (POE), polyamidy, polyanhydridy, polyuretány (PU), polykarbonáty, polyfosfázány, polyvinylalkoholy (PVA) a polyvinylacetáty (PVAC).

### 3.1.4 Tkanivové inžinierstvo vybraných častí tela:

#### a) Nanovlákná pre kostné tkanivové inžinierstvo

Požiadavok novej kosti ako náhrady k výmene, alebo obnove funkcie kosti, ktorá bola poškodená, zranená, poprípade stratená, ja hlavnou klinickou a socioekonomickou potrebou. Skeletálne tkanivové inžinierstvo vyžaduje, v zásade, kostry vhodné pre bunkové pripevnenie a zachovanie bunkových funkcií, vrátane bohatého zdroja osteoprogenitorových buniek v kombinácii s výraznými osteoinduktívnymi rastovými faktormi [34].

Existujú viaceré prístupy v ošetrovaní kosti. Súčasné terapie zahrňujú autoštep a aloštep hubovitej kosti, aplikáciu vaskulárnych štepov fibulárneho a iliárneho vrcholku kosti. Hoci sú štandardnými ošetrovaniami, s ich použitím sa vyskytujú aj nedostatky [35], a síce morbidita na strane donora alebo zavedenie infekcie poprípade choroby na strane príjemcu. Úlohu zohráva aj socioekonomický faktor [34].

Ďalšou metódou opravy defektu kosti je cesta výplni kosti cementom, ktoré ale môžu spôsobiť taktiež infekciu.

Výmena kostnej drene je ďalšou možnou aplikáciou tkanivového inžinierstva pre liečenie pacientov, ale jej nevýhoda spočíva v chemoterapii, alebo radiačnej liečbe. Dreň môže byť použitá v kultúrach tkanivového inžinierstva [35].

Predchádzaním nežiadúcich účinkov vyššie spomenutých metód má tkanivové inžinierstvo pomocou kostier.

V súčasnosti dizajn a výroba kostry vo výskume tkanivového inžinierstva je riadená 3 kategóriami materiálov [36]:

- I. Schválené biodegradabilné a bioresorbovatelné polyméry, ako kolagén, PGA, PLLA, PDLA, PCL
- II. Množstvo neschválených polymérov, ako sú POE, polyanhydridy, ktoré sú vo fázi preverovania
- III. Syntéza podnikateľských polymérnych biomateriálov, ako PLA-lyzín, ktoré môžu selektívne zavádzať špecifické bunkové fenotypy a viesť diferenciaciu a proliferáciu do cieľového funkčného prematuračného a maturačného tkaniva

Pred uvážením žiadaných vlastností potencionálneho materiálu je výhodné pochopiť 2 koncepty kostnej regenerácie pre tkanivové inžinierstvo, špeciálne osteoindukciu a osteokondukciu [35]. Osteoindukcia je proces vyvolania osteogenézy, teda novotvorby kosti. Zahrňuje prijímanie nezrelých buniek- ľudských mezenchymálnych kmeňových buniek (hMSC) a ich stimuláciu k premene na preosteocyty, z nich na osteoblasty a chondrocyty. V situácii hojenia kosti, ako je napríklad fraktúra, väčšina hojenia kosti je závislá na tomto procese [37] Osteokondukcia podporuje vrastanie kapilár a buniek hostiteľa do 3D kostry k vytvoreniu kosti.

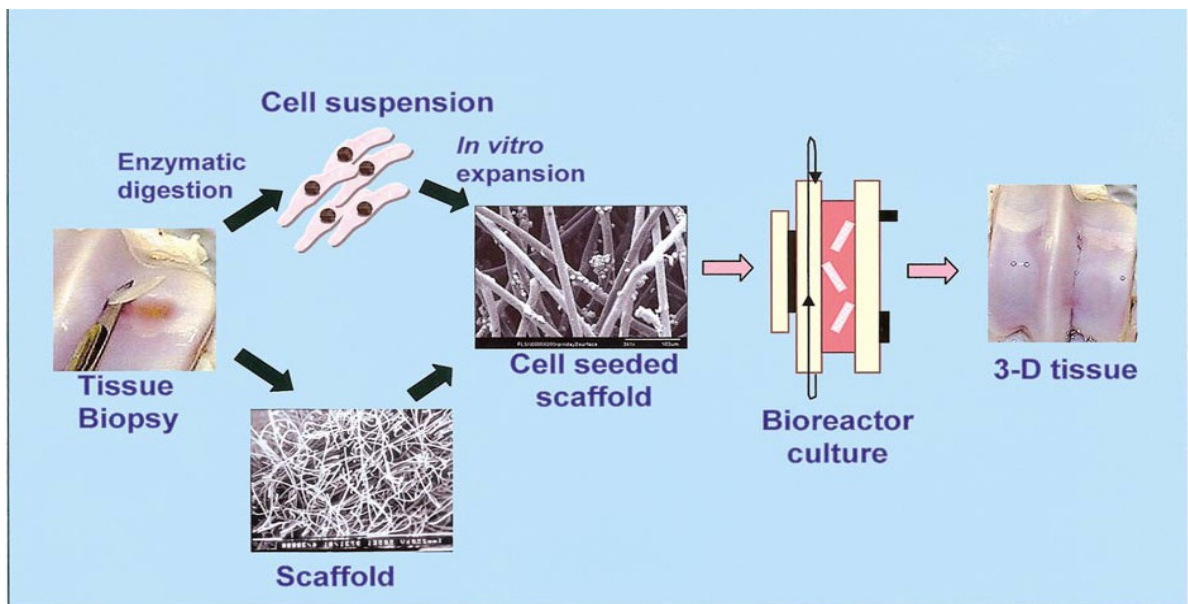
Polyméry môžu byť rôzne v ich molekulovej hmotnosti, polydisperzite, kryštalickosti, teplotnej premene, z čoho vyplýva rôzna rýchlosť absorpcie. Ich relatívna hydrofóbnosť a percento kryštalickosti môže ovplyvniť bunkový fenotyp, podobne aj povrchový náboj bude ovplyvňovať bunkové šírenie a afinitu buniek k povrchu. V použití sa polyméry delia na acelulárne, kde sa predpokladá, že bunky z okolitého tkaniva budú migrovať do polyméru po jeho aplikácii na defekt kosti, a celulárne[35].

Bolo zistené, že electrospinningom pripravené PCL kostry poskytujú prostredie, ktoré podporuje mineralizáciu tkaniva a môže byť vhodným kandidátom pre liečbu kostných defektov. Tvarovateľnosť týchto PCL kostier môže byť taktiež nápomocná v klinických aplikáciách [38].

Hodváby sú tiež atraktívnym materiálom pre tkanivové inžinierstvo kosti vzhľadom na ich biokompatibilitu, pomalú degradáciu a excelentné mechanické vlastnosti. Kostra zložená z

hodvábneho fibrínu vytvorená cestou electrospinningu poskytla prostredie, ktoré podporilo vytvorenie mineralizovaného tkaniva. Zavedenie BMP-2 a nanohydroxyapatitu (nHAP) do kostry zvýšilo významne vytváranie kosti v závislosti na veľkosti mineralizácie a transkripcie génov zúčastnených procesu osteogenézy. Bolo tiež zjavné, že nHAP bol úspešne zasadený ak do hodvábnej/PEO kostry [39].

PLGA materiály sú často používané ako konštrukčné materiály. Nedávno bol vyvinutý rotačný kyslíkovo-permeabilný bioreaktorový systém (ROBS) (obr.č.14) k poskytnutiu optimálneho tlaku kyslíku a mechanického napätia na bunkovo-polymérovú štruktúru. Osteoblasty odvodené od MSC novonarodených potkanov boli kultivované na PLGA penách a následne bola pozorovaná mineralizácia, ako aj 3D vytvorenie kosti [38].



Obr.č.14: Schéma bioreaktorového systému (ROBS) (prevzaté z Felicity R.A.J. Rose, Richard O.C. Oreffo: Bone tissue engineering: Hope vs Hype)

Okrem vyššie spomenutých materiálov sa ešte využívajú v kostnom inžinierstve demineralizovaný kostný matrix, trikalcium fosfát (TCP), dentálna sadra, titánium a keramika. Veľkú úlohu zohráva aj porozita materiálu, aj keď negatívne ovplyvňuje mechanickú silu polyméru [35].

## b) Nanovlákná pre tkanivové inžinierstvo chrupavky

Kĺbová chrupavka je tkanivo s obdivuhodnou životnosťou. Avšak, viaceré poškodenia chrupavkovitého tkaniva zapríčinené vývojovými abnormalitami, úrazom, alebo degeneráciou v súvislosti s pokročilým vekom, ako je napríklad osteoartritída, majú za následok postihnutie chrupavky a značnú bolesť, vedúcu až k imobilite [40].

Kĺbová chrupavka pozostáva z riedko rozptýlených chondrocytov, obklopených ECM. Chondrocyty sú zodpovedné za uchovanie kĺbovej chrupavky ako funkčnej entity. K dosiahnutiu cieľu, akým je oprava poškodenej kĺbovej chrupavky použitím (polo)syntetickej kostry a chondrocytov sú nutné solubilné aj nesolubilné signály[41].

V tkanivovom inžinierstve chrupavky sú zvyčajne používané pre regeneráciu chondrocyty a MSC [42]. Chondrocyty kĺbovej chrupavky môžu byť získané z chrupavky, ale obmedzený prístup k tomuto tkanivu, robí tento proces problematickým. Vlastná kostná dreň pacienta môže byť vhodným zdrojom pre MSC [41]. K vyvolaniu chondrogenickej diferenciácii je nutná kultivácia MSC pri ich vysokej hustote v 3D prostredí, aby sa zvýšila interakcia bunka-bunka, priaznivá pre chondrogenézu.

Doterajšie štúdie oznámili, že MSC vystavili chondrogenické vlastnosti, keď boli kultivované v bunkových peletových kultúrach (CP)[42]. Podstatnými obmedzeniami spojenými s bežnou CP kultúrou, ako slabé mechanické vlastnosti, inadequate veľkosť, nekontrolovateľná morfológia a slabá spracovateľnosť, robia tento kultivačný model nepraktický pre opravu chrupavky [40].

Mnohé matrice sa používajú ako kultivačné systémy pre kĺbové chondrocyty. Patria sem okrem iného PGA, PLA, hyaluronové estery, polymerizujúci a nepolymerizujúci fibrín, kolagén, alginát, chitosan, kalcium karbonát a ich kombinácie [41].

S ostatných materiálov bolo dokázané, že MSC vnorené do nanovláknien PCL v médiu bez séra doplnené TGF- $\beta$ 1 preukázali chondrocytový fenotyp expresiou chondrocytošpecifických génov a produkciou sulfátovo-proteoglykánového extracelulárneho matrixu (ECM). 3D kostry posiate MSC vykazovali morfológiu chrupavky a hladina chondrogenézy v nanovláknach sa ukázala byť ekvivalentná alebo vyššia ako u CP kultúr [42].

Súčasná práca tiež kombinujú MSC odvodené od dospeljej kostnej drene s novou 3D hodvábnou kostrou. Stimulátory ako dexametazón a TGF- $\beta$ 3 boli nevyhnutné pre bunkové

prežitie, proliferáciu a chondrogenézu. Konštrukcia kostry MSC-hodváb vytvorila zónovú architektúru podobnú prirodzenému tkanivu chrupavky [40].

### c) Cievne tkanivové inžinierstvo

Choroby krvných ciev, ako je napríklad ateroskleróza, sú jedným z hlavných príčin smrti človeka v modernej spoločnosti. Poškodená krvná cieva môže byť vymenená autológnyimi žilami alebo artériami, ale za cenu zdravia ostatných tkanív [43].

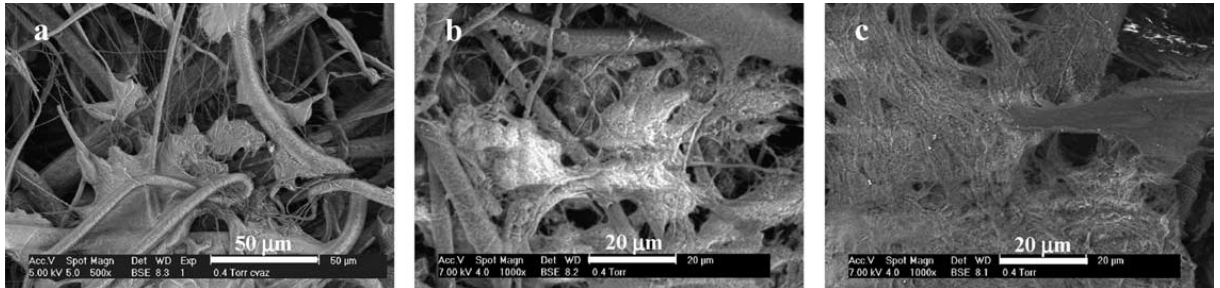
Vytvorenie krvnej cievy ako náhrady vyžaduje začlenenie hladkých svalových buniek (SMC) a endotelových buniek (EC) do tubulárnej kostry tak, ako je to zložené v pôvodných artériách [44]. Veľké a stredne veľké artérie majú jasné štrukturálne vlastnosti, a síce primárne intimu, médiu a adventíciu, ktoré sú menej prítomné v menších arteriolách a neexistujú v kapilárach. Intima vytvára vrstvu najbližšie toku krvi a skladá sa z endotelových buniek. Je prilahlá k vnútornej elastickej lamine, ktorá sa nachádza výhradne vo veľkých artériách a separuje laminu od média. Média obsahuje SMC o vysokej hustote, ktoré sú koncentricky usporiadané. Vonkajšia elastická lamina separuje médiu od adventície, ktorá obsahuje kolagénny ECM s fibroblastami, krvnými cievami a nervami [45].

Hoci polytetrafluoretylén (PTFE) a polyetyléntereftalát (PET) (Dacron<sup>MT</sup>) sú úspešne používané v liečení patologických procesov u veľkých artérii, žiaden materiál nebol odskúšaný úspešne vo výmene krvných ciev menších ako 6 mm v priemere [43].

V štúdií bola electrospinningom vytvorená nanovlákná kostra kopolyméru PLLA-PCL (75:25) s unikátnou usporiadanou štruktúrou. Hodnotená na nej bola morfológia, adhézia a proliferácia ľudských koronárnych SMC. Tieto bunky prejavili výhradne vretenovitý kontraktilný fenotyp ako aj orientované prichytenie a migráciu pozdĺž usporiadaných nanovláknien. Distribúcia a organizácia cytoskeletových proteínov v SMC bola tiež paralelná k smeru nanovláknien, adhézia a proliferácia buniek bola významne zlepšená na polymérom nanovláknenom povrchu s usporiadanou topografiou. Výsledky zdôraznili potenciál použitia PLLA-co-ε-PCL nanovláknenej kostry pre aplikácie v inžinierstve krvných ciev [46].

Tiež podobná, dvojvrstvá tubulárna konštrukcia PLA/PCL bola doložená ako prototypová kostra tkanivového inžinierstva krvných ciev. Kombinácia PLA a PCL má za následok silnú a elastickú anizotropnú kostru. Okrem toho táto kombinácia polymérov ukázala schopnosť podpory prichytenia, šírenia a rastu myších fibroblastov (Obr.č.15). Histológia stanovila odpoveď ľudských venózných myofibroblastov k tejto dvojvrstvej

kostry. Zistilo sa , že po tridsiatich dňoch kultúry sa bunky viac koncentrovali vo vonkajšej vrstve kostry a po štyroch týždňoch boli odhalené hodnoty kolagénu a glykoaminoglykánu (GaG) 8 a 26 % [47].



Obr.č.15: Snímky PLA/PCL kostry získané SEM mikroskopiou. a) 1 týždňová, b) 2 týždňová a c) 4 týždňová kultúra 3T3 myších fibroblastov (prevzaté z C.M. Vaz et al: Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique)

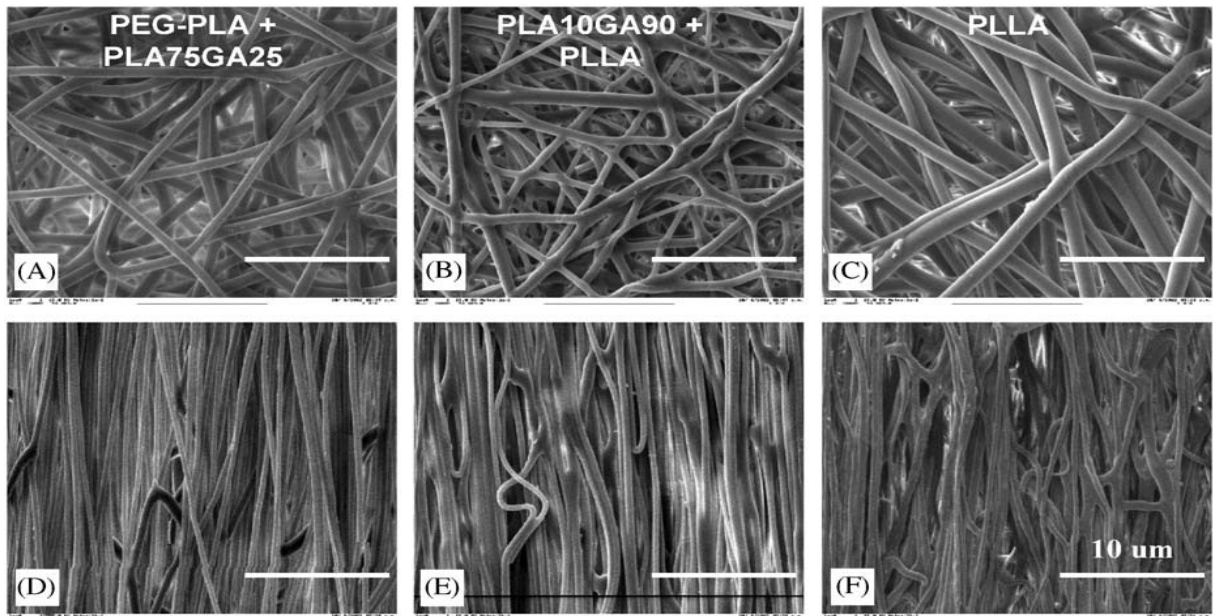
Endoteliálne bunky boli značne rozšírené na kultivovanom tkanivovom polystyréne (TCPS). Ich tvar na pôvodnej PET matrici bol guľovitý a bunky sa nerozširovali, kým na PET so štepenou želatínou si osvojili natiahnutý polygonálny tvar. Na TCPS množstvo buniek vzrastalo s časom kultivácie, na pôvodnom aj želatínovom PET sa v tretí deň množstvo znížilo. Ale v piati deň bol preukázaný opätovný rast. Želatína v tomto prípade zlepšila rast buniek, v porovnaní s rastom na nemodifikovanom PET [43].

#### d) Tkanivové inžinierstvo srdca

Pre tkanivové inžinierstvo srdca existujú najmenej 2 hlavné komponenty v porovnaní s cievami. Je to myokard sám o sebe a srdcové chlopne. V prípade srdca boli na Univerzite Toronto používané na vývoj kardiomyocytov želatínové špongiózne kostry, PCLA a PGA [44]. Iní autori tiež uvádzajú pre tkanivové inžinierstvo myokardu PGA, želatínu a algináty [48]. Tkanivové inžinierstvo srdcových chlopní je ale väčšou výzvou, hlavne v oblasti pediatrie. Tu by mohla srdcová chlopňa vytvorená živými bunkami rásť s dieťaťom, čím by bola odstránená potreba viacerých chirurgických zákrokov [44].

Štúdiá uskutočnená s použitím electrospinningom pripravených PLGA membrán o rôznom zložení s tým, že jednotlivé kostry sa líšili v hydrofilite a rýchlosti degradácie, bola prevedená za účelom porovnania jednotlivých komponent kostry. Bunky použité na zasatie boli kardiomyocyty. Bolo zistené, že tieto bunky sú veľmi citlivé k štruktúrnemu zloženiu

kostry a preferovali relatívne hydrofóbny povrch. Hydrofóbnosť klesala v rade PEG-PLA +PLA-PGA (25:75) > PLA-PGA (10:90) +PLLA > PLLA. Najväčšia degradačná rýchlosť PLA-PGA (10:90) +PLLA tiež negatívne ovplyvnila kardiomyocyty. Hydrofóbne PLLA kostry poskytli najlepšiu podporu pre prichytenie buniek a štrukturálny vývoj [49] (Obr.č.16).



Obr.č.16: Obrázky získané SEM mikroskopiou: a) PEG-PLA +PLA-PGA (25:75), b) PLA-PGA (10:90) +PLLA a c) PLLA. d), f), g) sú obrázky ich príslušných orientovaných membrán (prevzaté z Xinhua Zong et al: Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs)

K diferenciacii do kardiomyocytov *in vitro* boli použité bunky MSC a ES bunky [50].

#### e) Nervové tkanivové inžinierstvo

Liečba nervového tkaniva vyplývajúca zo zranenia miechy vyžaduje doplňujúcu starostlivosť alebo novú medicínsku terapiu, pretože axóny sa neregenerujú v ich prirodzenom prostredí. V tejto súvislosti bolo vyšetrených množstvo biomateriálov, a najmä polymérov pre ich vhodnosť v tejto oblasti [51].

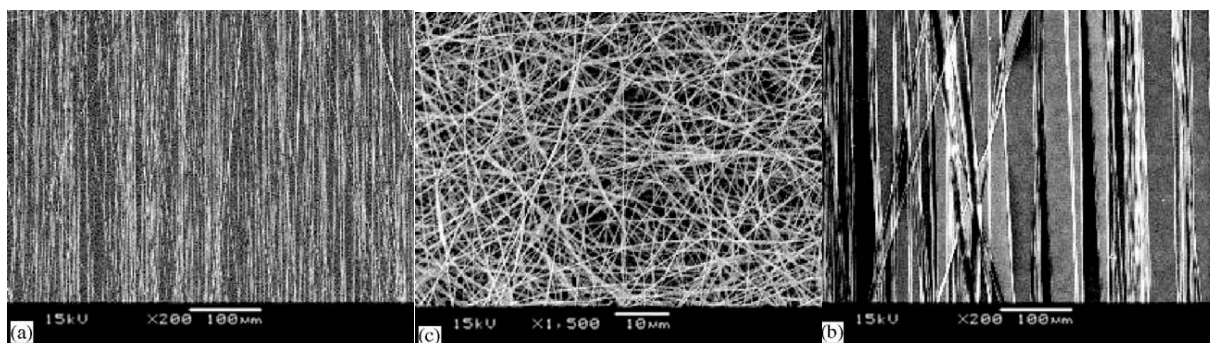
V materiáloch založených na géloch bolo zistené, že bunky sú zhromaždené po celej sieti priečne viazaných polymérnych reťazcov. Vzďialenosť medzi týmito väzbami ovplyvňuje preniknutie buniek do hydrogélu, spolu s chemickým zložením okolitej

polymérnej siete [52]. Materiál musí poskytnúť vhodné prostredie pre bunkovú proliferáciu, diferenciáciu a predlžovanie axónov.

Pri štúdiách bol porovnávaný rast fetálnych kortikálnych buniek myši (FMCC) na chitosane, zmesi chitosan/glycerofosfátová soľ (GP) a poly-D-lyzíne. Zistilo sa, že buniek, ktoré prežili, bolo najmenej na chitosane a zmesi chitosan/GP v porovnaní s poly-D-lyzínom. Preto, použitie neurónov bolo zlepšené pri kovalentnom zviazaní polylyzínu k chitosanu, prežitie buniek sa zdvojnásobilo, hoci rast neuritov ostal nemenný [53].

Bolo tiež zistené, že bunky nervového prekursoru sú schopné zhromažďovať sa po celom 3D povrchu PEG hydrogél, ktorý obsahuje hydrolyticky degradabilné laktidové jednotky. Ako degradácia postupovala, esterové väzby vrámci PLA bloku boli hydrolyzované až dokým sa sieť úplne nerozpustila. Bunky boli kultivované v hydrogéle s mitogénom bFGF-2, ktorý umožňoval rast buniek. Prvý dôkaz vytvorenia nervových buniek v hydrogélom prostredí bol pozorovaný medzi 10. a 12. dňom kultúry. Po 16. dni bola pozorovaná produkcia fibronektínu. Pozitívna lokácia synaptofyzínu nasvedčovala, že neuróny boli vhodné k vytvoreniu synapsii [52].

PLLA je tiež sľubným materiálom. Jeho vhodnosť pre nervové inžinierstvo bola hodnotená pomocou neurálnych kmeňových buniek (NSC) a modelovej bunkovej línie. Bunky C17-2 sú vhodným kandidátom k diferenciácii bez interakcie s adhezívnymi molekulami a boli skúmané na 3 typoch kostier, usporiadané nanovlákná, neusporiadané nanovlákná a usporiadané mikrovlákná, vytvorených electrospinningom (Obr.č.17). Bunky rástli na všetkých kostrách aj s neuritmi, a to v smere rastu vlákien, vo vretenovitom tvare. Viac buniek ale diferencovalo na usporiadaných nanovláknach [51].



Obr.č.17: SEM fotografia vlákien: a) usporiadané nanovlákná, b) neusporiadané nanovlákná c) usporiadané mikrovlákná ( prevzaté z F. Yang et al: Fabrication of nano-structured porous PLLAscaffold intended for nerve tissue engineering)

PLLA bol skúmaný aj ako materiál vytvorený fázovou separáciou, pričom boli použité tie isté bunky C17-2. SEM mikroskopiou bolo zistené prichytenie buniek vrámci poróznej kostry. Už 2. deň bunky progresívne rástli cez 3D štruktúru a dĺžka neuritov bola dvojnásobná k veľkosti bunkového tela. V niektorých častiach bola pozorovaná aj migrácia buniek do matrice [54].

### **3.2.Systémy cieleného doručenia liečiv**

Biologická signalizácia je kľúčovou zložkou pre funkciu bunky a tkanivovú regeneráciu. Endogénne signalizačné molekuly sú často nedostatočné v kvalite aj kvantite pre opravu defektov o väčšej veľkosti, kde je požadovaný prídavok exogénnych signálnych molekúl. Vzhľadom na citlivosť buniek ku koncentrácii biologických molekúl a krátky polčas týchto molekúl je veľmi dôležitá úspešná aplikácia biologických faktorov v tkanivovom inžinierstve, ktorá kriticky závisí na technológiách doručenia [14].

DDS ako lipidové a polymérne nanočastice môžu byť vytvorené za účelom zlepšenia farmakologických a terapeutických vlastností liečiv, respektíve biosignálnych molekúl aplikovaných parenterálne. Skladajú sa z nosiča, ktorý je lipidovej alebo polymérnej povahy a asociovaného terapeutika [49]. Polymérne nanovlákná sú v poslednej dobe skúmané pre ich schopnosť uzatvoriť a doručiť bioaktívne molekuly pre terapeutické aplikácie [5].

Proces electrospinningu môže byť ľahko prispôsobený k poskytnutiu uzatvorených bioaktívnych látok. Liečivá môžu byť tuhé alebo tekuté [2]. Medzi významnejšie vlastnosti liečiva patrí jeho pôsobnosť, ako aj stabilita, solubilita, veľkosť a náboj. Základným pravidlom je aj počet molekúl, ktoré môže DDS niesť. Použitie nerozumného množstva môže viesť k problémom na strane toxicity, metabolizmu, eliminácii liečiva alebo biodegradability nosiča [55].

Ku konkrétnym príkladom doručovaných liečiv patria hydrofilné liečivá ( Mefoxin, tetracyklín hydrochlorid), lipofilné liečivá (Ibuprofen, Cefazolin), DNA, proteíny, GaG a enzýmy. Z nanovláknien sú to hlavne PEG, PLGA, PLA-PEG, PLCL, PVA, PEVA a PLA [2, 5].

## 4. Záver

Doterajšie postupy liečenia chorobami alebo zranením poškodených tkanív zahrňovali na jednej strane medikamentóznú liečbu s odpovedajúcimi nežiadúcimi účinkami, na strane druhej transplantáciu poškodeného tkaniva od vhodného darcu, čo však bolo späté s nedostatkami, a síce morbidita a mortalita na strane darcu a prípadná infekcia a imunosupresívna liečba na strane príjemcu.

Dnešná doba si ale vyžaduje, vzhľadom na obrovský vedecký a technický rozvoj, posun aj v tejto oblasti a kľúčovú rolu v nej zohráva relatívne nový biomedicínsky obor, tkanivové inžinierstvo, ktoré vyššie spomenuté nedostatky postráda, a tým sa stáva atraktívnejším pre pacientov aj lekárov.

Tkanivové inžinierstvo predstavuje zásadný krok v zlepšeniach poškodeného tkaniva alebo obnovy orgánov a ich funkcií a to za pomoci kmeňových buniek a polymérnych materiálov. Bolo totiž zistené, že kmeňové bunky majú schopnosť diferenciovať do viacerých bunčných typov a vytvoriť tak pestrú škálu zrelých buniek, od kardiomyocytov, cez osteoblasty, chondrocyty až po nervové bunky.

Polymérny materiál zas predstavuje výhodu podobnosti s ECM (extracelulárny matrix), biokompatibility a nastaviteľnej biodegradácie vzhľadom k miestu aplikácie. Spojením týchto dvoch kompartmentov, buniek a materiálu, je vytvorená špecifická kostra pripravená vytvoriť nové a tým zregenerovať poškodené tkanivo, obnoviť funkciu a zachovať život.

Polymérny materiál ale podáva pomocnú ruku aj v systémoch cielej dopravy liečiv, čím sa znižuje toxicita látky.

Cieľom mojej práce bolo oboznámiť sa najmä s tkanivovým inžinierstvom, odborom, ktorý predstavuje veľkú výzvu, pretože je len na začiatku, a už dosahuje obrovské úspechy. O jeho masívnom využití v budúcnosti niet pochýb.

## 5. Použitá literatura

- [1] Tasilo Prnka, Karel Šperlink: Biotechnologie, Nanobiotechnologie, Nanomedicina, Repronis Ostrava, 2006, s. 134-166
- [2] SY Chew et al :The Role of Electrospinning in the Emerging field of Nanomedicine, Curr Pharm Des. 2006 ; vol.12, no. 36: 4751–4770
- [3] A.Greiner et al: Biohybrid nanosystems with polymer nanofibres and nanotubes, Applied Microbiology and Biotechnology, July 2006, vol. 71, no.4, s. 387-393  
(prevzaté s Reneker et al, Yarin et al: Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning, 2001, Hohman et al a) Electrospinning and electrically forced jets II.Applications, b) Electrospinning and electrically forced jets I. Stability theory, 2001
- [4] Sodomka L.: Nanovlákna-struktura, vlastnosti, technologie, použití, Vlákna a textil, 2006, vol. 13, no. 3, s. 78–86
- [5] Rajesh Vasita, Dhirendra S Katti: Nanofibres and their applications in tissue engineering, International Journal of Nanomedicine, 2006, vol.1, no.1, s. 15–30
- [6] Yoshito Ikada : Challenges in tissue engineering, J. R. Soc. Interface, 22 October 2006, vol. 3, no. 10, s. 589-601
- [7] Tabata Yasuhiko : Biomaterial technology for tissue engineering applications,J. R. Soc. Interface, Published online 2009, doi:10.1098/rsif.2008.0448.focus
- [8] Stanislav Filip, Jaroslav Mokřý, Ivan Hruška: Kmeňové bunky, Galén, 2006 s. 53, s. 108
- [9] Milan Koukal: Kmenové bunky: Záchrana, nebo zkáza lidstva?, vydané 19.3 2009, MEDICÍNA, www.21stoleti.cz
- [10] [www.washingtonpost.com](http://www.washingtonpost.com): Embryonic stem cells found to acquire mutations, 5.Sept. 2005, zdroj Nature Genetics, stiahnuté 10.8.2009
- [11] Kotobuki et al : Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and characterization of Mesenchymal stem cells from bone marrow, Artificial organs, Jan 2004, vol. 28, no. 1, s. 33-39
- [12] Julia E Babensee et al : Growth factor delivery for tissue engineering, Pharmaceutical Research, May 2000, vol. 17, no. 5, s. 497-504
- [13] Taylor Patricia M: Biological matrices and bionanotechnology,Phil. Trans. R. Soc. B

- Aug 2007, vol.362, no.1484 , s. 1313-1320
- [14] X Ma: Biomimetic materials for tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Jan 2008, vol. 60, no. 2, s. 184-198 (prevzaté z Whitesides GM, Grzybowski B. Self-assembly at all scales)
- [15] G.M.Whitesides, M. Boncheva: Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components, *PNAS*, April 2002 vol. 99 no. 8, s. 4769-4774
- [16] G.B. Fields et al.: Proteinlike molecular architecture: Biomaterial applications for inducing cellular receptor binding and signal transduction, *Biopolym.* 1998, vol. 47, s. 143–151
- [17] L.A.Smith,X Ma: Nano-fibres scaffold for tissue engineering, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Dec 2004, vol. 39, no. 3, s. 125-131
- (Obr.č.9): Tushar Gore et al: Self-Assembly of Model Collagen Peptide Amphiphiles, *Langmuir*, 2001, vol.17, no.17, s. 5352–5360
- [18] Harrington et al: Branched peptide amphiphiles as self-assembling coatings for tissue engineering scaffolds, *Journal of Biomed. Mater. Res.*, July 2006, vol. 78A, no. 1, s. 157-167
- (Obr.č.10): Harrington et al: Branched peptide amphiphiles as self-assembling coatings for tissue engineering scaffolds, *Journal of Biomed. Mater. Res.*, July 2006, vol. 78A, no. 1, s. 157-167
- [19] Beniash: Self-assembling peptide amphiphile matrices for cell entrapment,*Acta Biomaterialia*, July 2005, vol.1, no. 4, s. 387–397, prevzaté z Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Peptide-amphiphile nanofibers:A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials, 2001
- (Obr.č.11): Hartgerink et al: Peptide-amphiphile nanofibers:A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials, *PNAS*, April 2002, vol. 99, no. 8, s. 5133-5138
- (Obr.č.12): Peter X. Ma, Ruiyun Zhang: Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix, *J. [Biomed Mat Research](#)*, July 1999; vol. 46, no. 1, s. 60-72
- (Obr.č.13): Ruiyun Zhang, Peter X. Ma: Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures, *Journal of biomedical materials research*, 2000, vol. 52, no. 2, s. 430-438

- [20] Jamil A. Matthews et al: Electrospinning of collagen nanofibres, *Biomacromolecules*, 2002, vol. 3, no. 2, s. 232-238
- [21] Dehai Liang, Benjamin S. Hsiao, Benjamin Chu: Functional electrospun nanofibres scaffolds for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Dec 2007, vol. 59, no. 14, s. 1392-1412
- [22] Gersbach CA et al: Runx2/Cbfa1-genetically engineered skeletal myoblasts mineralize collagen scaffolds in vitro, *Biotechnology and Bioengineering*, Oct 2004, vol. 88, no. 3, s. 369-378
- [23] M.Geiger, R.H.Li, W.Friess: Collagen sponges for bone regeneration with rh-BMP-2, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Nov 2003, vol. 55, no. 12, s. 1613-1629
- [24] Sundararajan V. Madihally, Howard W.T. Matthew: Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, June 1999, vol. 20, no. 12, s. 1133-1142
- [25] Narayan Bhattarai et al: Electrospun chitosan-based nanofibres and their cellular compatibility, *Bomaterials*, Nov 2005, vol. 26, no. 31, s. 6176-6184
- [26] L. DeBelle, A.M. Tamburro: Elastin:molecular description and function, *The International Journal of Biochemistry and Cell biology* 1999, vol. 31, no. 2, s. 261-272
- [27] Ung-Jin Kim et al: Three dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin, *Biomaterials*, May 2005, vol. 26, no. 15, s. 2775-2785
- [28] Hyoung-Joon Jin et al: Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats, *Biomaterials*, March 2004, vol. 25, no. 6, s. 1039-1047
- [29] Byung-Moo Min: Electrospinning of silk fibroin nanofibres and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, March- April 2004, vol. 25, no. 7-8, s. 1289-1297
- [30] In Chul Um et al: Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid, *Biomacromolecules*, 2004, vol. 5, no. 4, s.1428–1436
- [31] Pathiraja A.Gunatillake, Raju Adhikari: Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European cells and Materials*, 2003, vol. 5, s. 1-16
- [32] R.Chandra, Renu Rustgi: Biodegradable polymers, *Progress in Polymer Science*, Nov 1998, vol. 23, no. 7, s. 1273-1335
- [33] C. Mauli Agrawal, Robert B. Ray: Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, ,

Jan 2001, vol. 55, no. 2, s. 141-150

- [34] Felicity R.A.J. Rose, Richard O.C. Oreffo: Bone tissue engineering: Hope vs Hype, Biochemical and Biophysical Research Communications, March 2002, vol. 292, no. 1, s. 1-7
- [35] Karen J.L. Burg, Scott Porter, James F. Kellam : Biomaterial developments for bone tissue engineering, Biomaterials, Dec 2000, vol. 21, no. 23, s. 2347-2359
- [36] Dietmar W. Hutmacher: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, 2000
- [37] T. Albrektsson, C. Johansson: Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, European Spine Journal, Oct 2001, vol. 10, no. 2, s. 96-101
- [38] H.Yoshimoto et al: A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, Biomaterials, May 2003, vol. 24, no. 12, s. 2077-2082
- [39] Chunmei Li et al: Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials, June 2006, vol. 27, no. 16, s. 3115-3124
- [40] Yongzhong Wang et al: In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells, Biomaterials, Dec 2005, vol. 26, no. 34, s. 7082-7094
- [41] P. M. van der Kraan et al: Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors:relevance for articular cartilage tissue engineering, Osteoarthritis and cartilage, Aug 2002, vol. 10, no. 8, s. 631-637
- [42] Wan-Ju Li et al: A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells, Biomaterials, Feb 2005, vol. 26, no. 6, s. 599-609
- [43] Zuwei Ma et al: Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering, Biomaterials, May 2005, vol. 26, no. 15, s. 2527-2536
- [44] Anthony Ratcliffe: Tissue engineering of vascular grafts, Matrix biology, Aug 2000, vol. 19, no. 4, s. 353-357
- [45] C.Y. Xu et al: Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering, Biomaterials, Feb 2004, vol. 25, no. 5, s. 877-886
- [46] C.M. Vaz et al: Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using

- a multi-layering electrospinning technique, *Acta Biomaterialia*, Sept 2005, vol. 1, no. 5, s. 575-582
- [47] Robert M. Nerem, Ann E. Ensley: The tissue engineering of blood vessels and the heart, *American Journal of Transplantation*, Feb 2004, vol. 4, no. S6, s. 36-42
- [48] Tatsuya Shimizu et al: Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction, *Biomaterials*, June 2003, vol. 24, no. 13, s. 2309-2316
- [49] Xinhua Zong et al: Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs, *Biomaterials*, Sept 2005, vol. 26, no. 26, s. 5330-5338
- [50] Keiichi Fukuda: Development of Regenerative Cardiomyocytes from Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Tissue Engineering, *Artificial Organs*, Dec 2001, vol. 25, no. 3, s. 187-193
- [51] F. Yang et al: Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials*, May 2005, vol. 26, no. 15, s. 2603-2610
- [52] Melissa J. Mahoney , Kristi S. Anseth: Three-dimensional growth and function of neural tissue in degradable polyethylene glycol hydrogels, *Biomaterials*, April 2006, vol. 27, no. 10, s. 2265-2274
- [53] K.E. Crompton et al: Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering, *Biomaterials*, Jan 2007, vol. 28, no. 3, s. 441-449
- [54] F. Yang et al: Fabrication of nano-structured porous PLLAscaffold intended for nerve tissue engineering, *Biomaterials*, May 2004, vol. 25, no. 10, s. 1891-1900
- [55] Theresa M. Allen, et al: Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science*, March 2004, vol. 303, no. 5665, s. 1818-1822