

FUNKCIONALIZOVANÁ NANOVLÁKNA JAKO NANOSYSTÉMY ŘÍZENÉHO DODÁVÁNÍ LÁTEK

Evžen Amler, Matěj Buzgo, Michala Rampichová, Karolina Vocetková, Eva Filová,
Eva Prosecká

Laboratoř pokročilých biomateriálů, UCEEB, ČVUT v Praze, Buštěhrad

ANOTACE

Příspěvek pojednává o systémech řízeného dodávání léčiv pro bezbuněčné aplikace pomocí nanovláknenných struktur.

SUMMARY

The aim of this article is to deal with drug-delivery system in cell-free scaffold application through the nanofiber material structure.

ÚVOD

Laboratoř tkáňového inženýrství se zabývá tvorbou, optimalizací a testováním systémů řízeného dodávání a uvolňování léčiv, zejména pro medicínské aplikace. Jedná se o komplexní systémy řízeného uvolňování obsahu z nanosystémů na bázi nanovláken pro regenerativní medicínu a tkáňové inženýrství. Tato nová a velmi perspektivní odvětví medicíny se nespolehají jen na operativní aplikaci implantátů, ale jsou také esenciálně závislá na řadě inženýrských odvětví. Je totiž zřejmé, že kvalitní a funkční nosič pro bezbuněčnou terapii musí (kromě splnění řady podmínek, biologických i mechanických) obsahovat i kvalitní systém řízeného uvolňování. Právě optimalizace a charakterizace strukturních a mechanických parametrů těchto systémů je cílem výzkumného týmu.

Celá řada systému řízeného dodávání léčiv je v současné době již popsána a další dlouhá řada systémů se v laboratořích po celém světě připravuje. Důvod je jediný: doposud neexistuje optimální systém řízeného dodávání léčiv. Mezi slibné systémy řízeného dodávání léčiv patří nanovláknna, která jsou versatilní, flexibilní a nanobiomimetická a navíc je možné jejich povrch funkcionalizovat, stejně tak jako jejich nitro (jádro). Kromě toho je lze také připravit za přiměřenou cenu pro zdravotnické aplikace a díky tomu můžeme sledovat vzrůstající počet použití nanovláken pro konstrukci a rekonstrukci tkání, včetně pojivových tkání. Tato nanovláknna jsou pak využívána jako systém řízeného dodávání léčiv pro bezbuněčné aplikace.

Systémy řízeného dodávání léčiv na bázi nanovláken se mohou připravit i v tekuté (injikovatelné) formě. Zřejmou výhodou vlastností nanovláken v injikovatelné formě je jejich vysoká porozita, velmi dobrá buněčná adheze a možnost regulace dodávání léčiv či bioaktivních látek. Dodávané látky mohou být buď osvojeny, nebo připevněny k nanovláknennému povrchu.

FUNKCIONALIZACE NANOVLÁKEN POVRCHOVOU ADSORPCÍ

Fyzikální adsorpce k nanovláknennému povrchu je jednoduchý způsob přípravy systému řízeného dodávání léčiv. Velký specifický povrch nanovláken vytváří možnost k vysoké adsorpci. Bohužel se adsorbované molekuly většinou na povrchu udrží jen krátkodobě a

molekuly jsou obvykle rychle uvolněny do okolí. Nie et al. ukázali, že imobilizace BMP-2 na povrchu nanovláken vedla k 75% uvolnění všech molekul během prvních pěti dnů [1]. Různé sofistikované způsoby jsou prezentovány v literatuře k odstranění tohoto nedostatku s uvolňováním molekul [2]. Povrch nanovláken může být též funkcionalizován vazbou dalšího systému. Systém řízeného dodávání léčiv uvolňuje bioaktivní molekuly dvoufázově v závislosti na uvolňování léčiva z nanovláken a degradaci sekundárního systému. Například adsorpce pomalu degradujících liposomů obohacených fetalním bovinním sérem vedla na PCL nanovláknách ke zvýšené adhezi chondrocytů a k jejich vyšší proliferaci [3]. Sekundární systém řízeného dodávání léčiv je možno též připravit pomocí elektro-sprejováním s tvorbou nanočástic [4, 5]. Také byly vyvinuty techniky pro povrchovou funkcionalizaci implantátů prostřednictvím použití nanovláken, za účelem lepšího osídlení implantátů buňkami a zároveň pro lepší biointegraci implantátu [6,7]. Meng et al. například prokázali, že mineralizace PLGA/ gelatin nanovláken zlepšila adhezi, proliferaci a aktivitu MG63 buněk [8]. Adherované substance mohou být uvolněny z povrchu nanovláken změnou iontové síly, teplotou, mechanickým napětím, atd. Nicméně kontrolovaná degradace nanovláken se zdá být tím nejspolehlivějším způsobem pro kontrolu uvolňování v systému řízeného dodávání léčiv. Nejvhodnějším způsobem se zdá být chemická modifikace polymeru, například síťování, což vede k definovatelnému a říditelnému rozpadu.[9].

NANOVLÁKNA S INTERNALIZOVANÝMI BIOAKTIVNÍMI LÁTKAMI

Internalizace nebo obalování (enkapsulace) bioaktivních látek do vnitřku nanovláken, odstraňuje či minimalizuje nevýhody jejich povrchové funkcionalizace. Existuje několik způsobů této internalizace nebo enkapsulace bioaktivních látek do nitra nanovláken, mezi nejběžnější metody patří zvlákňování směsi (blend electrospinning), emulzní zvlákňování (emulsion electrospinning) a koaxiální zvlákňování (coaxial electrospinning).

Směšové zvlákňování (blend electrospinning)

Blend electrospinning využívá kompozitu polymer/látka připraveného prostým smícháním. Je možné využít i mechanické či ultrazvukové dispergace. Toto zvlákňování bylo testováno na širokém spektru substancí, jako antibiotika, cytostatika, proteiny, DNA a siRNA [10], a bylo prokázáno, že je vhodné pro inkorporaci malých molekul. Dexamethasone-PLGA nanovlákná připravená metodou zvlákňování směsi se ukázala jako vhodná pro potenci osteogenní diferenciaci kmenových buněk [11]. Hlavním omezením používáním této metody je nezbytnost rozpuštění bioaktivní látky do roztoku polymeru. Bohužel, většina biokompatibilních polymerů podporující buněčnou adhezi (např. PCL, PLA a PU) jsou rozpustná v organických rozpouštědlech. Polární polymery však nejsou vhodné pro buněčnou adhezi a mají omezenou životnost ve fyziologických tekutinách. Použití metody zvlákňování směsi u proteinů z nevodných roztoků pak vede k signifikantnímu snížení jeho aktivity. Jednou z mála výjimek je fibroin, neboť nanovlákná připravená ze směsi fibroin/BMP-2 vykazala zlepšenou proliferaci MSCs a osteogenní diferenciaci in vitro [12].

Koaxiální zvlákňování

Koaxiální zvlákňování je již prověřená metoda pro produkci nanovláken druhé-generace, neboli dutých nanovláken s enkapsulovanými látkami. Tyto enkapsulované látky mohou, ale také nemusí být rozpustné v tom a samém rozpouštědle s polymerem, který tvoří vnější obal. Koaxiální zvlákňování umožňuje vytvoření kompozitních funkcionalizovaných nanovláken se separovanou (oddělenou) vnitřní strukturou, kdy jádro struktury je odděleno od obalu [13]. Hlavní výhodou koaxiálního zvlákňování je možnost vytvoření formy jádra a

obalu nanovláken s výrazně zvýšenou koncentrací bioaktivních molekul. Zachování biologické aktivity enkapsulovaných molekul je důležitým charakteristickým rysem nanovláken druhé generace. Ideální stav je takový, který nesmí vést k denaturaci proteinu a musí protein uvolňovat s vysokou účinností. Obal-jádro neboli bikomponentní nanovlákná umožňují zachování konformací i velmi senzitivních proteinů, zejména pokud jsou zabudována do jádra liposomů [14]. Vodné prostředí v jádře liposomů zachová stabilní proteinovou konformaci a vede k buněčné proliferaci i s nižšími koncentracemi růstových faktorů [14]. Tento systém, založený na nanovlákněch druhé generace s inkorporovanými α -granulemi, byl nedávno vyvinut ve výzkumné skupině pro biomedicínskou aplikaci [15]. Nicméně je nutno podotknout, že i nanovlákná druhé generace mají své nevýhody, které jsou ještě stále překážkou k širší klinické aplikaci. Největší zábranou je omezená reprodukce produktu s řadou defektů, které následně ovlivňují rychlost uvolňování. Dalším limitujícím faktorem je i omezená rychlost produkce. Multiplexing metoda však může být částečným řešením tohoto problému.

Emulzní zvlákňování

Řadu nevýhod u metod směsového a koaxiálního zvlákňování může být vyřešeno aplikací metody nazývané 'emulzní zvlákňování'. Emulzní zvlákňování je modifikací metody směsového zvlákňování a je založen na zvlákňování směsi dvou nemísitelných rozpouštědel. Emulze pro tuto metodu může být připravena mechanickým mícháním [16], ultrazvukem [17] či mikrofluidním mixováním [18]. Briggs et al. prokázali, že se zachovává PDGF-BB bioaktivita a diferenciací MSC do osteogenní linie [17]. Disperzní zvlákňování také umožňuje tvorbu mikro- a nano-částic. HAp částice udržely aktivitu BMP-2 v PLGA nanovlákněném nosiči [19]. Tyto výsledky dokazují, že emulzní zvlákňování je vhodnou cestou k produkci nanovláken typu jádro/plášť (bikomponentních nanovláken), které jsou funkcionalizovány bioaktivními molekulami.

Avšak ani emulzní zvlákňování není bez nedostatků: metoda je nespolehlivá pro polymerní roztoky s nízkým povrchovým napětím. Navíc i příprava emulzí je obtížná zejména vzhledem k zachování peptidové či proteinové aktivity [20,21].

AKTIVNÍ KONTROLA UVOLŇOVÁNÍ LÁTEK Z NANOVLÁKEN

Klasické systémy řízeného dodávání a uvolňování léčiv jsou založeny na pasivním uvolňování z polymerních matrixů. Rychlost uvolňování léčiv je řízena rychlostí difúze z matrix a rychlostí degradace nosiče [22]. Sahoo et al. připravili koaxiální nanovlákná z PLGA obohacené bFGF, a také nosič z PLGA a FGF (bFGF) bez nanovlákněné struktury [22]. Oba nosiče vykazovaly podobné vlastnosti, ale nanovlákněný nosič uvolňoval svůj obsah v delším čase [22].

Nedávno byl též vyvinut systém s aktivní kontrolou uvolňování léčiv. Zřejmou výhodou je možnost ovládnutí spouštěcího mechanismu externím stimulem. Navíc uvolnění látek může být pouze lokální, a samozřejmě při vhodné stimulaci. Mezi stimulační faktory může být zahrnuta teplota (např. teplotně senzitivní hydrogel) [23], pH (např. pH senzitivní hydrogely) [24], ultrazvuk (např. lipozomy) [25] a enzymatické štěpení (např. metaloproteinázově senzitivní hydrogely) [26].

LITERATURA

- [1] Nie H, Soh BW, Fu YC, Wang CH. Three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffold for BMP-2 delivery. *Biotechnol. Bioeng.* 99(1), 223–234 (2008).

- [2] Filova E, Rampichova M, Litvinec A et al. A cell-free nanofiber composite scaffold regenerated osteochondral defects in miniature pigs. *Int. J. Pharm.* 447(1–2), 139–149 (2013).
- [3] Rampichova M, Martinova L, Kostakova E et al. A simple drug anchoring microfiber scaffold for chondrocyte seeding and proliferation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23(2), 555–563 (2012).
- [4] Bock N, Dargaville TR, Woodruff MA. Electrospinning of polymers with therapeutic molecules: state of the art. *Prog. Polym. Sci.* 37(11), 1510–1551 (2012).
- [5] Mahanta N, Valiyaveetil S. Surface modified electrospun poly(vinyl alcohol) membranes for extracting nanoparticles from water. *Nanoscale* 3(11), 4625–4631 (2011).
- [6] Jang JH, Castano O, Kim HW. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61(12), 1065–1083 (2009).
- [7] Datta P, Chatterjee J, Dhara S. Electrospun nanofibers of a phosphorylated polymer – a bioinspired approach for bone graft applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 94, 177–183 (2012).
- [8] Meng ZX, Li HF, Sun ZZ, Zheng W, Zheng YF. Fabrication of mineralized electrospun PLGA and PLGA/gelatin nanofibers and their potential in bone tissue engineering. *Mat. Sci. Eng. C* 33(2), 699–706 (2013).
- [9] Prosecka E, Buzgo M, Rampichova M et al. Thin-layer hydroxyapatite deposition on a nanofiber surface stimulates mesenchymal stem cell proliferation and their differentiation into osteoblasts. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 428503 (2012).
- [10] Sill TJ, Von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29(13), 1989–2006 (2008).
- [11] Lee JB, Jeong SM, Kim K-J et al. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (hADSCs) on a dexamethasone eluting nanofiber scaffolds. *Tiss. Eng. Regen. Med.* 6(1), 371–379 (2009).
- [12] Li C, Vepari C, Jin H-J, Kim HJ, Kaplan DL. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(16), 3115–3124 (2006).
- [13] Song T, Zhang Y, Zhou T, Lim CT, Ramakrishna S, Liu B. Encapsulation of self-assembled FePt magnetic nanoparticles in PCL nanofibers by coaxial electrospinning. *Chem. Phys. Lett.* 415(4–6), 317–322 (2005).
- [14] Mickova A, Buzgo M, Benada O et al. Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system. *Biomacromolecules* 13(4), 952–962 (2012).
- [15] Buzgo M, Jakubova R, Mickova A et al. Time-regulated drug delivery system based on coaxially incorporated platelet alpha-granules for biomedical use. *Nanomedicine Lond.* 8(7), 1137–1154 (2013).
- [16] Xu X, Yang L, Xu X et al. Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions. *J. Control. Release* 108(1), 33–42 (2005).
- [17] Briggs T, Arinze TL. Examining the formulation of emulsion electrospinning for improving the release of bioactive proteins from electrospun fibers. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102(3), 674–684 (2014).
- [18] Zhang X, Gao X, Jiang L, Qin J. Flexible generation of gradient electrospinning nanofibers using a microfluidic assisted approach. *Langmuir* 28(26), 10026–10032 (2012).
- [19] Nie H, Soh BW, Fu Y-C, Wang C-H. Three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffold for BMP-2 delivery. *Biotechnol. Bioeng.* 99(1), 223–234 (2008).

- [20] Duval M, Gross E. Degradation of poly(ethylene oxide) in aqueous solutions by ultrasonic waves. *Macromolecules* 46(12), 4972–4977 (2013).
- [21] Basedow A, Ebert K. Ultrasonic degradation of polymers in solution. In: *Physical Chemistry*. Springer, Berlin-Heidelberg, Germany, 83–148 (1977).
- [22] Sahoo S, Ang LT, Goh JC-H, Toh S-L. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93A(4), 1539–1550 (2010).
- [23] Lo YL, Hsu CY, Lin HR. pH-and thermo-sensitive pluronic/ poly(acrylic acid) in situ hydrogels for sustained release of an anticancer drug. *J. Drug Target* 21(1), 54–66 (2013).
- [24] Hua S, Ma H, Li X, Yang H, Wang A. pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca²⁺ crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium. *Int. J. Biol. Macromol.* 46(5), 517–523 (2010).
- [25] Deckers R, Moonen CT. Ultrasound triggered, image guided, local drug delivery. *J. Control. Release* 148(1), 25–33 (2010).
- [26] Kim J, Kim IS, Cho TH et al. In vivo evaluation of MMP sensitive high-molecular weight HA-based hydrogels for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 95(3), 673–81 (2010).

Tento příspěvek vznikl za podpory Evropské unie, projektu OP VaVpI č. CZ.1.05/2.1.00/03.0091 – Univerzitní centrum energeticky efektivních budov.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI

