

WYBRANE METODY OTRZYMYWANIA POROWATYCH RUSZTOWAŃ W INŻYNIERII TKANKOWEJ

SELECTED METHODS OF PREPARATION OF POROUS SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING

Michał Dziadek^{1*}, Katarzyna Cholewa-Kowalska²

¹ Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Wydział Inżynierii Materiałowej
i Ceramiki, Katedra Fizykochemii i Modelowania Procesów,
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30

² Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Wydział Inżynierii Materiałowej
i Ceramiki, Katedra Technologii Szkła i Powłok Amorficznych,
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30

* e-mail: dziadek@agh.edu.pl

STRESZCZENIE

Inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną, której celem jest opracowanie biologicznych substytutów umożliwiających regenerację lub zastąpienie uszkodzonych lub zmienionych chorobowo tkanek czy organów. Dąży się do tego, aby rusztowania tkankowe posiadały wymagane korzystne cechy oraz spełniały przynajmniej niektóre funkcje naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednym z najważniejszych etapów opracowania podłoża jest projektowanie i wytwarzanie przestrzennej, wysoko porowatej struktury o pożądanym kształcie i rozmiarze porów. W niniejszym opracowaniu przedstawiono stan wiedzy na temat najpopularniejszych metod wytwarzania przestrzennych rusztowań w inżynierii tkankowej, do których należą: odlewanie z roztworu z wymywaniem porogenu, termicznie indukowana separacja faz oraz separacja faz w układzie rozpuszczalnik–nierozpuszczalnik.

Słowa kluczowe: inżynieria tkankowa, rusztowania porowate, odlewanie z roztworu z wymywaniem porogenu, termicznie indukowana separacja faz, separacja faz w układzie rozpuszczalnik–nierozpuszczalnik

ABSTRACT

Tissue engineering is an interdisciplinary field aiming to develop of biological substitutes, that are able to regenerate or replace damaged or diseased tissues or organs. The approach to tissue engineering is to use scaffolds that mimics multiple advantageous characteristics of the native extracellular matrix. One of the most important stages of building scaffolds is the design and preparation of a porous, three-dimensional structure with high porosity, and required size and shape of the pores. In this review, state of the art of the most common fabrication methods of three-dimensional biomimetic scaffolds are presented that include: solvent casting particle leaching (SCPL), thermally induced phase separation (TIPS), and liquid induced phase separation (LIPS).

Keywords: tissue engineering, porous scaffolds, solvent casting particulate leaching (SCPL), thermally induced phase separation (TIPS), liquid induced phase separation (LIPS)

1. Wstęp

Idea inżynierii tkankowej pojawiła się pod koniec lat 80. ubiegłego stulecia w odpowiedzi na problemy współczesnej implantologii oraz transplantologii. Inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną łączącą wiedzę z zakresu nauk przyrodniczych (biologii, genetyki, biochemii, chemii), medycyny oraz inżynierii materiałowej. Jej głównym zadaniem jest wytwarzanie przestrzennych, porowatych podłoży (ang. *scaffold*) zapewniających odpowiednie środowisko do regeneracji uszkodzonych tkanek czy narządów. Podłoża te mają zasadniczo spełniać funkcję czasowej macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*), umożliwiając różnicowanie i proliferację osadzonych komórek wspomagane dostarczonymi cząstkami sygnałowymi (np. czynniki wzrostu, angiogenezy, przylegania komórek). Tak przygotowane w warunkach *in vitro* substytuty tkankowe mogą zostać wszczepione w miejsce ubytku tkanki lub narządu. Dalsza regeneracja przebiega warunkach *in vivo* [1, 2, 3].

Naturalna macierz zewnątrzkomórkowa spełnia wiele istotnych funkcji zarówno na poziomie komórkowym, tkankowym, jak również narządowym. Funkcje te oraz właściwości ECM zależą od rodzaju tkanki. Ważnym zagadnieniem jest dostosowanie właściwości podłoża do właściwości regenerowanej tkanki. Dąży się do tego, aby syntetyczna macierz zewnątrzkomórkowa wykazywała biomimetyzm, to znaczy naśladowała pewne korzystne cechy oraz spełniała niektóre funkcje naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej [2, 4, 5]. Rusztowania w inżynierii tkankowej odgrywają kluczową rolę pozwalając dostarczyć komórki w miejsce ubytku, a także zapewniając odpowiednie środowisko do odbudowy funkcjonalnej tkanki [6, 7].

Jednym z ważniejszych parametrów podłoży tkankowych jest architektura – porowatość, wielkość, geometria, połączenie oraz rozmieszczenie porów w materiale. Duża porowatość otwarta pozwala na zasiedlenie oraz dostarczenie komórek do miejsca regeneracji, umożliwia transport składników odżywczych i produktów przemiany materii, a także unaczynienie nowopowstającej tkanki. Kluczową rolę odgrywa również hierarchiczna struktura porów rozpatrywana na poziomie mili-, mikro- oraz nanometrów. Poziom mili- determinuje kształt oraz wymiary rusztowania, a także jego właściwości mechaniczne. Mikrostruktura wpływa na migrację komórek, transport składników odżywczych oraz produktów ubocznych. Z kolei struktura nanometryczna zapewnia adhezję komórek, a także wpływa na ekspresję składników ECM [3, 4, 8]. Dla nowopowstających naczyń optymalny średni wymiar porów wynosi 5 μm , dla rozwoju hepatocytów około 20 μm , dla regeneracji skóry 20–125 μm , dla regeneracji tkanki kostnej 100–350 μm . Pory o średnicy większej niż 500 μm sprzyjają powstawaniu tkanki włóknistej (bliznowatej) i szybkiemu jej unaczynieniu. Na procesy życiowe komórek ma również wpływ kształt porów. Powinien on pozwalać zarówno na adhezję oraz rozplaszczanie się komórek oraz na przyjmowanie przez komórkę kulistego kształtu, niezbędnego do przeprowadzania specyficznych procesów życiowych [9].

Duży wpływ na różnicowanie się, migrację, wzrost i proliferację komórek, poza strukturą porowatą, mają właściwości mechaniczne ECM – moduł sprężystości, czy gęstość [4, 10, 11]. Dlatego też najlepszym podejściem jest dostosowanie właściwości mechanicznych podłoża do właściwości naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej danej tkanki [2, 12]. Bodźce mechaniczne przekazywane komórkom za pośrednictwem syntetycznej macierzy wpływają pozytywnie na sekrecję składników naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej oraz jej przebudowę [4]. Drugim aspektem właściwości mechanicznych syntetycznej ECM jest stworzenie tymczasowej, strukturalnej podpory dla komórek. W wielu przypadkach zachodzi również potrzeba tymczasowego przejęcia funkcji mechanicznych danej tkanki czy narządu [13]. Syntetyczna macierz umożliwia przenoszenie części naprężeń oraz zapewnia ochronę komórek przed nadmiernymi obciążeniami aż do czasu, dopóki powstająca tkanka nie osiągnie wystarczającej wytrzymałości [14, 15]. Rusztowanie tkankowe powinno również zachowywać stabilność wymiarów i struktury po implantacji, do czasu powstania tkanki. W szczególności ważne jest to w przypadku tkanek twardych – tkanki kostnej, czy chrzęstnej [9].

Pożądaną architekturę oraz parametry mechaniczne rusztowania można uzyskać przede wszystkim przez dobór odpowiednich metod otrzymywania, ich łączenie, a także stosowanie różnorodnych materiałów, w tym kompozytów. Kluczowym wyzwaniem jest zapewnienie odpowiedniej porowatości

i właściwości mechanicznych podłoża, umożliwiającą jednoczesną migrację oraz komunikację komórek, transport substancji odżywczych oraz ubocznych, zapewnienie środowiska niezbędnego do różnicowania i proliferacji komórek, a także przenoszenie części naprężeń.

2. Metody otrzymywania porowatych rusztowań dla inżynierii tkankowej

W literaturze opisano wiele technik otrzymywania przestrzennych rusztowań do zastosowań inżynierii tkankowej. Różnorodne metody wytwarzania pozwalają uzyskać sieć połączonych porów, a także kontrolować właściwości mechaniczne, czy czas biodegradacji podłoża. Metody te mają zarówno zalety, jak i wady, dlatego też ciągle poszukuje się nowych technik wytwarzania. W rozdziale tym zostaną przedstawione najpopularniejsze metody otrzymywania rusztowań polimerowych oraz kompozytowych, o osnowie polimerowej, dla celów inżynierii tkankowej, pozwalające kontrolować wymienione właściwości w szerokim zakresie.

2.1. Odlewanie z roztworu z wymywaniem porogenu

Jedną z najczęściej spotykanych metod otrzymywania porowatych rusztowań jest metoda odlewania z roztworu, w połączeniu z wymywaniem porogenu (SCPL, ang. *solvent casting particulate leaching*). Polega ona na selektywnym wymywaniu cząstek wcześniej zdyspergowanych w matrycy polimerowej. Proces ten składa się z następujących etapów:

- uzyskanie roztworu polimeru przez rozpuszczanie w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku organicznym;
- zdyspergowanie cząstek porogenu w uzyskanym roztworze;
- odlewanie roztworu do form o pożądanym kształcie;
- utrwalenie kształtu przez odparowanie rozpuszczalnika;
- otrzymanie porowatej struktury przez wymycie cząstek porogenu z polimerowej matrycy [8, 14, 16, 17].

Najczęściej stosowanymi porogenami są: chlorek sodu, sacharoza, glukoza, sfery żelatynowe, winian sodu oraz cytrynian sodu o odpowiedniej frakcji ziarnowej [9, 12, 16, 17, 18, 19]. Można również stosować kulki parafinowe, wówczas proces wymywania prowadzi się w podwyższonej temperaturze [17]. Jednym z wymagań jest nierozpuszczalność porogenu w rozpuszczalniku stosowanym w celu uzyskania roztworu polimeru [16].

Proces jest stosunkowo łatwy do przeprowadzenia i zazwyczaj w całości przebiega w temperaturze pokojowej [16]. Dużą zaletą tej metody jest możliwość kontrolowania porowatości, a także wymiaru i geometrii porów wytwarzanego rusztowania odpowiednio przez takie czynniki, jak ilość, wielkość oraz kształt cząstek porogenu [16, 17]. Dzięki tej metodzie można uzyskać porowatość od 30% do ponad 93% oraz wielkość porów wahającą się pomiędzy 50 μm a 1 mm [8, 9, 17, 18]. Wytrzymałość mechaniczną oraz czas degradacji matrycy można również kontrolować przez ilość porogenu, a także stężenie polimeru. Wyższe stężenie polimeru powoduje wzrost wytrzymałości podłoża. Z kolei większa ilość porogenu, a co za tym idzie większa porowatość, powoduje pogorszenie właściwości mechanicznych [16].

Istnieje jednak problem z wytworzeniem sieci połączonych oraz otwartych porów, zwłaszcza w przypadku niskich porowatości rusztowania (poniżej 65% całkowitego udziału objętościowego porogenu). Wynika to z faktu, iż łączność pomiędzy porami determinowana jest przez orientację przestrzenną cząstek porogenu w matrycy polimerowej. W związku z tym, mniejszy udział objętościowy porogenu zmniejsza liczbę statystycznych punktów styku pomiędzy poszczególnymi cząstkami, czyli połączeń porów po usunięciu porogenu. Dodatkowo niski udział objętościowy porogenu, może być przyczyną niecałkowitego usunięcia jego cząstek z matrycy polimerowej [17]. Związane jest z tym kolejne ograniczenie tej metody, którym jest wielkość otrzymywanych rusztowań. Całkowite usunięcie porogenu, a więc uzyskanie jednolitej struktury rozkładu porów można osiągnąć jedynie dla niewielkich form przestrzennych, których grubość nie przekracza 3–4 mm oraz cienkich membran i folii [9, 16, 18]. Zbyt duża grubość rusztowania stanowi również przeszkodę dla całkowitego odparowania rozpuszczalnika [17]. Problemy te można rozwiązać przez laminowanie cienkich form uzyskanych tą metodą [8, 9, 16, 20]. Pozwala to na uzyskanie większych rusztowań,

jednak posiadających tylko częściowo połączoną sieć porów. Ograniczeniem metody jest również brak kontroli wielkości połączenia porów, które bezpośrednio wpływa na migrację komórek, a także wrastanie naczyń krwionośnych. Częściowo problem ten można rozwiązać poprzez stosowanie cząstek porogenu, z których podczas procesu wymywania powstają produkty gazowe (ang. *gas foaming porogen leaching*) [5, 17]. Stosowanym porogeniem może być wodorowęglan amonu lub wodorowęglan sodu, które w kontakcie z wodą wydzielają dwutlenek węgla oraz, w przypadku pierwszego związku, gazowy amoniak [5].

Można również łączyć metodę wymywania porogenu z innymi technikami wytwarzania porowatych rusztowań, takimi jak separacja faz, liofilizacja czy też metody szybkiego wytwarzania (RP; ang. *rapid prototyping*), do których należą osadzanie topionego materiału (FDM; ang. *fused deposition modeling*), czy drukowanie przestrzenne (ang. *3D printing*). W takim przypadku konieczny jest odpowiedni dobór parametrów w celu wytworzenia wystarczającej ilości połączeń pomiędzy porami oraz odpowiedniej wielkości połączeń. Najczęściej jednak kombinacja technik prowadzi do wytworzenia struktury charakteryzującej się dużym rozrzutem wielkości porów oraz różną ich geometrią. Duże pory zazwyczaj stanowią luki po usuniętym porogenu, natomiast mniejsze pory charakterystyczne są dla innych metod. Zatem dzięki łączeniu metod można uzyskać hierarchiczną strukturę porów [17].

Inną wadą metody wymywania porogenu jest stosowanie rozpuszczalników organicznych, które mogą być trudne do całkowitego usunięcia, przez co mogą ograniczać adhezję, proliferację oraz inne procesy życiowe komórek, a także wpływać niekorzystnie na otaczające tkanki po implantacji [8, 17, 18]. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie metody wtryskiwania lub prasowania na gorąco połączonych z wymywaniem porogenu (ang. *melt-molding* lub *hot-pressing porogen leaching*). Eliminuje ona potrzebę stosowania rozpuszczalników [17].

Architektura rusztowania uzyskanego metodą wymywania porogenu jest odpowiednia do regeneracji tkanki kostnej oraz chrzęstnej [16, 17, 18]. Jednak właściwości mechaniczne dalekie są od właściwości kości gąbczastej [18]. Metoda wymywania porogenu wykorzystywana jest również do otrzymywania, obok polimerowych podłoży, także rusztowań kompozytowych np. polimerowo-ceramicznych: PLGA/BG PCL/BG-45S5 oraz PCL/HAp [21, 22, 23, 24, 25].

2.2. Separacja faz

Często wykorzystywaną metodą otrzymywania porowatych rusztowań oraz membran jest separacja faz [26, 27]. Separacja faz roztworu polimeru może być wywołana na dwa sposoby, w zależności od czynnika indukującego separację:

- termicznie indukowana separacja faz (TIPS, ang. *thermal induced phase separation*), w której czynnikiem indukującym jest temperatura;
- inwersja faz w układzie rozpuszczalnik–nierozpuszczalnik (LIPS, ang. *liquid induced phase separation, immersion precipitation*), w której o inwersji faz decyduje obecność trzeciego składnika – nierozpuszczalnika – w układzie polimer–rozpuszczalnik–nierozpuszczalnik [27].

2.2.1. Termicznie indukowana separacja faz

Metodę termicznie indukowanej separacji faz, w zależności od temperatury, w jakiej zachodzi proces, można podzielić na dwa rodzaje:

- termicznie indukowaną separację faz w układzie ciecz–ciecz (ang. *liquid–liquid TIPS*), która zachodzi jeżeli temperatura procesu jest wyższa od temperatury krystalizacji rozpuszczalnika lub od punktu zamarzania roztworu;
- termicznie indukowaną separację faz w układzie ciało stałe–ciecz (ang. *solid–liquid TIPS*), która ma miejsce jeżeli osiągnięta zostanie temperatura krystalizacji rozpuszczalnika [28].

2.2.1.1. Termicznie indukowana separacja faz w układzie ciecz–ciecz

Do popularnych metod otrzymywania porowatych rusztowań dla inżynierii tkankowej należy metoda termicznie indukowanej separacji faz w układzie ciecz–ciecz połączona z liofilizacją (ang. *liquid–*

liquid TIPS with freezing-drying). Metoda ta oparta jest na wywołaniu separacji dwóch niemieszających się faz w homogenicznym układzie roztworu polimeru (układ jednofazowy, dwuskładnikowy: polimer–rozpuszczalnik). Spadek temperatury powoduje niestabilność termodynamiczną układu, który dąży do obniżenia energii swobodnej, czego skutkiem jest separacja faz. Wynikiem jest powstanie dwóch termodynamicznie stabilnych, niemieszających się faz: o wysokim oraz niskim stężeniu polimeru. Następnie faza uboga w polimer jest usuwana w procesie mrożenia i liofilizacji (sublimacji pod obniżonym ciśnieniem). Powstałe luki po usunięciu fazy bogatej w rozpuszczalnik stanowią pory otrzymanego materiału [8, 27, 29].

Proces ten przebiega w następujących etapach:

- uzyskanie roztworu polimeru przez rozpuszczanie w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku organicznym;
- odlewanie roztworu do form o pożądanym kształcie;
- wywołanie separacji faz przez schłodzenie roztworu;
- zamrożenie roztworu;
- usunięcie rozpuszczalnika przez liofilizację [5].

Metodę ilustruje się często za pomocą diagramu fazowego, będącego funkcją temperatury od stężenia polimeru w układzie dwuskładnikowym polimer–rozpuszczalnik. Powyżej krzywej binodalnej występuje obszar stabilnego termodynamicznie, homogenicznego roztworu jednofazowego, dwuskładnikowego. W zależności od stężenia polimeru separacja faz w układzie ciecz–ciecz przebiega według różnych mechanizmów. Obszar pomiędzy krzywą binodalną i spinodalną jest obszarem roztworów metastabilnych, o różnym stężeniu polimeru. Oznacza to, iż roztwory te są stabilne w bardzo wąskim zakresie stężeń polimeru. Obie krzywe mają wspólne maksimum, które w układach dwuskładnikowych wyznacza temperaturę oraz stężenie krytyczne – punkt krytyczny. Separacja ciecz–ciecz odbywa się przez zarodkowanie oraz wzrost kropli fazy ubogiej w polimer, jeżeli stężenie polimeru w roztworze jest większe od stężenia krytycznego. Z kolei, jeżeli stężenie polimeru w roztworze jest mniejsze od stężenia krytycznego, separacja następuje w wyniku nukleacji oraz wzrostu kropli fazy bogatej w polimer. Krople po zarodkowaniu mogą wzrastać ponieważ istnieje gradient stężeń w ich kierunku. Poniżej krzywej spinodalnej występuje obszar roztworów niestabilnych. Dla obniżenia energii swobodnej układu, cząsteczki obu składników niestabilnego roztworu przemieszczają się z obszarów o niskim stężeniu do obszarów o wysokim stężeniu. W ten sposób powstaje dwufazowa struktura złożona z fazy bogatej oraz ubogiej w polimer. Fazy te są całkowicie ze sobą połączone [27].

Przez sublimację fazy ubogiej w polimer, powstaje porowata struktura polimeru. Pierwszy mechanizm separacji faz prowadzi do powstania polimerowych kul, drugi mechanizm prowadzi do powstania zamkniętych porów, uwięzionych w matrycy polimerowej. Najlepszą porowatość, z punktu widzenia rusztowań dla inżynierii tkankowej, uzyskuje się w procesie spinodalnej separacji faz. Uzyskana struktura posiada sieć połączonych i otwartych porów [12, 26, 27, 29]. Stopień połączenia oraz rozmiar porów uzyskanych na drodze separacji spinodalnej można kontrolować za pomocą prędkości chłodzenia, stężenia polimeru oraz lepkości rozpuszczalnika. Wzrost stężenia polimeru prowadzi do obniżenia stopnia połączenia porów. Z kolei duża szybkość chłodzenia oraz lepkość rozpuszczalnika prowadzi do zmniejszenia wielkości porów, przy określonym stężeniu polimeru. Zależności te mogą być wykorzystane do otrzymania gradientowej porowatości podłoża. Jeżeli roztwór polimeru zostanie umieszczony pomiędzy materiałem o wysokiej przewodności cieplnej a izolatorem cieplnym (np. powietrzem), uzyskuje się zmienny stopień przechłodzenia kolejnych warstw materiału. Prowadzi to do uzyskania gradientowej porowatości [27].

Bezpośrednią separację spinodalną można osiągnąć jedynie przy stężeniu krytycznym polimeru w roztworze. W innym przypadku najpierw zostaje osiągnięta separacja binodalna. Ponieważ stopień przechłodzenia roztworu polimeru, niezbędny dla indukcji separacji faz w zakresie binodalnym jest niski, w celu zapobieżenia separacji faz w zakresie metastabilnym można stosować szybkie prędkości chłodzenia oraz wysoki stopień przechłodzenia [27].

Całkowita separacja faz może być uzyskana dzięki sile napędowej, jaką jest międzyfazowa energia swobodna. Dzięki niej dochodzi do koalescencji – łączenia się małych kropli w większe – przez co zmniejsza się ich liczba. Finalny rozmiar kropli zależy również od wspomnianego już gradientu stężeń

w ich pobliżu. Tylko krople większe od pewnej krytycznej wielkości są w stanie wzrastać dalej, kosztem kropli mniejszych. Promień kropli fazy ubogiej w polimer wzrasta, z kolei ich liczba maleje wykładniczo w czasie. Tempo wzrostu kropli maleje wraz ze wzrostem stężenia polimeru, a także obniżeniem temperatury procesu, co wynika ze wzrostu lepkości układu [30]. Podczas chłodzenia proces separacji faz może zachodzić wielokrotnie, co może wpływać na strukturę oraz stopień połączenia porów. Duży wpływ na wzrost kropli ma również napięcie powierzchniowe pomiędzy fazami oraz lepkość roztworu [27].

Oprócz separacji faz w układzie ciecz–ciecz, która spełnia kluczową rolę w metodzie TIPS, mogą również zachodzić inne przemiany fazowe. W zależności od fizykochemicznych właściwości układu może to być krystalizacja polimeru z roztworu lub witrifikacja roztworu polimeru. Przemiany te, wraz z separacją faz, mogą współistnieć i mieć istotny wpływ na formowanie porowatej struktury materiału [27, 30]. Przy niskich stężeniach polimeru w roztworze, uprzywilejowanym procesem jest separacja faz w układzie ciecz–ciecz. Z kolei pozostałe przemiany mogą zaistnieć przy wysokich stężeniach polimeru. W obrębie fazy o wysokim stężeniu polimeru, w wyniku separacji faz, również może dojść do krystalizacji czy witrifikacji. Ponadto współistniejące przemiany fazowe prowadzą do ustalenia struktury roztworu na pewnym etapie separacji faz. Umożliwiają także, w przypadku krystalizacji polimeru z roztworu, zachodzenie separacji faz w układzie ciało stałe–ciecz [27].

Ograniczeniem tej metody jest trudność kontrolowania porowatości, rozmiaru porów, a także połączenia porów. W zakresie obszaru spinodalnego można kontrolować kształt, rozmiar oraz dystrybucję porów za pomocą niewielkich zmian parametrów, takich jak: masa cząsteczkowa polimeru, rodzaj rozpuszczalnika, stężenie polimeru, parametry schładzania: szybkość obniżania temperatury, minimalna osiągnięta temperatura, czy czas chłodzenia [9, 26, 29, 31]. Trudno jest również uzyskać powtarzalność parametrów porowatości, ze względu na dużą czułość metody na powyższe parametry.

Metodą tą można uzyskać przestrzenne podłoża o porowatości do 96% oraz wielkości porów w zakresie od 10 do 300 μm [18, 26, 29, 31]. Jednak większość autorów podaje, iż wielkość porów nie przekracza 35 μm [26, 31]. Uzyskane pory mają zwykle anizotropową morfologię [29, 31]. Wadą, podobnie, jak w przypadku metody wymywania porogenu, jest stosowanie toksycznych rozpuszczalników [8]. Metodą TIPS połączoną z liofilizacją, oprócz polimerowych rusztowań dla inżynierii tkankowej, można również otrzymywać podłoża kompozytowe o osnowie polimerowej na przykład PLGA/BG-45S5, PDLA/BG-45S5 [31].

2.2.1.2. Termicznie indukowana separacja faz w układzie ciało stałe–ciecz

Metoda TIPS w układzie ciało stałe–ciecz nie jest tak popularna jak poprzednio opisywana. Metoda nazywana jest również liofilizacją (ang. *freeze-drying*) [32]. Proces ten polega na szybkim obniżeniu temperatury w celu wywołania krystalizacji rozpuszczalnika z roztworu polimeru. Aby nie dopuścić do separacji faz w układzie ciecz–ciecz, obniżanie temperatury musi przebiegać bardzo szybko, lub temperatura zamrażania rozpuszczalnika musi być wyższa od temperatury zachodzenia separacji faz w układzie ciecz–ciecz [29, 33, 34]. Temperatura procesu jest dużo niższa od temperatury stosowanej w przypadku separacji w układzie ciecz–ciecz. Podczas krystalizacji rozpuszczalnika, cząsteczki polimeru zostają wyparte z roztworu, ulegają agregacji i przemieszczają się wraz z frontem krystalizacji rozpuszczalnika. Na granicach kryształów tworzy się faza bogata w polimer, stanowiąca szkielet rusztowania [20, 33]. Po usunięciu kryształów rozpuszczalnika w procesie liofilizacji, podobnie, jak w przypadku metody separacji w układzie ciecz–ciecz, powstałe luki stanowią porowatość materiału. Wielkość oraz kształt porów zależy od wielkości oraz geometrii powstałych kryształów rozpuszczalnika [14, 20, 35].

Proces liofilizacji prowadzący do uzyskania porowatych rusztowań dla inżynierii tkankowej przebiega w kilku etapach::

- uzyskanie roztworu polimeru przez rozpuszczanie w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku organicznym;
- odlewanie roztworu do form o pożądanym kształcie;
- wywołanie separacji faz przez zamrażanie roztworu;
- usunięcie rozpuszczalnika przez liofilizację [32].

Porowatość, wielkość, geometrię oraz orientację porów w rusztowaniu otrzymywanym za pomocą inwersji fazowej w układzie ciało stałe–ciecz można kontrolować za pomocą kilku parametrów procesu. Należą do nich: rodzaj, masa cząsteczkowa oraz stężenie polimeru, rodzaj i stężenie rozpuszczalnika, a także szybkość obniżania temperatury, czas mrożenia oraz uzyskany gradient temperatury [36, 37].

Przy dużym gradiencie temperatury można otrzymać zorientowaną strukturę porów. Gradient ten można uzyskać przy niskich temperaturach oraz szybkim procesie mrożenia – działając na roztwór ciekłym azotem (temperatura $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Prowadzi to do nukleacji wielu zarodków krystalizacji rozpuszczalnika oraz dużej prędkości krystalizacji. W wyniku tego uzyskuje się dużą ilość drobnych kryształów rozpuszczalnika, równomiernie rozmieszczonych w matrycy polimerowej, które po procesie sublimacji stanowią pory materiału [20, 29, 33, 37, 38]. Skrócenie czasu zamrażania również prowadzi do powstania mniejszych porów [38]. Z kolei, wyższe temperatury procesu (od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) oraz długi czas mrożenia prowadzą do powstania mniejszej liczby dużych porów [37]. Zbyt niska szybkość chłodzenia może prowadzić do separacji faz w układzie ciecz–ciecz przed uzyskaniem punktu zamrażania rozpuszczalnika. Wówczas mamy izotropową porowatość, a wielkość porów wynosi około $10\text{ }\mu\text{m}$ [38]. Jednoosiowy gradient temperatury sprzyja powstawaniu mikrotubularnych, równoległe ułożonych względem siebie porów, zorientowanych wzdłuż wektora gradientu. Jeżeli gradient temperatur nie jest jednoosiowy, wówczas występuje przypadkowe zorientowanie porów [33, 39].

Badania wykazały, iż wyższe stężenie polimeru powoduje powstanie grubszych ścianek porów oraz zmniejszenie ich średnicy w porównaniu do mniejszych stężeń polimeru [29]. Według literatury metodą tą można uzyskać materiały o średniej wielkości porów z zakresu $10\text{--}350\text{ }\mu\text{m}$ oraz porowatości $30\text{--}97\%$ [14, 32]. Uzyskane pory są otwarte oraz tworzą połączoną sieć [29, 35]. Technika liofilizacji można uzyskać zarówno porowate materiały polimerowe, jak również rusztowania kompozytowe o osnowie polimerowej [14, 35].

2.2.2. Inwersja faz w układzie rozpuszczalnik–nierozpuszczalnik

Kolejną metodą otrzymywania polimerowych oraz kompozytowych porowatych rusztowań dla inżynierii tkankowej jest inwersja fazowa. Stan nierównowagowy, w odróżnieniu od metody TIPS, indukowany jest przez wprowadzenie do jednofazowego, dwuskładnikowego układu polimer–rozpuszczalnik, trzeciego składnika, którym jest nierozpuszczalnik dla polimeru. W układzie, który dąży do minimalizacji energii swobodnej dochodzi do separacji faz, przez co zostaje osiągnięty nowy stan równowagi termodynamicznej. Efektem jest powstanie dwóch faz – bogatej oraz ubogiej w polimer. Proces zachodzi dzięki dyfuzji rozpuszczalnika z roztworu polimeru do kąpieli strącającej oraz nierozpuszczalnika z kąpieli strącającej do roztworu polimeru [30]. Proces inwersji faz można traktować jako proces izotermiczny [27, 40]. Składa się on z następujących etapów:

- uzyskanie roztworu polimeru przez rozpuszczanie w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku organicznym;
- odlewanie roztworu do form o pożądanym kształcie;
- wywołanie inwersji faz przez zanurzenie roztworu w kąpieli strącającej;
- usunięcie rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika przez suszenie pod obniżonym ciśnieniem (ewentualnie przez zamrażanie i liofilizację) [41, 42].

Podobnie, jak w przypadku separacji fazowej indukowanej termicznie, również podczas inwersji fazowej mogą zachodzić dwa rodzaje przemian. Pierwszy to inwersja faz w układzie ciecz–ciecz [27, 30, 40, 43]. W literaturze inne przemiany są zwykle określane jako żelowanie (ang. *gel transition*). Należą do nich krystalizacja oraz zeszklenie (witryfikacja). Przemiany te bezpośrednio związane są ze zmianą lepkości układu. Dla polimerów amorficznych, podobnie jak w przypadku TIPS w układzie ciecz–ciecz, struktura materiału może być stabilizowana przez proces witryfikacji. Z kolei dla polimerów półkryształicznych może zachodzić zjawisko krystalizacji polimeru z roztworu [27].

Diagram fazowy podzielony jest pomiędzy obszar jednofazowego, homogenicznego roztworu polimeru oraz obszar luki mieszalności, która pojawia się jeżeli do układu zostanie wprowadzona dostateczna ilość nierozpuszczalnika. Zasadniczo w obszarze separacji faz występują trzy regiony analogiczne do obszaru luki mieszalności w układzie dwuskładnikowym. Regiony metastabilne

występują pomiędzy binodą oraz spinodą, analogicznie dla wysokiego oraz niskiego stężenia polimeru. Region niestabilny jest otoczony przez krzywą spinodalną. Separacja faz w obszarze luki mieszalności przebiega w taki sam sposób, jak w przypadku układu dwuskładnikowego [27, 40]. Szczególnie pożądaną porowatością z punktu widzenia inżynierii tkankowej jest porowatość uzyskana na drodze separacji spinodalnej, w wyniku której powstaje sieć połączonych i otwartych porów [43]. Rozmiar oraz położenie obszaru luki mieszalności na trójkącie kompozycji determinowane są przez molowy udział składników, a także ich wzajemne oddziaływanie. Jest ono opisane za pomocą trzech parametrów odniesionych do układów dwuskładnikowych: $\chi_{\text{polimer-rozpuszczalnik}}$, $\chi_{\text{rozpuszczalnik-nierozpuszczalnik}}$, $\chi_{\text{polimer-nierozpuszczalnik}}$ [27, 43]. Znajomość wymienionych parametrów pozwala na przewidywanie kształtu diagramu fazowego, z czym wiąże się uzyskanie pożądanej struktury materiału [43].

Kluczowym procesem jest transport masy w obrębie układu, który zależy głównie od szybkości dyfuzji rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika, z oraz do roztworu polimeru. W dużej mierze determinuje to mikrostrukturę rusztowania. Jeżeli nierozpuszczalnik dyfunduje do roztworu polimeru szybciej niż rozpuszczalnik z roztworu polimeru, wówczas zachodzi separacja faz w układzie ciecz–ciecz, czego rezultatem jest porowata struktura materiału [40]. Separacja faz w układzie ciecz–ciecz zachodzi również, jeżeli w roztworze mamy niskie stężenie polimeru [43]. W innych przypadkach, jeżeli rozpuszczalnik dyfunduje z roztworu polimeru szybciej niż nierozpuszczalnik do roztworu lub jeżeli w roztworze występuje wysokie stężenie polimeru, zachodzi proces żelowania. Powstaje wówczas lita, nieporowata struktura [40, 43]. Procesy żelowania oraz separacji faz w układzie ciecz–ciecz mogą zachodzić równolegle po osiągnięciu odpowiedniego stężenia fazy bogatej w polimer [27].

Ze względu na różne mechanizmy formowania się mikrostruktury, w materiale można wyróżnić warstwę zewnętrzną oraz warstwy wewnętrzne. Warstwa zewnętrzna powstaje w wyniku opisanych już procesów żelowania. Procesy te zachodzą, ponieważ w chwili bezpośredniego kontaktu roztworu polimeru z nierozpuszczalnikiem, powstaje duży gradient stężeń. Rozpuszczalnik z roztworu polimeru szybko dyfunduje do kąpielii strącającej, a stosunkowo małe ilości nierozpuszczalnika przenikają do roztworu polimeru. Wzrastające stężenie polimeru powoduje wtrzyfikację lub krystalizację, przez co powstaje zwarta, nieporowata warstwa. Jej grubość wzrasta, dopóki dyfuzja rozpuszczalnika z głębszych warstw roztworu polimeru nie zostanie zahamowana przez tworzącą się litą warstwę. W międzyczasie nierozpuszczalnik dyfunduje przez powstającą zewnętrzną warstwę. Jeżeli w wewnętrznych warstwach materiału znajduje się określona ilość nierozpuszczalnika, wywoła to binodalną lub spinodalną separację fazową. W zależności od stężenia polimeru powstanie jedna z trzech opisanych porowatych struktur. Faza uboga w polimer wzrasta, jeżeli nierozpuszczalnik dyfunduje do warstw wewnętrznych, indukując tym samym dyfuzję rozpuszczalnika do tej fazy. Dyfuzja rozpuszczalnika do fazy ubogiej w polimer powoduje wzrost stężenia polimeru w otaczającej fazie bogatej w polimer. Przy wysokich stężeniach polimeru, również wewnętrzne warstwy materiału podlegają procesom żelowania, determinując strukturę ścian porów. Oczywiście w fazie ubogiej w polimer występuje zarówno rozpuszczalnik, jak i nierozpuszczalnik. Niewielkie ilości dyfundującego nierozpuszczalnika są niezbędne, aby doprowadzić do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika z fazy o wysokim stężeniu polimeru. W ten sposób powstaje stabilny szkielet, który po usunięciu rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika tworzy porowaty materiał [40].

Struktura warstwy zewnętrznej determinuje szybkość dyfuzji zarówno rozpuszczalnika, jak i nierozpuszczalnika, określając tym samym rodzaj przemian zachodzących w warstwach wewnętrznych otrzymanego rusztowania oraz jego mikrostrukturę. Gdy zewnętrzna warstwa jest mikroporowata, transport masy do wewnętrznych warstw jest ograniczony tylko w niewielkim stopniu. W konsekwencji, w warstwach wewnętrznych zachodzi proces żelowania. Struktura wewnętrzna podłoża jest wówczas nieporowata [40]. Jest to niepożądane zjawisko z punktu widzenia inżynierii tkankowej.

Metodą tą można uzyskać przestrzenne podłoża o porowatości od 61% do 98% oraz wielkości porów w zakresie od 10 μm do 50 μm [42, 44]. Technikę można stosować zarówno do otrzymywania podłoży polimerowych (PLLA, PCL), jak i kompozytowych z osnową polimerową (PCL/HAp) [41, 42, 44].

3. Podsumowanie

Wydaje się, iż jednym z najważniejszych parametrów podłoży dla inżynierii tkankowej, który decyduje o możliwości zastosowania w regeneracji danej tkanki, jest ich architektura. Wysoka porowatość, odpowiedni kształt oraz rozmiar porów pozwalają w warunkach *in vitro* na zasiedlenie materiału odpowiednimi komórkami oraz dostarczenie ich w miejsce ubytku. Z kolei w warunkach *in vivo* umożliwiają różnicowanie oraz proliferację komórek, unaczynienie nowopowstającej tkanki oraz transport substancji odżywczych, zapewniając środowisko sprzyjające regeneracji tkanki. Wymienione parametry rusztowań można kontrolować przede wszystkim przez dobór odpowiednich metod otrzymywania. Projektowanie architektury podłoży tkankowych wymaga poznania mechanizmów powstawania porowatości oraz wyznaczenia parametrów procesów wytwarzania, które na nią wpływają.

W literaturze można znaleźć opis wielu metod wytwarzania przestrzennych, wysoko porowatych rusztowań dla inżynierii tkankowej. Przedstawione metody należą do najpopularniejszych. Metoda wymywania porogenu daje możliwość stosunkowo łatwej kontroli porowatości, wielkości oraz kształtu porów. Dzięki niej można uzyskać pory o wielkości większej niż po zastosowaniu pozostałych opisanych metod. Metody separacji fazowej są bardzo czułe na takie parametry, jak stężenie roztworu polimeru, masa cząsteczkowa polimeru oraz rodzaj użytego rozpuszczalnika, a w przypadku metody TIPS, na parametry termiczne procesu. Powoduje to, iż trudno jest uzyskać powtarzalną mikrostrukturę materiału, ale z drugiej strony metoda ta daje duże możliwości projektowania architektury rusztowań. Ponieważ metody separacji fazowej pozwalają uzyskać pory o wielkości kilkudziesięciu, a nawet kilku mikrometrów często stosuje się tę metodę w połączeniu z metodą wymywania porogenu w celu uzyskania hierarchicznej struktury porów materiału.

LITERATURA

- [1] Y. Tabata: *Significance of release technology in tissue engineering*, Drug Discovery Today, vol. 10, 2005, s. 1639–1646.
- [2] B. Chan, B. Leong: *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*, European Spine Journal, vol. 17, 2008, s. 467–479.
- [3] S. Liao, C. Chan, S. Ramakrishna: *Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering*, Materials Science and Engineering C, vol. 28, 2008, s. 1189–1202.
- [4] K. Kima, I. Parkb, T. Hoshibac, H. Jiangd: *Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering*, Progress in Polymer Science, vol. 36, 2011, s. 238–268.
- [5] T. Kim, H. Shin, D. Lim, *Biomimetic scaffolds for tissue engineering*, Advanced Functional Materials, vol. 22, 2012, s. 2446–2468.
- [6] B. Kim, D. Mooney: *Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering*, Tibtech, vol. 16, 1998, s. 224–230.
- [7] F. Rosso, A. Giordano, M. Barbarisi, A. Barbarisi: *From cell–ECM interactions to tissue engineering*, Journal of Cellular Physiology, vol. 199, 2004, s. 174–180.
- [8] C. Liu, Z. Xia, J. Czernuszka: *Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering*, Chemical Engineering Research and Design, vol. 85, 2008, s. 1051–1064.
- [9] S. Yang, K. Leong, Z. Du, C. Chua: *The design of scaffolds for use in tissue engineering part I. Traditional factors*, Tissue Engineering, vol. 7, 2001, s. 679–689.
- [10] S. Owen, M. Shoichet: *Design of three-dimensional biomimetic scaffolds*, Journal of Biomedical Materials Research A, vol. 94, 2010, s. 1321–1331.
- [11] A. Seidi, M. Ramalingam, I. Elloumi-Hannachi, S. Ostrovidov: *Gradient biomaterials for soft-to-hard interface tissue engineering*, Acta Biomaterialia, vol. 7, 2011, s. 1441–1451.
- [12] P. Ma: *Biomimetic materials for tissue engineering*, Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 60, 2008, s. 184–198.
- [13] G. Chan, D. Mooney: *New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response*, Trends in Biotechnology, vol. 26, 2008, s. 382–392.
- [14] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J. Kenny: *Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review*, Polymer Degradation and Stability, vol. 95, 2010, s. 2126–2146.
- [15] M. Vert, S. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin: *Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 3, 1992, s. 432–446.
- [16] B. Stevens, Y. Yang, A. Mohandas, B. Stucker, K. Nguyen: *A review of materials, fabrication methods, and strategies*

- used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 85, 2008, s. 573–582.
- [17] J. Reignier, M. Huneault: *Preparation of interconnected polycaprolactone porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching*, *Polymer*, vol. 47, 2006, s. 4703–4717.
- [18] A. Salgado, O. Coutinho, R. Reis: *Bone tissue engineering: state of the art and future trends*, *Macromolecular Bioscience*, vol. 4, 2004, s. 743–765.
- [19] Q. Cai, J. Yang, J. Bei: *A novel porous cells scaffold made of polylactide–dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques*, *Biomaterials*, vol. 23, 2002, s. 4483–4492.
- [20] E. Sachlos, J. Czernuszka: *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds*, *European Cells and Materials*, vol. 5, 2003, s. 29–40.
- [21] V. Cannillo, F. Chiellini, P. Fabbri: *Production of Bioglass 45S5 – Polycaprolactone composite scaffolds*, *Composite Structures*, vol. 92, 2010, s. 1823–1832.
- [22] T. Kim, H. Shin, D. Lim: *Biomimetic scaffolds for tissue engineering*, *Advanced Functional Materials*, vol. 22, 2012, s. 2446–2468.
- [23] X. Li, J. Shi, X. Dong, L. Zhang, H. Zeng: *A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 84, 2008, s. 84–91.
- [24] H. Yu, H. Matthew, P. Wooley: *Effect of porosity and pore size on microstructures and mechanical properties of poly-epsilon-caprolactone–hydroxyapatite composites*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: Applied Biomaterials*, vol. 86, 2008, s. 541–547.
- [25] V. Guarino, F. Causa, P. Netti, G. Ciapetti, S. Pagani: *The role of hydroxyapatite as solid signal on performance of PCL porous scaffolds for bone tissue regeneration*, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 86, 2008, s. 548–557.
- [26] A. Mikos, J. Temenoff: *Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering*, *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 3, 2000, s. 1–6.
- [27] P. van de Witte, P. Dijkstra, J. van den Berg, J. Feijen: *Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation*, *Journal of Membrane Science*, vol. 117, 1996, s. 1–31.
- [28] V. Guarino, L. Ambrosio: *Temperature-driven processing techniques for manufacturing fully interconnected porous scaffolds in bone tissue engineering*, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 224, 2010, s. 1–13.
- [29] S. Wislet-Gendebien: *Advances in Regenerative Medicine*, InTech, Rijeka, 2011.
- [30] M. Di Luccio, R. Nobrega, C. Borges: *Microporous anisotropic phase inversion membranes from bisphenol-A polycarbonate: study of a ternary system*, *Polymer*, vol. 41, 2000, s. 4309–4315.
- [31] Q. Chen, A. Roether, A. Boccaccini: *Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials*, *Topics in Tissue Engineering*, vol. 4, 2008, s. 1–27.
- [32] T. Lu, Y. Li, T. Chen: *Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering*, *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, 2013, s. 337–350.
- [33] M. Woodruff, D. Hutmacher: *The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century*, *Progress in Polymer Science*, vol. 35, 2010, s. 1217–1256.
- [34] N. Sultana: *Biodegradable Polymer-based Scaffolds for Bone Tissue Engineering*, Springer, Berlin 2013.
- [35] X. Ma: *Scaffolds for tissue fabrication*, *Materials Today*, vol. 3, 2004, s. 30–40.
- [36] C. Schugens, V. Maquet, C. Grandfils, R. Jerome, P. Teyssie: *Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation: I. Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation*, *Polymer*, vol. 37, 1996, s. 1027–1038.
- [37] G. Hou, D. Grijpma, J. Feijen: *Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique*, *Biomaterials*, vol. 24, 2003, s. 1937–1947.
- [38] J. de Groot, A. Nijenhuis, P. Bruin: *Use of porous biodegradable polymer implants in meniscus reconstruction. 1) Preparation of porous biodegradable polyurethanes for the reconstruction of meniscus lesions*, *Colloid & Polymer Science*, vol. 268, 1990, s. 1073–1081.
- [39] P. Ma, R. Zhang: *Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds*, *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 56, 2001, s. 469–477.
- [40] T. Young, L. Chen, L. Cheng: *Membranes with a microparticulate morphology*, *Polymer*, 1996, vol. 37, s. 1305–1310.
- [41] A.G. Coombes, S.C. Rizzi, M. Williamson, J.E. Barralet: *Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery*, *Biomaterials*, vol. 25, 2004, s. 315–325.
- [42] C. Yeh, Y. Li, P. H. Chiang, C. Huan, Y. Wang, H. Chang: *Characterizing microporous PCL matrices for application of tissue engineering*, *Journal of Medical and Biological Engineering*, vol. 29, 2009, s. 92–97.
- [43] J. Wijmans, J. Kant, M. Mulder, C. Smolders: *Phase separation phenomena in solutions of polysulfone in mixtures of a solvent and a nonsolvent: relationship with membrane formation*, *Polymer*, vol. 26, 1985, s. 1539–1545.
- [44] A. Denga, A. Chena, S. Wanga, Y. Li, Y. Liua, X. Chenga, Z. Zhaoc, D. Lin: *Porous nanostructured poly-L-lactide scaffolds prepared by phase inversion using supercritical CO₂ as a nonsolvent in the presence of ammonium bicarbonate particles*, *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 77, 2013, s. 110–116.

otrzymano / submitted: 17.02.2014r.
wersja poprawiona / revised version: 22.07.2014r.
zaakceptowano / accepted: 30.09.2014r.