



Modifikace malopřůměrové cévní náhrady heparinem a nanocelulózou

Diplomová práce

Studijní program: N3106 – Textilní inženýrství
Studijní obor: 3106T018 – Netkané a nanovláknenné materiály
Autor práce: **Ing. Zuzana Hrubá**
Vedoucí práce: Ing. Petr Mikeš, Ph.D.





Modification of small diameter vascular graft by heparin and nanocellulose

Master thesis

Study programme: N3106 – Textile Engineering
Study branch: 3106T018 – Nonwoven and Nanomaterials
Author: **Ing. Zuzana Hrubá**
Supervisor: Ing. Petr Mikeš, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ing. Zuzana Hrubá**

Osobní číslo: **T15000133**

Studijní program: **N3106 Textilní inženýrství**

Studijní obor: **Netkané a nanovláknenné materiály**

Název tématu: **Modifikace maloprůměrové cévní náhrady heparinem a nanocelulózou**

Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše na dané téma.
2. Návrh modifikace vnitřní vrstvy stávající cévní náhrady látkami zabraňujícími srážení krve a podporujícími růst endotelových buněk.
3. Provedení experimentů: navazování heparinu na nanovláknennou vrstvu; modifikace bazální laminy pomocí nanocelulózy.
4. Biologické testování vyrobených vzorků.
5. Vyhodnocení experimentů.
6. Závěr.



Rozsah grafických prací: **dle potřeby dokumentace**

Rozsah pracovní zprávy: **40-60 dle potřeby**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1]DUFRESNE, A. Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials. Berlin: Walter de Gruyter, 2013.

[2]LIN, N. a DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect.

[3]PECKA, M. Laboratorní hematologie v přehledu: buňka a krevetvorba. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2002.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Petr Mikeš, Ph.D.**


Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce: **8. června 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2017**


Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka




prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 8. června 2016

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Petru Mikešovi Ph.D. a RNDr. Janě Horákové Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této práce.

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá modifikací maloprůměrové cévní náhrady heparinem a nanocelulózou. Rešeršní část diplomové práce je zaměřena na cévní náhrady, cévní systém, hemostázu a modifikaci maloprůměrových cévních náhrad.

Experimentální část je zaměřena na samotnou modifikaci maloprůměrové cévní náhrady heparinem a nanocelulózou. Dále se zabývá testováním modifikovaných materiálů pomocí endotelových buněk, testování trombogenicity a vlivu účinku heparinu na buňky.

KLÍČOVÁ SLOVA

maloprůměrová cévní náhrada, heparin, nanocelulóza, polydopamin

Annotation

This master thesis deals with modification of small-diameter vascular graft by heparin and nano-cellulose. Literature search was conducted to find a suitable procedures mainly focused on vascular grafts, vascular system, haemostasis and modification of small-diameter vascular grafts.

Experimental part includes the modification of small-diameter vascular graft by heparin and nanocellulose itself. It is also focused on testing of modified materials by endothelial cells, testing of thrombogenicity and the effect of heparin on cells.

KEYWORDS

Small-diameter graft, heparin, nanocellulose, polydopamine

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část	10
2.1 Cévní náhrady	10
2.1.1 Historie cévní chirurgie.....	10
2.1.2 Současné cévní náhrady	11
2.2 Maloprůměrové cévní náhrady	14
2.2.1 Vlastnosti cévní náhrady	15
2.3 Cévní systém	16
2.3.1 Struktura cévní stěny.....	16
2.3.2 Endotel	18
2.4 Hemostáza.....	18
2.4.1 Mechanismy hemostatických procesů.....	19
2.5 Trombogenicita maloprůměrových cévních náhrad.....	25
2.6 Modifikace maloprůměrových cévních náhrad.....	26
2.6.1 Heparin.....	27
2.6.2 Polydopamin	29
2.6.3 Celulóza	30
2.6.4 Nanocelulóza.....	32
3. Experimentální část.....	42
3.1 Materiál a přístrojové vybavení	42
3.2 Použité metody.....	43
3.2.1 Elektrostatické zvlákňování	43
3.2.2 Stanovení metabolické aktivity buněk (MTT test).....	44
3.2.3 Fluorescenční mikroskopie	45
3.2.4 Skenovací elektronová mikroskopie	45
3.2.5 Aktivovaný parciální tromboplastický čas (aPTT)	46
3.3 Modifikace materiálů nanocelulózou	46
3.3.1 Příprava roztoků pro elektrostatické zvlákňování	47
3.3.2 Modifikace tubulárních vzorků nanocelulózou.....	48
3.3.3 Charakterizace materiálů.....	49
3.3.4 Biologické testování materiálů modifikovaných nanocelulózou	49
3.3.4.2 Testování trombogenicity tubulárních vzorků blendy modifikovaného bakteriální nanocelulózou	50
3.4 Modifikace maloprůměrové cévní náhrady polydopaminem a heparinem	51
3.4.3 Biologické testování materiálů modifikovaných PDA a heparinem	53

4.	Výsledky a diskuze	57
4.1	Modifikace materiálů nanocelulózou	57
4.1.1	Modifikace planární vrstvy polykaprolaktonu nanocelulózou	57
4.1.2	Modifikace tubulárního blendu nanocelulózou	59
4.1.3	Biologické testování materiálů modifikovaných nanocelulózou	63
4.2	Modifikace materiálů polydopaminem a heparinem	68
4.2.1	Charakterizace modifikovaných materiálů polydopaminem a heparinem	69
4.2.2	Testování modifikovaných materiálů PDA a heparinem s endotelovými buňkami	70
5.	Závěr	82

Seznam zkratek

ADP	Adenosin difosfát
aPTT	Aktivovaný parciální tromboplastický čas
AT	Antitrombin
BBE	Bovinní mozkový extrakt
BC	Bakteriální celulóza
CAB	Celulóza acetát butyrát
CBHs	Cellobiohydroláza
CNC	Nanokrystalická celulóza
CNF	Nanofibrilární celulóza
DAPI	4,6-diamindin-2-fenylidol
EBM-2	Endoteliální bazální médium
EC	Extracelulární matrix
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid
EDX	Energy disperse X-ray spectroscopy
EG	Endoglukanáza
ePTFE	Expandovaný polytetrafluorethylen
Fb	Fibronectin
FBS	fetální bovinní sérum
GP	Glykoprotein
HC II	Heparinový kofaktor II
hEGF	Lidský epidermální růstový faktor
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
MTT	Test metabolické aktivity buněk
NHS	N-hydroxysukcinimid
PBS	Fosfátový pufr
PCL	Polykaprolakton
PDGF	Destičkový růstový faktor
PF4	Destičkový faktor 4
PLCL	Kopolymer polylaktidu a polykaprolaktonu
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TAT	Trombin – antitrombin komplex

TXA ₂	Tromboxan A ₂
vWF	von Willebrandův faktor
βTG	β tromboglobulin

1. Úvod

Onemocnění kardiovaskulární soustavy, ať už ateroskleróza, aneurysma a další poškození cév, patří v současné době k celosvětově nejrozšířenějším chorobám a ročně na ně umírají miliony lidí. Tato onemocnění vážným způsobem narušují funkce celého cévního systému a v konečném důsledku způsobují přerušování cirkulace krve v těle. Tomu lze předejít použitím správné cévní náhrady, autologní či umělé.

Běžně používané cévní implantáty, jejichž průměry se pohybují od 6 mm výše, jsou vyráběny mnohými technikami – pletením, tkaním či extruzí. Nejčastěji jsou vyráběny z polyethylentereftlátu (PET) nebo polytetrafluorethylenu (PTFE). Studie dokládají velmi uspokojivé výsledky transplantací při použití těchto cévních náhrad. Problém ovšem vyvstává, je-li potřeba provést transplantaci cévy o průměru menším než 6 mm. Neboť transplantace cévních náhrad takovýchto průměrů, zhotovených výše uvedenými technikami, nevykazují příznivé výsledky a zřídka kdy se setkávají s úspěchem.

Slibným řešením se jeví vyrábět maloprůměrové cévní náhrady za pomoci tkáňového inženýrství, které se zabývá vývojem a tvorbou tkáňových scaffoldů. Cévní náhrady vyrobené elektrostatickým zvlákňováním poskytují strukturu vhodných vlastností. Tyto vlákenné struktury jsou vysoce porézní, a to při velmi malé velikosti pórů.

V poslední době je ovšem velkým problémem trombogenicita maloprůměrových cévních náhrad. Ta způsobuje ucpání cévních náhrad. Jediným řešením trombogenicity maloprůměrových cévních náhrad je modifikace jejich povrchu například heparinem či nanocelulózou. Nanocelulóza je používána pro zlepšení viability buněk a heparin pro snížení trombogenicity. Pokud totiž zvyšujeme buněčnou viabilitu dochází i ke zvýšení trombogenicity cévní náhrady, tudíž dalším řešením je modifikace cévní náhrady heparinem.

2. Teoretická část

2.1 Cévní náhrady

Kardiovaskulární onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtí nebo zhoršení kvality života pro miliony jedinců. Například ve Spojených státech každý rok zemře 600 000 lidí na kardiovaskulární onemocnění. Hlavní příčinou je často ateroskleróza, jedná se o onemocnění, kdy dochází k vytvoření „plaku“ na cévní stěně a ztvrdnutí arteriální stěny. To vede ke stenóze neboli obstrukci krve v cévním řečišti. Nedostatek krevního zásobení tkání může způsobit ischemii, a tím i infarkt myokardu, cévní mozkovou příhodu atd.

Mezi současnou léčbu arteriálních onemocnění patří bypass, implantace stentu, podávání antikoagulancií a změna životního stylu. A pomalu nastává doba, kdy je nezbytnou součástí léčby náhrada poškozené cévy za zdravou cévní náhradu, ať už biologickou či syntetickou (*Arrigoni, 2006*).

2.1.1 Historie cévní chirurgie

Historie cévní chirurgie sahá do dávných časů, kdy ošetření cévních poranění bylo omezeno jen na kompresi rány a vypalování zraněné cévy nebo zastavení krvácení. O první milník v ošetřování cévních poranění se postaral Ambrose Paré, který v 15. století vytvořil obvaz na ošetření cévních poranění. Avšak první chirurgické ošetření se událo roku 1759, kdy Hallowell a Lambert sešili poranění brachiální tepny.

První cévní anastomóza byla provedena Nicholasem Eckem u psů v roce 1877. Na zlepšení techniky operací anastomóz a počátečních cévních transplantací se podíleli Carrel a Guthrie už v roce 1900. Alexis Carrel dokonce obdržel Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu v roce 1912 (*Callow, 1986; Chlupáč, 2009;*).

První autogenní žíla pro operaci aneurysma byla použita Goyannesem v roce 1906, ovšem vůbec první implantace autologní cévní náhrady proběhla už v roce 1902. V roce 1948 zahájil Kunlin velmi úspěšnou éru v cévní chirurgii s femoropopliteálním bypassesem. Zároveň začaly být používány první arteriální alotransplantáty. První

nahrazení cévy syntetickou cévní náhradou se odehrálo v roce 1952 (*Callow, 1986; Ku, 2000*).

2.1.2 Současné cévní náhrady

Obecně platí, že syntetické cévní náhrady jsou vhodné pro nahrazení velkých tepen, jako je například hrudní aorta, břišní aorta a kyčelní tepny. Pro cévy s malým průměrem, kdy je vnitřní průměr menší než 6 mm, jsou vhodné autotransplantáty. Autologní transplantáty se běžně používají na náhradu koronárních a periferních tepen.

Jak již bylo zmíněno, cévní náhrady můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na biologické a syntetické cévní náhrady. Biologické cévní náhrady můžeme dále rozdělit na autologní transplantáty, allotransplantáty a xenotransplantáty.

Allotransplantát je transplantát pocházející z jedince stejného druhu. Xenotransplantát je transplantát pocházející z jedince rozdílného druhu. Xenotransplantací se rozumí například transplantace mezi člověkem a zvířetem (*Chlupáč, 2009*).

2.1.3 Autologní cévní náhrady

Autologní cévní náhrada je cévní náhrada z jiné části těla pacienta. Obvykle se používají safenózní žíly a vnitřní prsní tepny. Autologní transplantáty mají tu výhodu, že jsou biokompatibilní pro pacienta, čímž se výrazně snižuje riziko imunitního odmítnutí. Další výhodou této techniky je okamžitá dostupnost autologního transplantátu. Navíc nativní cévní tkáň má biologické vlastnosti a strukturu pro optimální výkon cévní tkáně. Nevýhodou autologních transplantátů je vznik další rány na těle a to po odoperované cévě, která může mít za následek vyšší nemocnost pacienta (*Li, 2013; Knight 2014*).

2.1.4 Syntetické cévní náhrady

Pokud není možné z nějakého důvodu použít autologní cévní náhrady, používají se syntetické cévní náhrady. Syntetické cévní náhrady jsou na trhu už od roku 1970, často jsou vyrobeny z expandovaného polytetrafluorethylenu (ePTFE), Dacronu nebo

polyuretanu. Tyto polymery jsou biologicky inertní, ale mají omezenou odolnost vůči tvorbě trombů uvnitř cévní náhrady, což může vést k obstrukci maloprůměrových cévních náhrad. Z tohoto důvodu jsou syntetické cévní náhrady používány jen jako náhrada tepen s vnitřním průměrem větším než 6 mm. V posledních 10 letech se proto používají heparinem potažené cévní náhrady z ePTFE. Velkou nevýhodou syntetických náhrad je jejich citlivost na infekci (*Li, 2013; Knight 2014*).

2.1.4.1 Přehled syntetických cévních náhrad použitých v klinické praxi

Jak již bylo zmíněno, nejčastěji používanými polymery na výrobu cévních náhrad jsou Dacron a ePTFE. Oba tyto polymery jsou vysoce krystalické a hydrofobní, což jsou vlastnosti, které zabraňují polymerům hydrolyzovat. Navíc hydrofobicita polymeru má významné důsledky na predikci povrchové interakce s krví a tkání (*Xue, 2003*).

- **Polyethyltereftalát - PET (Dacron, Terylen)**

Polyethyltereftalát (PET) byl představen v roce 1939 v Anglii, poté byl nadále vyvíjen a nakonec patentován firmou DuPont v roce 1950 pod obchodním názvem Dacron. První dvě cévní náhrady vyrobené z Dacronu byly implantovány v Julian v roce 1957 a v DeBakey 1958 (*Xue, 2003*). Dacron má velmi dobrou stabilitu a může přetrvávat v těle po dobu až 10 let po implantaci bez výrazného zhoršení vlastností.

Tkaná PET cévní náhrada má lepší stabilitu, menší propustnost a menší krvácivost. Mezi nevýhody tkané PET cévní náhrady patří nízká pórovitost, třepení cévní náhrady na okrajích a riziko infekce. Velkou nevýhodou tkané PET cévní náhrady je neschopnost se začlenit do okolní tkáně. Při hojení této cévní náhrady byla pozorována tvorba vnitřní fibrózní kapsle, vnější kolagenní kapsle a vzácná tvorba endoteliálních ostrovů.

Výhoda pletené PET cévní náhrady spočívá ve větší pórovitosti, prorůstání do tkáně a radiální roztažnosti. Nevýhodou je riziko infekce a dilatace. Při hojení těchto cévních náhrad bylo pozorováno lumenální pokrytí fibrinem, velmi sporadicky se vyskytující endotel a transanastomická endotelizace u zvířat (*Chlupáč, 2009; Knight 2014*).

- **Expandovaný polytetrafluorethylen - ePTFE (Teflon, GoreTex)**

Expandovaný polytetrafluorethylen byl patentován firmou DuPont v roce 1937 jako teflon. V medicíně byl poprvé ePTFE použit v umělých srdečních chlopních v roce 1960. V roce 1969 Gore patentoval ePTFE jako Gore-Tex, v dnešní době je tento materiál používán na výrobu cévních náhrad (Xue, 2003).

Molekula ePTFE je biologicky stabilní a nepodléhá biologické degradaci uvnitř těla. Povrch cévní náhrady je elektronegativní, což minimalizuje jeho reakci s krevními složkami. Pro ePTFE je charakteristická struktura uzal-fibrilární, ve které jsou pevné uzly připojeny přes jemné fibrily s průměrnou meziuzlovou vzdáleností 30 μm pro standardní cévní náhradu (Xue, 2003).

Expandovaný polytetrafluorethylen je používán na výrobu nízkou porozitních cévních náhrad ($< 30 \mu\text{m}$) a vysoce porozitních cévních náhrad ($> 45 \mu\text{m}$).

Nízko porozitní cévní náhrady jsou biologicky stabilní. Jejich nevýhodou je krvácivost ve stezích, omezené zabudování do okolní tkáně a velké riziko infekce. Při hojení byl pozorován fibrinový povrch a povlak destiček. Nebylo pozorováno žádné transmurální prorůstání tkání.

Vysoko porozitní cévní náhrady jsou biologicky stabilní a jejich velkou výhodou je prorůstání buněk cévní náhradou. Nevýhodou je riziko infekce stejně jako u většiny syntetických cévních náhrad. Při hojení těchto cévních náhrad byla pozorována invaze makrofágů, migrace fibroblastů a určitá angiogeneze. Při *in vitro* testování byla pozorována endotelizace u zvířat. Tyto cévní náhrady byly poprvé použity v roce 1975 (Chlupáč, 2009; Li, 2014).

- **Polyuretany (PU)**

Polyuretany byly původně vyvinuty v Německu v roce 1930 jako materiál pro povrchovou úpravu, pěny a adheziva. Jako biomateriál byl PU poprvé použit pro povlakování umělého srdce. Polyuretany jsou pružné a mají vyhovující mechanické vlastnosti a rovněž mají přijatelnou biokompatibilitu. Všechny tyto vlastnosti z PU udělaly vhodného kandidáta pro výrobu cévních náhrad (Xue, 2003).

Polyuretany jsou jako cévní náhrady využívány ve fibrilární formě nebo jako pěny. Velkou výhodou polyuretanových cévních náhrad je jejich hemokompatibilita a

biokompatibilita, dále jsou málo trombogenní. Nevýhodou je jejich biodegradace již v první generaci cévních náhrad, velké riziko infekce a možné riziko karcinogenity. Při hojení fibrilární polyuretanové cévní náhrady byla sledována tvorba tenké fibrinové vrstvy v cévě a omezený růst buněk. při hojení cévní náhrady pěnové byl pozorován větší růst buněk a to z důvodů větší porozity pěny. Cévní náhrady z polyuretanů byly poprvé použity v roce 1967 (*Chlupáč, 2009; Qui, 2016*).

2.2 Maloprůměrové cévní náhrady

Každý rok je na celém světě provedeno až 800 000 bypassu koronární artérie. Dále je na zemi 202 milionů lidí, kteří trpí onemocněním periferních tepen. K léčbě těchto onemocnění lékaři využívají nedegradabilní syntetické PTFE nebo Dacron cévní náhrady se středním nebo velkým průměrem. Tyto syntetické cévní náhrady poskytují dalších 10 let života bez jakýchkoliv příznaků onemocnění, jenže jejich problémem je náchylnost k trombogenicitě (*Song, 2011*). Z těchto důvodů je stále častěji v klinické praxi potřeba maloprůměrových cévních náhrad, které pomohou nahradit nebo opravit poškozenou nativní cévu, a navíc budou podporovat regeneraci tkáně a budou funkční v dlouhodobém časovém horizontu (*Patel, 2014*).

Při hledání materiálů vhodných pro cévní náhrady byly odzkoušeny například přírodní materiály z kolagenu, elastinu, fibrinu, dále také syntetické polymery nebo i decelurizované matrice allogenní, xenogenní i heterogenní (*Seifu, 2013*). Problémem ovšem byla dlouhá doba zhotovení cévních náhrad, vysoký potenciál přenosu onemocnění, tvorby trombu, hyperplazie cévní stěny a imunitní odmítnutí.

Z těchto důvodů byl zahájen výzkum na výrobu maloprůměrových cévních náhrad z biologicky rozložitelných a biologicky kompatibilních materiálů. Příkladem biologicky degradovatelných syntetických polymerů používaných pro výrobu maloprůměrových cévních náhrad jsou polyestery jako polykaprolakton (PCL) a kopolymer polylaktidu a polykaprolaktonu (PLCL) (*Woodruff, 2009*).

- **Polykaprolakton (PCL)**

Polykaprolakton (PCL) je semikrystalický polymer, který má relativně dlouhou dobu degradace, degraduje až dva roky. Z tohoto důvodu je vhodné jeho použití ve tkáňovém inženýrství, jelikož u scaffoldů je potřeba, aby podporovaly regeneraci poškozené tkáně. Polykaprolakton má vynikající viskoelastické vlastnosti. Polykaprolakton také neprochází plastickou deformací při delším cyklickém namáhání, což je skvělé pro jeho použití pro cévní náhrady (*Patel, 2014*).

Polykaprolakton je zajímavý materiál pro vaskulární aplikace, zejména protože má vynikající mechanické vlastnosti, pomalou rychlost rozkladu a dobrou biokompatibilitu. Jedním z nejsnazších způsobů, jak zpracovat PCL do porézního scaffoldu, je elektrostatické zvláknování. Právě díky elektrostatickému zvláknování je možné PCL zvláknit na mikro či nanovlákná. Za posledních pět let byla zveřejněna celá řada studií o elektrostaticky zvlákněném PCL pro cévní náhrady (*de Valence, 2012*).

2.2.1 Vlastnosti cévní náhrady

Při přípravě cévních náhrad je snaha o přesnou replikaci struktury nativní tkáně, nicméně je také velmi důležitá funkční konstrukce cévní náhrady. Cévní náhrada by měla být odolná vůči infekci, musí být biokompatibilní, netoxická, nekarcinogenní, neimunogenní a biologicky stabilní. Cévní náhrada musí být trombo rezistentní, zároveň musí mít určitou pórovitost umožňující hojení a angiogenezi. Všechny tyto atributy jsou poskytovány v rámci tepny pomocí intaktního endotelu, který funguje jako sekreční tkáň a selektivní propustná bariéra (*Hasan, 2014*).

Cévní náhrada musí mít vhodné mechanické vlastnosti jako je pevnost, odolnost vůči zalomení, dobrou suturabilitu. Náhrada musí být dostatečně silná, aby odolala značnému vnitřnímu tlaku v důsledku kolísání krevního tlaku a zůstala v poloze, ve které byla operována. Musí také umožnit držet stehy v podélném i obvodovém napětí. Kromě toho je důležitá adekvátní elasticita cévní náhrady, aby vydržela cyklické zatížení v rámci krevního oběhu člověka (*Thomas, 2003*).

2.3 Cévní systém

Cévní systém lidského těla je tvořen cévami, které fungují jako jakýsi potrubní systém pro rozvod okysličené krve a její návrat po předání kyslíku tkáním. Cévní stěna je jednou z nejdůležitějších složek hemostatického procesu (Čihák, 2004).

Cévy nacházející se v lidském těle můžeme rozdělit podle jejich průměru na tepny (artérie), tepénky (arterioly) a vlasečnice (kapiláry). Tepny jsou největší a mohou dosahovat průměru okolo 2-3 cm. Tepny se v tkáni větví na menší tepénky a tepénky přecházejí v nejmenší vlasečnice (Pecka, 2004).

2.3.1 Struktura cévní stěny

Struktura cévní stěny je velmi důležitá pro tkáňové inženýrství vaskulárního systému. Hlavní myšlenkou výroby cévních náhrad je přesná replikace nativní cévní stěny a tím i jejich vlastností a chování v lidském těle.

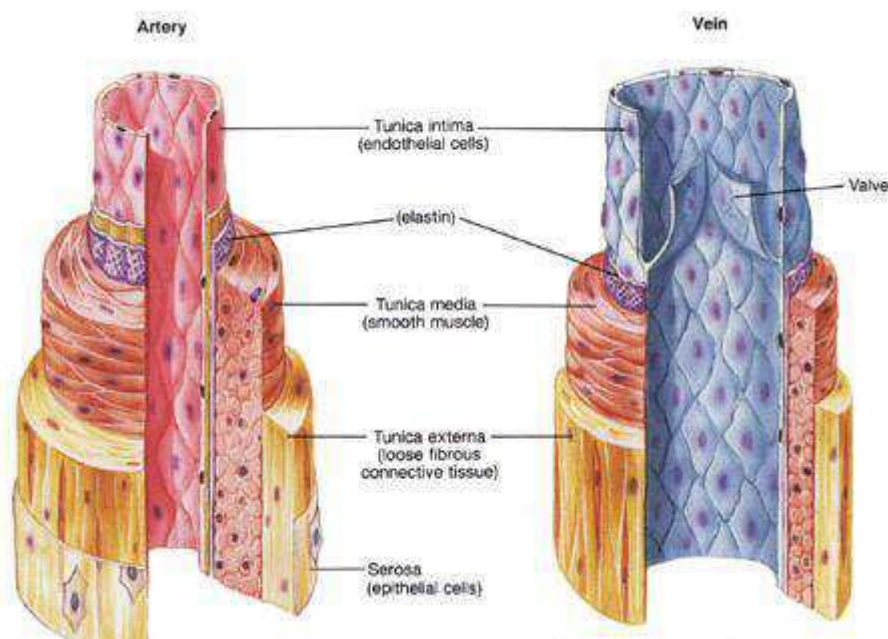
Cévní stěnu tvoří *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventicia* (Obr.1). *Tunica intima* se skládá z jedné vrstvy endoteliálních buněk, které jsou uloženy na bazální membráně. Cévní endotel funguje jako styčná plocha mezi cirkulující krví a tkáněmi. Jednobuněčná vrstva tenkých plochých endotelových buněk leží na bazální membráně, která spolu se subendoteliální plochou vytváří sekundární bariéru pro přechod tekutin, makromolekul do extracelulárního prostoru. Subendoteliální bazální membránu tvoří látky známé jako extracelulární matrix (EC). Hlavní součástí bazální membrány je kolagen typu IV a V, elastin, mikrofibrily spolu s glykoproteiny (GP). V bazální membráně je také laminin, entaktin, vitronectin a von Willebrandův faktor. Hlavním proteoglykanem bazální membrány je heparan sulfát (Čihák, 2000; Marieb 2005).

Pod bazální membránou se nachází *subintima*, která obsahuje žírné buňky syntetizující a skladující heparin, histamin a serotonin. Další vrstvou je *tunica media*, která je ohraničena vnitřním a zevním elastickým listem (laminou). *Tunica media* je tvořena hladkým svalstvem, které je obklopené pojivovou tkání. *Tunica media* obsahuje kolagen typu I a III, elastická vlákna, glykosaminoglykany, strukturální glykoproteiny. Její hlavní funkcí je zodpovídat za elasticitu a tonus cév. Pomocí elastických vláken a hladké svaloviny zajišťuje změnu průsvitu cévy.

V *tunica adventicie* se nachází fibroblasty zodpovědné za syntézu pojivové tkáně, adipocyty zodpovědné za syntézu lipidů a žírné buňky (Hasan, 2013; Stenmark, 2013).

U dospělého jedince tvoří cévní endotel přibližně 1% hmotnosti těla a plochu okolo 5000 m². Při porovnání se podíl plochy endotelu na jednotku krevního objemu v mikrocirkulaci mnohonásobně zvětšuje. Právě mikrocirkulace představuje hlavní prostor, kde se endotel uplatňuje. Jelikož nesmáčivý a neporušený endotel je nejlepším protisrážlivým prostředím.

Protisrážlivě působí elektronegativní náboj povrchu endoteliálních buněk, glykosaminoglykany – heparan sulfát a heparin, které jsou tvořeny přímo endotelem. Dále protisrážlivě působí přirozené inhibitory krevního srážení vázané na povrchu endotelu, receptory membrány (trombomodulin) a prostacyklin, který je syntetizován v cévním endotelu (Pecka, 2004; Hasan, 2013; Marieb, 2005).



Obr.1: Stavba cévní stěny. (wikiskripta.com)

2.3.2 Endotel

Endotel tvoří funkční netrombogenní povrch luminy cév. Poškození endotelu může vést k zánětu, ateroskleróze nebo trombóze. Endotel hraje hlavní roli v regulaci cévního tonu, průtoku krve a permeabilitě kapilár, proliferaci buněk hladkého svalstva a podílí se na regulaci hemostázy (Aird, 2015).

Endotel reguluje hemostázu prostřednictvím exprese vazebných míst pro prokoagulační i antikoagulační činitele na svém povrchu. Podílí se na hemostáze prostřednictvím tvorby či uvolňováním řady biologicky aktivních látek (Hudeček, 2004).

Endotelové buňky zajišťují nesmáčivý povrch cév a kapilár. Dále udržují lumen cév otevřený a průchodný, podílejí se na regulaci vazomotoriky cév, tato funkce je velmi důležitá pro krevní tlak a průtok krve. Endotel se podílí na funkci trombocytů a hemostáze (Pecka, 2004; Aird, 2015).

2.4 Hemostáza

Při výrobě a vývoji cévních náhrad je důležité pochopit a porozumět všem pochodům lidského těla, které souvisí s danou konkrétní náhradou. V našem případě je důležité pochopit nejen krevní oběh, ale i proces srážení krve. A to z toho důvodu, abychom se vyhnuli spuštění či narušení takového fyziologického pochodu, jako je srážení krve.

„Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení. Jde o komplexní proces, na kterém se podílí řada složek a mechanismů s rozdílnými vstupy a účinky. Jedná se o složitý mechanismus spojený s celou řadou pozitivních a negativních zpětných vazeb.“ (Pecka, 2004)

Mezi hlavní složky hemostázy patří cévní stěna, a to hlavně endotel a subendotelové struktury. Další složkou hemostázy je tkáňová složka, krevní destičky a činitele plazmatického koagulačního systému s aktivátory, inhibitory a složky fibrinolýzy (Pecka, 2004; Langmeier, 2009).

2.4.1 Mechanismy hemostatických procesů

Při jakémkoliv poškození povrchu endotelu je zahájen proces srážení krve. Proces srážení krve začíná kombinovanou adhezivní reakcí, která zahrnuje krevní destičky, ale i ostatní buňky nebo látky, které se podílejí na hemostáze. K zástavě krvácení dochází bezprostředně po narušení povrchu endotelu. Prvním krokem zástavy krvácení je tvorba primární hemostatické zátky, která se aktivováním dalších procesů zpevní a následně je vytvořena definitivní krevní zátka.

Mezi základní mechanismy hemostázy patří:

- Primární hemostáza
- Plazmatický koagulační systém
- Fibrinolytický systém
- Inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy

Primární hemostáza je proces tvorby primární cévní zátky, někdy také označované jako agregátu krevních destiček. Tato primární zátka uzavírá místo narušení cévní stěny a zastavuje tak krvácení (*Aird, 2015*).

Sekundární hemostáza znamená stabilizaci trombu fibrinovou sítí. Toto je důležité pro udržení integrity cévní stěny a cirkulace krve. V primární hemostáze mají hlavní roli trombocyty. V sekundární hemostáze je důležitým momentem tvorba trombinu, který vede k polymeraci fibrinogenu. Primární i sekundární hemostáza tvoří jeden prolínající se celek.

Finální fází hemostázy je fibrinolýza, která umožní rozpuštění trombu a rekanalizaci poškozeného úseku endotelu a zároveň umožní obnovení průtoku krve. Současně s fibrinolýzou dochází k iniciaci dějů, které vedou k celkovému zhojení poškozené tkáně (*Pecka, 2004; Aird, 2015; Langmeier, 2009*).

1) Primární hemostáza

Primární hemostázy se účastní hlavně krevní destičky a cévní složka. Neaktivní krevní destičky (trombocyty) mají oválný diskoidní tvar a na normální, zdravou endotelovou cévní výstelku vůbec nereagují. V momentě, kdy dojde k porušení

celistvosti endotelu, dochází k obnažení kolagenních vláken v subendoteliálním prostoru a dochází k adhezi neboli přichycení krevních destiček ke kolagenovým vláknům. K adhezi dochází pomocí receptorů glykoproteinové povahy. Na této adhezi se podílí glykoprotein GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX. Spojení je zprostředkováno pomocí bivalentních proteinů, a to konkrétně pomocí von Willebrandova faktoru (vWF) nebo fibronectinu (Fb) (*Colman, 2001*).

Aktivace krevních destiček a receptorů spustí kaskádu biochemických a metabolických procesů, konkrétně dojde ke spuštění aktivace krevních destiček. Při aktivaci destiček dochází ke změně jejich tvaru a k centralizaci jejich granulí. Tento proces je doprovázen uvolněním proagregačních a chemických působků (sekreční fáze) a to destičkového růstového faktoru (PDGF), destičkového faktoru 4 (PF4), β -tromboglobulinu (β TG), fibronogenu a rovněž dochází k aktivaci receptorů glykoproteinu GP IIb/IIIa (*Kittnar, 2011*).

Následuje aktivace dalších destiček pomocí mezibuněčných signálů. Dochází k tomu, že krevní destičky secernují ze svých granulí adenosin difosfát (ADP) a metabolismem kyseliny arachidonové vzniká tromboxan A₂ (TXA₂). Jak ADP, tak i TXA₂ jsou silnými stimulatory agregace krevních destiček. Obě tyto látky se váží na receptory okolních krevních destiček, aktivují je a krevní destičky touto aktivací mění svůj tvar na kulovitý s výběžky. Dochází k aktivaci a obnažení vazebných míst receptorů GP IIb/IIIa. Tato aktivace umožní vzájemnou vazbu trombocytů prostřednictvím bivalentních proteinů, konkrétně pomocí fibrinogenu, vWF a vitronektinu. Vazba trombocytů má za následek pospojování krevních destiček a jejich agregaci. Nejprve probíhá primární agregace a následně sekundární agregace. Po ní dochází k vytvoření bílého trombu neboli destičkové zátky (*Penka, 2011*).

Na konci první fáze primární hemostázy dochází k přesunu fosfolipidů z vnitřní membránové dvojvrstvy do vnější membránové struktury krevní destičky. Uvolněné fosfolipidy výrazně urychlují další fázi, kterou je přeměna rozpustného fibrinu na nerozpustný fibrin. Tímto dějem dochází ke slepení a splynutí trombocytů, destičkový trombus se postupně zvětšuje a stává se hlavním hemostatickým mechanismem. Při tvorbě destičkové zátky se uplatňuje i tkáňový faktor z již poškozené tkáně. Na povrchu aktivovaných destiček dochází k tvorbě koagulačně aktivních faktorů, tím to dějem se povrch destičky stává přístupný pro interakci s koagulačními faktory. Výsledkem tohoto

děje je tvorba fibrinové zátky. Do takto vytvořené fibrinové sítě jsou postupně zachytávány erytrocyty a leukocyty a bílý trombus se postupně mění na červený (Pecka, 2004; Kittnar, 2011).

2) Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém je sled dějů, jejichž cílem je vznik nerozpustného fibrinu. Při těchto dějích dochází k postupné přeměně fibrinogenu na fibrin a dále na monomery fibrinu, které dále polymerují. Polymery fibrinu se následně propojují kovalentními vazbami pomocí aktivovaného faktoru XIIIa a vzniká nerozpustný fibrin. Fibrin pak vytváří vláknitou síť, ve které jsou zachytávány krevní buňky. Vzniká krevní sraženina, která je označována jako stabilní fibrinová zátka (Penka, 2011).

- **Vlastní proces koagulace**

Cílem koagulace je generace trombinu a vytvoření pevného fibrinového vlákna a zastavení krvácení. Tohoto cíle je dosaženo regulovanou kaskádovitou enzymatickou reakcí. Při této reakci jsou faktory, které se v krvi vyskytují v neaktivované formě (proenzymy), štěpeny na aktivní formu. Jsou označovány jako koagulační faktory a označeny velkým písmenem F a římskou číslicí. Aktivované faktory jsou označeny ještě malým písmenem a, například neaktivní faktor se zapisuje jako FII a aktivní jako FIIa (Penka, 2011; Kittnar, 2011).

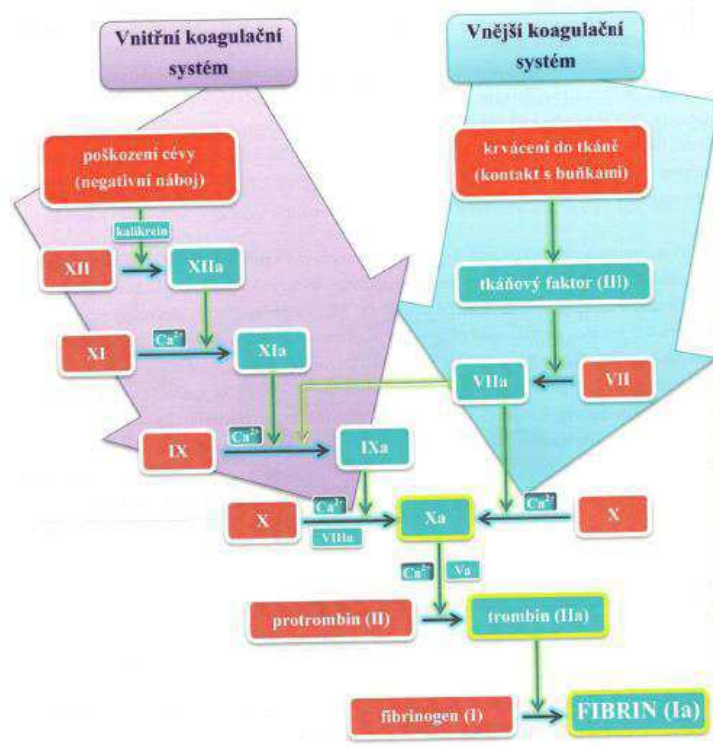
Koagulační systém se skládá ze dvou částí, a to z vnitřní a vnější kaskády (Obr.2). Tyto kaskády se liší podle typu aktivačního stimulu, avšak oba dva systémy se vzájemně doplňují. Cílem obou dvou systémů je aktivace trombinu a následná přeměna rozpustného plazmatického proteinu fibrinogenu na nerozpustný fibrin.

Koagulační kaskáda se skládá z velkého množství proteinů, tyto proteiny mají přesně vymezenou funkci. Většina těchto proteinů v těle koluje v neaktivované formě a aktivní se stávají až po enzymatickém štěpení. Při aktivaci většiny těchto proteinů je potřebná přítomnost vápenatých iontů Ca^{2+} (Roušar, 2012; Tanzi 2005).

Vnitřní systém je aktivován po odhalení negativně nabitého povrchu poškozené cévy či trombocytů. Následkem je aktivace faktorů XII, XI a IX, ten ve spojení s faktorem VIII způsobí přeměnu faktoru X na jeho aktivovanou formu Xa.

Vnější systém je aktivován po kontaktu faktoru VII s tkáňovým faktorem, který je přítomný na membráně buněk ve tkáních. Touto cestou vzniká aktivovaný faktor VIIa, který následně aktivuje faktor X, může aktivovat i faktor IX.

Další dráha je společná pro oba dva systémy. Aktivovaný faktor Xa s faktorem Va a Ca^{2+} vytvoří enzymový komplex, který aktivuje protrombin na trombin. Vzniklý trombin je enzym, který je schopný štěpit fibrinogen na nerozpustný fibrin. Nerozpustný fibrin po polymeraci vytvoří síť, která zabrání dalšímu úniku krve z cévy (Roušar, 2012; Tanzi 2005; Kittnar 2011).



Obr.2: Vnitřní a vnější systém hemokoagulace. (Roušar, 2012)

Tab.1: Přehled koagulačních faktorů. (Kittnar, 2011)

Faktor	Název faktoru	Funkce
I	Fibrinogen	Vznik fibrinového vlákna
II	Protrombin	Prekurzor trombinu, trombin štěpí fibrinogen
III	Tkáňový faktor	Přítomný na membráně buněk ve tkáních, aktivace vnějšího systému
IV	Ca ²⁺	Podíl na aktivaci většiny koagulačních faktorů
V	Proakcelerin	Účast na aktivaci trombinu
VII	Prokonvertin	Účast na aktivaci faktoru X ve vnějším koagulačním systému
VIII	Antihemofilický faktor A	Účast na aktivaci faktoru X ve vnitřním koagulačním systému
IX	Christmasův faktor	Účast na aktivaci faktoru X ve vnitřním koagulačním systému
X	Stuart – Prowerův faktor	Aktivace trombinu
XI	Antihemofilický faktor C	Aktivace faktoru IX
XII	Hagemanův faktor	Aktivace vnitřního systému, aktivace faktoru XI
XIII	Fibrin stabilizující faktor	Stabilizace fibrinových vláken

3) Fibrinolytický systém

„Fibrinolýza je fyziologická, dynamická, současně vysoce kontrolovaná odpověď organismu na tvorbu fibrinových depozit“ (Penka, 2011). Je to proces odbourávání nerozpustného fibrinu. Odpovídá za odbourání již nepotřebného fibrinového koagula po proběhlém procesu srážení krve a následném zhojení rány. K aktivaci fibrinolýzy dochází současně s aktivací krevních destiček a koagulace. Celý tento děj trvá přibližně 48-72 hodin (Penka, 2011).

4) Inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy

„Inhibitory krevního srážení jsou přirozené složky krve, které tlumí antikoagulačními mechanismy proces srážení krve vyvolaný plazmatickým koagulačním systémem a fibrinolýzou“ (Pecka, 2004). Inhibitory krevního srážení je možné rozdělit podle několika kritérií. Jsou rozděleny například podle původu na přirozené a získané, podle specifity na inhibitory serinových proteáz a inhibitory kofaktorů serinových proteáz, nespecifické inhibitory s rozšířeným spektrem. Při rozdělení podle systému dělí na inhibitory koagulace a fibrinolýzy (Penka, 2011). Jedná se o složitý systém na kterém se podílí mnoho složek.

- **Inhibitory plazmatického koagulačního systému**

V plazmatickém koagulačním systému se z fyziologických inhibitorů krevního srážení nejvíce uplatňuje antitrombin (AT) a alfa₂-makroglobulin. Tyto inhibitory jsou v plazmě obsaženy ve velké koncentraci. Antitrombin spolu s kofaktorem heparinu II odpovídá až za 80% inhibiční koagulační aktivity (*Rangarajan, 2010*).

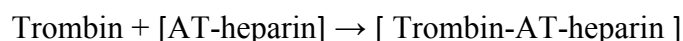
- a) Antitrombin (AT)**

Antitrombin, dříve označovaný jako antitrombin III, inhibitor, který je tvořen jedním řetězcem α₂-glykoproteinu o 424 aminokyselinách. Je tvořen v játrech, může se vyskytovat i v endotelových buňkách. Jedná se o antikoagulačně nejúčinnější látkou, je schopen neutralizovat účinek trombinu.

Antitrombin je fyziologický inhibitor serinových proteáz, AT vyvazuje trombin a jiné plazmatické proteázy za vzniku komplexu. Rychlost tvorby komplexu může být zvýšena navázáním heparinu nebo proteoglykanů z endotelových buněk.

Antitrombin reaguje i s velmi malým množstvím trombinu za vzniku komplexu TAT (trombin-antitrombin). Tento komplex se oddělí z receptorových struktur na buněčné membráně a během pár minut je odbouráván v játrech pomocí buněk mononukleárního fagocytárního systému. Systém TAT podává informace o hyperkoagulačním stavu systému (*Rangarajan, 2015*).

Reakce antitrombinu s trombinem může být urychlena až 1000 krát v přítomnosti látek s negativním povrchovým nábojem. Mezi látky s negativním povrchovým nábojem patří například polyglykosaminoglykany, konkrétně heparan sulfát. Hepariny jsou látky, které se běžně nachází na povrchu endotelových buněk. Vazba heparinu s antitrombinem je reversibilní, heparin může být kdykoliv z komplexu uvolněn a je schopen vazby s další látkou (*Pecka, 2004*).



Pro inaktivaci trombinu je důležitá vazba trombinu a antitrombinu na jednu molekulu heparinu. K této reakci je potřeba heparin tvořený minimálně 18 monosacharidovými jednotkami. V případě kratší molekuly heparinu nedochází

k inhibici trombinu, avšak dochází k inhibici faktoru Xa. Heparin v komplexu s antitrombinem je schopen inhibovat faktory IIa a Xa. Podmínkou této inhibice je přítomnost AT v plazmě v minimální koncentraci větší než 40%.

Antitrombin funguje jako inhibitor trombinu, dále může inhibovat i faktor Xa. Ostatní proteázy však vyvazuje rychleji jen v přítomnosti heparinu (*Pecka, 2004; Penka, 2011; Rangarajan, 2015*).

b) Heparinový kofaktor II (HC II)

Heparinový kofaktor II je glykoprotein tvořený pouze jedním řetězcem, patří mezi inhibitory serinových proteáz. Je možné ho najít v cévním endotelu a je syntetizován endotelovými buňkami a játry (*Jaffe, 1985*).

Heparinový kofaktor II je homologní inhibitor k antitrombinu. Fyziologicky má pouze lokální význam. Jeho aktivita je namířena přímo proti trombinu, jedná se o specifický inhibitor trombinu s nímž tvoří komplex 1:1 (*Jaffe, 1985*).

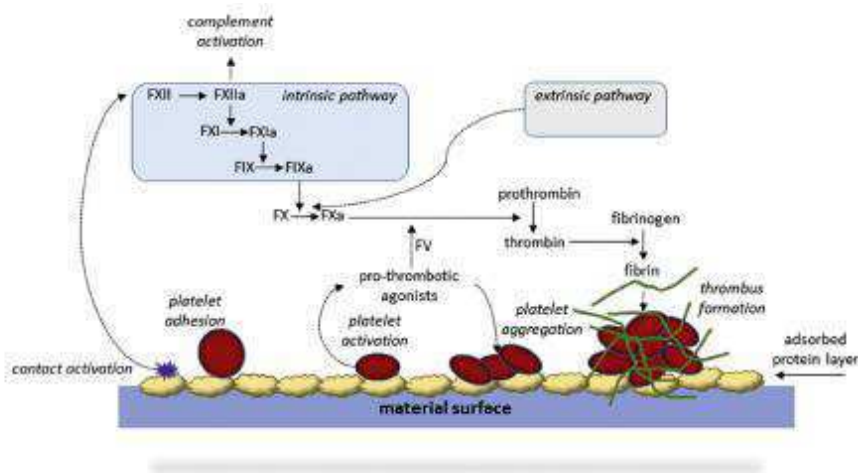
Účinek inhibice HC II se zvyšuje v přítomnosti heparinu, heparansulfátu, dermatansulfátu a další glykosaminoglykanů.

2.5 Trombogenicita malopřůměrových cévních náhrad

Trombóza je onemocnění cévního systému, při kterém dochází ke srážení krve za vzniku trombu, a tím ucpání tepny či žíly. Mezi příčiny vzniku trombózy patří poškození endotelu cév, zpomalení krevního řečiště či zvýšená srážlivost krve. (*Penka, 2010*).

Tvorba trombu je výsledkem dvou vzájemně závislých mechanismů, krevních destiček a faktorů srážení krve. Trombocyty jsou malé bezjaderné buňky, které cirkulují v krvi, jejich množství se pohybuje okolo 150-400 x 10⁶/ ml, jsou kritickou složkou hemostázy. Aktivace krevních destiček různými podněty spouští komplexní cesty, které vedou k agregaci trombocytů a k uvolnění silných pro-trombotických molekul (*Kittnar, 2011*).

Známým faktem je, že umělé povrchy v krevním řečišti mohou vyvolat aktivaci trombocytů, k aktivaci může dojít různými mechanismy. K jejich aktivaci stačí změny v průtoku krve. Aktivované krevní destičky podléhají dramatickým změnám tvaru a tyto změny podporují agregaci s jinými destičkami a dochází k uvolňování prokoagulačních látek jako je tromboxan A₂, ADP a F Va. Fosfolipidy destičkové membrány slouží jako substrát pro aktivované faktory srážení krve, což vede k lokální amplifikaci koagulační kaskády (Biran, 2016).



Obr.3: Schéma aktivace koagulační kaskády a trombocytů po kontaktu s povrchem materiálu. (Biran, 2016)

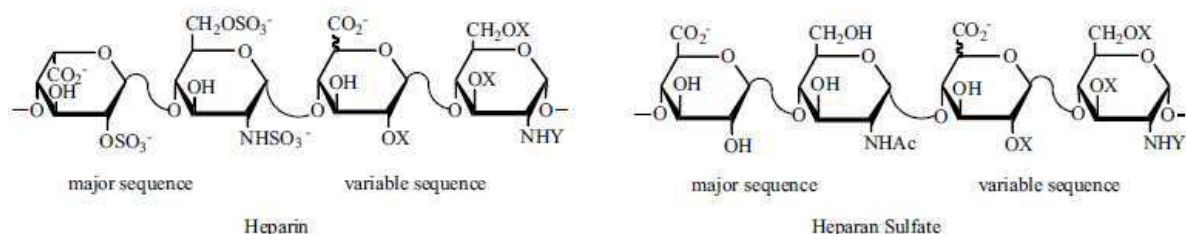
Agregace trombocytů spolu s aktivací faktorů srážení může mít za následek významnou akumulaci trombu na neznámém povrchu (cévní náhrada), může dojít k embolizaci částic trombu do krevního oběhu a může dojít k výraznému snížení trombocytů v krvi (Biran, 2016).

2.6 Modifikace malopřůměrových cévních náhrad

Malopřůměrové cévní náhrady jsou v současné době velmi žádané a velmi potřebné pro léčbu některých onemocnění, u nichž není možnost použít jiný postup léčby než nahrazení lidské cévy. S tímto postupem přicházejí i problémy, které nastávají po nahrazení nativní cévy malopřůměrovou cévní náhradou. Velkým problémem, který je spojen s cévními náhradami, je jejich trombogenicita. Tato diplomová práce se snaží o vyřešení trombogenicity cévních náhrad pomocí modifikace vnitřní stěny náhrady. K modifikaci vnitřní stěny byl vybrán heparin a nanocelulóza.

2.6.1 Heparin

Heparin je přirozeně se vyskytující lineární polysacharid, který sdílí chemickou a strukturní podobnost s heparanem sulfátem, což je proteoglykan na povrchu buněk, který zajišťuje přirozenou antikoagulační povrchovou aktivitu vaskulárního endotelu.



Obr.4: Chemický vzorec heparinu a heparan sulfátu. (Murugesan, 2008)

Již od první syntézy heparinu (McLean, 1916) probíhala dlouhotrvající debata týkající se vnitřní struktury heparinu a jeho koagulačních vlastností (Casu, 1985). Chemicky se jedná o sbírku fragmentů, z nichž každá má jinou molekulovou hmotnost a různý mechanismus působení. Avšak nejdůležitějším účinkem heparinu je jeho interference v koagulační kaskádě (Dvořák, 2010). Je možné ho najít v granulích žírných buněk (Heyligers, 2007).

Heparin je směs lineárních aniontových polysacharidů obsahující kyselinu 2-O-sulfo-L- iduronovou, 2-deoxy-2-sulfamoyl-6-O-sulfo-β-D-glukózy, kyseliny D-glukuronové, Acetamido-2-deoxy-β-D-glukózy a kyseliny α-L-iduronové jako hlavní sacharidové jednotky. Ty jsou spojeny přes 1→4 glykosidické vazby (Murugesan, 2008). Molekulová hmotnost heparinu se může pohybovat od 3000 do 30 000 Da se střední hodnotou 15 000 Da (Hirsch, 1991). Z těchto čísel je přibližně jedna třetina reprezentována jedinečným pentasacharidem nezbytným pro vazbu na antitrombin, urychlující trombin a aktivovanou inhibici faktoru X (Lam, 1976).

Antikoagulační funkce heparinu závisí na specifické sekvenci pěti sacharidů (tzv. pentasacharidová sekvence), ty jsou důležité pro účinnou vazbu antitrombinu (AT). Vazba AT na heparinovou pentasacharidovou sekvenci způsobí konformační změny molekuly AT a dochází ke zrychlení AT zprostředkované inhibicí různých faktorů srážení serinové proteázy.

Další antikoagulační aktivita heparinu prochází aktivací heparinového kofaktoru II, která je méně účinná a obecně vyžaduje vyšší koncentraci heparinu v systémové koncentraci. Zbytek molekuly nemá žádné antikoagulační vlastnosti. Obecně platí, že heparin působí na různé úrovně koagulační kaskády. Jeho vlastnosti mohou být definovány jako antikoagulační, antitrombotické, profibrinolytické a anti-agregativní, protizánětlivé, antiproliferační a antiischemické (*Lundin, 2000; Perretti, 2000; Yagnik, 2000*).

- **Efekt heparinu na koagulační kaskádu**

Samotný heparin nemá žádné antikoagulační vlastnosti. Bylo prokázáno, že k tomuto účelu dochází v přítomnosti plazmatického kofaktoru. Tento kofaktor byl objeven a byl pojmenován antitrombin (AT). Heparin se váže na antitrombin přes jedinečnou pentasacharidovou sekvenci přítomnou přibližně v jedné třetině molekuly. Stabilní kovalentní AT-heparinové komplexy (AT/H) inaktivují trombin a aktivovaný faktor X (Xa) přibližně na stejné úrovni. Podobně aktivovaný faktor IX (IXa) je inhibován komplexem AT / H (*Rosenberg, 1987*). Z těchto enzymů je trombin a faktor Xa náchylnější k inhibici, přičemž trombin je ještě citlivější než faktor Xa. Vazba na lysinové části antitrombinu nejen vytváří komplex, ale vytváří konformační změny v aktivním místě, které jsou odpovědné za účinnější inhibici koagulačních enzymů (*Rosenberg, 1987*).

Pro vyvolání inhibice trombinu komplexem AT / H je nutná nejen pentasacharidová sekvence, ale navíc i molekula heparinu, která by měla být dostatečně velká, aby vytvořila most mezi trombinem a antitrombinem. Na druhé straně přemostění pentasacharidem hraje nejdůležitější roli. Z tohoto důvodu není menší molekula heparinu (méně než 18 sacharidů) tak účinná z hlediska inhibice trombinu (faktoru IIa) a převládá afinita faktoru Xa (*Lullman, 2012*).

Místo toho velmi malé molekuly obsahující pouze jeden pentasacharid se stávají více či méně selektivními inhibitory faktoru Xa. Jak bylo zmíněno, antitrombin je hlavním kofaktorem heparinu, ale není jediný. Vysoká koncentrace heparinu potencuje inhibici trombinu nezávislého na antitrombinu přes jiný kofaktor známý jako heparinový kofaktor II (HCII). Tato katalýza je také závislá na molekulové hmotnosti, protože vyžaduje, aby heparin nesl alespoň 24 sacharidových jednotek (*Sie, 1986*).

- **Působení heparinu na krevní destičky (trombocyty)**

Heparin se váže *in vivo* na destičky a pak může v závislosti na podmínkách urychlit nebo inhibovat agregaci krevních destiček. Obecně platí, že heparin s vysokou molekulovou hmotností a s nízkou afinitou vůči faktoru Xa ovlivňuje krevní destičky více než heparin s nízkou molekulovou hmotností a s vysokou afinitou k faktoru Xa. Obecně heparin narušuje hemostázu prostřednictvím inhibice koagulačních enzymů. Tento účinek je usnadněn plazmatickými kofaktory a inhibicí krevních destiček (Klement, 2001; Dvořák, 2010).

2.6.2 Polydopamin

K modifikaci maloprůměrové cévní náhrady byl zvolen polydopamin jako prostředník k navázání heparinu na vnitřní stěny maloprůměrové cévní náhrady. Byl vybrán hlavně z toho důvodu, že se jedná o molekulu, která je schopná přilnout prakticky k jakýmkoliv materiálům v alkalickém prostředí.

Katecholická sloučenina dopaminu (DA) je molekula inspirovaná adhezivními bílkovinami. Navíc je schopna vlastní polymerace ve vodném roztoku, kdy dopamin polymeruje na polydopamin (PDA). Inspirací těmito jevy byly zavedeny metody, kdy pomocí polydopaminu je navazován heparin na různé povrchy. Jeden způsob zahrnuje navázání PDA na substrát a poté následuje přímá kovalentní vazba heparinu na reaktivní vrstvu polydopaminu (Liu, 2015).

Další metoda spočívá v konjugaci heparinu s dopaminem a poté dochází k oxidaci dopaminu a následné adhezi k substrátu. Ve srovnání s tradičními strategiemi imobilizace heparinu jsou metody založené na PDA pohodlnější a univerzálnější (Liu, 2015).

Při zkoumání vlivu modifikovaného povrchu polydopaminem na buňky byla zjištěna zvýšená proliferace endotelových buněk. To znamená, že polydopamin působí podpůrně na endotelové buňky a podporuje jejich růst. Zároveň byl zkoumán vliv polydopaminu po následné heparinizaci povrchu materiálu. Bylo dokázáno, že po heparinizaci se povrch materiálu stal vhodnějším pro proliferaci endotelových buněk.

Kromě toho polydopamin může účinně inhibovat adhezi krevních destiček, čímž snižuje riziko vzniku trombózy (Wei, 2014).

2.6.3 Celulóza

Přírodní polymery jako je celulóza, jsou hojně využívány ve tkáňovém inženýrství i regenerativní medicíně a hrají velkou roli v přípravě tkáňových nosičů. Jejich velkou výhodou je to, že jsou podobné nebo dokonce i někdy totožné s látkami, které můžeme najít v lidském těle. Tudíž tělo je snadno přijme narozdíl od syntetických látek. Mezi jejich velké výhody patří bezesporu biokompatibilita a biodegradabilita, a jelikož se jedná o přírodní polymery je velká pravděpodobnost, že nebudou pro tělo toxické. Z těchto důvodů byla celulóza zvolena jako další látka k modifikaci maloprůměrové cévní náhrady.

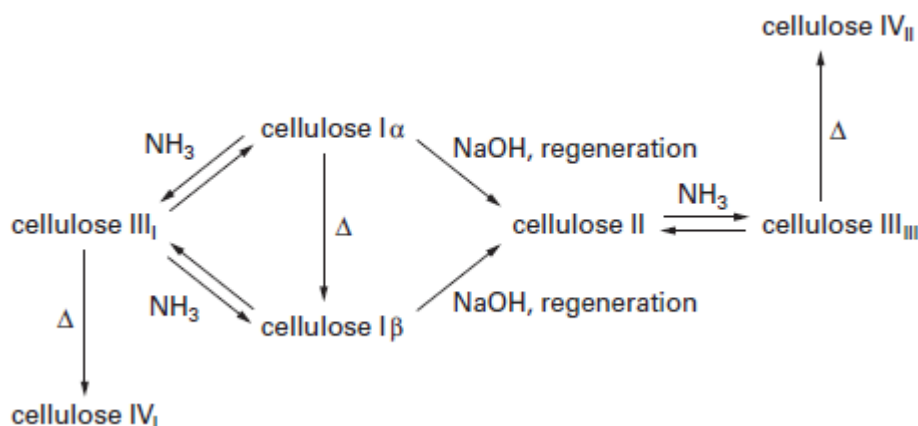
- **Struktura celulózy**

Celulóza je lineární syndiotaktický homopolymer s molekulárním vzorcem $(C_6H_{10}O_5)_n$. Celulóza je složena z D-anhydroglukopyranózových jednotek (AGU), kterým se obecně říká glukózové jednotky. Tyto glukózové jednotky jsou dohromady spojeny β -(1,4) glykosidickými vazbami za vzniku dimeru, známého pod názvem celobióza. Celobióza je základní jednotkou celulózy (*Suhas, 2010*).

Celulóza je hlavní stavební látkou rostlinných primárních buněčných stěn a spolu s ligninem a hemicelulózou se podílí na stavbě sekundárních buněčných stěn. Celulóza je nejrozšířenější biopolymer na zemi. Je to vysoce modifikovatelný, lineární homopolymer s unikátními vlastnostmi. Mezi tyto unikátní vlastnosti patří hydrofilicita, biodegradabilita, chiralita, široké chemické modifikační možnosti, velká mechanická pevnost, relativní tepelná stabilita a vysoká sorpční schopnost. Celulóza pochází z obnovitelných zdrojů, je to netavitelný polymer a je nerozpustná ve většině rozpouštědel, a to v důsledku vodíkových vazeb a krystalinity. Celulóza se v přírodě, konkrétně ve dřevě, vyskytuje ve dvou formách, a to ve formě amorfní a krystalické. V krystalické části jsou vodíkové vazby mezi celulóзовými makromolekulami rozloženy pravidelně a vzniká uspořádaný prostorový systém podobný mřížce krystalu. U nativní celulózy tvoří krystalická část až 70% a u izolované celulózy v podobě buničiny tvoří krystalická část 40%. Zbytek celulózy tvoří amorfní část, která se vyznačuje tím, že nemá žádné pravidelné prostorové uspořádání (*Šlezingerová, 1996; Nechyporchuk, 2016; Mohan, 2015*).

Polymerační stupeň nativní celulózy závisí hlavně na jejím zdroji, ale všeobecně se pohybuje v širokém rozmezí od 1000 do 30 000, od toho se odvíjí délka řetězců nativní celulózy, která se pohybuje od 500 do 15 000 nm (Nechyporchuk, 2016).

Celulózu můžeme rozdělit do 4 různých polymorfů (Obr.4) a to celulóza I,II,III,IV. Celulóza I je přírodní polymorf a je nejvíce krystalická. Celulóza II má antiparalelní uspořádání řetězců a získává se rekrystalizací nativní celulózy. Celulóza III může být připravena z celulózy I nebo II pomocí kapalného amoniaku. Poslední celulóza IV může být připravena z celulózy III jejím zahříváním v glycerolu (Devabaktuni, 2011; Lin, 2011; Mohan, 2015).



Obr.5: Konverze jednotlivých polymorfů celulózy. (Dufresne 2011)

- **Biodegradace celulózy**

Biodegradace celulózy v přírodě probíhá pomocí celulólytických mikroorganismů. Jedná se mikroorganismy schopné syntetizovat enzymy, které rozkládají celulózu. Mezi tyto mikroorganismy patří například *Eubacteria*, houby a některé formy anaerobních prvoků. Působením těchto mikroorganismů dochází k rozkladu celulózy za vzniku oxidu uhličitého a vody za aerobních podmínek a při anaerobních podmínkách je celulóza rozložena na oxid uhličitý, metan a vodu.

Mikroorganismy, které jsou schopné degradovat celulózu, obsahují ve svém těle enzym celulózu. Celulóza hydrolyzuje β -1,4-glykosidickou vazbu celulózy. Enzym celulózu je možné rozdělit do dvou skupin na endoglukanázu a cellobiohydrolázu. Endoglukanáza (endo-1,4- β -glukanáza, EG) hydrolyzuje vnitřní vazby nejlépe

v celulóзовých amorfních oblastech. Cellobiohydroláza (exo-1,4- β -glukanáza, CBHs) působí na stávající nebo endoglukanázové generované konce řetězců. Oba enzymy mohou degradovat amorfní celulózu. CBHs jsou jedinými enzymy, které efektivně degradují krystalickou celulózu. CBHs a EG degradují celulózu za uvolnění molekuly cellobiozy. Efektivní hydrolýza celulózy navíc vyžaduje enzym β -glukozidázu, který rozkládá cellobiozu za vzniku dvou molekul glukózy (Pérez, 2001).

2.6.4 Nanocelulóza

Nanocelulóza je stejně jako celulóza přírodní polysacharid. Jedná se o látku, která našla široké uplatnění ve tkáňovém inženýrství díky svým vlastnostem. Mezi tyto vlastnosti patří hlavně biokompatibilita, hemokompatibilita a netoxičita. Z těchto důvodů byl tento slibný materiál vybrán jako další možná látka vhodná pro modifikaci maloprůměrové cévní náhrady.

Nanocelulóza je extrakt z nativní celulózy, která se nachází v rostlinách, zvířatech a bakteriích. Vlákna celulózy obsahují krystalické a amorfní oblasti, které mohou být odděleny od sebe pomocí mechanických, chemických metod nebo kombinací mechanických, chemických a enzymatických metod. Tímto způsobem je možné z celulózy vyextrahovat nanocelulózu. Obecně můžeme nanocelulózu rozdělit do tří skupin (Dufresne, 2011; Abitbol 2016).

- 1) Nanokrystalická celulóza (CNC)
- 2) Nanofibrilární celulóza (CNF)
- 3) Bakteriální nanocelulóza (BC)

Mezi zdroje CNC a CNF celulózy patří dřevo, bavlna, konopí, len, pšeničná sláma, cukrová řepa, hlízy brambor, řasy a kůra moruše (Abitbol, 2016).

1) Nanokrystalická celulóza (CNC)

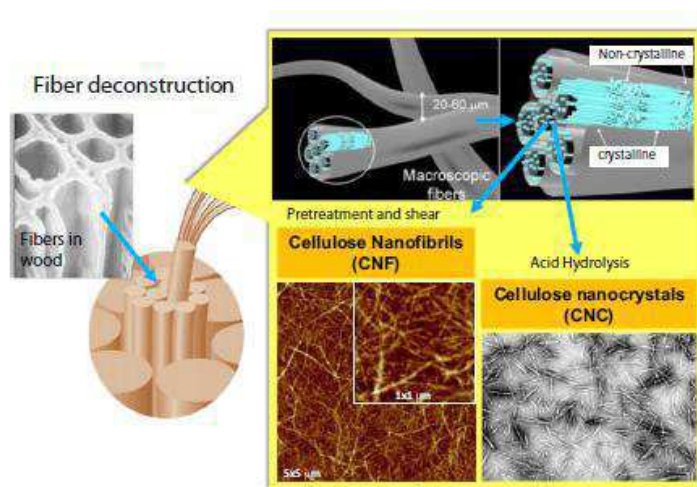
Nanokrystalickou celulózu (CNC), známou také jako whiskery, lze z nativní celulózy získat pomocí kyselé hydrolýzy, kdy dojde k odstranění amorfní struktury celulózy, ale zůstane zachována vysoce krystalická struktura. Takto uvolněné částice nanokrystalické struktury mají průměr okolo 5-30 nm a jejich délka se pohybuje okolo

100-500 nm. Délka krystalů závisí na zdroji nanokrystalické celulózy. Zdrojem CNC je obvykle dřevo, bavlna nebo tunicin, což je látka extrahovaná z mořských živočichů. Nanokrystalická celulóza se může vyskytovat v různých geometrických tvarech, který je závislý na zdroji CNC. Například CNC z řas má obdelníkovité uspořádání a CNC z tunicinu má geometrii podobnou zkroucenému pásku (Gardner, 2008; Mohan, 2015).

Možnosti funkcionalizace povrchu CNC závisí na druhu použité minerální kyseliny při hydrolýze. Částice CNC mají slabě záporný náboj, pokud byla k hydrolýze použita kyselina chlorovodíková. Povrch CNC je záporně nabitý, pokud k hydrolýze byla použita kyselina sírová. Rovněž bylo zjištěno, že rozměry krystalů CNC závisí na době trvání hydrolýzy. Obecně platí čím delší reakční doba, tím kratší krystaly (Abitbol, 2016).

2) Nanofibrilární celulóza (CNF)

Nanofibrilární celulóza (CNF) se získává hlavně za použití mechanických procesů. K zisku CNF se používá vysokotlaká homogenizace a/nebo mletí a dále chemické nebo enzymatické štěpení. CNF se skládá z individuálních i agregovaných nanofibril, které jsou tvořeny ze střídavých krystalických a amorfních domén. CNF je tvořena dlouhými a měkkými řetězci. Vzhledem k zapletení dlouhých celulózových řetězců tak není snadné určit délku CNF. Avšak podle literatury se délka CNF uvádí od 10 do 100 nm, záleží ovšem na zdroji celulózy, defibrilačním procesu a úpravách celulózy při jejím zpracování (Nechporchuk, 2016; Gardner, 2008).



Obr.5: Ilustrace CNC a CNF celulózy v buněčné stěně rostlin. (Salas, 2014)

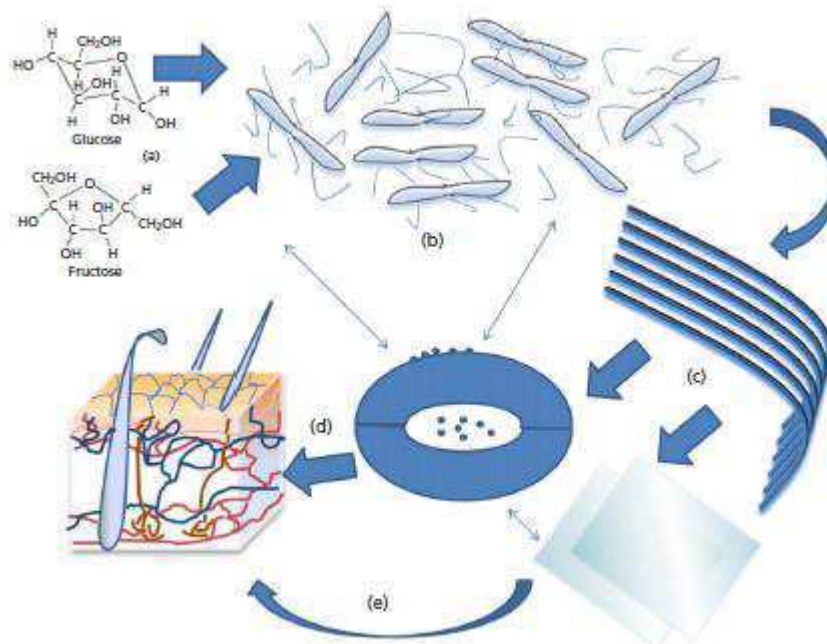
3) Bakteriální celulóza

Historie výzkumu BC sahá až do roku 1886, kdy ji jako první popsal J.M.Brown. Bakteriální celulóza spadá do kategorie exopolysacharidů. Mezi nejčastěji používané bakterie patří *Acetobacter xylinum* nebo *Gluconacetobacter* (Abeer, 2013; Esa, 2014).

Bakterie jsou kultivovány v běžném živném prostředí a bakteriální celulóza je vylučována jako exopolysacharid na rozhraní ovzduší. Při biosyntéze BC jsou glukozové řetězce syntetizovány uvnitř bakterie a ven jsou vytlačovány skrze póry, které má bakterie na povrchu těla (Obr.6). Výsledná forma stabilní bakteriální celulózy se skládá z vláken o průměru 20-100 nanometrů, které obsahují až 99 % vody. Bakteriální celulóza je syntetizována v čisté formě, a proto nevyžaduje žádné intenzivní zpracování pro odstranění nečistot nebo kontaminujících látek (lignin, pektin, hemicelulózy) (Lin, 2011; Gardner, 2008; Esa, 2014).

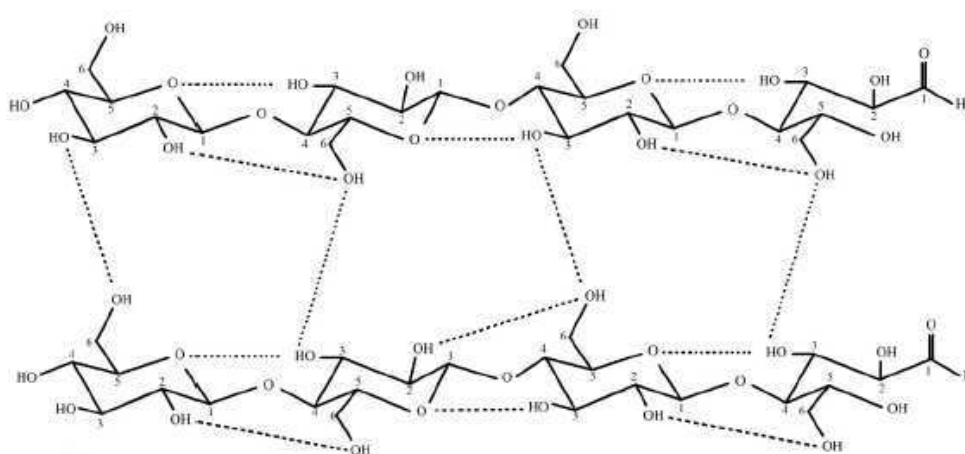
Tímto způsobem je možné vyrobit bakteriální celulózu s vysokou molekulovou hmotností, vysokou krystalinitou a dobrou mechanickou stabilitou. Produkce bakteriální celulózy fermentací umožňuje kontrolovat tvar vytvořených celulózových těles i strukturu nanovláknenné sítě během biosyntézy, což je velmi důležité pro tkáňové inženýrství a následné použití materiálu (Abitbol, 2016).

Bakteriální celulóza se skládá pouze z jednoho monomeru glukózy, a přesto vykazuje skvělé vlastnosti. Bakteriální celulóza se vyznačuje unikátní nanostrukturou (Chen, 2010), vysokou schopností zadržovat vodu (Saibuatong, 2010) a vysokým stupněm polymerace (Dahman, 2010). Rovněž vykazuje vysokou mechanickou pevnost a vysokou krystalinitu (Keshk, 2014). Díky svým vlastnostem a nedávným objevům má BC obrovský potenciál stát se vyhledávaným materiálem pro biomedicínské aplikace (Shah, 2013).



Obr.6: Znárodnění koloběhu vzniku bakteriální celulózy až po její použití. (a) Molekuly fruktózy a glukózy jako zdroj uhlíku pro *Gluconacetobacter xylinus*. (b) Syntéza BC, zde znázorněna jako modrá vlákna. (c) Bakteriální celulózové mikrofibrily. (d-e) Znárodnění použití BC jako krytí rány či jako nosič léků. (Abeer, 2013)

Bakteriální celulóza se skládá z β -1 \rightarrow 4 glukanových řetězců s molekulovým vzorcem $(C_6H_{10}O_5)_n$. Glukanové řetězce jsou drženy pohromadě pomocí inter a intra vodíkových vazeb (Obr.7). Mikrovlákna BC byla poprvé popsána v Muhlethalerinu 1949 a jsou asi 100krát menší než vlákna rostlinné celulózy (Chawla, 2009).



Obr.7: Intra a inter vodíkové vazby v bakteriální celulóze. (Esa, 2014)

Bakteriální celulóza poskytuje celou řadu výhod oproti nanokrystalické a nanofibrilární celulóze. Bezesporu největší výhodou je její čistota, rovněž z její čistoty vyplývá i reprodukovatelnost pokusů s BC.

Bakteriální celulóza vyniká svou vysokou krystalinitou, která se pohybuje okolo 60-80% (Czaja, 2006), dále má BC vysokou pevnost v tahu a vysoký Youngův modul pružnosti 15-30 GPa. Bakteriální celulóza má vysoký měrný povrch oproti rostlinným nanocelulózám a i díky svému povrchu je BC silně hydrofilní. Bakteriální celulóza je extrémně nerozpustná ve většině rozpouštědel, má dobrou tvarovatelnost a vysoký stupeň polymerizace (De Olyveira, 2011).

Bakteriální celulóza díky své nanovláčkové struktuře a její 3D porézní síti podporuje buněčnou proliferaci (Czaja, 2009). Dále byla sledována její biokompatibilita, kdy při implantaci nebyla pozorována žádná reakce na cizí těleso a BC způsobila velmi nízkou zánětlivou reakci. Navíc implantáty prokazovaly vhodnou integraci s hostitelskou tkání a podporovaly adhezi a proliferaci buněk hostitelské tkáně (Klemm, 2001). Biokompatibilita BC je srovnatelná s biomateriály, které jsou široce používány ve tkáňovém inženýrství, například s kyselinou polyglykolovou a polytetrafluorethylenem (Sulaeva, 2015).

Vlastnosti nanocelulózy

Nanocelulóza je přírodní materiál, který má strukturu v nanoměřítku. Díky své struktuře nanocelulóza disponuje různými vlastnostmi, které jsou odlišné od „tradičních“ materiálů. Mezi tyto vlastnosti patří například speciální morfologie a geometrické rozměry, krystalinita, vysoký specifický povrch, reologické vlastnosti, bariérové vlastnosti, povrchová chemická reaktivita, biokompatibilita a biodegradabilita. Nanocelulóza vyniká svou nízkou hustotou, biologickou degradabilitou, vysokou pevností a tuhostí (Salas, 2014; Endes, 2016).

Všechny tyto vlastnosti mohou být obecně zařazeny do tří kategorií: fyzikální, chemické a biologické vlastnosti. Díky těmto vlastnostem je nanocelulóza žádaným materiálem v různých odvětvích. V současné době je nanocelulóza žádaným materiálem v systémech řízeného uvolňování léčiv a ve tkáňovém inženýrství (Lin, 2011).

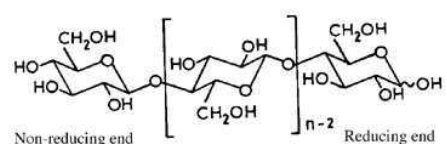
1) Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti u nanocelulózy lze charakterizovat podle zastoupení její uspořádané (krystalické) a neuspořádané (amorfní) oblasti. Celulózové řetězce v amorfní oblasti přispívají k pružnosti a plasticitě materiálu, zatímco krystalické oblasti jsou zodpovědné za tuhost a pružnost materiálu (Lin, 2011; Endes, 2016).

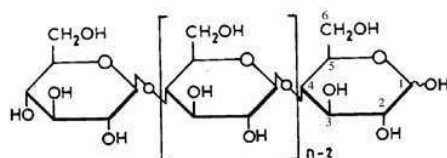
2) Chemické vlastnosti

Z chemického hlediska je nanocelulóza homopolysacharid s vysokou molekulovou hmotností skládající se z β -1,4-anhydro-D-glukopyranózových jednotek. Tyto jednotky neleží přesně v rovině se strukturou, ale spíše zaujímají konformaci židle, v níž se glukózové zbytky otáčejí v úhlu 180° kolem osy a hydroxylové skupiny leží v rovníkové poloze (Dufresne, 2011). Schopnost těchto hydroxylových skupin vytvářet vodíkové vazby hraje důležitou roli při tvorbě fibrilární a semikrystalické struktury. Těmi se řídí důležité fyzikální vlastnosti nanocelulózy.

Jednou z konkrétních vlastností celulózy je, že každá glukózová jednotka nese tři hydroxylové skupiny (Obr.8). Tyto hydroxylové skupiny zajišťují nanocelulóze reaktivní povrch pokrytý četnými aktivními hydroxylovými skupinami. Reaktivita hydroxylových skupin je v různých polohách různá.



Sometimes shown as



Cellulose

Obr.8: Chemický vzorec celulózy.

Hydroxylová skupina v poloze 6 se chová jako primární alkohol, zatímco hydroxylové skupiny v polohách 2 a 3 se chovají jako sekundární alkoholy. Atom

uhlíku, který nese hydroxylovou skupinu v poloze 6 je připojen pouze jednou alkylovou skupinou, přičemž atomy uhlíku s hydroxylovými skupinami v polohách 2 a 3 jsou spojeny přímo na dvě alkylové skupiny. Ty indukují sférické účinky odvozené od supramolekulární struktury celulózy a reakce činidla (*Nechyporchuk, 2016*).

Bylo zjištěno, že hydroxylová skupina v poloze 6 může reagovat až 10x rychleji než ostatní hydroxylové skupiny. Dále bylo zjištěno, že reaktivita hydroxylové skupiny v poloze 2 je větší než reaktivita hydroxylové skupiny v poloze 3. Nicméně povrchová reaktivita u nanocelulózy závisí také na použitých reaktantech a rozpouštědlech, ty mohou mít nesmírný vliv na reaktivitu hydroxylových skupin v různých polohách.

Na rozdíl od reaktivních skupin je další důležitou otázkou povrchový náboj nanocelulózy, který se vztahuje hlavně na negativní estery sulfátu ($-\text{SO}_3^-$) na CNC. Estery sulfátu jsou na CNC zavedeny při hydrolýze kyselinou sírovou. Kyselina sírová hydrolyzuje povrch nanocelulózy, proto je povrch nanocelulózy nabitý negativním nábojem a taktéž je to důvod proč nanocelulóza je schopna vytvářet dobře dispergované vodné koloidní suspenze. Náboj nanocelulózy je možné ovlivnit dobou trvání hydrolýzy a také teplotou kyseliny sírové. Navázaný ester sulfátu dodává CNC vysokou stabilitu v rozpouštědlech. Zároveň díky této skupině je možné CNC použít pro biomedicínské aplikace (*Dufresne, 2011*).

3) Biologické vlastnosti

a) Biokompatibilita a hemokompatibilita

Nanocelulóza i celulóza patří mezi biokompatibilní materiály. Velký problém ovšem nastává v jejich schopnosti biodegradace. Lidské tělo totiž není schopno rozložit celulózové materiály. Postrádá celulolytické enzymy, které jsou zodpovědné za degradaci celulózy.

Nicméně některé vlastnosti celulózy jako jsou krystalinita nebo hydratace mohou mít vliv na stupeň degradace, na absorpci i imunitní odpověď. Další vliv na degradaci celulózy může mít i chemická modifikace celulózy (*Lin, 2011; Abitbol, 2016*).

Hemokompatibilita je důležitá zejména pro biomateriály, které přijdou do styku s krví. Může se jednat například o umělé orgány, umělé cévy, čerpadla, umělá srdce (Lin, 2011; Endes, 2016).

Při porovnání biokompatibility a hemokompatibility CNC, CNF a BC celulózy je jasným vítězem bakteriální celulóza. Například byla testována biokompatibilita bakteriální celulózy na potkanech při testech *in vivo*. Potkanům byla zavedena kapsle s bakteriální celulózou pod kůži a byly sledovány reakce organismu na přítomnost BC. Ani po 12 týdnech nedošlo k žádné zánětlivé či jiné nežádoucí reakci. Naopak BC byla přijata hostitelskou tkání a umožnil infiltraci fibroblasty (Helenius, 2006; Endes, 2016).

Petersen a Gatenholm poukazují na to, že biokompatibilita BC může souviset s tím, že BC má podobnou strukturu jako složky extracelulární matrix jako například kolagen. Ve skutečnosti má BC a kolagen podobný průměr vláken kolem 100 nm. Ovšem velmi vzácné je přímé vyšetřování biokompatibility CNC a CNF (Petersen, 2010).

b) Toxikologie

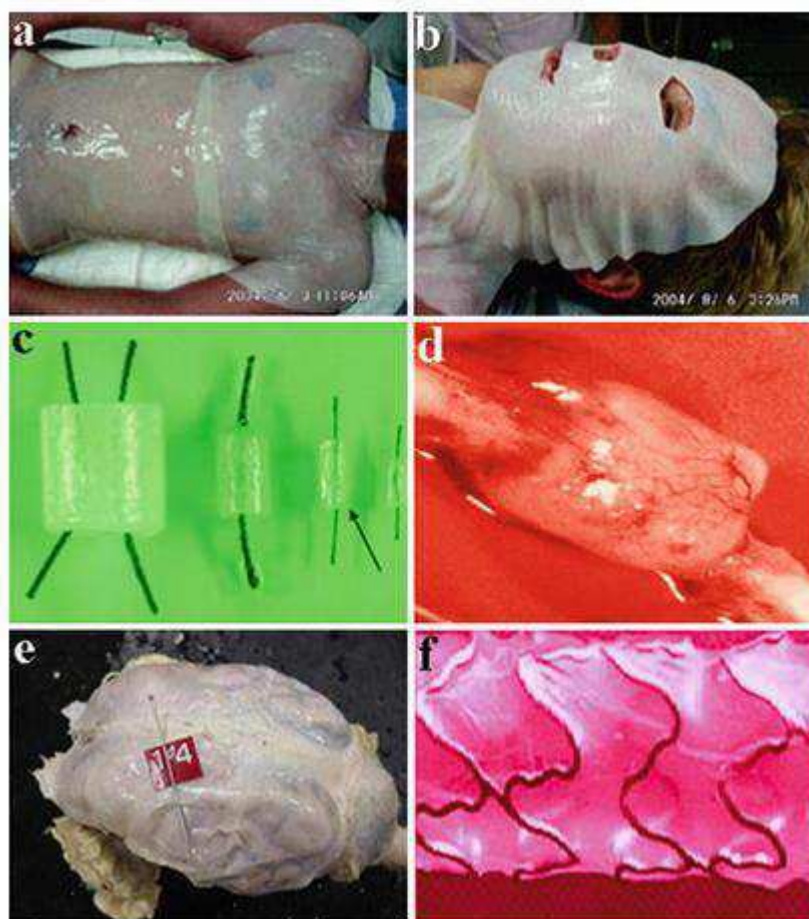
Dřívější studie prokázaly, že nanocelulóza není toxická nebo má jen velmi nízkou toxicitu, která je srovnatelná například s toxicitou kuchyňské soli. I tak při použití nanocelulózy jako biomedicínského materiálu jsou otázky toxikologie a bezpečnosti ověřovány neustále. Avšak testování neprokázalo žádný vliv nebo poškození organismu na buněčné či genetické úrovni za použití nanocelulózy jako biomateriálu (Lin, 2011; Endes, 2016; Abitbol, 2016).

Použití nanocelulózy v medicíně

Slibné mechanické vlastnosti a biokompatibilita dělají z nanocelulózy materiál vhodný k výzkumu a vývoji ve tkáňovém inženýrství. Nanocelulózové materiály jsou vhodné například pro vývoj scaffoldů, je prokázáno, že nanocelulóza podporuje adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk.

Bakteriální celulóza a nanokrystalická celulóza jsou vhodné pro povlakování materiálů ve tkáňovém inženýrství, dále pro výrobu různých membrán a hydrogelů, jsou vhodné pro elektrostatické zvlákňování a tvorbu kompozitů.

Velké uplatnění nanocelulózy je v drug delivery systémech, kde se nanocelulóza používá ve formě membrán, potahů tablet, nosičů různých biopolymerů. Tyto materiály poskytují dobrou stabilitu léčiva, stejně jako možnost nastavení uvolňování léčiv (Khalil, 2011; Jorfí, 2014; Lu, 2014).



Obr.9: Použití nanocelulózy v medicíně, (a) a (b) nanocelulózový hydrogel, (c) a (d) žilní implantáty, (e) rekonstrukce mozkové pleny, (f) stent. (Khalil, 2011)

Ve tkáňovém inženýrství se nejvíce uplatňuje bakteriální celulóza. Ta je zkoumána pro své mechanické vlastnosti jako budoucí možná náhrada vazů (Lin, 2011; Jorfí, 2014). Velké uplatnění BC našla i v odvětví hojení ran, kdy je používána pro svou dobrou proliferaci lidských kmenových buněk a schopnost zrychlení regenerace tkání (Fu, 2012; Fu, 2013; Lu, 2014).

Pro uplatnění při hojení či náhradě kostní tkáně byl vyroben kompozit BC a hydroxyapatitu, tato kombinace zajišťuje lepší adhezi, proliferaci kostních buněk a mineralizaci kostí (Tazi, 2012; Jorfí, 2014; Lu, 2014).

Ovšem asi největším odvětvím tkáňového inženýrství je výroba cévních náhrad. Cévní náhrady musí vykazovat dobrou mechanickou pevnost a krevní hemokompatibilitu. Všechny tyto požadavky splňuje nanocelulóza, zejména bakteriální celulóza. Bakteriální celulóza je vhodná pro výrobu maloprůměrových cévních náhrad (< 4mm) a velkých cévních náhrad (> 6 mm) (Fink, 2009; Lu, 2014).

Tým Dietera Klemm z Friedrich-Schiller-University Jena byl první výzkumný ústav, který vyvinul a aplikoval cévní náhradu z bakteriální celulózy. Jako první popsali materiál, z kterého byly vyrobeny cévní náhrady BASYC byl materiál vyrobený z bakteriální celulózy (Klemm, 2001).

Tento materiál vykazoval vysokou mechanickou odolnost ve vlhkém stavu, enormně zadržoval vodu a vykazoval nízkou drsnost na vnitřním povrchu cévní náhrady. Zároveň se uvádí, že BASYC z bakteriální celulózy byl použit na cévní náhrady u krys a prasat (Schumann, 2009).

Podle Schumanna a kolektivu byla cévní náhrada z bakteriální celulózy vhodná k použití pro cévní náhrady malých průměrů a zároveň omezovala fenomén vzniku trombu a stenózy (Schumann, 2009; Lu, 2014).

Dále také v poslední době Brown a kolektiv popsali syntézu CNC/fibrinových biokompozitů určených pro výrobu maloprůměrových cévních náhrad. Tento materiál vznikl kovalentním naroubováním CNC na fibrinovou matici. Materiál vykazoval pevnost i elasticitu. Nicméně nebyl testován *in vivo*.

Jako materiál pro výrobu cévních náhrad byl vyvíjen i materiál z polyuretanu a CNF. Přítomnost CNF v polyuretanu měla za následek lepší elastické vlastnosti materiálu, dále nízkou trombogenicitu a materiál vykazoval mimořádné fyzikální a mechanické vlastnosti. Cévní náhrada z tohoto materiálu byla použita u 26-letého muže při náhradě krkavice. Ovšem doposud nebyly publikovány žádné výsledky tohoto použití (Lin, 2011).

3. Experimentální část

Stávající cévní náhrady kolabují z důvodů vysoké trombogenicity při implantaci do vyšších živočišných druhů. Návrhem řešení bylo modifikovat vnitřní stěnu cévní náhrady nanocelulózou, která výrazně zvyšuje adhezi endotelů z důvodů její jemné struktury. Na druhé straně však společně se zvyšující se adhezí endotelových buněk roste i trombogenicita povrchu, proto bylo nutné na daný povrch navázat heparin za použití polydopaminu.

Experimentální část diplomové práce je rozdělena na dvě podkapitoly. První podkapitola se týká modifikace materiálu nanocelulózou a druhá podkapitola je zaměřena na modifikaci maloprůměrové cévní náhrady polydopaminem a heparinem.

3.1 Materiál a přístrojové vybavení

V této kapitole je uveden veškerý materiál a přístrojové vybavení, které bylo použito při zpracování této diplomové práce. Seznam použitých chemikálií je uveden v *Tab.3* a seznam použitých přístrojů je uveden v *Tab.4*.

Tab.3: Přehled použitých chemikálií.

Chemikálie	Popis	Výrobce
BGB Ultra cellulose nanocrystals	8 % vodná suspenze	Blue Goose biorefineries inc.
Sappi Cellulose nanofibers	1% roztok v 2-Ethyl-1-hexanol	Sappi
CelluForce	Nanokrystalická celulóza	Celluforce
Celulóza acetát butyrát	Mw 80 000 g/mol	Sigma Aldrich
Bakteriální celulóza	Suspenze bakteriální celulózy	Royal institute of technology Stockholm
Polykaprolakton	Mw 80 000 g/mol	Sigma Aldrich
Kopolymer polylaktidu a polykaprolaktonu	PURASORB7015	Corbion
Heparin sodium salt	CAS: 9041-08-1	TCI
Chloroform		Penta
Chlorovodíková kyselina		Penta
Ethanol		Penta
Kyselina octová		Penta
Trombocyty	TRSA11170405	Krajská nemocnice Liberec
Endotelové buňky		ATCC
Endothelial Basal Medium		Lonza
EGM-2 Single Quots		Lonza
Trypsin-EDTA		Lonza
Tris	CAS: 77-86-1	Sigma Aldrich
Dopamin	CAS: 6231-7	TCI
3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-		Thermo Fisher

2,5-difenyl tetrazolium bromid		
Isopropanol		Penta
Glutaraldehyd		Sigma Aldrich
Fosfátový pufr		
DAPI		Thermo Fisher
Phalloidin		Thermo Fisher
Composol CS		Krajská nemocnice Liberec
Triton X-100		Sigma Aldrich

Tab.4: Přehled přístrojů.

Přístroj	Výrobce
Peristaltická pumpa	Scientific
Fluorescenční mikroskop	Nikon
Elektronový mikroskop	Tescan
UV-Vis spektrofotometr	BioTech
Flow box	Telstar Bio-II-A
Nanospider™	Elmarco
Sterilizátor ethylen oxid	Anprolene
Koagulační analyzátor BCS XP	Siemens

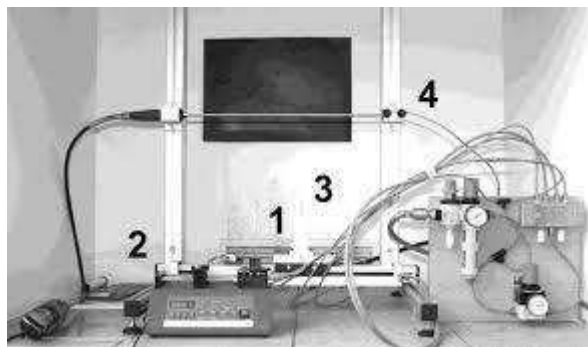
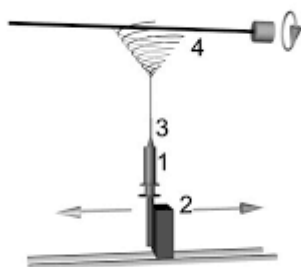
3.2 Použité metody

3.2.1 Elektrostatické zvlákňování

Princip elektrostatického zvlákňování (electrospinningu) využívá elektrostatického potenciálu mezi elektrodou a kolektorem. Použitím zdroje vysokého napětí dochází k přivedu vysokého napětí kladné či záporné polarity do polymerního roztoku. Ten je následně přitahován vlivem elektrického potenciálu vznikajícího mezi elektrodou a kolektorem. Elektrický potenciál způsobuje silnou interakci mezi elektrodou a kolektorem a vlivem elektrostatických sil, kde dochází k deformaci kapaliny a následné tvorbě Taylorova kužele a posléze nanovláken či mikrovláken. V okamžiku, kdy je překonána prahová hodnota napětí, elektrostatické síly překonají povrchové napětí, vnitřní tření polymerního roztoku a proudy polymerního roztoku jsou vytahovány z Taylorova kužele. Tyto vlákenné proudy prochází bičovací zónou, kde dochází k odpaření rozpouštědla a následně se vlákna ukládají ve formě suchých polymerních vláken na kolektor.

Zařízení pro zvlákňování maloprůměrových cévních náhrad je tvořeno pohybující se jehlou, která vykonává lineární posuv ve vzdálenosti rovné délce cévní náhrady.

Kolektor je tvořen velice rychle rotujícím vřetenem. Princip zvlákňování potom probíhá stejným způsobem, který je popsán výše.



Obr 11: Schéma (a) a fotografie (b) zachycující uspořádání zařízení pro výrobu maloprůměrových cévních náhrad pomocí elektrostatického zvlákňování. Injekční stříkačka (1) obsahující polymerní roztok je umístěná v dávkovací pumpě (2), kdy jehla (3) injekční stříkačky je připojena ke zdroji vysokého napětí. Vytvářející se vlákna se ukládají na rotující vřeteno (4). (Horáková, 2015)

3.2.2 Stanovení metabolické aktivity buněk (MTT test)

MTT test byl použit k testování materiálů s endotelovými buňkami, trombocyty a byl použit i pro stanovení vlivu účinku heparinu na endotelové buňky.

Tato metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (fialové krystalky). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním okyseleného isopropanolu a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm (referenční vlnová délka 650 nm). Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk - čím tmavší barva, a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk.

Do sterilních jamek použité () kultivační destičky bylo napipetováno kompletní médium a k němu byl přidán roztok MTT. Do takto připraveného roztoku byly pomocí pinzety přeneseny scaffoldy. Roztok byl vytemperován na 37 °C. Z jamek s pozitivními kontrolami bylo odsáto médium a bylo připipetováno nové médium a MTT roztok.

Takto připravená kultivační destička byla vložena do inkubátoru a byly stopovány 2-4 hodiny inkubace.

Po skončení inkubace MTT testu bylo odsáto médium a byl přidán okyselený isopropanol. V tomto roztoku došlo k rozpuštění fialových krystalků. Zabarvený roztok byl přepipetován do čistých jamek a na spektrofotometru byla změřena absorbance při 570 a 650 nm. Výsledná absorbance vzorků byla získána jako rozdíl absorbancí při 570 a 650 nm a po odečtení negativních kontrol. Jako negativní kontroly byly použity vzorky v médiu bez buněk. Výsledky byly zprůměrovány a uvedeny do grafu spolu se směrodatnými odchylkami.

3.2.3 Fluorescenční mikroskopie

Pro vizualizaci a následnou kvantifikaci buněk na testovaných materiálech byla použita fluorescenční mikroskopie. Vzorky byly po skončení doby kultivace dvakrát propláchnuty fosfátovým pufrům (PBS) a zafixovány ve 2,5 % glutaraldehydu po dobu 15 minut při 4 ° C. Po oplachu PBS byly zafixované buňky byly obarveny pomocí 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) a phalloidinu, kdy DAPI barví modře jádra buněk a phalloidin barví zeleně cytoplazmu buněk. Barvení probíhalo 15 minut ve tmě. Takto zhotovené preparáty byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu.

Z vyfocených snímků z fluorescenčního mikroskopu byla provedena kvantifikace buněčných jader na plochu 1 mm², kvantifikace byla provedena automaticky s využitím softwaru MATLAB. Kvantifikace byla provedena z jednoho vzorku z dvaceti zorných polí. Výsledky jsou uvedeny v grafu jako průměrná hodnota ± směrodatná odchylka.

3.2.4 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie byla použita pro vizualizaci modifikovaných materiálů a vizualizaci endotelových buněk a trombocytů. Po skončení doby kultivace byly vzorky dvakrát promyty v PBS a fixovány pomocí 2,5 % glutaraldehydu po dobu 30 minut při 4 °C. Poté byly vzorky odvodněny vzrůstající ethanolovou řadou (60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%), nalepeny na terčíky, pozlaceny a poté byly pozorovány elektronovým mikroskopem.

3.2.5 Aktivovaný parciální tromboplastický čas (aPTT)

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas byl použit ke zjištění množství navázaného heparinu na modifikované materiály. Jedná o screeningový test, který se používá k monitoringu pacientů, kteří podstupují léčbu heparinem. Aktivovaný parciální čas je založen na měření doby do vzniku fibrinového vlákna u dekalcifikované plazmy po přidání nadbytku vápenatých iontů a parciálního tromboplastinu.

Při měření aPTT bylo smícháno 100 μ l PBS, ve kterém byl vytřepáván vzorek modifikovaný heparinem. K fosfátovému pufru bylo přidáno 400 μ l plazmy. Takto připravený vzorek byl měřen na automatickém koagulačním analyzátoru BCS XP. Aktivovaný parciální čas byl měřen na Oddělení hematologie a transfúzního lékařství Krajské nemocnice Liberec.

V případě přítomnosti heparinu ve vzorku plazmy dochází k prodloužení koagulačního času. Tato doba je úměrná koncentraci heparinu v měřeném roztoku. Fyziologické hodnoty aPTT jsou 25-40 sekund.

3.3 Modifikace materiálů nanocelulózou

Tato kapitola je věnována modifikaci materiálů nanocelulózou. Nanocelulóza byla použita k modifikaci maloprůměrové cévní náhrady. Důvodem modifikace cévní náhrady nanocelulózou bylo zlepšení adheze a proliferace endotelových buněk, změna smáčivosti hydrofobních polyesterů a následná možnost chemické modifikace. Maloprůměrová cévní náhrada byla vyrobena z polymerů polykaprolaktonu a kopolymeru polylaktidu a polykaprolaktonu.

Planární vzorky modifikované nanocelulózou byly použity k testování s endotelovými buňkami. Planární vzorky byly pro testování použity z důvodu snadnější výroby a lepšího zacházení při testování *in vitro*. Navíc u planárních vzorků byla možnost použití většího počtu opakování jednotlivých testů. Tubulární blend, který byl modifikován nanocelulózou pomocí peristaltické pumpy byl následně charakterizován pomocí SEM, poté byl vložen do PBS a byl vytřepáván. Po 24/ 72 h byl opět charakterizován pomocí SEM. Nemodifikované vzorky PCL a tubulárního blendu byly použity jako kontroly při testování materiálů s endotelovými buňkami a kontroly pro

snímky SEM. Cílem modifikace tubulárních vzorků bylo potáhnout vnitřní stěnu cévní náhrady pro usnadnění endotelizace vnitřního povrchu.

3.3.1 Příprava roztoků pro elektrostatické zvláknění

- **Celulóza acetát butyrát (CAB)**

Byl připraven roztok celulózy acetát butyrát o koncentraci 10 hm %. Celulóza acetát byla rozpuštěna v kyselině octové. Po rozpuštění byl roztok zvlákněn na NANOSPIDERU™.

Celulóza acetát butyrát nebyl použit pro modifikaci základního materiálu, byl zvlákněn samostatně. A byl zvlákněn za účelem nalezení alternativy místo alifatických polyesterů. Alifatické polyestery jsou hydrofobní a mají semikrystalickou strukturu. Celulóza acetát butyrát je hydrofilní. V budoucnosti by mohla nahradit již zmíněné alifatické polyestery.

- **Polykaprolakton (PCL) + nanokrystalická celulóza (CNC)**

Polykaprolakton byl rozpuštěn ve směsi rozpouštědel chloroform/ethanol/kyselina octová v poměru (8/1/1) na finální koncentraci 10 hm. %. Po rozpuštění PCL byla do roztoku přidána CNC celulóza o koncentraci 1 hm.% a 2 hm.%. Takto připravené roztoky byly elektrostaticky zvlákněny na NANOSPIDERU™.

- **Polykaprolakton (PCL) + kopolymer polylaktidu a polykaprolaktonu (PLCL)**

Polykaprolakton a kopolymer polylaktidu a polykaprolaktonu byly rozpuštěny v poměru 1:1 ve směsi rozpouštědel chloroform/ethanol/ kyselina octová (8/1/1). Finální koncentrace roztoku byla 10 hm.%. Blend těchto dvou polymerů byl zvlákněn za použití NANOSPIDERU™.

3.3.2 Modifikace tubulárních vzorků nanocelulózou

Pro modifikace byl zvlákněn blend PCL/PLCL. K modifikace blendu byla použita bakteriální celulóza (KTH Stockholm), CNC (BGB celulóza; CelluForce) a CNF (Sappi) celulóza. Bakteriální a Sappi celulóza byly použity bez jakýchkoliv úprav. Z BGB celulózy byla namíchána suspenze o koncentraci 1 hm.%, rozpouštědlem byla destilovaná voda. Z CelluForce celulózy byly namíchány dvě suspenze o koncentraci 1 hm.%, rozpouštědlem v prvním roztoku byla destilovaná voda a druhým rozpouštědlem byl butanol. Takto připravené suspenze byly použity k modifikaci tubulárních vzorků.

Modifikace probíhala pomocí peristaltické pumpy, ta byla nastavena na průtok 3 ml/min a dobu 24 hodin.



Obr.12: Schéma zapojení peristaltické pumpy při modifikaci nanovlákněných cévních náhrad.

Následně byly vzorky analyzovány pomocí SEM. Po analýze vzorků na SEM byly vzorky ponořeny do 1 ml PBS a vytřepávány při 100 rpm 24 h/ 72h při teplotě 37°C. Po 24/72 hodinách byly provedeny další snímky SEM za účelem kontroly vrstvy nanocelulózy.

3.3.3 Charakterizace materiálů

Charakterizace modifikovaných materiálů probíhala pomocí skenovací elektronové mikroskopie a obrazové analýzy v programu Nis elements, kde byl měřen průměr vláken. Průměr vláken byl měřen u 150 vláken. Průměr vláken byl vyjádřen jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka. Snímky z elektronového mikroskopu a naměřené průměry vláken jsou uvedeny v kapitole 4. Výsledky a diskuze.

3.3.4 Biologické testování materiálů modifikovaných nanocelulózou

Elektrostaticky zvlákněné materiály a tubulární blend modifikovaný bakteriální celulózą byly testovány *in vitro* s endotelovými buňkami a trombocyty.

3.3.4.1 Testování modifikovaných materiálů nanocelulózą s endotelovými buňkami

Pro testování s endotelovými buňkami byl zvlákněn polykaprolakton, polykaprolakton s nanokrystalickou celulózą a celulóža acetát butyrát.

Z těchto materiálů byly vyřezány kruhové vzorky o průměru 15 mm. Tyto vzorky byly umístěny do 24 jamkové destičky. Aby se docílilo správného smočení materiálů byly vzorky zatíženy skleněným kroužkem. Takto připravené materiály byly sterilizovány ethylenoxidem a před samotným testováním byly odvětrávány dva týdny při pokojové teplotě.

Vlastní testování probíhalo za použití lidských endotelových buněk z pupečnickové žíly, pasáž 7 (Human umbilical vein endothelial cell HUVEC), které byly kultivovány v endoteliálním bazálním médiu (EBM-2) doplněném EGM-2 Single Quots. Ten obsahoval lidský epidermální růstový faktor (hEGF), hydrokortison, bovinní mozkový extrakt (BBE), kyselinu askorbovou, fetální bovinní sérum (FBS) a Gentamicin/Amfotericin-B (GA). Buňky byly umístěny v inkubátoru v atmosféře 5% CO₂ při 37°C. Když se buňky staly konfluentními, byly suspendovány za použití trypsinu-EDTA. Endotelové buňky byly nasazeny na vrchní stranu vzorků při

koncentraci 1×10^4 buněk na jamku. Vzorky byly analyzovány po 7 dnech kultivace za použití fluorescenční mikroskopie (3.2.2) a skenovací elektronové mikroskopie (3.2.3). Pro kvantifikaci buněčné viability byl použit metabolický test MTT (3.2.1). Jako negativní kontroly byly použity vzorky, které byly inkubovány v médiu bez buněk.

- MTT

Viabilita endotelových buněk na scaffoldech byla testována po 7 dnech kultivace pomocí MTT testu. Testování bylo provedeno na 3 vzorcích a 1 vzorku jako negativní kontrola pro každý materiál.

3.3.4.2 Testování trombogenicity tubulárních vzorků blendu modifikovaného bakteriální nanocelulózou

Na testování trombogenicity byly připraveny tubulární vzorky elektrostaticky zvlákněného blendu z PCL a PLCL v poměru 1:1. Vnitřní vrstva těchto tubulárních vzorků byla po zvláknění modifikována bakteriální nanocelulózou. Z takto připravených vzorků (Blend, Blend + BC) byly vystřiženy vzorky o průměru 6 mm. Tyto vzorky byly před samotným testováním vysterilizovány v ethylen oxidu a odvětrány po dobu tří týdnů při laboratorní teplotě.

Materiály byly inkubované ve 200 μ l suspenze trombocytů o koncentraci 830×10^6 trombocytů/ml po dobu dvou hodin při 37°C. Stejným způsobem byly připraveny i materiály sloužící jako negativní kontroly, ovšem negativní kontroly byly inkubovány pouze v roztoku Composolu CS. Vzorky byly analyzovány po dvou hodinové inkubaci za použití skenovací elektronové mikroskopie (3.2.3). Pro kvantifikaci buněčné viability byl použit metabolický test MTT (3.2.1).

- MTT test

Po uplynutí dvou hodinové inkubace materiálů s trombocyty byly vzorky pro MTT test přendány do 150 μ l čistého roztoku Composol CS a bylo přidáno 50 μ l roztoku MTT. Vzniklé fialové krystaly byly rozpuštěny pomocí okyseleného isopropylalkoholu. Absorbance roztoků byla měřena při vlnových délkách 570 nm a 650 nm. Tyto hodnoty byly zprůměrovány a výsledná absorbance vzorků byla vypočítána jako rozdíl

absorbancí vzorků a negativních kontrol. Testování bylo provedeno na 7 vzorcích a byla 1 negativní kontrola.

3.4 Modifikace maloprůměrové cévní náhrady polydopaminem a heparinem

Pro modifikaci byl zvlákněn blend (PCL/PCLC), který byl dále modifikován polydopaminem a heparinem. Modifikace probíhala pomocí polymerační reakce. Modifikována byla jak planární vrstva, tak i tubulární vzorky. Modifikace tubulárních vzorků probíhala pomocí peristaltické pumpy.

Planární vrstva byla modifikována z důvodů použití této vrstvy k biologickému testování s endotelovými buňkami a trombocyty. Planární vrstva je vhodnější pro testování *in vitro* než tubulární vzorky. Tubulární vzorky byly modifikovány pro další experimenty, které budou provedeny v Německu na Univerzitě Tübingen.

3.4.1 Příprava roztoků pro výrobu cévních náhrad (blend)

- **Polykaprolakton (PCL) + kopolymer polylaktidu a polykaprolaktonu (PLCL)**

Materiály byly připraveny stejným způsobem jako materiály pro modifikaci nanocelulózou.

3.4.2 Modifikace materiálů polydopaminem a heparinem

Tato část práce probíhala ve spolupráci s Oddělením nanomateriálů v přírodních vědách a Ing. Janem Lukáškem.

- Modifikace planárních vzorků polydopaminem a heparinem

Vzorek blendu byl upnut do teflonového rámečku s vnitřní plochou 16 cm². V 250 ml odměrné baňce byl připraven 10 mM roztok Tris, ten byl kvantitativně převeden do kádinky a bylo přidáno 66,2 µl koncentrované 35 % kyseliny chlorovodíkové (HCl). Výsledné pH roztoku bylo 8,5. Do takto připraveného roztoku s pufrem byl vložen

rámeček se vzorkem. Následně byl vzorek v pufru vložen do ultrazvuku na 2 minuty, aby došlo k nasycení nanovlákněného nosiče roztokem. Na *Obr.13* je vidět neúplně smočený vzorek v teflonovém rámečku v polymeračním roztoku. A na vedlejším obrázku je zachycen barevný přechod během reakce (změna bílé barvy - vzorky vpravo, na hnědou až černou - vzorky vlevo).



Obr.13: Snímek polymeračního roztoku s nesmočeným vzorkem v teflonovém rámečku a snímek smočených vzorků během polymerační reakce dopaminu.

Následně byla kádinka postavena na magnetické míchadlo, vzorek byl vyndán a za stálého míchání byl do roztoku pufru přidán heparin (2 mg/ml) a po jeho rozpuštění byl do roztoku přidán polydopamin (2 mg/ml). Po rozpuštění polydopaminu byl vzorek vrácen zpět do polymerační lázně. Planární vzorek blendu po přidání dopaminu začíná okamžitě tmavnout přes světle hnědou až do černé (cca 2 hod), barevný přechod během reakce je vidět na *Obr.13*. Polymerační lázeň byla míchána při 250 rpm 4 hodiny. Po uplynutí 4 hodin byl vzorek vyjmut z lázně, byl opakovaně opláchnut destilovanou vodou, čištěn destilovanou vodou v ultrazvuku a následně byl ponechán na vzduchu, aby oschnul. Poté byl dosušen v exikátoru pod vakuem.

Modifikace materiálu polydopaminem probíhala stejným způsobem, jen do polymeračního roztoku nebyl přidán heparin.

- Modifikace tubulárních vzorků polydopaminem a heparinem

Modifikace tubulárních vzorků polydopaminem probíhala stejným způsobem jako modifikace planárních vzorků. Rozdíl byl v uchycení vzorků. Kdy nejprve byl tubulární blend v pufru vložen do ultrazvuku na 2 minuty, aby došlo k nasycení tubulárního vzorku roztokem. Následně byl tubulární blend napojen do hadičky peristaltické pumpy a byl uchycen pomocí svorek, které měly zabránit pohybu tubulárního blendu v hadičce (*Obr.14*).



Obr.14: Snímek uchycení tubulárních vzorků při modifikaci polydopaminem a heparinem.

Peristaltická pumpa byla nastavena na průtok 100 ml/ min na dobu 4 hodiny. Zde byl nalezen problém, jelikož pomocí peristaltické pumpy byly modifikovány cévní náhrady o průměru 4 mm a 5 mm. U cévní náhrady s průměrem 5 mm docházelo k prosakování její stěny. Tento problém byl vyřešen nastavením menšího průtoku roztoku peristaltickou pumpou. Konkrétně byl průtok zmenšen na 30 ml/min.

3.4.3 Biologické testování materiálů modifikovaných polydopaminem a heparinem

Elektrostaticky zvlákněné materiály a blend modifikovaný polydopaminem a polydopaminem s heparinem byly testovány *in vitro* s endotelovými buňkami a trombocyty. Zároveň byl testován vliv účinku heparinu na endotelové buňky.

3.4.3.1 Testování modifikovaných blendů polydopaminem a heparinem s endotelovými buňkami

Pro testování s endotelovými buňkami byl zvlákněn blend, který byl následně modifikovaný polydopaminem a polydopaminem a heparinem. Příprava vzorků a vlastní testování materiálů s endotelovými buňkami probíhalo stejným způsobem jako testování materiálů modifikovaných nanocelulózou (3.3.4.1). K testování byla použita pasáž číslo 7. Endotelové buňky byly nasazeny na vrchol vzorků při koncentraci 1×10^4 buněk na jamku. Vzorky byly analyzovány po 1 a 7 dnech kultivace za použití

fluorescenční mikroskopie (3.2.2) a skenovací elektronové mikroskopie (3.2.3). Pro kvantifikaci buněčné viability byl použit metabolický test MTT (3.2.1). Jako negativní kontroly byly použity vzorky, které byly namočený v médiu bez buněk.

- MTT

Metabolický MTT test probíhal stejný způsobem jako při testování materiálů modifikovaných nanocelulózou s endotelovými buňkami. Jediným rozdílem byla doba kultivace, kdy materiály modifikovaná polydopaminem a heparinem byly s endotelovými buňkami testovány po 1 a 7 dnech inkubace. Pro každý materiál byly testovány 3 vzorky a 1 negativní kontrola.

3.4.3.2 Testování trombogenicity modifikovaných materiálů heparinem a polydopaminem

Testování trombogenicity probíhalo na zvlákněném blendu z PCL/PLCL a na blendu modifikovaném polydopaminem a blendu modifikovaném polydopaminem a heparinem. Testování trombogenicity modifikovaných materiálů heparinem a polydopaminem probíhalo stejně jako testování trombogenicity materiálů modifikovaných nanocelulózou (3.3.4.2). Jako kontrolní materiál bylo použito dno testovací jamky (TCP).

- MTT test

Po uplynutí dvou hodinové inkubace materiálů s trombocyty byly vzorky pro MTT test přendány do 150 μ l čistého roztoku Composol PS a bylo přidáno 50 μ l roztoku MTT. Po 3 hodinách inkubace byla měřeno absorbance vzniklého roztoku formazanu.

3.4.3.3 Testování vlivu účinku heparinu na endotelové buňky

Testování vlivu účinku heparinu bylo provedeno dle normy ČSN EN ISO 10993-5 na lidských endotelových buňkách (HUVEC), pasáž číslo 7. Endotelové buňky byly nasazeny do 96 jamkové kultivační destičky v koncentraci 1×10^4 buněk/ jamka. Buňky byly ponechány v inkubátoru po dobu 24 hodin při 37°C.

Heparin byl rozpuštěn v kompletním médiu pro endotelové buňky (EBM-2+EGM Single Quots), výsledné koncentrace roztoku heparinu byly 1 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,0025 mg/ml; 0,0001 mg/ml. Před aplikací roztoku na buňky byl roztok přefiltrován. Po 24 hodinách inkubace endotelových buněk bylo odsáto médium a k buňkám bylo přidáno 100 μ l roztoku heparinu v médiu pro endotelové buňky. Pro každou koncentraci roztoku heparinu bylo nasazeno 12 jamek pro vyhodnocení cytotoxického/stimulujícího účinku heparinu. Roztok heparinu byl pipetován podle následujícího schématu:

- A) Negativní kontrola – 100 μ l kompletního média – 100 % viabilita
- B) Pozitivní kontrola - 100 μ l kompletního média s cytotoxickým Tritonem X-100 (0,1%)
- C) 0,0001 mg/ml heparinu
- D) 0,0025 mg/ml heparinu
- E) 0,005 mg/ml heparinu
- F) 0,075 mg/ml heparinu
- G) 0,01 mg/ml heparinu
- H) 1 mg/ml heparinu

Takto připravená destička byla inkubována 24 hodin při 37°C. Poté bylo odsáto médium a do každé jamky bylo přidáno 50 μ l roztoku MTT. Po 3 hodinách inkubace při 37°C bylo odsáto MTT a fialové krystaly formazanu byly 100 μ l rozpuštěny okyseleným isopropanolem. Poté byla měřena absorbance při 570 nm (referenční vlnová délka 650 nm). Výsledky byly přepočteny na % viability buněk oproti pozitivní kontrole (buňky v médiu neovlivněné účinky testované látky). Pro každou koncentraci, negativní a pozitivní kontroly bylo testováno 12 vzorků.

3.4.3.4 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas byl měřen na modifikovaných materiálech blendu s polydopaminem, blendu-PDA-heparin a samotném blendu. Z modifikovaných materiálů blend-PDA, blend-PDA-heparin byly vystřiženy vzorky o průměru 15 mm a 6 mm. Tyto vzorky byly vytřepávány při 100 rpm a teplotě 37 °C v PBS. U vzorků o průměru 15 mm bylo PBS odebráno po 1. a 7. dnu inkubace, vzorky byly inkubovány v 1 ml PBS. Tyto vzorky byly testovány za stejných podmínek jako

probíhalo testování vzorků s endotely. U vzorků o průměru 6 mm bylo PBS odebráno po 2 hodinách a 7 dnech inkubace, vzorky byly inkubovány v objemu 200 μ l. Tyto vzorky byly testovány za stejných podmínek jako probíhalo testování vzorků s trombocyty. Takto odebrané PBS bylo použito ke stanovení aPTT, kdy bylo odebráno 100 μ l PBS a bylo přidáno 400 μ l plazmy. Vzniklý vzorek byl změřen na automatickém analyzátoru BCS XP.

- Kalibrační křivka

Při modifikaci materiálu byl používán roztok heparinu o koncentraci 1 mg/ml. Z této koncentrace vycházela i kalibrační křivka, která sloužila pro odvození koncentrace heparinu v modifikovaných materiálech. Jako první byl namíchán roztok o koncentraci 1 mg/ml, ten vznikl rozpuštěním heparinu v PBS. Při sestavování kalibrační křivky byly použity tyto koncentrace heparinu: 1 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,0075 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,0025 mg/ml; 0,001 mg/ml; 0,00075 mg/ml; 0,0005 mg/ml.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Modifikace materiálů nanocelulózou

Modifikace nanocelulózou byla prováděna za účelem zlepšení adheze a proliferace buněk a zlepšení vlastností modifikovaných materiálů a za účelem možné následné chemické modifikace. K experimentům byly použity různé zdroje nanocelulózy, jednalo se o nanokrystalickou celulózu, nanofibrilární celulózu, bakteriální celulózu a celulózu acetát butyrát. V experimentech bylo zjišťováno, zda došlo k homogennímu pokrytí povrchu nanocelulózou a jak modifikace zlepšila proliferaci endotelových buněk.

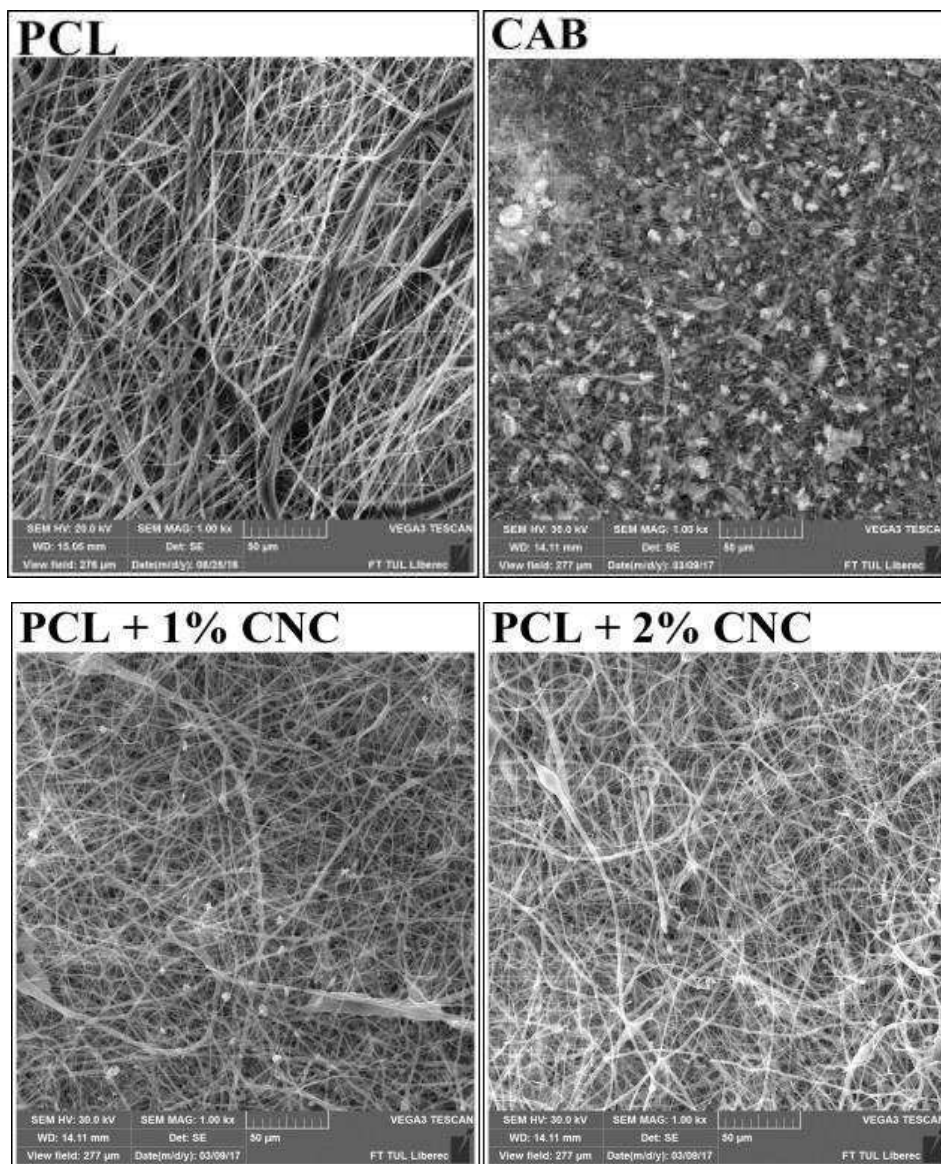
4.1.1 Modifikace planární vrstvy polykaprolaktonu nanocelulózou

K modifikaci polykaprolaktonu byla použita nanokrystalická celulóza, která byla přidána do roztoku polykaprolaktonu. Tento roztok byl následně elektrostaticky zvlákněn.

Modifikace planární vrstvy byla provedena za účelem zlepšení adheze a proliferace endotelových buněk na nanovlákněné vrstvě PCL.

Na *Obr.15* jsou zobrazeny snímky z elektronového mikroskopu zvlákněného PCL, celulózy acetát butyrátu a PCL, které bylo modifikováno 1% a 2% nanokrystalické celulózy. Průměr vláken u PCL byl 348 ± 189 nm. U celulózy acetát butyrát byl průměr vláken okolo 191 ± 78 nm, ovšem u CAB bylo velmi obtížné naměřit průměry, kvůli vzniklým defektům na nanovlákněné vrstvě CAB.

U PCL modifikovaného 1% nebo 2% nanokrystalické celulózy nebyl problém naměřit průměry vláken, vlákna byla homogenní. U PCL s 1% nanokrystalické celulózy byl průměr vláken 465 ± 195 nm a u PCL s 2% nanokrystalické celulózy byl průměr vláken 493 ± 212 nm.



Obr. 15: SEM snímky elektrostaticky zvlákněného PCL, PCL s 1 % CNC a 2 % CNC a CAB, měřítko 50 μm .

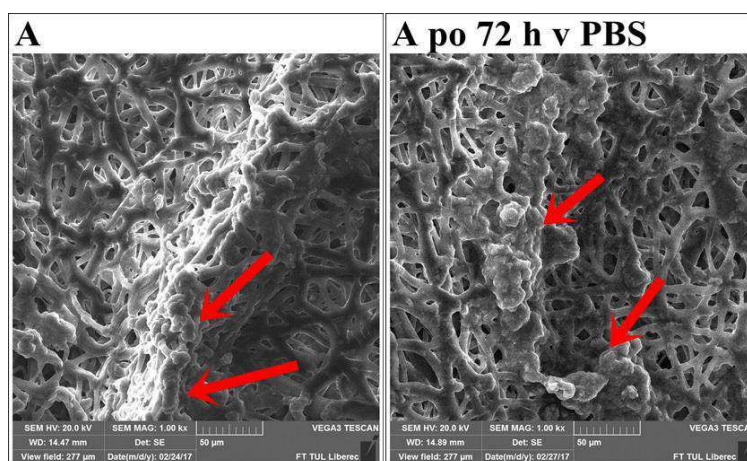
Při tomto experimentu byla použita nanokrystalická celulóza, která byla přidána do roztoku polymeru PCL. Nanokrystalická celulóza byla zvlákněna s PCL za účelem zlepšení adheze a proliferace buněk na endotelové vrstvě díky zvýšení hydrofilicity povrchu. Vrstva PCL byla zvlákněna za účelem kontroly a porovnání výsledných vrstev. Oba dva roztoky s nanokrystalickou celulózą se povedlo zvláknit a vznikla homogenní vrstva s vlákny se podobným průměrem. Problém se zvlákněním byl u celulózy acetát butyrát, která při zvlákněování vyvážela defekty mezi nanovlákny, což činilo materiál křehký a znesnadňovalo manipulaci. U materiálu CAB je potřeba optimalizovat procesní podmínky pro vznik vlákenné vrstvy bez přítomnosti defektů.

4.1.2 Modifikace tubulárního blendu nanocelulózou

Modifikace tubulárního blendu byla provedena za účelem zlepšení adheze, proliferace buněk, snížení trombogenicity tubulárního blendu a případné další chemické modifikaci, která by podpořila výše zminované funkce. Snahou bylo přiblížit se modifikací vnitřní stěny cévní náhrady skutečné bazální lamině, která je jednou z vrstev v lidských cévách. K tomuto účelu byla použita nanocelulóza, která se strukturou velmi podobá právě bazální lamině.

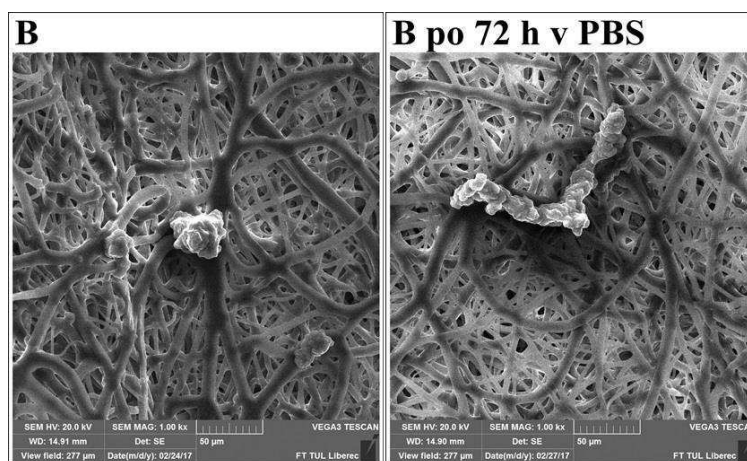
Účelem tohoto experimentu bylo provedení modifikace vnitřní stěny cévní náhrady pomocí různých druhů nanocelulóz a peristaltické pumpy. K modifikaci byly použity komerčně dostupné nanocelulózy i bakteriální celulóza, která není komerčně dostupná. K modifikaci vnitřní stěny tubulárních vzorků byla použita nanokrystalická, nanofibrilární a bakteriální celulóza.

Na *Obr.16* je snímek z elektronového mikroskopu vnitřní stěny nanovláknenné cévní náhrady modifikované suspenzí nanokrystalické celulózy s obchodním názvem BGB celulóza. Fotografie A ukazuje morfologii vnitřní vrstvy cévní náhrady po 24 h proudění CNC peristaltickou pumpou, kde jsou patrné ostrovy a shluky CNC (znázorněno červenou šipkou). Po vyfocení na SEM byla cévní náhrada ponořena 1 ml PBS a třepána s PBS po dobu 72 hodin. Výsledek ukazuje druhá fotografie, kde je vidět, že ostrůvky CNC se výrazně zmenšily. Roztok PBS byl po vyndání vzorku zakalený a CNC začala na dně zkumavky sedimentovat ke dnu.



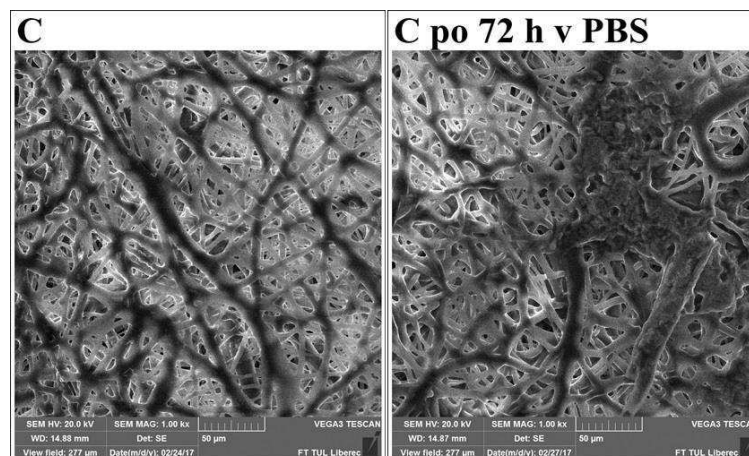
Obr.16: Snímky ze SEM vnitřní stěny nanovláknenné cévní náhrady modifikované suspenzí nanokrystalické celulózy s obchodním názvem BGB celulóza. Červené šipky označují shluky nanokrystalické celulózy.

Na *Obr.17* je snímek z elektronového mikroskopu vnitřní stěny nanovláknenné cévní náhrady modifikované suspenzí nanokrystalické celulózy s obchodním názvem CelForce celulóza. Snímek B ukazuje morfologii vnitřní vrstvy cévní náhrady po 24 hodinách proudění roztoku CNC v peristaltické pumpě. Jak je vidět na snímku B nedošlo k celistvému pokrytí nanovláknenné vrstvy. Na vnitřní straně cévní náhrady vznikly shluky nanokrystalické celulózy. Druhá fotografie zobrazuje tu samou vnitřní vrstvu po 72 hodinách třepání v PBS. Již na první pohled je patrné, že shluky se výrazně zmenšily, zřejmě z důvodů vyplavení CNC z povrchu vnitřní vrstvy cévní náhrady. Stejně jako u předešlého vzorku i zde došlo k zakalení a sedimentaci uvolněné nanokrystalické celulózy z vnitřní vrstvy cévní náhrady.



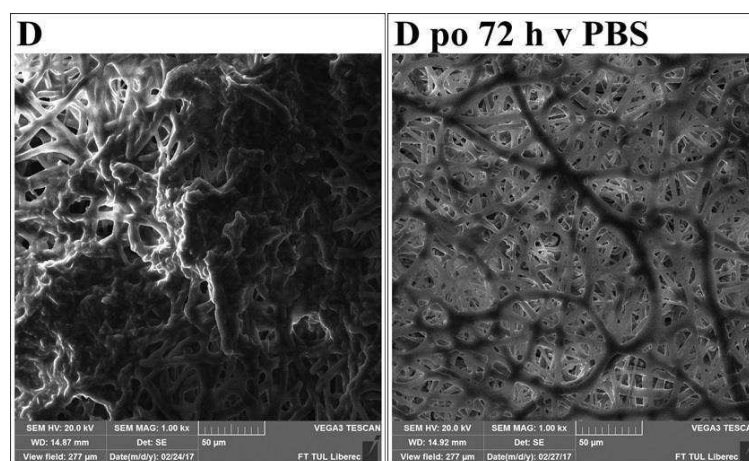
Obr.17: Snímky ze SEM vnitřní stěny nanovláknenné cévní náhrady modifikované suspenzí nanokrystalické celulózy s obchodním názvem CelForce.

Na *Obr.18* snímek vnitřní stěny nanovláknenné cévní náhrady modifikované suspenzí CNC, oproti předešlému experimentu byl k rozpuštění CNC použit butanol. I takto připravený roztok proudil 24 hodin peristaltickou pumpou s cévní náhradou. Problémem u tohoto roztoku bylo neschopné rozdispergování nanokrystalické celulózy v butanolu, k tomu bylo nutné použít ultrazvuk. Ovšem po 24 hodinách byl na dně kádinky nalezen sediment CNC a roztok, který byl zakalený, byl po 24 hodinách čirý. Na snímku C je vidět snímek vnitřní stěny cévní náhrady po 24 hodinách. Jak je vidět na tento vzorek se navázalo jen velmi malé množství CNC. Na vedlejším snímku je vidět vzorek po 72 hodinách v PBS. Na první pohled je patrné, že téměř všechna nanokrystalická celulóza se vyplavila v PBS. Roztok PBS byl zakalený a na dně zkumavky byl opět sediment.



Obr.18: : Snímky ze SEM vnitřní stěny nanovláčkové cévní náhrady modifikované suspenzí nanokrystalické celulózy s obchodním názvem CelForce.

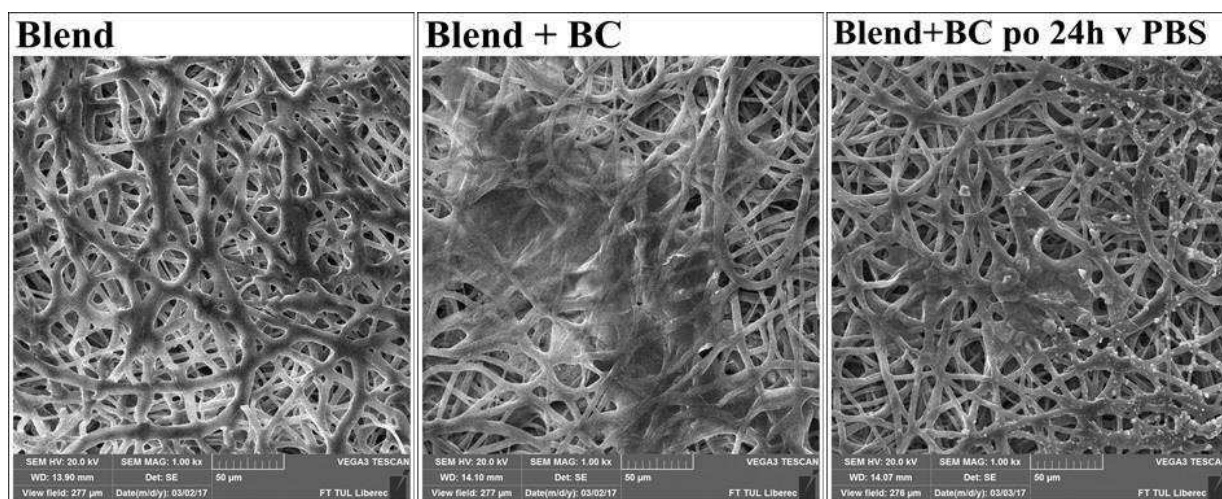
Na *Obr.19* je snímek z elektronového mikroskopu vnitřní stěny nanovláčkové cévní náhrady modifikované suspenzí nanofibrilární celulózy s obchodním názvem Sappi. Nanofibrilární celulóza byla dodána jako suspenze v 2-Ethyl-1-Hexanol o koncentraci 1 hm.%. Ta byla použita ve formě, ve které byla získána od dodavatele. I CNC proudila peristaltickou pumpou s cévní náhradou 24 hodin. Na snímku D je vnitřní vrstva cévní náhrady po 24 hodinách v peristaltické pumpě. Opět nejde o celistvou vrstvu ovšem vzniklá vrstva je nejvíce homogenní oproti předešlým snímkům. Problémem bylo, že po 72 hodinách třepání v PBS došlo k vyplavení nanofibrilární celulózy a roztok PBS byl opět zakalený.



Obr.19: Snímky ze SEM vnitřní stěny nanovláčkové cévní náhrady modifikované suspenzí nanofibrilární celulózy s obchodním názvem Sappi.

Na *Obr.20* jsou snímky vnitřní vrstvy cévní náhrady z elektronového mikroskopu blendu, blendu s bakteriální celulózą a blendu s bakteriální celulózą po 24 hodinách v PBS. K modifikaci této cévní náhrady byla použita bakteriální celulóza, která byla dodána z Royal institute of technology Stockholm. Tato bakteriální celulóza není

komerčně dostupná. Jelikož bylo obdrženo velmi malé množství bakteriální celulózy, tak v tomto případě nebylo možné použít peristaltickou pumpu. Vzorek cévní náhrady byl vložen do zkumavky s bakteriální celulózou a byl upevněn na třepače, kde se 24 hodin třepal. Po 24 hodinách byl vyjmut, vysušen a nafocen pomocí elektronového mikroskopu, na obrázku se jedná o prostřední snímek. Již na první pohled je vidět rozdíl mezi tímto snímkem a předešlými snímky. Bakteriální celulóza vytvořila vrstvu na vnitřní stěně cévní náhrady. Ta stejná vnitřní stěna cévní náhrady byla poté vložena do PBS a byla třepána po dobu 24 hodin v PBS. Po 24 hodinách došlo k neznatelnému vyplavení bakteriální celulózy, nedošlo k zakalení roztoku PBS. Z tohoto důvodu byla bakteriální celulóza vybrána pro testování s endotelovými buňkami a trombocyty.



Obr.20: SEM snímky PCL modifikovaného bakteriální nanocelulózou.

Při porovnání snímků z elektronového mikroskopu se jako nejlepší modifikace jeví případ, kdy byla použita bakteriální celulóza. I z tohoto důvodu byl tubulární vzorek s bakteriální celulózou vybrán pro testování trombogenicity. U této metody je nutné optimalizovat podmínky a zajistit reprodukovatelnost metody.

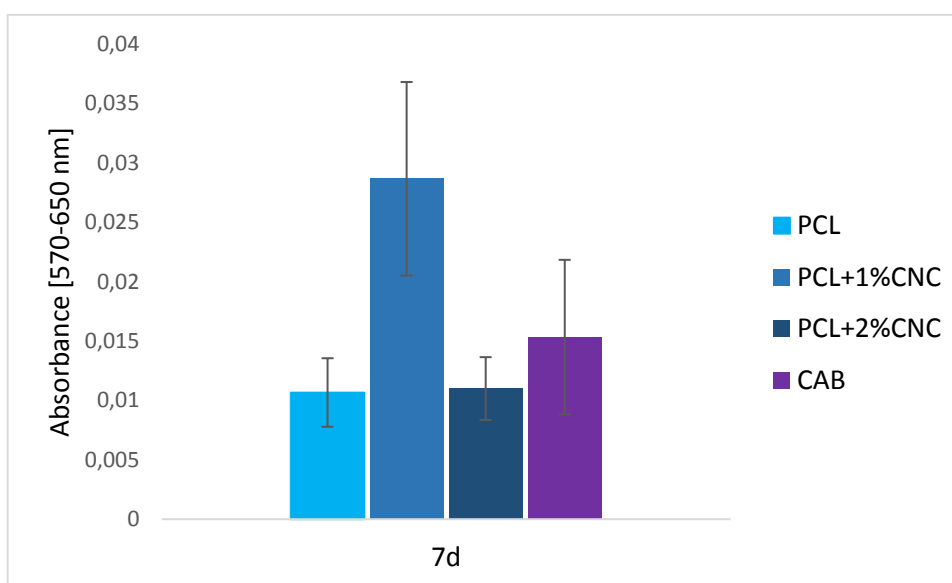
4.1.3 Biologické testování materiálů modifikovaných nanocelulózou

4.1.3.1 Testování materiálů modifikovaných nanocelulózou s endotelovými buňkami

Při testování *in vitro* byly použity endotelové buňky. Tyto buňky byly vybrány z toho důvodu, že tvoří vnitřní endotelovou výstelku cév. S endotelovými buňkami byly testovány elektrostaticky zvlákněné materiály PCL, PCL+1% CNC a PCL + 2% CNC, CAB. Tyto materiály byly testovány po 7 dnech kultivace. K testování byly vybrány materiály modifikované nanocelulózou s předpokladem, že modifikované materiály budou zlepšovat adhezi a proliferaci buněk

- MTT

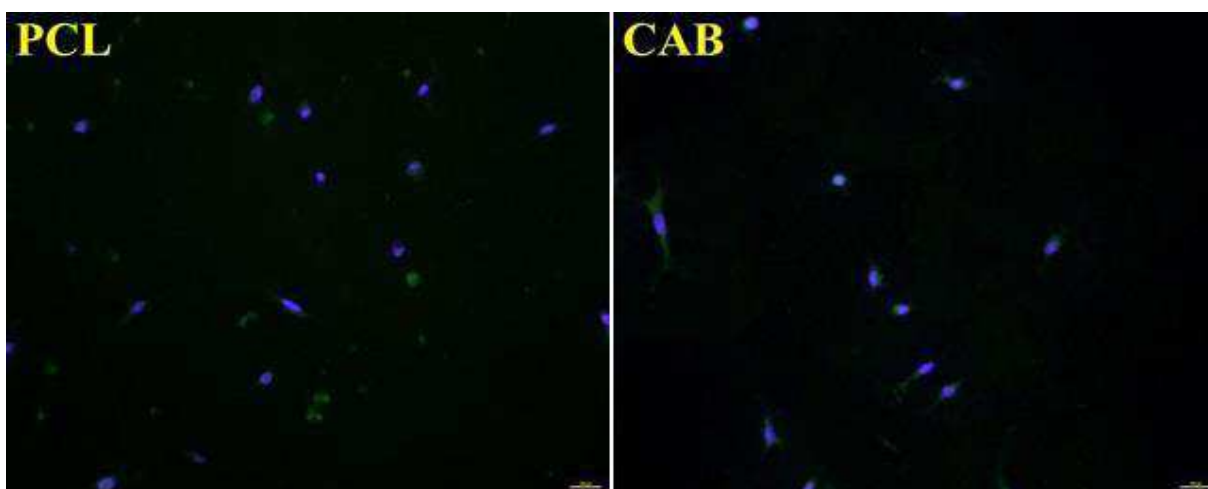
Buněčná viabilita u vzorků s nanocelulózou byla stanovována pomocí metabolického MTT testu po 7 dnech kultivace endotelových buněk s testovanými materiály. Naměřená absorbance všech vzorků byla velmi nízká. Nejlepších výsledků dosáhlo PCL s 1% CNC. Avšak viabilita endotelových buněk na PCL + 1% CNC byla výrazně nižší než hodnota pozitivní kontroly, kterou bylo dno testovací jamky (1,227), tato hodnota není zahrnuta v grafu. Všechny výsledky metabolického MTT testu jsou pod detekčním limitem této metody, a proto není možné se spolehlivě vyjádřit k získaným výsledkům. Výsledky MTT testu jsou vyobrazeny na Obr.21.



Obr.21: MTT test po 7 dnech kultivace endotelových buněk na elektrostaticky zvlákněných materiálech ($n=3$).

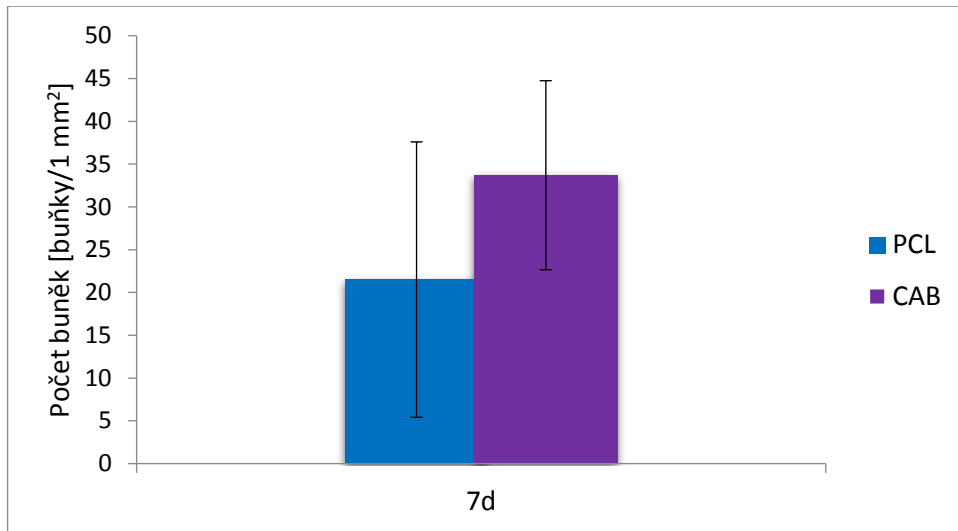
- Fluorescenční mikroskopie

Pomocí fluorescenčního mikroskopu byly zachyceny obarvené buňky na vzorcích. Vzorky byly obarveny pomocí DAPI a phaloidinu, kdy DAPI barví modře jádra buněk a phaloidin barví zeleně cytoplazmu buněk. vzorky modifikované CNC způsobovaly silnou autofluorescenci, proto nebylo možné odlišit buňky od pozadí a nebyla provedena kvantifikace buněk. PCL vrstva byla částečně pokryta zaoblenými malými buňkami. Na vrstvě CAB byly nalezeny malé částečně rozprostřené buňky, jak je vidět na *Obr.22*.



Obr.22: Endotelové buňky zachycené na elektrostaticky zvlákněných vrstvách zabarvené phaloidinem (zelené) a DAPI (modré) po 7 denní kultivaci. Zvětšení 200x.

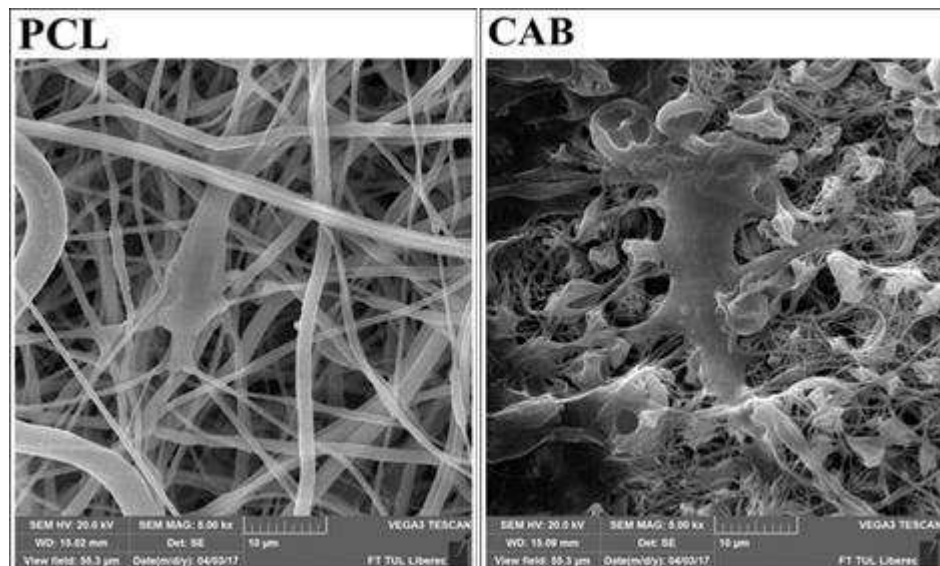
Pro porovnání počtu buněk na jednotlivých testovaných materiálech byla provedena kvantifikace buněčných jader na plochu 1 mm². Byla provedena automaticky pomocí softwaru MATLAB z 10-ti zorných polí zabarvených buněk pomocí DAPI. Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny na *Obr.23*. Při porovnání PCL a CAB se více endotelových buněk nacházelo na elektrostaticky zvlákněném CAB. Ovšem z tohoto měření není možné dělat jednoznačné závěry díky velkým odchýlkám v počtu buněk. Experiment by měl být zopakován s použitím jiných fluorescenčních barviv, které by neinteragovaly s materiály modifikovanými nanocelulózou a ve více testovaných časových intervalech.

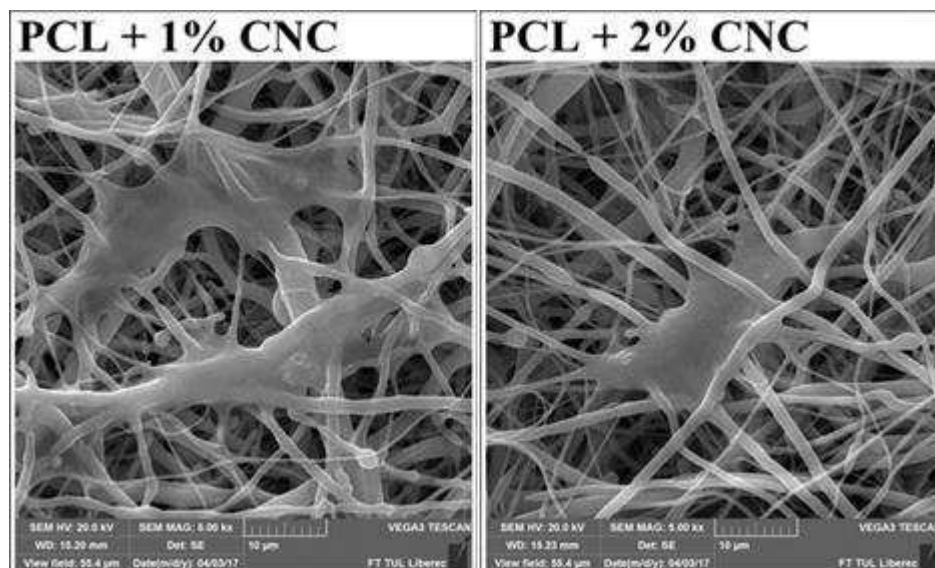


Obr.23: Počet buněk na elektrostaticky zvlákněném PCL a CAB spočítaný z obarvených jader endotelových buněk po 7 dnech kultivace (n=10).

- Skenovací elektronová mikroskopie

Analýza interakce buněk s materiály byla provedena pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Obrázky jsou znázorněny na Obr.24. Buňky kultivované na PCL scaffoldu byly po týdnu menší v porovnání s materiály modifikovanými přísádkem CNC, zejména u 1% CNC. Na elektrostaticky zvlákněném scaffoldu z CAB se rovněž vyskytovaly endotelové buňky, které zaujímaly větší plochu než na zvlákněném PCL.





Obr.24: Snímky SEM endotelových buněk na testovaných materiálech po 7 dnech kultivace, měřítko 10 μm .

Tento experiment zahrnoval testování PCL, PCL s přídavkem nanokrytalické celulózy a celulózy acetátu butyrátu s endotelovými buňkami. Viabilita endotelových buněk byla u všech vzorků velice nízká, počet buněk na vzorcích byl velmi malý až neměřitelný. Vliv nanocelulózy na proliferaci buněk se neprojevil a je třeba hledat jiné způsoby zlepšení vlastností materiálů. Je možné, že nanokrytalická celulóza je uvnitř materiálu, a tudíž nemá žádný vliv na adhezi a proliferaci buněk. Zajímavé je, že přítomnost 1 % CNC se zdá být lepší než přídavek 2 % CNC. Na druhou stranu byl otestován omezený počet vzorků a bylo by dobré tomuto materiálu věnovat víc pozornosti. A na základě těchto výsledků by bylo dobré zopakovat testování těchto materiálů s dalšími buněčnými liniemi (fibroblasty, hladkosvalové buňky).

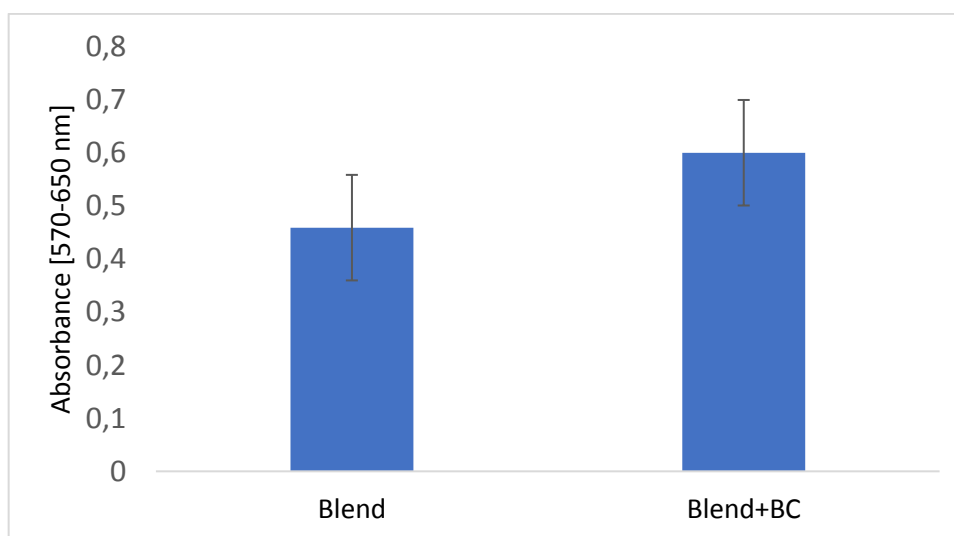
V případě elektrostaticky zvlákněného CAB by bylo vhodné vyzkoušet experiment znovu po optimalizaci složení roztoku a procesních podmínek po vytvoření homogenní vlákněné vrstvy. Nicméně podle míry rozprostření buněk se zdá, že chemické složení materiálu je vyhovující.

4.1.3.2 Testování trombogenicity modifikovaných tubulárních vzorků

K testování trombogenicity byly použity modifikované tubulární vzorky bakteriální celulózy a samotný blend. Trombogenicita těchto materiálů byla hodnocena po dvou hodinách inkubace materiálů se suspenzí trombocytů. K hodnocení trombogenicity materiálů byl použit metabolický test MTT a skenovací elektronová mikroskopie.

- MTT

Výsledky metabolické aktivity trombocytů jsou shrnuty na *Obr.25*. U tubulárního blendu byla naměřena absorbance o hodnotě $0,5 \pm 0,1$. (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka). U tubulárního blendu modifikovaného bakteriální celulózy došlo k mírnému zvýšení metabolické aktivity trombocytů na hodnotu $0,6 \pm 0,14$. Tento nárůst aktivity trombocytů zřejmě souvisí s větším měrným povrchem bakteriální celulózy.

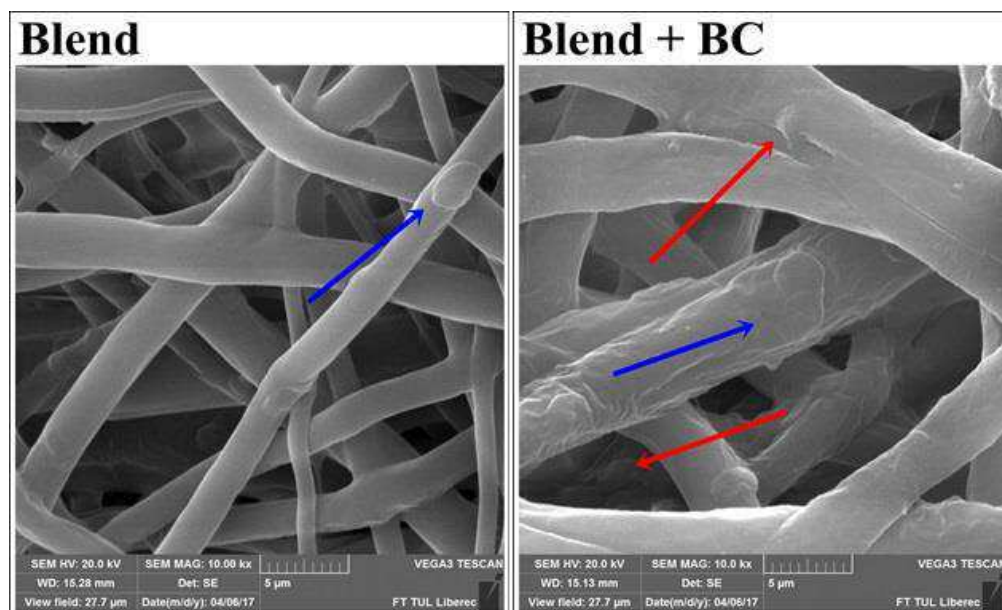


Obr.25: Metabolická aktivita trombocytů měřená pomocí MTT testu po dvou hodinové inkubaci materiálů se suspenzí trombocytů.

- Skenovací elektronová mikroskopie

Snímky z elektronové mikroskopie ukazují morfologii krevních destiček, která je silně závislá na jejich aktivaci. Mikrovláknitý blend obsahoval krevní destičky převážně v klidovém stavu bez jakýchkoliv výběžků. Vrstva modifikovaná bakteriální celulózy obsahovala kromě krevních destiček v klidovém stádiu i částečně

rozprostřené destičky. Na snímcích SEM nebyla patrná struktura bakteriální celulózy. Snímky SEM jsou zobrazeny na *Obr.26*.



Obr.26: SEM snímky trombocytů po dvou hodinové inkubaci s testovanými materiály, červené šipky značí aktivované rozprostřené trombocyty a modré šipky značí trombocyty v klidovém stadiu, měřítko 5 µm.

Pro testování trombogenicity byl použit blend modifikovaný bakteriální celulózą. Jak je vidět z výsledků metabolického MTT testu modifikace blendu nanocelulózą vedla k mírnému zvýšení aktivace trombocytů pravděpodobně díky zvýšení měrného povrchu a tím i kontaktu trombocytů s testovaným materiálem. Na snímcích z elektronového mikroskopu už však není patrná vrstva bakteriální celulózy.

4.2 Modifikace materiálů polydopaminem a heparinem

Malopřůměrové cévní náhrady byly vyráběny metodou elektrostatického zvlákňování z biodegradabilních polyesterů. Pro zlepšení adheze endotelových buněk byla vnitřní vrstva cévní náhrady modifikována vrstvou polydopaminu. A za účelem snížení trombogenicity cévní náhrady byl na polydopamin navázán heparin. K imobilizaci heparinu byly použity tři metody: dip-coating PDA v roztoku heparinu; kovalentní připojení heparinu s využitím karbodiimidové chemie; přímá inkorporace heparinu při polymeraci dopaminu. Takto připravené materiály byly otestovány pomocí aPTT na přítomnost navázaného heparinu.

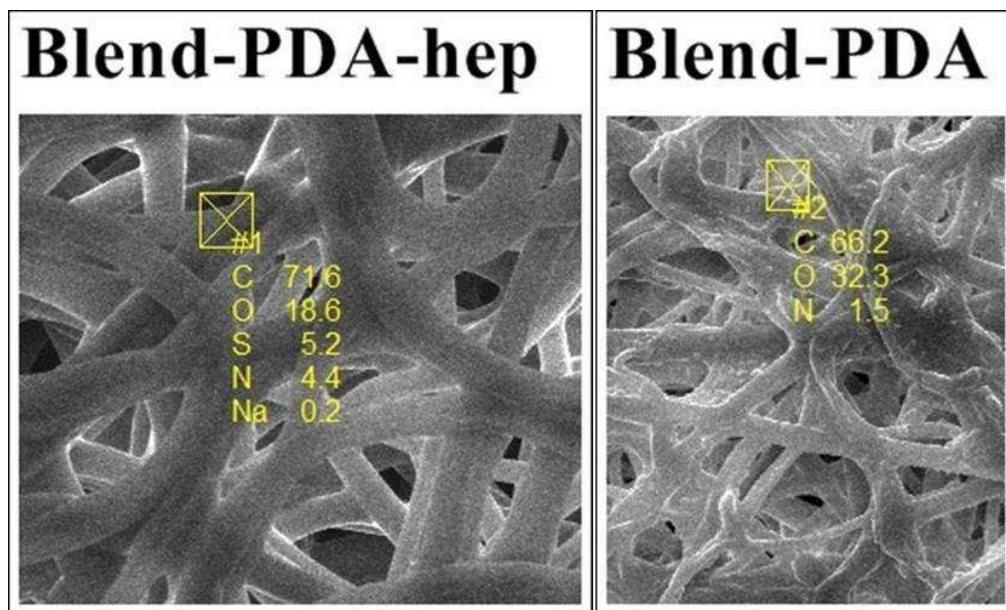
Podle průběžných výsledků měření koagulačního času pomocí aPTT vyplynulo, že metoda dip coating není vhodná pro imobilizaci heparinu na povrch materiálu, a to z toho důvodu, že neumožňuje jeho navázání v dostatečném množství. Daleko úspěšnější bylo kovalentní navázání heparinu pomocí N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid/N-hydroxysukcinimid (EDC/NHS) aktivovaného esteru. Avšak pro svou jednoduchost, časovou nenáročnost byla upřednostněna přímá kopolymerace heparinu při polymeraci polydopaminu. Tento postup je nejenom reprodukovatelný, ale zároveň dovoluje řídit množství obsaženého heparinu v závislosti na reakčním čase a koncentraci polymeračního roztoku.

4.2.1 Charakterizace modifikovaných materiálů polydopaminem a heparinem

Modifikované materiály byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie a analýzy energy disperse X-ray spectroscopy (EDX). Pomocí analýzy EDX bylo stanoveno zastoupení prvků v modifikované vrstvě. Snímky jsou na *Obr.27*. Při EDX analýze prvků bylo na vrstvě modifikované polydopaminem nalezeno 64 % uhlíku, 30,6 % kyslíku a 5,4 % dusíku. Přítomnost dusíku v modifikované vrstvě značí přítomnost polydopaminu.

EDX analýza strukturních prvků byla provedena i na vrstvě modifikované polydopaminem a heparinem. EDX analýza nepodává informace o množství heparinu na vlákně vrstvě, jedná se o důkaz přítomnosti heparinu. Na této vrstvě bylo nalezeno 71,6 % uhlíku, 18,6 % kyslíku, 5,2 % síry, 4,4 % dusíku a 0,2 % sodíku. Přítomnost dusíku značí přítomnost polydopaminu a přítomnost sodíku a síry značí přítomnost heparinu v modifikované vrstvě.

Ke zjištění množství navázaného heparinu byla také využita metoda Toluidine Blue a anti-Xa assay, obě tyto metody nebyly úspěšné, a proto zde nejsou podrobněji zmiňovány.



Obr.27: Detail snímků SEM modifikovaných vrstev s EDX analýzou prvků.

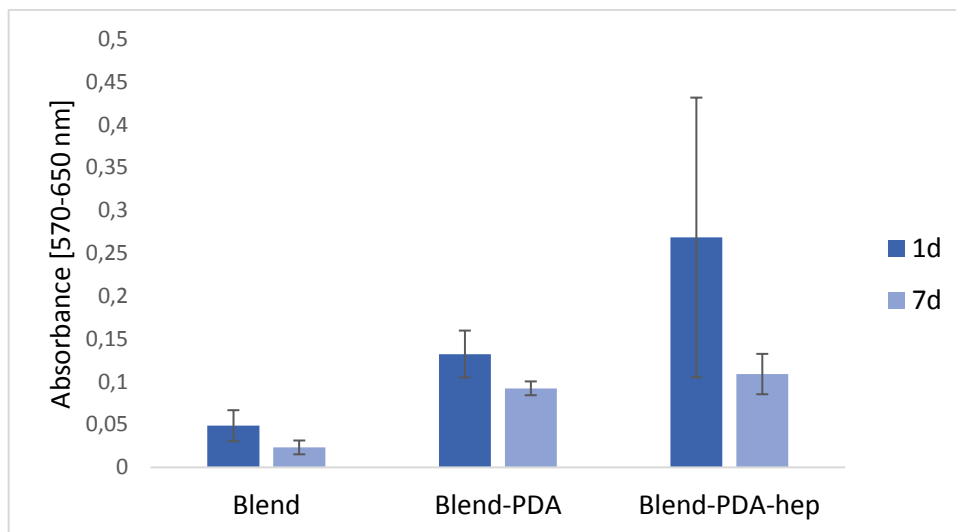
4.2.2 Testování modifikovaných materiálů PDA a heparinem s endotelovými buňkami

S endotelovými buňkami byl testován samotný blend, blend s polydopaminem a blend modifikovaný polydopaminem a heparinem. Modifikované materiály byly testovány po 1 a 7 dnech kultivace. K testování byla použita pasáž číslo 7. Při tomto testování byl předpoklad, že polydopamin a heparin zlepší vlastnosti materiálů a tím i adhezi a proliferaci endotelových buněk.

- MTT

Viabilita endotelových buněk byla stanovena po 1 a 7 dnech inkubace buněk s blendem a modifikovanými vrstvami. Naměřená absorbance, která odráží viabilitu buněk, byla v obou testovacích dnech velmi nízká. Většinou to bylo způsobeno vysokou absorbancí u negativních kontrol (vzorky inkubované pouze v přítomnosti kompletního média) modifikovaných vzorků Blend-PDA a Blend-PDA-hep, kdy byla absorbance v rozmezí 0,3-0,6. Hodnota negativních kontrol byla od naměřených absorbancí odečtena, aby byla získána skutečná hodnota viability buněk. Výsledky MTT testu jsou shrnuty na Obr.28. Vysoká hodnota absorbancí u negativních kontrol byla způsobená interakcí MTT testu s materiálem modifikovaným polydopaminem. Tento experiment

bude v budoucnu zopakován s využitím kitu CCK-8, který neinteraguje s modifikací pomocí polydopaminu.



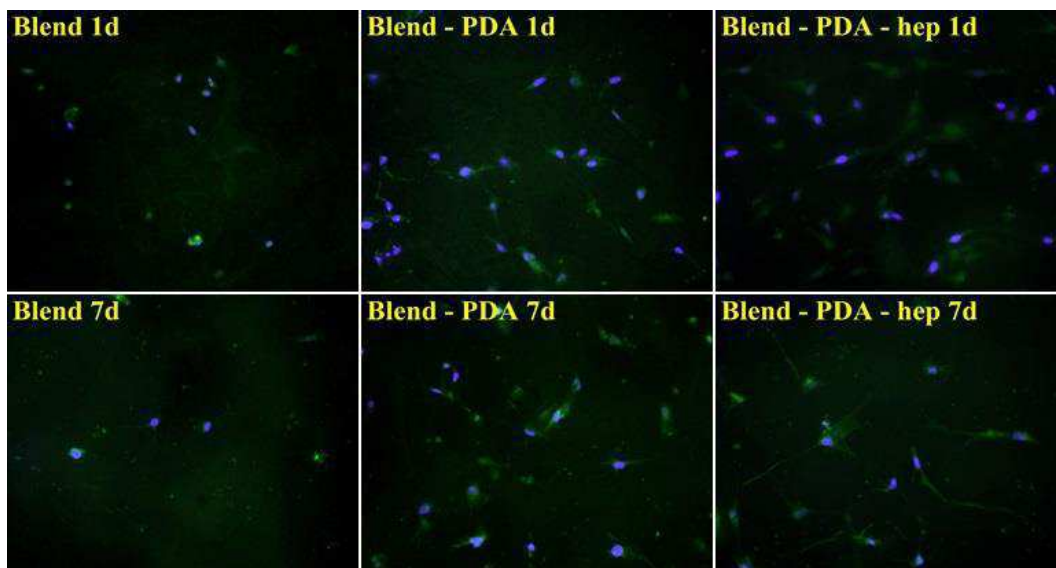
Obr.28: MTT test po 1 a 7 dni kultivace endotelových buněk s modifikovanými materiály (n=3).

První den po nasazení byla životaschopnost buněk vyšší u modifikovaných vzorků oproti samotnému blendu. A u materiálu blend-PDA-hep byla měřena vysoká směrodatná odchylka. Po týdnu kultivace se ve všech vzorcích snížila viabilita buněk, zřejmě protože endotelové buňky mohou snadno přejít do stavu senescence. Každopádně i po snížení byla viabilita buněk vyšší u modifikovaných vzorků než u samotného blendu.

Získané výsledky však mohou být ovlivněny interakcí MTT testu s modifikací polydopaminem, proto bude experiment zopakován s vhodnějším kitem pro měření viability endotelových buněk, který v době testování nebyl k dispozici.

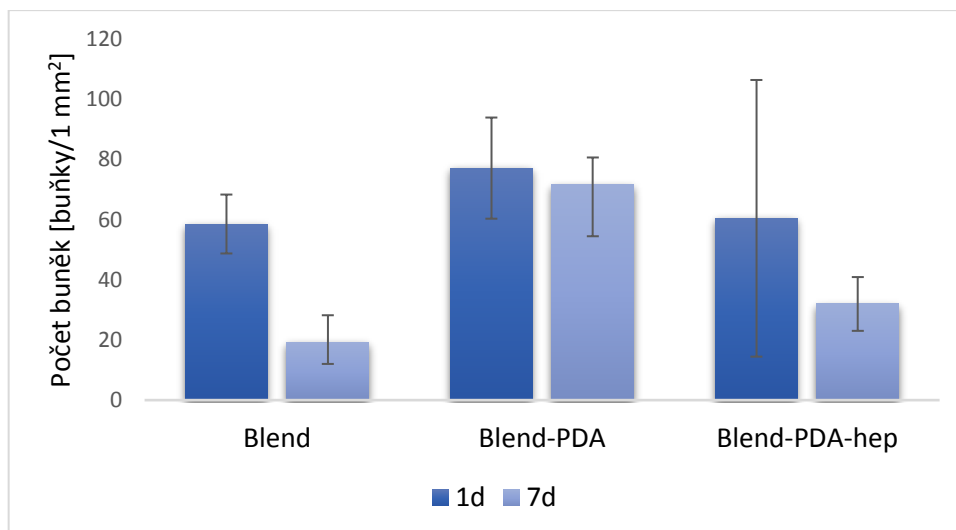
- Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie byla použita i v případě vizualizace endotelových buněk na materiálech modifikovaných polydopaminem a heparinem. Zachycené snímky jsou na Obr.29. Ve vrstvách s polydopaminem (blend-PDA, blend-PDA-hep) byly buňky více rozprostřeny než na samotném elektrostaticky zvlákněném blendu. I po týdnu kultivace si endotelové buňky zachovaly svůj tvar. U nemedifikovaných materiálů byla vidět modrá jádra buněk a téměř žádná cytoplazma. Na modifikovaných materiálech se nacházely buňky s větším podílem cytoplazmy okolo buněčného jádra (blend-PDA, blend-PDA-hep)



Obr.29: Endotelové buňky zachycené na testovaných materiálech zabarvené phaloidinem (zelené) a DAPI (modré) po 1 dnu a 7 dnech kultivace. Zvětšení 200x.

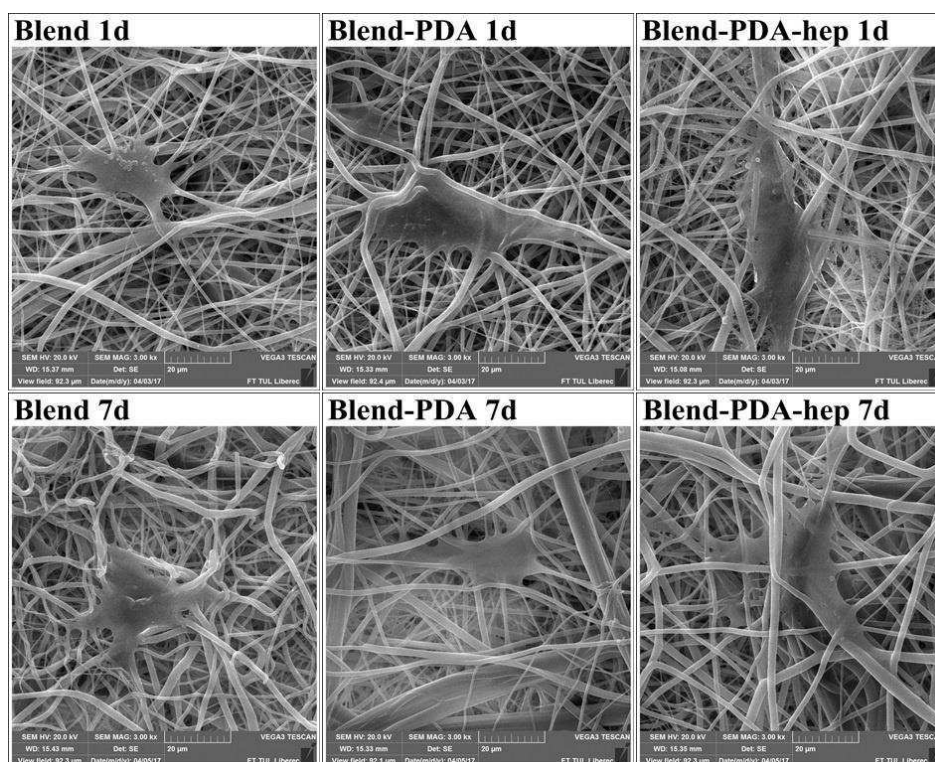
Kvantifikace buněčných jader na plochu 1 mm² byla automaticky provedena z obrázků buněk obarvených pomocí DAPI. Výsledky jsou znázorněny na *Obr.30*. Zde je vidět, že počet buněk klesá na blendu, což je v souladu s výsledky MTT testu i snímky z fluorescenčního mikroskopu. Ve vzorcích modifikovaných polydopaminem (blend-PDA) zůstal počet buněk téměř stejný po celou dobu experimentu. Vrstvy modifikované polydopaminem a heparinem vykazovaly po týdnu kultivace pokles počtu buněk. Životaschopnost endotelových buněk byla nicméně vyšší u modifikovaných vzorků než ve směsi polyesterů. Navíc u vrstvy modifikované polydopaminem a heparinem byla první den pozorována vysoká směrodatná odchylka kvůli nehomogenitě distribuce buněk na povrchu scaffoldu, což může svědčit o nehomogenním pokrytí vrstvy heparinem.



Obr.30: Počet buněk spočítaný z obarvených jader buněk po 1 a 7 dnech kultivace (n=20).

- Skenovací elektronová mikroskopie

I u materiálů modifikovaných polydopaminem a heparinem byla provedena analýza buněčné interakce s materiály pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Na vrstvách modifikovaných PDA a PDA-hep došlo k většímu rozprostření buněk. Endotelové buňky na samotném blendu byly menší a obsahovaly malé kuličky na svém povrchu nebo v těsném okolí buněk. Snímky jsou uvedeny na Obr.31.



Obr.31: Snímky SEM endotelových buněk na testovaných materiálech, měřítko 20 μm .

Elektrostaticky zvlákněné vzorky modifikované polydopaminem a polydopamin-heparinem byly testovány *in vitro* s endotelovými buňkami. Předpokladem tohoto testování bylo zvýšení jejich proliferace. Ovšem při testování nedošlo ke zvýšení proliferace, počet buněk na modifikovaných materiálech zůstal spíše konstantní. Zároveň byl předpoklad, že přítomnost heparinu podpoří viabilitu buněk. Výsledky testů ukázaly zvýšenou viabilitu při kultivaci buněk na vrstvě obsahující polydopamin a heparin. Materiál modifikovaný polydopaminem zlepšuje adhezi endotelových buněk. I během týdenní kultivace došlo k velmi nepatrnému zvýšení počtu buněk na vzorku. K potvrzení vlivu přítomnosti heparinu na endotelové buňky bylo ještě provedeno testování na cytotoxicitu heparinu. V budoucnosti bude nutné provést experimenty umožňující kvantifikaci navázaného heparinu na ploše povrchu a kontrolu homogenity pokrytí heparinem.

Při nahlédnutí do literatury (*Ding, 2015*) bylo zjištěno, že viabilita endotelových buněk na materiálech modifikovaných heparinem a polydopaminem je většinou stanovována pomocí kitu CCK-8. Navíc je používána i rozdílná doba kultivace materiálů s endotelovými buňkami. V našem případě byly materiály s buňkami kultivovány 1 a 7 dní, ovšem literatura uvádí kultivaci trvající 1 a 3 dny. Pokud porovnáme výsledky naše a *Ding et al.* v článku je uvedeno, že první den viabilita buněk byla na vzorku modifikovaném jen PDA a vzorku modifikovaném PDA a heparinem stejná, rozdíl ve viabilitě buněk byl viditelný až 3 den kultivace. Po 3 dnech kultivace byla viabilita endotelových buněk vyšší u vzorků s PDA a heparinem. V našem experimentu byla viabilita buněk první den na vzorcích s PDA a PDA-heparin rozdílná a 7 den kultivace byl rozdíl nepatrný, ovšem viabilita byla opět vyšší u vzorku s PDA a heparinem.

Ovšem v jiné literatuře (*Yao, 2014*) používají rovněž MTT test pro stanovení viability buněk, ale stejně jako v předešlém případě zvolili jinou dobu kultivace než my. Yao et al. testoval buněčnou viabilitu buněk po 1,2 a 3 dnech kultivace. V tomto případě opět vyšší viability dosahovaly vzorky modifikované PDA a heparinem a s rostoucí dobou kultivace rostlo i množství buněk na vzorcích.

Z důvodů těchto rozdílů by bylo dobré zopakovat experiment s kitem CCK-8 a se stejnou dobou kultivace jako je uvedena ve článku a zopakovat MTT test s jinou dobou kultivace.

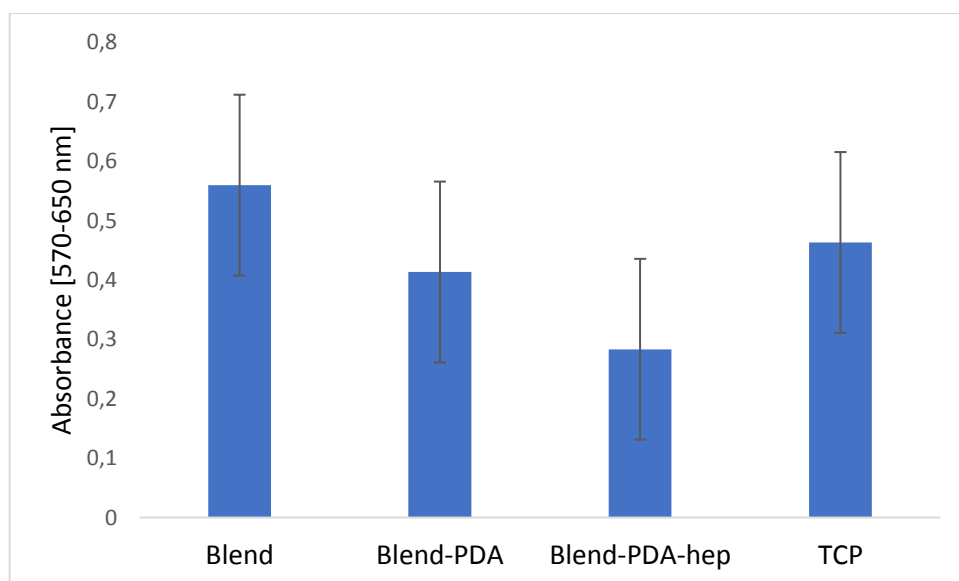
4.2.3 Testování trombogenicity modifikovaného blendu PDA a heparinem

Testování trombogenicity modifikovaného blendu PDA a heparinem bylo provedeno za účelem zjištění jak polydopamin a heparin působí na trombocyty a zda třeba snižují trombogenicitu materiálu.

K testování trombogenicity byly použity modifikované materiály blend-PDA, blend-PDA-hep a samotný blend. Trombogenicita těchto materiálů byla hodnocena po dvou hodinách inkubace materiálů se suspenzí trombocytů. K hodnocení trombogenicity materiálů byl použit metabolický test MTT a skenovací elektronová mikroskopie.

- MTT

Metabolická aktivita trombocytů byla měřena pomocí MTT testu po dvou hodinové inkubaci materiálů se suspenzí trombocytů. Absorbance byla měřena jako rozdíl hodnot při 570 nm a 650 nm, po odečtení průměrné absorbance negativních kontrol. Výsledky MTT testu jsou znázorněny na *Obr.32*.



Obr.32: Metabolická aktivita trombocytů měřená pomocí MTT testu po dvou hodinové inkubaci materiálů a kontroly (TCP) se suspenzí trombocytů.

Při tomto experimentu bylo potvrzeno, že vlákenné materiály mají díky velkému měrnému povrchu vysoké trombogenní vlastnosti. Elektrostaticky zvlákněný blend, který je tvořen vlákny o rozměrech jednotek mikrometrů vykazoval vyšší aktivitu trombocytů (absorbance $0,6 \pm 0,15$) než modifikované materiály. Ke snížení aktivity

trombocytů přispěla modifikace blend polydopaminem, zde byl pozorován pokles absorbance na $0,4 \pm 0,08$. K ještě většímu poklesu aktivity trombocytů došlo na blendu modifikovaném polydopaminem a heparinem, kdy absorbance dosahovala hodnoty $0,3 \pm 0,13$.

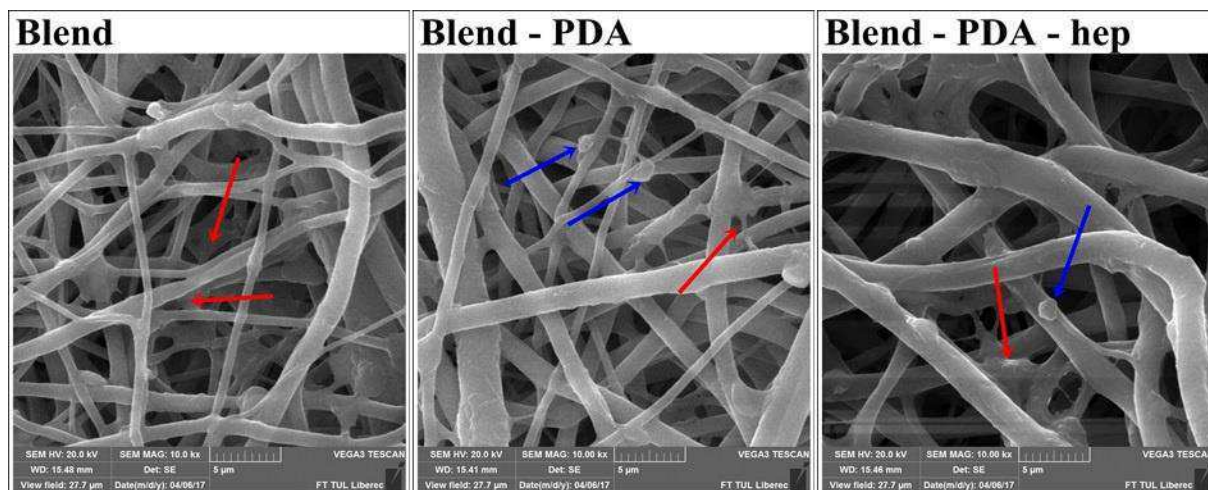
Došlo však k tomu, že vrstvy modifikované polydopaminem tvořily po inkubaci s Composelem a roztokem MTT fialové krystaly, a to i bez přítomnosti trombocytů, hodnota absorbance byla tedy upravena odečtením hodnot negativních kontrol. K tomuto jevu došlo i u testování materiálů s endotelovými buňkami. A naměřená absorbance na hladkém kontrolním plastiku byla okolo 0,5.

- Skenovací elektronová mikroskopie

Snímky z elektronové mikroskopie ukazují morfologii krevních destiček, ta je silně závislá na jejich aktivaci. V klidovém stavu jsou destičky kulaté a mají průměr okolo 7 μm . Při aktivaci dochází ke změně tvaru destiček, destičky vysílají výběžky a rozprostírají se na povrchu materiálu.

Na nanovlákněných materiálech jsou obvykle pozorovány aktivované a rozprostřené trombocyty na povrchu materiálů, což neodpovídalo ani jednomu s testovaných materiálů.

Mikrovlákněný blend obsahoval krevní destičky převážně rozprostřené ve vnitřní struktuře materiálu. Vrstvy modifikované polydopaminem a polydopaminem a heparinem obsahovaly krevní destičky v různých stádiích aktivace od kulatých (modré šipky v Obr.33) až po rozprostřené (červené šipky v obrázku) *Obr.33*. Bylo zjištěno, že mikrovlákněné materiály aktivují krevní destičky méně než vrstvy s menšími průměry vláken. To zjištění bylo ověřeno v jiné diplomové práci (Havličková, 2017). A ke snížení aktivace krevních destiček přispívá modifikace vláken vrstvou polydopaminu a polydopaminu a heparinu.



Obr.33: SEM snímky trombocytů po dvou hodinové inkubaci s testovanými materiály, červené šipky značí rozprostřené trombocyty, modré šipky značí trombocyty v klidovém stadiu, měřítko snímků 5 μ m.

Při tomto experimentu došlo k potvrzení hypotézy, že modifikace vláken vrstvou polydopaminu a polydopaminu s heparinem vede ke snížení aktivace krevních destiček.

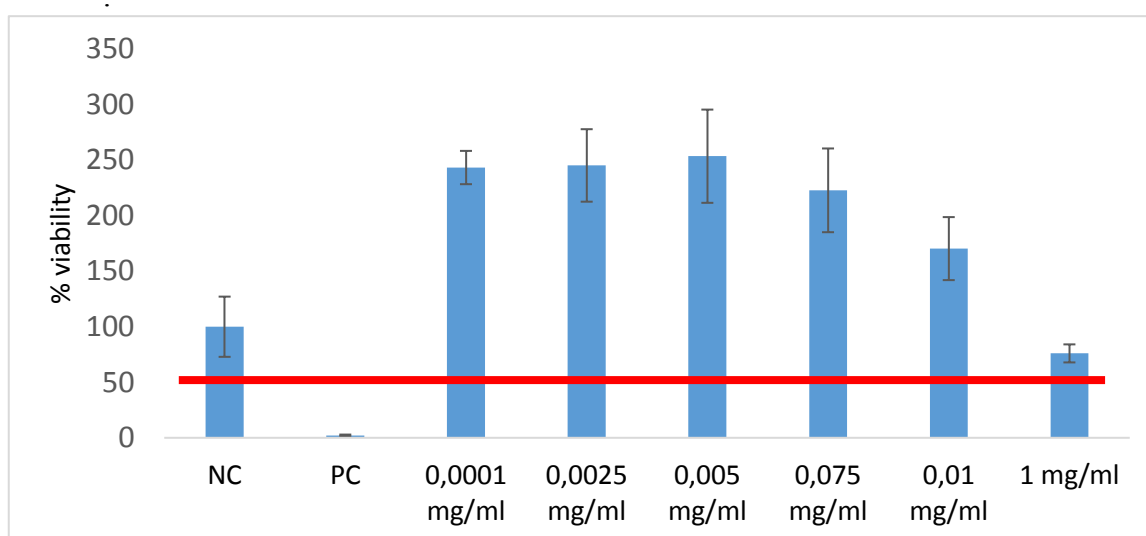
Stejného výsledku dosáhli i v literárních zdrojích (Yao, 2014; Liu, 2008), kde dokazují, že modifikace povrchu heparinem výrazně snižuje adhezi a aktivitu krevní destiček, a to zřejmě v důsledku odpuzování nábojů. Yao *et al.* tvrdí, že modifikací heparinem došlo ke vzniku negativního náboje na vzorku a jelikož jsou trombocyty také negativně nabitě, dochází vlastně k odpuzování stejně nabitých povrchů a tím i ke snížení aktivity trombocytů.

Při porovnání trombogenicity u vzorků jen s PDA a vzorků s PDA a heparinem bylo dosaženo stejných výsledků jako v článku (Gao, 2014; Pan, 2016). Kde při testování materiálu jen s PDA došlo ke zvýšení adheze a aktivity krevních destiček na materiál. A při testování vzorků s PDA a heparinem došlo ke snížení aktivity a adheze trombocytů na materiál. Všechny tyto výsledky jednoznačně ukazují, že heparin snižuje aktivitu krevní destiček a zároveň snižuje i jejich adhezi.

4.2.4 Testování vlivu účinku heparinu na endotelové buňky

Metabolická aktivita endotelových buněk po inkubaci s roztoky heparinu v médiu o různých koncentracích byla testována pomocí MTT testu podle normy ISO 10993, výsledky jsou uvedeny v Obr.34. Z Obr.34 je patrné, že přítomnost heparinu v médiu měla jednoznačně pozitivní vliv na metabolickou aktivitu endotelových buněk v rozmezí koncentrací 0,0001 – 0,01 mg/ml. Při použití koncentrací 0,0001 – 0,005

mg/ml došlo k nárůstu metabolické aktivity buněk cca o 150 % oproti buňkám v médiu. Nejvyšší testovaná koncentrace 1 mg/ml způsobovala mírnou inhibici viability, ale nepůsobila cytotoxicky. Dle použité normy ČSN ISO 10993-5 je stanoveno cytotoxické působení při poklesu viability na 70 %. Z toho vyplývá, že přídavek heparinu v koncentracích 0,01-0,0001 mg/ml do materiálů by tedy měl jednoznačně podporovat proliferaci endotelových buněk. V provedeném experimentu nebyly tyto účinky spolehlivě prokázány, vrstva heparinu mohla být nehomogenně navázána. Budou provedeny další experimenty zajišťující rovnoměrné a stabilní pokrytí povrchu vláknenného materiálu.



Obr.34: Buněčná viabilita po 24 hodinové inkubaci endotelových buněk s médiem (NC), s médiem obsahujícím Triton X-100 (PC) a roztoky heparinu v různých koncentracích měřená pomocí metabolického MTT testu (n=12). Červená čára značí limit cytotoxického působení daný normou ISO 10993-5.

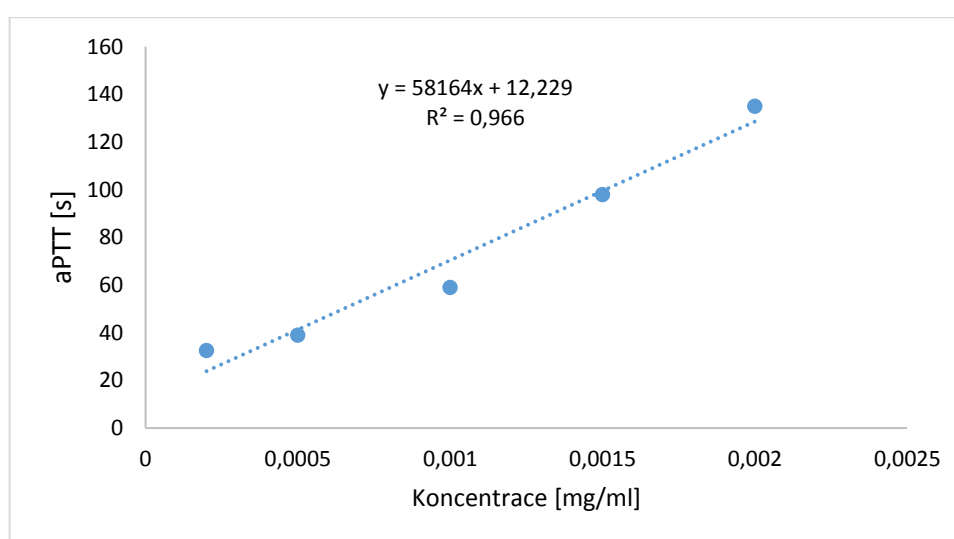
4.2.5 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas byl použit ke zjištění koncentrace navázaného heparinu na materiálech. Koncentrace heparinu byla zjišťována pomocí sestavení kalibrační křivky a poměření závislosti aPTT na koncentraci heparinu. Naměřené hodnoty aPTT daných koncentrací v Tab.4. K měření aktivovaného protrombinového času byla použita kalibrační křivka v rozmezí 1 – 0,005 mg/ml. Ovšem koncentrace 1 mg/ml byla na automatické koagulačním analyzátoru neměřitelná, tato hodnota byla nad mezí detekce přístroje.

Tab.4: Naměřené hodnoty aPTT daných koncentrací.

	Koncentrace [mg/ml]	aPTT [s]
1	0,002	135,06
2	0,0015	98
3	0,001	59
4	0,0005	39,03
5	0,0002	32,5

Z těchto naměřených dat byla sestrojena kalibrační křivka a z rovnice regrese byla vypočítána koncentrace navázaného heparinu ve vzorcích.



Obr.34: Kalibrační křivka koncentrace heparinu.

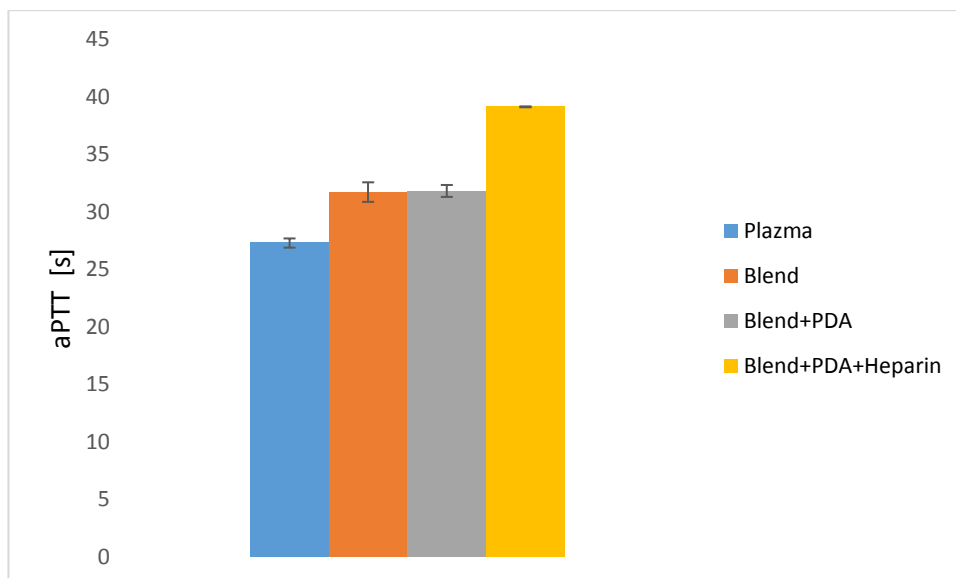
Koncentrace heparinu byla zjišťována z PBS, do kterého byly vzorky různou dobu vytřepávány. Výsledné koncentrace heparinu uvolněného do PBS jsou shrnuty v Tab.5. Množství heparinu bylo nakonec přepočítáno na plochu vzorku, který byl vytřepáván v PBS. K testování byly použity kruhové vzorky o průměru 15 a 6 mm. Vzorky o průměru 15 mm byly testovány také s endotelovými buňkami, a doba inkubace byla zvolena stejně jako u endotelových buněk. Vzorky o průměru 6 mm byly použity na testování s trombocyty a dvou hodinová inkubace byla použita, protože inkubace materiálů s trombocyty trvala také dvě hodiny. Při pohledu do Tab.5 je možné porovnat naměřené koncentrace u 15 mm a 6 mm vzorků, pokud je koncentrace vyjádřena v mg/ml, rozdíly mezi naměřenými koncentracemi nejsou tak výrazné. Ovšem při přepočítání koncentrace na plochu je možné vidět, že u vzorku o průměru 6 mm po dvou hodinách vytřepávání je koncentrace heparinu 2,11 ug/cm². Dochází zřejmě k nerovnoměrnému pokrytí povrchu heparinem nebo k nestejnomyernému uvolňování

heparinu do roztoku. Tento experiment byl použit pro ověření účinků modifikace materiálu heparinem. Cílem nebylo testovat finálně vytvořené materiály, šlo pouze o mezikrok při vývoji materiálu. Nestejnoměrné výsledky poukázaly na to, že je třeba hledat jiné cesty navázání heparinu, například vyzkoušet kovalentní připojení heparinu či zvýšit jeho koncentraci. Zároveň je zde vidět, že nejvíce heparinu bylo uvolněno během prvních dvou hodin. Ovšem problémem u této metody je její reprodukovatelnost, již je nutné zajistit do budoucna.

Tab.5: Přehled naměřených koncentrací heparinu na vzorcích.

Vzorky	Čas	aPTT [s]	Koncentrace heparin [mg/ml]	Množství heparinu [ug/cm ²]
15 mm	1.den	39,1444	0,000463	0,261582
	7.den	32,866	0,0003639	0,200565
6 mm	2 hodiny	184,52	0,0005924	2,115828
	7 den	49,72	0,0001288	0,36837

Při měření aPTT byla proměřována čistá plazma bez přídavku PBS, blend a dále modifikovaný blend s polydopaminem a blend s polydopaminem a heparinem. Tyto vzorky byly v PBS vytřepávány 2 hodiny/ 1 den/ 7 dní. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a jsou uvedeny v obrázku i se směrodatnými odchylkami. Jak je vidět z *Obr.35* nejvyšší aPTT vykazuje modifikovaný blend s PDA a heparinem a nejnižší aPTT plazma. Při měření aPTT byla použita čistá plazma bez přídavku PBS. Mírný vzestup hodnot aPTT u blendu a blendu s PDA může být zapříčiněn přidáním PBS ke vzorku.



Obr.35: Porovnání naměřeného aPTT u plazmy, blendu, blend-PDA, blend-PDA-hep. Vzorky byly proměřeny po 24 hodinách inkubace ($n=3$). Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a jsou uvedeny v obrázku i se směrodatnými odchylkami.

Při porovnání hodnot aPTT polydopaminu s literaturou (Yang, 2012; Ding, 2015; Pan, 2016) bylo zjištěno, že polydopamin nevykazuje žádné aktivní antikoagulační vlastnosti, jelikož nijak výrazně neprodlužuje koagulační čas aPTT ve srovnání se vzorkem blendu. Stejný výsledek zaznamenal i Ding *et al.*, kde vrstva modifikovaná polydopaminem neměla žádný vliv na prodloužení koagulačního času, na rozdíl od vrstvy modifikované PDA a heparinem. V článkách je uvedeno, že vrstva modifikovaná PDA a heparinem prodloužila koagulační čas o 20 sekund v porovnání s vrstvou s PDA. V našem případě vzorek modifikovaný PDA a heparinem prodloužil koagulační čas cca o 10 sekund. Časový rozdíl je zřejmě způsoben odlišným způsobem navázání heparinu, jelikož Ding *et al.* před samotnou imobilizací heparinu vzorek potáhl polydopaminem s polyethyleniminem.

5. Závěr

Tato práce řešila problém nedostatečné endotelizace a zároveň přílišné trombogenicity maloprůměrové cévní náhrady. Tento problém byl řešen ve dvou fázích a to modifikací cévní náhrady nanocelulózou kvůli zlepšení buněčné adheze a modifikací heparinem, který zajišťoval snížení trombogenicity.

Pro modifikaci byla použita maloprůměrová cévní náhrada o průměru 4 mm vyrobená na Technické univerzitě v Liberci. Tato cévní náhrada byla vyrobena elektrostatickým zvlákněním polykaprolaktonu a kopolymeru polylaktidu a polykaprolaktonu. Takto vyrobená cévní náhrada byla poté modifikována.

První část diplomové práce se zabývá modifikací maloprůměrové cévní náhrady nanocelulózou. Úkolem bylo modifikovat vnitřní stranu cévní náhrady několika druhy nanocelulózy (CNC, CNF, BC) za účelem zvýšení adheze endotelových buněk. K modifikaci byly použity komerčně dostupné nanocelulózy, ale i bakteriální celulóza vyvíjená v Royal institute of technology ve Stockholmu. Modifikace cévní náhrady probíhala za použití peristaltické pumpy. Takto modifikované materiály byly dále testovány s endotelovými buňkami a trombocyty. Při těchto experimentech bylo dosaženo slibných výsledků, je však důležité optimalizovat podmínky při kterých docházelo k modifikaci a zároveň zajistit reprodukovatelnost metody.

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na modifikaci cévní náhrady pomocí polydopaminu a heparinu. Jako nejúčinnější způsob modifikace materiálů byla zvolena přímá inkorporace heparinu při polymeraci polydopaminu. Tento postup se osvědčil v možnosti reprodukce, a navíc dovoluje řídit množství obsaženého heparinu v závislosti na reakčním čase a koncentraci polymeračního roztoku. Modifikované materiály polydopaminem a heparinem byly dále testovány *in vitro* s endotelovými buňkami a s trombocyty. Po *in vitro* testování následovalo testování vlivu účinku heparinu na endotelové buňky a testování koagulačního času. Při testování materiálů modifikovaných polydopaminem a heparinem byly získány velmi slibné výsledky, díky kterým bude výzkum a vývoj v modifikaci maloprůměrové cévní náhrady pokračovat nadále.

V blízké budoucnosti bude vyzkoušeno i kovalentní navázání heparinu na polydopamin a tyto dvě metody budou porovnány mezi sebou. Dále je nutné vyzkoušet

kvantifikaci navázaného heparinu jiným způsobem než měřením koagulačního času. Další metoda, které je naplánována do budoucna je navázání heparinu na OH skupiny nanocelulózy.

Zdroje

- ABEER, M.M., MOHD, A., MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2014, **2014**(8), 1047-1061.
- ABITBOL, T., RIVKIN, A. a CAO, Y. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, **2016**(39), 76-78.
- ABDUL KHALIL, H. P. S., A. H. BHAT a A. ABU BAKAR. Cellulosic Nanocomposites from Natural Fibers for Medical Applications: A Review. *Handbook of polymer Nanocomposite*. 2014, **2014**, 475-511.
- AIRD, W. C. Endothelium and haemostasis. *Hamostaseologie*. **2015**(35), 6-11.
- ARRIGONI, C., CAMOZZI, D. a REMUZZI, A.. Vascular Tissue Engineering. *Cell Transplantation*. **2006**(15), 119-125.
- BIRAN, R. a POND, D.. Heparin coatings for improving blood compatibility of medical devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2016**(15).
- CHEN, P., CHO, S.Y., JIN, H.J., 2010. Modification and Applications of Bacterial Celluloses in Polymer Science. *Macromolecular Research*, 2010 (16), 309–320.
- CHLUPAC, J., FILOVA, E. & BACAKOVA, L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol. Res.* 58 (Suppl. 2), S119–S139 (2009).
- CRAWFORD, R. L. (1981). *Lignin biodegradation and transformation*. New York: John Wiley and Sons.
ISBN 0-471-05743-6.
- COOLMAN, R.W., HIRSCH, K., MARDER, V.J. et al.: Hemostasis and Thrombosis, New York 2001, Lippincott Williams and Wilkins
- ČIHÁK, R. *Anatomie 3*. 2004. 2. vyd., Praha: Grada, ISBN 80-247-1
- DAHMAN, Y., Nanostructured Biomaterials and Biocomposites from Bacterial Cellulose Nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 9, 5105–5122.
- DAHMAN, Y., JAYASURIYA, K.E., KALIS, M., 2010. Potential of Biocellulose Nanofibers Production from Agricultural Renewable Resources: Preliminary Study. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(6), 1647–1659.
- DAUGIRDAS, J.T., BERNARDO, A.A., BERRY, L. *Hemodialysis effect on platelet count and function and hemodialysis-associated thrombocytopenia*
- Devabaktuni Lavanya et al. / IJDFR volume 2 Issue 6, Nov.-Dec.2011
- DE VALENCE, S., TILLE, J-C., MUGNAI, D., MROWCZYNSKI, W., GURNY, R., Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials*. **2011**(33), 38-47.
- DE OLYVEIRA, G.M., MANZINE COSTA L.M., BASMAJI, P. a XAVIER FILHO, L.. *Bacterial Nanocellulose for Medicine Regenerative*.

DING, Y., YANG, M. a YANG, Z. Cooperative control of blood compatibility and re-endothelialization by immobilized heparin and substrate topography. *Acta Biomaterialia*. **2014**(15),

DVORAK, M. VLASIN, M. DVORAKOVA, P. RAUSER, "Heparin and Its Derivatives in the Treatment of Arterial Thrombosis: A Review," *Veterinarni Medicina*, Vol. 55, No. 11, 2010, pp. 523-546.

ESA, F., TASIRIN, S.M., RAHMAN, N.M. a STANA-KLEINSCHEK, K.. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application.

ENDES, C., S. CAMARERO-ESPINOSA, S. MUELLER, E. J. FOSTER, A. PETRI-FINK, B. ROTHEN-RUTISHAUSER, C. WEDER a M. J. D. CLIFT. A critical review of the current knowledge regarding the biological impact of nanocellulose, *Journal of Nanotechnology*.

EYHOLZER, C, de Couraca AB, Duc F, Bourban PE, Tingaut P, Zimmermann T, et al. Biocomposite hydrogels with carboxymethylated, nanofibrillated cellulose powder for replacement of the nucleus pulposus. *Biomacromolecules* 2011;12:1419–27

FU LN, ZHANG Y, LI C, WU ZH, ZHUO Q, HUANG X, et al. Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method. *J Mater Chem* 2012;22:12349–57.

FU L, ZHOU P, ZHANG S, YANG G. Evaluation of bacterial nanocellulose based uniform wound dressing for large area skin transplantation. *Mater Sci Eng C* 2013;33:2995–3000.

GAO, A., LIU, F. a XUE, L.. Preparation and evaluation of heparin-immobilized poly (lactic acid) (PLA) membrane for hemodialysis. *Journal of Membrane Science*. **2013**, 390-399.

GARDNER, D.J., OPORTO, G.S., MILLS, R. a My Ahmed Said Azizi SAMIR. Adhesion and Surface Issues in Cellulose and Nanocellulose. *Journal of Adhesion Science and Technology*. **2008**(15), 545-567.

HASAN, A., MEMIC, A a ANNABI, N. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia*. **2014**(10), 11-25. Helenius G, Backdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* 2006;76:431–8.

HEYLIGERS, J. M.M., LISMAN, T., VERHAGEN, H.J.M., WEETERINGS, C., Philip G. DE GROOT a Frans L. MOLL. *A heparin-bonded vascular graft generates no systemic effect on markers of hemostasis activation or detectable heparin-induced thrombocytopenia-associated antibodies in humans*. DOI: 10.1016/j.jvs.2007.10.005.

Hirsh J (1991): Heparin. *The New England Journal of Medicine* 324, 1565–1574.

Hudeček, J., Paceková, M., Chudej, J., Kubisz, P.,: Infekce a hemostáza, *Vnitřní lékařství* 50, 2004, č.6, s. 453-461.

Jaffe, E.A., Armellino, D., Tollefsen, D.M.,: Biosynthesis of functionally active heparin cofactor II by a human hepatoma – derived cell line. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 132, 1985, s. 368-374

JORFI, M., FOSTER, E.J., MUELLER, S., FOSTER, E.J., A. PETRI-FINK, B. ROTHEN-RUTISHAUSER, C. WEDER a M. J. D. CLIFT. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications.

KAMEL, S., N. ALI, K. JAHANGIR, S. M. SHAH a A. A. EL-GENDY. *Pharmaceutical significance of cellulose: A review. eXPRESS Polymer Letters Vol.2, No.11 (2008) 758–778.*

Keshk, S.M., 2014. Bacterial Cellulose Production and Its Industrial Applications. *Bioprocess Biotechnology* 4, 2.

KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*. 1. Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.

KLEMENT, P, Y.J DU, L BERRY, M ANDREW a A.K.C CHAN. *Blood-compatible biomaterials by surface coating with a novel antithrombin–heparin covalent complex*, *Biomaterials* 23(2):527-35.

KNIGHT, D.K., GILLIES, E.R a MEQUANINT, K.. *Vascular Grafting Strategies in Coronary Intervention*, *Biomaterials*.

Ku DN & Allen RC: 2000. Vascular grafts. In Bronzino JD, ed. *The Biomedical Engineering Handbook*, 2nd edn. Boca Raton, FL, CRC Press.

LAM, LH, SILBERT JE, ROSENBERG, RD (1976): The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 69, 570–577.

LANGMEIER, M. *Základy lékařské fyziologie*. 1. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.

LI, S. a SENGUPTA, D. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Advanced Review*. **2014**(6), 61-76.

LIN, N. a DUFRESNE, A. *Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect*, *European Polymer Journal* 59:302–325.

LINHARDT, R., MURUGESAN, S. a XIE, J.. *Immobilization of Heparin: Approaches and Applications*. *Current topics in medicinal chemistry* 8(2):80-100.

LIU, Y., QIU, W.Z., YANG, W.Y., QIAN, J.C, HUANG, X.J. a Zhi-Kang XU. *Polydopamine-assisted deposition of heparin for selective adsorption of low-density lipoprotein*, *RSC Advances* 2015,5(17)

LU, Y. a TEKINALP, H. Nanocellulose in polymer composite and medical applications. *Tappi Journal*. 2013, **2013**(6), 47-54.

LÜLLMANN, H. *Barevný atlas farmakologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. 372 s. ISBN 978 80 247 1672-5.

Lundin L, Larsson H, Kreuger J, Kanda S, Lindahl U, Salmivirta M, Claesson-Welsh L (2000): *Selectively desulfated heparin inhibits fibroblast growth factor-induced mitogenicity and angiogenesis*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 24653–24660.

Marieb EN, Mallat J. 2005. *Anatomie lidského těla* = [Orig.: Human anatomy]. Brno: CP Books.

MOHAN, T., HRIBERNIK, S., KARGL, R. a STANA-KLEINSCHEK, K.. *Nanocellulosic Materials in Tissue Engineering Applications*, *Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends*, Chapter: *Nanocellulosic Materials in Tissue Engineering Applications*.

MILLERET, V., HEFTI, T., HALL, H., VOGEL, V. a EBERLI, D. *Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation. Acta Biomaterialia.* **2012**(8), 4349–4356.

NECHYPORCHUK, O., BELGACEM, M.N. a BRAS, J.. *Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. Industrial Crops and Products.* **2016**(93), 2-25.

PAN, C.H., PANG, L.Q, GAO, F., WANG, Y.N., LIU, T., YE, W. a HOU, Y.H.. *Anticoagulation and endothelial cell behaviors of heparin-loaded graphene oxide coating on titanium surface. Materials Science and Engineering.* **2016**(63), 333-340.

PATEL HN, GARCIA, R, SCHILINDER C, (2015) Fibro-porous poliglecaprone/polycaprolactone conduits: synergistic effect of composition and in vitro degradation on mechanical properties. *Polym Int* 64:547–555

PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu : buňka a krvetvorba.* 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2002. 160 s. ISBN 8086682013

PERRETTI M, PAGE CP (2000): Heparin and inflammation: a new use for an old GAG? *Gut* 47, 14–15.

PÉREZ, J., J. MUÑOZ-DORADO, T. DE LA RUBIA a J. MARTÍNEZ. *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview.* *Int Microbiol.* 2002 Jun;5(2):53-63.

Petersen N, Gatenholm P (2011) Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 1277-1286.

QIU, X., LEE, B., NING, X., MURTHY, N., DONG, N. a Song LI. End-point immobilization of heparin on plasma-treated surface of electrospun polycarbonate-urethane vascular graft: from in vitro to in situ. *Acta Biomaterialia.* **2017**(51), 138-147.

RANGARAJAN, S. *Inhibitors of coagulation. Haemophilia.* **2010**(17), 90-94.

ROSENBERG RD (1987): The heparin-antithrombin system: A natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Salzman EW (eds.): *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* 2nd ed. J.B. Lippincott, Philadelphia. 1373–1392.

Roušar, T., *Laboratorní cvičení z hematologie,* Vyd. 1. Pardubice : Univerzita Pardubice, 2012 72 s. :

Saibuatong, O.A., Phisalaphong, M., 2010. Novo Aloe Vera-Bacterial Cellulose Composite Film From Biosynthesis. *Carbohydrate Polymers* 79(2), 455–460.

SALAS, C., NYPELÖ, T., RODRIGUEZ-ABREU, C, CARRILLO, C. a ROJAS, O.C.. *Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. Current Opinion in Colloid & Interface Science.* **2014**(19), 383-398.

SEIFU, DG, PURNAMA A, MEQUANINT. K, MANTOVANI, D (2013) Small diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol* 10:410–421

- SCHUMANN, DA, WIÚÉERMANN, J., KLEMM, DO, KRAMER, F., KOTH D, et al. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes. *Cellulose* 2009;16:877–85.
- SHAHN, N., UL-ISLAMA, M., KHATTAKA, W.A., PARKA, J.K., 2013. Overview of Bacterial Cellulose Composites: A Multipurpose Advanced Material. *Carbohydrate Polymers* 98, 1585– 1598.
- SIE P, OFOSU, F, et al. (1986): Respective role of antithrombin III and heparin cofactor II in the in vitro anticoagulant effect of heparin and of various sulphated polysaccharides. *British Journal of Hematology* 64, 707–714.
- SONG, Y, FEIJEN J, GRIJPM, D, POOT A (2011) Tissue engineering of small-diameter vascular grafts: a literature review. *Clinical Hemorheol Microcirc* 49(1):357–374
- SUHAS, N., GUPTA, V.K., P.J.M. CARROTT, SINGH, R., CHAUDHARY, M. a KUSHWAHA, S.. *Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. Bioresource Technology.* **2016**(216), 1066–1076.
- TANZI, M.C.. *Bioactive technologies for hemocompatibility. Journal Expert Review of Medical Devices.* **2005**(2), 473-492.
- THOMAS, A. C., CAMPBELL, G.R., CAMPBELL, J.H., et al. *Advances in vascular tissue engineering: from in vitro to in situ.* Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine 6(1) ·
- Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C (2007) Development of small diameter vascular grafts. *World J Surg* 31(4):682–689
- WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER. *The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. Progress in Polymer Science.* **2010**(35), 1217-1256
- XUE, L. a GREISLER, H.P.. *Biomaterials in the development and future of vascular grafts. Journal of Vascular Surgery.* **2003**(37), 473-480.
- YAO, Yao, Jianing WANG, Yun CUI, et al. *Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization. Acta Biomaterialia.* **2014**(10), 2739–2749.

