



Funkcionalizace nanovláknenných materiálů pomocí látek uvolňujících oxid dusnatý

Diplomová práce

Studijní program: N3106 – Textilní inženýrství
Studijní obor: 3106T018 – Netkané a nanovláknenné materiály
Autor práce: **Bc. Kristýna Beranová**
Vedoucí práce: Ing. Aleš Šaman





Functionalization of nanofibrous layers by incorporation of nitric oxide releasing substances

Master thesis

Study programme: N3106 – Textile Engineering
Study branch: 3106T018 – Nonwoven and Nanomaterials
Author: **Bc. Kristýna Beranová**
Supervisor: Ing. Aleš Šaman



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Beranová**
Osobní číslo: **T16000548**
Studijní program: **N3106 Textilní inženýrství**
Studijní obor: **Netkané a nanovláknenné materiály**
Název tématu: **Funkcionalizace nanovláknenných materiálů pomocí látek uvolňujících oxid dusnatý**
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. Vypracovat rešerši na dané téma (metody funkcionalizace nanovláknenných tkáňových nosičů, látky uvolňujících oxid dusnatý (NO) a jejich funkce v organismu, metody detekce oxidu dusnatého, způsoby inkorporace těchto látek do tkáňových nosičů)
2. Syntéza látek uvolňujících oxid dusnatý a optimalizace detekce uvolněného NO
3. Vývoj funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů uvolňujících NO
4. Vyhodnocení a zpracování výsledků

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace

Rozsah pracovní zprávy: 40-60 dle potřeby

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

1. Ridnour, L., A., Sim E., S., Hayward, M., A., Wink D., A., Martin, S., M., Buettner G., R., Spitz, D., S., A Spectrophotometric Method for the Direct Detection and Quantitation of Nitric Oxide, Nitrite, and Nitrate in Cell Culture Media, *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 281, no. 2, 223229.
2. Lei, J., Vodovotz, Y., Tzeng, E., Billiar, T., E., Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system, *Nitric Oxide*, 2013, vol. 35, pages 175185
3. Bryan, N., S., Grisham, M. B. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples, *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, vol. 43., no. 5, pages 645657.
4. AL-SA'DONI, H., Ferro, A., S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs, *Clinical Science*, 2000, vol. 98, pages 507520.
5. Frost., M., C., Meyerhoff M., E. Controlled photo initiated release of nitric oxide from polymer films containing S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine derivatized fumed silica filler, *J Am Chem Soc*, 2004, vol. 11, no. 126(5), pages 1348-9.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Aleš Šaman

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

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Aleši Šamanovi za odborné vedení, trpělivost, čas, cenné rady a připomínky k této diplomové práci. Děkuji Mgr. Janě Horákové za možnost odborné konzultace a pomoci při řešení problematiky, kterou se zabývá tato diplomová práce.

Také bych ráda poděkovala všem, kteří se na této diplomové práci podíleli a tím přispěli k jejímu úspěšnému dokončení.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům za morální a finanční podporu při studiu na vysoké škole, svým sestrám, které tolerovaly mé výkyvy nálad a svým přátelům, kteří mě vždy podporovali během studia.

ABSTRAKT

Tato práce si kladla za cíl prostudovat možnosti optimalizace nanovláknenných struktur s inkorporovaným SNAPsem, jenž zastává funkci donoru oxidu dusnatého. Byl zkoumán jeho vliv na morfologickou stavbu nanovláknenných nosičů vytvořených z alifatických polyesterů PCL a PLC (PURASORB) pomocí elektrostatického zvlákňování a rovněž je zkoumán vliv SNAPsu na buněčnou adhezi a viabilitu. Dále byly prostudovány možnosti detekce uvolněného oxidu dusnatého z nanovláknenné struktury pomocí nepřímé metody Griess Assay a vliv sterilizace pomocí 70 hm % etanolu na buněčnou viabilitu. Na základě sérií testování byl vyhodnocen nejvhodnější materiál spolu s koncentrací SNAPsu, který je nejvíce vyhovujícím pro vytvoření maloprůměrové cévní náhrady.

KLÍČOVÁ SLOVA

Oxid dusnatý, maloprůměrová cévní náhrada, SNAPs, Griess Assay, poly- ϵ -kaprolakton, PLC, absorbance, elektrostatické zvlákňování

ABSTRACT

Purpose of this work was study of optimisation possibilities concerning nanofibrous structures with incorporated SNAP, which acts as a donor of nitric oxide. His influence on the morphological structure of nanofibrous carriers made of aliphatic polyesters PCL and PLC (PURASORB) using electrostatic spinning, as well as the effect of SNAP on cell adhesion and viability. Furthermore we explore the possibilities of detection of released nitric oxide from the nanofibrous structure by the indirect Griess Assay method and the effect of sterilization with 70 wt % ethanol on cell viability. Based on series of testing, the most suitable material was evaluated, together with the concentration of SNAP, which is most suited for the creation of a small diameter vascular substitute.

KEY WORDS

Nitric oxide, small-diameter vascular graft, SNAP, Griess Assay, poly- ϵ -caprolactone, PLC, absorbance, electrospinning

OBSAH

Seznam zkratk	11
Seznam tabulek	16
Úvod.....	17
Teoreticko-rešeršní část	19
1. Oxid dusnatý	19
1.1 Úvod.....	19
1.2 Chemické reakce oxidu dusnatého.....	20
1.3 Enzymatická biosyntéza oxidu dusnatého	21
1.4 Biologické účinky oxidu dusnatého v organismu	23
1.4.1 Fyziologické účinky oxidu dusnatého	23
1.4.2 Endotel a vazodilatace	24
1.4.3 Patofyziologické účinky oxidu dusnatého	25
2 Donory oxidu dusnatého.....	27
2.1 S - Nitrosothioly	27
2.1.1 SNAP (S-NITROSO-N-ACETYLPENICILLINAMINE)	27
3 Analýza oxidu dusnatého a jeho metabolitů	29
3.1 Griessova metoda (Griess Assay)	29
4 Obecná anatomie a fyziologie cév	31
4.1 Typy cév.....	31
4.2 Obecný průřez cévní stěnou	32
5 Obecný popis cévních náhrad	33
5.1 Obecné vlastnosti cévních protéz.....	33
5.2 Indikace k použití cévní náhrady	33
5.3 Základní dělení cévních náhrad	34
5.3.1 Maloprůměrové cévní náhrady	34

6	Elektrostatické zvlákňování (elektrospinning)	36
6.1	Základní metody elektrostatického zvlákňování.....	36
6.2	Enkapsulace.....	38
7	Alifatické polyestery	39
7.1	Poly- ϵ -kaprolakton (PCL)	39
7.1.2	Využití PCL v medicíně	40
7.2	PLC (PURASORB).....	40
	Experimentální část.....	41
8	Metodika	41
8.1	Příprava roztoku PCL a PLC pro elektrostatické zvlákňování	42
8.2	Příprava SNAPs	43
8.3	Elektrostatické zvlákňování	43
8.4	Griess Assay	44
9	Testování <i>in vitro</i>	45
9.1	Flourescenční mikroskopie	45
9.2	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	46
9.3	Stanovení metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu	46
10	Experiment č. 1	47
10.1	Vyhodnocení <i>in vitro</i> testů	47
10.1.1	Fluorescenční mikroskopie	48
10.1.2	Skenovací elektronová mikroskopie bez přítomnosti buněk	51
10.1.3	Skenovací elektronová mikroskopie po 1 dni kultivace	52
10.1.4	Skenovací elektronová mikroskopie po 14 dnech buněčné kultivace	53
10.1.5	Vyhodnocení metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu	54
10.1.6	Vyhodnocení metody Griess Assay	56
10.2	Diskuze výsledků – Experiment č. 1	59
11	Experiment č. 2	61

11.1	Vyhodnocení <i>in vitro</i> testů	61
11.1.1	Fluorescenční mikroskopie	62
11.1.2	Skenovací elektronová mikroskopie bez přítomnosti buněk	63
11.1.3	Skenovací elektronová mikroskopie po 1 dni kultivace	64
11.1.4	Skenovací elektronová mikroskopie po 11 dnech kultivace.....	65
11.1.5	Vyhodnocení metabolického MTT testu	65
11.1.6	Vyhodnocení metody Griess Assay	68
11.2	Diskuze výsledků - Experiment č. 2.....	71
12	Vliv sterilizace PCL a PLc s ohledem na inkorporovaný SNAPs	72
12.1	Sada č. 1 - MTT test (24 hodin, sterilizace 70 hm % EtOH)	73
12.2	Sada č. 2 - MTT test (24 hodin, bez sterilizace).....	74
	Závěr	77
	Použitá literatura	79

SEZNAM ZKRATEK

<i>CASCM</i>	hladkosvalové buňky
<i>cGMP</i>	cyklický guasinmonofosfát
<i>CNS</i>	centrální nervová soustava
<i>COO</i>	esterová skupina
<i>EBM-2</i>	médium pro endotelové buňky
<i>EDRF</i>	endoteliální relaxační faktor
<i>eNOS</i>	endoteliální syntetáza oxidu dusnatého
<i>EtOH</i>	ethanol (ethylalkohol)
<i>H₂O</i>	voda
<i>HNO₂</i>	kyselina dusitá
<i>HUVEC</i>	Human umbilical vein endothelial cells
<i>iNOS</i>	indukovaná syntetáza oxidu dusnatého
<i>MTU</i>	Michiganská Technologická Univerzita
<i>NADPH</i>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<i>NEED</i>	N-(1-naftyl)ethylendiamin dihydrochloridem
<i>nNOS</i>	neuronální syntetáza oxidu dusnatého
<i>NO</i>	oxid dusnatý
<i>NO_x</i>	
<i>NOS</i>	syntetáza oxidu dusnatého
<i>O₂</i>	kyslík
<i>PBS</i>	fosfátový pufr

<i>PBS</i>	polybutylen sukcinát
<i>PCL</i>	poly-ε-kaprolakton
<i>PHB</i>	polyhydroxybutyrát
<i>PLA</i>	kyselina polyléčná
<i>PLC</i>	kopolymer kyseliny polyléčné a polykaprolaktonu
<i>PTFE</i>	polytetrafluorethylen/teflon
<i>SNAP</i>	S-nitroso-N-Acetylpenicillinamine
<i>R-SH</i>	thiolová skupina
<i>ROP</i>	ring-opening polymeraziton
<i>RSNO</i>	s-nitrosothiol
<i>SA</i>	kyselina sulfanová
<i>SEM</i>	skenovací elektronová mikroskopie
<i>SNP</i>	sodium nitroprusside
<i>SULF</i>	sulfanilamid

Seznam obrázků

Obr. 1:	Nákres molekuly oxidu dusnatého	19
Obr. 2:	Schéma enzymatické biosyntézy oxidu dusnatého	21
Obr. 3:	Schéma fyziologických účinků oxidu dusnatého	24
Obr. 4:	Konstitutivní eNOS je exprimován v endotelových buňkách a katalyzuje oxidaci L-argininu na L-citrulin, což vede k tvorbě NO. NO snadno difunduje z endotelových buněk do buněk hladkého svalstva	25
Obr. 5:	Chemický vzorec SNAP (S-Nitroso-N-Acetylpenicilamine)	28
Obr. 6:	Reakční mechanismus oxidu dusnatého při Griessově reakci	30
Obr. 7:	Schéma elektrostatického zvlákňování z jehly	36
Obr. 8:	Právě probíhající elektrostatické zvlákňování z válcové elektrody se zachytávanými nově vytvořenými nanovláknami na kolektoru	37
Obr. 9:	Proces katalytické polymerizace s otevřením kruhu ϵ -kaprolaktonu	39
Obr. 10:	Průměr vláken jednotlivých typů polymerních roztoků (7 hm% PLC a 7 hm% PCL) s přidavkem SNAPsu o různých koncentracích (0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm %) a jeho vliv na průměr vláken elektrostatickým zvlákňováním	48
Obr. 11:	Snímky č. 1-4 (7 hm % PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)	48
Obr. 12:	Snímky č. 5-8 (7 hm % PCL + 0, 0,2, 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)	49
Obr. 13:	Snímky č. 1-4 (7 hm % PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)	49
Obr. 14:	Snímky č. 5-8 (7 hm, % PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 % SNAPs)	50
Obr. 15:	Snímky č. 1-4 (7 hm % PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 % SNAPs)	51
Obr. 16:	Snímky č. 5-8 (7 hm % PCL + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 % SNAPs)	51
Obr. 17:	Snímky č. 1-4 (7 hm% PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 % SNAPs)	52
Obr. 18:	Snímky č. 5-8 (7 hm% PCL + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 % SNAPs)	52
Obr. 19:	Snímky č. 1-4 (PLC)	53
Obr. 20:	Snímky č. 5-8 (PCL)	53
Obr. 21:	Hodnoty absorbance negativních kontrol polymerů (7 hm% PLC a 7 hm% PCL) s různou koncentrací	

	SNAPsu (0, 0,2 0,4 a 0,6 hm %)	54
Obr. 22:	Hodnoty absorbance testovaných materiálů měřených po 1., 3., 7. a 14. dnu buněčné kultivace. Hodnota absorbance je vypočítána jako rozdíl hodnot při 570 a 650 nm po odečtení průměrné hodnoty absorbance od negativních kontrol - rozděleno dle kultivační doby	55
Obr. 23:	Hodnoty absorbance testovaných materiálů měřených po 1.,3.,7. a 14. dnu buněčné kultivace. Hodnota absorbance je vypočítána jako rozdíl hodnot při 570 a 650 nm po odečtení průměrné hodnoty absorbance od negativních kontrol – materiálové rozdělení	56
Obr. 24:	Kalibrační křivka PBS vypočítána pro hodnotu 495 nm v různých v následujících koncentracích dusitanu sodného (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μM)	57
Obr. 25:	Vyhodnocení nepřímé metody detekce oxidu dusnatého – Griess Assay. Hodnota absorbance měřena za 1., 3. a 7. den.	58
Obr. 26:	Průměr vláken jednotlivých typů polymerních roztoků (7 hm% PCL) s přídavkem SNAPsu o různých koncentracích (0; 0,2 a 0,4 hm %)a jeho vliv na průměr vláken tvořených elektrostatickým zvlákňováním	62
Obr. 27:	Snímek č. 1-3 (15 hm % PCL + 0, 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)	63
Obr. 28:	Snímek č 1-3 (15 hm % PCL + 0, 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)	64
Obr. 29:	Snímky č. 1-3 (15 hm % PCL + 0; 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)	65
Obr. 30:	Snímek č. 1-3 (15 hm % PCL + 0; 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)	65
Obr. 31:	Snímek č. 1-3 (15 hm % PCL + 0; 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)	66
Obr. 32:	Hodnoty absorbance negativních kontrol polymeru (7 hm% PCL) s různou koncentrací SNAPsu (0; 0,2 a 0,4 hm %)	67
Obr. 33:	Hodnoty absorbance testovaných materiálů měřených po 4., 7. a 14. Dnem kultivace. Hodnota absorbance je vypočítána jako rozdíl hodnot při 570 a 650 nm po odečtení průměrné hodnoty absorbance od negativních kontrol	68
Obr. 34:	Hodnoty absorbance testovaných materiálů měřených 4.,7. a 14. dnu buněčné kultivace. Hodnota absorbance je vypočítána jako rozdíl hodnot při 570 a 650 nm po odečtení	

	průměrné hodnoty absorbance od negativních kontrol – materiálové rozdělení.	69
Obr. 35:	Kalibrační křivka PBS vypočítána pro hodnotu 495 nm v různých následujících koncentracích dusitanu sodného (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μ M)	70
Obr. 36:	Kalibrační křivka destilované vody byla vypočítána pro hodnotu 539 nm v různých hodnotách koncentrace dusitanu sodného 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μ M).	70
Obr. 37:	Vyhodnocení metody Griess Assay ve třechtestovacích dnech (1., 2. a 3. den). Výsledky byly zaznamenány do grafu. Pro polovinu testovaných vzorků byl použit fosfátový pufr (PBS) a pro druhou polovinu byla využita destilovaná voda	71
Obr. 38:	Hodnoty absorbance metabolického MTT testu, které byly naměřeny při vlnové délce 570 nm. Testované materiály byly vysterilizovány po dobu 30 minut v 70 hm % EtOH	75
Obr. 39:	Procentuální vyjádření konfluence buněk na povrchu testovaných materiálů, které byly vysterilizovány po dobu 30 minut v 70 hm % EtOH	76
Obr. 40:	Hodnoty absorbance MTT testu buněčné aktivity na povrchu testovaných materiálů, které byly osázeny buněčnou linií HUVEC a nebyly žádným způsobem sterilizovány. Hodnoty absorbance byly naměřeny při vlnové délce 570 nm	77
Obr. 41:	Grafické vyjádření procentuální konfluence buněk na povrchu testovaných scaffoldů	77

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Typy izoform NOS s jejich charakterizací a fyziologickou funkcí v organismu (Lei 2013)	23
Tab. 2 Seznam testovaných materiálů a jejich charakterizace (Experiment č. 1)	47
Tab. 3 Seznam testovaných materiálů a jejich charakterizace (Experiment č. 2).....	61

ÚVOD

Hektický životní styl, nedostatek pohybu a rovněž špatná životospráva jsou nejčastější příčiny vzniku tzv. civilizačních chorob, které rovněž můžeme označit jako „nemocemi moderní doby“. Největším zástupcem této skupiny jsou nemoci kardiovaskulárního systému. Tato onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Při vzniku kardiovaskulárních chorob dochází nejčastěji k poškození cévního systému, jehož hlavním úkolem je transport živin, dýchacích plynů, hormonů a je nedílnou součástí při udržování homeostázy. S prudkým rozvojem tkáňového inženýrství a nanotechnologií je však spojen vznik nových lékařských postupů k řešení otázky léčby kardiovaskulárních onemocnění v podobě umělých cévních náhrad. Avšak cévy malopřůměrové, vyrobené ze syntetických materiálů, stále nejsou úspěšně přijímány lidským organismem jako je tomu u jiných implantátů. Důvodem je imunitní odpověď organismu na „cizí“ předmět, tvorba trombů a náchylnost implantátu k praskání. Z tohoto důvodu se přistupuje k vývoji optimalizovaných cévních náhrad, které jsou obohaceny o látky, které jsou schopny potlačit negativní reakce organismu a podpoření správné funkce cévního implantátu.

Hlavním zájmem této diplomové práce je studium vybraných polymerních materiálů, do jejichž struktury je inkorporován SNAPs (donor NO), který v určitém časovém intervalu a ve vhodném prostředí uvolňuje oxid dusnatý. Ten je pomocí Griessovy metody (Griess Assay) blíže analyzován. Tato část práce byla vypracována ve spolupráci s Michiganskou Technologickou Univerzitou (MTU) oddělení Biomedicínského inženýrství.

Tato diplomová práce je rozdělena na dvě základní části. První část teoreticko-rešeršní je zaměřena na vysvětlení jednotlivých pojmů týkající se řešené problematiky a na teoretické poznatky důležité pro uskutečnění experimentů.

Druhá část diplomové práce je zaměřena experimentálně a je zde zkoumána koncentrace SNAPsu, která souvisí s postupným uvolňováním oxidu dusnatého do vnějšího prostředí. Hodnota oxidu dusnatého a jeho metabolitů je detekována pomocí nepřímé metody Griess Assay. Zároveň je v této práci zkoumán vliv SNAPsu na růst a proliferaci buněčných linií (HUVEC, CASCM), kterou byly vzorky PCL

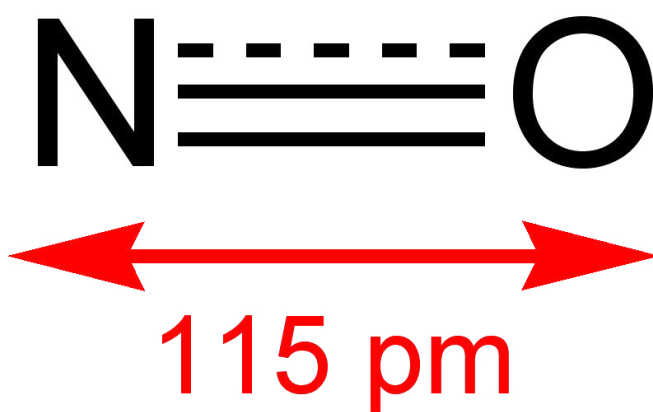
s různou koncentrací SNAPsu osázeny. Aktivita buněk byla vyhodnocena pomocí metabolického MTT testu. Další součástí experimentální části této práce je zjišťování vlivu chemické sterilizace na uvolňování SNAPsu.

TEORETICKO-REŠERŠNÍ ČÁST

1. OXID DUSNATÝ

1.1 Úvod

Oxid dusnatý (NO) je za normálních podmínek bezbarvý, jedovatý a za přítomnosti vlhkosti leptavý plyn, který při teplotě -152°C kapalní a tuhne při teplotě -164°C . Oxid dusnatý je relativně stabilní radikál s 11 valenčními elektrony (jeden je nepárový). Vyskytuje se v atmosféře a přispívá ke znečištění ovzduší. Má paramagnetické vlastnosti a díky svému hydrofóbnímu charakteru je velmi obtížně rozpustný ve vodě (přibližně 2mM). Za vysokého tlaku se oxid dusnatý samovolně rozpadá. Biologický poločas rozpadu se pohybuje v rozmezí 3 - 5 s (Kupková, Beneš, 2004).



Obr. 1 Nákres molekuly oxidu dusnatého (Wikipedie, 2016)

Oxid dusnatý (NO) v lidském organismu reguluje neurologické, imunitní a kardiovaskulární procesy. První zmínka o oxidu dusnatém je datována roku 1620, kdy byl poprvé připraven belgickým chemikem, fyziologem a fyzikem Jeanem Baptistou van Helmontem. Později, v roce 1772 byl NO poprvé chemicky popsán anglickým chemikem, pedagogem, přírodním filozofem a teologem Josephem Priestleym, který je obvykle spíše spojován s objevem kyslíku (1774). Toxicita oxidu

dusnatého byla zjištěna roku 1800. V tomto roce se Sir Humphry Davy nadýchal nepatrného množství oxidu dusnatého a tím se téměř otrávil. V roce 1867 bylo vyzorováno, že amylnitrit způsobuje snížení krevního tlaku při hypertenzi, což prozatím nebylo připisováno účinkům oxidu dusnatého. Za 1. světové války (1914 - 1918) bylo zjištěno, že u vojáků dělostřelectva plnicích granáty nitroglycerinem, se vyskytuje pokles krevního tlaku. Tento poznatek byl později využit při léčbě anginy pectoris (Král 1998, Pindur 2013).

V roce 1977 lékař, farmaceut a držitel Nobelovy ceny Farid Murad objasnil mechanismus účinku a působení NO na aktivaci guanlátacyklázy, která zvyšuje intracelulární koncentraci cGMP. V 80. letech 20. století Robert Furchgott objevil endoteliální relaxační faktor (EDRF). Důležitý zlom nastal v roce 1987, kdy Louis Ignarro a Salvador Moncada objevili schopnost endotelových buněk tvořit oxid dusnatý. Časopis „Science“ v roce 1992 vyhlásil oxid dusnatý „Molekulou roku“ a v roce 1998 dostává Louis Ignarro, Robert Furchgott a Farid Murad Nobelovu cenu za lékařství a fyziologii „Za klíčové objevy týkající se oxidu dusnatého jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému“. Tyto objevy otevřely nové možnosti v oblasti výzkumu využití oxidu dusnatého. (Ignarro 2005, Sedláček 1999).

1.2 Chemické reakce oxidu dusnatého

Oxid dusnatý za přítomnosti volného kyslíku oxiduje na oxid dusičitý, což je hnědý a jedovatý plyn, který je rovněž radikál. Při vystavení lidského organismu vyšším dávkám oxidu dusičitého (či jeho dimeru) dochází k poškození epitelových buněk dýchacích cest. Tato poškození mohou být až smrtelná.



Poločas této reakce není nijak konstantní a záleží na počáteční koncentraci NO, z čehož vyplývá, že pokud je koncentrace oxidu dusnatého vyšší, tím je průběh reakce rychlejší. Vzhledem k přítomnosti jednoho nepárového elektronu lze očekávat snadný průběh tvorby dimeru, avšak tento proces za normální teploty neprobíhá a ke vzniku dimeru jsou nutné nízké teploty. Produktem této reakce je bezbarvý dimer postrádající charakter radikálu (Kupková, Beneš 2004).

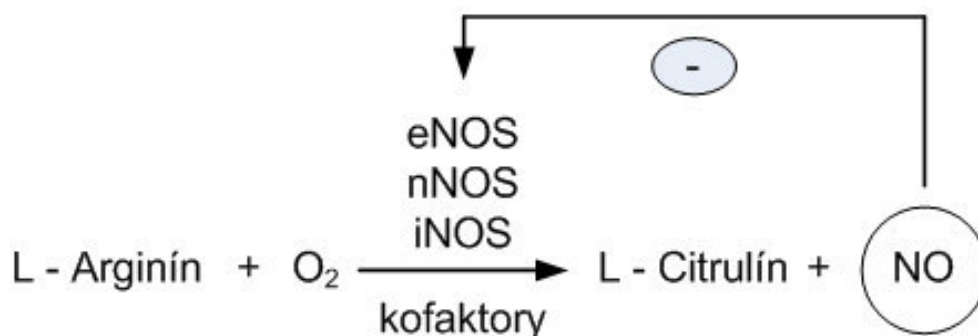


Za přítomnosti vody reaguje oxid dusnatý s kyslíkem za vzniku kyseliny dusité (Bryan 2007).



1.3 Enzymatická biosyntéza oxidu dusnatého

Biosyntéza oxidu dusnatého vyžaduje působení příslušných enzymů - syntetázy oxidu dusnatého (NOS), substrát L - argininu, vzdušný kyslík a NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfát). Oxid dusnatý vzniká oxidací guanidinového dusíku aminokyseliny L-argininu působením NO-syntazy za vzniku L-citrulinu (Luo 2005).



Obr. 2 Schéma enzymatické biosyntézy oxidu dusnatého. Převzato z (www.posterus.sk, 2008)

NO-syntaza (NOS) byla izolována v několika formách, které se mezi sebou liší subcelulární lokalizací, kinetikou, způsobem aktivace a tedy i funkcí (Kupková, Beneš 2004).

NO-syntazy dělíme na konstitutivní formy, které se jinak označují jako neuronální forma (nNOS), imunitní forma (iNOS) a endotelová (eNOS) (Lei 2013).

Neuronální forma (nNOS) se nachází v nervovém systému, kde je závislá na Ca⁺ a kalmodulinu. Aktivace nNOS je závislá na stimulaci postsynaptických receptorů vedoucí ke vstupu Ca²⁺ nebo naopak k jeho uvolnění z vnitrobuněčných zásob.

Dále je aktivace nNOS spojena s akčními potenciály, které vyvolávají vtok Ca^{2+} do presynaptických zakončení vedoucí přes napětově řízené kanály.

Imunitní forma (iNOS) se nachází v makrofázích, hepatocytech, myocytech a jiných buňkách. Aktivita iNOS nezávisí na změnách Ca^{2+} , protože pevně váže kalmodulin. Je stimulována cytokiny či přítomností bakterií v buňkách. Přispívá k neurotoxické zprostředkované NO. Tato forma je velmi důležitou při zánětlivých reakcích a je součástí nespecifické imunity

(<http://physiology.lf2.cuni.cz/teaching/nitricox/index.htm>, 2012).

Endotelová forma (eNOS) je produkována endotelovými buňkami, avšak její přítomnost byla též prokázána v neuronech centrální nervové soustavy. Její hlavní funkcí v organismu je regulace cévního tonu, krevního tlaku a srážlivost krve. Syntéza oxidu dusnatého v krevních cévách ve vyšší míře probíhá v arteriálním endotelu nežli v endotelu venózním. Podněty, které aktivují endotelovou NO - syntasu (eNOS) jsou různého původu. Podněty chemické jsou vyvolány následujícími látkami: acetylcholin, bradykinin, endotelin, angiotenzin II, katecholmaniny, atd. Fyzikální podněty jsou vyvolány smykovým třením proudící krve či pnutím cévní stěny (Lei 2013).

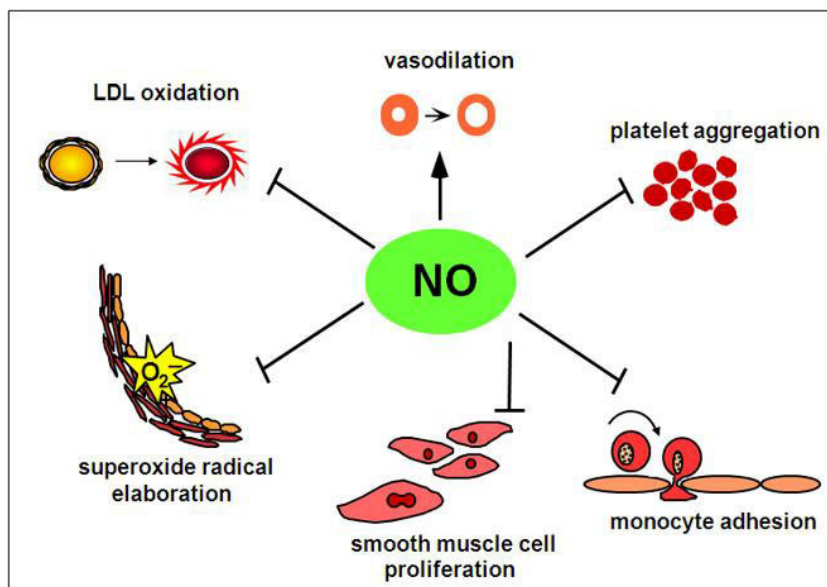
Tab. 1 Typy izoform NOS s jejich charakterizací a fyziologickou funkcí v organismu (Lei 2013)

Izoforma NOS	neuronální	endotelová	indukovaná
Označení	nNOS	eNOS	iNOS
Vyžaduje Ca ⁺	ano	ano	ne
Lokalizace v buňce	cytoplazma	buněčná membrána	cytoplazma
Výskyt	CNS, svalové buňky	převážně endotelové buňky	makrofágy, myocyty, hepatocyty a jiné buňky
Hlavní funkce	neurotransmitter	regulace cévního tonu	imunitní reakce

1.4 Biologické účinky oxidu dusnatého v organismu

1.4.1 Fyziologické účinky oxidu dusnatého

Oxid dusnatý se v imunitním systému účastní nespecifické obrany, hlavně proti prvokům a některým bakteriím, virům a nádorům. Je i účastníkem fagocytózy a zasahuje do zánětlivých procesů. V CNS působí oxid dusnatý jako tzv. buněčný posel. Zasahuje do regulace synapsí, aktivitu neuronů či výdej neurotransmiterů. Oxid dusnatý bývá považován za jeden z mediátorů bolesti. Oxid dusnatý dále ovlivňuje tonus střevní stěny včetně svěračů, pomocí vazodilatace způsobuje erekci. Renální funkce jsou ovlivňovány produkcí oxidu dusnatého a to takovým způsobem, že při vyšší syntéze NO v glomerulech ledvin infiltrovaných bílými krvinkami přispívá k udržení perfuze glomerulů a inhibici trombózy. V respiračním systému je produkce oxidu dusnatého minimální, avšak bylo prokázáno, že inhalace NO je vhodná jako léčebná metoda při akutních a subakutních plicních hypertenzích, protože prokazatelně snižuje tlak v plicích (Kupková, Beneš 2004).



Obr. 3 Schéma fyziologických účinků oxidu dusnatého. Převzato z (<http://www.argininecardio.com/science-of-nitric-oxide.php>, 2013)

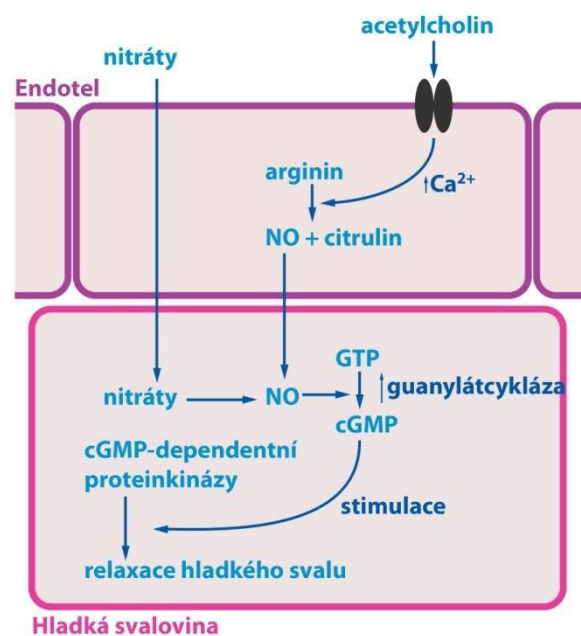
V kardiovaskulárním systému má oxid dusnatý své zastoupení. Hlavní funkcí oxidu dusnatého v kardiovaskulárním systému je udržování cévního tonu a krevního tlaku. Dále inhibuje adhezi a agregaci trombocytů a má antitrombotické účinky. Jak již bylo zmíněno, oxid dusnatý je vazodilatační látka produkována zejména endotelovými buňkami. Endotel je jednovrstevná cévní výstelka, která vytváří vnitřní část cévy (tunica intima) (Lei 2013, Kelm 2014).

1.4.2 Endotel a vazodilatace

Oxid dusnatý je vazodilatační látka produkována zejména endotelovými buňkami. Endotel je jednovrstevná cévní výstelka, která vytváří vnitřní část cévy (tunica intima). Endotel má velmi významnou syntetizující funkci. Jeho buňky syntetizují více než dvacet faktorů, které ovlivňují fyziologické procesy probíhající v organismu. Syntetizované faktory endotelu zajišťují optimální permeabilitu, umožňují a regulují transport iontů a tekutin, regulují přestup makromolekul a jiných buněčných elementů. Cévní tonus, průsvit cév, vazodilatační účinky jsou endotelem kontrolovány pomocí mediátoru NO a prostacyklinů (PGI₂). Jejich hlavními antagonisty jsou angiotenzin II a endothelin spolu s tromboxany a volnými částicemi působí vazokonstrikčně a proagregačně. Zdravý a nepoškozený endotel působí antitrombogeně. Jak již bylo zmíněno, uvolňuje vazodilatační a antiagregační mediátory, které musejí být

v rovnováze s lokálními vazokonstrikčními a agregačními faktory (Karásek 2004, <http://pfyziolffup.upol.cz> 2012).

Podle serveru (www.ftbit.cz, 2015) je mechanismus působení NO popisován tak, že po navázání acetylcholinu na receptor dojde k nastartování reakcí. Dojde ke zvýšení Ca^{2+} , kdy následkem toho dojde k aktivaci endotelové NO - syntasy. Syntetizovaný oxid dusnatý difunduje do buněk přilehlé hladké svaloviny cévní stěny, kde je aktivována guanylátcykláza, která vytváří cGMP, jenž stimuluje cGMP-dependentní proteinkinázy. Tento proces má za následek relaxaci buněk hladké svaloviny cévní stěny.



Obr. 4 Konstitutivní eNOS je exprimován v endotelových buňkách a katalyzuje oxidaci L-argininu na L-citrulin, což vede k tvorbě NO. NO snadno difunduje z endotelových buněk do buněk hladkého svalstva. Převzato (www.pfyziolffup.upol.cz 2012, Saebra 2015)

1.4.3 Patofyziologické účinky oxidu dusnatého

Dle článku (Kupková, Beneš, 2004) může být oxid dusnatý klíčovým faktorem při vzniku migrén i jiných bolestech hlavy založených na kardiovaskulární příčině. Další roli zastává při vzniku septického šoku. Snížená hladina NO v těle má velký vliv na vznik hypertenze a erektilní dysfunkce.

Již dříve bylo potvrzeno, že hladina vydechaného NO je jedním z ukazatelů stavu zánětu dýchacích cest. Vyšší hladina NO má neurotoxické účinky, což výrazně

ovlivňuje průběh Alzheimerovy choroby nebo epilepsie. Vliv NO je velmi častý u očních chorob, kde se patologicky projevuje jeho zvýšená i snížená produkce v organismu. Dalším případem, kdy oxid dusnatý negativně ovlivňuje fyziologické funkce v organismu, je u nemocných s diabetem 1. typu. Beta buňky Langerhansových ostrůvků jsou ničeny autoimunitní reakcí způsobenou reaktivním kyslíkem a dusíkem. Oxid dusnatý také ovlivňuje motilitu střev. Jeho zvýšená produkce je spojena se vznikem zánětlivých onemocnění střev (Pařízková, 1998, Karetová, 2002)

2 DONORY OXIDU DUSNATÉHO

Jak již bylo několikrát zmíněno, oxid dusnatý (NO) je za fyziologických podmínek vysoce reaktivní, z čehož vyplývá, že pro tuto molekulu existuje široká škála nosičů, které jsou velmi často používány v medicínských a biomedicínských aplikacích.

Donory neboli dárce oxidu dusnatého jsou látky, které se za fyziologických podmínek, zejména fyziologickém pH ($7,4 \pm 0,04$), rozkládají a tím dochází k uvolňování NO. Některé donory jsou připraveny synteticky a některé donory jsou přírodní. Velkou výhodou použití nosičů oxidu dusnatého v laboratorních podmínkách je jeho stálá koncentrace v přítomné látce, která je definována po relativně dlouhou dobu.

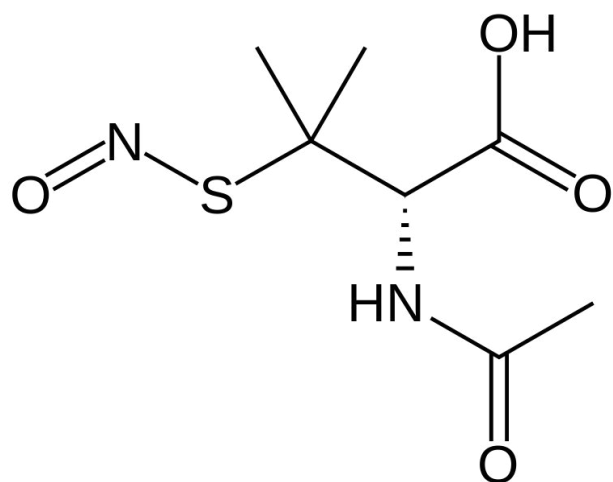
Mezi sloučeniny, které slouží jako donory NO patří: glyceryltrinitrát (GTN), diazeniumdioláty (NONOáty) nebo s-nitrosothioly (RSNO) (Bušová 2011, AL-SA'DON 2000).

2.1 S - Nitrosothioly

S-nitrosothioly je skupina donorů NO, která obsahuje chemickou vazbu mezi thiolovou skupinou (R-SH) a NO skupinou. Součástí této skupiny donorů oxidu dusnatého je i SNAP (S-nitroso-N-Acetylpenicillinamine) (AL-SA'DONI, 2000).

2.1.1 SNAP (S-NITROSO-N-ACETYLPENICILLINAMINE)

Mezi nejvýznamnější a nejčastěji používané donory NO patří syntetické S-nitrosothioly. Konkrétně používanými donory NO tohoto typu jsou: SNAP (S-Nitroso-N-acetylpenicillinamine) a SNP (sodium nitroprusside). SNAP je donor, který je schopen uvolňovat oxid dusnatý ve fyziologických podmínkách a právě proto je používán jako vazodilatátor, protože produkcí NO působí stimulačně na produkci cGMP. Udává se, že poločas rozpadu SNAP je přibližně 5 hodin při 37°C (AL-SA'DONI, 2000, Frost, 2004).



Obr. 5 Chemický vzore SNAP (S-Nitroso-N-Acetylpenicilinamine). Převzato (Kupková, Beneš 2004)

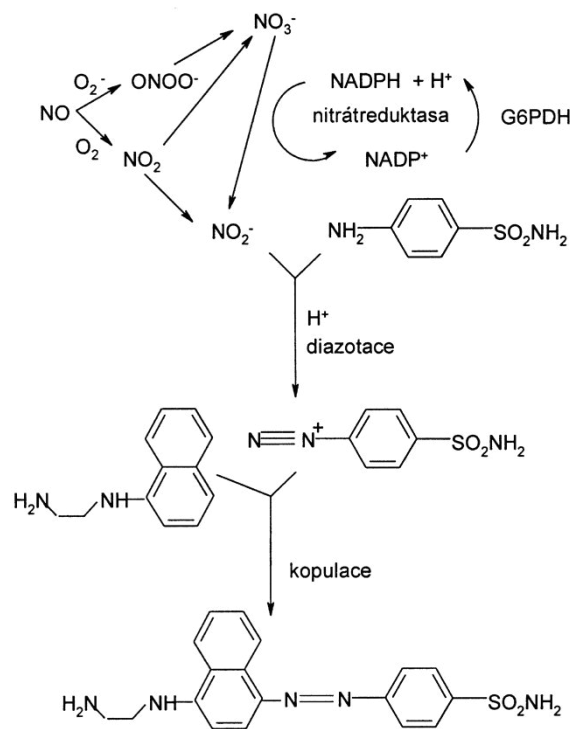
3 ANALÝZA OXIDU DUSNATÉHO A JEHO METABOLITŮ

Oxid dusnatý je v těle tvořen ve velmi malém množství a rychle reaguje s kyslíkem, hemoglobinem, thioley a jinými látkami. Z tohoto důvodu je jeho doba existence v organismu velmi krátká a pohybuje se v rozmezí 3 - 5 s. Jeho přítomnost v organismu lze stanovit přímými či nepřímými metodami. Přímou metodou detekce oxidu dusnatého je chemiluminiscence, což je luminiscenční metoda, která je založena na měření luminiscenčního záření, které zkoumaný vzorek emituje. Dalšími přímými metodami je elektrochemická (ampérometrická) detekce nebo elektronová spinová (paramagnetická) rezonance ESR (EPR). Nepřímé metody detekce oxidu dusnatého je například Griessova metoda, oxidace hemoglobinu, chemiluminiscenční reakce NO s luminolem, přeměna argininu na citrulin nebo analýza dusitanů a dusičnanů metodou HPLC (Kupková, Beneš 2004).

3.1 Griessova metoda (Griess Assay)

Griessova metoda je nepřímá metoda analýzy oxidu dusnatého a jeho metabolitů. Jako první byla Griessova metoda popsána v roce 1879 Peterem Griessem jako „Analýza dusitanů“. Tato metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení oxidu dusnatého, dusitanů a dusičnanů přítomných v lidském organismu. Tato analýza je realizována pomocí nitrátoreduktázy a Griessova činidla (Kupková, Beneš 2004)

V článku (Ridnour L., A., 2000) je řečeno, že NO_x reaguje se sulfanilamidem/kyselinou sulfanovou (SULF/SA). Avšak hlavní reakcí je reakce sloučeniny s N-(1-naftyl)ethylendiamin dihydrochloridem (NEDD). Touto reakcí dojde ke zbarvení roztoku za použití fosfátového pufru (PBS) s hodnotou absorbance 496 nm. V případě použití destilované vody se roztok zbarví do fialova s hodnotou absorbance 540 nm (Nims, 1995).



Obr. 6 Reakční mechanismus oxidu dusnatého při Griessově reakci. Převzato z (Kupková, Beneš 2004)

4 OBECNÁ ANATOMIE A FYZIOLOGIE CÉV

Podle (Dylevský, Ježek 2004) je cévní systém definován jako uzavřená soustava trubic, která se v jednotlivých úsecích liší stavbou a tím i vlastnostmi a propustností cévní stěny. Základní funkcí kardiovaskulárního systému je rozvod živin a kyslíku, dále odvod metabolitů k exkrečním orgánům. Další důležitou funkcí je transport hormonů. Kardiovaskulární systém je jedním z důležitých prvků při udržování homeostázy.

4.1 Typy cév

Cévy jsou primárně děleny na cévy krevní a lymfatické. Krevní cévy jsou dále děleny na arterie, vény a kapiláry. Jednotlivé typy cév se od sebe odlišují anatomickou strukturou a tím i svým funkčním zastoupením v kardiovaskulárním systému. Arterie jsou typem cév, které rozvádějí krev pod vysokým tlakem a z tohoto důvodu mají velmi pevnou, ale pružnou cévní stěnu. Tento tlak klesá směrem od srdce do periferií těla. Základem tepenné části krevního oběhu je aorta (srdečnice), což je silnostěnná tepna vystupující z levé srdeční komory. Vnitřní průsvit aorty je přibližně 30 mm a dále se postupně dělí na jednotlivé arterie, které dělením zmenšují svůj vnitřní průsvit, který se pohybuje v rozmezí od 5 do 15 mm. Pokud vnitřní průsvit arterii klesne pod 0,3 mm hovoříme o arteriolách.

Vnitřní průsvit kapilár se pohybuje v rozmezí od 7 do 50 μm . V tomto typu cév probíhá výměna živin a krevních plynů mezi orgány. Kapiláry vytvářejí spoje mezi tepnami a žilami. Žilní část krevního oběhu je tvořena tkáňovými kapilárami, ze kterých vznikají malé žíly (venuly). Venuly, jejichž průměr se pohybuje od 0,2 do 1 mm, sbírají krev z vlásečnic a postupně utvářejí větší žíly (vény), které jsou také označovány jako nízkotlaký nebo kapacitní krevní systém. Základním úkolem žilního systému je vedení krve zpět k srdci, ale také slouží jako zásobník krve. Vény dělíme na malé, střední a velké vény (průměr do 15 mm), které postupně odvádějí krev do horní a dolní duté žíly, které vedou krev dále do srdce a to konkrétně do pravé srdeční síně (Dylevský, Ježek 2004).

4.2 Obecný průřez cévní stěnou

Cévní strukturu lze obecně rozdělit do tří základních struktur: *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia*. *Tunica intima* je složena z endotelových buněk, které nasedají na bazální laminu. Endotelové buňky jsou ploché buňky mezenchymálního původu, které jsou uspořádány ve směru toku krve a centrální oblast se vykluje do lumen cévy. Tvar endotelových buněk a jejich následné uspořádání zajišťuje hladký a nesmáčivý povrch vnitřní strany cévy. Právě endotelové buňky zabezpečují syntézu vazoaktivních látek např. NO. Součástí této struktury je také subendotelové vazivo, což je řídké kolagenní vazivo, které může obsahovat hladké svalové buňky.

Tunica media je vrstva tvořená hladkými svalovými buňkami, které jsou spirálovitě a kruhově orientovány. Tato cévní vrstva umožňuje změnu průsvitu cévy a tím regulovat krevní tlak (průtok krve). *Tunica media* dodává cévě pružnost, proto velké cévy mají tuto vrstvu velmi silnou. V této vrstvě jsou přítomna kolagenní a elastická vlákna.

Tunica adventitia představuje vnější vrstvu cévní stěny. Je to vazivová vrstva, ve které jsou umístěna elastická vlákna, která zvyšují a podporují pružnost cévy. V této vrstvě je přítomné nervové zásobení, ale také například fibroblasty (Dylevský, Ježek 2004).

5 OBECNÝ POPIS CEVNÍCH NÁHRAD

5.1 Obecné vlastnosti cévních protéz

Velmi důležitou vlastností jakéhokoliv předmětu, který má být implantován do těla, je jeho biokompatibilita, což znamená, že materiál nesmí vyvolávat žádnou reakci s organismem. Porozita, která usnadňuje hojivé procesy a to díky možnosti prorůstání lidské tkáně implantátem, je další velmi důležitou podmínkou pro vytvoření kvalitní cévní náhrady. S touto vlastností úzce souvisí další důležitá vlastnost, která ovlivňuje hojivé procesy a tou je biodegradabilita. Ta je definována jako rychlost degradace implantátu úměrná rychlosti formování tkáně. Samozřejmostí je netoxičita a nekarcinogenost použitého materiálu, nevyvolávání alergických reakcí a co je zásadní u cévních implantátů, nesmí způsobovat změny krevní srážlivosti (Amler a kol. 2008, Tara, 2013, Wu 2008).

5.2 Indikace k použití cévní náhrady

Cévní náhrada je samostatný útvar, který je implantován jako náhrada za poškozený úsek v cévním řečišti, který nelze rekonstruovat. Cílem této náhrady je obnovení fyziologických, mechanických a anatomických funkcí poškozené části cévy. K poškození cévy dochází z několika příčin. První příčinou je poranění, které poškodilo cévu takovým způsobem, že nelze přejít k operativnímu řešení. Tato poškození cévy může být způsobeno například bodnou či střelnou zbraní, pádem nebo nárazem. Poškozená céva nemůže plnit svou funkci, a proto je nutné přejít k její výměně. Další příčinou je onemocnění cévy. Tato onemocnění většinou způsobují její neprůchodnost, které se projevuje hypoxií nebo poškozením orgánu nebo jeho části. Prvním onemocněním, které může způsobit neprůchodnost cévy je sraženina (trombóza). V cévě vzniká trombus, který se přichytí k cévní stěně, čímž je omezena průchodnost cévy nebo může dojít k odtržení trombu, který doputuje do místa cévy s užším průměrem a tím dojde k její ucpání.

Druhým onemocněním je výduť neboli aneurysma. Hlavní příčinou vzniku aneurysmatu je oslabená nebo poškozená céva, která podstatně hůře odolává tlaku krevního řečiště. Dochází k vyklenutí poškozeného místa a díky tomu dochází

ke změnám krevního tlaku v místě tvorby aneurysmatu. Posléze může dojít k prasknutí aneurysmatu, což má za následek vážné poškození cévy způsobující masivní krvácení, které je život ohrožující. Posledním onemocněním je ateroskleróza jinak známo také jako kornatění tepen. Příčinou vzniku této nemoci je usazování tukových plátů, vaziva nebo cholesterolu ve stěně cévy. Céva tím ztrácí svou přirozenou pružnost a průřez, čímž dochází k omezení průtoku krve cévou (Amler a kol. 2008).

5.3 Základní dělení cévních náhrad

Průměr cévní náhrady velkých průměrů se pohybuje v rozmezí 12 - 38 mm a nejčastěji využívaným materiálem je PTFE (polytetrafluorethylen/teflon) a polyester. Cévní náhrady středního průměru se velikostně pohybují v rozmezí 5 - 10 mm, které se nejčastěji vyrábějí z teflonu, polyesteru a biologických materiálů. Problém nastává v případě maloprůměrových cévních náhrad, jejichž průměr je méně než 6 mm. Využívaným materiálem při výrobě maloprůměrových cév jsou materiály syntetické i biologické, avšak stále ve vývoji. V případě umělých maloprůměrových cév se setkáváme s vysokým stupněm trombogenicity (Amler a kol. 2008, Tara 2013).

5.3.1 Maloprůměrové cévní náhrady

Maloprůměrové cévní náhrady jsou cévní náhrady, jejichž průměr je méně než 6 mm. Výroba spolehlivě fungující cévní náhrady je stále celkem problematická, ačkoliv je velká snaha o výrobu správně fungujících maloprůměrových cévních náhrad. Avšak v případě implantovaných maloprůměrových syntetických cévních náhrad se setkáváme s vysokým stupněm trombocytózy a intimální hyperplazií, což způsobilo selhání implantovaného cévního štěpu. V poslední době vývoj maloprůměrových cév zažívá velký progres a s tím souvisí i používání nových biologicky degradabilních materiálů (Amler a kol. 2008,).

Podle článku (Zítka a kol.) je hlavním problémem špatné přijetí cévní náhrady organismem. Avšak existují metody, pomocí kterých lze imunitní odpověď a reakci organismu potlačit a dojde k přijetí umělé cévní náhrady organismem. Jako nejúčinnější jsou popsány tyto tři strategie, kdy se přistupuje k protisrážlivým úpravám materiálu:

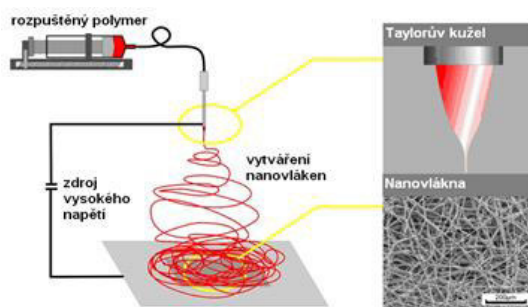
1. Imobilizace protisrážlivých molekul a vytvoření bezbuněčných tromborezistentních nanopovrchů
2. Začlenění molekul, u kterých bylo prokázáno, že zvýší tvorbu endotelu i na vnitřní stěně cévní náhrady *in vitro* a *in vivo*
3. Posílení tvorby endotelu pomocí nanočástic oxidu železa nebo endoteliálních buněk značených magnetickými mikročásticemi.

Podle článku (Tara 2013) se biodegradabilní polyestery prokázaly jako vhodné materiály, které je možné použít k výrobě scaffoldů pro tkáňové inženýrství a to včetně cévních náhrad. Dalším zásadním krokem k vylepšení maloprůměrových cévních implantátů bylo použití nanovláken právě k jejich výrobě. Vnitřní strana cévní náhrady tvořena nanovlákný zásadně usnadňuje endotelizaci vnitřního povrchu. Aby se zamezilo vzniku zánětů, trombů, intimální hyperplazii a podpořila se endotelizace vnitřního povrchu cévního implantátu.

6 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ (ELEKTROSPINNING)

Elektrostatické zvlákňování je proces výroby nanovlákených materiálů. Při tomto procesu je využíváno vodivosti polymerních roztoků či tavenin a jejich formování pomocí působení elektrického statického pole vysoké intenzity. Vzniklá nanovlákna jsou deponována na kolektor, který se pohybuje po povrchu zemnicí elektrody.

Existuje několik metod tvorby nanovláken, avšak průmyslově nejčastěji volenou metodou je již zmíněné elektrostatické zvlákňování. I v tomto případě se můžeme setkat s odlišnými metodami elektrostatického zvlákňování polymerních roztoků či tavenin (Petráš 2009)



Obr. 7 Schéma elektrostatického zvlákňování z jehly (kapiláry) (www.asio.cz, 2015)

6.1 Základní metody elektrostatického zvlákňování

- Elektrostatické zvlákňování z jehly:

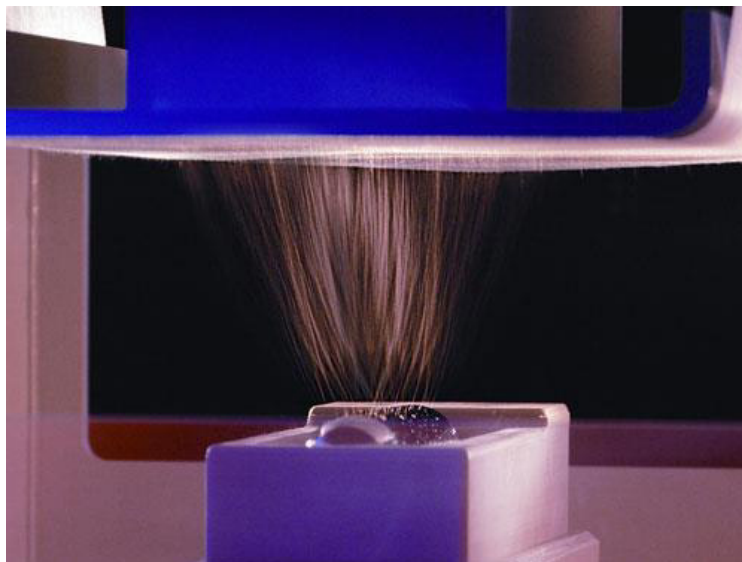
Nejjednodušším z nich je zvlákňování z jehly. Proces zvlákňování probíhá mezi dvěma elektrodami. První z nich má podobu kapiláry (jehly), na kterou je přivedeno vysoké napětí. Vnitřek této kapiláry je vyplněn polymerním roztokem. Tento roztok je konstantní rychlostí vytlačován z jehly ven. Na špičce kapiláry (jehly) dochází ke vzniku tzv. Taylorova kužele. Cestou k uzemněné elektrodě je z polymerního roztoku odpařováno rozpouštědlo a dochází ke vzniku vlákna, které je zachytáváno na povrchu materiálu, který je umístěn před zeměnou elektrodou.

- Elektrostatické zvlákňování z tyčky

Další jednoduchou metodou je zvlákňování z tyčky. Principiálně je tato metoda velmi podobná elektrostatickému zvlákňování z kapiláry (jehly). Nicméně liší se tím, že polymerní roztok není plynule dávkován, ale je umístěn ve tvaru kapky přímo na elektrodu ve tvaru tyčky. Právě na tuto elektrodu je přiváděno vysoké napětí. Tvar kapky se mění podle intenzity elektrického pole. Kolektor, který zachytává vytvořená vlákna, je umístěn nahoru přímo nad zvlákňovací elektrodu v přibližné vzdálenosti 10 cm.

- Elektrostatické zvlákňování z válečku/struny

Další metodou tvorby nanovláken je elektrostatické zvlákňování z povrchu válečku. Tato metoda využívá poznatku, že Taylorův kužel nemusí vznikat jen kapiláry či tyčinky, ale může jich vznikat několik za sebou za podmínky, že máme velmi tenkou vrstvu polymerního roztoku na povrchu, na kterém může vznikat právě několik Taylorových kuželů současně. Tato metoda elektrostatického zvlákňování je tou nejefektivnější a je nejvhodnější k průmyslové výrobě nanovláken. Elektroda použití při této metodě je elektroda válcové nebo drátová/strunová (Jirsák 2004).



Obr. 8 Právě probíhající elektrostatické zvlákňování z válcové elektrody se zachytávanými nově vytvořenými nanovláknými na kolektoru (www.elmarco.cz, 2008)

6.2 Enkapsulace

Enkapsulaci lze popsat jako metodu, která využívá aplikaci jiných látek do nitra či povrchu tzv. nosiče. Tato metoda umožňuje postupné a kontrolované uvolňování zejména léčiv. Kapsle se skládají z jádra (aktivní látka) a polymerního obalu. Cílem enkapsulace je možnost řízení postupného uvolňování aktivní látky z polymerního obalu, kdy se obsah kapsle s postupem času pomalu uvolňuje.

Většina technik enkapsulace je založena na tvorbě kapek aktivní látky, která je později obklopena polymerní matricí (nosný materiál). V dnešní době je známo několik metod výroby kapslí např. sprejové sušení, sprejové chlazení, elektrostatické sprejování, atd. (Reis 2006, Vrbková 2015).

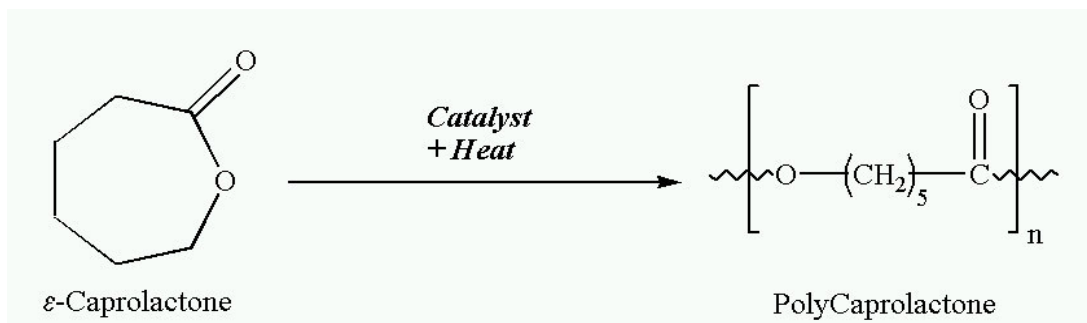
7 ALIFATICKÉ POLYESTERY

Alifatické polyestery zaznamenaly v posledních letech zvýšené využití zejména v biomedicínských aplikacích. Hlavním důvodem používání tohoto typu polyesteru je jeho biokompatibilita a biodegradabilita. Uplatňují se jako nosiče při cílené/řízené aplikaci léčiv, chirurgické nitě či jako scaffoldy (lešení) v oblasti tkáňového inženýrství. Charakteristickým znakem polyesterů je přítomnost esterových vazeb $-COO-$ v polymerním řetězci. Esterové vazby umožňují za přispění enzymů hydrolytický rozklad polyesteru.

Skupinu alifatických polyesterů tvoří 4 hlavní alifatické polyestery, ale i další sloučeniny. Mezi tuto skupinu patří PHB (polyhydroxybutyrát), PLA (kyselina polylactonová), PBS (polybutylen sukcinát) a PCL (Poly- ϵ -kaprolakton) (Bikiaris 2013, Vroman 2009).

7.1 Poly- ϵ -kaprolakton (PCL)

Poly- ϵ -kaprolakton (PCL) je biologický degradabilní semikrystalický polymer konkrétně patřící do skupiny polyesterů, konkrétně alifatických. Vyznačuje se nízkou teplotou tání ($t_m=59^\circ\text{C}$) a také nízkou teplotou skelného přechodu ($t_g= -72^\circ\text{C}$). PCL je polymer, který má vysoké prodloužení při přetržení, ale velmi nízkou pevnost v tahu, která se pohybuje okolo 23 MPa. Molekulová hmotnost tohoto polymeru se pohybuje od 3000 do 80 000 g. mol⁻¹. Typickým procesem přípravy poly- ϵ -kaprolaktonu je katalytická polymerizace s otevřením kruhu (ROP, ring - opening polymerization) ϵ -kaprolaktonu (Garkhal, 2007, Smrčková, 2009).



Obr. 9 Proces katalytické polymerizace s otevřením kruhu ϵ -kaprolaktonu (Wikipedia 2016)

PCL původem nepochází z obnovitelných přírodních zdrojů, ale i přes tuto skutečnost je plně biodegradabilní. Je to z důvodu velké podobnosti jeho chemické struktury s chemickou strukturou tuků a olejů. PCL je polymer, který se rozkládá hydrolýzou esterové vazby a to i při fyziologických podmínkách a proto je možné tento typ polymeru využívat v implantační technice. Další vlastností, která je velmi žádoucí při použití materiálu v medicínských aplikacích, je vyšší hydrofóbnost než v případě PLA nebo PGA. Díky této vlastnosti je doba rozkladu mnohem delší, řádově 2 - 3 let (Jerome 2008, Petráš 2009).

7.1.2 Využití PCL v medicíně

PCL má žádoucí mechanické vlastnosti, pomalou rychlost biologické degradability a je biologicky kompatibilní a proto je velmi hojně využíván v lékařských, farmaceutických a biomedicínských aplikacích. Další velmi žádanou vlastností PCL je minimální zánětlivá reakce organismu. Konkrétní použití polymeru je například dlouhodobé uvolňování léčiv, tkáňové inženýrství (výroba scaffoldu, implantátů), výroba chirurgických šicích materiálů či jako součást kompozitu pro výplň kořene zubu (Bikiaris 2013).

7.2 PLC (PURASORB)

PLC je kopolymer kyseliny poly-L-mléčné a poly- ϵ -caprolaktonu v různých poměrech. PLC je dodáván ve formě bílých až světle hnědých granulí či vloček. Tento materiál je vhodným materiálem k výrobě cévních náhrad zvláště v poměru PLLA/PCL (75/25) (Mo 2014). Článek (Dong, 2008) dokazuje, že testovaný kopolymer v poměru PLLA/PCL (70/30) je dlouhodobě kompatibilní s endotelovými buňkami.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8 METODIKA

Hlavním cílem této diplomové práce je začlenění molekul oxidu dusnatého pomocí SNAP (S-Nitroso-N-Acetylpenicillinamine) do nanovláčené struktury vytvořené elektrostatickým zvlákněním polymerních roztoků tří typů alifatických polyesterů tak, aby byla podporována buněčná adheze a plynulé uvoňování oxidu dusnatého do vnějšího prostředí. Nejprve byl testován poly- ϵ -kaprolakton (PCL) spolu s PURASORB (PLC) jejichž specifikace je popsána níže (kapitola 8.1). Toto testování inspirované články (Jang 2012, Romanowicz 2013, Jeong 2014) bylo označeno jako Experiment č. 1 a probíhalo následujícím způsobem. Z obou testovaných materiálů byly vytvořeny polymerní roztoky o koncentraci 7 hm %. Polymerní roztoky byly posléze rozděleny na celkem osmi vzorků o identickém objemu. Do každého připraveného vzorku (č. 1-8) bylo přidáno určité množství laboratorně připraveného SNAPsu (příprava kapitola 8.2) tak, aby v každém vzorku byla jiná koncentrace (0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm %). Vzorky byly důkladně promíseny a posléze byly jednotlivé vzorky elektrostaticky zvlákněny na zařízení NANOSPIDERTM o sériovém označení NS 1WS500U za podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 8.3 (Sill 2008).

Pro každý vzorek byla vytvořena planární nanovláčená struktura, ve které byl inkorporován donor oxidu dusnatého. Každá struktura byla důkladně označena, zabalena do aluminiové folie a uchovávána v chladu po celou dobu průběhu Experimentu č. 1, protože SNAPs přidány do jednotlivých vzorků reaguje se světlem a teplem, což by mohlo zásadně ovlivnit výsledky experimentů.

Z planárních vrstev byly vytvořeny vzorky, které byly použity k testování *in vitro*. Testování *in vitro* mělo přinést informaci o vhodné koncentraci SNAPsu v nanovláčené struktuře a jeho vlivu na testované buněčné linie. Celé testování *in vitro*, včetně mikroskopických technik, je podrobně popsáno v kapitole č. 9.

Dalším testováním, kterému byly vystaveny planární vrstvy, bylo testování pomocí nepřímé metody detekce uvolňování oxidu dusnatého - Griess Assay. Příprava této metody testování je podrobně popsána v kapitole 8.4.

Identický postup byl zvolen i v případě druhé série testů označené jako Experimentu č. 2. Avšak byl testován pouze jeden materiál, jímž byl poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) o koncentraci 16 hm % a $M_w = 45\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Vzhledem získaným výsledkům z průběhu Experimentu č. 1 byla zredukována koncentrace SNAPsu pouze na tři koncentrace (0; 0,2 a 0,4 hm %). Vytvořené planární nanovláčené vrstvy bylo rovněž potřeba uchovávat v chladu a tmě ze stejného důvodu jako tomu bylo v Experimentu č. 1.

Posledním pokusem této diplomové práce bylo testování, zda má sterilizace pomocí 70 % ethanolu vliv na uvolňování oxidu dusnatého z nanovláčkových struktur. Byly tedy vytvořeny dvě série vzorků, přičemž jedna série byla vysterilizována pomocí 70 hm% etanolu po dobu 30 minut a druhá série nebyla žádným způsobem vysterilizována. Obě série vzorků byly osazeny buněčnou linií, 24 hodin inkubovány a vyhodnoceny pomocí metabolického MTT testu. Přesný průběh testování je uveden v kapitole 12.

8.1 Příprava roztoku PCL a PLC pro elektrostatické zvlákňování

Pro přípravu roztoku byly celkem zvoleny následující tři typy polymerů, které byly použity ve dvou experimentech (Experiment č. 1, Experiment č. 2). V Experimentu č. 1 byl použit kopolymer složený z kyseliny mléčné a kaprolaktonu - PLC 7015, PURASORB v poměru 70/30. Druhým použitým polymerem byl polykaprolakton - PCL, $M_w = 80\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma Aldrich. V Experimentu č. 2 byl testován pouze jeden materiál. Konkrétně se jednalo o polykaprolakton o odlišné molekulové hmotnosti než bylo v případě Experimentu č. 1. V Experimentu č. 2 byl tedy použit polykaprolakton - PCL, $M_w = 45\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma Aldrich. Polymery byly rozpuštěny v rozpouštědlovém systému *chloroform/kyselina octová/ethanol* v poměru 8/1/1 (v/v/v). V Experimentu č. 1 bylo k výrobě planárních vrstev připraveno celkově 100 g roztoku o koncentraci polymerní složky 7 hm %. Tyto hodnoty byly shodné v případě přípravy roztoku PCL a i v případě přípravy roztoku PLC.

V Experimentu č. 2 byl zvlákňovací roztok připraven stejným postupem jako v Experimentu č. 1, avšak koncentrace polymerní složky byla zvýšena na 16 hm %. Celkově bylo připraveno 100 g zvlákňovacího roztoku, který byl použit k výrobě planárních vrstev.

8.2 Příprava SNAPs

Příprava SNAPs je poměrně složitá a časově náročná metoda. Prvním krokem bylo navážení 200 mg N-acetyl-DL-penicilaminu ($M_w=191,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Toto množství N-acetyl-DL-penicilaminu bylo rozpuštěno v 5 ml methanolu. Absolutního rozpuštění N-acetyl-DL-penicilaminu bylo docíleno použitím sonifikátoru. K úpravě pH bylo přidáno 1,5 ml jednomolární kyseliny chlorovodíkové (HCl) a 100 μl kyseliny sírové (H_2SO_4). Roztok byl promísen. Do vzniklého roztoku bylo přidáno 144,9 mg dusitanu sodného NaNO_2 ($M_w=69 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Vzniklý roztok byl po dobu 30 minut míchán pomocí rotačního míchadla. Po uplynutí 30 minut byl roztok chlazen po dobu 45 minut. Po ochlazení roztok získal zelený/červený odstín, který byl v této fázi žádoucím. Roztok byl vložen do vakuové odparky, kde docházelo k odpaření methanolu z roztoku. V této fázi již bylo možné pozorovat vznik tmavě zelených krystalků, které se zachytávaly na stěně vakuové rozparky. Téměř hotový SNAPs byl poté dosušován po dobu dvou dnů ve vakuu za pokojové teploty. Tento postup byl zapůjčen MTU z důvodu spolupráce na tomto výzkumu.

8.3 Elektrostatické zvlákňování

Jak již bylo řečeno v Experimentu č. 1 bylo pro oba materiály připraveno celkem 100 g roztoku o koncentraci 7 hm %. Do obou polymerních roztoků bylo přidáno různé množství SNAPs a to takové, abychom dosáhli těchto koncentrací SNAPs v polymerních roztocích: 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm %. Z těchto požadavků bylo tedy odvozeno, že bylo naváženo toto množství SNAPs: 0, 200, 400 a 600 mg.

V Experimentu č. 2 byl použit pouze jeden materiál, z kterého byly vyrobeny jednotlivé vzorky. Stejně jako v Experimentu č. 1 bylo připraveno 100 g roztoku s koncentrací polymeru 16 hm %. V tomto experimentu byly podmínky pozměněny a koncentrace SNAPs v polymerních roztocích byla určena následovně: 0; 0,2 a 0,4 hm %. Z toho vyplývá, že množství SNAPs bylo naváženo následovně: 0, 200 a

400 mg. SNAPs byl do všech roztoku přidán přibližně hodinu před elektrostatickým zvlákňováním, které probíhalo pomocí zařízení NanospiderTM o sériovém označení NS 1WS500U.

Podmínky elektrostatického zvlákňování byly v obou případech totožné. Zvlákňovací proces byl proveden pomocí 0,2 mm struny, na kterou byly postupně nanесeny vytvořené roztoky polymeru případně roztoky polymeru společně s požadovanými koncentracemi SNAPs. Tyto roztoky byly nanášeny na strunu za použití štěrbin o velikosti 0,5 mm. Vytvořená vlákna byla zachytávána na netkanou textilií, která byla odtahována rychlostí 15 mm/min. Kolektor byl umístěn ve vzdálenosti 170 mm od struny. Napětí použité při zvlákňování bylo - 10 kV na kolektoru a + 35 kV na struně. Zvlákňování probíhalo za teploty 23°C a relativní vlhkosti 35 % rh.

8.4 Griess Assay

Příprava Griess Assay v tomto případě probíhala podle článku (Ridnour L., A., 2000), který pojednává o postupu přípravy Griessova činidla a celkovém vyhodnocení a zpracování Griess Assay.

Byl připraven roztok 100 μM dusitanu sodného (Sigma Aldrich). Poté bylo toto připravené množství bylo dvojnásobně ředěno v následujících koncentracích: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 a 1,56 μM . Do takto připravených roztoků dusitanu sodného bylo připipetováno 100 mM fosfátového pufru (PBS, Sigma Aldrich) o pH 7,4, který obsahoval 17 mM sulfanilamidu (SULF, Sigma Aldrich) a 0,4 mM N-(1-naftyl)-ethylen-diaminu (NEED, Sigma Aldrich). Vzhledem k použití fosfátového pufru jako média byla hodnota absorbance zvolena 496 nm. Pro destilovanou vodu byla zvolena hodnota absorbance 539 nm. Tyto roztoky byly poté spektrofotometricky vyhodnoceny a vyneseny do závislosti absorbance a koncentrace. Pomocí lineární extrapolace byla stanovena kalibrační křivka.

9 TESTOVÁNÍ *IN VITRO*

Připravené vzorky byly nejprve vysterilizovány v 70 hm % ethanolu po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byly vzorky dvakrát opláchnuty fosfátovým pufrem (PBS, Lanza). Opláchnuté vzorky byly poté osázeny připravenou buněčnou linií HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells, Lonza), která byla kultivována v médiu určeném pro endotelové buňky (EBM-2). Tento typ buněčné linie byl použit pro testování materiálů použitých v Experimentu č. 1. Druhou použitou buněčnou linií byla buněčná linie CASCAM (hladkosvalové buňky), která byla také kultivovaná v médiu určeném pro hladkosvalové buňky (EBM-2). Tato buněčná linie byla použita pro potřeby testování materiálu Experimentu č.2. Kultivace probíhala za konstantních podmínek, tzn. za teploty 37°C a 5% CO₂. Po dosažení 80% konfluence (vytvoření souvislé vrstvy buněk) byly buňky ztrypsinizovány a nasazeny na testované materiály v koncentraci 4,5 x 10⁴ buněk na testovací jamku (pasáž 5). Testování probíhalo v 96 - jamkových destičkách po dobu 14 dnů. Testovacími dny byly určeny 1., 3., 7. a 14. den kultivace. Buněčná morfologie na testovaných materiálech byly použity tyto mikroskopické techniky: fluorescenční mikroskopie a skenovací elektronová mikroskopie. Buněčná viabilita byla testována pomocí MTT testu.

9.1 Flourescenční mikroskopie

Vzorky analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie byly taktéž dvakrát propláchnuty fosfátovým pufrem (PBS). Propláchnuté vzorky byly zafixovány pomocí vymraženého methanolu o teplotě -20°C po dobu 30 minut. Následovalo opětovné dvojí promytí fosfátovým pufrem (PBS). Omyté vzorky byly obarveny fluorescenčním barvivem propidium jodidem (Sigma Aldrich) po dobu 10 minut s důrazem na nepřítomnost světla. Po uplynutí 10 minut byly vzorky dvakrát propláchnuty fosfátovým pufrem (PBS) a následně analyzovány invertovaným fluorescenčním mikroskopem NIKON Eclipse Ti X cite 120q(zvětšení 40x).

9.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Vzorky určeny pro skenovací elektronovou mikroskopii byly dvakrát opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS) a poté zafixovány ve 2,5 hm % roztoku glutaraldehydu (Sigma Aldrich) po dobu 30 minut při teplotě 4°C. Po uplynutí této doby byly vzorky propláchnuty vzrůstající ethanolovou řadou v intervalu 5 minut (60, 70, 80, 90, 96 a 100 hm % ethanol). Vzorky byly uloženy na parafilm, kde byly ponechány do úplného vyschnutí. Po vyschnutí byly vzorky pozlaceny a následně analyzovány pomocí elektronového mikroskopu TESCAN VEGA 3.

9.3 Stanovení metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu

MTT test je typ testu, kterým je možné měřit viabilitu buněk, které jsou osazeny na testovaný materiál. Jedná se o kolorimetrický test, který je založen na redukci solubilní tetrazolové soli MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan ve formě fialových nerozpustných krystalků. Tato reakce probíhá na mitochondriální membráně vlivem mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk. Počet živých buněk je indikován množstvím redukovaného MTT. Přidáním okyseleného isopropanolu se krystalky rozpustí. MTT test byl realizován v 96 - jamkových sterilních destičkách, do kterých bylo připipetováno 150 µl buněčného média a 50 µl MTT roztoku (Sigma Aldrich). Poté byly přeneseny jednotlivé testované materiály, které byly osázeny buňkami. Vzorky byly inkubovány za teploty 37°C po dobu 4 hodin. Po uplynutí inkubační doby byly fialové krystalky plně rozpuštěny pomocí okyseleného isopropanolu o objemu 200 µl.

Zabarvený vzorek byl poté přepipetován do jiné čisté 96 - jamkové destičky. Na spektrofotometru byla měřena absorbance při 570 nm a 650 nm. Výsledná absorbance byla určena jako rozdíl absorbancí při 570 nm a 650 nm a po odečtení od hodnoty negativních kontrol. Negativními kontrolami se rozuměly naměřené absorbance vzorků inkubovaných pouze v médiu bez přítomnosti buněk.

10 EXPERIMENT Č. 1

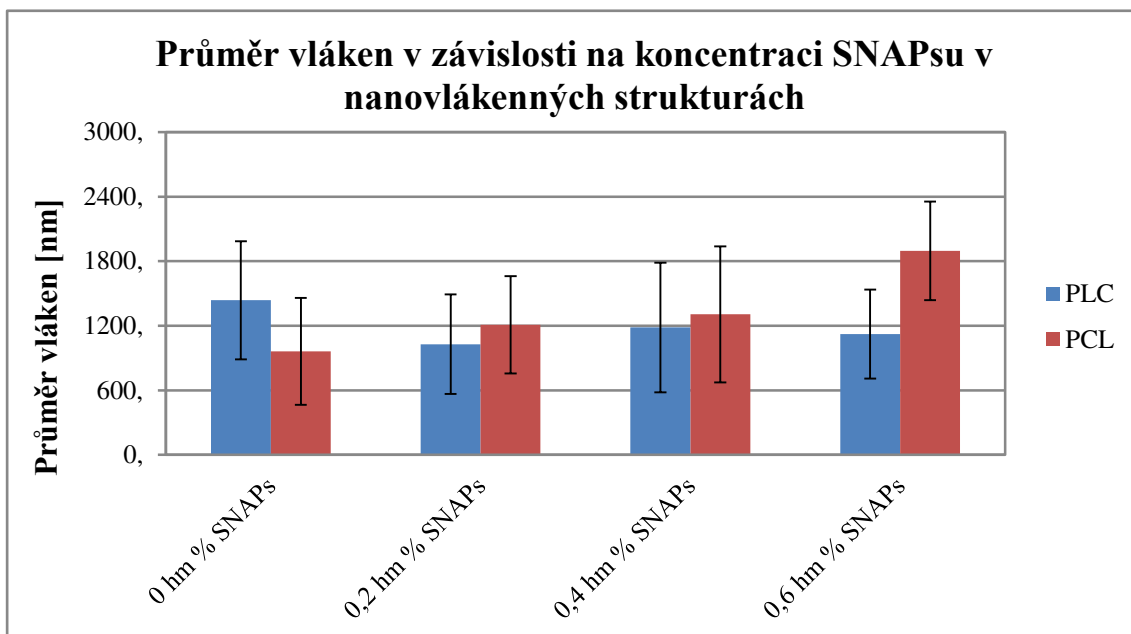
10.1 Vyhodnocení *in vitro* testů

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byly měřeny průměry vláken vytvořených nanovláčkových struktur, které byly vytvořeny z jednotlivých polymerních roztoků s rozdílnou koncentrací přidaného SNAPsu (0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm %). Bylo nutné si ověřit, zda bude přítomnost SNAPsu v polymerních roztocích mít zásadní vliv na kvalitu a velikost vláken.

Pro každou variantu tedy proběhlo celkem 100 měření průměrů vláken z čehož byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Pro toto zpracování byl použit program Image J. Obě tyto hodnoty byly poté zaneseny do tabulky č. 2 a dále graficky zpracovány (obr. 10).

Tab. 2 Seznam testovaných materiálů a jejich charakterizace (Experiment č. 1)

č.	Materiál	Koncentrace SNAPs [%]	Průměry vláken/100 měření [nm]	Směrodatná odchylka [nm]
1	PLC	0	1437,98	549,33
2	PLC	0,2	1029,13	461,60
3	PLC	0,4	1184,34	603,15
4	PLC	0,6	1122,60	414,49
5	PCL	0	962,61	497,08
6	PCL	0,2	1208,79	452,06
7	PCL	0,4	1306,25	631,76
8	PCL	0,6	1869,33	458,21

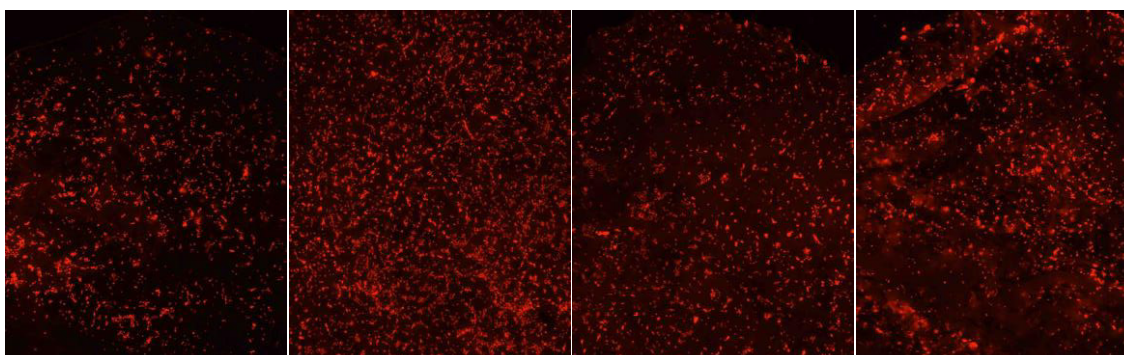


Obr. 10 Průměr vláken jednotlivých typů polymerních roztoků (7 hm% PLC a 7 hm% PCL) s přidavkem SNAPsu o různých koncentracích (0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm%) a jeho vliv na průměr vláken tvořených elektrostatickým zvlákňováním

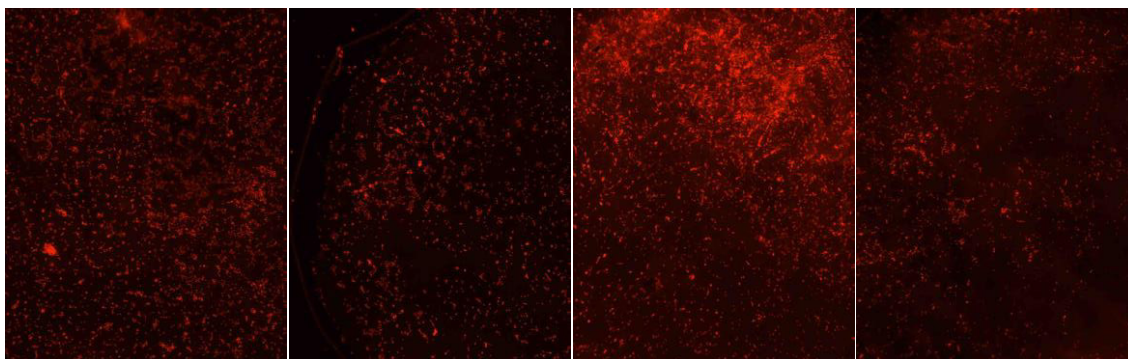
10.1.1 Fluorescenční mikroskopie

Obarvením buněčných jader pomocí fluorescenčního barviva propidium jodidu lze posoudit za použití fluorescenčního mikroskopu rozmístění buněk na testovaném materiálu. Testované materiály byly označeny pomocí číslic 1-8 (stejně jako v Tab. 1). Po dobu 14 testovacích dnů probíhala proliferace buněk po povrchu tkáňového nosiče (scaffoldu). Snímky byly vyhodnoceny po 1. testovacím dni a 14. den.

Fluorescenční mikroskopie - 1. testovací den



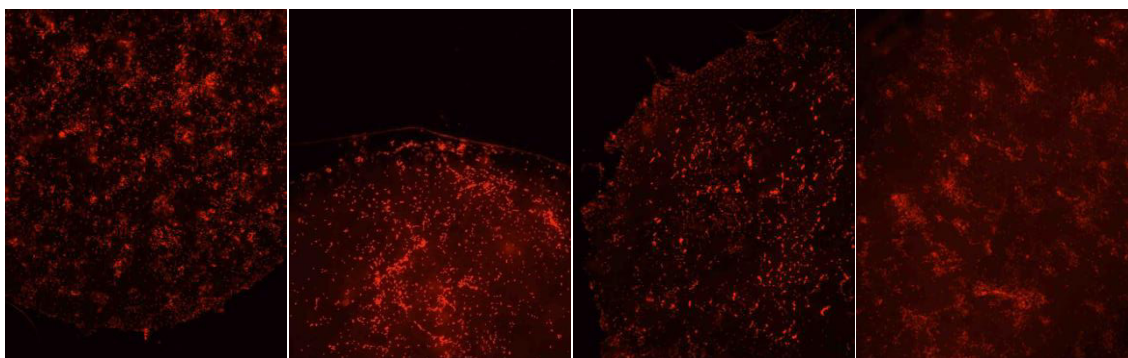
Obr. 11 Snímky č. 1-4 (7 hm % PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)



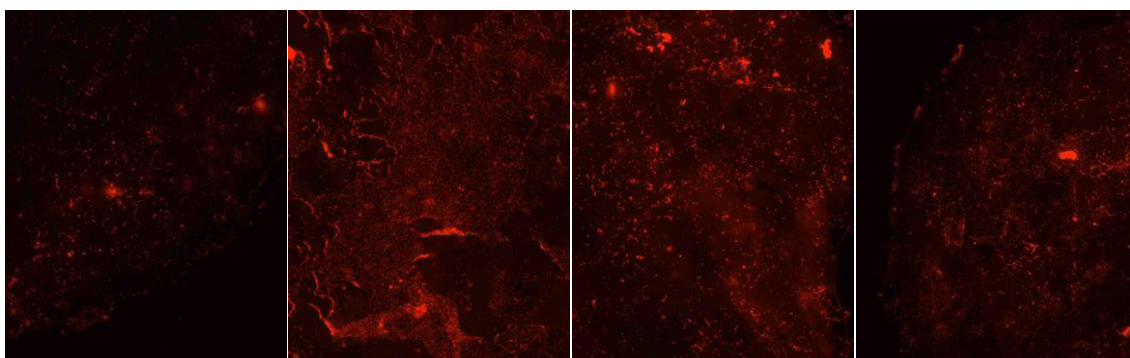
Obr. 12 Snímky č. 5-8 (7 hm % PCL + 0, 0,2, 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)

Po prvním testovacím dni bylo u všech osmi vzorků zřejmé pravidelné rozložení buněk po plochách tkáňových nosičů. Avšak u některých snímků jsou patrné shluky buněk (např. snímek č. 4 a č. 7). Tyto buněčné shluky lze připisovat nehomogenní vrstvě tkáňového nosiče, což ovlivňuje proliferaci buněk. Naopak vzorek č. 2 vykazuje nejvíce pravidelné rozložení buněk po povrchu testovaného materiálu. V tomto případě se jedná o 7 hm % PLC + 0,2 hm % SNAPs.

Fluorescenční mikroskopie - 14. testovací den



Obr. 13 Snímky č. 1-4 (PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)

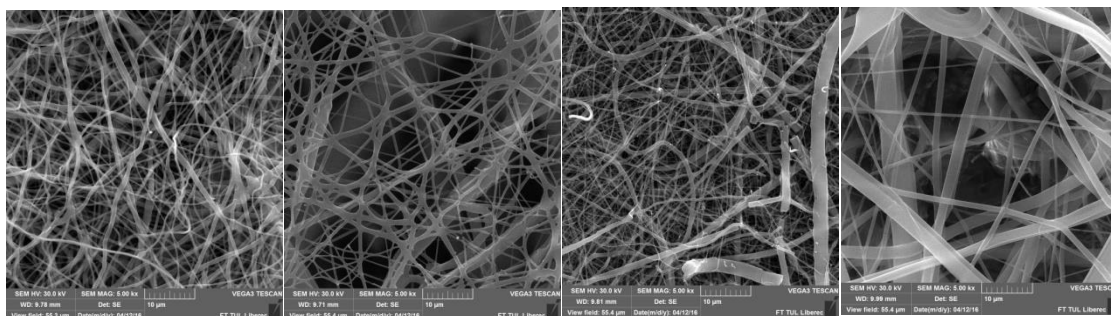


Obr. 14 Snímky č. 5-8 (PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)

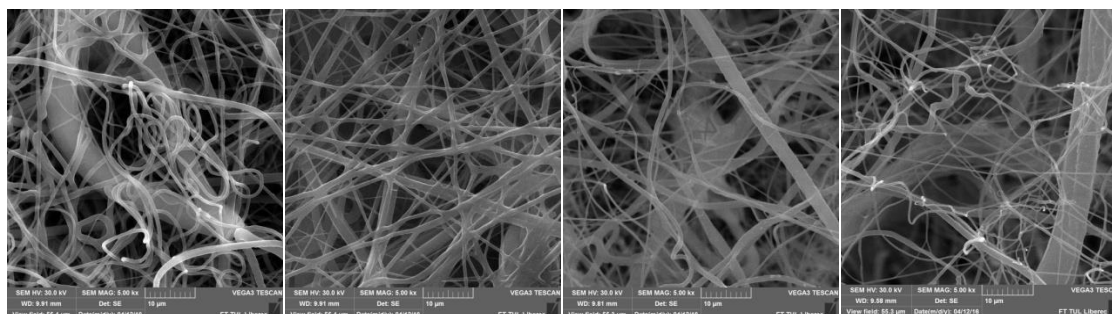
Na konci testování tzn. 14 den, bylo u vzorku č. 6 (7 hm % PCL + 0,2 hm % SNAPs) prokázána téměř konfluentní vrstva buněk, což je patrné na snímcích z fluorescenční mikroskopie. Naopak u vzorku č. 5 (7 hm % PCL + 0 hm % SNAPs), který je bez přídavku SNAPsu, je zřejmá nejméně souvislá vrstva buněk. Další vzorky, které vykazují rovněž konfluentní vrstvu buněk, jsou č. 7 (7 hm % PCL + 0,4 hm % SNAPs) a č. 4 (7 hm % PLC + 0,6 hm % SNAPs).

10.1.2 Skenovací elektronová mikroskopie bez přítomnosti buněk

Pomocí SEM byla pozorována vláknenná struktura bez přítomnosti buněčné linie. Do vláknenné struktury byl aplikován SNAPs. Použité snímky mají zvětšení 5000 x a měřítko 10 μm . Výsledné snímky jsou zobrazeny černobíle a označeny pomocí čísel.



Obr. 15 Snímky č. 1-4 (PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)

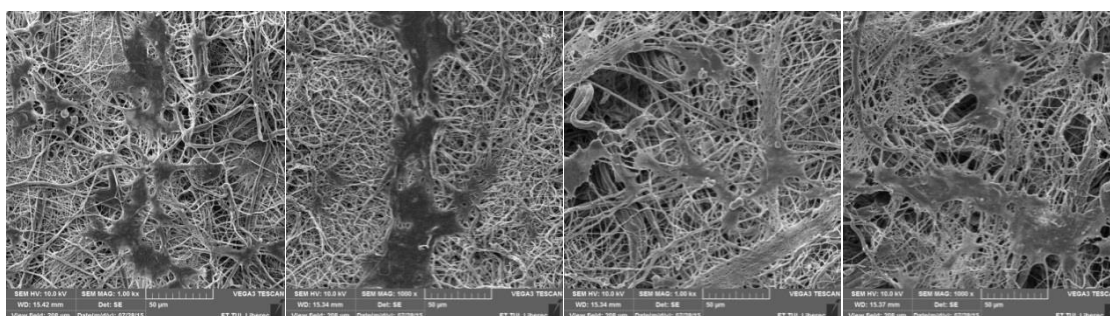


Obr. 16 Snímky č. 5-8 (PCL + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)

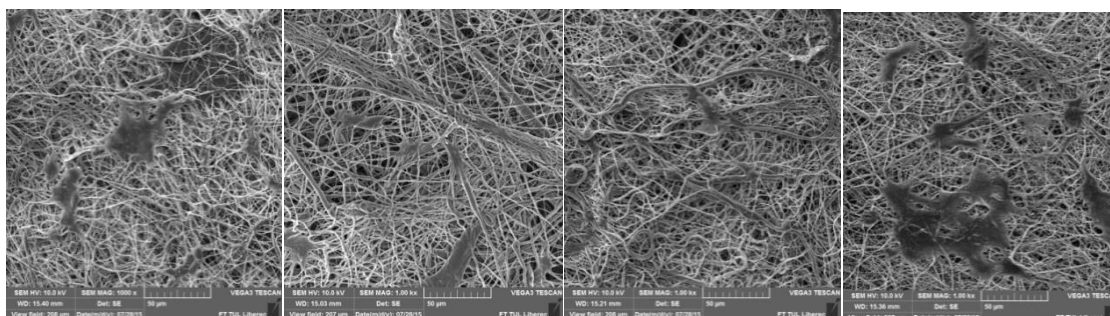
Testované materiály s aplikovaným SNAPsem byly testovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Toto testování probíhalo bez přítomnosti buněčné linie. Na snímcích je možné pozorovat detailně vláknennou strukturu jednotlivých scaffoldů. Snímek č. 6 (7 hm % PCL + 0,2 hm % SNAPs) vykazoval vláknennou strukturu s malou přítomností polymerních defektů a vysokou pravidelností vláken.

10.1.3 Skenovací elektronová mikroskopie po 1 dni kultivace

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla pozorována vlákněná struktura tkáňového nosiče (scaffoldu), ale také prostorový povrch buněk. Výsledný obraz je zobrazen černobíle. Zvětšení bylo 1000x. Jednotlivé vzorky byly opět označeny pomocí číslic a to 1-8.



Obr. 17 Snímky č. 1-4 (PLC + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)

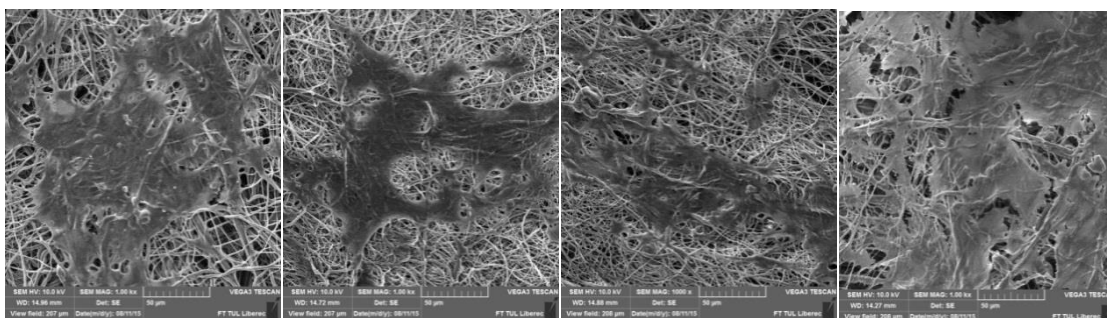


Obr. 18 Snímky č. 5-8 (PCL + 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm %SNAPs)

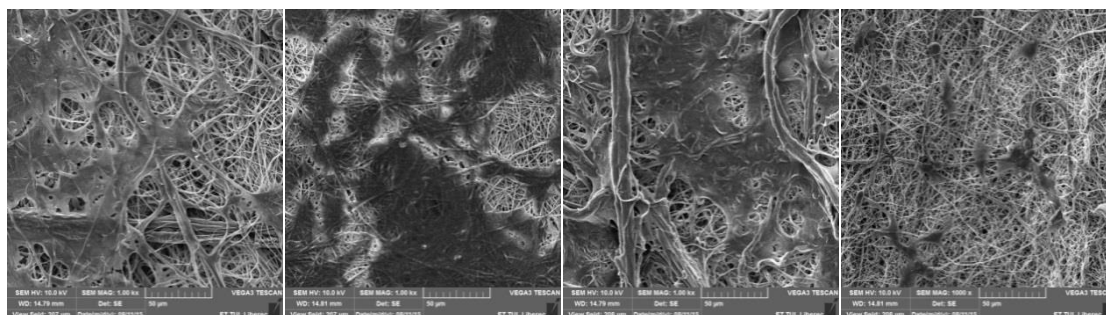
Po jednom dni kultivace je patrné, že buňky, které byly nasazeny na jednotlivé testované tkáňové nosiče (scaffoldy), adherovaly k testovaným materiálům. U všech testovaných materiálů tedy byla prokázána pomocí SEM přítomnost přilnutých buněk na povrchu jednotlivých materiálů.

10.1.4 Skenovací elektronová mikroskopie po 14 dnech buněčné kultivace

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla pozorována vlákenná struktura tkáňového nosiče (scaffoldu), ale také prostorový povrch buněk. Výsledný obraz je zobrazen černobíle. Zvětšení je 1000x a snímky byly vytvořeny po 14 dnech buněčné kultivace. Jednotlivé vzorky byly opět označeny pomocí číslic a to 1-8.



Obr. 19 Snímky č. 1-4 (PLC+ 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)



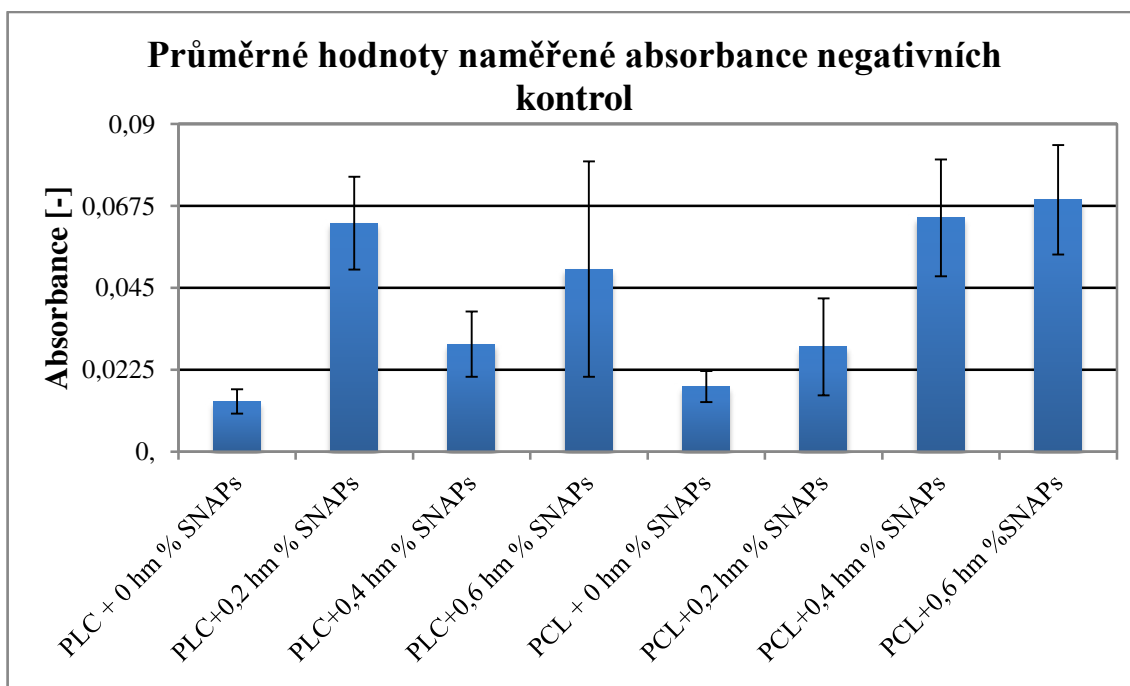
Obr. 20 Snímky č. 5-8 (PCL + 0,2; 0,4 a 0,6 hm % SNAPs)

Ze snímků z elektronového mikroskopu je patrné, že nejvíce adherovaných buněk je na materiálu č. 6, což je PCL + 0,2 hm % SNAPs, které vytvářejí souvislou vrstvu. Naopak materiál č. 8 téměř souvislou vrstvu přilnutých buněk nevytváří. Jedná se o materiál PLC + 0,6 hm % SNAPs.

10.1.5 Vyhodnocení metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu

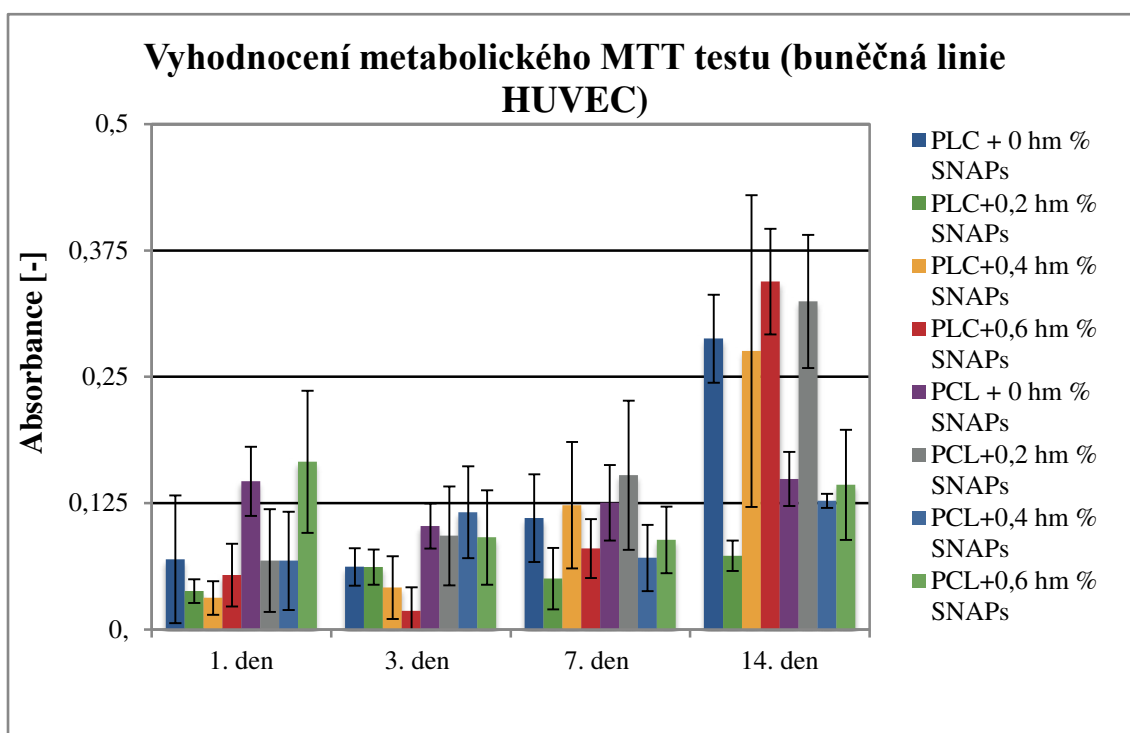
Metabolická aktivita buněk byla měřena pomocí MTT testu po 1, 3, 7 a 14 dnech buněčné kultivace. Tkáňové nosiče byly vysterilizovány pomocí 70 hm % EtOH po dobu 30 minut. Po proběhlé sterilizaci byly osázeny buněčnou linií HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells, Lonza), která byla kultivována v médiu určeném pro endotelové buňky (EBM-2). Kultivace probíhala za konstantních podmínek, tzn. za teploty 37°C a 5% CO². Po dosažení 80% konfluence byly buňky ztrypsinizovány a nasazeny na testované materiály v koncentraci 4,5x10⁴ buněk na testovací jamku (pasáž 5). Testování probíhalo v 96 - jamkových destičkách po dobu 14 dnů.

Tato testovací metoda byla využita z důvodu vhodnosti materiálu kombinované s materiály obohacené o přidaný SNAPs v různých koncentracích. Byly celkově použity dva testované materiály. V prvním případě byl testován kopolymer poly-e-caprolaktonu a kyseliny polymléčné do jehož struktur byl přidán SNAPs o koncentracích: 0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm %. Druhým testovaným materiálem byl poly-e-caprolakton o stejných koncentracích SNAPsu ve struktuře polymeru.



Obr. 11 Hodnoty absorbance negativních kontrol polymerů (7 hm% PLC a 7 hm% PCL) s různou koncentrací SNAPsu (0, 0,2 0,4 a 0,6 hm %)

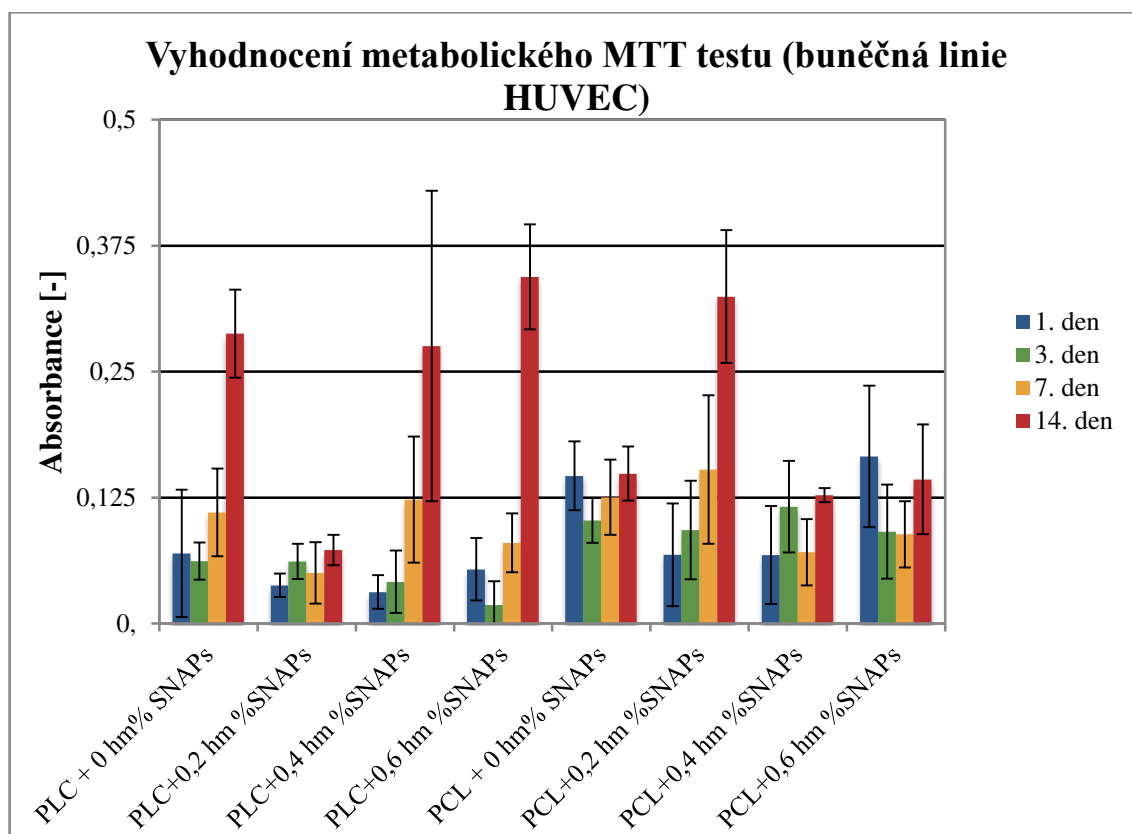
Obr. 21 zobrazuje negativní kontroly naměřené absorbance pro jednotlivé testované vzorky. Materiály, které neobsahují SNAPs ve své struktuře vykazují nejnižší hodnotu absorbance a se zvyšující se koncentrací SNAPsu by se měla absorbance materiálu zvyšovat jako je tomu u testovaného materiálu PCL. Z naměřených absorbancí materiálu PLC je zřejmé, že vytvořená vlákna nejsou homogenní, což znamená, že struktura nanovláknenného nosiče ovlivňuje výsledky buněčné proliferace.



Obr. 22 Hodnoty absorbance testovaných materiálů měřených po 1., 3., 7. a 14. dnubuněčné kultivace. Hodnota absorbance je vypočítána jako rozdíl hodnot při 570 a 650 nm po odečtení průměrné hodnoty absorbance od negativních kontrol - rozděleno dle kultivační doby

Z naměřených výsledků uvedených v obr. 22 je patrné, že buněčná viabilita vzrůstala konstantně na následujících materiálech: PLC, PLC + 0,4 hm % SNAPs, PLC + 0,6 hm % SNAPs a PCL + 0,2 hm % SNAPs. Na zbylých testovaných vzorcích nebyl tento konstantní nárůst buněčné viability přítomen. Možným důvodem je prudké a velké uvolnění oxidu dusnatého, čímž patrně došlo k rapidnímu nárůstu jeho koncentrace. Ačkoliv by například vzorek PLC + 0,2 hm % SNAPs neměl obsahovat velké množství oxidu dusnatého, negativní kontrola ukazuje na vysokou hodnotu absorbance, což může souviset s větším množstvím uvolněného NO, který působí ve vyšších dávkách

cytotoxicky. Pravděpodobně ze stejného důvodu nedochází ke zvýšení buněčné viability u vzorku PCL + 0,4 hm % SNAPs a PCL + 0,6 hm % SNAPs. Ze získaných výsledků je zřejmé, že nejideálnějším vzorkem pro proliferaci buněk je PCL + 0,2 hm % SNAPs. Obr. 23 má v sobě zahrnutá stejná data jako jsou zpracována v obr. 22, avšak pro lepší názornost byl graf upraven tak, aby bylo možné porovnat hodnoty absorbance pro jednotlivé materiály.



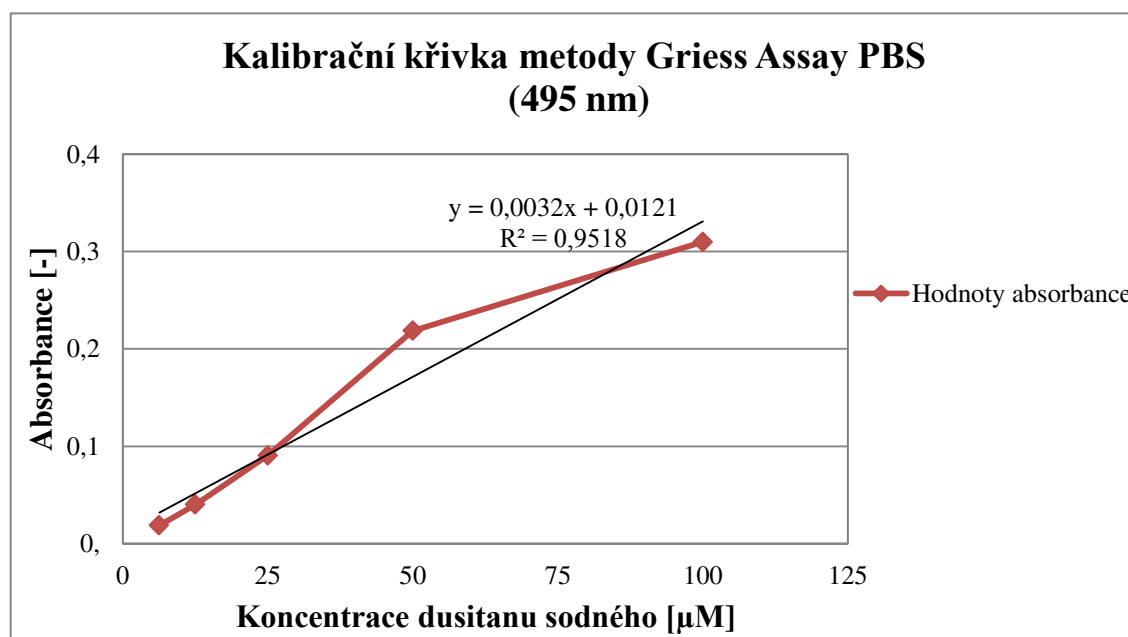
Obr. 23 Hodnoty absorbance testovaných materiálů měřených po 1., 3., 7. a 14. dnu buněčné kultivace. Hodnota absorbance je vypočítána jako rozdíl hodnot při 570 a 650 nm po odečtení průměrné hodnoty absorbance od negativních kontrol – materiálové rozdělení

10.1.6 Vyhodnocení metody Griess Assay

Detekce oxidu dusnatého a jeho metabolitů probíhalo právě pomocí nepřímé metody tzv. Griessova metoda neboli Griess Assay. Testované materiály, ve kterých byl přítomen SNAPs, byly nejprve nastříhány na malé čtverce o hmotnosti 0,0500 g. Jednotlivé vzorky (5 vzorků pro každý testovaný materiál) byly umístěny do plastových zkumavek, do kterých byl přidán fosfátový pufr (PBS) o pH 7,4 a objemu 4 ml. Vzorky byly umístěny do inkubátoru, kde byla udržována stabilní teplota 37°C. Testované materiály byly uloženy v inkubátoru po dobu jednoho testovacího dnu. Po uplynutí této

doby byly vzorky testovaného materiálu přesunuty do jiných plastových zkumavek, kam bylo posléze přidáno stejné množství fosfátového pufru (PBS) jako v prvním případě. Materiály byly opět uloženy do inkubátoru, kde zůstaly do uplynutí další naplánované inkubační doby, tedy po uplynutí 3 dnů. Tentýž postup byl zvolen v dalším testovacím dnu, tedy 7. den.

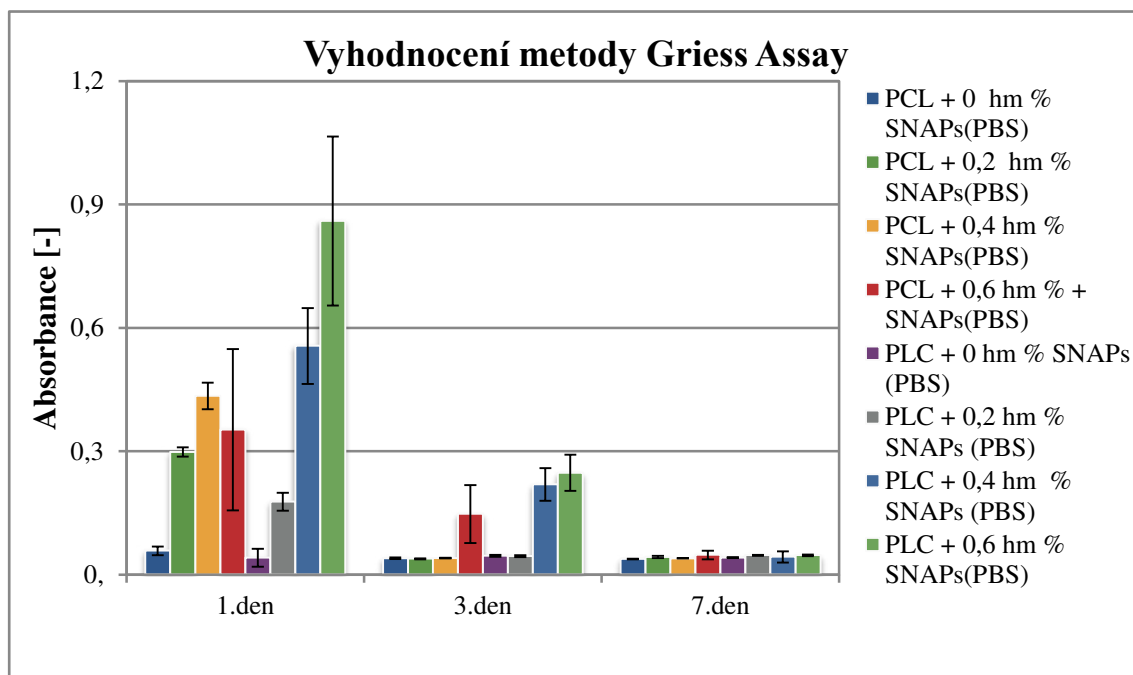
K vyhodnocení detekce oxidu dusnatého a jeho metabolitů bylo nejprve nutno vytvořit kalibrační křivku (obr. 24) v různých vlnových délkách pro hodnoty absorbance, které nabývají nejvyšších hodnot v okolí 495 nm. Posléze byl každý testovací den odebrán vzorek PBS o objemu 100 μ l jenž byl vložen do čisté 96 - jamkové destičky. K těmto vzorkům bylo přidáno 100 μ l 17 mM sulfanilamidu a přibližně 3 minuty poté 100 μ l 0,4 mM NEDD.



Obr. 24 Kalibrační křivka PBS vypočítána pro hodnotu 495 nm v různých v následujících koncentracích dusitanu sodného (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μ M).

Pomocí spektrofotometru byly jednotlivé roztoky, ve kterých byl přítomen vyloučený oxid dusnatý spolu s jeho metabolity, vyhodnoceny. Získané výsledky byly vyneseny do graficky zpracovány. Na obr. 25 je patrná obrovská hodnota absorbance v případě PLC + 0,6 hm % SNAPs v 1. testovacím dnu, což bylo s nejvyšší pravděpodobností způsobeno vyšší koncentrací SNAPsu ve struktuře vzorku. Třetí testovací den také nejvyšší hodnoty absorbance vykazuje PLC + 0,6 hm % SNAPs. Další vysoký nárůst v prvním testovacím dnu byl zjištěn i v případě PLC + 0,4 hm % SNAPs, který třetí testovací den nabývá velmi podobných hodnot jako testovaný

materiál PLC + 0,6 hm % SNAPs, který měl první testovací den velmi vysoké hodnoty absorbance, což signalizuje velmi prudké a rychlé uvolnění oxidu dusnatého do roztoku PBS, které simuluje svým pH přirozené vnitřní prostředí lidského těla. V sedmém testovacím dnu nabývaly všechny hodnoty absorbance testovaných materiálů velmi podobných hodnot, což znamená, že oxid dusnatý přestával být uvolňován po uplynutí 7 dnů od umístění do roztoku PBS a uložení do inkubátoru, který rovněž má za úkol simulovat fyziologickou teplotu lidského těla tzn. $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 25 Vyhodnocení nepřímé metody detekce oxidu dusnatého – Griess Assay. Hodnota absorbance měřena za 1., 3. a 7. den.

Z naměřených hodnot získaných metodou Griess Assay (obr. 25) bylo možné pozorovat hodnoty absorbance testovaných materiálů, tedy bylo možné vyhodnotit rychlost uvolňování derivátů oxidu dusnatého do vnějšího okolí. Z obr. 25 je zřejmé, že nehomogenita povrchu u materiálů PLC způsobuje prudké uvolnění oxidu dusnatého do vnějšího prostředí. Třetí inkubační den pouze následující materiály byly schopny uvolňování derivátů oxidu dusnatého z vnější struktury: PCL + 0,6 hm %, PLC + 0,4 hm % a PLC + 0,6 hm %. Zbylé testované materiály již třetí den nebyly schopny uvolňovat oxid dusnatý v zaznamenaném množství. Tento jev je nejspíše způsoben velkou koncentrací SNAPsu v jednotlivých jmenovaných strukturách materiálu a také z důvodu velké nehomogenity povrchu vzorků vytvořených z polymeru PURASORB (PLC). Toto tvrzení je rovněž potvrzené negativní kontrolou MTT testu

uvedenou na obr. 22 a také vizuálním vyhodnocením a porovnáním získaných snímků z mikroskopů vytvořených pomocí SEM a fluorescenční mikroskopie.

10.2 Diskuze výsledků – Experiment č. 1

V Experimentu č. 1 probíhalo testování dvou materiálů, které byly obohaceny o různé koncentrace donoru oxidu dusnatého. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, které materiály spolu s inkorporovaným SNAPsem budou nejvíce vhodné pro výrobu umělé cévní náhrady.

Nejprve bylo potřeba zjistit, zda přítomnost SNAPsu v polymerním roztoku neovlivní kvalitu a průběh elektrostatického zvlákňování a zda nějakým způsobem ovlivňuje strukturu vytvořených planárních nanovlákných vzorků. Nejlépe byl elektrostaticky zvlákňován vzorek č. 2 (7 hm % PLC + 0,2 hm % SNAPs). Relativně nízká směrodatná odchylka (v porovnání s ostatními vzorky) poukazuje na vyšší homogenitu nežli tomu je například u vzorku č. 7 (7 hm % PCL + 0,4 hm % SNAPs), který má nejvyšší hodnotu směrodatné odchylky, což ukazuje na vysokou nehomogenitu vytvořeného povrchu.

Další velmi důležitým aspektem, který byl předmětem zkoumání tohoto experimentu, je zjištění, zda je přítomnost SNAPsu v nanovlákně struktuře, o které víme, že je biokompatibilní, toxická. Vzorky byly testovány několika metodami. Nejprve byla pomocí fluorescenční mikroskopie zkoumána konfluence buněk. Nejvíce konfluentní vrstva byla prokázána u snímku č. 6 (7 hm % PCL + 0,2 hm % SNAPs). Tento vzorek rovněž prokázal nejvíce homogenní vrstvu, která byla zjišťována pomocí emisní elektronové mikroskopie. Rovněž tento vzorek vykázal nejrovnoměrnější růst buněčné struktury, která byla testována pomocí metabolického MTT testu. Všechny tyto výsledky připisujeme faktu, že právě tento vzorek vykazoval nejvyšší homogenitu povrchu, což příznivě ovlivnilo adhezi a následný růst buněčných struktur a zároveň koncentrace SNAPsu v nanovlákně struktuře nebyla pro testované buňky toxická.

V neposlední řadě bylo potřeba vyhodnotit uvolňování oxidu dusnatého v závislosti na čase metodou Griess Assay. Nejvyšší hodnoty absorbance byly naměřeny v případě vzorku č. 8 (7 hm % PCL + 0,6 hm % SNAPs). Vysoká hodnoty

absorbance byly naměřeny i v případě vzorku č. 7 (7 hm % PCL + 0,4 hm % SNAPs). Testovaný materiál PLC byl z dalšího experimentu vyřazen, protože nesplňoval požadavky kladené na materiál (špatná homogenita, horší proliferace buněk nežli u druhého testovaného materiálu), který by byl vhodný k výrobě cévní náhrady.

Právě z důvodu prudkého uvolňování oxidu dusnatého byla pro další experiment vyřazena koncentrace 0,6 %. Tato koncentrace a prudké uvolnění může působit na buněčné linie toxicky (Kröncke, 1997).

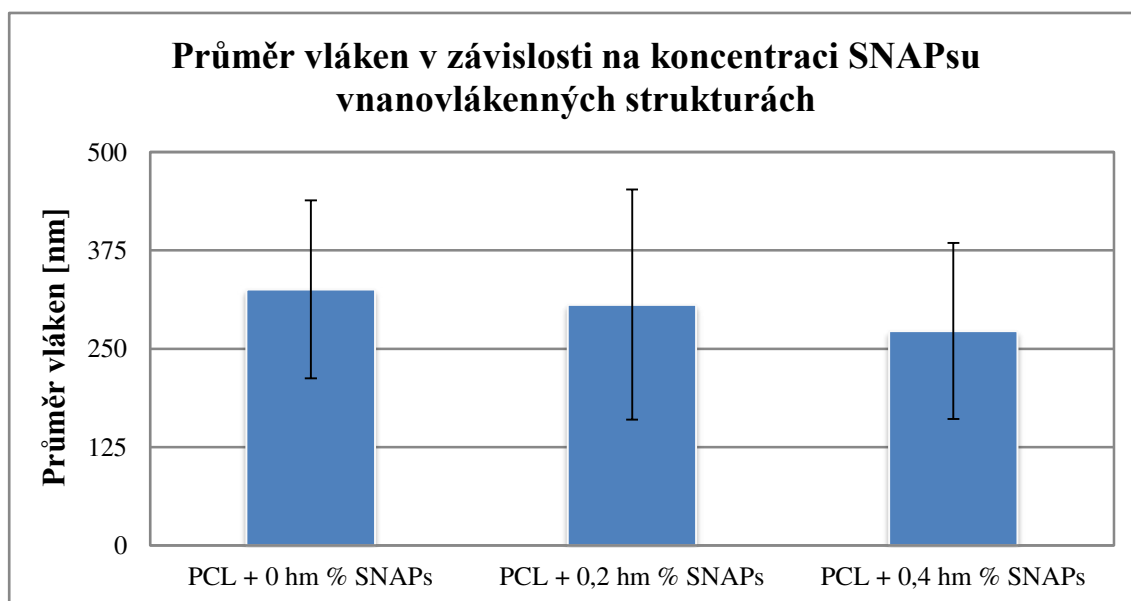
11 EXPERIMENT Č. 2

11.1 Vyhodnocení *in vitro* testů

V Experimentu č. 2 probíhalo *in vitro* testování vzorků vytvořených z biodegradabilního polymeru. V tomto případě se jednalo o alifatický polyester polykaprolakton (PCL, $M_w = 45\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma Aldrich). Roztok byl vytvořen o koncentraci 15 hm %. Jednotlivé vzorky byly modifikovány přidavkem SNAPs o koncentracích: 0; 0,2 a 0,4 hm %.

Tab. 3 Seznam testovaných materiálů a jejich charakterizace (Experiment č. 2)

č.	Materiál	Koncentrace SNAPs [%]	Průměry vláken/100 měření [nm]	Směrodatná odchylka [nm]
1	PCL	0	325,40	113,02
2	PCL	0,2	306,10	146,19
3	PCL	0,4	272,66	111,94



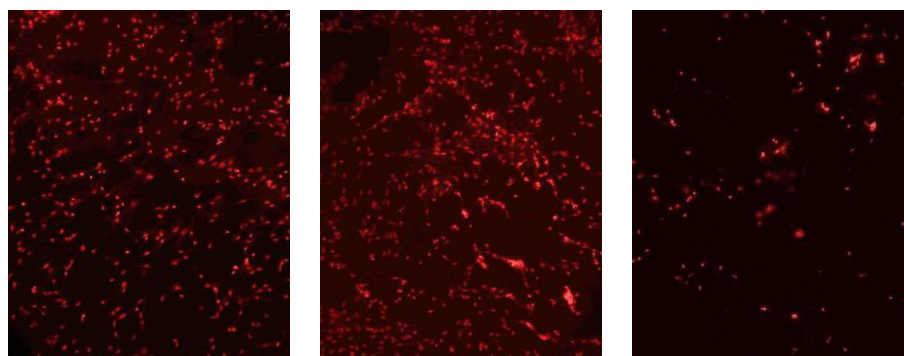
Obr. 26 Průměr vláken jednotlivých typů polymerních roztoků (7 hm% PCL) s přidavkem SNAPsu o různých koncentracích (0 hm%; 0,2 hm % a 0,4 hm %) a jeho vliv na průměr vláken tvořených elektrostatickým zvlákňováním

Naměřené hodnoty, které jsou zapsány v tab. 3 a graficky zpracovány v obr. 26, určují průměr vláken, který je závislý na koncentraci přidaného SNAPsu do struktury polymeru. Ze získaných hodnot je zřejmý pokles velikosti průměru vláken v souvislosti s velikostí koncentrace SNAPsu. Měřeno bylo celkem 100 hodnot pro každý testovaný vzorek. Z těchto hodnot byla určena průměrná velikost vláken. Tedy v tomto případě je možné pozorovat přesně opačný průběh než-li tomu bylo v případě Experimentu č. 1, kdy průměr vláken stoupal spolu s hodnotou koncentrace SNAPsu.

11.1.1 Fluorescenční mikroskopie

I v tomto případě byla buněčná jádra obarvena pomocí propidium jodidu a pozorována pomocí flourescenčního mikroskopu. Délka kultivace vzorků byla celkem 11 dní. Materiály byly označeny čísly 1-3 (označení identické jako v tab. 3).

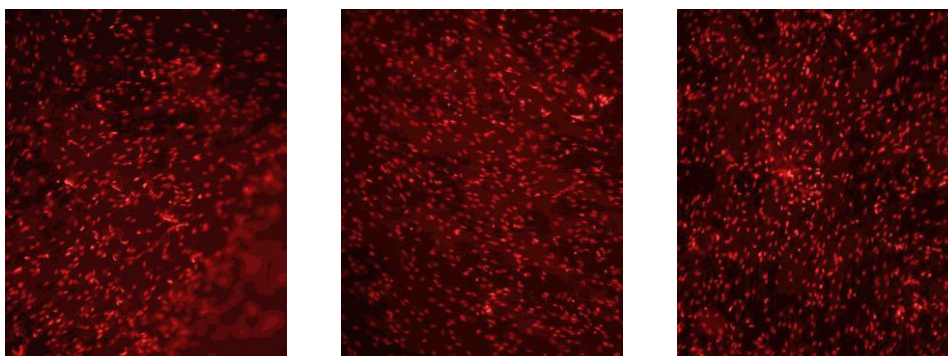
Flourescenční mikroskopie - 1. testovací den



Obr. 27 Snímek č. 1-3 (15 hm % PCL + 0, 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)

Testované materiály byly osázeny buněčnými kulturami CASCM (hladkosvalové buňky). Na vzorcích č. 1 (15 hm % PCL + 0 hm% SNAPs) a č. 2 (15 hm % PCL + 0,2 hm % SNAPs) je patrné pravidelné rozložení buněčných struktur. Vzorek č. 3 byl osázen buňkami velmi zřídka, což mohlo být způsobeno špatným přilnutím testovaných buněk či neopatrnou manipulací při osazování testovaného vzorku.

Flourescenční mikroskopie - 11. testovací den



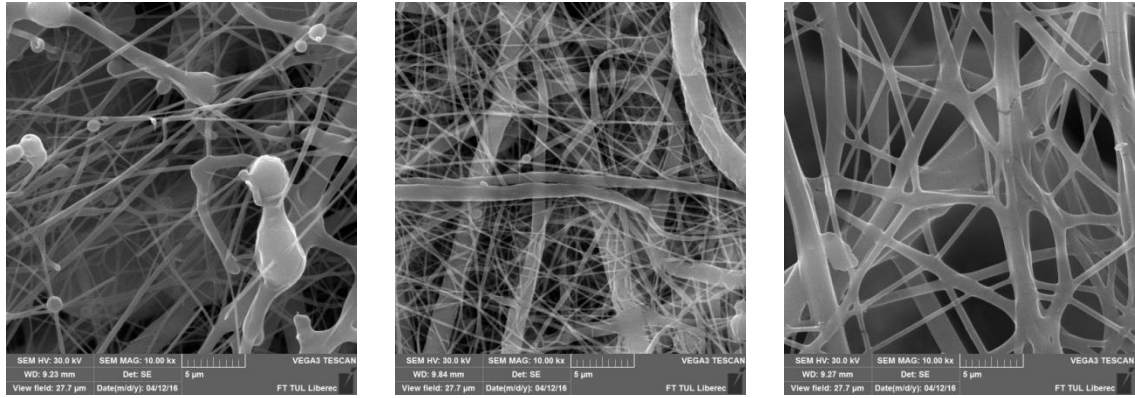
Obr. 28 Snímek č 1-3 (PCL + 0, 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)

Všechny vzorky (obr. 28) 11. testovací den vykazovaly pravidelnou konfluentní buněčnou vrstvu, což dokazuje, že přítomnost SNAPsu ve struktuře tkáňového nosiče neovlivňuje negativně buněčný růst.

11.1.2 Skenovací elektronová mikroskopie bez přítomnosti buněk

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byla pozorována vláknenná struktura tkáňového nosiče (scaffoldu). Ve struktuře scaffoldu byl přítomen SNAPs o koncentracích: 0; 0,2 a 0,4 hm % (obr. 29). Bylo použito zvětšení 10 000x. Výsledný obraz je zobrazen černobíle. Jednotlivé vzorky byly opět označeny pomocí číslic.

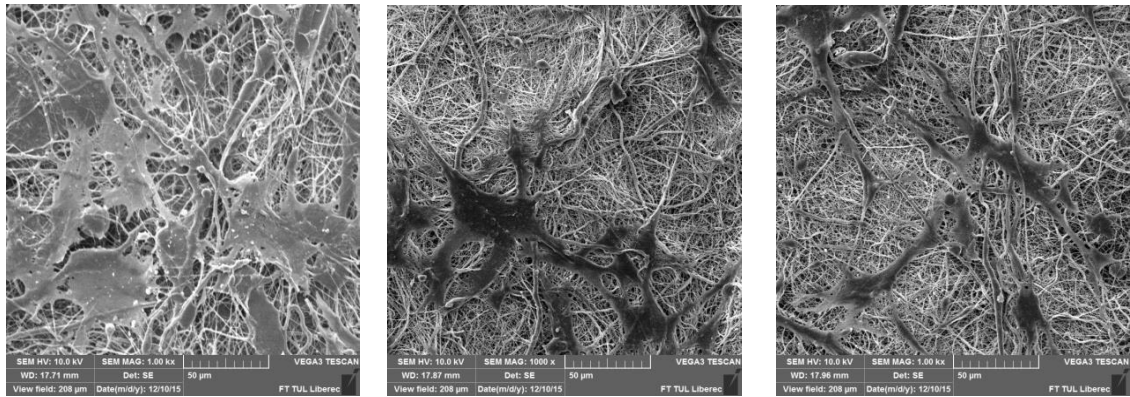
Morfologie jednotlivých scaffoldů byla vyhodnocena pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Z jednotlivých snímků je patrné, že při elektrostatickém zvláknění docházelo k časté tvorbě polymerních defektů, které jsou přítomny ve struktuře jednotlivých testovaných materiálů. V tomto případě docházelo spíše k tvorbě mikrovláken, avšak ve vzorku byly přítomny i nanovlákná. Bylo zjištěno, že inkorporovaný SNAPs není možné pozorovat na jednotlivých snímcích. V případě snímku č. 3 bylo možné pozorovat relativně pravidelná vlákna. V tomto případě se jednalo o PCL + 0,4 hm % SNAPs.



Obr. 29 Snímky č. 1-3 (PCL + 0; 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)

11.1.3 Skenovací elektronová mikroskopie po 1 dni kultivace

Použitím skenovací elektronové mikroskopie byly pozorovány adherované buňky na vláknennou strukturu tkáňového nosiče (scaffoldu). Tkáňové nosiče byly obohaceny o inkorporovaný SNAPs o koncentraci: 0; 0,2 a 0,4 hm % (obr. 30) a následně byla vizuálně porovnána jejich struktura s adherovanými buňkami. Doba kultivace byla 1 den.

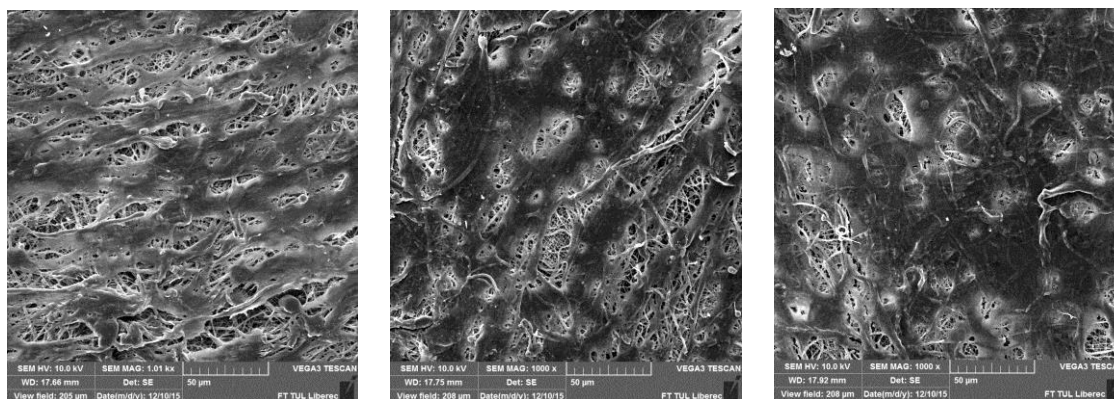


Obr. 30 Snímek č. 1-3 (PCL + 0; 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)

Po uplynutí jednodenní inkubační doby bylo prověřeno, zda buňky, kterými byly jednotlivé materiály osázeny, adherovaly k povrchům testovaných materiálů. Na jednotlivých snímcích je patrná přítomnost adherovaných buněk.

11.1.4 Skenovací elektronová mikroskopie po 11 dnech kultivace

Posledním testovacím dnem, kdy bylo vizuálně zkoumána buněčná vrstva na tkáňových nosičích vytvořených z PCL a obohaceny o SNAPs o různých koncentracích, byl testovací den jedenáctý.



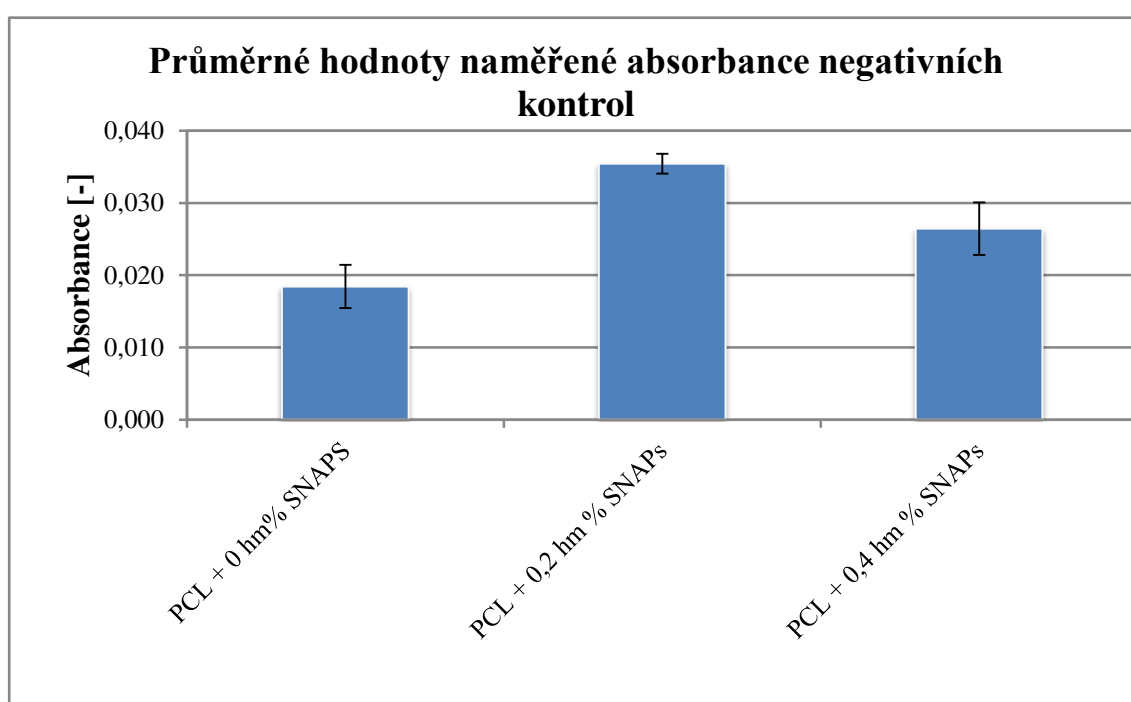
Obr. 31 Snímek č. 1-3 (PCL + 0; 0,2 a 0,4 hm % SNAPs)

U všech tří zkoumaných vzorků byla zaznamenána souvislá vrstva adherovaných buněk (obr. 31), avšak ze získaných snímků je zřejmé, že nejvíce adherovaných buněk je v případě snímku č. 2 a č. 3. Oby tyto vzorky obsahovaly v nanovlákněné struktuře inkorporovaný SNAPs o koncentracích 0,2 hm % (snímek č. 2) a 0,4 hm % (snímek č. 3).

11.1.5 Vyhodnocení metabolického MTT testu

Metabolická aktivita buněk byla měřena pomocí MTT testu po 4, 7 a 14 dnech buněčné kultivace. Tkáňové nosiče byly vysterilizovány pomocí 70 hm% EtOH po dobu 30 minut. Po proběhlé sterilizaci byly osázeny buněčnou linií CASCm, která byla kultivována v médiu určeném pro hladkosvalové buňky (EBM-2). Kultivace probíhala za konstantních podmínek tzn. teploty 37°C a 5% CO². Po dosažení 80% konfluence byly buňky ztrypsinizovány a nasazeny na testované materiály v koncentraci 4,5x10⁴ buněk na testovací jamku (pasáž 5). Testování probíhalo v 96 - jamkových destičkách po dobu 14 dnů. Testovaným materiálem byl poly-e-caprolakton obohacený o SNAPs o koncentracích: 0; 0,2 a 0,4 hm %.

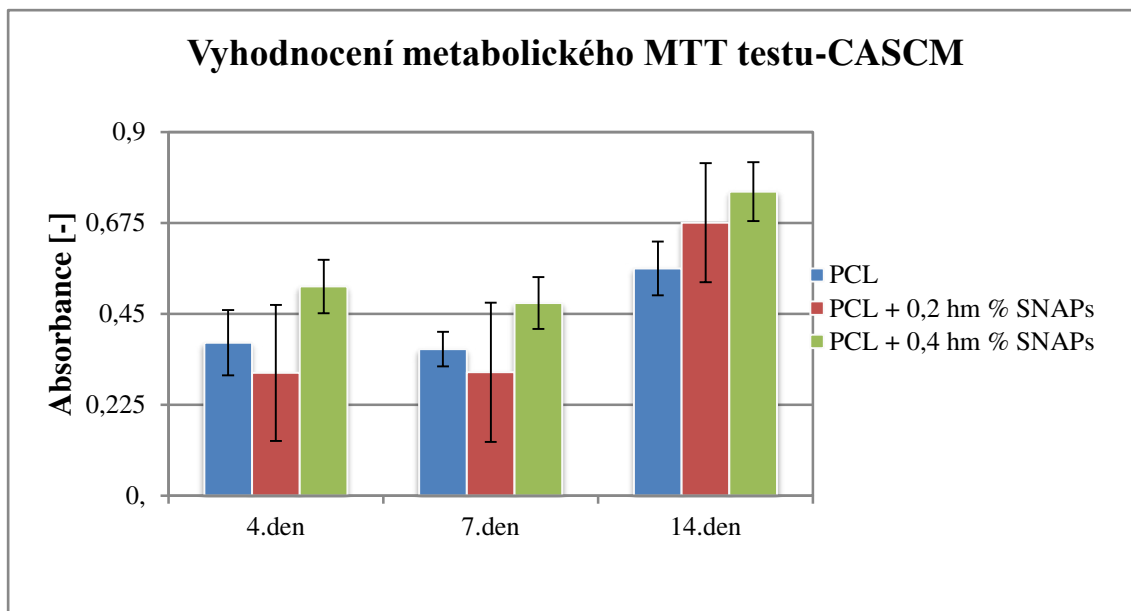
Obr. 32 zobrazuje absorbance naměřené u negativních kontrol. Dle očekávání je nejnižší hodnota měřené absorbance ($<0,02$) v případě testovaného materiálu, v jehož struktuře není přítom SNAPS. I v tomto případě by měla hodnota absorbance stoupat se zvyšující se koncentrací SNAPSu ve struktuře testovaných materiálů (stejně jako je tomu v Experimentu č. 1 u testovaného materiálu PCL). Testované materiály (obr. 32) tento trend nevykazují, což značí přítomnost nehomogéní struktury tkáňového nosiče. Lze tedy předpokládat, že vlákenná struktura testovaných materiálů ovlivňuje výsledky buněčné proliferace a následné uvolňování oxidu dusnatého ze struktury testovaného materiálu.



Obr. 32 Hodnoty absorbance negativních kontrol polymeru (7 hm% PCL) s různou koncentrací SNAPSu (0; 0,2 a 0,4 hm %)

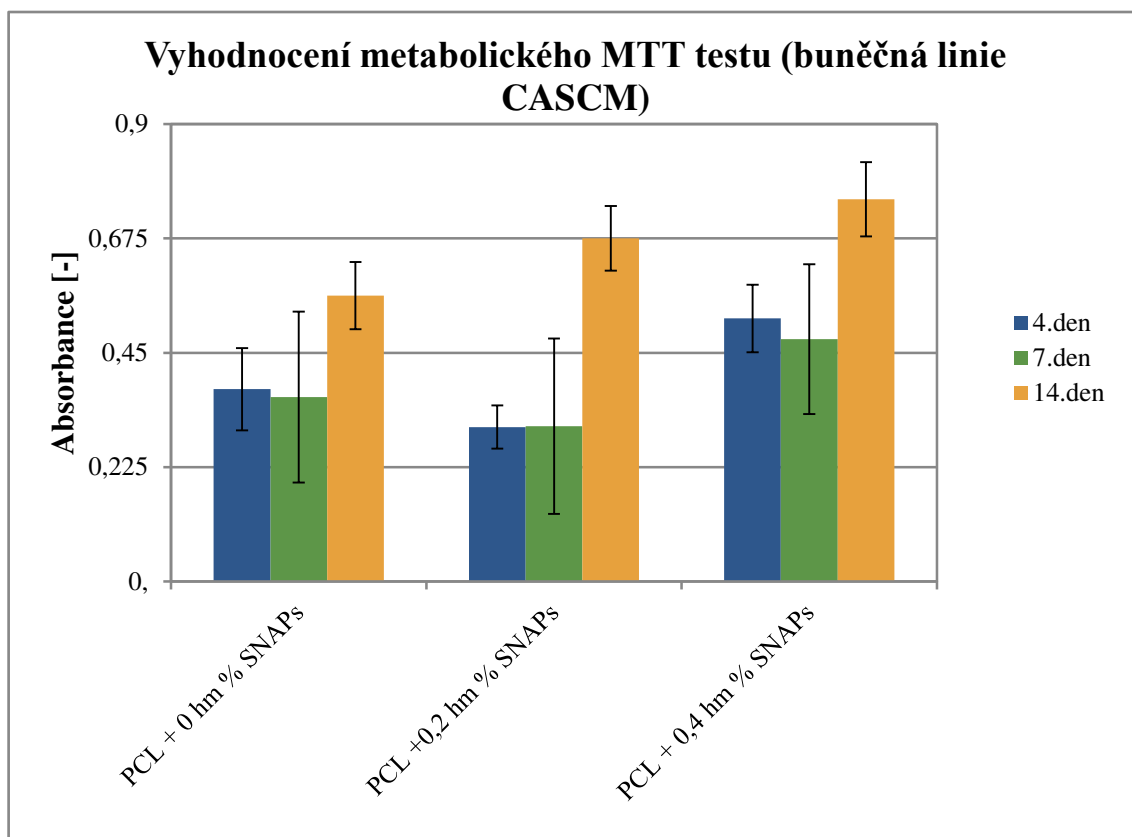
Obr. 33 zobrazuje buněčnou viabilitu, která byla měřena pomocí MTT testu je nejprve řazena podle kultivační doby (4., 7. a 14. den). Buněčná viabilita stoupala u všech tří testovaných materiálů. U vzorku PCL + 0,4 hm % SNAPS byl patrný drobný pokles viability 7. testovací den. Příčinou může být velké uvolňování derivátů oxidu dusnatého, který poté působí na buňky cytotoxicky. Vzorek PCL + 0,2 hm % SNAPS oproti očekávání nevykazoval navýšení buněčné kultivace 7. den. Negativní kontroly ukazují na vyšší hodnotu absorbance, což znamená, že povrch testovaného materiálu

nebyl homogenní, protože vzorek PCL + 0,2 hm % SNAPs má vyšší hodnotu absorbance než PCL + 0,4 hm % SNAPs. Díky nehomogenní struktuře nejspíše probíhalo uvolňování SNAPsu do vnějšího prostředí rychleji a ve větším množství, což ovlivnilo negativně buněčnou proliferaci mezi 4. a 7. dnem.



Obr. 33 Hodnoty absorbance testovaných materiálů měřených po 4., 7. a 14. dnem kultivace. Hodnota absorbance je vypočítána jako rozdíl hodnot při 570 a 650 nm po odečtení průměrné hodnoty absorbance od negativních kontrol

Obr. 34 zobrazuje hodnoty absorbance jednotlivých materiálů za danou kultivační dobu. Hodnoty jsou totožné s hodnotami v obr. 33, avšak pro názornost jsou hodnoty uspořádány tak, aby bylo zřejmé, jaké materiály nabývají nejvyšší hodnoty proliferace. Jak je tedy zřejmé z obr. 34, nejvyšší hodnoty absorbance lze pozorovat u vzorku PLC + 0,4 hm % SNAPs, ačkoliv 7. testovací den došlo k naopak k úbytku buněk, což je možné vysvětlit rychlým uvolněním SNAPsu do vnějšího prostředí.

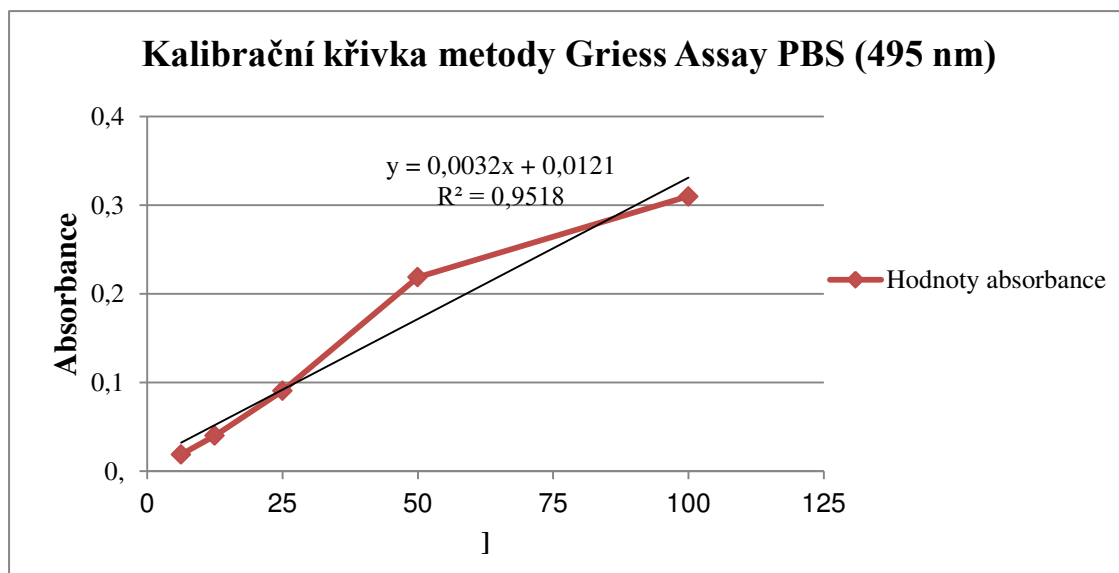


Obr. 34 Hodnoty absorbance testovaných materiálů měřených po 4., 7. a 14. dnu buněčné kultivace. Hodnota absorbance je vypočítána jako rozdíl hodnot při 570 a 650 nm po odečtení průměrné hodnoty absorbance od negativních kontrol – materiálové rozdělení.

11.1.6 Vyhodnocení metody Griess Assay

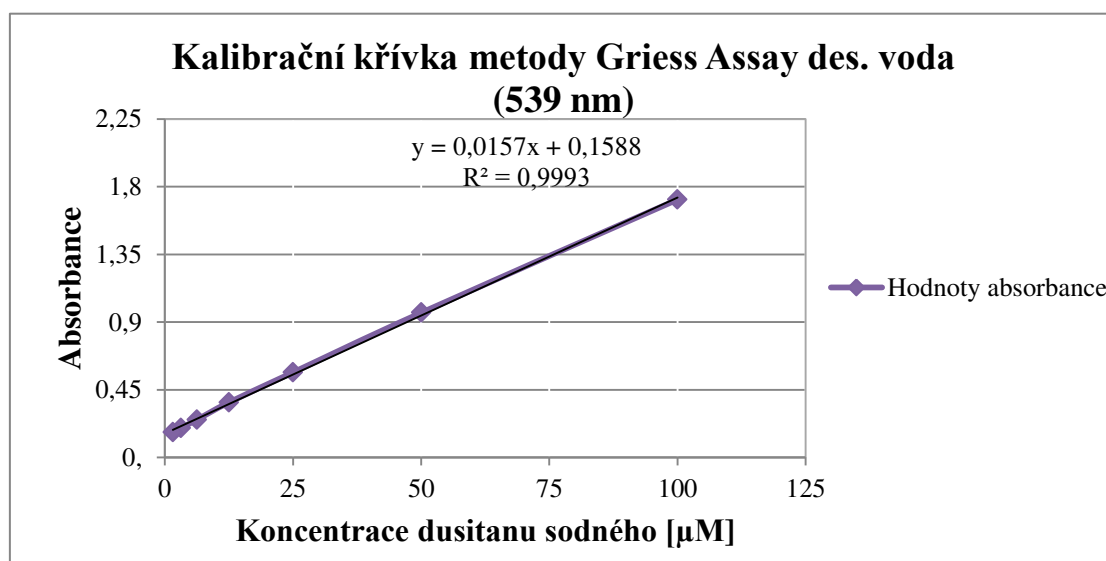
I v tomto případě byly připraveny vzorky testovaného materiálu o hmotnosti 0,0500 g, které byly vloženy do plastových zkumavek. Celkově byly vytvořeny dvě sady vzorků. Do první sady vzorků (5 vzorků z každého testovaného materiálu) byl aplikován fosfátový pufr (PBS) o objemu 4 ml a pH 7,4. Do druhé sady vzorků (rovněž 5 vzorků z každého testovaného materiálu) byla aplikována destilovaná voda o objemu 4 ml a pH 7. Vzorky byly uloženy do inkubátoru, kde byla udržována konstantní teplota o 37 °C. Po uplynutí inkubační doby tedy 1 dnu, byly vzorky přesunuty do jiné zkumavky naplněné stejným roztokem, ve kterém byly před tím testovány. Tento postup byl stejný i v dalších určených testovacích dnech, což byl den třetí a den sedmý. Z testovaných roztoků byly odebrány vzorky o objemu 100 μ l a byly aplikovány

do 96 - jamkové destičky. K nim bylo nejprve přidáno 100 μl 17 mM sulfanilamidu a po přibližně tříminutovém časovém intervalu bylo k jednotlivým testovaným vzorkům přidáno 100 μl 0,4 mM NEED. Roztoky byly poté spektrofotometricky vyhodnoceny, avšak bylo nutné si vytvořit kalibrační křivky. První kalibrační křivka byla pro fosfátový pufr (PBS) o hodnotě 495 nm (obr. 35).

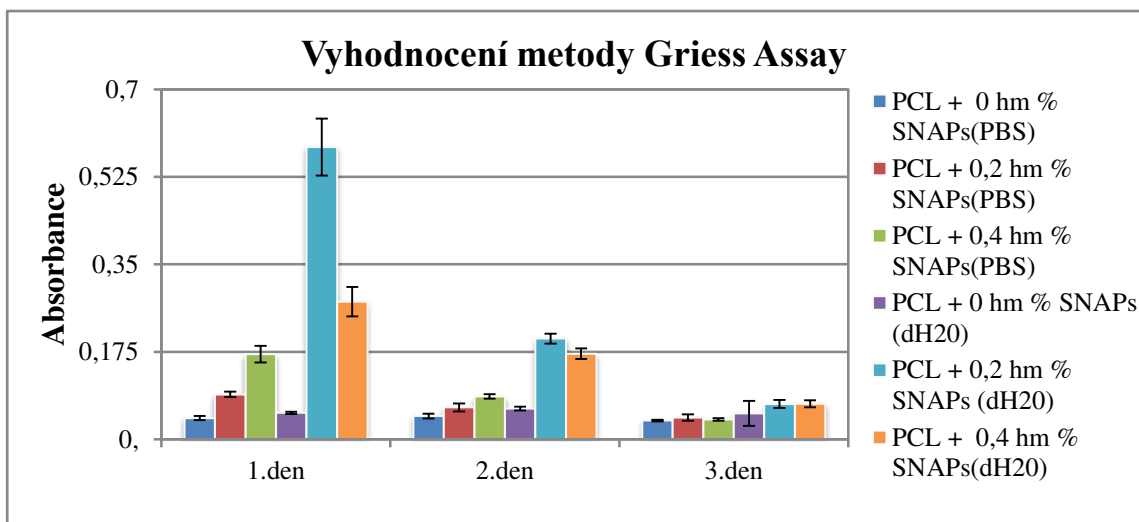


Obr. 35 Kalibrační křivka PBS vypočítána pro hodnotu 495 nm v různých v následujících koncentracích dusitanu sodného (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μM).

Druhá kalibrační křivka byla vytvořena pro destilovanou vodu o hodnotě 539 nm. Kalibrační křivka byla vytvořena stejným způsobem jako kalibrační křivka pro PBS (obr. 36).



Obr. 36 Kalibrační křivka destilované vody byla vypočítána pro hodnotu 539 nm v různých hodnotách koncentrace dusitanu sodného 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μM).



Obr. 37 Vyhodnocení metody Griess Assay ve třech testovacích dnech (1., 2. a 3. den). Výsledky byly zaznamenány do grafu. Pro polovinu testovaných vzorků byl použit fosfátový pufr (PBS) a pro druhou polovinu byla využita destilovaná voda

I v tomto případě byla metoda Griess Assay použita pro zjištění uvolňování oxidu dusnatého z planárních vrstev, které jsou taktéž obohaceny o přídavek SNAPsu o koncentracích: 0; 0,2 a 0,4 hm % SNAPs. Materiál pro tvorbu planárních vrstev byl použit poly- ϵ -caprolakton. Byla použita dvě média prvním byl roztok PBS, což je roztok, jenž má za úkol simulovat fyziologicky stabilní prostředí lidského organismu. Druhým použitým médiem byla destilovaná voda, která má neutrální pH (obr. 37). Nejvyšší hodnota absorbance v 1. den testování byla v případě PCL + 0,2 hm % (destilovaná voda). Jak ukazuje tabulka s průměrnými hodnotami velikosti vláken právě v tomto případě je zřejmá nejvyšší směrodatná odchylka v porovnání se zbylými hodnotami, což poukazuje na nehomogenitu testovaného vláknenného povrchu. Další vysokou hodnotu absorbance vykazuje materiál PCL + 0,4 hm % (SNAPs), který nejvíce uvolňoval oxid dusnatý rovněž první testovací den, avšak to bylo připisováno nejvyšší koncentraci SNAPsu z testovacích vzorků. Druhý testovací den oba materiály s nejvyššími hodnotami absorbance byly rovněž PCL + 0,2 hm % a PCL + 0,4 hm %. Třetí testovací den byly hodnoty absorbance všech materiálů téměř vyrovnány, avšak i v tomto případě nejvyšší hodnoty absorbance ze všech vzorků opět vykazovaly materiály PLC + 0,2 hm % a PLC + 0,4 hm %. Oba materiály byly ponořeny v destilované vodě, což nejspíše podpořilo rozklad polymerní nanovláknenné matrice, protože alifatické polyestery jsou rozkládány hydrolyticky. Je tedy zřejmé, že nejvíce oxidu dusnatého je uvolněno v průběhu prvního testovacího dne metody Griess Assay.

11.2 Diskuze výsledků - Experiment č. 2

V Experimentu č. 2 probíhalo velmi podobné testování jako v případě Experimentu č. 1, avšak byl testován pouze jeden materiál a o jiné molekulové hmotnosti a tedy i jiné koncentraci v polymerním roztoku (15 hm % PCL, $M_w = 45\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). V případě SNAPsu byly testovány pouze koncentrace 0,2 a 0,4 hm %. Všechny tři vzorky byly testovány pomocí fluorescenční mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie na schopnost buněčné linie (v tomto případě byla testována buněčná linie CASCm) proliferovat na testovaných materiálech. Na všech třech materiálech vznikla během testování souvislá buněčná vrstva. Tento poznatek je zjevný z výsledných snímků z fluorescenční mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie. Dle metabolického MTT testu vykazuje nejvyšší nárůst buněk vzorek č. 3 (15 hm % PCL + 0,4 hm % SNAPs), který však den sedmý vykazoval drobný úbytek pravděpodobně způsobený velkým uvolňováním derivátů oxidu dusnatého a v této koncentraci byl pro buňky cytotoxický. Vzorek č. 2 (15 hm % PCL + 0,2 hm % SNAPs) vykazoval vcelku rovnoměrný nárůst buněčné vrstvy na testovaném vzorku, avšak až poslední, tedy 14. testovací den. Hodnoty absorbance 4. a 7. testovací den byly pro tento vzorek téměř identické. Důvodem může být vysoká nehomogenita povrchu a tím pádem nejspíše docházelo k neplynulému uvolňování derivátu oxidu dusnatého do vnějšího prostředí vzorky a to nejspíše negativně ovlivnilo rychlost proliferace buněčné linie testované na vzorku PCL + 0,2 hm % SNAPs.

12 VLV STERILIZACE PCL A PLC S OHLEDEM NA INKORPOROVANÝ SNAPS

Zásadní otázkou při vývoji a výrobě cévních náhrad v případě, kdy je do nanovlákněné struktury inkorporován SNAPS, je postup, jakým přistupovat ke sterilizaci. Laboratorně používanou metodou sterilizace testovaných polymerních materiálů byla sterilizace pomocí 70 % ethanolu po dobu 30 minut. Avšak tato metoda sterilizace se nejeví jako nejvhodnější vzhledem k inkorporovanému SNAPSu. I přes důkladné omytí testovaných materiálů pomocí roztoku PBS (fosfátový pufr), může zbytkové množství ethanolu negativně ovlivňovat uvolňování oxidu dusnatého z inkorporovaného SNAPSu. Byl tedy zvolen typ testu, kdy byly porovnány dva materiály. Jeden materiál byl sterilizován konvenčním způsobem, tedy byl ponořen do 70 hm % ethanolu a byl zde ponechán po dobu 30 minut. A dále testován pomocí MTT testu, což mělo za úkol dokázat, zda zvolená laboratorní metoda sterilizace ovlivňuje uvolňování oxidu dusnatého, jehož koncentrace měla vliv na viabilitu buněk. Druhý materiál nebyl nijak sterilizován. Jednalo se o materiály, které byly použity v Experimentu č. 1, tedy PLC a PCL s různou koncentrací SNAPSu (0; 0,2; 0,4 a 0,6 hm %). Náplní pokusu bylo zjištění zda sterilizace pomocí 70 hm % EtOH může ovlivňovat uvolňování oxidu dusnatého. K tomuto pokusu byl použit MTT test, který slouží k určení viability buněk. Při pokusu byly použity dvě sady vzorků. Bylo použito 8 materiálů po 6 vzorcích (uvedeno níže).

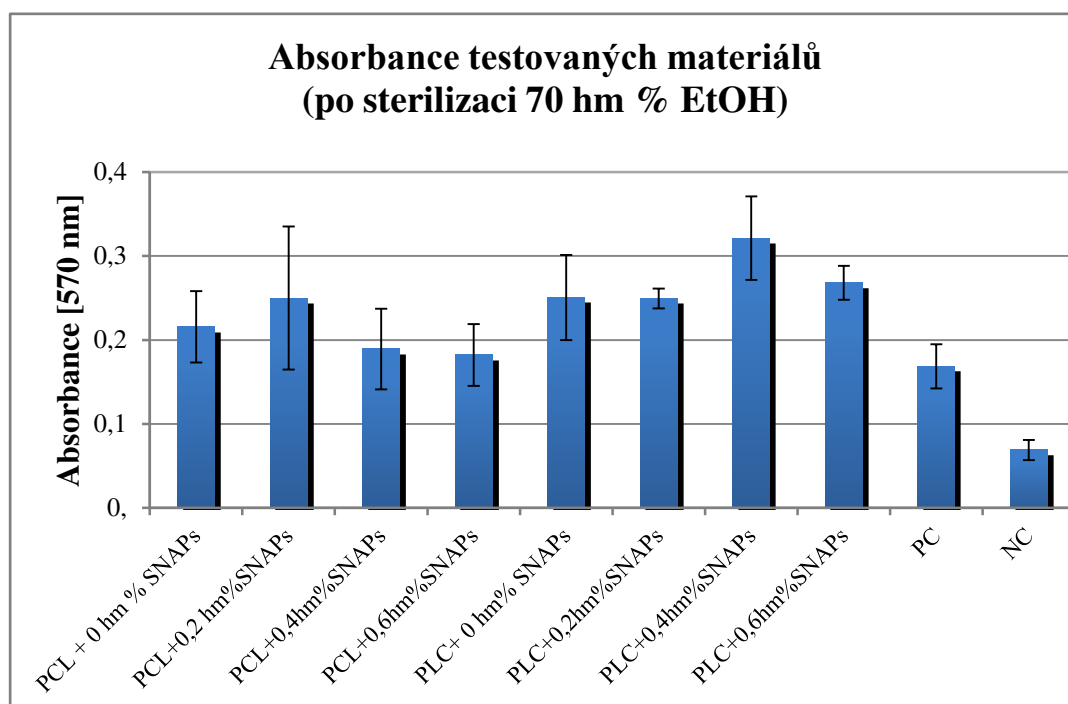
Sada č. 1 byla vysterilizována 70 hm % ethanolem po dobu trvání 30 minut. Po vysterilizování byla na te tované vzorky nasazena buněčná linie HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells, Lonza), která byla kultivována v médiu určeném pro endotelové buňky (EBM-2).

Sada č. 2 nebyla žádným způsobem vysterilizována. Na zkoumané vzorky byla nasazena rovněž buněčná linie HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells, Lonza), která byla kultivována v médiu určeném pro endotelové buňky (EBM-2). Použití jedné sady vysterilizované 70 hm % EtOH po dobu 30 minut a jedné sady bez sterilizace proběhlo z důvodu možného negativního ovlivnění viability buněk reziduálním množstvím ethanolu. Vzorky byly považovány za cytotoxické pokud viabilita buněk po uplynutí inkubační doby klesne pod 70 %. Procentuální vyhodnocení proběhlo

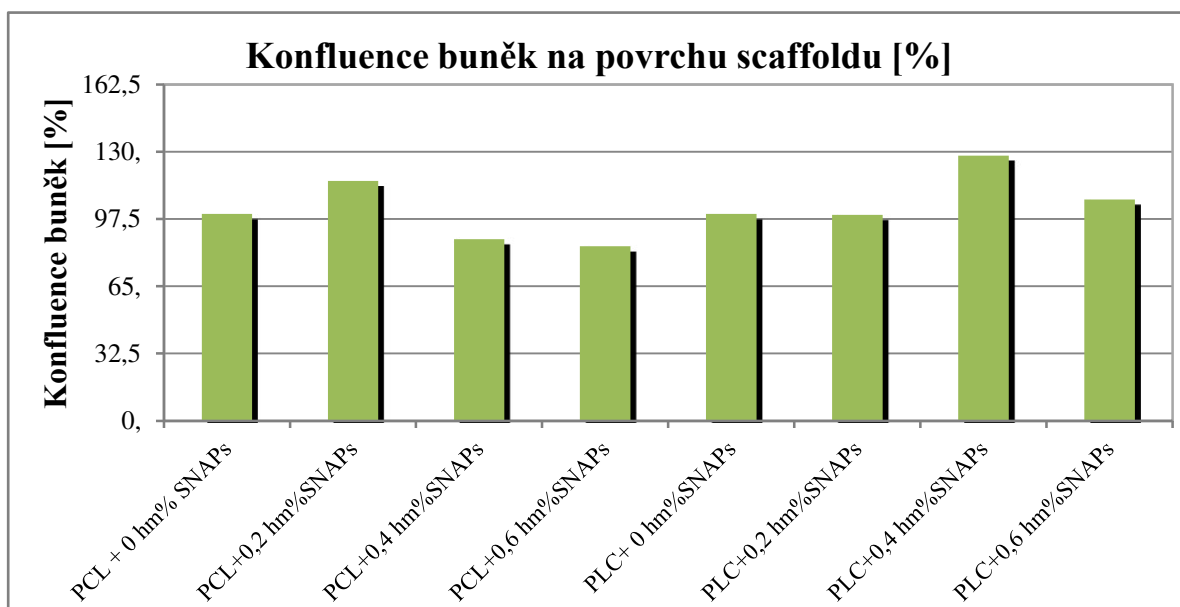
tak, že materiál, který nevykazoval cytotoxické účinky, byl ohodnocen 100 %. Jedná se o materiály, které neobsahují SNAPs ve své struktuře a z předešlých laboratorních zkušeností je známo, že materiály PCL a PLC bez jiných aditiv nejsou cytotoxické. Výsledky byly graficky zpracovány, kde byla vypsána hodnota absorbance, která byla určena pomocí MTT testu a procentuální viabilitu buněk, která se vztahuje k materiálu, který není cytotoxický.

12.1 Sada č. 1 - MTT test (24 hodin, sterilizace 70 hm % EtOH)

Celkem bylo testováno 8 materiálů, které byly vysterilizovány v 70 hm % ethanolu po dobu 30 minut. Poté byly vzorky osazeny buňkami a po uplynutí 24 hodin byl MTT test vyhodnocen pomocí spektrofotometrie o hodnotě 570 nm (obr. 38).



Obr. 38 Hodnoty absorbance metabolického MTT testu, které byly naměřeny při vlnové délce 570 nm. Testované materiály byly vysterilizovány po dobu 30 minut v 70 hm % EtOH



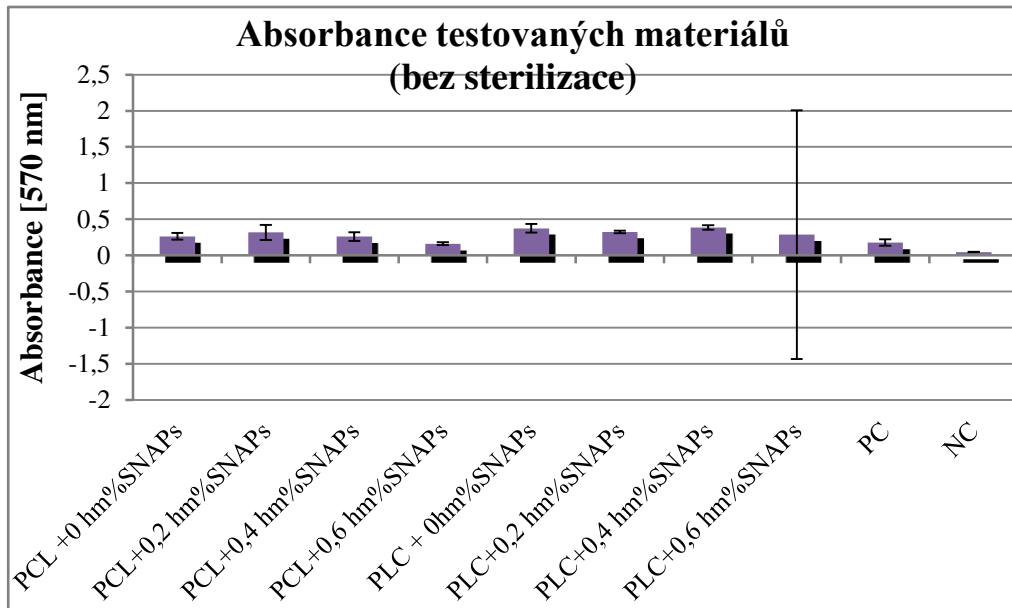
Obr. 39 Procentuální vyjádření konfluence buněk na povrchu testovaných materiálů, které byly vysterilizovány po dobu 30 minut v 70 hm % EtOH

Ze získaných výsledků je patrné, že nejvyšší buněčná aktivita byla zaznamenána pomocí MTT testu v případě materiálu PLC + 0,4 hm % SNAPs. Dále vysoká buněčná aktivita byla zaznamenána v případě PCL + 0,2 hm % SNAPs (obr. 39).

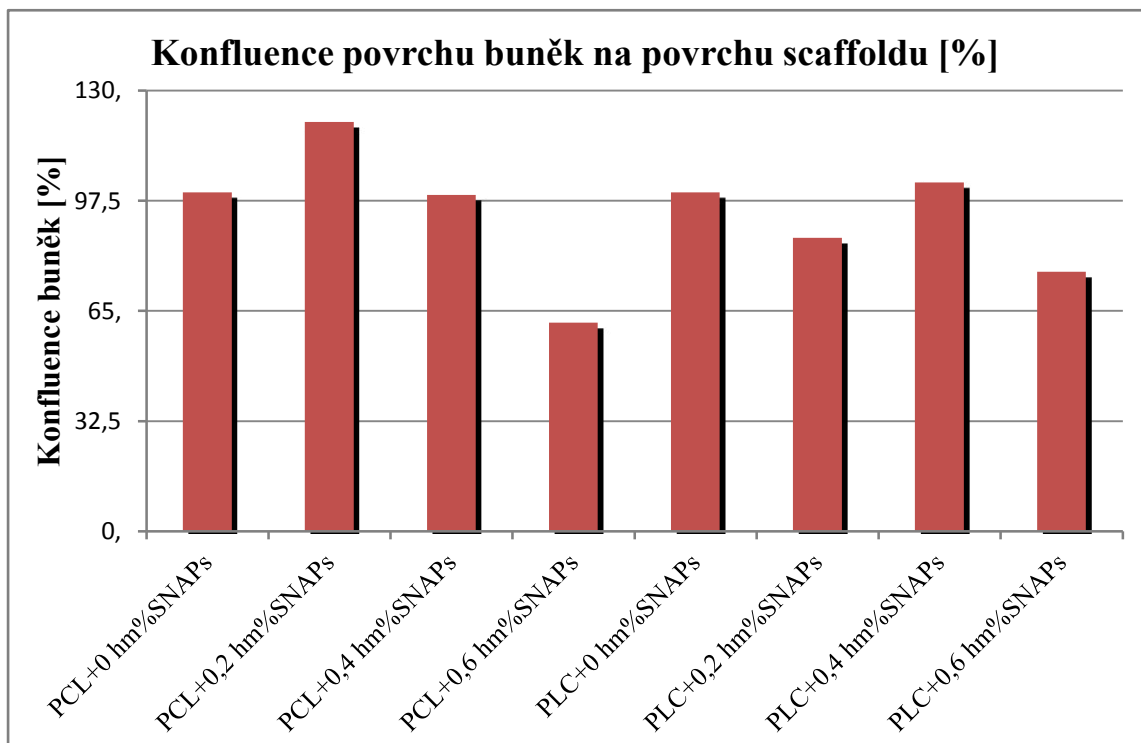
12.2 Sada č. 2 - MTT test (24 hodin, bez sterilizace)

Celkem bylo taktéž testováno 8 materiálů, které nebyly žádným způsobem sterilizovány. Vzorky byly osázeny buňkou linií HUVEC a po uplynutí inkubační doby 24 hodin byly vzorky vyhodnoceny pomocí spektrofotometrie o absorbanci 570 nm (obr. 40).

Pro objektivní posouzení bylo nutné testovat vzorky, které nebyly žádným způsobem sterilizovány. Testování probíhalo stejným způsobem, jako v předešlém případě. Avšak bez jakékoliv sterilizace. Největší nárůst buněčné aktivity je zřejmý rovněž v případě vzorku PLC + 0,2 hm % SNAPsu. Naopak vzorek PCL + 0,6 hm % SNAPsu je cytotoxický, protože buněčná aktivita v jeho případě klesla na 61 %. Pokud buněčná aktivita klesne pod 70 %, vzorek lze považovat za cytotoxický (obr. 41).



Obr. 40 Hodnoty absorbance MTT testu buněčné aktivity na povrchu testovaných materiálů, které byly osázeny buněčnou linií HUVEC a nebyly žádným způsobem sterilizovány. Hodnoty absorbance byly naměřeny při vlnové délce 570 nm



Obr. 41 Grafické vyjádření procentuální konfluence buněk na povrchu testovaných scaffoldů

Ze získaných hodnot a následného grafického zpracování (obr. 38-41) je zřejmé, že sterilizace vzorků, které uvolňují oxid dusnatý, má vliv na uvolňování oxidu dusnatého do vnějšího prostředí, nikoliv však na buněčnou aktivitu testovaných buněk. Lze tak usuzovat z faktu, že vzorek PCL + 0,6 hm %, který nebyl vysterilizovaný, působil cytotoxicky na testované buňky, ačkoliv hodnota směrodatné odchylky je vysoká, což může značit chybu způsobenou v průběhu testovacího procesu. Naopak identický vzorek, ale vysterilizovaný pomocí 70 hm % EtOH po dobu 30 minut nevykazoval tak nízký buněčný nárůst. Z toho faktu lze usuzovat, že sterilizace pomocí 70 hm % EtOH ovlivňuje uvolňování oxidu dusnatého z nanovlákněné struktury. Hodnoty absorbance naměřené u materiálů, které byly vysterilizovány pomocí 70 hm % EtOH nabývají menších hodnot, než li hodnoty absorbance naměřené u materiálů, které nebyly žádným způsobem sterilizovány.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na hledání možných využití donoru oxidu dusnatého při vývoji umělých cévních náhrad za použití nanovláknenných struktur vytvořených z biodegradabilních a biokompatibilních materiálů. Pro realizaci této práce byly zvoleny materiály, které se již dříve ukázaly jako velmi vhodné a které lze použít k tvorbě implantátů či scaffoldů. Mezi použité polymery patřili poly- ϵ -kaprolakton (PCL) a kopolymer kyseliny poly-L-mléčné a poly- ϵ -caprolaktonu v různých poměrech (PURASORB, PLC). Donorem oxidu dusnatého byl zvolen tzv. SNAP (S-Nitroso-N-acetylpenicillinamine). Cílem této diplomové práce bylo analyzovat různé koncentrace SNAPsu v různých roztoků polymerů.

Práce se opírala o teoreticko-rešeršní základ, jenž obsahuje poznatky velmi úzce související s řešenou problematikou jako např. vliv oxidu dusnatého na fungování lidského organismu, umělé cévní náhrady či alifatickými polyestery. Experimentální část diplomové práce je rozdělena na dva experimenty.

V Experimentu č. 1 byla nejprve zkoumána otázka, zda přídavek SNAPsu ovlivní kvalitu elektrostatického zvláknování a do jaké míry. Z naměřených hodnot (tab. 2 a 3) lze vyčíst, že SNAPs přítomný v polymerním roztoku zvyšuje průměr vláken u testovaného materiálu PCL. Elektrostaticky zvlákněný PLC obsahoval mnoho defektů, které vznikly při procesu zvláknování, a proto povrch jednotlivých materiálů nebyl homogenní, což je zřejmé i ze snímků, které byly získány pomocí SEM a fluorescenční mikroskopie. Dále je toto tvrzení potvrzeno pomocí negativních kontrol, které byly součástí metabolického MTT testu, jehož výsledky jsou právě ovlivněny nehomogenním povrchem testovaných materiálů. Právě z důvodu prudkého uvolňování oxidu dusnatého byl z dalšího experimentu vyloučen materiál PLC, který je ve vyšších dávkách cytotoxický pro buňky, jak nám potvrdil výzkum v kapitole 12. Metoda Griess Assay ukazuje schopnost materiálu uvolňovat oxid dusnatý. Varianty PCL + 0,4 hm %, PCL + 0,6 hm %, PLC + 0,4 hm % a PLC + 0,6 hm % uvolňují derivátů oxidu dusnatého nejvíce, což je způsobeno vyšší koncentrací SNAPsu ve strukturách polymeru. Nejvíce ideálním materiálem pro tvorbu maloprůměrové cévní náhrady je PCL + 0,2 hm % SNAPsu.

Experiment č. 2 byl velmi podobný Experimentu č. 1, pouze s rozdílem v testovaných materiálech. Testován byl pouze jeden materiál, tedy PCL o koncentracích 0; 0,2 a 0,4 hm % SNAPsu. Testovaný materiál měl nižší molekulovou hmotnost a tím pádem vyšší koncentraci. Tento materiál díky nižší molekulové hmotnosti netvořil rovněž homogenní strukturu, čímž bylo ovlivněno postupné uvolňování derivátů oxidu dusnatého. Toto tvrzení lze potvrdit vizuálním porovnáním získaných snímků ze SEM a fluorescenční mikroskopie a rovněž negativní kontrolou, která je součástí metabolického MTT testu. Největší buněčná aktivita je zřejmá u vzorku PCL + 0,4 hm % SNAPs. Avšak dle metody Griess Assay nejvíce derivátů oxidu dusnatého uvolňuje vzorek PCL + 0,2 hm % SNAPsu, což je nejspíše způsobeno nerovnoměrnou strukturou polymerního materiálu. Testované vzorky v tomto experimentu rovněž uvolňovaly nejvíce oxidu dusnatého v případě, kdy testovacím médiem byla destilovaná voda. Důvodem je zřejmě fakt, že alifatické polyestery jsou hydrolyticky degradabilní.

Posledním experimentem bylo zjištění, zda sterilizace pomocí 70 hm % EtOH ovlivňuje uvolňování oxidu dusnatého. Ze získaných hodnot, kdy buněčná aktivita u nesterilizovaných vzorků je vyšší, lze tvrdit, že sterilizace pomocí 70 hm % EtOH má částečný uvolňování oxidu dusnatého z polymerních struktur. Důvodem tohoto tvrzení je fakt, že materiál PCL + 0,6 hm % SNAPs, který není vysterilizovaný, působí na buňky cytotoxicky, avšak vysterilizovaný materiál PCL + 0,6 hm % SNAPs na testované buňky nepůsobí cytotoxicky.

Nejvíce ideálním materiálem pro tvorbu maloprůměrových cévních náhrad je PCL ($M_w = 80\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 0,2 hm % SNAPs. Tento polymerní materiál vytvářel nejvíce pravidelná vlákna, což příznivě ovlivňovalo plynulé uvolňování oxidu dusnatého. Koncentrace SNAPsu 0,2 hm % nepůsobila na buňky cytotoxicky.

POUŽITÁ LITERATURA

AL-SA'DONI, H., Ferro, A., S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs, *Clinical Science*, 2000, vol. 98, pages 507-520.

Amler, E., a kol., *Lékařské textilie. 2. díl*, Praha: Radix, 2008, 248 s.

Aplikace nanotechnologií ve vodním hospodářství. Asio [online]. 2015 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://www.asio.cz/cz/361.aplikace-nanotechnologii-ve-vodnim-hospodarstvi>

Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Ing. Iva Hrnčířiková, PhD.

Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Prof. RNDr. Igor Kučera, DrSc.

Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Mgr. SOŇA Hermanová, Ph.D.

Bikiaris, D. N., Nanokomposites of Aliphatic Polyesters: An Overview of the Effect of Different Nanofillers on Enzymatic Hydrolysis and Biodegradation of Polyesters, *Polymer Degradation and Stability*, 2013, vol. 98, no. 9, pages 1908-1928.

Blaise, G., A., Gauvin, D., Gangal, M., Authier S., Nitric oxide, cell signaling and cell death, *Toxicology*, 2005, vol. 208, no. 2, pages 177–192.

Bryan, N., S., Grisham, M. B. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples, *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, vol. 43., no. 5, pages 645-657.

Bušová, M., NO, jeho metabolismus, účinky, funkce a stanovení, Brno, 2011. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/326297/lf_b/Bakalarska_prace_-_Marketa_Busova.pdf.

DYLEVSKÝ, Ivan a Petr JEŽEK. *Základy funkční anatomie člověka* [online]. Palestra, 2016 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://vos.palestra.cz/skripta/anatomie/uvod3.htm>

Fontana J., Trnka, J., Maďa, P., Ivák, P., Funkce buněk a lidského těla, 2013.
Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/>

Frost., M., C., Meyerhoff M., E. Controlled photo initiated release of nitric oxide from polymer films containing S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine derivatized fumed silica filler, J Am Chem Soc, 2004, vol. 11, no. 126(5), pages 1348-9.

Fyziologie endotelu, dysfunkce endotelu. Ústav patologické fyziologie [online]. 2012 [cit. 2017-04-24].

Dostupné z: <http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/?p=1456>

Garkhal, K., Verma, S., Tikoo, K., Kumar, N., Surface modified poly (L- lactide-co-ε-caprolactone) microspheres as scaffold for tissue engineering, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007, vol. 82A, no. 3, pages 747-756.

Gupta, K. K., Pal, N., Mishra, P. K., Srivastava, P., Mohanty, S., Maiti, P., 5-Fluorouracil-loaded poly (lactic acid)-poly (caprolactone) hybrid scaffold: Potential chemotherapeutic implant, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014, vol. 102, no. 8, pages 2600-2612.

Jang, B., S., Jung, Y., Kwon, I., K., Mun, Ch., H., Kim, S., H., Fibroblast Culture on Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) an Electrospun Nanofiber Sheet, Macromolecular Research, 2012, vol. 20, no. 12, pages 1234-1242.

Jeong, S., I., Kim, B-S., Kang, S., W., Kwon, J., H., Lee, Y., M., Kim, S., H., Kim, Y., H., In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) scaffolds, Biomaterials, 2004, Vol. 25, No. 28, s. 5939-5946.

Jerôme, Ch., Lecomte, P., Recent Advances in the synthesis of Aliphatic polyesters by Ring-opening Polymerization, Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, vol. 60, no. 9, s. 1056-1076.

Karásek, D., Vaverková, H., Halenka, M., Hutrya, M., Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi, Interní medicína pro praxi, 2004, vol. 9, pages 450-453.

Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2004/09/06.pdf>

Karetová, D., Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob, Interní medicína, 2002, vol. 3, pages 119-122.

Dostupné z: <http://www.internimedica.cz/pdfs/int/2002/03/06.pdf>

Kelm M., Nitric oxide metabolism and breakdown, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 1999, vol. 1411, no. 2–3, pages 273–289.

Král, B., Inhalace oxidu dusnatého v terapii plicní hypertenze, Lékařské zprávy LF UK Hradec Králové, 1998, vol. 43, pages 141-144.

Dostupné z: ftp://orbis.lfhk.cuni.cz/Publikace/Lekarske_zpravy/LZ_1998_7-8.PDF

Kröncke, K-D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V., Nitric oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection - How, Why, When, and Where?, Nitric oxide: Biology and Chemistry, 1997, vol. 1, pages 107-120.

Kupková, Z., Beneš, L., Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého, Chemické listy, 2004, vol. 98, pages 116-122.

Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_03_01.pdf

Kwon, I. K., Kidoaki, S., Matsuda, T., Electrospun nano-to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential, Biomaterials, 2005, vol. 26, pages 3929-3939.

Lee, J., Tae, G., Kim, Y. H., Park, I., S., Kim, S-H., Hyun, S., Kim, S. H., The effect of gelatin incorporation into electrospun poly (l-lactide-co-ε-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility. Biomaterials. 2008, vol. 29, no. 12, pages 1872-1879.

Lei, J., Vodovotz, Y., Tzeng, E., Billiar, T., E., Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system, Nitric Oxide, 2013, vol. 35, pages 175-185

Luo J., D., Chen A. F., Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. Acta Pharmacol, 2005, vol. 26, no. 3, pages 259-64.

Lyn, D., H. Williams. The chemistry of S-nitrosothiols. Accounts of chemical research, 1999, vol. 10, pages 869-875.

Nims, R., W., Darbyshire J., F., Saavedra, J., E., Christodoulou D., Hanbauer, I., Cox G., W., Grisham, M., B., Laval, F., Cook J., A., Krishna, Krishna, M., C., Wink D., A., Colorimetric Methods for the Determination of Nitric Oxide Concentration in Neutral Aqueous Solutions, *Methods*, 1995, vol. 7, no. 1, pages 48-54.

Nitric oxide. Wikipedia [online]. 2016 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Nitric_oxide

Oxid dusnatý - plyn nevyhnutný pre život. Posterus [online]. 2008 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.posterus.sk/?p=3375>

Pařízková, R., Černý, V., Dostál, P., Význam oxidu dusnatého u kriticky nemocných, *Lékařské zprávy LF UK Hradec Králové*, 1998, vol. 43, pages 155-162. Dostupné z: ftp://orbis.lfhk.cuni.cz/Publikace/Lekarske_zpravy/LZ_1998_7-8.PDF

Petráš, D., Kimmer, D., Soukup, K., Klusoň, P., Bezpečná nanovlákná, *Chemické listy*, 2009, vol. 103, pages 1009-1016. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_12_1009-1016.pdf

Pindur, A., Oxid dusnatý a jeho úloha v organismu, Brno, 2013. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/380785/fsps_b/Bakalarska_prace.pdf.

Polycaprolactone. Wikipedia [online]. 2016 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Polycaprolactone>

Reis, C., P., Neufeld, R., J., Riberio, A., J., Veiga, F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2006, vol. 2, no 1, pages 8-21.

Reynolds, M., M., Frost, M., C., Meyerhoff, M., E., Nitric oxide-releasing hydrophobic polymers: preparation, characterization, and potential biomedical applications. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, vol. 7, pages 926-936.

Ridnour, L., A., Sim E., S., Hayward, M., A., Wink D., A., Martin, S., M., Buettner G., R., Spitz, D., S., A Spectrophotometric Method for the Direct Detection and Quantitation of Nitric Oxide, Nitrite, and Nitrate in Cell Culture Media, *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 281, no. 2, 223-229.

Romanowicz, G., E., He, W., Nielsen, M., Frost, M., C., Novel device for continuous spatial control and temporal delivery of nitric oxide for in vitro cell culture, *Polymer Degradation and Stability*, 2013, vol. 98, pages 332–339.

Saebra, B., A., State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. *Biotechnology Advances*. 2015, vol.33, pages 1370-1379

Science of Nitric Oxide- What Nitric Oxide does for the health and wellness of our cardiovascular system, according to Dr. Rainer Böger, M.D. Arginine Cardio [online]. 2013 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://www.argininecardio.com/science-of-nitric-oxide.php>

Sedláček, J., Oxid dusnatý jako signální molekula, *Vesmír*, 1999, vol. 78 , pages 75-76. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/oxid-dusnaty-jako-signalni-molekula>

Sill, T., Recum, H. A., von, *Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering*. *Biomaterials*, 2008, vol. 29, no 13, pages 1989-2006.

Smrčková, M., *Polymerace a kopolymerace e-kaprolaktonu pomocí organických a organokovových katalyzátorů*, Brno, 2009. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=15027.

Šnejdrová, E., Dittrich, M., Poly (hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv, *Chemické listy*, 2011, vol. 105, pages 27-33. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_01_27-33.pdf

Tara, S., et al., *Vessel Bioengineering – Development of Small-Diameter Arterial Grafts*, *Circulation Journal*, 2014, vol. 78., pages 12-19.

Vrbková, E., Vyskočilová, E., Červený, L., Enkapsulace aromatických látek do sférických silikátových částic, *Chemické listy*, 2015, vol. 109, pages 7-13. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_01_7-13.pdf

Vroman, I., Tighzert, L., *Biodegradable Polymers*, *Materials*, 2009, no. 2, pages 307-344.

Wu, Y., M. E. Meyerhoff: Nitric oxide-releasing/generating polymers for the development of implantable chemical sensors with enhanced biokompatibility. *Talanta*. 2008, vol. 75, pages 642-650.

Zítka, O., Šorbová, P., Adam, V., Hubálek, J., Provazník, I., Žižková, V., Kizek, R., Nanotechnologie pro efektnější cévní náhrady, *Chemické listy*, 2013, vol. 107, 24-29. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_01_24-29.pdf