

Studium adsorpce proteinů na polyesterové mikro a nanovláknenné materiály

Diplomová práce

Studijní program: N3942 Nanotechnologie
Studijní obor: Nanomateriály

Autor práce: **Bc. Pavel Dvořák**
Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.
Katedra chemie





Zadání diplomové práce

Studium adsorpce proteinů na polyesterové mikro a nanovláknenné materiály

Jméno a příjmení: **Bc. Pavel Dvořák**
Osobní číslo: M17000147
Studijní program: N3942 Nanotechnologie
Studijní obor: Nanomateriály
Zadávající katedra: Katedra chemie
Akademický rok: **2019/2020**

Zásady pro vypracování:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Charakteristika nano a mikrovláknenných materiálů (morfologická analýza, smáčivost).
3. Adheze proteinů na vláknenné materiály (optimalizace adsorpce a desorpce, modelový protein – BSA).
4. Analýza adheze proteinů na vláknenné materiály (kvantitativní analýza proteinů – elektroforeza, spektrofotometrie, chromatografie).
5. Vyhodnocení výsledků.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
40-60 stran
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. GRAFAHREND, Dirk a kol. Control of protein adsorption on functionalized electrospun fibers. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 101(3), 609-621. DOI: 10.1002/bit.21928. ISSN 00063592.
2. PHAM, Q. P. a kol. Electrospun poly(e-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*. 2006, 7(10), 2796-2805. DOI: 10.1021/bm060680j. ISSN 1525-7797.
3. odborné publikace dostupné z databází www.webofscience.com a www.scopus.com

Vedoucí práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání práce:

7. října 2019

Předpokládaný termín odevzdání:

18. května 2020

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, 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 nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

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

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má diplomová práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

25. května 2020

Bc. Pavel Dvořák

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří napomáhali vytvoření méj diplomové práce, především pak Ing. Věře Jenčové, Ph.D. za trpělivou podporu a pomoc s experimentální i teoretickou částí práce. Též bych rád poděkoval Mgr. Vitu Novotnému za provedená měření pomocí gelové permeační chromatografie, Ing. Kristýně Havlíčkové za přípravu materiálů a pomoc s jejich charakterizací a Ing. Šárce Hauzerové za pomoc s analýzou desorbovaných proteinů.

V neposlední řadě děkuji také svým rodičům, prarodičům a sestře Tereze za podporu v mém dosavadním studiu.

Abstrakt

Význam proteinové adsorpce při tvorbě extracelulární hmoty, jejím osazení buňkami a následné obnově tkání je zcela zásadní. Zatímco v oblasti nanočástic je tento jev již dobře prozkoumán, v oblasti vláknenných scaffoldů je tato disciplína stále prozkoumána nedostatečně. Různé vlastnosti specifické vláknenným materiálům ovlivňují průběh proteinové adsorpce a nepřímo tak určují reakci organismu. V této diplomové práci byla testována adsorpce albuminu z hovězího séra na několika polyesterových nano- a mikrovláknenných materiálech. Byl hledán vhodný postup adsorpce a desorpce, ale také nejvhodnější způsob následné analýzy adsorbovaných proteinů. Několik metod analýzy bylo zkoumáno jak z hlediska náročnosti, tak z hlediska správnosti výsledků. Na základě výsledků byly mezi sebou porovnány jak materiály, tak analytické metody. Kromě standardních metod elektroforézy a chromatografie se ukázala pro větší množství vzorků být vhodnou metoda fluorimetrická. Z testovaných materiálů se vhodným k dalšímu zkoumání jevil mikrovláknenný PCL 80 pro jeho vysoké hodnoty adsorbovaného albuminu, avšak hydrofobní blend s PLCL v poměru 1:1 váže albumin silněji.

Klíčová slova: proteinová adsorpce, vláknenné scaffoldy, albumin, polyestery, proteinová korona

Abstract

The protein adsorption is a crucial process at the formation of extracellular matrix, its cell adhesion and proliferation and resulting tissue renewal. In connection with nanoparticles, this phenomenon is well understood, whereas in the field of fibrous scaffolds, this phenomenon has yet to be investigated. Diverse properties of fibrous materials affect the process of protein adsorption, indirectly determining the response of an organism. In this diploma thesis, adsorption of bovine serum albumin onto several polyester nano- and micro-fibrous materials has been examined. A process of adsorption and desorption was determined and also the most eligible analysis methods of adsorbed proteins were sought. Several methods of analysis have been investigated in terms of method feasibility and results accuracy. Based on the results, both materials were compared between each other as well as the analytical methods used. In addition to the standard methods of electrophoresis and chromatography, the fluorimetry method proved to be suitable for analysis of large number of samples. From materials available, the most eligible for further research would be micro-fibrous PCL 80 due to high amounts of adsorbed proteins, but hydrophobic blend 1:1 with PLCL bonds with albumin stronger.

Keywords: protein adsorption, fibrous scaffolds, albumin, polyesters, protein corona

Obsah

Úvod.....	11
Teoretická část	12
1 Scaffolds ve tkáňovém inženýrství	12
1.1 Materiály pro scaffolds.....	13
1.2 Polymerní materiály	14
1.3 Metody přípravy vlákných materiálů.....	18
1.4 Charakteristika vlákných materiálů	20
2 Proteiny	21
2.1 Proteiny krevní plasmy	21
2.2 Další modelové proteiny	24
3 Proteinová adsorpce.....	26
3.1 Principy interakce krevních proteinů s materiály.....	26
3.2 Nanomateriály a proteinová adsorpce	30
3.3 Analýza adsorbovaných proteinů	32
Experimentální část.....	34
4 Materiály a metody	34
4.1 Použité materiály a chemikálie	34
4.2 Použité metody	37
4.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie	37
4.2.2 Stanovení specifického povrchu	37
4.2.3 Stanovení smáčivosti povrchu	37
4.2.4 10% SDS-PAGE elektroforéza.....	37
4.2.5 Spektrofotometické stanovení koncentrace proteinů	40
4.2.6 Fluorimetrické stanovení koncentrace	42
4.2.7 Stanovení koncentrace pomocí gelové permeační chromatografie ...	43
4.2.8 Statistické zpracování výsledků.....	43
5 Výsledky a diskuse	45

5.1	Charakteristika testovaných materiálů.....	45
5.2	Optimalizace postupu adsorpce a desorpce proteinů.....	48
5.3	Optimalizace doby adsorpce	50
5.4	Optimalizace druhé desorpce	53
5.5	Analýza slabě vázaných proteinů	56
5.6	Spektrofotometrická analýza adsorbovaných proteinů.....	57
	Závěry a doporučení.....	65
	Seznam použité literatury	67

Seznam obrázků

Obrázek 1:	Schematické znázornění fází adsorpce proteinu na povrch (angl.)[55]	28
Obrázek 2:	Grafické znázornění tvrdé („hard“) a měkké („soft“) korony na průřezu 0D nebo 1D materiálem se znázorněním Vromanova jevu (angl.)[57].....	29
Obrázek 3:	Aparatura k přípravě gelů pro SDS-PAGE elektroforézu s již připravenými gely.....	38
Obrázek 4:	Elektroforetická vana s již připravenými gely čekajícími na zalití „running“ pufrem.....	39
Obrázek 5:	Probíhající SDS-PAGE elektroforéza	40
Obrázek 6:	Kalibrační řada a trojice vzorků připraveny na spektrofotometrickou analýzu; A, B kalibrační řada, koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]: 1 – 1 000, 2 – 800, 3 – 600, 4 – 400, 5 – 200, 6 – 100, 7 – 80, 8 – 60, 9 – 40, 10 – 20, 11 – 10, 12 – 0 (čisté PBS); C, D vzorky o neznámé koncentraci.....	42
Obrázek 7:	SEM snímky materiálů; měřítko 10 μm , PLA 5 μm ; a) PCL 45, b) PCL 80 první a druhé sady, c) B 3:1 ", d) B 1:1 ", e) B 1:3 ", f) PLCL ", g) PLA.....	47
Obrázek 8:	Příprava vzorku pro adsorpci BSA; vlevo ústřížek materiálu vkládaný do mikroskopu, vpravo již připravený vzorek k otestování adsorpce	49
Obrázek 9:	10% SDS-PAGE elektroforéza; srovnání 1h a 24h adsorpce u jednotlivých materiálů.....	51

Obrázek 10: 10% SDS-PAGE elektroforéza; srovnání 1h, 4h, 8h a 24h adsorpce u vybraných materiálů	53
Obrázek 11: 10% SDS-PAGE elektroforéza; rozdíl mezi I. a II. desorpcí je patrný i u čtyř dalších testovaných vzorků materiálu PCL 80	55
Obrázek 12: 10% SDS-PAGE elektroforéza; vzorky materiálů PCL 45, PCL 80, B 1:1 a PLCL po I. desorpci a oplachu	57
Obrázek 13: Centrifugační kolona Sartorius <i>VivaSpin Turbo 4 3000 MWCO</i> ; zleva spodní sběrná zkumavka, vrchní nádobka s membránou a víčko	58
Obrázek 14: 10% SDS-PAGE elektroforéza: srovnání vzorků I. desorpce PCL 80 s kalibrační řadou BSA	64

Seznam grafů

Graf 1: GPC chromatografie; graf závislosti koncentrace BSA na materiálu po 1 a 24h adsorpci. * = nedostatek dat	51
Graf 2: GPC chromatografie; graf závislosti koncentrace BSA na materiálu po 1, 4, 8 a 24h adsorpci	52
Graf 3: GPC chromatografie; graf závislosti koncentrace adsorbovaného BSA na materiálu při dvou desorpcích	54
Graf 4: Detailní pohled na druhou desorpci z grafu 3	54
Graf 5: Poměr koncentrací z první a druhé desorpce vůči sumě obou naměřených hodnot	56
Graf 6: Graf závislosti koncentrace adsorbovaných proteinů vzorků z optimalizace doby adsorpce na materiálu; analyzováno Bradfordovou metodou po centrifugaci v kolonách	59
Graf 7: Graf závislosti koncentrace adsorbovaných proteinů vzorků z optimalizace druhé desorpce na materiálu; analyzováno Bradfordovou metodou po centrifugaci v kolonách	60

Graf 8: Graf závislosti naměřené koncentrace definovaných vzorků BSA na původní koncentraci; analyzováno Bradfordovou metodou po centrifugaci v kolonách.....	61
Graf 9: Graf závislosti naměřené koncentrace definovaných vzorků BSA na původní koncentraci; analyzováno Bradfordovou metodou po srážení draselnými solemi	62
Graf 10: Graf závislosti koncentrace adsorbovaných proteinů vzorků I. desorpce PCL 80 na materiálu; analyzováno Bradfordovou metodou po dialýze	63
Graf 11: Graf závislosti koncentrace adsorbovaných proteinů vzorků I. desorpce PCL 80 na materiálu; analyzováno metodou Quant-iT po 10násobném zředění pomocí PBS	64

Seznam tabulek

Tabulka 1: Souhrn informací o základních materiálech / skupinách materiálů pro scaffoldy[22]	16
Tabulka 2: Souhrn informací o základních proteinech / skupinách proteinů lidské krevní plasmy[35, 38, 39]	23
Tabulka 3: Souhrn informací o dalších modelových proteinech / skupinách proteinů v proteinové adsorpci[39, 42].....	26
Tabulka 4: Seznam použitých chemikálií a činidel.....	34
Tabulka 5: Seznam použitých roztoků	34
Tabulka 6: Seznam použitých přístrojů a programů	36
Tabulka 7: Příprava kalibrační řady BSA.....	41
Tabulka 8: Morfologická analýza použitých materiálů; * nelze změřit dostupnými metodami, * nelze změřit pro superhydrofilní charakter, ? nebylo měřeno	46

Seznam zkratek

- APS – peroxodisíran amonný
- B x:y – blend PCL a PLCL v poměru x:y
- BET – Brunauerova–Emmettova–Tellerova výpočetní metoda
- BSA – albumin z hovězího séra
- CBB – barvivo Coomassie Brilliant Blue
- ECM – extracelulární matrice
- GPC – gelová permeační chromatografie
- IČ – infračervená spektroskopie
- PBS – roztok fosfátového pufru
- PCL – poly- ϵ -kaprolakton
- PLA – kyselina polyléčná
- PDLA – kyselina poly-D-mléčná
- PLLA – kyselina poly-L-mléčná
- PDLLA – racemická směs kyselin poly-D-mléčné a poly-L-mléčné
- PLCL – poly-laktid-co-kaprolakton
- RNA – ribonukleová kyselina
- SDS – dodecylsírán sodný
- SDS-PAGE – denaturující elektroforéza pomocí SDS v polyakrylamidovém gelu
- SEM – skenovací elektronová mikroskopie
- TEMED – tetramethylethylendiamin
- Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan
- UV-VIS – ultrafialová-viditelná spektroskopie

Úvod

Za fenomén posledních let ve tkáňovém inženýrství bývají považovány vlákenné materiály. Jejich strukturní i povrchové vlastnosti, stejně tak jako jejich relativně snadná příprava i použití, je předurčují k využití do scaffoldů sloužících k náhradám jak měkkých, tak tvrdých tkání.

Jakmile se takový materiál dostane do kontaktu s fyziologickým prostředím organismu, např. po implantaci na místo poškozené tkáně nebo do místa v krevním řečišti, je velmi nepravděpodobné, že by se okolní buňky pokusily s materiálem okamžitě interagovat.[1–3] Namísto toho dojde ke kineticky výhodnějšímu jevu, tzv. proteinové adsorpci. Materiál je tak ihned obalen tzv. proteinovou korunou, první odezvou organismu na neznámý materiál, která poté identifikuje tento materiál při následných biologických procesech, ať už při interakci s okolními buňkami, tak při interakci s obrannými mechanismy organismu.

V nanotoxikologii i ve tkáňovém inženýrství se výzkum proteinové adsorpce stal v posledních letech populárním.[1, 4] Studuje se jak vznik tzv. měkké korony, tedy té kineticky řízené prvotní vrstvy proteinů, tak postupná proměna korony v blízkosti povrchu materiálu, způsobená termodynamicky řízenou výměnou nebo deformací navázaných proteinů.[5]

Cílem této diplomové práce je především optimalizace postupů adsorpce (a následné desorpce) vybraných proteinů krevní plasmy na vybrané dostupné nano- a mikrovlákenné materiály a s tím spojená analýza adsorpce. Porovnání výsledků kvantifikace adsorbovaných proteinů mezi zvolenými materiály, s výsledky z dostupné literatury a také s případnými daty o buněčné adhezi a proliferaci by mělo být využito k výběru vhodných materiálů pro jejich aplikace.

Teoretická část

1 Scaffoldy ve tkáňovém inženýrství

Mezi obory moderní medicíny nabývá stále více na významu tkáňové inženýrství. Tento interdisciplinární obor kombinuje znalosti (nano)technologie a biologie ve snaze dosáhnout obnovení, náhrady, či uzdravení poškozených lidských i zvířecích tkání.[6] K dosažení zmíněných cílů se výzkumníci zaměřují především na tři základní aspekty, tzv. triádu, tkáňového inženýrství: buňky, biomolekuly a tzv. scaffoldy.

Scaffold je pojem pro biomateriál poskytující oporu buňkám při tvorbě tkání.[6] Struktura často polymerního charakteru podporuje adhezi biomolekul a následnou adhezi a proliferaci buněk. Pro použití takového materiálu se uplatňují dva nejslibnější přístupy tkáňového inženýrství.[7] První z nich využívá buněk odebraných z příslušné tkáně poraněného jedince a vhodných syntetických 3D scaffoldů. Buňky jsou po odběru prekulturnovány na scaffoldu, který buňkám poskytuje porézní strukturu k proliferaci a tvorbě extracelulární matrice (ECM). Scaffoldy pro tento účel jsou biodegradabilní a degradují v souladu s rychlostí proliferace buněk.[7] Po implantaci prekulturnovaného materiálu na postižené místo pak rychlost degradace materiálu zároveň reguluje růst buněk. Druhý přístup pracuje s acelulárními 2D nebo 3D scaffoldy dodávajícími na zasažené místo podpůrné biomolekuly a funkční skupiny (tzv. bioaktivní scaffoldy). Materiál je implantován ihned po zranění a jeho cílem je připravit vhodné podmínky pro obnovu okolní tkáně přímo v daném místě, kde tvoří platformu pro proliferaci buněk. Materiálem dodané biomolekuly a funkční skupiny pak mají za úkol nalákat na postižené místo co nejvíce progenitorových buněk k úspěšné obnově tkáně. Častá je i kombinace obou přístupů.

V místě implantace scaffold plní především funkci zástupce extracelulární matrice.[6, 8, 9] Pro výběr vhodného scaffoldu je tak určující, jak dobře dokáže ECM svými vlastnostmi imitovat.[6] Samozřejmě záleží také na typu tkáně, jejíž vlastnosti je záměr napodobit.[10] U měkkých tkání je pozornost zaměřena především na tzv. biodegradabilitu materiálu, tedy dobu, po kterou je materiál schopen udržet si původní vlastnosti a tvar v prostředí organismu. Průběh degradace materiálu by u měkkých tkání měl odpovídat tomu, jak organismus postupně nahrazuje scaffold za přirozenou ECM. Také je nevyhnutelné znát produkty, které se uvolňují při degradaci materiálu do okolní

tkáně, protože tyto látky by neměly být toxické a také by neměly negativně ovlivňovat proliferaci buněk. U tvrdých tkání pak naopak požadujeme, aby materiál byl pokud možno nedegradabilní.

Kromě již zmíněné architektury a biodegradability materiálu jsou důležité pro funkci materiálu také další jeho charakteristiky, především mechanické vlastnosti a biokompatibilita. Scaffoldy v místě poškození pomáhají v udržení mechanické a tvarové stability, stejně jako ECM v nepoškozené tkáni. Mnohé typy buněk dokáží vycítit různé materiálové a povrchové vlastnosti scaffoldu, jako je např. tuhost, hydrofobicita, rozměry, poloměr zakřivení, náboj, sterické efekty svrchní vrstvy a další,[4, 6] a upraví podle nich svůj tvar, morfologii, míru adheze nebo proliferace, případně vyvolají negativní odezvu, či začnou proces řízené nebo neřízené buněčné smrti.

Pro prověření biokompatibility materiálu jsou prvním krokem in vitro testy cytotoxicity,[11] často pak následují testy adheze a proliferace buněk.[12] Sleduje se např. metabolická aktivita buněk, tvorba monovrstvy pokrývající materiál nebo třeba tvorba mezibuněčných kontaktů, hlídá se vždy jakákoliv negativní odezva. V poslední době se pozornost obrací také k fenoménu tzv. proteinové adsorpce, resp. proteinové korony.[4] Po umístění materiálu do kontaktu s fyziologickým prostředím organismu, např. po injekci nanočástic do krevního řečiště nebo po implantaci scaffoldu na místo poškozené tkáně se ihned na materiál naváže určitá škála proteinů z daného prostředí, které takto mohou nabýt změněné konformace, případně tak pozměnit i svoji funkci, či aktivitu.[4, 13] Utvořený proteinový obal následně ovlivňuje interakce buněk, přesněji membránových proteinů a receptorů, s materiálem a s tím spojené chování buněk v blízkosti sledovaného materiálu.

1.1 Materiály pro scaffoldy

Od poloviny 80. let, kdy se pojem tkáňové inženýrství začal objevovat, bylo vyvinuto značné množství nejrůznějších materiálů, ze kterých mají výzkumníci na výběr při vývoji nového scaffoldu.[6] K dosažení vhodných vlastností scaffoldu pro zvolenou aplikaci mohou být uplatněny jak materiály přírodního, tak i syntetického charakteru.[14] Dosud se prosadily především materiály keramické, kovové, či polymerní. V ortopedické praxi se velmi osvědčily materiály z nerezové oceli, slitin kobaltu nebo titanu, případně keramiky na bázi oxidu hlinitého, oxidu zirkoničitého, fosforečnanu vápenatého, nebo tzv. bioskla. Pomocí uvedených materiálů i jejich kombinací lze účinně

ně nahradit poškozené tkáně kostí, či chrupavek. Pro rigidní tkáně z nich lze vybrat jak bioinertní materiály, tak povrchově bioaktivní materiály zejména v oblasti keramik a zcela v oblasti keramik pak i bioresorbovatelné (degradabilní) materiály. Takové materiály však jsou již velmi vzácné, krom toho také zpracovatelnost podobných materiálů je limitována.[15]

Vhodné pro měkké tkáně a lépe bioresorbovatelné se tak ukázaly být zejména materiály polymerní.[14] Přírodní polymery, např. glykosaminoglykany, chitin, chitosan, kolageny nebo škrob, dokáží přirozeně velmi dobře imitovat ECM, mají proto využití zejména na obnovu chrupavek, kostí, kůže i nervů. Mají však také řadu nevýhod. Získané materiály se často velmi liší svými vlastnostmi zdroj od zdroje, problémy trpí také jejich následné zpracování, například nemusí být snadné je rozpustit nebo roztavit, také biodegradabilita se může lišit pacient od pacienta. Syntetické polymery předčí ty přírodní především svojí modifikovatelností. Lze tak dosáhnout vhodných mechanických vlastností pro danou aplikaci a stejně tak lze obejít i další zmíněné nevýhody přírodních materiálů.

1.2 Polymerní materiály

V oblasti syntetických polymerních materiálů jsou rozšířené zejména poly- α -hydroxyestery, polyanhydridy nebo polyorthoestery.[10, 14] Zatímco mezi nedegradabilní jsou řazeny polymery polyethylen (PE), polyethylentereftalát (PET), dále varianty polyethylenoxidu (PEO, PEG) nebo polytetrafluorethylen (PTFE), mezi bioresorbovatelné polymery pak patří právě poly- α -hydroxyestery, kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polymlečná (PLA), polydioxanon (PDO), či poly- ϵ -kaprolakton (PCL). Zmíněné materiály mají často desítky let trvající historii uplatnění v medicínské i potravinářské praxi. Důležitou skupinu pak představují i jejich kopolymery. Úpravou poměru jednotlivých monomerů kopolymerů lze dosáhnout různé rozpustnosti, krystalinity i degradability.[14]

Oproti jiným bioresorbovatelným materiálům je kyselina polyglykolová, stejně tak jako její homopolymery, vysoce krystalická. Na základě toho není rozpustná ve většině organických rozpouštědel. Naopak kvůli hydrofilicitě ztrácí svoje mechanické vlastnosti již během 2 týdnů a může být kompletně rozložena již během 4 týdnů po implantaci. Je také velmi tepelně stabilní a vykazuje dobré chování při tavení.

Strukturně i způsobem přípravy blízká kyselina polymléčná je dosud nejběžněji využívaný syntetický biomateriál. Od PGA se však odlišuje svými vlastnostmi kvůli methylové skupině na alfa uhlíku, která ji dělá chirální. Kyselina poly-L-mléčná (PLLA) je tak semikrystalická s relativně vyšší tvrdostí, stejně tak křehkostí.[14, 16] Naproti tomu kyselina poly-DL-mléčná (PDLLA) je amorfni průhledný materiál, degraduje ale rychleji než PLLA, hydrolyza může trvat 2–12 měsíců v závislosti na stupni molekulové hmotnosti, krystalinity, či na příměsích. Různých rychlostí degradace lze dosáhnout také spojením zmíněných materiálů v amorfni kopolymeru poly-laktid-co-glykolové kyseliny (PLGA).

Struktura homopolymeru poly-ε-kaprolaktonu (PCL) obsahuje pět nepolárních methylenových skupin a jednu polární esterovou. Je tudíž semikrystalický, vyznačuje se elastickými vlastnostmi, čímž se přibližuje polyolefinům. Ovšem kvůli zmíněné polární skupině je biodegradabilní. Doba degradace samotného homopolymeru může dosahovat 24 měsíců, z toho důvodu byly syntetizovány kopolymery s kyselinou poly-DL-mléčnou nebo poly-L-mléčnou poly-laktid-co-kaprolaktony (PLCL) v různých poměrech.

V závislosti na poměru kopolymeru PLCL lze obdržet různé vlastnosti, od měkkých a lepkavých materiálů přes různě elastické a plastické až po tuhé voskovité.[16, 17] Kvůli takovéto modularitě nalézá PLCL využití jak v medicínských aplikacích, tak např. jako ztužovadlo.

Kvůli nepolárním skupinám je povrch PCL hydrofobní, což zhoršuje podmínky k adhezi buněk.[18] Tato vlastnost je považována za jednu z největších nevýhod tohoto materiálu. Vhodnějších vlastností pro adhezi a proliferaci buněk lze dosáhnout pomocí tzv. blendů. Před přípravou vláken se do vstupní směsi přimísí prekurzor hydrofilního materiálu. Toto lze provést např. s polyethylen glykolem (PEG), polyvinyl alkoholem (PVA), želatinou, kolagenem,[18] kyselinou polymléčnou (PLLA)[19] nebo poly-laktid-co-kaprolaktonem (PLCL).[20, 21]

Tabulka 1: Souhrn informací o základních materiálech / skupinách materiálů pro scaffoldy[22]

Skupina		Přednosti	Slabiny	
přirodní	uhlovodíky	kyselina hyaluronová	biokompatibilní, mechanicky odolná, stimuluje buněčnou činnost a tvorbu ECM, elastická, hydratující	viskózní
		chitosan	biokompatibilní, biodegradabilní, málo imunogenní, antimikrobiální, antioxidant, stimuluje imunitní odezvu, srážení krve a produkci ECM	špatně rozpustný ve vodě, degraduje pomalu a nekontrolovatelně
		alginát sodný	nízkonákladový, biokompatibilní, biodegradabilní, málo toxický, neimunogenní, stimuluje imunitní odezvu a buněčnou činnost	málo propletené řetězce, buňkám cizí
	proteiny	želatina	biodegradabilní, neantigenní, stimuluje imunitní odezvu	špatně rozpustná ve vodě, horší mechanické vlastnosti
		vlákněné hedvábí	výborné mechanické vlastnosti, kontrolovatelná biodegradace, propustné, stimuluje buněčnou činnost	za určitých podmínek slabší mechanická pevnost
		kolagen	málo antigenní, biokompatibilní, stimuluje buněčnou činnost, v čase stabilní a biomechanicky pevný	lámavý během degradace
syntetické	apartické polyestery	PLA	biodegradabilní, dobré mechanické vlastnosti, obnovitelná, univerzální, snadno	lámavá, hydrofobní, málo krystalická

			zpracovatelná	
		PLGA	kontrolovatelná degradace, smáčivost a jiné mechanické vlastnosti, rozpustná v mnoha běžných rozpouštědlech	málo tvárná, vysokonákladová, malá buněčná afinita, nevhodná pro transport léčiva
		PCL	pružný, dlouhodobě odolný, vysoce krystalický	pomalou degradující, málo mechanicky pevný, hydrofobní
	superhydrofilní	PEG	vysoce biokompatibilní, citlivý na různé fyzikální a chemické podněty, neutrální, rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech a vodě	nebiodegradabilní, neimunogenní, neantigenní, možný kontaktní alergen
		PVA	pružný, průdušný, absorbující vodu	nebiodegradabilní, špatné mechanické vlastnosti
		PVP	snadná a čistá syntéza, nízkonákladový, měkký, absorbující vodu	nebiodegradabilní, špatné mechanické vlastnosti

Výhodou blendů i kopolymerů navíc je, že každá složka může jinak interagovat s okolním prostředím a tak se může snáze podařit imitovat dvě základní složky ECM, proteoglykany a kolageny.[8] PCL i na něm založené blendy či kopolymery bývají pro výše zmíněné důvody považovány za excelentní materiály co se adheze a polymerace buněk a tedy i obnovy tkání týče.[18, 23] Obdobně jsou na tom podle dostupné literatury i materiály založené na PLA.[23, 24] Pilarek et al. například vyzdvihuje rychlost osazení vlákněného materiálu z PLA buňkami a vysokou míru jejich proliferace na něm.[24] Sangsanoh et al. podobně na základě testů buněk periferní nervové soustavy krys označuje PCL a PLA jako jedny z nejlépe adherujících materiálů v porovnání s některými dalšími, například poly-3-hydroxybutyrátem (PHB) nebo chitosanem,

a to jak vlákenné, tak vrstvy.[23] Koepsell navíc zmiňuje výrazný pozitivní vliv shodné orientace vláken PCL na adhezi a proliferaci buněk naznačujíc, že mikrostruktura vlákenného materiálu má v tomto ohledu výrazný vliv.[25]

1.3 Metody přípravy vlákenných materiálů

Jak již bylo naznačeno, polyesterové vlákenné materiály svými vlastnostmi a rozměry dobře simulují strukturu i funkci ECM.[10, 18] K jejich přípravě bylo dosud vyvinuto množství metod.[10, 26] Mezi běžné patří např. drawing, fázová separace, molekulární self-assembly, šablonová syntéza, melt-blown, forcespinning nebo elektrospinning.

Drawing, jak již název naznačuje, označuje tažení jednotlivých vláken z tekuté fáze.[10] Vlákno vzniká tahem mikromanipulátoru z kapky roztoku nebo taveniny. Při vytažení vlákna dojde k jeho tunutí a uvolnění rozpouštědla, čímž vzniká pevné vlákno. Takto je možné připravit shodně orientovaná vlákna či různě křížené vzory, vhodné k adhezi a proliferaci buněk, obtížnější je však uplatnění metody v sériové výrobě.

Při fázové separaci dochází k oddělení dvou fyzikálně odlišných fází. Základní homogenní fáze je při této metodě zchlazením přeměněna v gel. Po výměně stávajícího rozpouštědla za rozpouštědlo s odlišnými vlastnostmi dochází k tvorbě vlákenné sítě. Po odebrání rozpouštědla pomocí dalšího ochlazení a následné desublimace je získána vlákenná, často nanovlákenná, porézní 3D struktura velmi podobná struktuře kolagenu v ECM.[19, 26, 27]

Metodou self-assembly lze získat poměrně dobré nanovlákenné materiály.[10] Na základě elektrostatických, hydrofobních, nebo třeba van der Waalsových interakcí, iontové síly prostředí nebo pH prostředí se molekuly samostatně skládají ve vlákennou strukturu. Je takto možné docílit nejrůznějších složených struktur a tvarů, listovitých, kulovitých, tyčinkovitých, diskovitých nebo kanálkovitých.[27] Běžně se k jejich přípravě využívá peptidových amfifilů, strukturálně založených na kolagenu, jsou tedy i svojí primární strukturou příbuzné ECM. Metoda je však velmi náročná na provedení.

Přesně definované tloušťky vláken lze dosáhnout pomocí tzv. šablonové syntézy. Roztok polymeru je protlačován přes membránu s definovanými otvory. Vlákna vznikají zachycením protlačeného materiálu ve srážecí lázni. Velmi podobnou je metoda melt-blown, kdy je tavenina polymeru vytlačována z trysek za podpory proudu horkého vzduchu. Ten napomáhá prodlužování a zužování vzniklých vláken a také jejich tunutí

a unášení na kolektor. Ač je tento způsob vhodný pro průmyslovou výrobu, takto vzniklá vlákna běžně dosahují vyšších průměrů v řádu mikrometrů.

Na bázi odstředivé síly je založena tvorba vláken pomocí tzv. forcespinningu. Do otáčejícího se dutého disku či válce s otvory, tzv. spinnerety je rovnoměrně dodáván roztok nebo tavenina polymeru. Odstředivou silou jsou ze spinnerety již tahána vlákna a zachytávána na okolo umístěný kolektor. Velikost vláken pak závisí zejména na rychlosti otáčení, ale lze ji také ovlivnit teplotou nebo jiným typem kolektoru. Metoda je pro svoji jednoduchost a výtěžnost oblíbenou.

Elektrospinning (též elektrostatische zvlákňování) je považován za nejvíce spolehlivou a cenově dostupnou metodu k přípravě vlákenných materiálů.[18] Obdobně jako vlákna připravená fázovou separací tvoří vlákna připravená pomocí elektrospinningu strukturu velmi podobnou ECM, podporující proteinovou adsorpci a tak i adhezi a proliferaci buněk.[19] Touto metodou však nelze snadno dosáhnout 3D struktur a problematická je i z hlediska velikosti pórů. Na polymerní roztok nebo taveninu je při této metodě aplikováno vysoké napětí, které zajistí vytvoření trysky z povrchu roztoku nebo taveniny, tzv. Taylorova kuželu.[10] Po dosažení kritické hodnoty napětí kužel vyústí v tzv. bičující vlákno, které je koronovým výbojem elektrického větru unášeno na kolektor. Během putování vláken na kolektor jsou vlákna zbavena rozpouštědla a tak i neutralizována, u vláken z taveniny je nutné náboj z vláken odvést.

Varianty elektrospinningu lze obecně rozdělit na jehlové a bezjehlové. Při zvlákňování z jehly nebo více jehel se tvoří Taylorovy kužely z hladiny na hrotu jehly. Parametry jehly a případným sestavením více jehel dle určitého vzorce a do určitých vzdáleností lze modifikovat parametry výsledných vláken a materiálu. Varianty bezjehlového zvlákňování zahrnují zvlákňování z volné hladiny, ale mohou využívat také elektrod ve tvaru válce, struny, kuželu, disku, sítky aj. z důvodu ztenčení hladiny k podpoře tvorby Taylorových kuželů. Mimo elektrod lze k tomuto účelu využít také bublin vytvořených foukáním vzduchu na volnou hladinu, tzv. bubble-elektrospinning.

Variant elektrospinningu je kvůli jeho jednoduchosti a popularitě velké množství.[10] Další z variant je například použití střídavého napětí. Při střídavém napětí nejsou vlákna zachytávána na nabitý kolektor, nýbrž jako kolektor slouží neutrální okolní prostředí, např. vzduch. Takto je možno dosáhnout vyšší produkce vláken. Při metodě

zvané elektrobloving jsou podobně jako u melt-blownu vlákna prodlužována proudem vzduchu, což podporuje tvorbu vláken z některých materiálů, např. pryskyřic.

Koaxiální elektrospinning využívá dvou a více různých výchozích látek k tvorbě kompozitních vláken. Základní zvláknitelná složka by v takovém případě měla obalovat další složky, které nemusí být zvláknitelné. Uvádí se, že se jedná o bikomponentní vlákno tvořené strukturou jádro-plášť. Je však možné dosáhnout i dutého vlákna, např. vymytím vnitřního ve vodě rozpustného materiálu vodou. Avšak hlavní využití takových vláken je ke zvláknění materiálů, které nelze zvláknit běžným způsobem nebo je tento úkon jinými metodami náročný. Případně se tato metoda používá i k inkorporaci (bio)aktivních látek, které např. v místě aplikace mohou poskytovat buňkám živiny nebo léčivou látku. Obdobně jako u core-shell nanočástic, i u koaxiálních nanovláken je možné poté řízeně uvolňovat inkorporovanou složku, je tedy výhodné takto připravená vlákna využít klinicky.

1.4 Charakteristika vláknenných materiálů

K charakterizaci vláknenných materiálů lze v dostupné literatuře nalézt řadu analytických i biochemických metod. Zkoumá se jak fyzikálně-chemická a morfologická stránka materiálů, jako je analýza funkčních skupin, drsnost povrchu, smáčivost nebo degradabilita, tak biochemická stránka, zejména biokompatibilita, proteinová adsorpce, buněčná adheze a proliferace včetně cytotoxicity a buněčné morfologie.[28]

Základní informace o morfologii materiálu běžně poskytuje metoda skenovací elektronové mikroskopie (SEM).[28–31] Elektronové mikroskopy využívají interakce paprsku elektronů s elektronovým obalem atomů na povrchu vzorku. Vzorky je třeba před analýzou upravit na vodivé např. pozlacením. Z analýzy lze vyčíst informace ku příkladu o průměru a distribuci vláken, metoda také může být rozšířena o detekci složení vláken nebo jejich krystalinity. Topografii vzorku lze dále zkoumat pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM),[28–30] která spočívá v analýze povrchu vzorku na základě interakce s hrotem analyzátoru. Oproti metodě SEM lze navíc získat informace o drsnosti povrchu a velikosti pórů v něm.

Porozita může být dále zkoumána i při analýze specifického povrchu materiálu.[32–34] Pro obě vlastnosti materiálu se běžně využívá metod chemisorpce inertního plynu, např. dusíku nebo kryptonu. Zpracování výsledků je pak prováděno Brunauerovou–Emmettovou–Tellerovou metodou (BET) dávající informaci o specifickém po-

vrchu a Barrettovou–Joynerovou–Halendovou metodou (BJH) popisující informace o porositě, velikosti a tvaru pórů.

Pro biomedicínské aplikace může být užitečná znalost mechanických vlastností materiálu.[30, 31] Ke zjištění mechanické odolnosti, stability a trvanlivosti je materiál testován pomocí více způsobů různého namáhání. Pracuje se s analýzou např. tlakových nebo tahových deformací, sleduje se také poškození nebo prodloužení vláken. Hojně využívána informace o smáčivosti materiálu. Ke zjištění smáčivosti povrchu je využíváno goniometrické analýzy přisedlé kapky.[28–30] Zjišťuje se kontaktní úhel kapky referenčního rozpouštědla, např. vody.

Při studiu proteinové adsorpce nebo biokompatibility je vhodná také chemická analýza funkčních skupin na povrchu materiálu. Kromě výše zmíněné metody SEM se mezi běžné metody řadí např. infračervená spektroskopie (IČ), ultrafialová-viditelná spektroskopie (UV-VIS) nebo třeba rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS).[28–30] Všechny tyto metody při analýze detekují interakce atomů nebo vazeb mezi nimi s dodaným svazkem záření.

Fyzikálně-chemické vlastnosti materiálu jsou pak často dávány do vztahu s biokompatibilitou materiálu. Kromě proteinové adsorpce, kterou se zabývá tato práce, je možné se běžně setkat s testy buněčné adheze a proliferace na materiálu, stejně tak jako s testy cytotoxicity, vlivu na buněčnou morfologii a metabolické procesy buněk.[28, 31] Při těchto testech se provádí vystavení materiálu specifické linii (specifickým liniím) buněk a sleduje se jejich reakce jak v krátkodobém měřítku (první kontakt, osazení povrchu), tak v dlouhodobém (metabolismus, funkce, úmrtnost, degradace materiálu). Při testech je třeba se vyvarovat kontaminaci (jak chemické, tak mikrobiální) a vlivům okolního prostředí (výkyvy teploty, pH, záření), testy tak jsou prováděny za specifických podmínek a s využitím specifických postupů. Na tyto tzv. *in vitro* testy pak navazují i *in vivo* testy na vybraných organismech dle potřeby pro předpokládané využití materiálu.

2 Proteiny

2.1 Proteiny krevní plasmy

Proteiny krevní plasmy (také proteiny krevního séra) představují jednu z jejích klíčových složek,[35] jsou tak hlavními modelovými proteiny pro studium proteinové ad-

sorpce. Vyskytují se mezi nimi jak jednoduché, tak komplexní proteiny a proteiny složené z více součástí. Zdraví dospělí lidé mají mezi 6,5 až 8,4 % proteinů na 100 ml krve. Složení směsi proteinů v krvi se však odvíjí od zdravotního stavu pacienta a genetických predispozic. Proteiny krevní plasmy tak mohou být brány jako diagnostické/prognostické měřítko týkající se zdraví organismu.

K dnešnímu dni bylo identifikováno přes 3 700 proteinů krevní plasmy.[13] Převážná většina z nich se v ní vyskytuje pouze ve stopovém množství a jedná se o podskupiny těch hlavních.[35] Přesto jsou pro správnou funkci organismu nepostradatelné. Často jsou produkovány v játrech a na funkčnosti jater závisí. Podle hybnosti při elektroforéze se dělí do skupin α , β a γ .

Albumin je nejvíce zastoupený protein lidské krevní plasmy.[35–37] U dospělých lidí zaujímá 50–70 % všech proteinů krevní plasmy, jeho přirozená koncentrace je mezi 35 a 55 mg/ml. Jedná se o globulární protein složený ze 610 aminokyselin v jediném řetězci peptidů. Je produkován v játrech a v případě jejich poškození a jeho snížené produkce stojí za vícero poruchami krevního oběhu. Jeho základní funkcí je vyrovnávání osmotického tlaku v cévách a udržování obsahu vody v krvi. Kvůli svojí velikosti, resp. molekulové hmotnosti 69 kDa nemůže procházet kapilárami endotelu, zůstává tak především v krevním řečišti. Zde také napomáhá transportu nejrůznějších živin, iontů a hormonů, stejně tak jako léčiv. V proteinové adsorpci se albumin, ať už z lidského nebo hovězího séra, používá zejména pro jeho vysoké zastoupení v plasmě a tudíž velmi pravděpodobný výskyt v blízkosti implantovaného materiálu. Velkou roli hraje také široké pole vědeckého poznání tohoto proteinu.

Globuliny jsou skupina dalších globulárních krevních proteinů. Oproti albuminu jsou hůře rozpustné ve vodě a také mají větší molekulové hmotnosti, 90–1 300 kDa. α_1 globuliny pomáhají transportu látek, léčiv, hormonů, enzymů, zároveň chrání orgány před působením těchto látek. Jsou běžnými markery nejrůznějších onemocnění od tumorů, přes záněty jater až po plicní onemocnění. Významnými zástupci jsou glykoprotein, fetoglobulin nebo antitripsin.

α_2 globuliny jsou často spojovány s transportem kovových prvků v cévách. Ceruloplasmin je zodpovědný za uchovávání a transport mědi, na každou molekulu proteinu je vázáno osm jejích atomů. Kvůli tomu se také účastní mnoha procesů spojených se změnou oxidačního čísla nejrůznějších iontů kovů v krvi, např. i železa. Haptoglobin

je zase spojován se správnou funkcí hemoglobinu. Na ten se váže a zabraňuje tak například jeho úniku močovými cestami nebo jinými membránami v organismu. Zároveň působí jako antioxidant a chrání buňky před poškozením ionty železa.

β globuliny též napomáhají přenosu železa v krvi. Glykoprotein transferin je přímo zodpovědný za transport železa na tvorbu hemoglobinu. Obdobně jako albumin je tvořen jediným složeným řetězcem, obsahuje však dva železité ionty. Je spojován s imunitou organismu a hladina jeho výskytu ukazuje na nejrůznější poruchy krve tvorby. Podobný hemopexin se silně váže na hem, složku hemoglobinu, často v poměru 1:1. Ve vztahu k buňkám má podobné vlastnosti jako haptoglobin. C-reaktivní protein se váže na specifické polysacharidy na povrchu mrtvých buněk nebo bakterií. Je zodpovědný za imunitní odezvu organismu, protože aktivuje makrofágy a T-lymfocyty. Bývá označován za spolehlivý marker virových i bakteriálních onemocnění.

Imunoglobuliny jsou širokou škálou γ globulinů běžně produkovaných krevními buňkami. Dělí se na pět skupin IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Jedná se o protilátky potřebné pro nejrůznější procesy v krvi, imunitní nebo třeba aktivační. V případě tumoru krevních buněk se mezi nimi objeví tzv. Bence Jonesův protein, běžně se nevyskytující protilátka složená pouze z části imunoglobulinového peptidického řetězce, který je využíván jako marker.

Fibrinogen je protein spojený se srážením krve. Jedná se o prekurzor fibrinu, složený ze šesti peptidových řetězců spojených dvěma sulfidickými můstky. Svoji molekulovou hmotností 350–450 kDa převyšuje ostatní proteiny, avšak na rozdíl od výše jmenovaných se jedná o fibrilární protein. Délka k tloušťce jeho struktury je v poměru 20:1. V krvi se vyskytuje v koncentraci 2–4 mg/ml.

Tabulka 2: Souhrn informací o základních proteinech / skupinách proteinů lidské krevní plasmy[35, 38, 39]

Skupina	Tvar	Koncentrace v plasmě [mg/ml]	Molekulová hmotnost [kDa]	Rozpustnost ve vodě	Funkce
Albumin	globulární	35–55	69 (hovězí 67)	rozpustný	Osmotická funkce, transport látek, proteinová rezerva

Globuliny		25–35	90–1 300		viz níže
α_1 globuliny		1–4	45–200		Transport látek, inhibitory enzymů
α_2 globuliny		4–8	30–820		Transport látek, inhibitory enzymů, komplementární faktory
β globuliny		5–12	80–3200	nerozpustné	Transport látek, komplementární faktory
γ globuliny	písmene Y	7–15	150–900		Protilátky, imunitní odezva, aktivace procesů, markery
IgA		1,5–2,5	180		
IgD		0,03	150		
IgE		$1-7 \times 10^{-4}$	200		
IgG		6–16	150		
IgM		0,6–1,79	900		
Fibrinogen	fibrilární	2–4	340–450	rozpustný	Koagulace

2.2 Další modelové proteiny

V proteinové adsorpci se běžně používají i jiné modelové proteiny, než proteiny krevní plasmy. Kromě albuminu se velmi často pracuje také s lysozymem, enzymem savců i ptáků.[40–42] Tento globulární protein je relativně menší se 129 aminokyselinami a molekulovou hmotností přibližně 15 kDa.[43, 44] Vyskytuje se v kostech, chrupavkách a vaječných bílích. Je známý svým antibakteriálním významem, katalyzuje totiž různé rozkladné hydrolytické procesy na povrchu bakterií a buněk. Také se jedná o velmi dobře vědecky prostudovaný protein, je známý pro svoje protirakovinotvorné účinky a antimikrobiální účinky.[45 s. 15]

Ve vaječných bílcích se také vyskytuje ovalbumin, historicky první izolovaný protein v čisté formě, který zaujímá 54–58 hm. % vaječného bílku[45 s. 15, 46]. Skládá se z 385 aminokyselin tvořících monomerní fosfoglykoprotein. Jako zástupce serpinů, enzymů proteáz, je známý svými antimikrobiálními, protimutagenními, antioxidačními a protirakovinotvornými účinky.

Ze syrovátky kravského mléka je získáván α -lactalbumin.[47, 48] Tento protein vyskytující se v mléce savců stojí za syntézou laktózy a je tak potřebný při výživě jejich mláďat. Je též významným zdrojem esenciální aminokyseliny tryptofan, zejména pro následnou syntézu serotoninu. Ovšem i u tohoto proteinu lze pozorovat protirakovinotvorné účinky. Omezuje dělení buněk a také indukuje buněčnou apoptózu.

Pravděpodobně nejznámějším proteinem může být inzulin.[49] V metabolismu některých živočichů hraje důležitou roli při udržování hladiny glukózy, tzv. krevního cukru. Navíc však napomáhá v regulaci proteinů, lipidů, v proliferaci buněk aj. Skládá se ze 110 aminokyselin. Vyskytuje se též v krevní plasmě, jeho koncentrace se však pohybuje v jednotkách až desítkách ng/ml.

Z membránových proteinů lze jmenovat cytochrom C.[50] Jedná se o relativně malý tvarem kulatý protein o molekulové hmotnosti okolo 12 kDa. Vyskytuje se na membráně mitochondrií, odkud je snadno získáván. Kvůli polárním aminokyselinám na povrchu je rozpustný ve vodě, avšak ve svém nitru obsahuje i shluk nepolárních aminokyselin. Účelem tohoto proteinu je asistovat jako transportér elektronů mezi integrovanými membránovými proteiny.

Dlouhou historii ve vědeckých pracích má ribonukleáza A.[51 s. 19, 52] Tento relativně malý, přesto však velmi komplexní protein byl používán už jako modelový protein pro studium proteinů samotných. Je totiž velmi stabilní, a byť je složen pouze ze 124 aminokyselin, je konformačně složen velmi specificky. Proto slouží jako dobrý model pro zkoumání skládání proteinů. Jeho funkcí je katalýza hydrolýzy jednovláknové RNA.

Tabulka 3: Souhrn informací o dalších modelových proteinech / skupinách proteinů v proteinové adsorpci [39, 42]

Skupina	Tvar	Molekulová hmotnost [kDa]	Rozpustnost ve vodě	Funkce
Lysozym	globulární	14,3–14,6	rozpustný	Antibakteriální účinek, protirakovinotvorný účinek, imunitní odezva
Ovalbumin	serpinovitý	44,5–45	rozpustný	
α -lactalbumin	globulární	14,175	rozpustný	Tvorba laktózy, serotoninu, zásoba energie
Inzulin	globulární	5,808	nerozpustný	Metabolické procesy
Cytochrom C	globulární	12,4	rozpustný	Energetické procesy mitochondrií
Ribonukleáza A	globulární	13,7	rozpustná	Katalýza hydrolyzy RNA

3 Proteinová adsorpce

3.1 Principy interakce krevních proteinů s materiály

Jak již bylo v úvodu zmíněno, při vložení materiálu do fyziologického prostředí je materiál téměř okamžitě obalen proteiny. [4, 13, 53] Okolní buňky tedy neinteragují přímo se samotným materiálem, ale s materiálem pokrytým vrstvou adsorbovaných proteinů. Buňky však nereagují pouze na složení a uspořádání této vrstvy, ale také na různé dynamické změny, např. průběžnou výměnu proteinů ve vrstvě při postupném ustavování termodynamické rovnováhy. Složení a uspořádání vrstvy je pak ovlivněno povahou materiálu, zejména jeho povrchu, a s tou spojenou afinitou jednotlivých proteinů krevní plasmy k materiálu. Vzhledem k velkému množství různých proteinů v krevní plasmě (dle Lynche a Dawsona přes 3 700 [13]) lze očekávat také různé mechanismy navázání proteinů na materiál a jejich soupeření. Z těchto důvodů je v literatuře velmi málo užíván pojem „vrstva“ proteinů, používá se vhodnější termín „korona“.

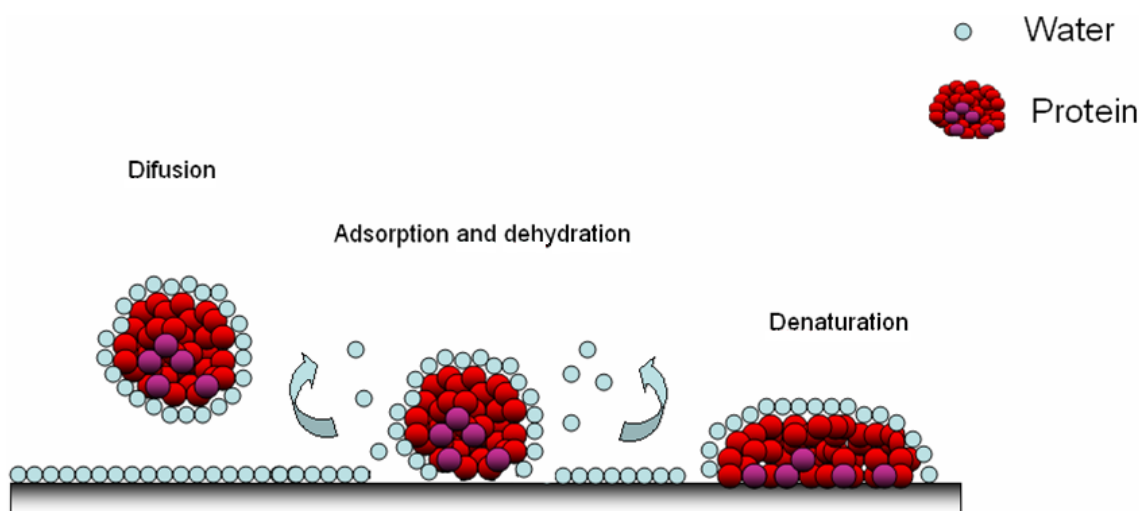
K povrchu materiálu migrují proteiny zcela volně buď na základě difuze, nebo podle spádu potenciální energie.[5] V blízkosti materiálu se však již začínají uplatňovat termodynamické principy a protein putuje ve směru spádu Gibbsovy volné energie. Entalpický a entropický příspěvek rovnice 1 pak může utvářet vícero dějů, např. tvorba kovalentních i nekovalentních vazeb, přeskupení molekul vody na rozhraní fyziologického prostředí nebo třeba změny konformace jak proteinů, tak povrchu samotného materiálu.

$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{ads} - T\Delta S_{ads} < 0$$

Rovnice 1: Skladba entalpického a entropického příspěvku v rovnici Gibbsovy volné energie

Protein s materiálem interaguje skrze vazné místo proteinu. Takové místo je vymezené specifickou lokální vlastností proteinu, danou např. jeho primární strukturou v dané doméně. Vazných míst může být v proteinu více a navázání probíhá pomocí nejrozličnějších typů interakcí.[54] Stabilita vazby proteinu a materiálu pak závisí na počtu a síle takových interakcí.[5] Je například známo, že hydrofobní materiály váží proteiny silněji a ty se naopak hůře desorbují. Konformační změny proteinu lze očekávat, především pokud umožní vytvořit další interakci s materiálem a snížit tak Gibbsovu volnou energii systému. Může se jednat o odhalení za běžných podmínek skrytého vazného místa, přeuspořádání vazných míst důležité vazné domény nebo přeuspořádání katalytické domény. Rozsah změn pak závisí také na vnitřní stabilitě struktury proteinu.[2, 5, 40]

Změny konformace se odehrávají u většiny adsorpcí proteinů na materiál.[5] Při adsorpci na hydrofobní materiál jsou běžně nevratné, zatímco u hydrofilních materiálů mohou být vratné po změně pH nebo iontové síly v roztoku.[40] Konformace proteinů často závisí na okolních molekulách vody, kterými jsou proteiny v organismu za běžných podmínek obklopeny a s nimiž kooperují. U hydrofobních materiálů tak protein spíše musí podstoupit konformační změny, navíc razantnější a v relativně krátkém čase, což způsobí uvolnění jeho vnitřní stability a možnou ztrátu původní funkce. Tyto změny jsou však entropicky výhodné, protože umožní odebrat molekuly vody z hydrofobního povrchu materiálu a uvolnit napětí v struktuře povrchu. V důsledku konformačních změn tedy mohou být fyziologické procesy v exponovaném místě materiálem ovlivněny a to nejen u proteinů, které s materiálem přímo interagovaly.[5]



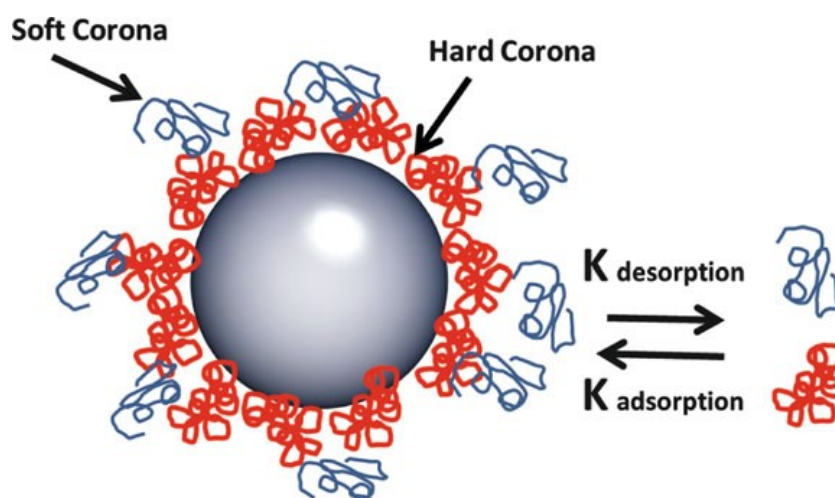
Obrázek 1: Schematické znázornění fází adsorpce proteinu na povrch (angl.)[55]

V souvislosti s proteinovou korunou se často hovoří o tzv. tvrdé a měkké koruně (angl. „hard“ a „soft“).[5] Podle jedné ze dvou soupeřících definic těchto termínů měkká korona již neinteraguje s materiálem přímo, ale skrze interakce s okolními proteiny (tvrdou korunou). I tyto interakce však doprovází konformační změny. Stejně tak jako konformačně pozměněné proteiny tvrdé korony odkrývají další vazná místa pro materiál, obdobně také mohou odkrývat běžně skrytá vazná místa pro jiné proteiny. Mohou takto vyvolat řetězovou reakci konformačních změn i u proteinů, které neinteragují přímo s materiálem a umožnit tak vznik atypických vazeb mezi proteiny, tzv. nespecifických vazeb, které vyvolávají imunitní odezvu organismu.

Pro fyziologickou odpověď organismu bývá za důležitější považována tvrdá korona. Ta je na materiál silněji navázána a zůstává tak na materiálu i po vystavení různým biofyzikálním procesům nebo fyziologickým změnám prostředí. Na rozdíl od měkké korony je také mnohem méně proměnlivá a ovlivnitelná na základě okolních podmínek. V případě putování materiálu organismem svým složením tvrdá korona mimo jiné určuje, odkud v organismu materiál pochází (kde se korona utvořila). Také může zabraňovat aglomeraci i agregaci materiálu jak se sebou samým, tak s jeho okolím na základě vlastností materiálu. Měkká korona nemůže být přímo izolována, její zkoumání je tak omezeno na úzké spektrum analytických metod a proto je oproti ní tvrdá korona mnohem lépe prozkoumána.

Korona na povrchu materiálu však není stálá.[5, 40, 56] Neustále zde probíhají adsorpční a desorpční děje, u každého proteinu odlišné, popsané jako tzv. Vromanův jev, někdy též označované jako „zrání“ korony. U proteinů soupeřících v obsazení po-

vrchu materiálu hraje roli zejména jejich koncentrace v okolním prostředí, jejich schopnost difuze na základě jejich tvaru a velikosti, ale také schopnost interagovat se samotným materiálem. Desorpční děje závisí na vazných energiích komplexu materiál–protein, případně vlivu a vazných energií komplexů proteinů mezi sebou. Poměr adsorpční a desorpční složky procesu je pro proces klíčový, kvantitativně je pak reprezentován disociační konstantou K_d . Na základě simulací je uváděno, že rychlé kinetické složky adsorpce tvořící tvrdou koronu probíhají v řádu sekund, zatímco pomalé složky tvořící měkkou koronu mohou probíhat minuty až hodiny. Protikladný proces desorpce pak dle simulací operuje v časových intervalech minut pro měkkou koronu a hodin pro tvrdou koronu.



Obrázek 2: Grafické znázornění tvrdé („hard“) a měkké („soft“) korony na průřezu 0D nebo 1D materiálem se znázorněním Vromanova jevu (angl.)[57]

Jako první se na materiál váží proteiny s příznivými vlastnostmi pro rychlou adsorpci.[5, 40] Pokud je však jejich vazná schopnost slabší, postupem času je vystřídají proteiny pomaleji se adsorbující, avšak s příznivějšími vlastnostmi pro dlouhodobou vazbu na materiál. Albumin, imunoglobulin G a fibrinogen jsou známy jako první proteiny vázané na materiál a tím pádem vhodné jako modelové k testům proteinové adsorpce. Podle vlastností materiálu jsou poté nahrazovány apolipoproteiny a koagulačními faktory. Svoji roli hraje také teplota okolního prostředí ovlivňující difuzní chování proteinů,[58] nebo třeba iontová síla prostředí,[5, 40] která je zodpovědná za délku elektrostatických interakcí, tzv. Debyovu délku. Proteiny, jejichž vazná místa preferují Debyovu délku aktuálního prostředí k tvorbě vazeb, jsou v této fázi zvýhodněny. Vromanův jev neustává ani v řádu dní a stále tak ovlivňuje a reguluje fyziologickou odpověď organismu.

Kvůli komplexní struktuře proteinu je obtížné předpovědět adsorpční chování proteinu ve vztahu k určitému materiálu.[40] Proteiny však lze alespoň obecně dělit na tvrdé („hard“) a měkké („soft“) na základě schopnosti rozvolnit vnitřní strukturu pro lepší adsorpci na povrch. Pojmenování nelze zaměňovat s pojmy tvrdé a měkké korony. Proteiny označované jako tvrdé podstupují nejvýše malé konformační změny a váží se více na hydrofobní povrchy hydrofobními nebo elektrostatickými vazbami. Proteiny označované jako měkké jsou mnohem poddajnější. U hydrofobních i hydrofilních materiálů rozvolněním konformace tyto proteiny navýší entropii systému. Příspěvkem entropii však kompenzují nově vzniklé elektrostatické interakce a právě zaniklé interakce proteinu i materiálu s vodou. Každý protein se na základě svých vlastností váže na materiál jinými interakcemi, stejně tak na povrchu vytváří odlišnou strukturu o různé hustotě a různém uspořádání.

3.2 Nanomateriály a proteinová adsorpce

O proteinové adsorpci se velmi často hovoří zejména v souvislosti s nanočásticemi vpravenými do krevního řečiště. Ty jsou spojovány s využitím v medicíně především jako nosiče léčiv. Napříč dostupnou literaturou je také možné se setkat s proteinovou adsorpcí na hladkých površích např. u kostních nebo kloubních náhrad. Ve spojení s vláknými materiály je ovšem fenomén proteinové adsorpce poměrně méně prozkoumán. Ač teoretické pozadí zůstává stejné, obor tkáňového inženýrství disponuje materiály se širokým spektrem specifických vlastností, které je třeba při výzkumu proteinové adsorpce zohlednit.

Dobře zvolený vlákný materiál může být v mnoha případech vhodnější než hladký. Již Woo et al. při svých experimentech se širokým spektrem proteinů včetně albuminu na PLLA ověřil, že porézní materiál má mnohem lepší vlastnosti pro proteinovou adsorpci než hladký materiál.[59, 60] Podle autorů je porézní materiál výhodnější pro buněčnou adhezi a proliferaci a pro následné obnovení kostní tkáně. Více autorů došlo následně ke shodnému závěru u nejrůznějších kombinací hladkých a porézních materiálů. Tuto tezi rozšiřuje Mao et al., který při svých experimentech s adsorpcí albuminu na kopolymery PLGA zjistil, že vlákný porézní materiál adsorbuje mnohem lépe než porézní materiál, jehož póry jsou tvořeny agregovanými vločkami.[61] Vlákné struktury obsahující mikropóry tak jsou podle autorů velmi vhodné pro proteinovou adsorpci.

Casiano-Maldonado et al. pak porovnal adsorpci lyzozymu a inzulínu na polystyren a poly(isobutylen-*b*-styren).[62] Ve svých závěrech v první řadě uvádí, že lépe adsorbující jsou materiály s vysokým poměrem povrchu k objemu, především 3D materiály. Také však uvádí, že menší proteiny a hydrofobnější proteiny jako inzulín tvoří silnější vazby s hydrofobními materiály. Mikhaylova et al. při srovnání adsorpce lyzozymu a albuminu na polystyren a hypervětvené aromatické polyestery došla k podobným závěrům jako Casiano-Maldonado et al.,[63] navíc je však doplňuje o výraznou afinitu kladně nabitého proteinu k záporně nabitému povrchu. K zajímavému závěru se pak dostává Wilson et al.,[2] který ve svém review zmiňuje, že ač hydrofilní povrchy tvoří s proteiny slabší vazby, proteiny u nich mění konformaci v mnohem menší míře, a tak nedochází ke tvorbě nepřírozených nespecifických vazeb mezi proteiny v koruně. Takové vazby potom mohou negativně ovlivňovat buněčnou adsorpci a proliferaci, slouží také pravděpodobně jako varovné signály buňkám. Na práci Wilsonova týmu navazuje Wang et al., který ve svých pracích zmiňuje, že nespecifické vazby se mohou v krevním řečišti stát iniciátorem srážení krve a tvorby usazenin.[26] Oba autoři ale upozorňují na odlišnosti ve výsledcích *in vitro* a *in vivo* testů a předestírají, že dosavadní poznatky o proteinové adsorpci nelze brát za bernou minci.

Wangův tým mimo jiné svoje závěry testoval na materiálech PLLA a PLCL doplněných o kovalentně navázaný imobilizovaný heparin.[26] Že je možné proteinovou adsorpci pozitivně ovlivnit úpravou materiálu, ověřil i Ma et al.[64, 65] Úspěšně do PLLA inkorporoval nanočástice hydroxyapatitu a zlepšil tak adsorpci vybraných proteinů včetně albuminu. Více autorů označuje i ošetření materiálu plazmatem jako katalytické pro proteinovou adsorpci. Sankar et al. například plazmatem ošetřil nanovlákněný, mikrovlákněný i kombinovaný PCL a následně na krevním séru ověřil, že proteiny lépe adsorbují.[66] Velmi podobných výsledků dosáhl Deepthi et al., který vlákna PCL pro scaffoldy na obnovu vazivových tkání doplnil o povlak chitosanu s kyselinou hyaluronovou.[67] Proteiny fetálního hovězího séra podle autorů lépe adsorbovaly kvůli doplněným sacharidovým funkčním skupinám. Se zajímavou modifikací pro využití v regeneraci tkání jícnu přichází Leong et al., kterému se na povrch vlákně PDLLA podařilo dodat nanopóry a zvýšit tak mnohonásobně adsorpci proteinů fetálního hovězího séra a adhezi a proliferaci buněk.[68]

3.3 Analýza adsorbovaných proteinů

Proteinovou adsorpci lze *in vitro* analyzovat na základě adsorpční či desorpční křivky, změn v konformaci nebo ve specifických, či nespecifických vazbách, nebo na základě změn fyzikálních vlastností, jako je tloušťka proteinové vrstvy nebo index lomu.[58] Testy pak mohou probíhat jak přímo na materiálu, tak ve výluhu.[40] Oba tyto přístupy mají svá úskalí. Zatímco při analýze na materiálu má na výsledky negativní vliv interference signálu proteinů a signálu materiálu, při analýze po desorpci je třeba počítat s mnoha průvodními jevy spojenými s pomocnými kroky a chemikáliemi. Jedná se například o denaturaci proteinů nebo vlivy desorpčního, či analytického činidla.

Z analýz na povrchu materiálu se mezi běžné řadí metoda rezonance povrchových plazmonů (SPR).[40, 58] Metoda detektuje změny v indexu lomu pomocí měření evanescentních vln v blízkosti kovového povrchu. Sleduje se, jak se mění v daném místě poměr analyzovaných a analyzujících molekul. Metoda může být rozšířena tak, aby detekovala koncentraci specifického proteinu z krevní plasmy nebo aby poskytovala informaci o konformačních změnách. Příbuznou optickou metodou je pak elipsometrie, která také zkoumá změnu indexu lomu, konkrétně ve vrstvě proteinů na reflektivním povrchu.[58] Stejně jako u metody SPR, i tato metoda umožňuje získat informaci o koncentraci a konformačních změnách proteinů.

Mimo optických metod jsou běžné také mikroskopické metody analýzy povrchu. Již zmíněná skenovací elektronová mikroskopie může být např. rozšířena o detekci nejrozličnějších informací o povrchu a složení vzorku.[40] Stejně tak lze proteiny na povrchu pomocí této metody lokalizovat a určit i lokální koncentraci a jejich rozložení. Podobnou metodou je pak mikroskopie atomárních sil.[40, 58] Tato metoda může poskytnout informace o interakcích na povrchu materiálu, nebo třeba o agregaci proteinů. Může také posloužit pro sledování dynamických změn v adsorpci v průběhu času. Metoda je však velmi časově náročná i náročná na provedení, navíc může interagovat se vzorkem.

K analýze výluhu lze naopak vhodně uplatnit spektroskopické a fluorimetrické metody.[58] Metody jsou založeny na kolorimetrickém určení koncentrace proteinů na základě interakce s činidlem. Může být využívána jak změna reflektované barvy činidla, tak fluorescenční schopnosti činidla po navázání na proteiny. Mezi známé metody patří např. Bradfordova metoda využívající barviva Coomassie Brilliant Blue, metoda

BCA využívající 2,2-bichinolin-4,4-dikarboxylové kyseliny, nebo třeba populární metoda s názvem ELISA využívající enzymů při imunoenzymatické reakci.[40] Kromě externího činidla dodaného po ukončení experimentu lze využít i látku inkorporovanou přímo do struktury proteinu. Na tomto principu funguje jak značení proteinu radionuklidem, tak fluoroforem.[58] Oba tyto typy značení lze velmi snadno detekovat a detekce je považována za velmi přesnou. Lze také rozlišit různé proteiny směsi, avšak metody značení neumožňují získat informace o konformaci nebo funkčnosti proteinů. Oblíbenými pro toto použití jsou radionuklid ^{125}I nebo fluorofor fluorescein-izothiokyanát (FITC).[58, 69]

Velmi dobrých výsledků lze dosáhnout také využitím klasických separačních metod elektroforézy nebo chromatografie. Obě tyto kvalitativní metody mohou ve spojení s vhodnou kvantitativní analýzou výsledku pomoci při analýze adsorpce jednotlivých proteinů včetně analýzy konformace nebo agregace proteinů.[58] Metoda denaturující elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE) může být například doplněna o techniky blottingu nebo kolorimetrické analýzy,[70] gelová permeační chromatografie (GPC) pak využívá IČ nebo UV-VIS spektroskopie. Samotné metody IČ lze využít i k analýze na povrchu materiálu, kromě výše zmíněných informací lze získat i data o orientaci adsorbovaných proteinů.[58]

Experimentální část

4 Materiály a metody

4.1 Použité materiály a chemikálie

V tabulce 4 jsou vypsány veškeré chemikálie, jichž bylo použito v této práci.

Tabulka 4: Seznam použitých chemikálií a činidel

látka	výrobce
NaCl	Analytika
KCl	Analytika
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Analytika
KH ₂ PO ₄	Analytika
HCl	Penta
Bovine Serum Albumine	Sigma-Aldrich
Bradfordovo činidlo	Sigma-Aldrich
TEMED	Roth
Quant-iT Protein Assay Kit	Invitrogen
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad

V tabulce 5 jsou vypsány veškeré roztoky, jichž bylo použito v této práci.

Tabulka 5: Seznam použitých roztoků

roztok	složení
Fosfátový pufr (PBS) o pH 7,4	800 ml destilované vody 8 g NaCl 0,2 g KCl 3,63 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 0,24 g KH ₂ PO ₄ HCl do pH 7,4 destilovaná vody do objemu 1 l přefiltrování přes filtrační papír
GPC mobilní fáze	100 mmol/l NaH ₂ PO ₄ o pH 6,8 100 mmol/l NaCl 0,03% NaN ₃

SDS-PAGE dolní gel (10%)	1,9 ml destilované vody 1,7 ml 30% akryl-bisakrylamidu 1,3 ml roztoku Tris-HCl o pH 8,8 50 µl 10% SDS po promíchání v rychlém sledu: 50 µl 10% peroxodisíranu amonného (APS) 5 µl tetramethylethylendiaminu (TEMED)
1,5 mol/l Tris o pH 8,8	18,7 g Tris 80 ml destilované vody HCl do pH 8,8
SDS-PAGE horní gel (5%)	1,4 ml destilované vody 330 µl 30% akryl-bisakrylamidu 250 µl Tris-HCl o pH 6,8 20 µl 10% SDS po promíchání v rychlém sledu: 20µl 10% APS 2 µl TEMEDu
1,5 mol/l Tris-HCl o pH 6,8	9,09 g Tris 40 ml destilované vody HCl do pH 6,8
2× SDS-PAGE vzorkový pufr	10 ml Tris-HCl o pH 6,8 12 ml 10% SDS 30 ml glycerolu 15 ml β-merkaptoethanolu 1,8 mg bromfenolové modři destilovaná voda do objemu 100 ml
10× SDS-PAGE „running“ pufr	800 ml destilované vody 10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g glycinu
CBB barvicí roztok	450 ml methanolu 100 ml kyseliny octové 450 ml destilované vody 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250

CBB odbarvovací roztok	450 ml methanolu 100 ml kyseliny octové 450 ml destilované vody
sušící roztok	450 ml methanolu 100 ml kyseliny octové 30 ml glycerolu 420 ml destilované vody

V tabulce 6 jsou vypsány veškeré přístroje a software, jichž bylo použito v této práci.

Tabulka 6: Seznam použitých přístrojů a programů

přístroj nebo program	výrobce
Nanospider™ NS 1WS500U	Elmarco
Laboratorní váhy BP 110 S	Sartorius
Laboratorní váhy BBX 22	Boeco
Sterilizátor Anprolene AN74i	Andersen Products
pH metr pH 700	Eutech Instruments
SDS-PAGE systém Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Centrifuga Z36HK	Hermle Labortechnik
Centrifuga 5414C	Eppendorf
CO ₂ inkubátor NB-203XL	N-Biotek
Kývací zařízení PS-3D	Grant-bio
Chromatografický systém Dionex UltiMate™ 3000 s detektorem DAD-3000	Thermo Scientific
GPC kolona Yarra SEC-3000	Phenomenex
Chemisorpční analyzátor Autosorb iQ	Quantachrome
Skenovací elektronový mikroskop Vega3 SB	Tescan
Přístroj k pozlacení Q150ES	Quorum Technologies
Software pro statistické zpracování a tvorbu grafů	Microsoft Office 2010 Standard
Software pro zpracování snímků	Pinta, Pixlr, Malování 3D

4.2 Použité metody

Následující metody byly použity při charakterizaci materiálů a analýze desorbovaných proteinů.

4.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Povrch vybraných materiálů byl snímán a analyzován pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Drobné ústřížky materiálů byly přilepeny oboustrannou lepicí páskou na kovový terčík a pomocí přístroje k pozlacení na ně byla nanesena vrstva zlata o tloušťce 10 nm. Takto pozlacené byly vzorky přeneseny do komory skenovacího elektronového mikroskopu a analyzovány za pokojové teploty při 10–20 kV ve zvětšeních 1–10 000×. Ke stanovení průměru vláken bylo použito 100 měření, která byla následně statisticky zpracována (kapitola 4.2.8).

4.2.2 Stanovení specifického povrchu

Stanovení specifického povrchu materiálů (v literatuře též měrného povrchu) bylo provedeno Ing. Janou Karpíškovou, Ph.D. pomocí metody sorpce plynu, tzv. BET analýzy. Vzorky byly nejprve odplyněny při 40 °C po dobu 48–72 hodin, následně bylo provedeno měření chemisorpčním analyzátozem pomocí kryptonového plynu.

4.2.3 Stanovení smáčivosti povrchu

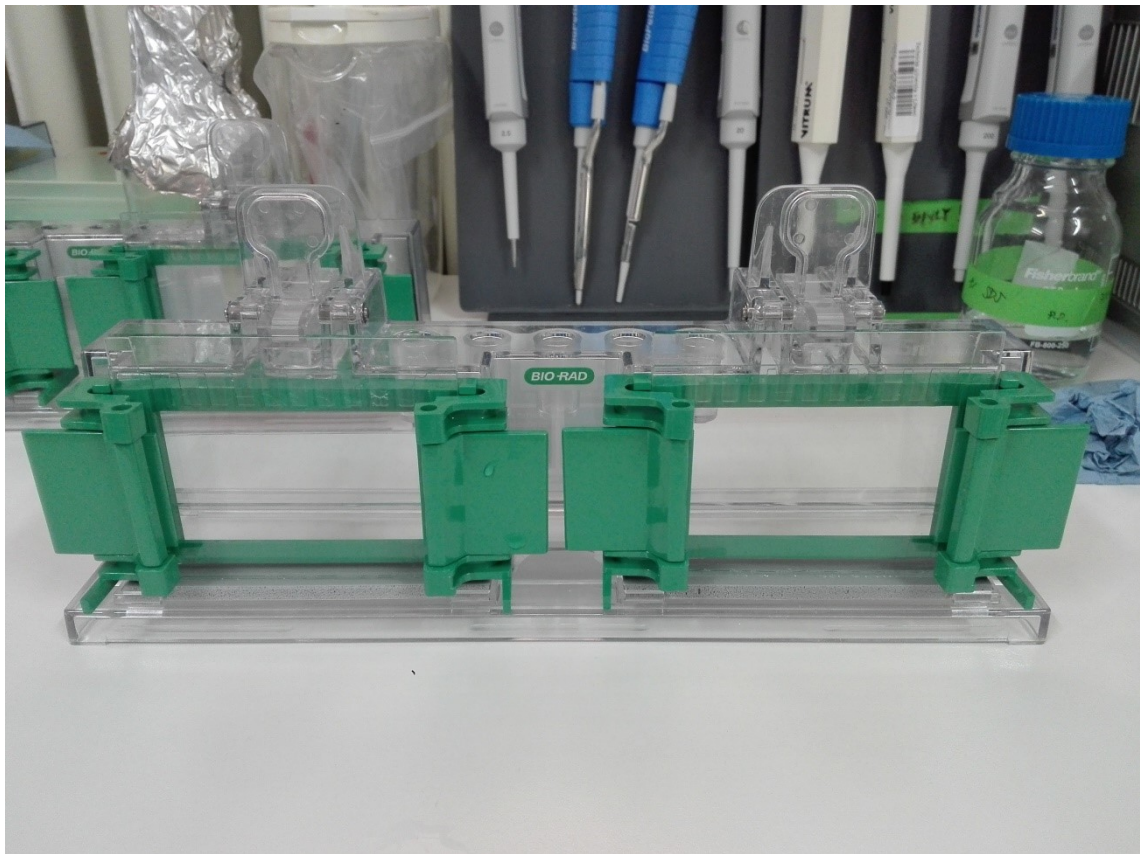
Smáčivost povrchu materiálů byla zkoumána vyhodnocením kontaktního úhlu pomocí metody přisedlé kapky. Každý materiál byl testován 10× pomocí 15 μl kapky destilované vody, výsledky byly následně statisticky zpracovány (kapitola 4.2.8).

4.2.4 10% SDS-PAGE elektroforéza

Koncentrace desorbovaných proteinů byla analyzována pomocí denaturující proteinové elektroforézy, konkrétně denaturující elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za použití dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Metoda elektroforézy využívá elektrického pole k separaci nabitých částic podle rychlosti pohybu v gelu, tudíž i podle jejich velikosti. Tento konkrétní typ elektroforézy pak využívá záporně nabitého dodecylsulfátu sodného (SDS), který obalí molekuly proteinu a dodá jim potřebný náboj. Molekuly proteinu se následně pohybují polyakrylamidovým gelem ke kladné elektrodě, přičemž menší molekuly se pohybují gelem rychleji. Srovnáním vzorku s tzv. markerem, u kterého je velikost známá, je možno poté vyčíst přibližnou velikost molekul a jejich distribuci. Metoda může být dále doplněna o kolorimetrii nebo tzv. blotting, na základě

kterých lze zjistit např. koncentraci proteinu či míru jeho poškození. Úpravou poměru složek gelu akrylamidu a bisakrylamidu lze docílit různých rychlostí putování proteinů a přizpůsobit tak „ostrost“ výsledku.

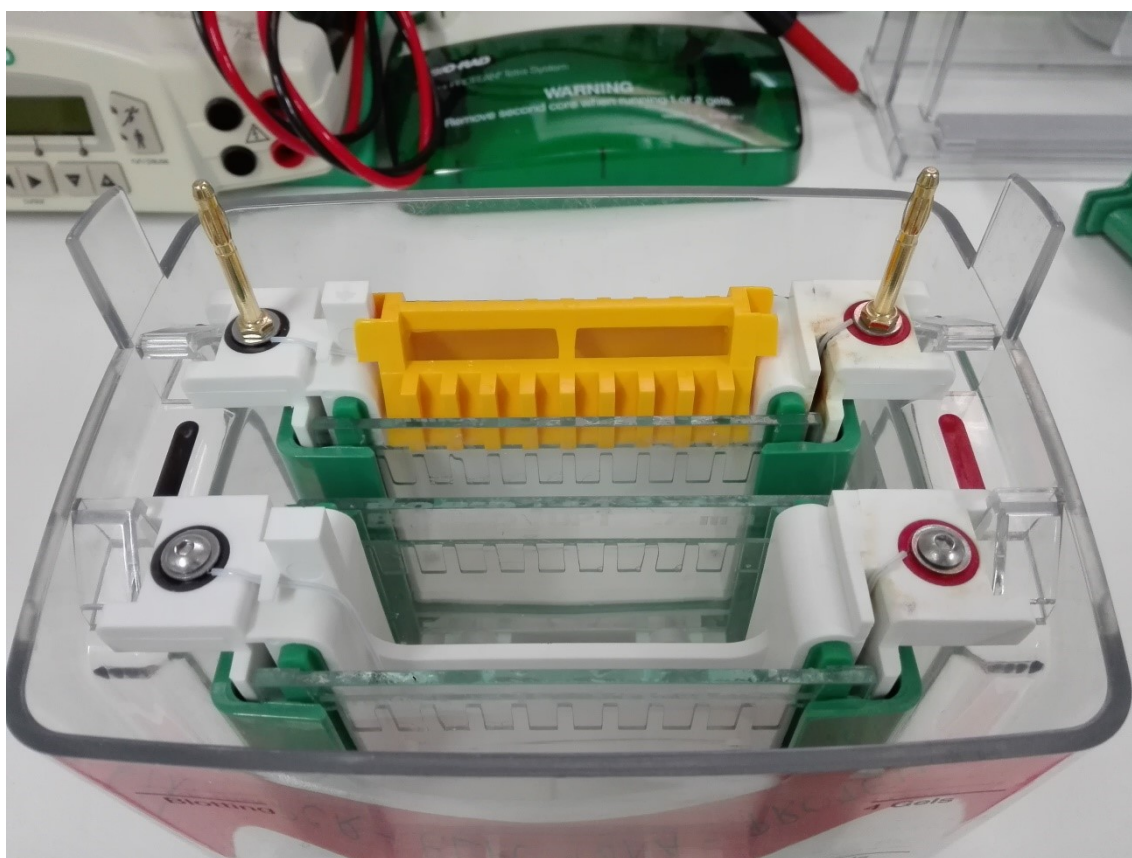
Příprava na SDS-PAGE elektroforézu sestává z přípravy polyakrylamidových gelů, sestavení aparatury a injekce vzorků. Každý experiment vyžaduje dvě části gelu, část zaostřovací, tzv. horní gel, a část rozdělovací, tzv. dolní gel. Pro tuto práci byly připraveny vždy 10% dolní a 5% horní gely pomocí aparatury pro přípravu gelů (obrázek 3). Roztok pro dolní gel byl připraven v kádince, promíchán a pipetován mezi skla přibližně do 4/5. Takto připravený základ byl poté převrstven destilovanou vodou a ponechán ke ztuhnutí za pokojové teploty.



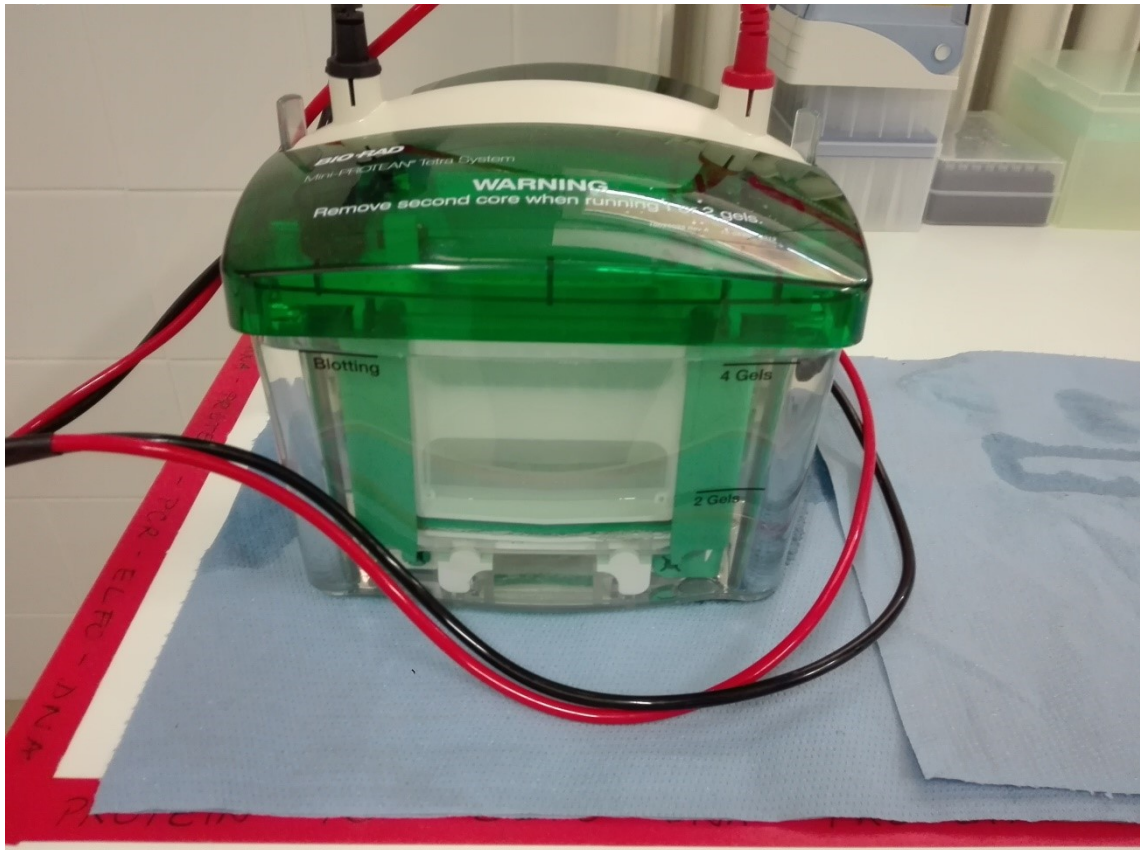
Obrázek 3: Aparatura k přípravě gelů pro SDS-PAGE elektroforézu s již připravenými gely

Po ztuhnutí dolního gelu byla destilovaná voda vylita a na její místo byl až pod horní okraj skel pipetován roztok pro gel horní, připravený obdobně jako v případě dolního gelu v kádince a promíchán. Do takto připraveného základu byl opatrně vložen hřebínek k vytvoření jamek a gel byl též ponechán ke ztuhnutí za pokojové teploty.

20 μl markeru bylo smícháno v poměru 1:1 s 2 \times koncentrovaným vzorkovým pufrem, stejně tak jednotlivé vzorky. Marker i vzorky byly následně ponechány ve vodní lázni při 95 °C po dobu 5 minut. Po ztuhnutí i horního gelu byl hřebínek opatrně vyjmut a gel byl přenesen do elektroforetické vany (obrázek 4). Takto připravené gely v elektroforetické vaně byly zality po okraj 10 \times koncentrovaným „running“ pufrem a do připravených jamek bylo opatrně pipetováno po 5 μl markeru a 15 μl jednotlivých vzorků. Vana byla uzavřena a zapojena do zdroje elektrického napětí (na obrázku 5). V první zaostřující fázi bylo na zdroji nastaveno napětí 90 V po dobu přibližně 20–25 minut, následně bylo napětí zvýšeno na 120 V, vše za pokojové teploty. Po doběhnutí barevného čela na konec gelu (cca po 1,5 h) byla elektroforéza ukončena.



Obrázek 4: Elektroforetická vana s již připravenými gely čekajícími na zalití „running“ pufrem



Obrázek 5: Probíhající SDS-PAGE elektroforéza

Dolní gel byl opatrně sejmут ze skel a za mírného míchání uložen v barvicím roztoku na 24 h. Z barvicího roztoku byl poté přenesen do odbarvovacího roztoku, kde byl též ponechán za mírného míchání po dobu 24 h. Odbarvovací roztok je běžné 1× vyměnit. Po uplynutí této doby byl výsledek nafocen. Také je možné gel usušit pomocí sušicího roztoku a celulózové fólie a následně skladovat. Gel je v roztoku ponechán za mírného míchání po dobu 24 h a poté je vložen mezi dvě folie. S pomocí dvou rámečků z každé strany je pak kolíčky upevněn a ponechán ve vzdušném prostředí k vyschnutí.

4.2.5 Spektrofotometické stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla též analyzována pomocí Bradfordovy metody založené na kolorimetrii. Jedná se o jednoduchou metodu založenou na interakci činidla Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) se vzorkem proteinu v kyselém prostředí. Činidlo interaguje především s bazickými a aromatickými aminokyselinami v proteinu, přičemž změní barvu z původní červeno-hnědé do odstínů modré. Odstín modré lze následně analyzovat spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm a srovnáním s kalibrační řadou

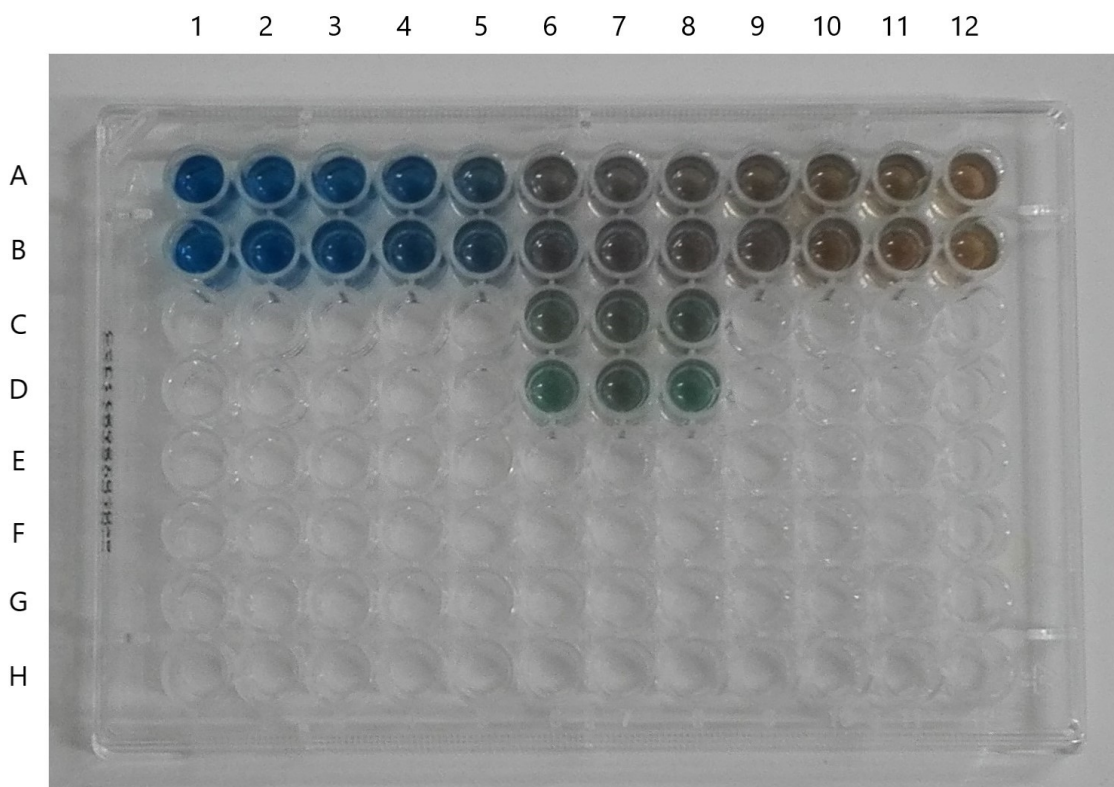
lze získat koncentraci proteinu ve vzorku.[10, 71] Činidlo však interaguje s většinou detergentů, např. s SDS, čímž dojde ke zkreslení výsledků.

Výchozí roztoky pro kalibrační řadu o koncentracích 1 000 a 100 $\mu\text{g/ml}$ byly připraveny pomocí desítkového ředění z roztoku BSA o koncentraci 10 mg/ml . V tabulce 7 je popsána příprava kalibrační řady BSA z těchto dvou roztoků, s jejíž pomocí byly následně výsledky kvantifikovány.

Tabulka 7: Příprava kalibrační řady BSA

Roztok BSA v PBS [μl]	PBS [μl]	Finální koncentrace [\times c výchozího roztoku]
100	0	1
80	20	0,8
60	40	0,6
40	60	0,4
20	80	0,2
10	90	0,1
0	100	0

Kalibrační řada i vzorky byly následně smíchány v 96jamkové destičce s Bradfordovým činidlem, 180 μl činidla na 20 μl roztoku, a ponechány při pokojové teplotě inkubovat po dobu 5 minut (obrázek 6). Po uplynutí této doby byly při vlnové délce 595 nm získány spektrofotometricky hodnoty absorbance, které byly použity k výpočtu koncentrace proteinu.



Obrázek 6: Kalibrační řada a trojice vzorků připraveny na spektrofotometrickou analýzu; A, B kalibrační řada, koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]: 1 – 1 000, 2 – 800, 3 – 600, 4 – 400, 5 – 200, 6 – 100, 7 – 80, 8 – 60, 9 – 40, 10 – 20, 11 – 10, 12 – 0 (čistě PBS); C, D vzorky o neznámé koncentraci

Od hodnot absorbance kalibrační řady byla při výpočtu odečtena hodnota slepého vzorku (samotné rozpouštědlo). Výsledné hodnoty absorbance byly srovnány se známými hodnotami koncentrace, na základě nichž byly proloženy lineární regresní křivkou, tzv. křivkou kalibrační. Stejně tak byly hodnoty slepého vzorku odečteny od hodnot zjišťovaných vzorků a výsledné hodnoty byly dosazeny do získaného vzorce pro kalibrační křivku. Takto byla získána koncentrace každého zjišťovaného vzorku. Jelikož byly vzorky vždy v triplikátu, bylo možné je dále statisticky zpracovat (kapitola 4.2.8).

4.2.6 Fluorimetrické stanovení koncentrace

Bradfordově metodě podobná je i analýza pomocí sady Quant-iT. I tato metoda je kolorimetrická, avšak méně náchylná na vliv detergentu. V prvním kroku bylo smícháno 60 μl činidla A (reagentu) se 12 ml činidla B (pufri) v temné místnosti a do každé jamky 96jamkové destičky z neprůsvitného materiálu bylo pipetováno 200 μl směsi. K té bylo pipetováno 20 μl vzorků nebo 10 μl standardů BSA smíchaných s SDS k dosažení shodných podmínek jako u vzorků.[72 s.] Vzorky byly následně měřeny za pokojové teploty při excitační vlnové délce 470 nm a poté při emisní vlnové délce

570 nm. Výsledné trojice hodnot byly statisticky zpracovány jako u spektrofotometrické metody (kapitola 4.2.8).

4.2.7 Stanovení koncentrace pomocí gelové permeační chromatografie

Další metoda využitá k analýze koncentrace proteinů byla gelová permeační chromatografie (GPC). Tato separační metoda využívá zúžené kolony se stacionární fází sestávající z hydrofobního porézního gelu. Skrz kolonu je pomocí vysokotlakého čerpadla hnána mobilní fáze sestávající z organického rozpouštědla obsahující vzorek, jehož průchod kolonou je následně analyzován. Na základě této metody lze zjistit velikost molekul polymeru ve vzorku i jejich distribuci, obdobně jako u elektroforézy, též lze získat koncentraci molekul nebo dosáhnout jejich izolace ze směsi.

Aparatura metody sestává ze zásobníku vzorků, zásobníku mobilní fáze a čerpadla, následuje předkolona, jejímž účelem je dostatečné zpomalení mobilní fáze, aby nebyla poškozena analytická kolona, dále následuje samotná analytická kolona (300 mm na délku, 4,6 mm v průměru, o velikosti částic 3 μm) spolu s detektorem (nejčastěji UV-VIS nebo IČ) a odtud již vede výpusť pro separaci nebo do odpadu. Jednotlivé části jsou spojeny tzv. bioinertním viperem, speciální hadičkou zabraňující případnému buněčnému znečištění, a spojkami zajišťujícími utěsnění na rozhraní kolon a viperu. Trasa byla sestavována vždy postupně a po každém přidaném prvku bylo vyzkoušeno utěsnění průtokem mobilní fáze. Po sestavení byla trasa vystavena průtoku mobilní fáze rychlostí 0,1 ml/min ke stabilizaci po dobu 5 min za pokojové teploty.

0,5ml vzorky spolu s kalibrační řadou BSA o koncentracích 1, 2, 5, 10 a 100 mg/l byly před analýzou 5 \times zředěny mobilní fází, následně přefiltrovány od případných hrubých nečistot pomocí 13mm nylonových stříkačkových filtrů o velikosti pórů 0,22 μm . Poté byl vždy celý objem vzorku (2,5 ml) přenesen do 2,5ml lahvíček s teflonovým uzávěrem a vložen do zásobníku přístroje. Průtok byl pro vzorky navýšen na 0,2 ml/min a experiment byl ponechán probíhat při pokojové teplotě. Naměřené amplitudy pro 20 μl vzorku při vlnové délce 279 nm byly následně na základě kalibrační řady statisticky zpracovány (kapitola 4.2.8).

4.2.8 Statistické zpracování výsledků

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí softwaru Microsoft Excel. Ze souboru hodnot byl vždy zpracován aritmetický průměr a příslušný interval spolehli-

vosti.[73] K jeho výpočtu byly využity statistické funkce pro výběrovou směrodatnou odchylku a Studentův koeficient spolehlivosti se zvolenou pravděpodobností 95 %. Výsledná hodnota byla mimo jiné použita v chybových úsečkách.

5 Výsledky a diskuse

Tato diplomová práce má za cíl optimalizovat postup proteinové adsorpce modelového proteinu albuminu z hovězího séra (BSA) na vybrané nano- a mikrovláknenné materiály. Materiály byly podrobeny adsorpci a desorpci a následně byla analyzována množství adsorbovaného proteinu. Cílem bylo najít vhodné parametry samotné proteinové adsorpce, vybrat vhodné metody k její analýze a najít též vhodné parametry těchto metod. Dále bylo cílem porovnat testované materiály mezi sebou.

Albumin je nejvíce zastoupený protein v lidské krevní plasmě,[35–37] z toho důvodu je také nejčastěji používaný modelový protein a proto byl zvolen v této práci. Pro adsorpci byl protein použit rozpuštěný v roztoku fosfátového pufru (PBS) o pH 7,4 v koncentraci 50 mg/ml. Ta byla vybrána přibližně odpovídající fyziologické koncentraci v lidské plasmě zdravého dospělého jedince,[37, 74] aby korespondovala s přirozenými podmínkami v organismu. Fosfátový pufr byl zvolen jako běžné rozpouštědlo používané při nakládání s buňkami, např. při jejich kultivaci nebo během buněčných testů biokompatibility.

Pro optimalizaci proteinové adsorpce byly z dostupných materiálů vybrány degradabilní polyesterové materiály ukazující se jako vhodné pro scaffolds. Konkrétně jde o tyto materiály: nano-vláknenný PCL (M_w 45 000 g/mol, dále jen „PCL 45“), mikrovláknenný PCL (M_w 80 000 g/mol, dále jen „PCL 80“), PLCL, PLA (konkrétně PDLLA) a blendy PCL 80 : PLCL v poměrech 3:1, 1:1 a 1:3 (též dále referované jako „B x:y“, např. „B 3:1“). Všechny tyto materiály byly připraveny procesem elektrostatického zvláknování pomocí přístroje Nanospider™ NS 1WS500U společnosti Elmarco Ing. Kristýnou Havlíčkovou. Materiály pocházely z více sérií příprav.

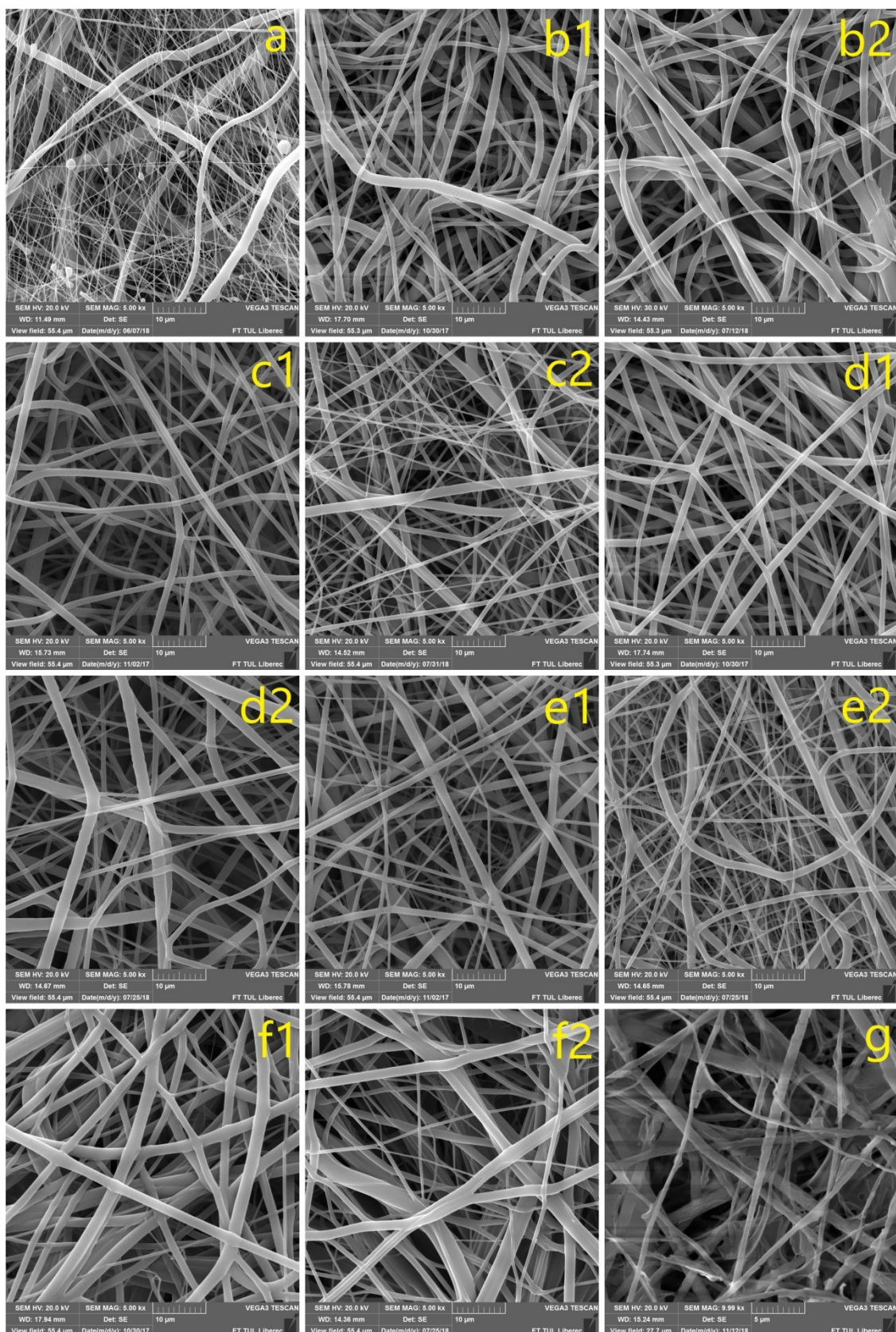
5.1 Charakteristika testovaných materiálů

Materiály byly charakterizovány Ing. Kristýnou Havlíčkovou a též Ing. Šárkou Hauzerovou. U všech materiálů byla provedena měření průměru vláken a jejich morfologie pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), u vybraných materiálů pak také měření specifického povrchu pomocí BET analýzy sorpce povrchu a měření hydrofobicity pomocí analýzy kontaktního úhlu přisedlé kapky (tabulka 8).

Tabulka 8: Morfologická analýza použitých materiálů; × nelze změřit dostupnými metodami, * nelze změřit pro superhydrofilní charakter, ? nebylo měřeno

Materiál	Průměr vláken [μm]		Specifický povrch [m^2/g]		Smáčivost [$^\circ$ kontaktního úhlu]
	série 1	série 2	série 1	série 2	série 2
PCL 45	0,5 \pm 0,1		×		*
PCL 80	0,74 \pm 0,06	1,2 \pm 0,1	2,59	×	*
B 3:1	0,87 \pm 0,05	0,73 \pm 0,09	2,17	0,9	74 \pm 7
B 1:1	0,99 \pm 0,06	1,1 \pm 0,1	1,83	1,7	110 \pm 10
B 1:3	0,75 \pm 0,06	0,9 \pm 0,1	1,52	1,1	86 \pm 6
PLCL	1,13 \pm 0,09	0,82 \pm 0,09	1,00	0,8	80 \pm 10
PLA	0,94 \pm 0,07		?		?

Na obrázku 7 si lze všimnout, že vzorek PCL 80 obsahuje více zkroucená vlákna než vzorek PLCL a tomuto pozorování odpovídají i jejich jednotlivé poměry v blendech. Všechny materiály, jak napovídají i průměry vláken v tabulce 8, jsou mikrovlákněné, s výjimkou PCL 45, který obsahuje kromě mikrovláken také nanovlákna, kromě nich ale také velké množství defektů v podobě různě tvarovaných kapek polymeru o průměru v jednotkách μm . Různé defekty je možné pozorovat také u materiálu PLA. U vláken blendů 3:1 a 1:3 lze pozorovat i jemnější vlákna, čemuž odpovídají i průměry v tabulce. Jediný hydrofobní materiál je blend 1:1, ostatní materiály mají hydrofilní až superhydrofilní charakter. PCL 80 pak vykazuje relativně vysokou hodnotu specifického povrchu vůči ostatním materiálům. Celkově však lze všechny tyto materiály s výjimkou nanovlákněného PCL 45 považovat za morfologicky velmi podobné, dá se předpokládat, že proteinová adsorpce bude záviset především na chemickém složení.

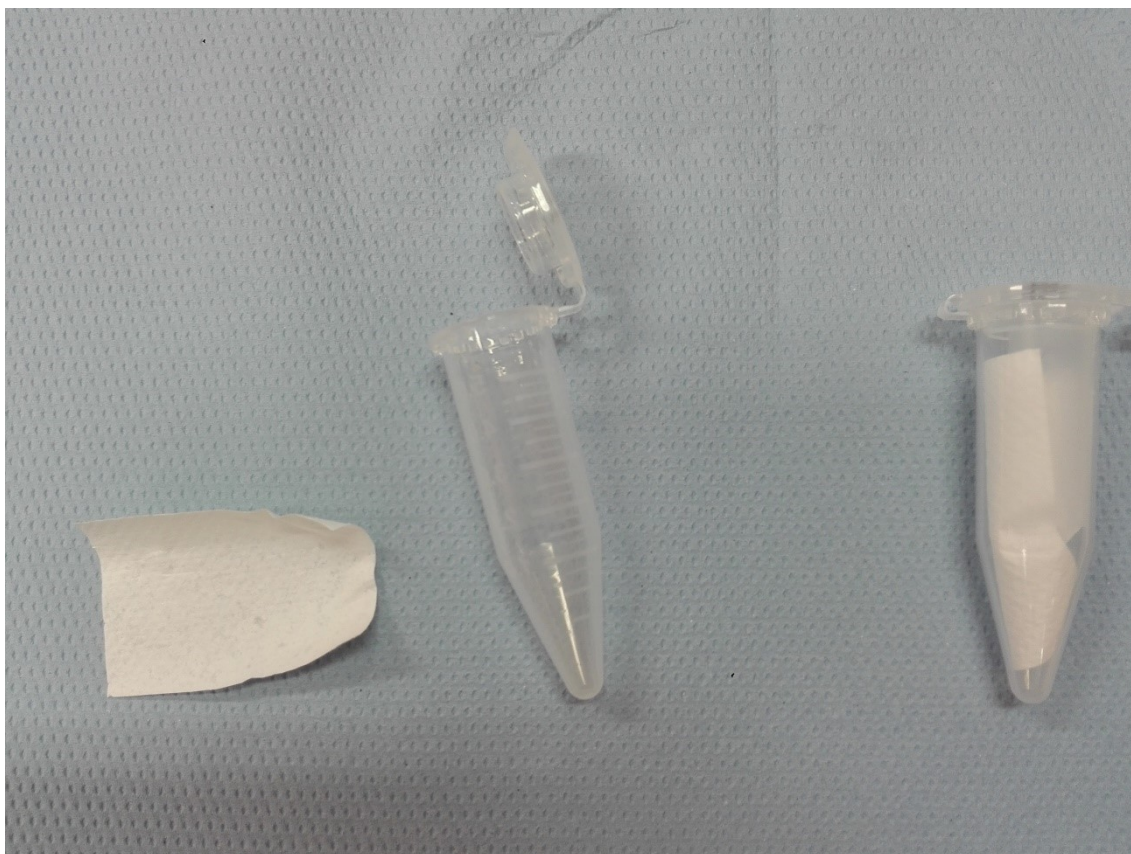


Obrázek 7: SEM snímky materiálů; měřítko 10 μ m, PLA 5 μ m; a) PCL 45, b) PCL 80 první a druhé sady, c) B 3:1 ", d) B 1:1 ", e) B 1:3 ", f) PLCL ", g) PLA

5.2 Optimalizace postupu adsorpce a desorpce proteinů

Pro úspěšné testování materiálů z hlediska proteinové adsorpce bylo nejprve potřeba optimalizovat postup samotné adsorpce a následné desorpce. K přípravě na adsorpci byly z materiálů vystříhány obdélníkové výstřižky o hmotnosti $(10,0 \pm 0,5)$ nebo $(20,0 \pm 0,5)$ mg. Výstřižky byly sterilizovány ethylenoxidem a odvětrány po dobu cca 1 týdne. Po odvětrání byly výstřižky jednotlivě umístěny do 2ml mikrozkušavek podél stěny tak, aby byly co nejméně pomačkané či poškozené (obrázek 8). Při každém experimentu byly od každého materiálu použity vždy tři výstřižky na vzorky a jeden na negativní kontrolu.

Na základě provedených experimentů pak byl optimalizován postup adsorpce proteinů na jednotlivé materiály na následující. Do kádinky byl připraven zásobní roztok modelového proteinu albuminu z hovězího séra (BSA) rozpuštěný v roztoku fosfátového pufru (PBS) o pH 7,4 v koncentraci 50 mg/ml. Do každé mikrozkušavky s výstřižkem pak byly pipetovány 2 ml zásobního roztoku, do mikrozkušavek negativní kontroly pak pouze 2 ml PBS. Mikrozkušavky se vzorky byly umístěny do inkubátoru a ponechány zde při 37 °C v klidu po dobu 1–24 h dle konkrétního experimentu. Doby adsorpce jsou dále rozebrány v kapitole 5.3.



Obrázek 8: Příprava vzorku pro adsorpci BSA; vlevo ústřížek materiálu vkládaný do mikrozkuřavky, vpravo již připravený vzorek k otestování adsorpce

Po uplynutí určené doby adsorpce byl z mikrozkuřavek pipetou opatřně odebrán veškerý adsorpční roztok tak, aby byl co nejměně ovlivněn výstřížek materiálu. Následně byl do mikrozkuřavky pipetován 1 ml PBS, který byl vzápětí stejně opatřně jako v případě adsorpčního roztoku odebrán k analýze (v literatuře označován jako „wash“). Takto lze získat proteiny nedostatečně adsorbované na povrch materiálu. Může se jednat o velmi slabě navázané proteiny (měkká korona), pravděpodobně navázané malým počtem vazeb, slabými typy vazeb, případně vazbami na dlouhé vzdálenosti.

Následně byly do mikrozkuřavek k materiálům pipetovány 2 ml 1% roztoku desorpčního činidla dodecylsírany sodného (SDS) v PBS a mikrozkuřavky byly ponechány po dobu 1 h na pomalu se kývající kývačce při pokojové teplotě. SDS byl zvolen pro jeho vysokou účinnost při denaturaci proteinů a přerušení vazeb. Pokud by byla zvolena delší doba desorpce nebo invazivnější kývání, či třepání, SDS by mohl i narušit samotný materiál. Po uplynutí 1 h byl následně roztok již obsahující desorbované proteiny odebrán k analýze. Stejný postup desorpce byl opakován i pro získání vzorků z druhé desorpce.

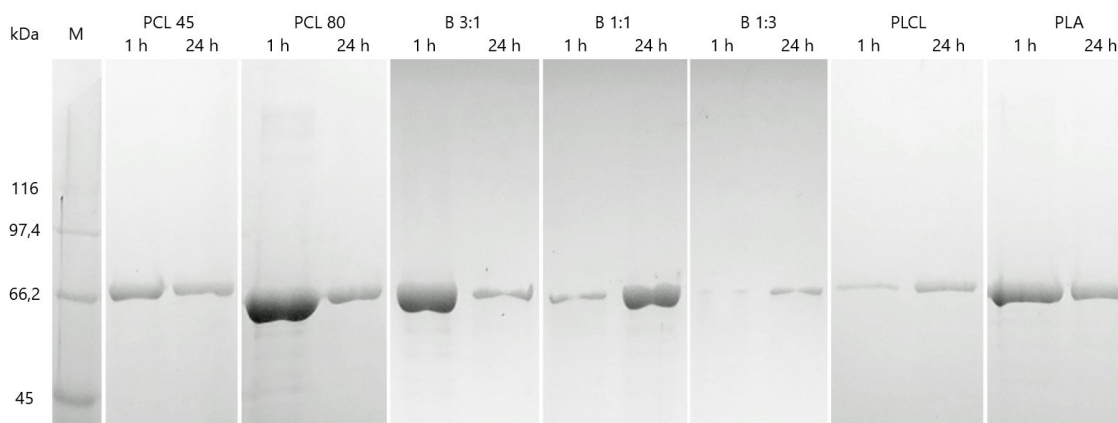
5.3 Optimalizace doby adsorpce

V mnoha dostupných zdrojích je možné se setkat spíše s kratšími intervaly adsorpčních testů,[2, 29, 75] běžná doba se pohybuje v rozmezí 1 až 3 h. Je tak sledována koncentrace adsorbovaných proteinů po prvním kontaktu materiálu s fyziologickým prostředím organismu a zejména tak tvorba tvrdé korony. Vyšší doby adsorpce, např. 24 h, pak zkoumají utváření termodynamické rovnováhy a případně měkkou koronu. Na základě výše uvedeného postupu bylo v této práci následně zkoumáno, jaká doba adsorpce je vhodná v souvislosti s testovanými materiály a modelovým proteinem BSA.

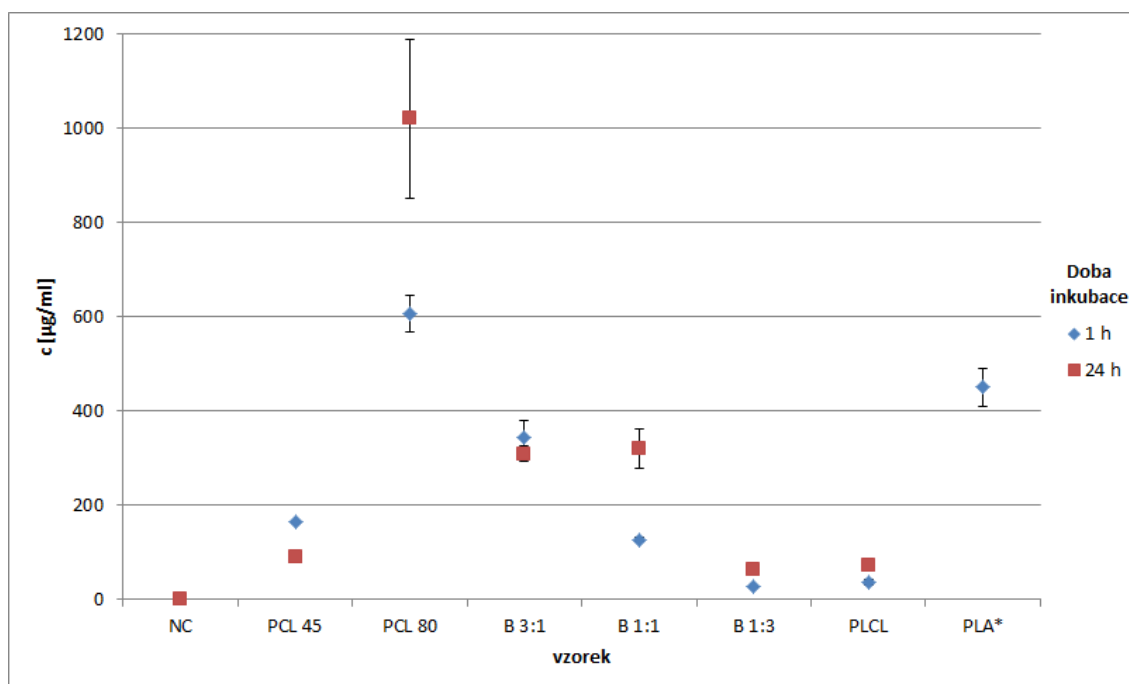
Byly tedy provedeny testy různých dob adsorpce, nejprve po doby 1 a 24 h, následně po doby 1, 4, 8 a 24 h. Výsledné roztoky desorbovaných proteinů byly analyzovány pomocí spektrofotometrických a fluorimetrických metod (kapitoly 4.2.5 a 4.2.6), jejichž výsledky jsou rozebrány v kapitole 5.6, a pomocí SDS-PAGE gelové elektroforézy (kapitola 4.2.4) a gelové permeační chromatografie (kapitola 4.2.7).

První experiment zkoumal rozdíl mezi množstvím adsorbovaného BSA po doby 1 a 24 h na první sérii materiálů. Již výsledky tohoto experimentu ukázaly, že má doba adsorpce na koncentraci adsorbovaných proteinů vliv, mezi časovými intervaly 1 a 24 h se totiž koncentrace u všech testovaných materiálů lišily. Zejména bylo možno tuto odlišnost pozorovat u vzorků PCL 80 a vzorků blendů s jeho výrazným zastoupením (3:1, 1:1), jak je patrné na obrázku 9 z SDS-PAGE elektroforézy a v grafu 1 z gelové permeační chromatografie. Tomu by odpovídal i relativně vyšší specifický povrch u těchto materiálů, kdy povrch materiálu může poskytovat dostatek místa k adsorpci proteinů. To by též potvrzoval fakt, že u materiálů s menší odlišností mezi 1 a 24h adsorpcí byly proteiny adsorbovány méně. Specifický povrch materiálů tedy na časový průběh adsorpce má pravděpodobně vliv.

Zatímco PLCL a blendy s jeho vyšším obsahem (1:3, 1:1) s přibývajícím časem adsorbovaly více proteinu, o ostatních materiálech toto nelze říci, naopak PCL 45 a blend 3:1 adsorbovaly méně proteinu. Zde se pravděpodobně jedná o afinitu BSA k daným materiálům. Je také možné, že se BSA v některých případech navíc denaturuje, resp. mění svoji konformaci, a tak dosahuje ještě vyšší afinity k určitým materiálům.



Obrázek 9: 10% SDS-PAGE elektroforéza; srovnání 1h a 24h adsorpce u jednotlivých materiálů

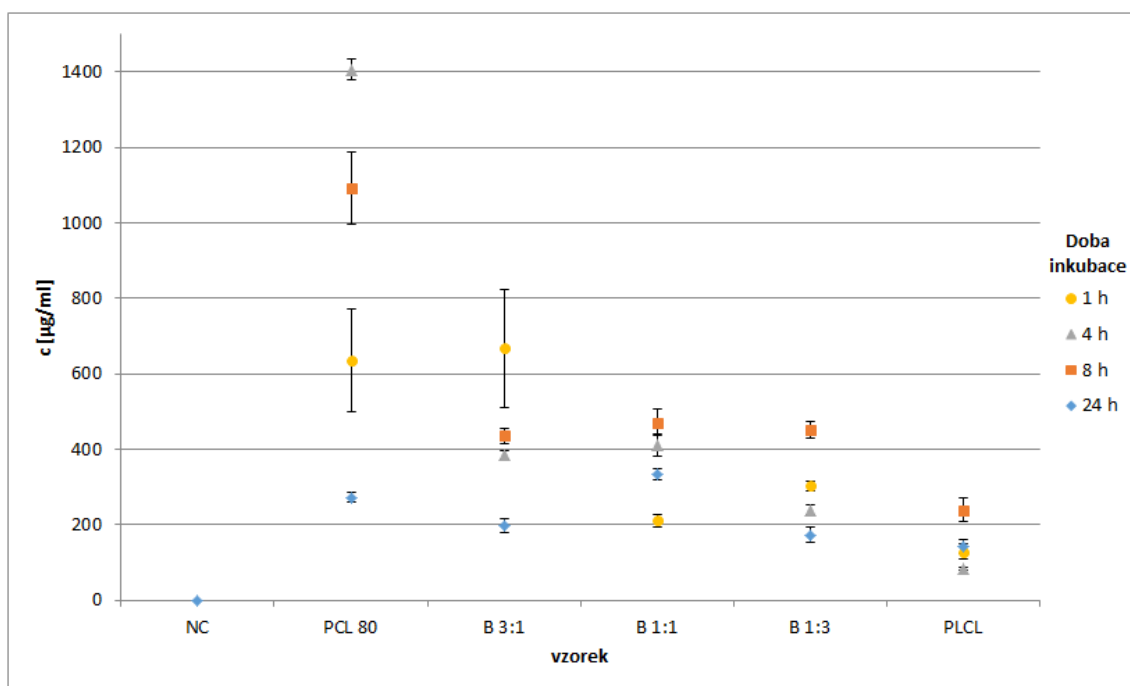


Graf 1: GPC chromatografie; graf závislosti koncentrace BSA na materiálu po 1 a 24h adsorpci. * = nedostatek dat

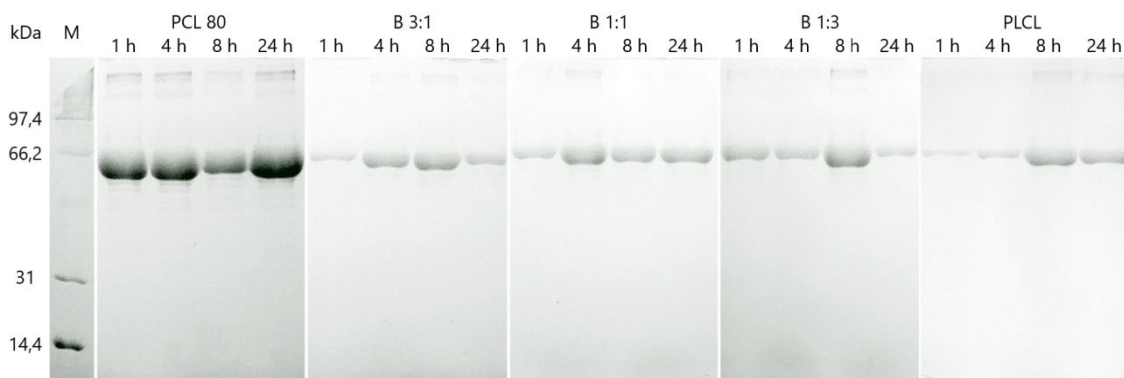
Z obou použitých metod analýzy pak vyplývá přibližný vztah mezi testovanými materiály, co se adsorpce BSA týče. Nejvíce adsorbující na základě těchto provedených experimentů je PCL 80 a to v obou časových intervalech. Při 1h adsorpci dále vyčnívají svojí schopností adsorbovat BSA materiály PLA společně s blendem 3:1, naopak při 24h adsorpci vyčnívá blend 1:1, tato odlišnost by mohla souviset s jeho hydrofobním charakterem. Je možné, že kvůli dané vlastnosti tohoto materiálu je průběh adsorpce odlišný od ostatních materiálů. Jelikož se v blízkosti materiálu vyskytuje méně molekul vody, jimiž jsou proteiny za běžných podmínek přirozeně obaleny, může zde figurovat odlišný proces přesunu proteinů do blízkosti materiálu a jejich navázání na materiál. Za nejméně adsorbující lze v obou časových intervalech považovat materiály PLCL

a blend 1:3. Kromě PCL 80 spolu metody dobře korespondují, hodnoty pro PCL 80 jsou vysoké a mohly by se tak pohybovat na hranici měřitelnosti, je tedy potřeba je brát s rezervou.

Druhý experiment zkoumal rozdíl mezi adsorpcemi po doby 1, 4, 8 a 24 h. Koncentrace adsorbovaného proteinu variovala i u časových intervalů 4 a 8 h. Obrázek 10 i graf 2 ukazují, že se každý materiál chová zcela odlišně v průběhu času a nelze tak stanovit jednotný průběh procesu společný všem materiálům. U většiny materiálů kromě PCL 80 je vysoká hodnota koncentrace proteinu okolo 8 h, kdy je možno pozorovat, že je adsorbováno největší množství proteinu. Afinita BSA k materiálu PCL 80 výrazně převyšuje afinity k ostatním materiálům. Mezi nimi pak znovu vyčnívá PCL 80, naopak nejslabší adsorpci BSA vykazuje PLCL. To je i v dobré shodě s výsledky z předchozího experimentu. Výsledky v tomto experimentu byly však mezi oběma metodami analýzy v některých případech odlišné, u chromatografie to může být např. způsobeno složitější přípravou vzorků a aparatury.



Graf 2: GPC chromatografie; graf závislosti koncentrace BSA na materiálu po 1, 4, 8 a 24h adsorpci



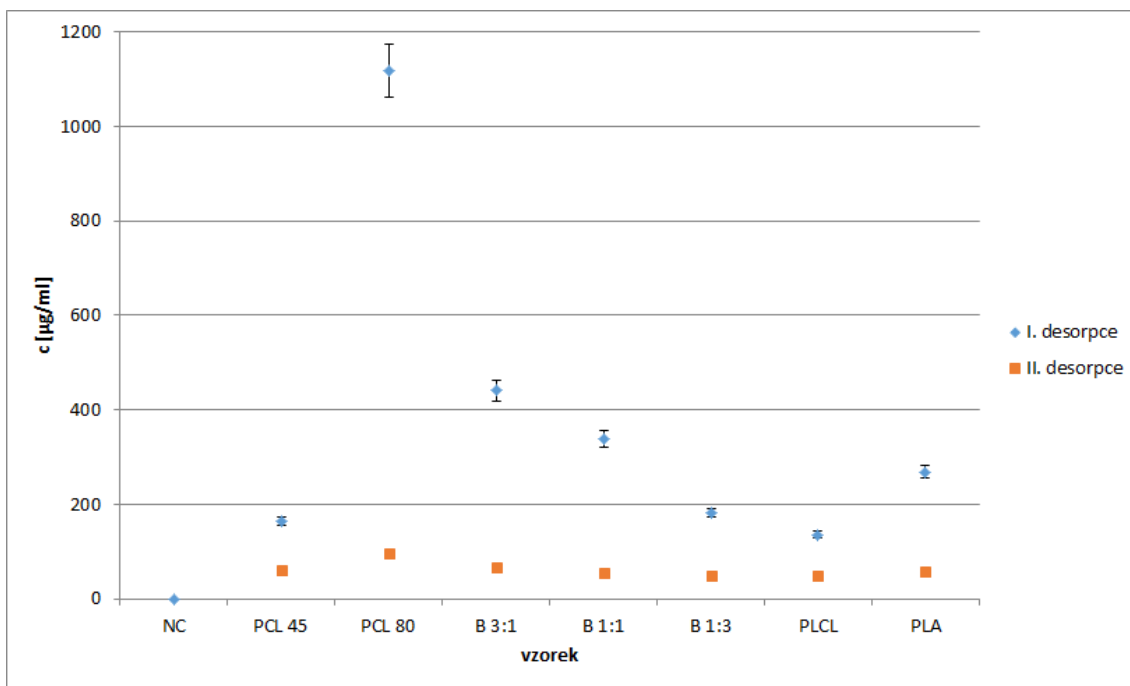
Obrázek 10: 10% SDS-PAGE elektroforéza; srovnání 1h, 4h, 8h a 24h adsorpce u vybraných materiálů

V obou experimentech bylo potvrzeno, že časový průběh adsorpce je velmi různorodý napříč testovanými materiály. Je možné usuzovat, že podoba proteinové korony je proměnlivá v závislosti na vlastnostech materiálu, což je v dobré shodě s dostupnými zdroji,[1, 3] ale také v závislosti na postupných změnách konformace samotného proteinu, aby mohl lépe interagovat s materiálem.[63] Jak již bylo zmíněno, v mnoha dostupných zdrojích je možné se setkat spíše s kratšími intervaly adsorpčních testů.[2, 29, 75] Jako vhodný interval pro experimenty s BSA se z otestovaných intervalů jeví interval 1 h, který byl proto použit ve všech následujících experimentech.

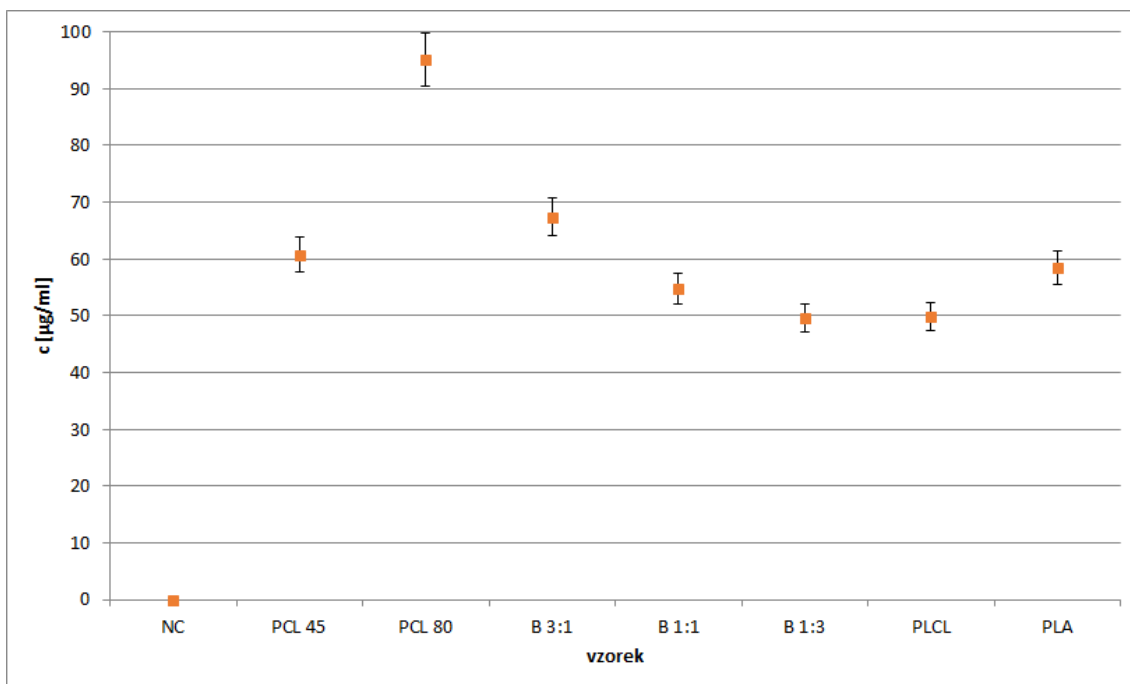
5.4 Optimalizace druhé desorpce

Druhá desorpce může podhalit poměr slabě a silně navázaných proteinů tvořících proteinovou koronu. Další experimenty tedy po 1h adsorpci a první desorpci podrobily materiály i druhé desorpci. Výsledné roztoky desorbovaných proteinů byly následně analyzovány gelovou permeační chromatografií, jejíž výsledky shrnují grafy 3 a 4, a SDS-PAGE elektroforézou, jejíž výsledek je zachycen na obrázku 11.

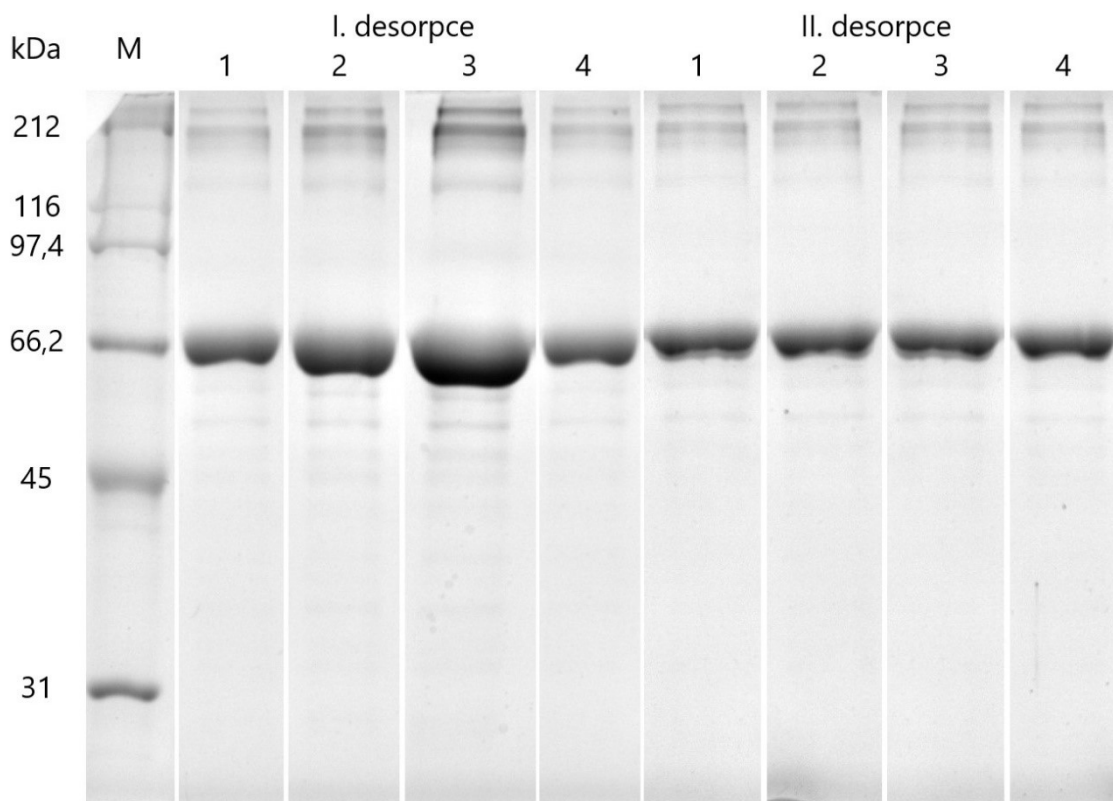
Zatímco při první desorpci (graf 3) byly hodnoty pro testované materiály odlišné celkem výrazně, při druhé desorpci je jejich rozdíl relativně minimální. Přesto však je po zaměření se pouze na druhou desorpci (graf 4) patrný rozdíl mezi jednotlivými materiály. Výsledky druhé desorpce vykazují shodný trend jako výsledky po první desorpci a stejně tak i jako výsledky z předcházejících experimentů. Výsledky první desorpce navíc potvrzují výsledky z předcházejících experimentů, materiály PCL 45, B 1:3 a PLCL adsorbují BSA nejméně, naopak PCL 80 nejvíce.



Graf 3: GPC chromatografie; graf závislosti koncentrace adsorbovaného BSA na materiálu při dvou desorpcích

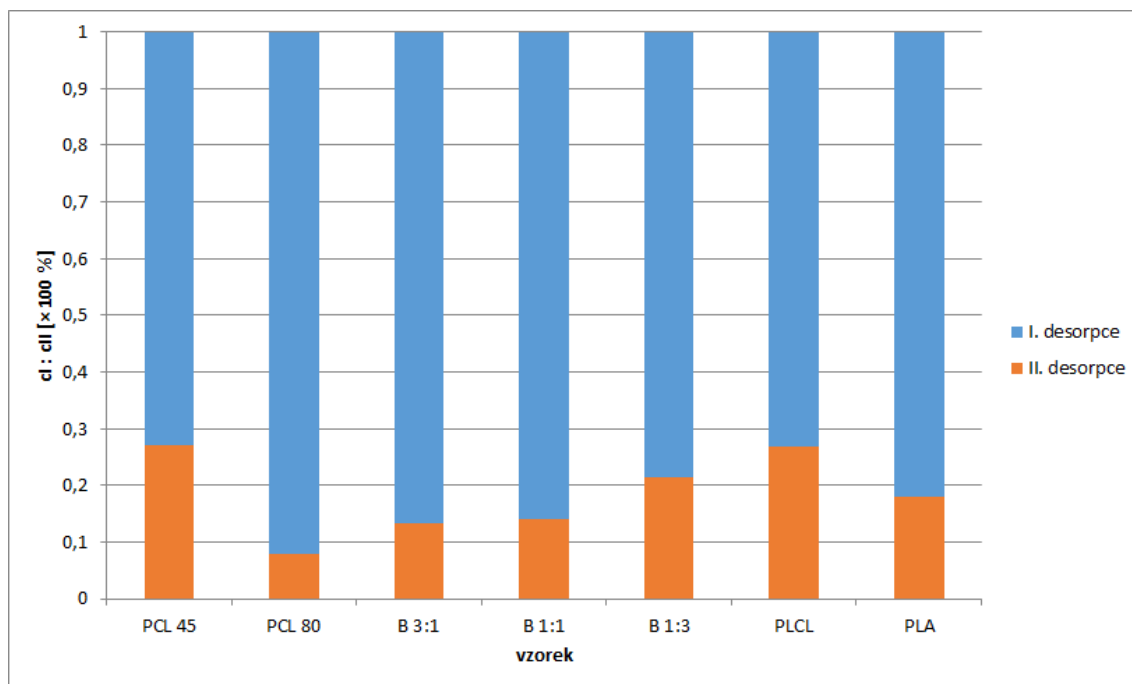


Graf 4: Detailní pohled na druhou desorpci z grafu 3



Obrázek 11: 10% SDS-PAGE elektroforéza; rozdíl mezi I. a II. desorpce je patrný i u čtyř dalších testovaných vzorků materiálu PCL 80

Graf 5 zobrazuje procentuální poměr hodnot první a druhé desorpce vůči sumě hodnot z obou desorpcí. U materiálů PCL 45 a PLCL lze říci, že po první desorpci zůstává na materiálu více proteinu v porovnání s ostatními materiály, lze tak usuzovat, že tyto materiály váží BSA pevněji, resp. BSA by pravděpodobně mohla podstupovat konformační změny, kvůli nimž se váže pevněji na tyto materiály. Naopak materiál PCL 80 již ve druhé desorpci uvolnil procentuálně nejméně proteinu. Vzhledem k vysoké hodnotě adsorbovaných proteinů zjištěné při předchozích experimentech lze usuzovat, že materiál PCL 80 váže proteiny BSA relativně slabě oproti ostatním testovaným materiálům.

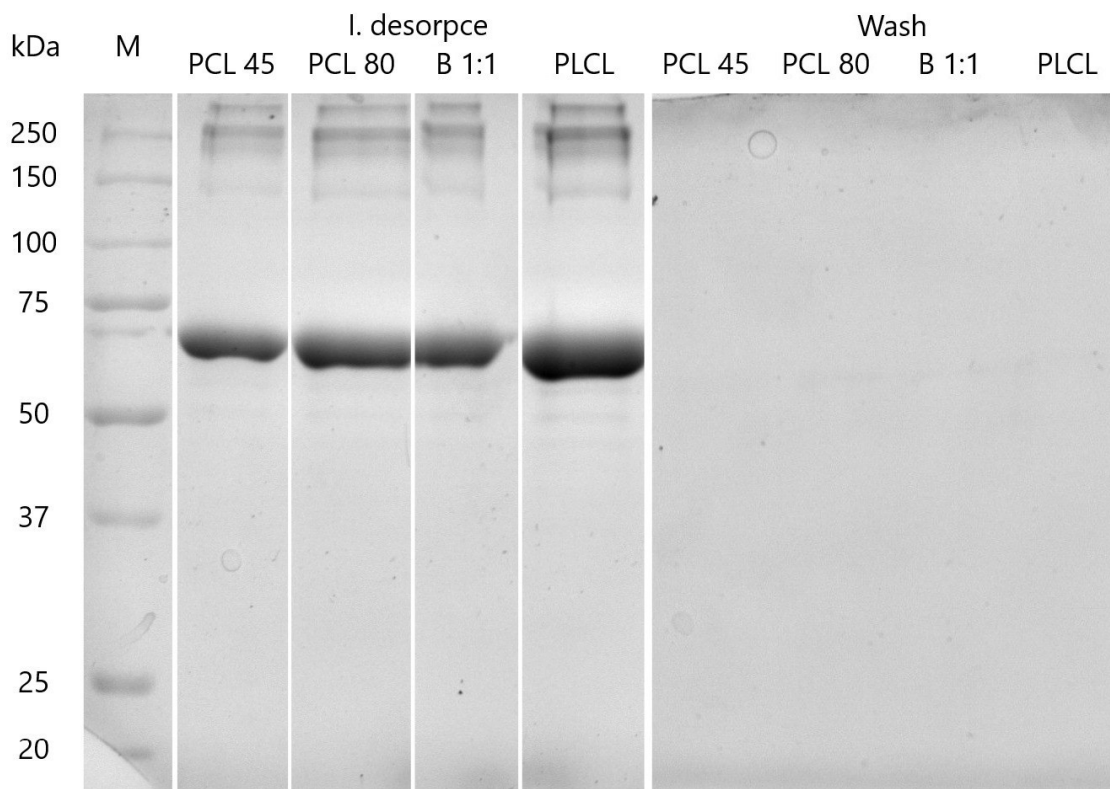


Graf 5: Poměr koncentrací z první a druhé desorpce vůči sumě obou naměřených hodnot

5.5 Analýza slabě vázaných proteinů

Obdobně jako druhá desorpce, i analýza proteinů ve vzorcích po oplachu (angl. „wash“) je běžně prováděna ke zhodnocení síly vazeb proteinů na povrch materiálů.[76, 77] Čtveřice vybraných materiálů PCL 45, PCL 80, blend 1:1 a PLCL byla podrobena 1h adsorpci, po níž byly z oplachu materiálů odebrány vzorky. Ty byly poté analyzovány elektroforeticky.

Výsledný záznam v obrázku 12 ukazuje zcela zanedbatelnou přítomnost proteinů ve všech testovaných vzorcích. Dá se tedy usuzovat, že ani jeden z materiálů neváže protein BSA příliš slabými vazbami, u všech zde testovaných materiálů se BSA pravděpodobně účastní tvrdé korony, což by bylo ve shodě s teorií.



Obrázek 12: 10% SDS-PAGE elektroforéza; vzorky materiálů PCL 45, PCL 80, B 1:1 a PLCL po I. desorpci a oplachu

5.6 Spektrofotometrická analýza adsorbovaných proteinů

Spektrofotometrická analýza koncentrace proteinů může doplnit, či dokonce nahradit ostatní již zmíněné metody při analýze proteinové adsorpce. V porovnání s elektroforézou nebo chromatografií lze touto metodou snadno analyzovat velké množství vzorků a tak získat statisticky velmi dobře zpracovatelná numerická data. Navzdory svojí robustnosti jsou se spektrofotometrickými metodami běžně spojovány určité problémy, které je třeba řešit. Analytická činidla používaná těmito metodami, např. Bradfordovo činidlo a v malé míře také činidla sady Quant-iT, interagují s detergenty, např. s v této práci použitým desorpčním činidlem SDS, a výsledky tak mohou být zkresleny. Je známo vícero postupů, jak se s tímto problémem vypořádat, několik z nich bylo v této práci ozkoušeno, jak v rámci výše popsáných experimentů, tak v následných pokusech. Mezi postupy odzkoušenými v této práci patří využití kolony s filtrační membránou, srážení roztoků vzorků pomocí draselných solí dle postupu popsaného Suzukim a Teradou,[78] dialýza a také analýza zředěných roztoků.

Separace pomocí filtračních kolon

Princip separace nízkomolekulárního detergentu od vysokomolekulárního proteinu ve vzorku pomocí kolony s filtrační membránou byl ozkoušen jako první. Na trhu lze nalézt nepřehledné množství filtračních kolon různých parametrů (velikost pórů, četnost pórů, maximální rychlost stáčení) k tomuto účelu. V rámci výše popsaných experimentů byly vzorky před otestováním Bradfordovou metodou filtrovány za využití centrifugačních kolon *VivaSpin Turbo 4 3000 MWCO* od firmy Sartorius (na obrázku 13). Tyto kolony sestávají ze dvou částí, z vrchní části obsahující membránu z polyethersulfonu,[79] do této části je umístěn vzorek ke stočení, a ze spodní sběrné části, do které při stočení přejde skrze membránu nízkomolekulární složka vzorku.

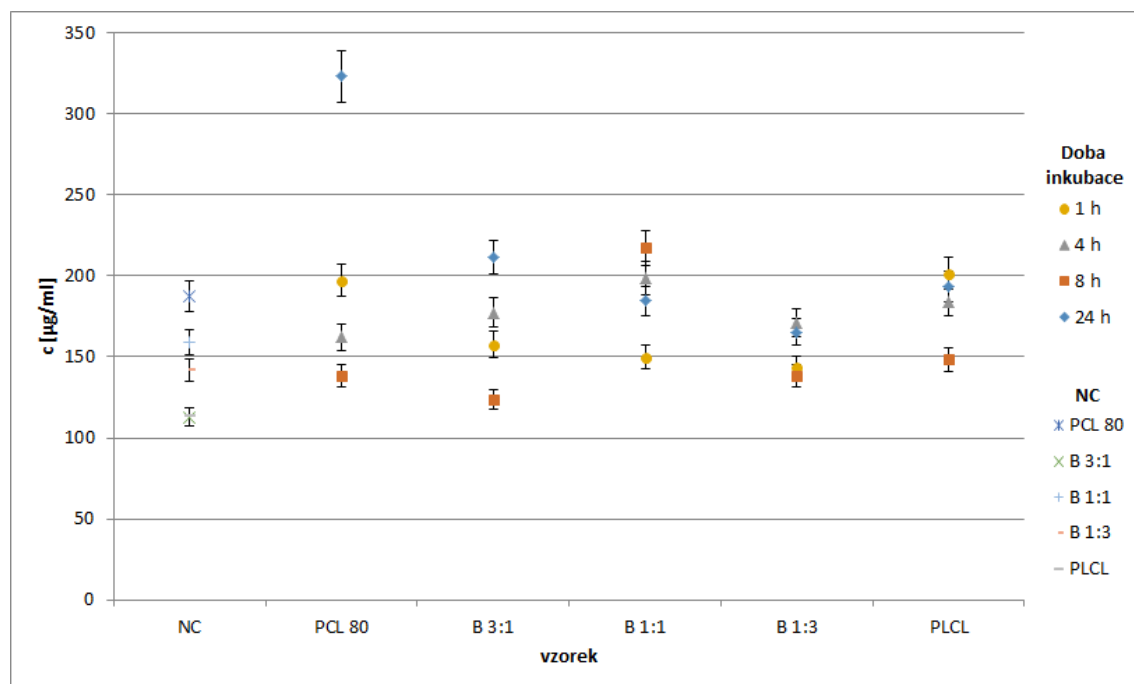


Obrázek 13: Centrifugační kolona Sartorius *VivaSpin Turbo 4 3000 MWCO*; zleva spodní sběrná zkumavka, vrchní nádobka s membránou a víčko

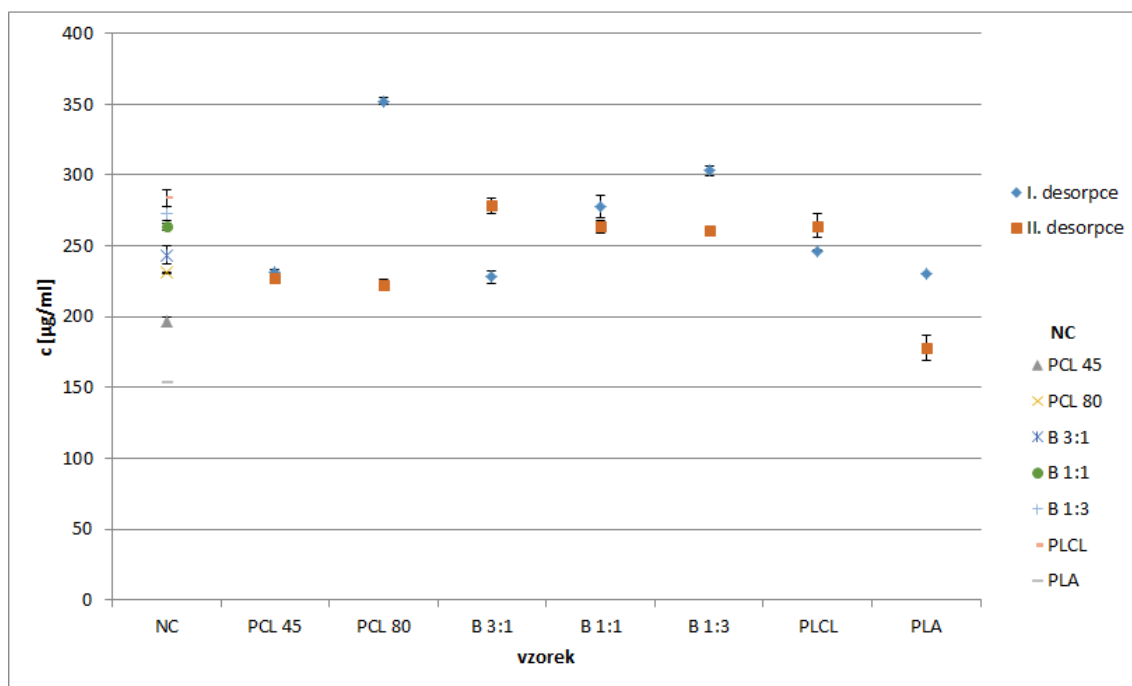
Od vzorků z předchozích experimentů bylo vždy po desorpci odebráno 0,5 ml roztoku a pipetováno do vrchní části kolon. Následovalo stočení na centrifuze při $2\ 830\times g$ po dobu 4×30 minut při pokojové teplotě. Po každém 30minutovém intervalu byly roztoky dolity pomocí Pasteurovy pipety roztokem PBS vždy dle stupnice na koloně cca do původního množství 0,5 ml. Naopak přes membránu prošlý nízkomolekulární obsah ze spodní části kolony byl pokaždé vylit do odpadu. Po 4. stočení

byl naposledy k neprošlému vysokomolekulárnímu obsahu do horní části kolon dolit PBS cca do 0,5 ml. Následně byl pomocí pipety vyjmut vzorek do připravených mikrozkuvek. Membrána ve vrchní části kolon byla ještě propláchnuta pomocí PBS o objemu 0,5 ml, který byl poté také přenesen do mikrozkuvek. Z výsledného přibližně 1 ml roztoku proteinů byla následně provedena analýza Bradfordovou metodou (kapitola 4.2.5) v poměru 20 μ l vzorku na 180 μ l činidla (grafy 6 a 7).

Přestože byl roztok stáčen v každém kroku po dobu 30 minut, nikdy nedošlo k úplnému průchodu nízkomolekulárních látek skrz membránu, vždy v horní části kolony zbylo přibližně 0,2 ml roztoku. Navíc při nakládání se stočeným supernatantem bylo možné pozorovat tvorbu bublin, jev spojený s nižším povrchovým napětím a vyšší smáčivostí, indikující nedostatečné odfiltrování SDS. To bylo také možné pozorovat po zchlazení na 5 °C, kdy se SDS vysrážel. Následné testy Bradfordovou metodou tuto skutečnost potvrdily, byly totiž naměřeny falešně pozitivní hodnoty i u negativních kontrol. Důvodem pravděpodobně byla příliš malá velikost pórů kolony 3 kDa v použitých dostupných kolonách 3000 MWCO, póry tak mohly být snadno obsazeny proteiny. Výrobce pro BSA doporučuje variantu kolony 10000 MWCO nebo 30000 MWCO,[79] přičemž pro 7 500 \times g uvádí dobu stáčení okolo 6 až 7 minut. Těchto podmínek nebylo možné pomocí dostupné centrifugy docílit a ani vyšší čas stáčení s tímto problémem nepomohl.

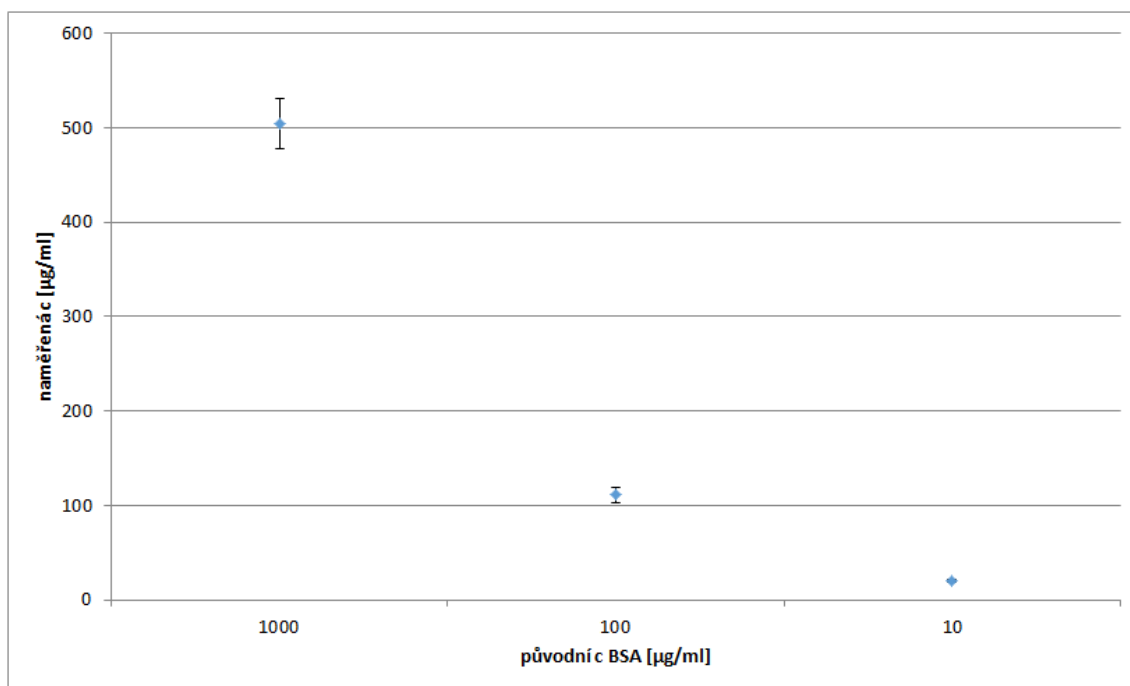


Graf 6: Graf závislosti koncentrace adsorbovaných proteinů vzorků z optimalizace doby adsorpce na materiálu; analyzováno Bradfordovou metodou po centrifugaci v kolonách



Graf 7: Graf závislosti koncentrace adsorbovaných proteinů vzorků z optimalizace druhé desorpce na materiálu; analyzováno Bradfordovou metodou po centrifugaci v kolonách

U vzorků s definovanou koncentrací BSA v 1% roztoku SDS v PBS bylo pozorováno, jak se chová supernatant, co se týče povrchového napětí, a také, jak odpovídají výsledky ze spektrofotometrie původní koncentraci. Vzorky o koncentracích BSA 10, 100 a 1000 µg/ml byly bez přestávky stáčeny v kolonách po dobu 4 h. Na rozdíl od slepých vzorků PBS a vody, u žádného ze vzorků obsahujících BSA neprošel veškerý nízkomolekulární obsah skrz membránu, ani u toho s nejnižší testovanou koncentrací 10 µg/ml. Přesto však u nižších koncentrací 10 a 100 µg/ml výsledné hodnoty relativně dobře odpovídaly skutečnosti (graf 8). Zde byla potvrzena hypotéza, že se problém pojí s vyšší koncentrací proteinu, kdy dochází k ucpání membrány.



Graf 8: Graf závislosti naměřené koncentrace definovaných vzorků BSA na původní koncentraci; analyzováno Bradfordovou metodou po centrifugaci v kolonách

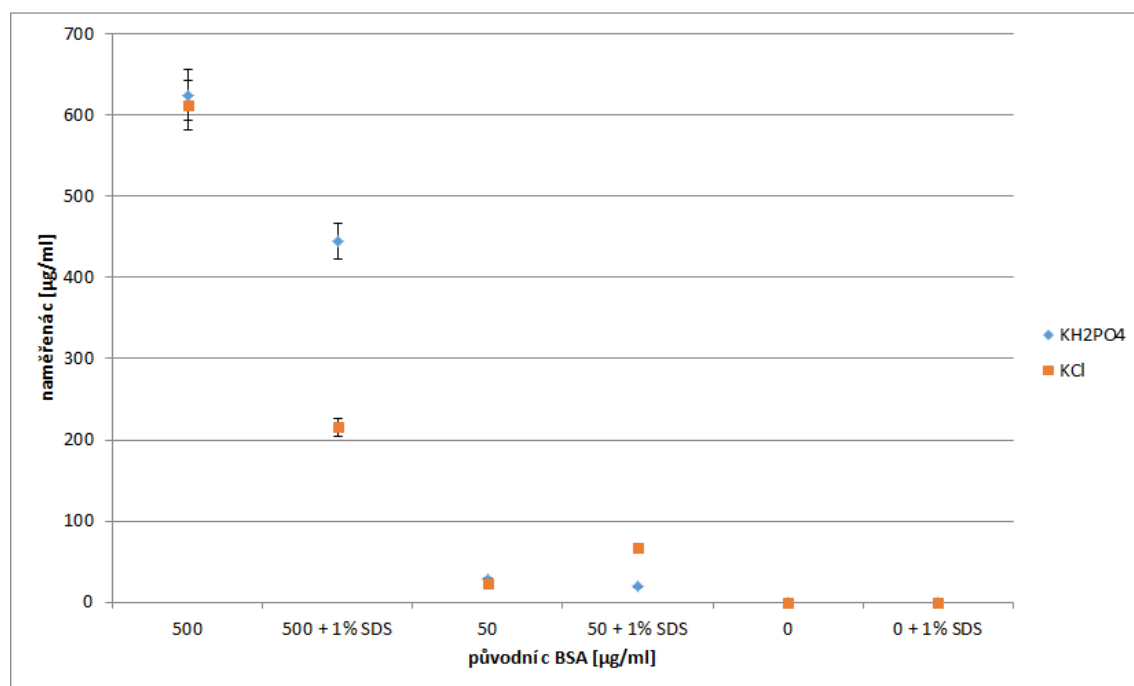
Separace srážením draselnými solemi

Druhý ozkoušený postup byl navržen a popsán Suzukim a Teradou.[78] Jedná se o vysrážení SDS pomocí různých solí alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin. Suzuki a Terada konkrétně srovnávali použití dihydrogenfosforečnanu, chloridu a octanu draselného, ale také zkoušeli soli barya a vápníku. Při tomto postupu byl roztok BSA a SDS ve vodě doplněn o sůl a ponechán ke zchlazení v ledové vodní lázni. Následně byl roztok centrifugován za teploty 5 °C. Autoři došli k závěru, že z testovaných solí nejefektivnější k danému účelu je dihydrogenfosforečnan draselný.

Postup v této diplomové práci byl ozkoušen u vzorků s definovanou koncentrací BSA 50 a 500 µg/ml v 1% roztoku PBS. Pro testy byly vybrány soli přítomné přímo v PBS, nejprve KH_2PO_4 a pro srovnání také KCl . Sůl byla přidána v množství k získání autory doporučené finální koncentrace 20 mmol/l a rozmíchána do rozpuštění. Roztoky byly ponechány v lednici po dobu 30 minut a následně stočeny při $2\ 830\times g$ a 5 °C po dobu 20 minut. Poté byl supernatant opatrně oddělen od sedimentu a výsledky byly analyzovány Bradfordovou metodou (graf 9).

Na základě výsledků vzorky s SDS mnohem více korespondovaly s výsledky slepých vzorků při použití KH_2PO_4 . Výsledky tak potvrdily relativně dobrou účinnost KH_2PO_4 popsanou autory proti neuspokojivému výsledku KCl . Avšak u obou solí

při koncentraci BSA 500 $\mu\text{g/ml}$ byla odlišnost stále markantní, metoda navíc byla provázána problémy. Zejména bylo obtížné oddělit supernatant od sedimentu, který byl jednak stočený na dně mikrozkušavky, jednak ale tvořil i krustu na hladině roztoku. Supernatant i po pečlivém oddělení vykazoval známky přítomnosti SDS, stejně jako u předchozí metody. Metoda se tak kvůli obtížnosti manipulace se stočenými vzorky a známkám přítomnosti SDS ve výsledku jeví jako problematická.



Graf 9: Graf závislosti naměřené koncentrace definovaných vzorků BSA na původní koncentraci; analyzováno Bradfordovou metodou po srážení draselnými solemi

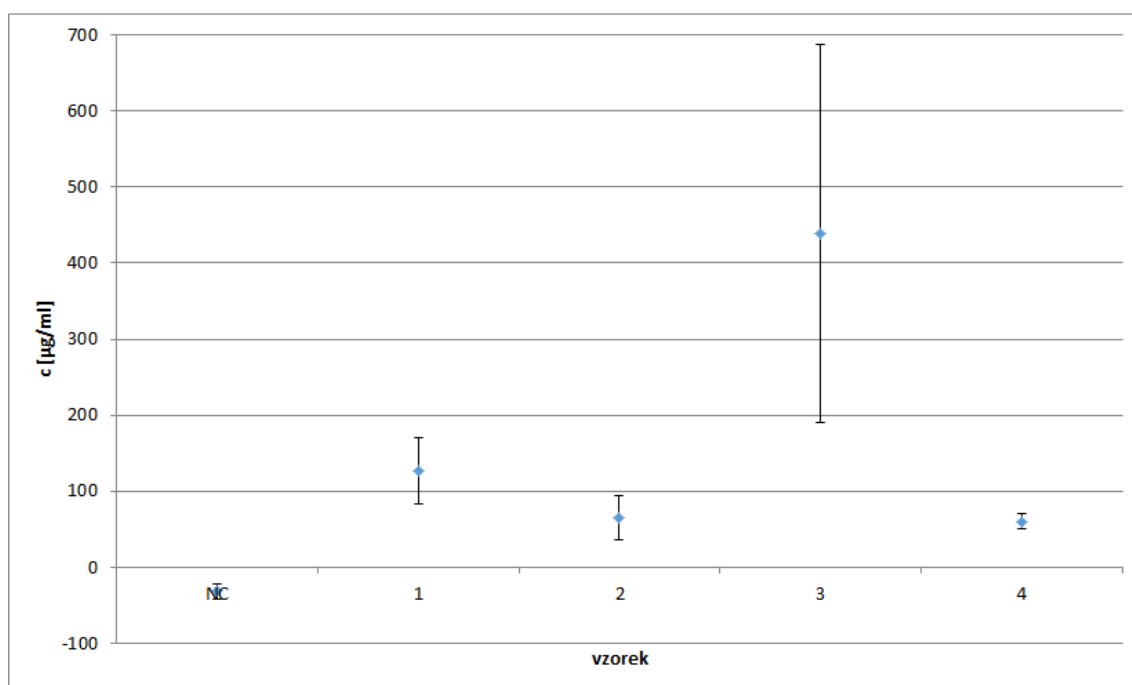
Separace dialyticky a analýza zředěných vzorků

Posledními testovanými metodami, jak omezit nízkomolekulární detergent ve vzorcích, byly dialýza vzorků a zředění vzorků. Metody byly testovány na 4 vzorcích PCL 80 po I. a II. desorpci. V případě dialýzy bylo použito dialytické střevo, které bylo nastříháno na přibližně 6–8 cm dlouhé proužky a na jednom konci uzavřeno svorkou. 1 ml vzorku byl pipetován do takto připraveného střeva a střevo bylo na druhém konci taktéž uzavřeno svorkou. Vzorky byly ponechány za neustálého míchání a za pokojové teploty v PBS po dobu 24 h, přičemž PBS bylo 3× vyměněno, po 1, 2 a 4 h od začátku dialýzy. Po ukončení dialýzy byly taktéž vzorky analyzovány pomocí Bradfordovy metody, kdy byl použit poměr 250 μl činidla na 5 μl vzorku.

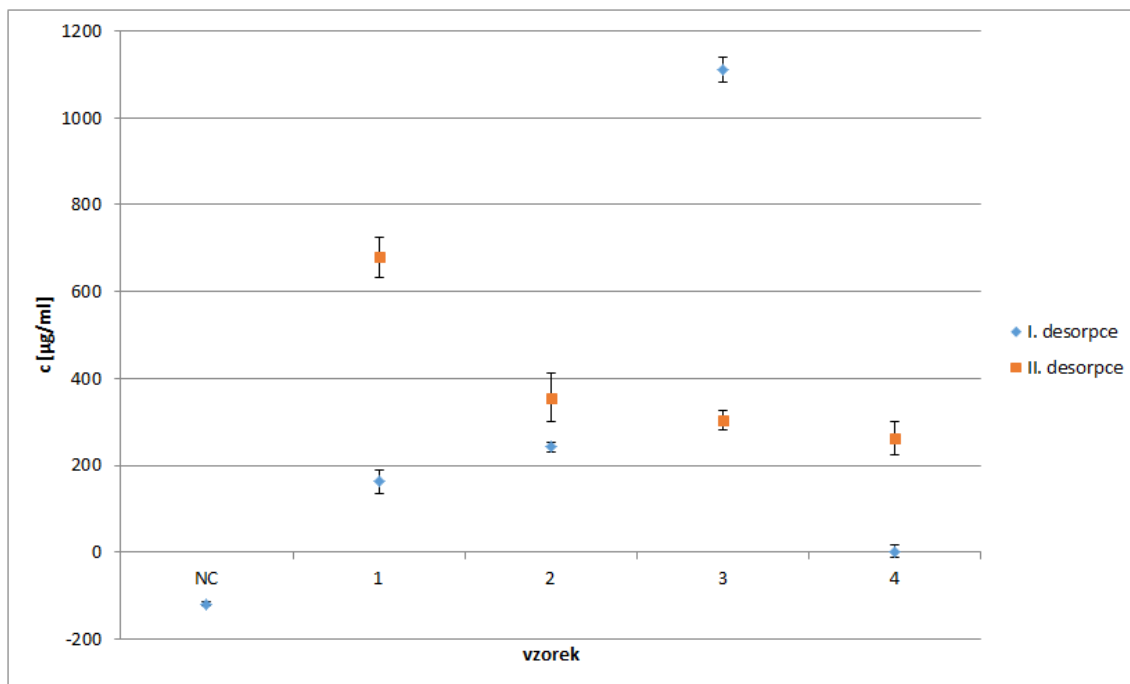
Pro metodu Quant-iT byly vzorky 10× zředěny roztokem PBS. Míra ředění byla určena na základě omezení této metody, kdy je za nejvyšší akceptovatelnou koncentraci

traci SDS uváděna hodnota 0,1 hm. %.[72] Vzorky byly též pro srovnání analyzovány elektroforeticky.

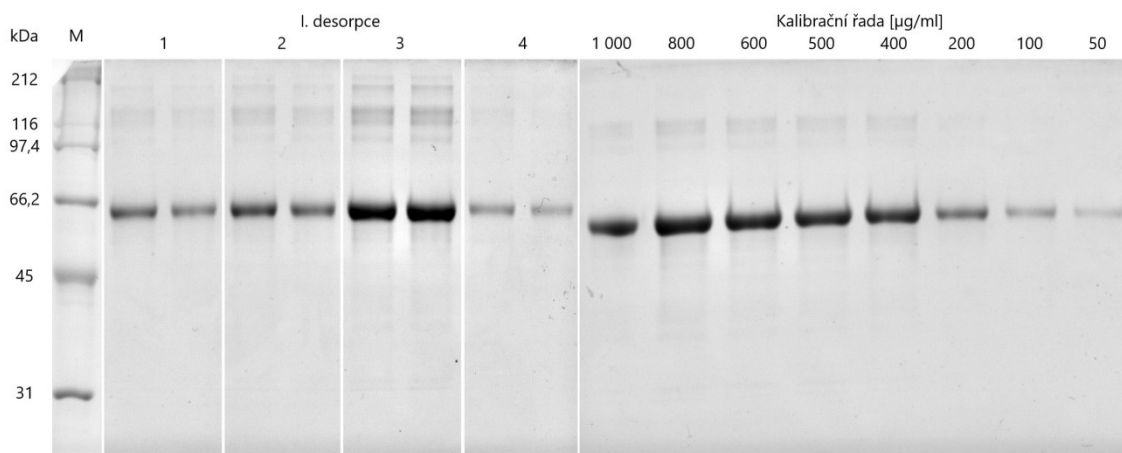
Jak je patrné ze srovnání grafů 10, 11 a obrázku 14, po dialýze byly výsledky negativní kontroly již blízké očekávání. V porovnání s metodou Quant-iT a elektroforézou však byly hodnoty vzorků stále poloviční. Je možné, že svou roli hraje také nespecifická adsorpce proteinů na materiál 96jamkové destičky, čímž by byla analýza narušena. Metoda Quant-iT po úpravě koncentrace SDS ve vzorcích i standardech dle manuálu metody dala výsledky odpovídající výsledku elektroforézy, zároveň byla relativně nenáročná na provedení i časově v porovnání s dialýzou nebo výše popsanou centrifugací v kolonách.



Graf 10: Graf závislosti koncentrace adsorbovaných proteinů vzorků I. desorpce PCL 80 na materiálu; analyzováno Bradfordovou metodou po dialýze



Graf 11: Graf závislosti koncentrace adsorbovaných proteinů vzorků I. desorpce PCL 80 na materiálu; analyzováno metodou Quant-iT po 10násobném zředění pomocí PBS



Obrázek 14: 10% SDS-PAGE elektroforéza: srovnání vzorků I. desorpce PCL 80 s kalibrační řadou BSA

Závěry a doporučení

K testům proteinové adsorpce byl připraven nanovláknenný materiál PCL 45 a mikrovláknenné materiály PCL 80, PLCL, blendy PCL 80 : PLCL v různých poměrech a materiál PLA. Materiály PCL 45 a PLA obsahovaly řadu defektů. U materiálů PCL 45 a PCL 80 byl naměřen superhydrofilní charakter, u blendy 1:1 naopak hydrofobní charakter. Materiály byly testovány výše uvedeným postupem na proteinovou adsorpci albuminu z hovězího séra. Zatímco PCL 45, blend 1:3 a PLCL adsorbovaly relativně málo proteinu napříč provedenými testy, materiál PCL 80 v adsorpci proteinu výrazně převyšoval ostatní materiály.

Doba adsorpce na materiály dle provedených testů měla vliv na časový průběh adsorpce. Každý z testovaných materiálů vykazoval odlišný charakter po 1, 4, 8 a 24 h. U hůře adsorbujících materiálů odlišnost v jednotlivých časových úsecích nebyla zásadní, naopak u více adsorbujících byly rozdíly více znát. Charakter korespondoval se specifickým povrchem materiálů, úpravou tohoto parametru tedy pravděpodobně může být připraven materiál absorbující proteiny v potřebné míře. Hydrofobní blend 1:1 vykazoval výrazně lepší schopnost absorbovat proteiny po 24 h, ostatní materiály však lépe adsorbovaly v kratších časových intervalech, což bylo v dobré shodě s dostupnou literaturou. Bylo potvrzeno, že smáčivost materiálu hraje v proteinové adsorpci zásadní vliv na princip jejího průběhu.

U testovaných materiálů byly též prověřeny vzorky po oplachu a z druhé desorpce. Na základě porovnání výsledků první a druhé desorpce lze říci, že materiály PCL 45 a PLCL váží proteiny silněji, zatímco materiál PCL 80 z testovaných materiálů nejslaběji. Přesto však trend výsledků druhé desorpce koresponduje s trendem první desorpce. Analyzované vzorky po oplachu vykazovaly zanedbatelnou přítomnost proteinů, albumin byl tedy na všechny testované materiály pravděpodobně navázán dostatečně silnými interakcemi tzv. tvrdé korony.

K otestování proteinové adsorpce bylo použito vícero dostupných metod. Gelová permeační chromatografie se osvědčila jako velmi přesná metoda analýzy, avšak také jako velmi časově náročná, kvůli čemuž nebylo možné otestovat statisticky vyhovující množství vzorků. SDS-PAGE elektroforéza byla prokázána jako dobrá orientační metoda, časově méně náročná, avšak pro získání numerických hodnot by bylo potřeba tu-

to metodu doplnit např. o metodu blotování nebo grafickou analýzu. Ke statistickému zpracování vzorků vhodné spektrofotometrické a fluorimetrické metody se ukázaly být problematické kvůli interakci činidla s detergentem SDS použitým při desorpci.

K překonání této překážky bylo otestováno vícero přístupů přípravy vzorků pro analýzu. Dostupné filtrační kolony *VivaSpin Turbo 4 3000 MWCO* měly malou velikost pórů v porovnání s velikostí molekul proteinu a nebylo tak možné jimi uspokojivě oddělit protein od detergentu. Stejný výsledek dávala také metoda srážení SDS draselnými solemi za nízkých teplot, nepodařilo se dostatečně oddělit supernatant obsahující proteiny od sedimentu obsahujícího detergent. Metoda dialýzy již dávala výsledky blízké očekávání, ty však přesto nekorespondovaly s provedenou elektroforézou i metodou Quant-iT. Poslední jmenovaná metoda se ukázala být z dostupných metod nejvhodnější, po dodržení doporučeného postupu výrobce dávala pro statisticky zpracovatelné množství vzorků hodnoty odpovídající očekávání.

Na základě provedených experimentů, z nichž relevantní jsou popsány v této práci, byl stanoven vhodný postup adsorpce jednoho modelového proteinu albuminu na vlákenné materiály i postup následné analýzy. Při kontaktu vlákenného materiálu s prostředím organismu však dochází k adsorpci celé řady proteinů, nejen nejvíce zastoupeného albuminu. V tomto směru je možné na práci navázat a dále prohloubit znalosti o adsorpci u testovaných materiálů na další modelové proteiny, případně na celé krevní sérum. Je možné, že ne všechny z uvedených postupů by při zvolení jiného modelového proteinu nebo kombinace proteinů byly aplikovatelné, případný následný výzkum tak může prohloubit i poznatky ohledně metod jevících se nyní jako nevhodné. Mezi cíli práce zmíněné srovnání s adhezí a proliferací buněk nebylo v této práci řešeno, i v tomto směru je možné výsledky práce dále prohloubit.

Seznam použité literatury

- [1] WEI, Qiang, Tobias BECHERER, Stefano ANGIOLETTI-UBERTI, Joachim DZUBIELLA, Christian WISCHKE, Axel T. NEFFE, Andreas LENDLEIN, Matthias BALLAUFF a Rainer HAAG. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2014, **53**(31), 8004–8031. ISSN 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201400546
- [2] WILSON, Cameron J., Richard E. CLEGG, David I. LEAVESLEY a Mark J. PEARCY. Mediation of biomaterial–cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Engineering* [online]. 2005, **11**(1–2), 1–18. ISSN 1076-3279. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2005.11.1
- [3] GRAFAHREND, Dirk, Karl-Heinz HEFFELS, Meike V. BEER, Peter GASTEIER, Martin MÖLLER, Gabriele BOEHM, Paul D. DALTON a Jürgen GROLL. Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation. *Nature Materials* [online]. 2011, **10**(1), 67–73. ISSN 1476-4660. Dostupné z: doi:10.1038/nmat2904
- [4] NEL, Andre E., Lutz MÄDLER, Darrell VELEGOL, Tian XIA, Eric M. V. HOEK, Ponisseril SOMASUNDARAN, Fred KLAESSIG, Vince CASTRANOVA a Mike THOMPSON. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials* [online]. 2009, **8**(7), 543–557. ISSN 1476-4660. Dostupné z: doi:10.1038/nmat2442
- [5] WALKEY, Carl D. a Warren C. W. CHAN. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews* [online]. 2012, **41**(7), 2780–2799. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/C1CS15233E
- [6] CHAN, B. P. a K. W. LEONG. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal* [online]. 2008, **17**(Suppl 4), 467–479. ISSN 0940-6719. Dostupné z: doi:10.1007/s00586-008-0745-3
- [7] JI, Wei, Yan SUN, Fang YANG, Jeroen J. J. P. VAN DEN BEUCKEN, Mingwen FAN, Zhi CHEN a John A. JANSEN. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical Research* [online]. 2011, **28**(6), 1259–1272. ISSN 1573-904X. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-010-0320-6
- [8] LI, Wan-Ju, Cato T. LAURENCIN, Edward J. CATERSON, Rocky S. TUAN a Frank K. KO. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2002, **60**(4), 613–621. ISSN 1097-4636. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.10167
- [9] BARNES, Catherine P., Scott A. SELL, Eugene D. BOLAND, David G. SIMPSON a Gary L. BOWLIN. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2007,

- 59(14)**, Intersection of Nanoscience and Modern Surface Analytical Methodology, 1413–1433. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.04.022
- [10] KOPŘIVOVÁ, Barbora. *Funkcionalizace tkáňového nosiče založeného na PVA pomocí růstových faktorů* [online]. B.m., 2018 [vid. 2018-09-30]. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Dostupné z: <https://theses.cz/id/yfuca5?info=1;issnlret=Barbora%3BKop%C5%99ivov%C3%A1%3B;zpet=%2Fvyhledavani%2F%3Fsearch%3DBarbora%20Kop%C5%99ivov%C3%A1%26start%3D1>
- [11] In vivo, in vitro, and analytical biocompatibility testing services. *Pacific BioLabs* [online]. [vid. 2020-05-25]. Dostupné z: <https://pacificbiolabs.com/biocompatibility>
- [12] KOOTEN, T. G. Van, C. L. KLEIN, H. KOHLER, C. J. KIRKPATRICK, D. F. WILLIAMS a R. ELOY. From cytotoxicity to biocompatibility testing in vitro: cell adhesion molecule expression defines a new set of parameters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 1997, **8(12)**, 835–841. ISSN 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1023/A:1018541419055
- [13] LYNCH, Iseult a Kenneth A. DAWSON. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* [online]. 2008, **3(1)**, 40–47. ISSN 1748-0132. Dostupné z: doi:10.1016/S1748-0132(08)70014-8
- [14] YANG, Shoufeng, Kah-Fai LEONG, Zhaohui DU a Chee-Kai CHUA. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering* [online]. 2001, **7(6)**, 679–689. ISSN 1076-3279. Dostupné z: doi:10.1089/107632701753337645
- [15] MAQUET, V. a R. JEROME. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Materials Science Forum* [online]. 1997, **250**, 15–42. ISSN 1662-9752. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.250.15
- [16] KEUN KWON, Il, Satoru KIDOAKI a Takehisa MATSUDA. Electrospun nano-to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* [online]. 2005, **26(18)**, 3929–3939. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.007
- [17] HILJANEN-VAINIO, M., T. KARJALAINEN a J. SEPPÄLÄ. Biodegradable lactone copolymers. I. Characterization and mechanical behavior of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 1996, **59(8)**, 1281–1288. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19960222)59:8<1281::AID-APP11>3.0.CO;2-9
- [18] LI, Wenchao, Yiqiang HU, Lei SHI, Xianglin ZHANG, Liming XIONG, Wancheng ZHANG a Ismat ULLAH. Electrospinning of polycaprolactone/Pluronic F127 dissolved in glacial acetic acid: fibrous scaffolds fabrication, characterization and in vitro evaluation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [on-

- line]. 2018, **29**(10), 1155–1167. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2018.1439431
- [19] WANG, Weizhong, Wei NIE, Xiaojun ZHOU, Wei FENG, Liang CHEN, Qianqian ZHANG, Zhengwei YOU, Qiusheng SHI, Chen PENG a Chuanglong HE. Fabrication of heterogeneous porous bilayered nanofibrous vascular grafts by two-step phase separation technique. *Acta Biomaterialia* [online]. 2018, **79**, 168–181. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2018.08.014
- [20] ZHANG, Kaile, Qiang FU, James YOO, Xiangxian CHEN, Prafulla CHANDRA, Xiumei MO, Lujie SONG, Anthony ATALA a Weixin ZHAO. 3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment. *Acta Biomaterialia* [online]. 2017, **50**, 154–164. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2016.12.008
- [21] GUPTA, Bhuvanesh, GEETA a Alok R. RAY. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ϵ -caprolactone-co-lactide) (PCL/PLCL) blend filament by melt spinning. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2012, **123**(4), 1944–1950. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.34728
- [22] MEMIC, Adnan, Tuerdimaimaiti ABUDULA, Halimatu S. MOHAMMED, Kasturi Joshi NAVARE, Thibault COLOMBANI a Sidi A. BENCHERIF. Latest progress in electrospun nanofibers for wound healing applications. *ACS Applied Bio Materials* [online]. 2019, **2**(3), 952–969. ISSN 2576-6422. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.8b00637
- [23] SANGSANOH, Pakakrong, Suchada WALEETORNCHEEPSAWAT, Orawan SUWANTONG, Patcharaporn WUTTICHAROENMONGKOL, Oratai WEE-RANANTANAPAN, Boontharika CHUENJITBUNTAWORN, Poonlarp CHEEPSUNTHORN, Prasit PAVASANT a Pitt SUPAPHOL. In vitro biocompatibility of schwann cells on surfaces of biocompatible polymeric electrospun fibrous and solution-cast film scaffolds. *Biomacromolecules* [online]. 2007, **8**(5), 1587–1594. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm061152a
- [24] PILAREK, Maciej, Iwona GRABOWSKA, Ilona SENDEREK, Michał WOJASIŃSKI, Justyna JANICKA, Katarzyna JANCZYK-ILACH a Tomasz CIACH. Liquid perfluorochemical-supported hybrid cell culture system for proliferation of chondrocytes on fibrous polylactide scaffolds. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [online]. 2014, **37**(9), 1707–1715. ISSN 1615-7605. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-014-1143-3
- [25] KOEPESELL, Laura, Tyler REMUND, Jing BAO, Daniel NEUFELD, Hao FONG a Ying DENG. Tissue engineering of annulus fibrosus using electrospun fibrous scaffolds with aligned polycaprolactone fibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2011, **99A**(4), 564–575. ISSN 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.33216
- [26] WANG, Weizhong, Jinwei HU, Chuanglong HE, Wei NIE, Wei FENG, Kexin QIU, Xiaojun ZHOU, Yu GAO a Guoqing WANG. Heparinized PLLA/PLCL nanofibrous scaffold for potential engineering of small-diameter blood vessel:

- Tunable elasticity and anticoagulation property. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2015, **103**(5), 1784–1797. ISSN 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.35315
- [27] SMITH, L. A. a P. X. MA. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2004, **39**(3), Biointerfaces and Nanotechnology, 125–131. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2003.12.004
- [28] KHAMPIENG, Thitikan, Vipawee YAMASSATIEN, Pongpol EKABUTR, Prasit PAVASANT a Pitt SUPAPHOL. Protein adsorption and cell behaviors on polycaprolactone film: The effect of surface topography. *Advances in Polymer Technology* [online]. 2018, **37**(6), 2030–2042. ISSN 1098-2329. Dostupné z: doi:10.1002/adv.21861
- [29] ROUXHET, Laurence, Florence DUHOUX, Olga BORECKY, Roger LEGRAS a Yves-Jacques SCHNEIDER. Adsorption of albumin, collagen, and fibronectin on the surface of poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHB/HV) and of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) films modified by an alkaline hydrolysis and of poly(ethylene terephthalate) (PET) track-etched membranes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 1998, **9**(12), 1279–1304. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/156856298X00398
- [30] VASITA, Rajesh, Gopinath MANI, C. Mauli AGRAWAL a Dharendra S. KATTI. Surface hydrophilization of electrospun PLGA micro-/nano-fibers by blending with Pluronic® F-108. *Polymer* [online]. 2010, **51**(16), 3706–3714. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2010.05.048
- [31] LISNENKO, Maxim. *Vliv degradace na mechanické vlastnosti nanovláknenných polyesterových materiálů* [online]. B.m., 2018 [vid. 2019-01-28]. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní. Dostupné z: <https://theses.cz/id/9mdswt?info=1;isslhret=Lisnenko%3B;zpet=%2Fvyhledavani%2F%3Fsearch%3Dlisnenko%26start%3D1>
- [32] CHEN, Tai-ying, Hao-chao HUANG, Jia-lin CAO, Yan-jiao XIN, Wen-feng LUO a Ning-jian AO. Preparation and characterization of alginate/HACC/oyster shell powder biocomposite scaffolds for potential bone tissue engineering applications. *RSC Advances* [online]. 2016, **6**(42), 35577–35588. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C5RA26805B
- [33] SHOAIB, Muhammad, Aamer SAEED, Javeed AKHTAR, Muhammad Saif Ur RAHMAN, Aman ULLAH, Klaus JURKSCHAT a Muhammad Moazzam NASEER. Potassium-doped mesoporous bioactive glass: Synthesis, characterization and evaluation of biomedical properties. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **75**, 836–844. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.02.090
- [34] SHITOLE, Ajinkya A., Piyush W. RAUT, Neeti SHARMA, Prabhanjan GIRAM, Anand P. KHANDWEKAR a Baijayantimala GARNAIK. Electrospun polycaprolactone/hydroxyapatite/ZnO nanofibers as potential biomaterials for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online].

- 2019, **30**(5), 1–17. ISSN 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-019-6255-5
- [35] GUPTA, Anil. 4 - Plasma proteins. In: *Comprehensive biochemistry for dentistry: Textbook for dental students* [online]. Singapore: Springer, 2019, s. 67–75. ISBN 978-981-1310-35-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-1035-5_4
- [36] YAWN, David H. *Plasma* [online]. B.m.: Encyclopædia Britannica, inc., 2017 [vid. 2020-05-25]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/plasma-biology>
- [37] LEEMAN, Mats, Jaeyeong CHOI, Sebastian HANSSON, Matilda Ulmius STORM a Lars NILSSON. Proteins and antibodies in serum, plasma, and whole blood—size characterization using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2018, **410**(20), 4867–4873. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-1127-2
- [38] SIMMONS, P., R. PENNY a I. GOLLER. Plasma proteins. A review. *The Medical Journal of Australia* [online]. 1969, **2**(10), 494–506. ISSN 0025-729X. Dostupné z: doi:10.5694/j.1326-5377.1969.tb107226.x
- [39] GRAHAM, D. E a M. C PHILLIPS. Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1979, **70**(3), 403–414. ISSN 0021-9797. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9797(79)90048-1
- [40] MIGLIORINI, Elisa, Marianne WEIDENHAUPT a Catherine PICART. Practical guide to characterize biomolecule adsorption on solid surfaces (review). *Biointerphases* [online]. 2018, **13**(6), 1–18. ISSN 1934-8630. Dostupné z: doi:10.1116/1.5045122
- [41] LEE, Wing-Hin, Ching-Yee LOO, Kim Linh VAN, Alexander V. ZAVGORODNIY a Ramin ROHANIZADEH. Modulating protein adsorption onto hydroxyapatite particles using different amino acid treatments. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2012, **9**(70), 918–927. ISSN 1742-5662. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2011.0586
- [42] KONDO, Akihiko a Ko HIGASHITANI. Adsorption of model proteins with wide variation in molecular properties on colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1992, **150**(2), 344–351. ISSN 0021-9797. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9797(92)90204-Y
- [43] KIM, David T., Harvey W. BLANCH a Clayton J. RADKE. Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy. *Langmuir* [online]. 2002, **18**(15), 5841–5850. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la0256331
- [44] PRIEUR, D. J., V. M. CÁMARA a D. M. YOUNG. 186 - Lysozyme deficiency. In: *Spontaneous Animal Models of Human Disease* [online]. San Diego: Academic Press, 1979, American College of Laboratory Animal Medicine, s. 79–81. ISBN 978-0-12-058502-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-058502-1.50048-7

- [45] SHARIF, Mian K., Makkia SALEEM a Komal JAVED. 15 - Food materials science in egg powder industry. In: *Role of Materials Science in Food Bioengineering* [online]. B.m.: Academic Press, 2018, Handbook of Food Bioengineering, s. 505–537. ISBN 978-0-12-811448-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811448-3.00015-2
- [46] STRIXNER, T. a U. KULOZIK. 7 - Egg proteins. In: *Handbook of Food Proteins* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2011, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, s. 150–209. ISBN 978-1-84569-758-7. Dostupné z: doi:10.1533/9780857093639.150
- [47] DE KRUIF, C. G. (Kees). 14 - Milk nanotubes: technology and potential applications. In: *Nanotechnology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2012, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, s. 398–412. ISBN 978-1-84569-739-6. Dostupné z: doi:10.1533/9780857095657.2.398
- [48] KELLY, P., B. W. WOONTON a G. W. SMITHERS. 8 - Improving the sensory quality, shelf-life and functionality of milk. In: *Functional and Speciality Beverage Technology* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2009, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, s. 170–231. ISBN 978-1-84569-342-8. Dostupné z: doi:10.1533/9781845695569.2.170
- [49] ANDOH, Tadashi. 19A - Insulin. In: *Handbook of Hormones* [online]. San Diego: Academic Press, 2016, s. 157–160. ISBN 978-0-12-801028-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801028-0.00148-3
- [50] YEAGLE, Philip L. 10 - Membrane proteins. In: *The Membranes of Cells (Third Edition)* [online]. Boston: Academic Press, 2016, s. 219–268. ISBN 978-0-12-800047-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800047-2.00010-3
- [51] WALLACE, Jason A. a Jana K. SHEN. 19 - Predicting pKa values with continuous constant pH molecular dynamics. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, 2009, Biothermodynamics, Part B, s. 455–475. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(09)66019-5
- [52] SCHERAGA, Harold A., William J. WEDEMEYER a Ervin WELKER. 12 - Bovine pancreatic ribonuclease a: Oxidative and conformational folding studies. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, 2001, Ribonucleases - Part A, s. 189–221. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(01)41153-0
- [53] ELECHALAWAR, Chandra Kumar, Md. Nazir HOSSEN, Lacey MCNALLY, Resham BHATTACHARYA a Priyabrata MUKHERJEE. Analysing the nanoparticle-protein corona for potential molecular target identification. *Journal of Controlled Release* [online]. 2020, **322**, 122–136. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2020.03.008
- [54] YU, Q. a H. CHEN. 7 - Interaction of switchable biomaterials surfaces with proteins. In: *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications* [online]. Oxford: Woodhead Publishing, 2015 [vid. 2020-05-07],

s. 167–188. ISBN 978-0-85709-713-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-85709-713-2.00007-9

- [55] PONCIN-EPAILLARD, Fabienne, Tjasa VRLINIC, Dominique DEBARNOT, Miran MOZETIC, Arnaud COUDREUSE, Gilbert LEGEAY, Benaïssa EL MOUALIJ a Willy ZORZI. Surface treatment of polymeric materials controlling the adhesion of biomolecules. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2012, **3**(3), 528–543. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb3030528
- [56] WESTMEIER, Dana, Shirley K. KNAUER, Roland H. STAUBER a Dominic DOCTER. 1 - Bio–nano interactions. In: *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials (Second Edition)* [online]. B.m.: Academic Press, 2017 [vid. 2020-05-07], s. 3–14. ISBN 978-0-12-809199-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809199-9.00001-X
- [57] RAHMAN, Masoud, Sophie LAURENT, Nancy TAWIL, L’Hocine YAHIA a Morteza MAHMOUDI. 2 - Nanoparticle and protein corona. In: *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013 [vid. 2020-05-07], Springer Series in Biophysics, s. 21–44. ISBN 978-3-642-37555-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-37555-2_2
- [58] FELGUEIRAS, H. P., J. C. ANTUNES, M. C. L. MARTINS a M. A. BARBOSA. 1 - Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials. In: *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2018 [vid. 2020-05-07], s. 1–27. ISBN 978-0-08-100803-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100803-4.00001-2
- [59] WOO, Kyung Mi, Victor J. CHEN a Peter X. MA. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2003, **67A**(2), 531–537. ISSN 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.10098
- [60] SALERNO, Aurelio, Vincenzo GUARINO, Olimpia OLIVIERO, Luigi AMBROSIO a Concepción DOMINGO. Bio-safe processing of polylactic-co-caprolactone and polylactic acid blends to fabricate fibrous porous scaffolds for in vitro mesenchymal stem cells adhesion and proliferation. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **63**, 512–521. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.03.018
- [61] MAO, Jifu, Shun DUAN, Anna SONG, Qing CAI, Xuliang DENG a Xiaoping YANG. Macroporous and nanofibrous poly(lactide-co-glycolide)(50/50) scaffolds via phase separation combined with particle-leaching. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2012, **32**(6), 1407–1414. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2012.04.018
- [62] CASIANO-MALDONADO, Madalis, Goy Teck LIM, Xiaopeng LI, Darrell H. RENEKER, Judit E. PUSKAS a Chrys WESDEMIOTIS. Protein adsorption on thermoplastic elastomeric surfaces: A quantitative mass spectrometry study. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2013, **354–355**, Detlef Schröder Memorial Issue, 391–397. ISSN 1387-3806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2013.08.007

- [63] MIKHAYLOVA, Y., V. DUTSCHK, M. MÜLLER, K. GRUNDKE, K. -J. EICHHORN a B. VOIT. Study of the solid–liquid interface of hydroxyl-terminated hyperbranched aromatic polyesters (HBP-OH) in aqueous media: II. Adsorption of model proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2007, **297**(1), 19–29. ISSN 0927-7757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2006.10.015
- [64] WEI, Guobao a Peter X. MA. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(19), 4749–4757. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.005
- [65] WOO, Kyung Mi, Jihye SEO, Ruiyun ZHANG a Peter X. MA. Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials* [online]. 2007, **28**(16), 2622–2630. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2007.02.004
- [66] SANKAR, Deepthi, K.t. SHALUMON, K.p. CHENNAZHI, Deepthy MENON a R. JAYAKUMAR. Surface plasma treatment of poly(caprolactone) micro, nano, and multiscale fibrous scaffolds for enhanced osteoconductivity. *Tissue Engineering Part A* [online]. 2013, **20**(11–12), 1689–1702. ISSN 1937-3341. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tea.2013.0569
- [67] DEEPTHI, S., K. JEEVITHA, M. NIVEDHITHA SUNDARAM, K. P. CHENNAZHI a R. JAYAKUMAR. Chitosan–hyaluronic acid hydrogel coated poly(caprolactone) multiscale bilayer scaffold for ligament regeneration. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2015, **260**, 478–485. ISSN 1385-8947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2014.08.106
- [68] LEONG, Meng Fatt, Kerm Sin CHIAN, Priyadarshini S. MHAISALKAR, Wey Feng ONG a Buddy D. RATNER. Effect of electrospun poly(D,L-lactide) fibrous scaffold with nanoporous surface on attachment of porcine esophageal epithelial cells and protein adsorption. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2009, **89A**(4), 1040–1048. ISSN 1549-3296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.32061
- [69] ARMENTANO, Ilaria, Gabriela CIAPETTI, Manuela PENNACCHI, Mariasere-na DOTTORI, Valentina DEVESCOVI, Donatella GRANCHI, Nicola BALDINI, Beatriz OLALDE, Maria Jesus JURADO, Jose Inaki Marquinez ALAVA a José M. KENNY. Role of PLLA plasma surface modification in the interaction with human marrow stromal cells. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2009, **114**(6), 3602–3611. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.31008
- [70] SUN, ZiLing, Lun BAI, GuoPing GUAN, KuiHua ZHAN a HongQin DAI. Protein adsorption and biocompatibility of porous silk fibroin films. In: *2009 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics: 2009 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics* [online]. 2009, s. 1–4. ISBN 978-1-4244-4134-1. Dostupné z: doi:10.1109/BMEI.2009.5305691

- [71] BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [online]. 1976, **72**(1), 248–254. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [72] *Quant-iT™ protein assay kit* [online]. [vid. 2020-05-25]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33210>
- [73] PANOŠOVÁ, Dagmar a Stanislav PANOŠ. *Chyby přímých měření* [online]. 2011. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/1982/mod_resource/content/3/Chyby%20p%C5%99%C3%ADm%C3%BDch%20m%C4%9B%C5%99en%C3%AD.pdf
- [74] 5 - Human albumin. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2009, **36**(6), 399–407. ISSN 1660-3796.
- [75] KHALIFEHZADEH, Raziieh a Buddy D. RATNER. Trifluoromethyl-functionalized poly(lactic acid): a fluoropolyester designed for blood contact applications. *Biomaterials Science* [online]. 2019, **7**(9), 3764–3778. ISSN 2047-4849. Dostupné z: doi:10.1039/C9BM00353C
- [76] GUO, MinJie, Ting GAO, Zhi FAN, JingXia YAO, JianJun XIA a HuaiFeng MI. Molecularly imprinted polymers with assistant recognition polymer chains for bovine serum albumin. *Science China Chemistry* [online]. 2010, **53**(4), 905–911. ISSN 1862-2771. Dostupné z: doi:10.1007/s11426-010-0113-0
- [77] SANTIN, M., M. A. WASSALL, G. PELUSO a S. P. DENYER. Adsorption of α -1-microglobulin from biological fluids onto polymer surfaces. *Biomaterials* [online]. 1997, **18**(11), 823–827. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(97)00004-5
- [78] SUZUKI, Haruo a Tomohiko TERADA. Removal of dodecyl sulfate from protein solution. *Analytical Biochemistry* [online]. 1988, **172**(1), 259–263. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(88)90440-X
- [79] *Vivaspin Turbo 4, 3 kDa, PES, 100 pc | Sartorius* [online]. [vid. 2020-05-25]. Dostupné z: <https://www.sartorius.com/shop/ww/en/usd/applications-laboratory-filtration-ultrafiltration/vivaspin-turbo-4%2c-3-kda%2c-pes%2c-100-pc/p/VS04T92>