



Funkcionalizace nanovláknenných a mikrovláknenných materiálů oxidem dusnatým

Diplomová práce

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





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Textile Engineering ■

Functionalization of nano and microfibrinous materials by nitric oxide

Master thesis

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



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Havlíčková**
Osobní číslo: **T15000132**
Studijní program: **N3106 Textilní inženýrství**
Studijní obor: **Netkané a nanovláknenné materiály**
Název tématu: **Funkcionalizace nanovláknenných a mikrovláknenných materiálů oxidem dusnatým**
Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

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

- 1) Vypracovat rešerši k zadanému tématu se zaměřením na problematiku studia oxidu dusnatého a jeho vlivu na lidský organismus.
- 2) Příprava nanovláknenných a mikrovláknenných vrstev PCL obsahujících donory oxidu dusnatého.
- 3) Sledování a studium kinetiky uvolňování oxidu dusnatého a testování zvlákněných materiálů In Vitro s endotelovými buňkami.
- 4) Diskuse a vyhodnocení dosažených výsledků a jejich porovnání s poznatky z rešeršní části práce.

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace

Rozsah pracovní zprávy: 40-60 dle potřeby

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

1. AL-SA'DONI, H., FERRO, A., (2000). S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. Chemical Science. Vol. 98, No. 5, pp. 507-520.
 2. KELM, M., (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. Vol. 1411, No. 2-3, pp. 273-289.
 3. NIMS, R. W., DARBYSHIRE, J. F., SAAVEDRA, J. E., CHRISTODOULOU, D., HANBAUER, I., COX, G. W., GRISHAM, M. B., LAVAL, F., COOK, J. A., KRISHNA, M. C., WINK, D. A., (1995). Colorimetric Methods for the Determination of Nitric Oxide Concentration in Neutral Aqueous Solutions. Methods. Vol. 7, No. 1, pp. 4854.
- WANG, P.G., CAI, T.B. & TANIGUCHI, N. eds., 2005. Nitric oxide donors: for pharmaceutical and biological applications [First edition]., Weinheim: Wiley-VCH Verlag. 390 pp. ISBN 3-527-31015-0.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Aleš Šaman

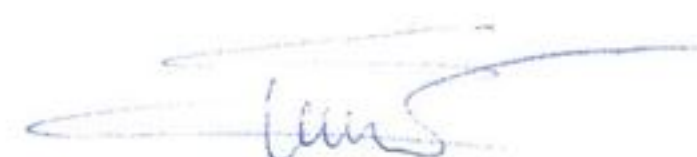
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce: **26. března 2016**

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



Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka



prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 26. března 2016

Prohlášení

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

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

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

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

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

Datum:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce Ing. Aleši Šamanovi za ochotu, trpělivost, odborné vedení a cenné rady při vypracování této práce. Své poděkování rovněž směřuji RNDr. Janě Horákové, Ph.D a dalším členům Katedry netkaných textilií a nanovlákných materiálů při Technické univerzitě v Liberci.

V neposlední řadě bych velmi ráda poděkovala mé rodině, především pak rodičům za vkládanou důvěru a podporu během studií.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo studium kinetiky uvolňování oxidu dusnatého z mikrovláknenných a nanovláknenných PCL vrstev, obsahujících různé koncentrace donoru oxidu dusnatého, kterým byl S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAPs). Kinetika uvolňování NO byla sledována nejen vlivem prosté difuze, ale i během enzymatické degradace, zprostředkované pomocí lipázy. Vyhodnocení probíhalo za pomoci Griess assay, metody schopné detekovat oxid dusnatý, uvolňovaný ze vzorků. Další část práce byla zaměřena na *In Vitro* testování zvlákněných PCL materiálů, modifikovaných SNAPs, s endotelovými buňkami a zhodnotit vliv oxidu dusnatého na tyto buňky.

Klíčová slova: Oxid dusnatý, Griessův test, donory oxidu dusnatého, SNAPs, kinetika uvolňování NO, elektrostatické zvláknění

ABSTRACT

The aim of this work was study of nitric oxide release kinetics from microfibre and nanofibre polycaprolactone (PCL) layers containing various concentrations of nitric oxide (NO) donor which was S-nitroso-N-acetylpenicillin (SNAPs). NO release kinetics was monitored not only by simple diffusion but also during lipase-mediated enzymatic degradation. The evaluation was performed by using Griess assay, a method capable of detecting nitric oxide released from the tested samples. Another part of the work was focused on the *In Vitro* testing of electrospun fibers modified by SNAPs with endothelial cells and to evaluate the effect of nitric oxide on these cells.

Key words: Nitric oxide, Griess assay, Nitric oxide donors, SNAPs, NO release kinetics, electrospinning

OBSAH

Úvod.....	14
Teoreticko-rešeršní část	16
1 Tkáňové inženýrství v regenerativní medicíně	16
1.1 Nanovláknenné scaffoldy	17
1.2 Systémy cílené dopravy léčiv	19
1.2.1 Příprava DDS.....	19
1.2.1.1 Funkcionalizace povrchu nosiče aktivní látkou.....	20
1.2.1.2 Princip enkapsulace aktivní látky	21
1.2.2 Drug delivery carries	22
1.2.2.1 Polymerní nanočástice	23
1.2.3 Kinetika uvolňování inkorporovaných látek	25
1.2.4 Kvantitativní stanovení uvolňování začleněných látek	26
1.2.4.1 Spektrofotometrie	27
2 Elektrostatické zvlákňování	29
2.1 Princip elektrostatického zvlákňování.....	29
2.2 Parametry elektrostatického zvlákňování.....	29
3 Oxid dusnatý	31
3.1 Syntéza NO.....	32
3.2 Detekce NO	34
3.2.1 Metody založené na měření absorbance.....	34
3.2.1.1 Griess assay.....	35
3.2.2 Fluorescenční metody.....	37
3.2.3 Chemiluminiscenční metody	38
3.3 Donory NO	39
3.3.1 Přímí dárči NO	39

3.3.1.1	Diazeniumdioláty.....	39
3.3.1.2	S-nitrosothioly.....	40
3.3.2	Donory vyžadující metabolické reakce	42
3.4	Chemická biologie NO – cytotoxické vs. cytoprotektivní účinky.....	43
3.5	Metabolismus NO a jeho transformace v lidském těle.....	44
3.5.1	Metabolismus NO a N-oxidů v dýchacích cestách.....	45
3.5.2	Metabolismus NO a N-oxidů v krvi	46
3.5.3	Metabolismus NO a N-oxidů v moči.....	47
3.6	Aplikace oxidu dusnatého v biomedicině a tkáňovém inženýrství	47
3.6.1	NO pro kvalitnější hojení ran	47
3.6.2	NO pro kardiovaskulární aplikace	48
	Experimentální část.....	50
4	Příprava materiálů	52
4.1	Syntéza SNAPs.....	52
4.2	Příprava roztoků PCL	53
4.3	Elektrostatické zvlákňování.....	53
4.4	Sterilizace materiálů	56
4.4.1	Sterilizace ethylenoxidem	56
4.4.2	Sterilizace ethanolem.....	56
5	Studium kinetiky uvolňování NO	58
5.1	Griess assay	58
5.1.1	Metodika reakce	58
5.1.2	Stanovení kalibračních křivek	60
5.2	Kinetika uvolňování NO vlivem difuze.....	61
5.2.1	Kinetika uvolňování NO se zohledněním vlivu sterilizace	61
5.2.2	Kinetika uvolňování NO z nesterilních materiálů	65

5.2.3	Kinetika uvolňování NO ze sterilních materiálů (ethylenoxid).....	67
5.3	Stanovení kinetiky uvolňování NO během degradace PCL materiálů	69
6	Biologické testování PCL vlákných vrstev, modifikovaných pomocí SNAPs	77
6.1	<i>In vitro</i> testování materiálů s endotelovými buňkami	77
6.2	Testování cytotoxicity SNAPs.....	84
6.2.1	Testování cytotoxického účinku SNAPs na endotelové buňky.....	84
6.2.2	Testování cytotoxického účinku SNAPs na trombocyty	86
6.3	Testování trombogenicity materiálů s obsahem SNAPs	88
7	Závěr	92
	LITERATURA	95

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A</i>	Absorbance [-]
<i>b</i>	Tloušťka absorpčního prostředí [m]
<i>c</i>	Látková koncentrace [mol·l ⁻¹]
<i>Ca²⁺</i>	Ionty vápníku
<i>CaM</i>	Kalmodilin
<i>DAFs</i>	Diaminofluoresceiny
<i>DEA/NO</i>	Diethylamin/NONOate
<i>DDS</i>	Drug Delivery Systém/Systém cílené dopravy léčiv
<i>EC</i>	Endotelové buňky
<i>ECM</i>	Extracelulární matrix
<i>EDRF</i>	Endothelium derived relaxing factor
<i>eNOS</i>	Endoteliální NOS
<i>FM</i>	Fluorescenční mikroskopie
<i>GSNO</i>	S -nitrosoglutathione
<i>HBO₂</i>	oxyhemoglobin
<i>HCPL</i>	Vysoce účinná gelová cgmomatografie
<i>H₂O₂</i>	Peroxid vodíku
<i>iNOS</i>	Indukované NOS
<i>IR</i>	Infračervené
<i>ISMM</i>	Isosorbid mononitrát
<i>JS-K</i>	O ₂ -(2,4-Dinitrophenyl)1-[(4-ethoxycarbonyl)piperazin-1-yl]diazon-1-ium-1,2-diolate
<i>MTT</i>	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid; barvivo
<i>MetHb</i>	Methemoglobin

<i>MnMb</i>	Mangan myoglobinu
<i>MOFs</i>	Organokovové struktury (Metal-organic frameworks)
<i>mPEG</i>	Methoxypoly(ethyleneglykol)
<i>NaCl</i>	Chlorid sodný
<i>NADPH</i>	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<i>NEDD</i>	N-(1-naftyl)ethylendiamin dihydrochlorid
<i>NMP</i>	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidone
<i>NO</i>	Oxid dusnatý
<i>NO₂</i>	Oxid disičitý
<i>nNOS</i>	Neurální NOS
<i>NOS</i>	Syntáza oxidu dusnatého
<i>NONOates</i>	Diazeniumdioláty
<i>NPA</i>	NAftalamid
<i>O₂</i>	Kyslík
<i>O₃</i>	Ozon
<i>ONOO⁻</i>	Peroxinitril
<i>PBS</i>	Fosfátový pufr (pH=7,4)
<i>PCL</i>	Polykaprolakton
<i>PEG</i>	poly(ethyleneglykol)
<i>PGA</i>	Polyglykolid
<i>PHB</i>	Polyhydroxybutyrát
<i>PLA</i>	Polylaktid
<i>PLGA</i>	Poly(laktid-co-glykolid)
<i>POEGMA-b-PVBA</i>	(polyoligo[ethyleneglykol]methyethermethakrylát-b-poly[3-vinylbenzaldehyd])

<i>PROLI/NO</i>	<i>l</i> -(hydroxy-NNO-azoxy)- <i>L</i> -proline, dvojsodná sůl
<i>PVA</i>	Polyvinylalkohol
<i>PVB</i>	Polyvinylbutyral
<i>SA</i>	Kyselina sulfanová
<i>SULF</i>	Sulfanilamid
<i>SeDPA</i>	Kyselina 3,3-diselenodipropionická
<i>SEM</i>	Rastrová elektronová mikroskopie
<i>SMC</i>	Hladkosvalové buňky
<i>SNAP</i>	<i>S</i> -Nitroso- <i>N</i> -acetyl- _{D,L} -penicillamin
<i>SNVP</i>	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -valerylpenicillamin
<i>SPER/NO</i>	Spermin/NONOate
<i>THOMS</i>	Tetramethylorthosilikát
<i>UV</i>	Ultrafialové záření
<i>VIS</i>	Viditelné záření
<i>V-PYRRO/NO</i>	1-[(Ethenyloxy)-NNO-azoxy]-pyrrolidin
α	Molární absorpční koeficient [$1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
ε	Dekadický molární absorpční koeficient [$1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
τ	Transmitance [-]
ϕ	Výstupní intenzita světla [W]
ϕ_0	Vstupní intenzita světla [W]

ÚVOD

Tkáňové inženýrství a regenerativní medicína jsou v současné době velmi rozvíjejícími se obory, neboť neustálé zvyšování úrovně poskytované zdravotní péče a životních standardů vede k prodlužování délky lidského života a celkovému stárnutí populace. V důsledku toho je kladen velký důraz na obnovu a regeneraci poškozených tkání. Výzkum je tedy směřován především na vývoj vhodných tkáňových nosičů (scaffoldů) pro dané typy tkáně. Velká pozornost je proto věnována vlákněným materiálům, jejichž vlákna dosahují nejlépe submikronových rozměrů, kdy průměr vláken tedy zpravidla nepřesahuje 1 μm . Zároveň je kladen důraz na kombinaci těchto materiálů s přídatnými faktory či aktivními látkami (léčiva, růstové faktory, proteiny, ad.), tedy s prostředky, pozitivně ovlivňujícími proliferaci, diferenciaci, růst buněk, a zároveň potlačujícími negativní reakce během interakce buněk se scaffoldem a okolními nativními tkáněmi. Účinností, efektivitou a kinetikou uvolňování těchto začleněných aktivních látek se blíže zabývá problematika Drug Delivery System neboli cílená doprava léčiv.

Jednou z aktivních látek, kterou je možné funkcionalizovat nanovlákněné či mikrovlákněné scaffoldy, je oxid dusnatý (NO), který v lidském organismu zastává roli buněčné signální molekuly a účastní se řady fyziologických a patofyziologických procesů. Mezi jeho významné funkce patří vazodilatace, snižování agregace krevních destiček, snižuje adhezi monocytů, které se posléze formují do makrofágů a účastní se zánětlivých reakcí, podporuje proliferaci celé řady buněk a stojí také za správnou funkci imunitního systému, nervového systému a podporuje hojení ran. Nicméně přesné buněčné odezvy jsou odlišně regulovány vlivem specifické koncentrace NO, a zároveň jsou ovlivněny místem jeho uvolňování, tedy na jaké buňky konkrétně působí.

Cílem této práce proto bylo vypracovat rešerši se zaměřením na problematiku oxidu dusnatého, jeho vlivu na lidský organismus a jeho potenciální aplikace v tkáňovém inženýrství (viz teoreticko-rešeršní část práce).

Experimentální část práce pak byla zaměřena na studium kinetiky uvolňování NO z mikrovlákněných a nanovlákněných elektrostaticky zvlákněných PCL vrstev, jež byly obohaceny donorem NO, S-nitroso-N-acetylpenicillaminem (SNAPs). Bylo

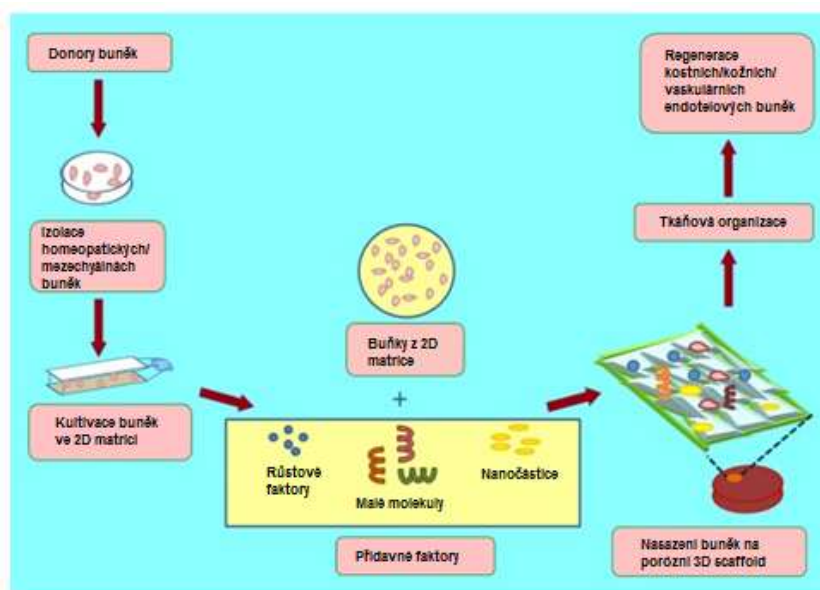
pozorováno uvolňování NO z testovaných vzorků vlivem difuze, a zároveň i vlivem enzymatické degradace materiálů, která byla vyvolána pomocí lipázy. Stanovení koncentrace uvolňovaného NO potom probíhalo vlivem Griess assay, což je metoda, která dokáže detekovat NO a stanovit koncentraci NO, uvolňovaného ze vzorků. Další významnou částí bylo *In vitro* testování zvlákněných PCL materiálů s endotelovými buňkami a následné zhodnocení vlivu uvolňovaného NO na tyto buňky.

TEORETICKO-REŠERŠNÍ ČÁST

1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ V REGENERATIVNÍ MEDICÍNĚ

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor. Vhodně kombinuje a aplikuje principy inženýrství a dalších vědních oborů (biologie, chemie, fyziky) za účelem vývoje biologických náhrad, které zlepšují, podporují či zcela obnovují funkci tkání, případně celých orgánů. (Howard et al. 2008)

Obrázek 1 zachycuje proces tkáňového inženýrství. Zde je možné vidět jednotlivé kroky přípravy biologické náhrady, až po její implantaci do těla pacienta. Nejprve dochází k odebrání buněk od recipienta či dárce, následuje izolace požadovaných buněk a jejich kultivace. Dalším krokem je nasazení izolovaných buněk a přídavných faktorů (růstové faktory, nanočástice, léčiva) na předem vytvořený podpurný nosič (dále již scaffold), kde probíhá kultivace buněk. Poslední fází je implantace, buňkami osazeného scaffoldu, do těla pacienta. (Singh et al. 2016) Druhou možností je pouze vytvoření vhodného scaffoldu (s aktivními látkami) a jeho vložení do těla pacienta, přičemž k regeneraci poškozené tkáně dochází vlivem prorůstání buněk do scaffoldu z okolních zdravých tkání. V tomto případě tedy není nutná izolace buněk pacienta či dárce a jejich následná kultivace, ale vložení neosázeného scaffoldu rovnou do těla pacienta.



Obr. 1: Schéma procesu tkáňového inženýrství. Převzato z: (Singh et al. 2016)

Tkáňové inženýrství tedy typicky zahrnuje tři klíčové aspekty, a to vhodný scaffold, buňky a biochemické či biologické podněty. Scaffoldy obecně slouží jako podpora při růstu tkání, zároveň se stávají nosičem pro bioaktivní faktory. Ty je nutné během regenerace tkání dodávat, neboť podporují interakci buněk se scaffoldem, potažmo s okolními tkáněmi, dále stimulují migraci buněk, jejich růst a diferenciaci. Dále zabezpečují požadovanou integraci buněk dovnitř nosiče. Zároveň napomáhají snížit riziko vniku zánětlivých nebo jiných nežádoucích reakcí, tedy reakcí organismu, bránícího se vůči implantovanému materiálu. (Dahlin 2011) Modifikující faktory – signální molekuly, které jsou začleňovány do scaffoldů, lze široce rozdělit do překrývajících se kategorií mitogenů (stimulujících buněčné dělení), růstových faktorů (biologické proteiny a DNA, které napomáhají proliferaci), léčiv o nízké molekulové hmotnosti a morfogenů (kontrola generujících se tkání). (Howard et al. 2008, Lee et al. 2011). Pro zvýšení regenerace a biologické dostupnosti obnovujících se tkání uvnitř scaffoldu, musí být aplikované dávky, takovýchto biologických faktorů o mnohonásobně vyšší koncentraci, než se běžně vyskytují v organismu. (Mikos et al. 2006)

1.1 Nanovláknenné scaffoldy

Scaffoldy jsou trojrozměrné struktury, které v ideálním případě podporují regeneraci a růst nových buněk a poskytují jim odpovídající mechanickou oporu. (Rana et al. 2015) Nanovláknenné scaffoldy, jak již poukazuje sám název, sestávají z vláken o poloměru menším než 1000 nm. Nicméně často jsou tímto názvem označovány i scaffoldy, jejichž poloměry dosahují i desítek μm .

Běžně využívané techniky zpracování polymerů se potýkají s potížemi ve snaze vytvořit vlákna o průměru menším než 10 μm . Z tohoto důvodu byly vyvíjeny způsoby přípravy nanovláken za účelem adekvátní simulace geometrie extracelulárního matrixu. V současné době je proto pro výrobu nanovláknenných scaffoldů nejvíce využíváno následujících tří metod: „samovystavba“, fázová separace a elektrostatické zvlákňování. (Barnes 2007). Nosiče je však možné připravovat celou řadou dalších metod, např. tvorbou hydrogelu síťováním, vysoušením mrazem, zpěňováním, loužením solí, a v neposlední řadě, velmi rychle se rozvíjející technologií 3D tisku (rapid prototyping).

Bez ohledu na výrobní technologii je na scaffoldy kladeno několik požadavků, které hrají klíčovou roli v navržení a stanovení vhodného scaffoldu pro danou aplikaci, posléze tedy pro zajištění správné funkce podpůrného nosiče a regeneraci poškozené tkáně. Prvním důležitým aspektem je cytokompatibilita scaffoldu, materiál tedy nesmí negativně ovlivňovat základní funkce buněk, jejich migraci a proliferaci. Nesmí tedy v žádném případě působit toxicky a vyvolávat imunitní reakci (případně minimální), aby nedocházelo k apoptóze buněk nebo silným zánětlivým reakcím. Dalším požadavkem může být, ovšem v závislosti na aplikaci nemusí, biodegradabilita nosiče, tedy jeho biologický rozklad po obnově poškozených tkání. Scaffold, u kterého požadujeme jeho rozklad po obnově poškozených tkání, musí být biologicky odbouratelný, aby buňky mohly produkovat svůj vlastní ECM, přičemž vedlejší produkty této degradace musejí být opět zcela netoxické. Rychlost degradace polymerního scaffoldu by měla odpovídat rychlosti obnovy nových tkání a nosič by měl být odbouráván pozvolna. Důležitými parametry jsou též mechanické vlastnosti podpůrných skeletů, které se liší s anatomickým umístěním implantovaného scaffoldu. Obecně však musí scaffoldy vykazovat dostatečnou mechanickou odolnost a pevnost, a to od počátku implantace až po dokončení procesu remodelace tkáně, tak aby byl zachován předem definovaný tvar nově vznikající tkáně. Důležité je zachování rovnováhy mezi mechanickými vlastnostmi scaffoldů a jejich vysoce porézní strukturou. Vysoká pórovitost a obrovský specifický povrch umožňují a usnadňují uchycení buněk na povrchu nosiče a následnou proliferaci buněk do hloubky nosiče, stejně jako difúzi živin, potřebných pro růst buněk, a také difúzi odpadních produktů, vznikajících degradací scaffoldu. Mimo dostatečné pórovitosti, je důležitým parametrem velikost pórů, ty musejí být dostatečně velké, tak aby jimi buňky byly schopny migrovat, ale dostatečně malé, aby vytvářely dostatečně vysoký měrný povrch. (Barnes 2010, Ma 2004)

Dalším podstatným kritériem při výrobě nanovlákných nosičů, které výrazně ovlivňují všechna kritéria popsaná výše, je volba materiálu, ze kterého má být scaffold zhotoven. V tkáňovém inženýrství je využíváno biomateriálů, které lze rozdělit do tří skupin: přírodní polymery, syntetické polymery a keramické materiály. Pro výrobu nanovlákných scaffoldů je v současné době nejvíce využíváno alifatických

polyesterů, mezi něž patří PGA, PLA, PLGA, PCL, PHB a další. (Gunatillake a Adhikari 2003)

1.2 Systémy cílené dopravy léčiv

V literatuře spíše označováno pojmem *Drug delivery systems* (dále jen DDS). Vývoj těchto systémů začal na základě jisté nedokonalosti konvenční léčby orálními léčivými složkami, ve smyslu poskytování prostorově či časově řízeného uvolňování léčivých složek, což způsobuje nespočet vedlejších účinků. Konvenční aplikace léků jsou charakterizovány omezenou účinností, nedokonalou distribucí a nedostatečnou selektivitou. Výše uváděné omezení byla překonána s nástupem DDS, neboť tyto systémy představují velice inteligentní technologii, dokáží přepravovat a aplikovat vhodné medikamenty na požadované místo, a tím zcela minimalizují nežádoucí účinky a negativní dopad léčiv na okolní tkáň, případně celý organismus, jako je tomu právě u orálních léčiv. Navíc DDS poskytují léčivu ochranu před příliš brzkým uvolněním, a tím tedy významně prodlužují působení léčiv, v řádech několika hodin až měsíců, především díky pozvolné degradaci polymeru, v němž je léčivá složka vhodným způsobem ukotvena, zapouzdřena či jinak vázána, zároveň zvyšují léčebné účinky. (Wilczewska et al., 2012, Bock et al. 2012)

Velikost částic může být v závislosti na aplikaci různá, pohybuje se od desítek nm až po více než 100 μm . Důležitý je též tvar částic, který nemusí být nutně sférický. S oběma parametry samozřejmě souvisí odlišné kinetiky a statistiky uvolňování léčiv. Zároveň tyto parametry ovlivňují biodistribuci nanočástic, především pak velikost nanočástic léčiva může hrát klíčovou roli v mechanismu průchodu skrze buněčnou membránu do buňky (Janssen et al. 2014, Canelas et al. 2010)

1.2.1 Příprava DDS

Příprava DDS spočívá v uložení aktivní látky (léčiv, růstových faktorů, proteinů, enzymů, ad.), v zahraniční literatuře označováno jako *drug loading*, na povrch či dovnitř vybraných nosičů (drug delivery carriers). Množství a způsob uložení aktivní látky na povrch/do nosičů, tedy interakce mezi vybranou aktivní látkou a nosnou maticí, je významným faktorem v následném procesu dodávání těchto látek. (Daniel 2012)

Loading aktivní látky lze provést celou řadou způsobů, obecně však lze proces rozdělit na dvě hlavní větve. První z nich je funkcionalizace povrchu nosné matrice, kde nejprve dochází k modifikaci povrchu matrice a posléze se uplatňuje kovalentní či nekovalentní navázání aktivní látky na povrch matrice. Druhou možností je enkapsulace aktivní látky dovnitř matrice. (Daniel 2012)

1.2.1.1 Funkcionalizace povrchu nosiče aktivní látkou

Funkcionalizací povrchu je myšlena modifikace povrchu před samotným zachycením ligandu, atomu či molekuly, poskytující jeden nebo více elektronových párů centrálnímu atomu. Nejjednodušší a nejčastější je modifikace, prováděná u polymerních matic, tedy syntetických a přírodních, které jsou na základě medicínských požadavků nejběžněji využívány. Pro uchycení aktivní látky na modifikovaném povrchu nosné matrice, je využíváno chemické či fyzikální konjugace, tedy interakce elektronů z volného elektronového páru, poskytovaného ligandem, s elektrony. Tato metoda je založena na chemických vlastnostech a na vysoké specifické ploše povrchu nosné matrice. (Werengowska-Ciećwirz et al. 2015)

Konjugací funkčních skupin s aktivní látkou dochází k tvorbě kovalentních vazeb mezi maticí a ligandem, tyto vznikající vazby nejčastěji probíhají na esterových, amidových nebo acetyl-hydrazonových skupinách. Esterová vazba je důsledek biokonjugace hydroxylové nebo primární aminové skupiny léčiva s karboxylovou nebo hydroxylovou skupinou polymerní matrice. Amidová vazba je vytvořena reakcí karboxylové skupiny s nukleofilem, který obsahuje primární amin. Acetyl-hydrazonová skupina je tvořena prostřednictvím konjugace karboxylové skupiny s hydrazidem. Další možnou kovalentní vazbou je sulfidická vazba, vznikající konjugací aminových a karboxylových skupin s thiolovými skupinami. (Werengowska-Ciećwirz et al. 2015)

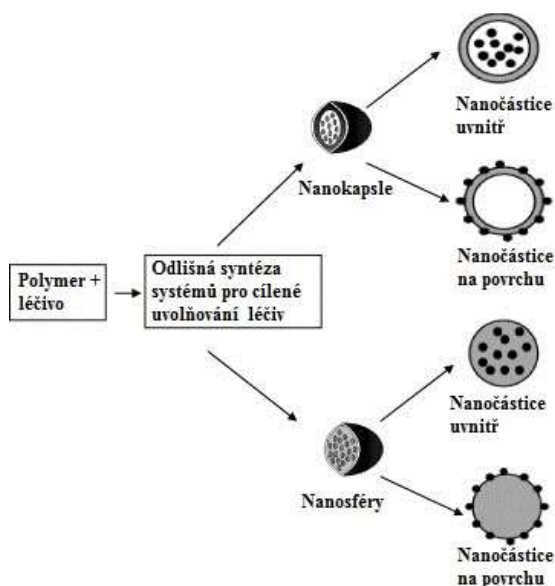
Navázání aktivní látky na povrch matrice lze docílit i metodou nekovalentních vazeb, tedy fyzikální adsorpcí, především pak elektrostatickými interakcemi mezi povrchem nosiče a aktivní látkou, případně chemickou imobilizací aktivní látky. Modifikace povrchu matic mohou probíhat pomocí plasmové úpravy, chemické metody (částečná hydrolýza biodegradabilních alifatických polymerů za kyselých či bazických podmínek) nebo roubování povrchu matrice vhodnými činidly (kyseliny,

zásady) pro vytvoření volných radikálů vlivem plazmatu či UV záření. Tyto úpravy vhodně přizpůsobí povrchovou adhezi a smáčecí vlastnosti matrice, případně je jimi dosaženo zavedení více funkčních skupin na povrchu matrice. (Yoo et al. 2009)

1.2.1.2 Princip enkapsulace aktivní látky

Enkapsulace je technologie, která zprostředkovává začlenění různých látek (pevných látek, kapalin, léků, bakteriálních a kmenových buněk) do nitra či na povrch nosné matrice. Je možné zapouzdřovat mikro- i nanočástice. Obě technologie se výrazným způsobem podílejí na vývoji a přípravě bioterapeutických aplikací, především pak na vývoji a přípravě DDS. (Tomaro-Duchesneau et al. 2013) Možný způsob zapouzdření/ukotvení aktivních sloučenin (léčiv) vykresluje obrázek 2, který představuje dvě možné varianty strukturálního uspořádání polymerních nanočástic, inkorporovaných uvnitř nebo vázaných na povrchu polymerní matrice. Schematicky tak ukazuje tvorbu nanokapslí a nanosfér.

Rozdíl mezi nanosférou a nanokapslí je následující, nanosféra má vždy strukturu matrice, kdy léčiva jsou začleněna uvnitř matrice nebo jsou absorbována či jinak vázána na povrchu matrice. Naproti tomu nanokapsle jsou jakési vezikulární systémy, kde je léčivo uzavřeno v jádru (dutině), které je následně obaleno polymerní membránou. (Reis et al. 2005)



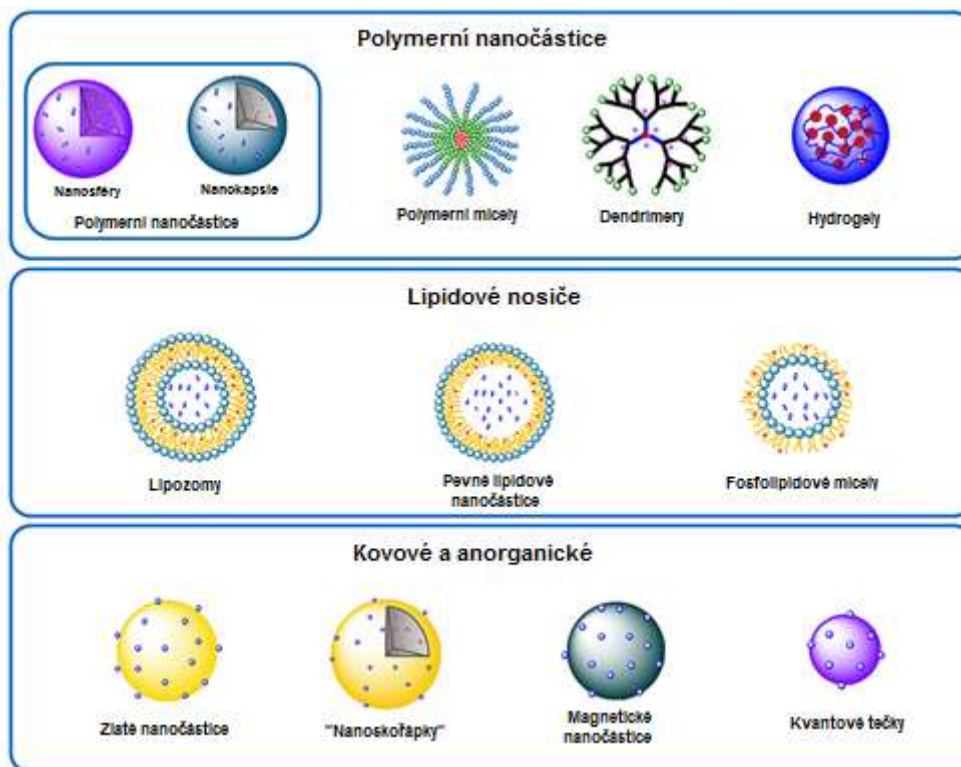
Obr. 3: Schématické zobrazení tvorby nanokapslí a nanosfér. Převzato z (Kumari et al. 2010)

Inkorporaci nanočástic je možné provádět třemi různými metodami, fyzikální, chemickou a polymerační. Fyzikální metoda zahrnuje tvorbu nanočástic procesem potahování (Pan coating, Air-suspension coating), odstředivým vytlačováním, principem Spray-Drying (electrospraying) či koaxiálním zvlákňováním (jedná se ovšem o inkorporaci částic do vláken, nikoli kapslí). Chemická metoda umožňuje tvorbu nanočástic emulgací a odpařováním/extrakcí rozpouštědla z polymerního roztoku, který následně tvoří obal kapsle. Případně metodou nanoprecipitace (srážením) kapek organické fáze (polymer rozpuštěný v rozpouštědle mísitelného s vodou). Polymerační metoda potom zahrnuje tvorbu nanočástic vlivem mezifázové polymerace, *In situ* polymerace a matrix polymerace. (Shekhar et al. 2010, Masood et al. 2016)

Pomocí těchto metod lze syntetizovat širokou škálu nano/mikročástic, které mají různou formu a uspořádání, např. částice ve formě jádro/plášť, několikastěnné a vícejaderné částice nebo částice s nepravidelným tvarem. Metoda výroby nanočástic a jejich začlenění v polymerním matrixu jednoznačně ovlivňuje výsledné vlastnosti a chování během aplikace v organismu.

1.2.2 Drug delivery carries

DDS mohou mít odlišnou strukturu a morfologii, to je dáno především typem nosiče, který následně poskytuje odlišné vlastnosti, rozličný obsah účinné látky, různou délku uvolňování a odezvu na fyziologické prostředí. Nejčastěji využívané struktury pro DDS zachycuje obrázek 2. (Janssen et al. 2014) Lze je rozdělit do několika skupin: na polymerní nosiče (polymerní mikro/nanočástice, mikro/nanokapsule, micely, dendrimery, hydrogely, polymerní konjugáty léčiv), lipidové nosiče (liposomy, lipidové micely, pevné nanočástice liposomů), kovové a anorganické nanostrukturní nosiče (zlaté/magnetické nanočástice, zlaté „nanoskořápky“, fullereny či kvantové tečky). (Pathak a Thassu 2009) Mezi nejvyužívanější nosiče aktivních látek potom patří liposomy, micely, dendrimery a především polymerní nanočástice.



Obr. 2: Ukázka různých typů nosičů pro DDS. Převzato z: (Canniot et al. 2014)

1.2.2.1 Polymerní nanočástice

V oblasti nanomedicíny lze nanočástice definovat jako pevné koloidní supramolekulární struktury, vyrobené obvykle (ne nutně) z polymerů, které dosahují submikronových rozměrů (s výhodou pod 500 nm), mohou však dosahovat i několika mikrometrů, proto jsou v DDS termínem nanočástice, označovány všechny typy nosičů. V závislosti na způsobu výroby lze získat nanosféry nebo nanokapsle. (Couvreur 2013).

Léčivo může být absorbováno, zapouzdřeno nebo konjugováno uvnitř nebo naopak na povrchu polymerního matrixu, tvořícího sféry/kapsle. Polymerní matrix (jakási „skořápka“) poskytuje začleněnému léku ochranu proti rozkladu vlivem účinků tělesných enzymů a procesu difúze, hydrolýzy, enzymatické degradace, případně jejich kombinaci. (Masood et al. 2016) Materiály používané pro přípravu nanosfé/kapslí jsou nejčastěji polymery, buďto přírodní, kam spadají karbohydráty (agaróza, chitosan, starch, karagenan, amyllum), chemicky modifikované karbohydráty (polydextran, polyamyllum) a proteiny (albumin, želatina, kolagen). Nebo je využíváno polymerů syntetických, které je možno rozdělit na nedegradabilní (polymethylmetakrylát,

glycidylmetakrylát, epoxidové polymery) nebo degradabilní (laktidy, glykolidy a jejich polymery, polyakrylkyanoakryláty, polyanhydridy). (Namdev et al. 2015)

Polymerní nanočástice je možné, v současné době vlastně žádoucí, povrchově modifikovat za účelem zvýšení odolnosti nanočástic a doby cirkulace v krvi. Pro modifikaci je používáno hydrofilních, netoxických, s krví slučitelných polymerů, jako jsou např. PVA, PEG, mPEG a polysorbát. (Masood et al. 2016)

DDS, obsahující nanočástice, musí splňovat podmínky cytokompatibility, neměly by vykazovat toxické účinky pro organismus, způsobovat zánětlivé nebo alergické reakce. Samozřejmě by měly splňovat podmínku biodegradability, tak aby docházelo k řízenému uvolňování inkorporovaných léčivých složek na cíleném místě, přičemž degradace probíhá vlivem štěpení kovalentních vazeb působením biochemických faktorů lidského organismu. Studií týkajících se toxicity polymerních nanočástic pro DDS je obecně mnohem méně oproti studiím zabývajících se vývojem systémů pro cílenou dopravu léčiv, vylepšováním technologií zhotovování nosičů, vývoj nových léčiv a způsobů jejich zapouzdření a další modifikace pro zvýšení účinnosti. Přesto *De Jong a Borm (2008)* předkládají svoji studii, ve které varují před možným nebezpečím, které mohou polymerní nanočástice, jakožto DDS představovat. Zároveň však nevyvracejí jejich potenciál, pouze poukazují na oblasti, na které by se měli další výzkumy zaměřit. Především na konkrétnější cílení a dodávku léčiv, zvýšení bezpečnosti a biokompatibility DDS, používání bezpečnějších léčiv a jejich rychlejší vývoj. *Voigt et al. (2014)* svou studií toxicity polybutylkyanoakrylátových nanočástic situaci uklidňuje, během jeho studie nebyla prokázána výrazná známka toxicity, použité nanočástice nevyvolávaly úmrtí testovaných buněk a polybutylkyanoakrylátové nanočástice tedy byly shledány jako netoxický nástroj pro podávání léčiv. Nicméně testy toxicity a cytokompatibility je nutné provádět u všech nově vyvíjených materiálů, protože různé kombinace zvolených polymerů (matrice), účinných látek (léčiv) a v neposlední řadě místo aplikace mohou bezpochyby vlivem degradace a postupným uvolňováním léčivých, ale i odpadních složek, způsobovat nežádoucí reakce v okolních tkáních, potažmo celém organismu.

1.2.3 Kinetika uvolňování inkorporovaných látek

I přes rychlý a rozsáhlý vývoj nosičů s enkapsulovanými látkami, určenými k jejich cílenému dodávání a postupnému uvolňování, je právě problematika uvolňování a kinetika uvolňování začleněných látek stěžejní pro vývoj a zdokonalování DDSs. Jedná se ovšem o natolik složitou problematiku, že v současné době stále není zcela pochopena a objasněna a je předmětem celé řady studií zabývajících se výzkumem a vývojem systémů pro cílenou dopravu léčiv s řízeným uvolňováním.

„Uvolňování léku“ (drug release) označuje proces, ve kterém dochází k rozpuštění léku, který následně migruje z výchozí polohy v polymerním systému na jeho vnější povrch, proces označovaný jako difuze. Na povrchu pak dochází k pozvolnému rozpouštění a uvolňování léčiva do uvolňovacího média (krev, tělesné tekutiny). Je-li ukotven pouze na povrchu, dochází pouze k rozpuštění a následnému uvolnění léku. Tento zdánlivě jednoduchý proces je ovšem ovlivněn řadou složitých faktorů, jako jsou fyzikálně-chemické vlastnosti rozpuštěných látek, strukturální uspořádání nosiče, prostředí, kam je lék aplikován, interakce organismu s DDS, potažmo uvolněnou látkou, a také kombinace výše zmíněných faktorů. Podrobnější přehled faktorů ovlivňujících kinetiku uvolňování léčiva poskytuje obrázek 4. (Fu a Kao 2011)



Obr. 4: Faktory ovlivňující kinetiku uvolňování léčiva z polymerního nosiče. Převzato z:
(Fu a Kao 2011)

Obecně platí, že hnacími silami transportu rozpuštěných léčivých látek z polymerní matrice je difúze rozpuštěné látky, bobtnání polymerní matrice a degradace materiálu, jedná-li se o matrici z degradabilního polymeru. Biodegradabilní polymery obsahují labilní vazby (esterové, amidové, anhydridové), které jsou náchylné k hydrolyze nebo enzymatické degradaci. Degradace polymerní matrice může být dvojího typu, povrchová či hloubková (celodegradace materiálu). Povrchová degradace je omezena pouze na vnější povrch polymerního nosiče, kdežto u hloubkové dochází k degradaci rovnoměrně v celém objemu nosiče. Degradace vede k odštěpování polymerního řetězce, tím dochází ke změně molekulové hmotnosti polymeru, což může být použito pro kvantifikaci procesu degradace v závislosti na čase pomocí gelové permeační chromatografie. (Fu a Kao 2011)

U nedegradabilních polymerních systémů dochází k transportu rozpuštěné látky vlivem řízené difuze. Nosiče léčiv, vyrobené z biologicky neobdouratelných polymerů, jsou povětšinou ve formě nano/mikro kapslí, tedy systému typu „reservoár“, kdy jádro, uvnitř něhož se nachází léčivo, je obaleno/potaženo polymerním filmem. Tento materiál, formující kapsli, funguje jako membrána, která následně řídí rychlost uvolňování. Rychlost uvolňování je potom relativně konstantní a není ovlivněna koncentračním gradientem, ale pravděpodobněji souvisí s tloušťkou a propustností polymerní membrány. (Fu a Kao 2011)

1.2.4 Kvantitativní stanovení uvolňování začleněných látek

Při studiu uvolňování aktivních látek z nosičů je stěžejní určit rychlost uvolňování a především množství uvolněné látky. Pro tento účel je možné využít řadu metod, kdy prvním přístupem může být kvantitativní chemická analýza, jejímž cílem je stanovit množství složek určité látky. Tento přístup lze rozdělit do dvou skupin, tedy metody chemické a fyzikální. Principem chemických metod je chemická reakce zjišťované látky a vhodného činidla, což vede k převedení zjišťované látky ve stálou a přesně definovanou sloučeninu. Tuto metodu lze dále rozdělit na volumetrii a titraci, tedy vážkovou a odměrkovou analýzu. Principem fyzikálních metod je stanovení určitých fyzikálních vlastností látek, kdy je možné mezi vybranou fyzikální vlastností a množstvím látky matematicky vyjádřit určitý vztah. Do této kategorie řadíme metody založené na absorbanci nebo odrazu světla, způsobené průchodem světelného paprsku

zkoumaným roztokem. Dále do této skupiny řadíme metody založené na principu excitace sekundárního záření, tedy fluorescenční a fosforescenční přístupy. Další podstatnou metodou je spektrofotometrie, tedy metoda principiálně založená na rozkladu světla při současné absorpci VIS, UV, IR světla (Tomíček 1958).

1.2.4.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je v současné době běžná metoda pro stanovení koncentrace, potažmo obsahu látky v daném proměřovaném roztoku. Využívá se skutečnosti, že řada látek je schopna absorbovat elektromagnetické záření ve viditelné či ultrafialové části spektra (méně často infračervené záření). Podstatou metody je, že každá sloučenina pohlcuje světlo různých vlnových délek (tedy absorpční spektrum), přičemž míra pohlceného světla závisí na struktuře sloučeniny. Množství světla určité vlnové délky, které absorbuje látka (např. rozpuštěná v roztoku), je závislá na koncentraci látky. Jistou podmínkou pro použití spektrofotometrické metody za účelem stanovení množství zvolené látky, je možnost převedení vybrané látky do formy roztoku. Pokud je spektrofotometrické proměření prováděno ve viditelné oblasti, je nutné, aby daná stanovená látka byla barevná, naopak prostředí, kterým bude procházet světlo, bylo průhledné, tak aby selektivní absorpce světla vlivem průchodu skrze roztok nezměnila vlnovou délku, ale jen intenzitu. (Kříženecká a Synek 2014)

Spektrofotometrie využívá Lambert-Beerova zákona, který určuje absorbanci. Ta je závislá na celkovém počtu absorbujících částic, interagujících se svazkem paprsků, tloušťce absorbujícího prostředí, kterým prochází záření. Je také přímo úměrná koncentraci roztoku. (Kříženecká a Synek 2014)

Pro konečnou tloušťku absorbující vrstvy platí

$$\phi = \phi_0 e^{-\alpha b}, \quad (1)$$

kde ϕ je výstupní intenzita světla, ϕ_0 je vstupní intenzita světla, α je absorpční molární koeficient, b je tloušťka absorpčního prostředí.

Nebo lze užít vztahu

$$\tau = \frac{\phi}{\phi_0} = e^{-\alpha b} = 10^{-\varepsilon b}, \quad (2)$$

kde τ je transmitance, ϕ je výstupní intenzita světla, ϕ_0 je vstupní intenzita světla, α je absorpční molární koeficient, b je tloušťka absorpčního prostředí a ε je dekadický molární absorpční koeficient.

Absorbance je poté dána následujícím vztahem

$$A = -\log \frac{\phi}{\phi_0} = -\log \tau = \varepsilon bc \quad (3)$$

kde A je absorbance, τ je transmitance, ϕ je výstupní intenzita světla, ϕ_0 je vstupní intenzita světla, α je absorpční molární koeficient, b je tloušťka absorpčního prostředí, ε je dekadický molární absorpční koeficient c látková koncentrace. (Kříženecká a Synek 2014)

Spektrofotometrie je pro stanovování uvolňování inkorporovaných látek poměrně využívaná, pro vyhodnocování byla použita v celé řadě studií a experimentů. Je to dáno její rychlostí a poměrně velkou přesností. Navíc ji lze využít i v případě určování látky, jejíž koncentrace v roztoku je velice malá.

2 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ

Způsob použití elektrostatických sil pro tvorbu velmi jemných vláken je znám již více než 100 let. Elektrostatické zvlákňování se ukázalo jako poměrně jednoduchá metoda pro vytvoření submikronových vláken, zpravidla o průměrech pohybujících se mezi 100 nm až 1 μm . Není však výjimkou, že vlákna dosahují průměrů i několika μm . Nanovláknenné struktury se vyznačují velkým specifickým povrchem, vysokou pórovitostí, ovšem s malou velikostí pórů, což tyto materiály staví do popředí zájmu pro nespočet aplikací. Touto metodou lze připravit vlákna z různých polymerů, přírodních, syntetických i polymerů, obsahující nejrůznější příměsi v závislosti na použití a požadovaných vlastnostech. (Haighi 2012).

2.1 Princip elektrostatického zvlákňování

Princip elektrostatického zvlákňování (electrospinningu) využívá rozdílného elektrického potenciálu mezi polymerním roztokem/taveninou a sběrným kolektorem. Použitím zdroje vysokého napětí, dochází k vhánění náboje určité polarity do polymerního roztoku či taveniny, ty jsou následně přitahovány vlivem elektrického potenciálu, vznikajícího mezi kapilárou a kolektorem. Rozdíl elektrických potenciálů způsobuje silnou přitažlivost mezi kapalinou a kolektorem a vlivem elektrostatických odpudivých sil mezi stejně nabitými částicemi kapaliny dochází k deformaci kapaliny a tvorbě Taylorova kužele. V okamžiku, kdy je překonána prahová hodnota napětí, elektrostatické síly překonají povrchové napětí kapičky polymeru, a jeden nebo dva nabitě proudy kapaliny jsou vytahovány z Taylorova kužele. Tyto vláknenné proudy prochází atmosférou, což umožňuje odpaření rozpouštědla a následné ukládání pevných polymerních vláken na kolektor. (Sill a Recum 2008, Hu et al. 2014)

2.2 Parametry elektrostatického zvlákňování

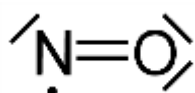
Parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování lze rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou parametry polymeru (roztoku či taveniny). Ty zahrnují viskozitu, koncentraci polymeru, molekulovou hmotnost polymeru, povrchové napětí a vodivost. Druhou skupinou jsou procesní parametry. Do této kategorie spadá napětí, typ kolektoru a vzdálenost mezi kolektorem a kapilárou. A třetí skupinou jsou parametry dané okolními podmínkami, tedy teplota, vlhkost a rychlost

proudění vzduchu. Přehled parametrů a jejich vliv na elektrostatické zvlákňování poskytuje kniha prof. Li a prof. Wanga (2013), ti zde popisují jednotlivé parametry, jejichž změnou lze docílit odlišných morfologií, struktur a jemností vláken. Podstatné je, že parametry procesu elektrostatického zvlákňování jsou podrobně zkoumány pro jednotlivé polymery samostatně, neboť každý polymer se chová zcela odlišně. Proto je nutné procesy elektrospinningu pro každou polymerní látku vždy optimalizovat. (Hu et al. 2014)

3 OXID DUSNATÝ

Oxid dusnatý je chemická sloučenina, která je definovaná chemickým vzorcem NO, jehož strukturu lze vidět na obrázku 7. NO je za běžných podmínek bezbarvý plyn a jedná se o volný radikál, jeho struktura tedy obsahuje nepárový elektron, který je v obr. 7 znázorněn tečkou u atomu dusíku. Jedná se o vysoce reaktivní molekulu s poločasem rozpadu přibližně několik sekund.

Dříve byl považován pouze za znečišťující látku životního prostředí, jakožto produkt chemického průmyslu, spalovacích procesů fosilních paliv či motorů automobilů. Nicméně je mnohem více, bylo prokázáno, že u všech savců se podílí na řadě fyziologických a patofyziologických procesů a zastává roli buněčné signální molekuly. Mezi celou řadou funkcí lze vyzdvihnout např. vazodilataci (zvyšuje tedy roztažnost cév, tím napomáhá většímu průtoku krve); snižuje agregaci krevních elementů (krevních destiček), která jinak iniciuje vznik krevních sraženin; snižuje adhezi monocytů, které se tvoří v kostní dřeni, přecházejí do krve a migrují do pojivých tkání, kde se formují do makrofágů a způsobují zánět; udržuje v rovnováze proliferaci buněk hladkého svalstva, která způsobuje zúžení krevních cév a nižší průtok krve; dále potlačuje oxidaci LDL cholesterolu; stojí také za správnou funkcí imunitního systému, nervového systému a podporuje hojení ran. (Hetrick a Schoenfish 2009).



Obr. 7: Chemická struktura oxidu dusnatého. Převzato z: <<https://www.boundless.com/>>

Za odhalení a popsání významu NO byla v roce 1998 udělena R. F. Furchgottovi, L. J. Ignarrovi a F. Muradovi Nobelova cena za Fyziologii a lékařství. (Nobelprize Org. 2014). Molekuly NO, označované jako „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF), zodpovědné za vazodilataci a regulaci krevního tlaku u savců, byly popsány jako endogenně produkováné signalizační molekuly v kardiovaskulárním systému, které jsou schopné modulovat produkci cytokinů. Pro svůj obrovský význam, byl oxid dusnatý v roce 1992, v časopise *Science*, vyhlášen molekulou roku. (Koshland 1992)

3.1 Syntéza NO

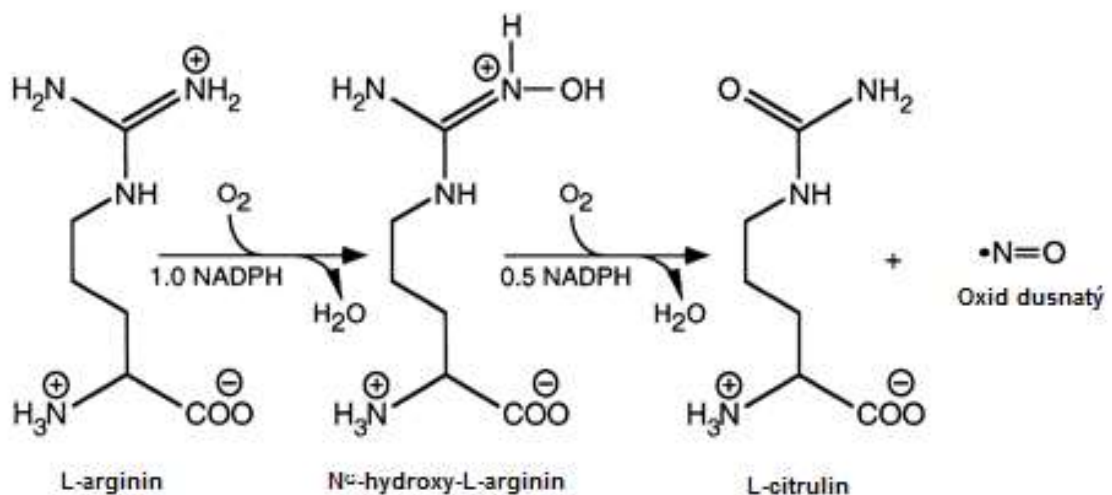
NO je generován třemi různými izoformami enzymu syntázy oxidu dusnatého (označováno NOS). Tyto izozymy jsou označovány jako eNOS (endoteliální NOS), nNOS (neurální NOS) a iNOS (indukované NOS) a obsahují společný rodový NOS gen, katalyzují stejnou reakci, nicméně se vzájemně odlišují svojí primární strukturou, determinovanou geneticky, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a výskytem v tkáních. Dvě syntázy jsou konstitutivně exprimovány, převážně v neuronech (nNOS) a endoteliálních tkáních (eNOS), naproti tomu inducibilní forma (iNOS) může být značně up-regulována v buňkách imunitního systému a mnoha jiných tkáních, kde je to vyžadováno pro jistou imunitní odpověď. (Alderton et al. 2001, Förstermann a Sessa 2012, Murphy 1999, Al-Sa'Doni a Ferro 2000)

Klíčovým rozlišovacím znakem mezi konstitutivními a inducibilními izoformami je závislost na vápníkových iontech Ca^{2+} . eNOS a nNOS jsou obě aktivovány zvýšením koncentrace intracelulárních Ca^{2+} , což posléze vede k navázání vápenatých iontů v buňkách na kalmodulin, a vzniká tak kalmodulinový komplex Ca^{2+} -CaM. Kdežto iNOS obsahuje nevratně vázané CaM, a je tedy do značné míry na Ca^{2+} nezávislá. Rozdělení syntáz oxidu dusnatého a jejich charakteristiky shrnuje tabulka na obrázku 8. (Lei et al. 2013, Al-Sa'Doni a Ferro 2000).

Biosyntéza NO (obr. 9) zahrnuje dva kroky oxidace L-argininu na L-citrulin za současné produkce oxidu dusnatého. Počáteční hydroxilace L-argininu vede k vzniku N^G -hydroxy-L-argininu, který slouží jako prekurzor pro NOS. Následně tedy tento meziprodukt oxiduje za vzniku L-citrulinu a NO. Na vznik 1 molu L-citrulinu je během reakce spotřebováno 1,5 molu NADPH a 2 moly kyslíku. (Andrew a Mayer 1999, Seabra et al. 2015, Al-Sa'Doni a Ferro 2000)

NOS izoformy	Expresní charakteristiky	Typ buněčné exprese	Aktivita enzymu
eNOS	Konstitutivní	Zejména v endoteliálních buňkách, také v buňkách hladkého svalstva, kardyomyocytech, kostních buňkách a neuronech	Závislá Ca^{2+} , generuje NO v nanomolekulární úrovni
nNOS	Konstitutivní	Především v neuronech, také ve slinivce břišní a ledvinách	Závislá Ca^{2+} , generuje NO v nanomolekulární úrovni
iNOS	Ne-expresivní za výchozích podmínek	Indukovatelná v mnoha typech buněk, včetně zánětlivých cytokinů, mikrobů, mikrobiálních produktů,	Nezávislá na Ca^{2+} , iNOS generuje NO v rozmezí mikromolárních koncentrací po dlouho dobu

Obr. 8: Typy izoform NOS a jejich charakteristiky. Převzato z: (Lei et al. 2013)



Obr. 9: Reakce vzniku L-citrulinu a NO, katalyzovaná NOS. Převzato z: (Andrew a Mayer 1999)

3.2 Detekce NO

Detekce NO a jeho derivátů (dusičnanů a dusitanů), tedy vývoj vhodných a dostatečně citlivých analytických technik, které budou schopny přesně kvantifikovat koncentraci NO a rychlost jeho produkce, se v současné době tiší intenzivnímu zájmu nespočtu vědeckých týmů napříč světem. Zásadní překážkou v přesné kvantifikaci NO je jeho vysoká reaktivita a velmi rychlé vylučování (vyplachování) endogenními látkami (např. O₂), hemovými proteiny (např. hemoglobin), thioly (např. cysteinové zbytky, glutathion), případně dalšími volnými radikály (např. superoxid). Další překážkou je velmi krátký poločas rozpadu NO (řádově sekundy). Vše výše zmíněné výrazně komplikuje detekci NO. Navíc je nutné si uvědomit, že detekované koncentrace NO se pohybují v rozmezí velmi nízkých hodnot, důsledkem toho je požadavek na techniky s širokými rozsahy lineární odezvy, a navíc s rychlými časy odezvy pro prostorovou detekci. (Hetrick a Schoenfisch 2009) Další, poměrně stěžejní nevýhodou, je neschopnost stanovování produkce NO *in vivo* pro celé tělo. Většinou probíhá stanovování koncentrace plyných fází NO (dusičnany, dusitany), a to z odebrané krve či moči recipienta. (Wang et al. 2015)

V současné době je využíváno několika komerčně dostupných metod pro detekci NO. Jednou z hlavních skupin jsou spektroskopické metody, kam spadá detekce NO na bázi absorbance, fluorescence nebo chemiluminiscence. Další možností, zjišťování množství NO, je využití elektrochemických technik, kde je využíváno nejrůzněji vylepšených membrán pro zvýšení odezvy elektrochemických čidel na NO, případně jsou aplikovány různé elektrokatalytické modifikace senzorů. Mimo tyto dvě stěžejní skupiny měřících technik pro detekci NO existují další, ty však zdaleka nejsou používány tak často. Patří sem např. hmotnostní spektrometrie, rentgenová fotoelektrická spektroskopie, IR a UV lasery, Ramanova spektroskopie, plynová chromatografie a další. (Hetrick a Schoenfisch 2009)

3.2.1 Metody založené na měření absorbance

Metody detekce NO, založené na absorbanci, jsou hojně využívány především díky dostupnému a jednoduše fungujícímu vybavení a koncepčně přímým postupům analýzy. Jsou využívány zejména pro detekci NO v biologických systémech. Existuje

více způsobů, které se liší různými indikátory, se kterými jsou testy absorbance prováděny. Tyto metody zahrnují test na bázi metaloproteinů a především pak Griessův test.

3.2.1.1 Griess assay

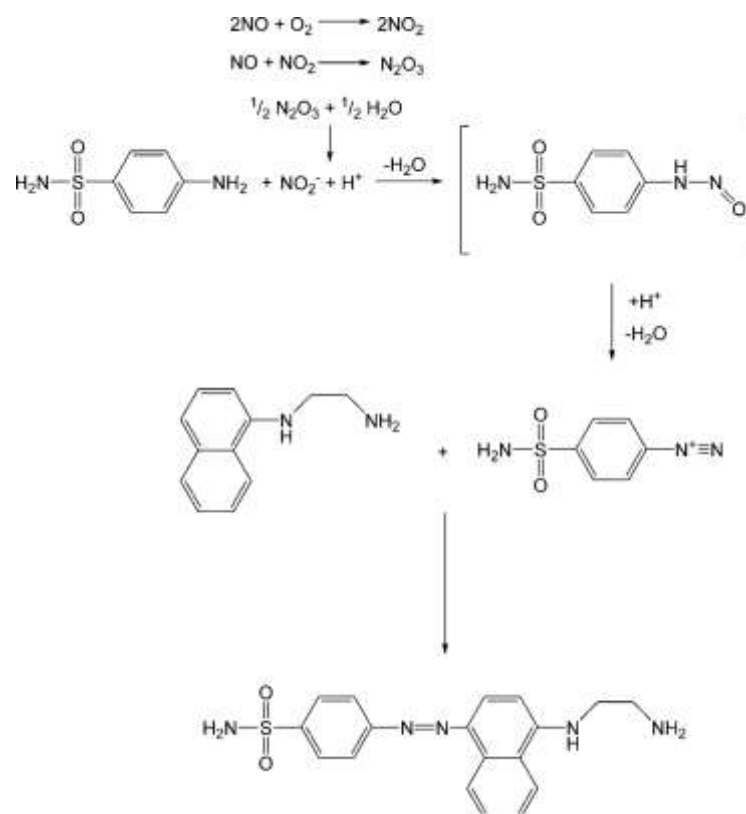
Griess assay neboli Griessův (diazotační) test je jednou z nejběžnějších metod pro detekci NO z nejrůznějších vzorků a matric. Poprvé byl test popsán Griessem v roce 1864 a diazotační reakcí byl skutečně naměřen dusitan. Během reakce dochází vlivem vysoké reaktivity NO k tvorbě dusitanů vlivem následujících reakcí:



Originální Griessova reakce je popsána reakcí dusitanu s kyselinou sulfanilovou (SA) a α -naftylaminem za kyselých podmínek, čímž je získáno azobarvivo, jehož koncentrace může být použita jako nepřímý ukazatel koncentrace dusitanů (a NO) ve vzorku. Později byl test upraven, kdy byla kyselina sulfanilová nahrazena sulfanilamidem (SULF) a α -naftylamin byl nahrazen N-(1-naftyl) ethylen-diamindichloridem (NEDD). To vedlo k větší citlivosti, reprodukovatelnosti a rychlosti metody. Obrázek 10 zachycuje moderní verzi Griessova testu, kdy nejprve dochází k reakci dusitanu se SULF za kyselých podmínek, což vede ke vzniku meziprojektu, tedy diazoniové soli. Tento produkt posléze reaguje s NEDD, tím vytvoří stabilní ve vodě rozpustné azobarvivo s absorpčním maximem $\lambda_{\text{max}} \cong 540 \text{ nm}$. V neutrálním pH = 7,4, kdy je SULF rozpuštěn s NEDD ve 100 μM fosfátového pufru za aerobních podmínek a posléze je přidán roztok s obsahem NO, má za následek vznik azobarviva s absorpčním maximem 496 nm, nicméně vznik tohoto azobarviva je velmi pomalý a trvá i několik dní, proto reakce dusitanu se SULF a NEDD probíhá za kyselých podmínek. Přidáním hydroxidu sodného dochází k neutralizaci kyselého roztoku dusitanu a výsledkem je tvorba produktu (azobarviva) se stejným absorpčním spektrem (496 nm). (Hetrick a Schoenfish 2009, Nims et al. 1995)

Koncentrace dusitanu je poté stanovena porovnáním absorbance roztoku azobarviva a kalibrační křivky, připravené se známými koncentracemi dusitanů. Tvorbu kalibračních křivek popisuje článek (Nims et al. 2000), kdy prve je připraven roztok dusitanu sodného (110 μM), který je následně dvojnásobně ředěn na koncentrace 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 μM . Do připravených roztoků je posléze přidáno 100 mM PBS (pH 7,4) obsahující 17mM SULF a 0,4 mM NEDD. Následuje inkubace vzorků po dobu 3 minut při teplotě místnosti, a poté je měřena absorbance při 496 nm. Získané hodnoty jsou vyneseny do grafu závislosti absorbance a koncentrace a lineární extrapolací je generována kalibrační křivka pro koncentraci NO. (Nims et al. 1995)

Detekční limit pro stanovení množství dusitanů pomocí Griessovy metody je přibližně 0,5 μM . Vzhledem k detekci vedlejších produktů NO (tj. dusitanů) nelze metoda uplatnit pro sledování množství NO v čase. (Hetrick a Schoenfisch 2009)



Obr. 10: Griessův test – diazotační reakce oxidu dusnatého (za aerobních podmínek), který reaguje za vzniku dusitanů (NO_2^-), které reagují se sulfanilamidem, což vede ke vzniku diazotované soli. Tento meziprodukt následně kopuluje s N-(1-naftyl) ethylendiaminem za vzniku stabilního vodorozpustného azobarviva. Převzato z: (Hetrick a Schoenfisch 2009)

Důležitými parametrem metody je poměr a koncentrace jednotlivých komponent Griessova testu, tedy NEDD a SULF. Přičemž *Nims et al. (1995)* stanovil optimální poměr komponent NEDD:SULF na 1:21, 1:42, 1:106 (pro průměrný excitační koeficient na mol NO, který byl stanoven na $12,500 \text{ M}^{-1}$). Optimální koncentraci SULF stanovil na 17 mM, přičemž koncentrace NEDD je proměnlivá v závislosti na poměru komponent. Pro poměr 1:21 je koncentrace NEDD 0,8 mM, pro poměr 1:42 je to 0,4 mM a pro poměr 1:106 je to 0,15 mM NED.

Hojnou využitelnost této metody dokládá řada studií, kde byl Griessův test pro stanovení dusitanů, potažmo NO, využit. *Chang et al. (2015)* ji využil pro stanovení uvolňování NO z nanočástic typu jádro/plášť - oxid křemičitý/chytosan, modifikovaný S-nitrosothiolem. Zhotovené vzorky vykazovaly 0,15 μmol S-nitroso skupin/mg uvolněných z NO, včetně prodlouženého uvolňování NO. Griessovu metodu použil *Lowe et al. (2015)* pro kvantifikaci uvolňování NO z obvazů pro zvýšené hojení ran. Obvazy byly připraveny elektrostatickým zvlákňováním kopolymerů na bázi akrylonitrilu. *Nguyen et al. (2016)* zkoumali uvolňování NO z PEOGMA-b-PVBA (polyoligo[ethylenglykol]methyethermethakrylát-b-poly[3- vinylbenzaldehyd]) matrice, na kterou byl navázán NO a antibiotika (gentamicin). Provedením Griessova testu byly prokázány synergické účinky, což snižovalo životaschopnost biofilmu *Pseudomonas auruginosa* o více než 90%, přičemž léčba samotnými antibiotiky nebo NO vedlo ke snížení životaschopnosti biofilmu pouze o 20%.

3.2.2 Fluorescenční metody

Pro detekci NO byla vyvinuta řada sond, které je vhodné použít pro biologické aplikace, neboť jsou vhodné pro sledování prostorové a časové produkce NO. Sondy nevykazují žádnou nebo minimální fluorescenci, dokud nezačnou reagovat s produkty vzniklými rozkladem NO (např. N_2O_3), po této reakci se však stávají vysoce fluorescenčními. Mezi nejčastější fluorescenční sondy, citlivé na NO, patří diaminofluoresceiny (DAFs), které poprvé popsal *Kojima et al. (1998)* Jejich fluorescence se po reakci s NO stonásobně zvyšuje. Dále je pak využíváno i derivátů DAF, např. DAF-2, které jsou vhodné pro analýzu produkce NO buňkami pomocí průtokové cytometrie. Pro citlivou detekci NO byla rovněž fluorescenční barviva

spojena s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a kapilární elektroforézou. (Hetrick a Schoenfisch 2009)

Desai et al. (2015) přináší poznatky o detekci NO ve vodné fázi pomocí fotoluminiscenční metody. V rámci své studie vytvořili selektivní sondy - luminiscenční organokovové komplexy (MOFs), funkcionalizované aminem. S novou vysoce selektivní fluorescenční sondou pro detekci NO ve vodných roztocích přichází *Huang et al. (2015)*. Fluorescenční sonda na bázi naftalamidu (NPA) reaguje na NO velice rychle a vykazuje 25násobné zvýšení fluorescence v průběhu 10 sekund. Nový fluorescenční biosenzor představuje i *Lie et al. (2016)*. Tento senzor je založen na bázi proteinu cytochromu P450 55B1.

3.2.3 Chemiluminiscenční metody

Pro detekci NO byly popsány dva typy chemiluminiscenční reakce. Jeden postup je založen na reakci NO s ozonem (O₃) v reakční komoře, což vede k oxidaci NO na oxid dusičitý (NO₂). Tato reakce produkuje množství světla - každá molekula NO, která zreaguje, excituje fotony. Emitované světlo je měřeno fotonásobičem a je úměrné koncentraci NO ve vzorku plynu. Postup reakce zachycují rovnice uvedené níže.



Druhý způsob chemiluminiscenční detekce NO je založen na reakci NO s peroxidem vodíku (H₂O₂) za vzniku peroxinitritu (ONOO⁻), který posléze reaguje s luminolem, tím se dosáhne charakteristické luminiscence. (Hetrick a Schoenfisc 2009)

Biologický efekt uvolňování NO byl pomocí chemiluminiscenční metody vyhodnocen ve studii *Cattanea et al. (2016)*. Zhotovené senzory jsou na bázi organokovových komplexů (MOFs), což jsou struktury s koordinačně nenasycenými místy a jsou tedy vhodné pro uložení a následné uvolňování NO. Takovéto organokovové struktury jsou připraveny koordinací kyseliny 2,5-dihydroxyterephthalové s různými zdroji kovů. V této studii jimi byly mangan a zinek (CPO-27 (Mg) a CPO-

27(Zn)). Chemiluminiscenční měření proběhlo po vystavení MOFs s uloženým NO proudy vlhkého dusíku (11% RH).

3.3 Donory NO

Donory oxidu dusnatého jsou farmakologicky účinné látky, které uvolňují NO *in vivo* nebo *in vitro*. Staly se užitečnými nástroji pro vyhodnocování klíčové role NO v kardiovaskulární fyziologii. V současné době jsou využívány k vývoji nových léčiv a v rámci studií k funkcionalizaci scaffoldů, které jsou posléze schopny uvolňovat NO. Obecně lze donory NO rozdělit do dvou skupin dle mechanismu uvolňování NO. První skupinou jsou donory NO, které uvolňují NO nebo jednu z redoxních forem dusíku spontánně, vlivem vlastního tepelného nebo fotochemického samo-rozkladu. Tato skupina zahrnuje S-nitrosothioly a diazeniumdioláty. Druhou skupinou jsou donory NO, které pro generování NO vyžadují metabolickou aktivaci, např. enzymatickou oxidaci, případně chemickou reakci s kyselinami, alkáliemi, kovy či thioly. Tato skupina zahrnuje organické dusičnany a dusitany nebo nitrovasodilatátory. (Wang, Cai a Taniguchi 2005)

3.3.1 Přímí dárci NO

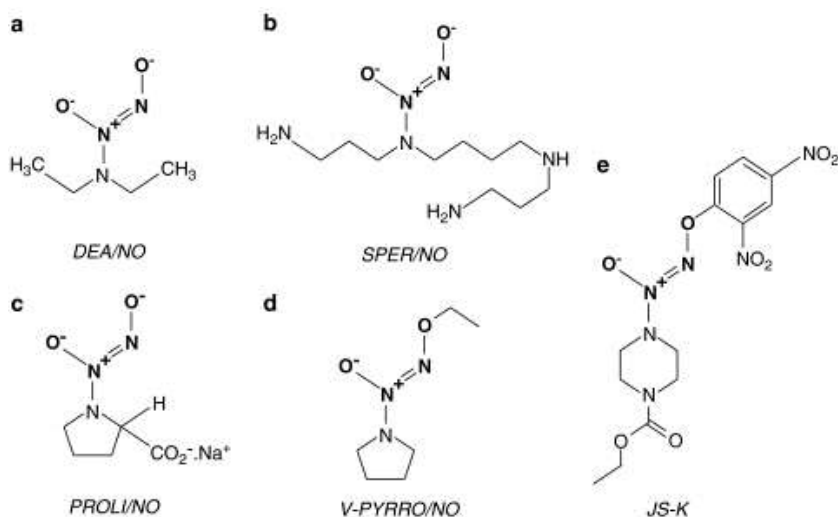
Jak již bylo řečeno, přímí dárci NO představují skupinu dárců, kteří spontánně uvolňují NO_x a nevyžadují proto metabolické reakce. Tato farmakologická činidla, obsahující funkční nitroso nebo nitrosylchloridovou skupinu. Mezi tyto donory patří plyny NO, nitroprusid sodný, trioxodinitrate sodný, diazeniumdioláty a v neposlední řadě S-nitrosothioly. Poslední dvě skupiny jsou v současné době nejvyužívanějšími donory NO pro různé studie, především díky řadě výhod, které přinášejí. Diazeniumdioláty dominují v důsledku předvídatelného charakteru uvolňování NO a pomalého uvolňování NO s prodlouženým účinkem. Stejně tak S-nitrosothioly jsou strukturně modifikovány k uvolňování NO v různé míře, v konkrétních podmínkách a změnou jejich struktury lze upravovat lipofilitu, která umožňuje zacílení těchto sloučeniny do oblastí s poškozenými tkáněmi.

3.3.1.1 Diazeniumdioláty

Diazeniumdioláty, také známé jako NONOates. Prvním v této skupině byl syntetizován adukt diethylamin a NO (DEA/NO) v roce 1960. Nicméně

do popředí zájmu se dostal kolem roku 1990. Tyto skupiny se skládají z dialátové skupiny [N(O-)N=O] vázané na nukleofilní adukt (aminy, polyaminy), právě přes atom dusíku. NONOates se spontánně rozkládají v roztocích při fyziologickém pH a teplotě a následně generují až 2 molární ekvivalenty NO. Rychlost rozkladu je závislá na struktuře, nicméně může probíhat v rozmezí sekund až hodin. (Miller a Megson 2007, Wang, Cai a Taniguchi 2005) Schematické znázornění několika vybraných NONOates (DEA/NO, SPER/NO, PROLI/NO, V-PYRRO/NO, JS-K) představuje obrázek 11.

NO donory v podobě NONOates byly použity v následujících studiích: (Seabra et al. 2015), (Suchyta a Schoenfisch 2015), (Liang et al. 2015), (Lowe et al. 2015), (Chakraborty a Mascharak 2016).



Obr. 11: Schematické struktury pěti příkladů NONOates (donorů NO). Převzato z: (Miller a Megson 2007)

3.3.1.2 S-nitrosothioly

S-nitrosothioly (RSNO nebo SNOs) je třída donorů, která zahrnuje širokou škálu různých sloučenin, které obsahují jednu chemickou vazbu mezi thiolovou (sulfohydrátovou) (R-SH) skupinou a NO. Za vhodných podmínek se tyto sloučeniny rozkládají za vzniku oxidu dusnatého a odpovídajícího disulfidu (RSSR), jak naznačuje rovnice 9. (Singh et al. 1996, Wang, Cai a Taniguchi 2005)

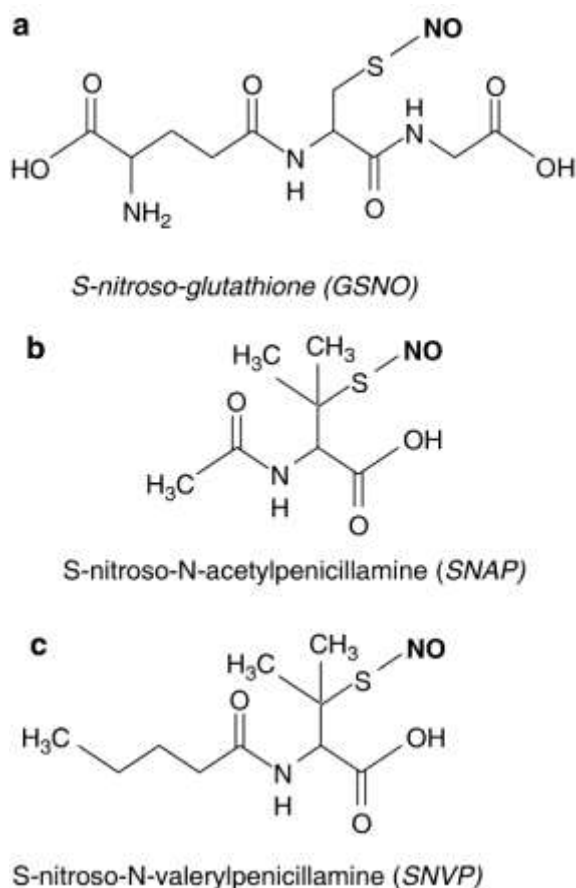


Jejich rozklad je katalyzován Cu^+ ionty, které samy o sobě mohou být vytvořeny redukcí Cu^{2+} iontů thiolu. Biologická aktivita SNOs je výrazně ovlivněna molekulárním okolím mateřského thiolu. To znamená, že během uvolňování mohou NO poskytovat biologickou aktivitu (přenosem NO^+). Mají také celou řadu dalších výhod oproti jiným třídám donorů NO. Některé vykazují tkáňovou selektivitu, jsou významnými inhibitory agregace trombocytů, nesdílejí nevýhody organických nitrátů a nitroprusidu, včetně omezené schopnosti indukovat oxidační stres nebo toleranci ve vaskulárních buňkách. (Miller a Megson 2007).

Řada S-Nitrothiolů se běžně vyskytuje v přírodě, kde hrají důležitou roli v řadě fyziologických a patofyziologických procesech. Na základě *in vivo* testů bylo zjištěno, že některé druhy S-nitrosothiolů se přirozeně vyskytují v lidské plazmě, konkrétně v plazmatickém albuminu o koncentraci cca 7 μM , plicní tekutině o koncentraci cca 0,3 μM či neutrofilech. To je jedna z výhod, pro kterou jsou obecně velmi často využívány, jakožto donory NO. Další byly syntetizovány chemicky a *in vivo* je nenajdeme. Vlivem nestability těchto sloučenin v jejich své čisté formě, je jejich izolace obtížná a brání tak objasnění jejich přesné chemii. (Al-Sa'Doni a Ferro 2000)

Nejčastěji využívaných S-Nitrosothiolů, jakožto donorů oxidu dusnatého, jsou především S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), S-nitrosoglutathione (GSNO) a S-Nitroso-N-valerylpenicillamine (SNVP). Existuje však celá řada dalších sloučenin např. S-Nitrosocysteine (CysNO), S-nitroso-N-acetyl-cysteine (SNAC) nebo S-Nitrosohomocysteine (HomocysNO). Chemickou strukturu vybraných SNOs zachycuje obrázek 13. (Singh et al. 1996, Wang, Cai a Taniguchi 2005)

Donory NO v podobě SNOs byly použity v následujících studiích: (Lauther et al. 2016), (Liu et al. 2015), (Lu et al. 2015), (Torre et al. 2016), (Yang et al. 2015).



Obr. 13: Schematická struktura vybraných donorů NO, patřících do skupiny SNOs.

Převzato z: (Miller a Megson 2007)

3.3.2 Donory vyžadující metabolické reakce

Tyto donory jsou pravým opakem donorů přímých, neboť nejsou schopny spontánního uvolňování NO a potřebují k tomu metabolické reakce. Mezi tyto donory patří nitrovasodilatátory, organické nitráty a dusitany esterů (včetně nitroglycerinu, amylnitritu, isosorbid dinitrátu, ad.) Po mnoho let byly tyto sloučeniny používány v klinické praxi k léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Jejich hlavními funkcemi je vasorelaxace či přímá inhibice nespecifických kationtových kanálů v buňkách hladkého svalstva cév. Omezení těchto činidel jsou poměrně dobře známy a zahrnují např. potenciálně nežádoucí hemodynamické účinky, nedostatek selektivity a omezenou biologickou dostupnost. (Ignarro et al. 2002, Quinn et al. 2015)

3.4 Chemická biologie NO – cytotoxické vs. cytoprotektivní účinky

Volný radikál NO je ukázkovým příkladem reaktivní molekuly, vykazující jak cytotoxické, tak cytoprotektivní vlastnosti. K jeho objevu vedly v podstatě dvě cesty. Jednou byla jeho identifikace jako endothelium-derived relaxing factor (EDRF), druhou potom bylo zjištění, že je generován makrofágy, které se účastní protinádorových a anti-patogenních reakcí.

Biologické účinky NO jsou na rozdíl od většiny malých signálních molekul dány jeho chemickými reakcemi. Unikátní chemie NO mu potom umožňuje účastnit se celé řady reakcí. Tyto potenciální reakce lze na základě chemické biologie NO rozdělit na přímé a nepřímé reakce. Přímé účinky NO jsou takové chemické reakce, které probíhají dostatečně dlouho, tak že NO reaguje přímo s biologickou cílovou molekulou. Naproti tomu nepřímé účinky vyžadují reakci NO s kyslíkem nebo superoxidem, tak aby generoval RNS, který následně reaguje s biologickými cíli. Přímé účinky se obvykle projevují při nízkých koncentracích, zatímco nepřímé účinky při koncentracích vysokých. (Thomas et al. 2008)

Přesné buněčné odezvy jsou potom odlišně regulovány právě specifickou koncentrací NO a zároveň jsou silně ovlivňovány místem jeho uvolňování, potažmo na jaké buňky NO působí. Pro celou řadu buněk bylo potvrzeno, že vhodné koncentrace NO, obecně nižší, podporují proliferaci a viabilitu buněk, naproti tomu vyšší hladiny NO zabraňují buněčnému cyklu, způsobují apoptózu a stárnutí buněk. (Napoli et al. 2013, Thomas et al. 2008)

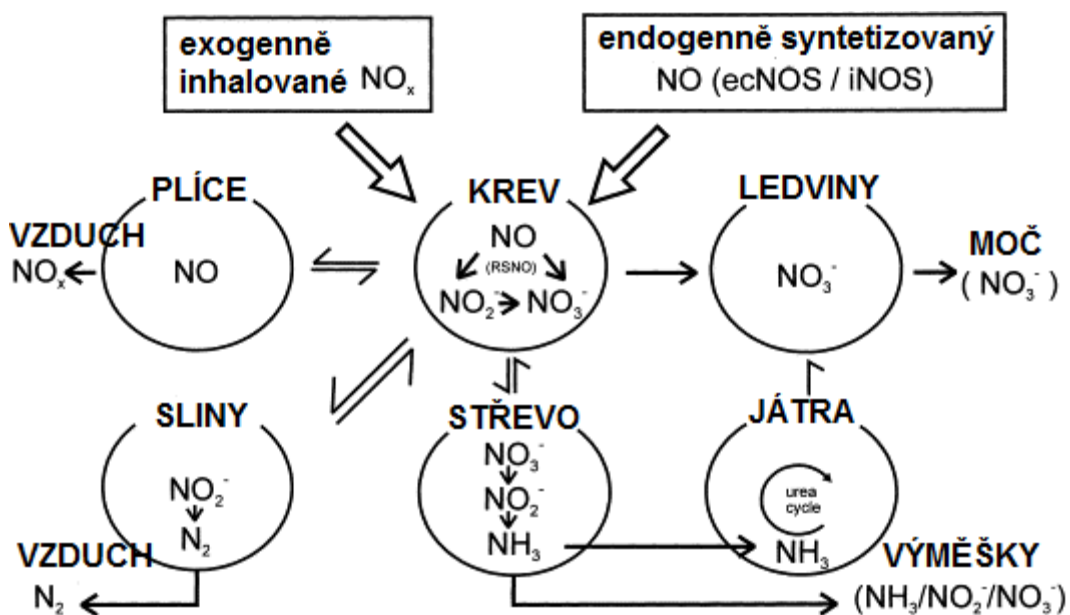
V případě vlivu NO na endotelové buňky je literatura značně rozporuplná. Na poli výzkumu, týkajícím se této problematiky, existují dvě skupiny vědeckých týmů. První přinášejí poznatky o pozitivním účinku NO na endotelové buňky, kdy NO zvyšuje jejich proliferaci a životaschopnost. To ve své studii potvrdil *Ziche et al. (1994)*, dále *Guo et al. 1995* a tuto skupinu podpořil i *Lei et al. (2013)*. Nicméně druhá skupina zastává názor zcela opačný, s odkazem na přítomnost exogenního zdroje NO dokládají, že uvolňování NO spíše zpomalují buněčnou adhezi, potažmo další přežití buněk. K těmto závěrům ve své studii dospěl *Heller et al. (1999)*, kde dokládá, že NO donory, jako například SNAPs, inhibují proliferaci endotelových buněk. Podobně

Sarkar *et al.* (1997) zkoumal uvolňování NO a jeho vliv na inhibiční efekty na kultivovaných endotelových buňkách. Další studie poukazují na vztah mezi koncentrací NO a inhibicí endotelových buněk, kdy Goch *et al.* (1995) na základě experimentů usuzuje, že velká exogenní koncentrace NO inhibuje proliferaci buněk, zatímco hladiny endogenního NO ji nezpůsobují.

Podíváme-li se na působení NO na trombocyty, tak zde je již literatura jednotnější, respektive daleko méně rozporuplná. Inhibici trombogenních vlastností vlivem uvolňujícího se NO uvádí řada studií, např. Vilahuret *et al.* (2004), Brisboris *et al.* (2013).

3.5 Metabolismus NO a jeho transformace v lidském těle

Ustálená koncentrace NO je určena především rychlostí jeho tvorby, rychlostí jeho rozkladu, tedy jeho metabolismu v těle a následném vyloučení z těla ven. Znalost forem metabolismu NO je předpokladem pro správné porozumění a následné vyhodnocení biologických účinků NO pro organismus, tedy zdali působí protektivně, případně cytotoxicky. Dále je tato znalost důležitá pro vývoj analytických metod pro hodnocení produkce NO v biologických systémech. NO a jeho přidružené N-oxidy (NO_x) jsou v těle produkovány řadou metabolických cest, viz obrázek 14. Ty jsou výrazně ovlivněny místem podání případně místem syntézy NO. (Kelm 1999)



Obr. 14: Biotransformace NO a N-oxidů v savčích organismech. Převzato z: (Kelm 1999)

Způsob a rychlost rozpadu NO se bude značně lišit pro vodnou a plynnou fázi. Jedním z hlavních produktů rozkladu NO ve vodných roztocích je dusitan. Kinetika rozpadu NO v roztocích je závislá na koncentraci, v důsledku toho není poločas rozpadu konstantní, je nepřímo úměrný koncentraci a je mnohem delší. Dalším produktem rozpadu NO ve vodných roztocích, ovšem v přítomnosti dostatečného množství O_2^- , je dusičnan. Rozpad NO nastává vlivem reakce s kyslíkem a jeho odvozeninami (ROS), jako je např. peroxidový anion (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) či hydroxylový radikál ($HO\cdot$). Kinetiky reakcí NO se liší v závislosti, se kterým z těchto odvozených kyslíkatých radikálů reagují a jejich koncentraci v různých buňkách a orgánech. Bylo též prokázáno, že všechny tři sloučeniny jsou produkovány buňkami savčích druhů, a to zejména vlivem endotelových buněk a makrofágů, schopných také produkovat NO. Poločas rozpadu NO a poměr konečné metabolity NO ve vodných roztocích (tedy rozpad na dusitany a dusičnany) bude záviset na okolních podmínkách, konkrétně typu a množství kyslíkatých radikálů, parciálním tlaku kyslíku (pO_2), hodnotě pH nebo koncentraci přechodových kovů. (Kelm 1999)

V plynné fázi jsou hlavními N-oxidy NO a NO_2 , které vznikají reakcí NO se vzdušným kyslíkem. NO a NO_2 jsou v dynamické rovnováze, proto lze NO oxidovat na NO_2 a rychlost reakce je závislá na množství dispergovaných částic, molekulárního kyslíku, ozonu (O_3) a intenzitě slunečního záření. NO také může podléhat fotorozkladu za vzniku NO a O_3 . Reakční rychlost NO a O_2 je o dva řády nižší, ve srovnání s vodnými roztoky. Za pokojové teploty NO reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku NO_2 rychlostí, která je závislá na koncentraci kyslíku a druhé mocnině koncentrace NO. Oxidace je tedy extrémě pomalá při nízkých koncentracích. (Kelm 1999)

3.5.1 Metabolismus NO a N-oxidů v dýchacích cestách

Jak již bylo řečeno, produkty reakce NO se vzdušným kyslíkem jsou především N-oxidy NO a NO_2 , kterým jsou lidé neustále vystavováni. V městských atmosférách stoupá koncentrace NO_x až na 0,1 ppm, zejména díky výfukovým plynům z automobilů a průmyslově produkováným plynům. NO, spíše než NO_2 , je hlavní složkou fotochemického smogu. Tudíž, obyvatelé průmyslových zemí jsou denně vystaveni nadměrné koncentraci NO, což může mít biologický dopad, jestliže se rozpustí

ve vodném roztoku. V nepřítomnosti kyslíku NO_2 dimerizuje na N_2O_4 , následně je hydrolyzován a vzniká dusitan a dusičnan. V přítomnosti kyslíku reaguje s přebytkem NO za vzniku N_2O_3 , který následně hydrolyzuje na dusitan. (Kelm 1999)

Vlastnosti NO , které hrají v dýchacích cestách a plicním oběhu klíčovou roli, jsou: (1) extrémně pomalá kinetika reakce NO s kyslíkem v plynné fázi při nízkých koncentracích NO , (2) vysoká difuzní kapacita NO a (3) velmi rychlá reakce NO s HbO_2 . Přičemž všechny tyto faktory vedou k rychlému odstranění NO z plic bez vedlejších systémových účinků. Ovšem při vyšších dávkách inhalovaného NO k nim dojít může. Těmito vedlejšími systémovými účinky pak mohou být inhibice funkce krevních destiček či snížení výkonu levé srdeční komory. (Kelm 1999)

3.5.2 Metabolismus NO a N -oxidů v krvi

Metabolismus NO , NO_2 , N_2O_3 , NO_2^- a NO_3^- (inhalovaných, podávané injekčně či syntetizovaných endogenně) v krvi závisí na difúzi, konvekci, distribučním koeficientu a chemických reakcí v různých kompartmentech lidské krve. Přestože se NO může v tkáni šířit na vzdálenost více než 100 μm , způsobuje hemoglobin, cirkulujících erytrocytů, významné vymývání NO . Červené krvinky tak poskytují odtok NO , a vytváří ostrý difuzní gradient. Stejně tak mohou snížit vnitřní koncentraci NO v buňce, produkující NO , protože oxyhemoglobin sníží opětovný vstup do buňky. Poločas rozpadu NO v krvi pak byl odhadnut v rozmezí 0,05-1,8 ms. (Kelm 1999)

Metabolické dráhy NO v cirkulující krvi mohou být následující: (1) NO uvolňovaný z endotelových buněk může dosáhnout erytrocytů a reagovat buďto s oxyhemoglobinem za vzniku dusičnanu nebo s hemoglobinem za vzniku nitrosylhemoglobinu, případně s 93-cysteinovým zbytkem β -podjednotky za vzniku *S*-nitrosohemoglobinu. Poměr těchto reakcí závisí na parciálním tlaku kyslíku. Ve vodné fázi plazmy může NO reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku dusitanu nebo se superoxidu za vzniku peroxydusitanu, a tím i poměr vytvořených dusitanů a dusičnanů, je závislý na okolních podmínkách. Nitrosoniové skupiny NO mohou reagovat s thioly v přítomnosti akceptorů elektronů za vzniku nitrosothiolů. (Kelm 1999, Wennmalm, Benthin a Petersson 1992)

3.5.3 Metabolismus NO a N-oxidů v moči

Přeměna NO a dusitanu vede ke vzniku dusičnanu, konečný metabolit NO_3^- je pak obsažen v lidské moči. Dusičnan je filtrován v glomerulu (cévním klubičku) a vstřebáván v renálních tubulech. Koncentrace dusičnanů v moči je 250-2000 μM , přičemž koncentrace dusitanů a NO nejsou obvykle zjistitelné. Běžně se této skutečnosti využívá pro diagnostiku infekcí močových cest, kdy bakteriální kontaminace způsobuje syntézu NO a posléze syntézu dusičnanů v močovém traktu. (Kelm 1999)

3.6 Aplikace oxidu dusnatého v biomedicině a tkáňovém inženýrství

Jak již bylo řečeno, NO hraje podstatnou roli v mnoha fyziologických procesech, jako je kontrola cévního toku (vazodilatace), imunitní odpověď, inhibice adheze a agregace krevních destiček a leukocytů, neokapilarizace (angiogeneze), apoptóza (programovaná buněčná smrt), hojení ran, reparace tkání a neurotransmise a zánět. (Seabra et al. 2015) Nedostatek produkce NO, případně snížení jeho biologické dostupnosti, je spojen s řadou patologických stavů, jako jsou kardiovaskulární komplikace (hypertenze, endoteliální dysfunkce či ateroskleróza), rakovina nebo neurodegenerativní procesy. (Gaucher et al. 2013) Zvýšená hladina NO potom souvisí s autoimunitními onemocněními (roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses).

Právě díky výše zmíněnému se rozvoj strategií pro přenos a řízené dodávání exogenního NO jeví jako velice slibný přístup v řadě biomedicínských aplikací (např. kardiovaskulární aplikace, hojení ran, antimikrobiální úpravy biomateriálů, léčba rakoviny, ad.)

3.6.1 NO pro kvalitnější hojení ran

Hojení ran je velmi složitý proces, skládající se ze tří hlavních fází, kterými jsou zánětlivá reakce, proliferace a následná remodelace tkání. Mimo těchto fází dochází v normálním procesu hojení ran k řadě dalších reakcí, jako je srážení krve, zánětlivá reakce, epitelace, tvorba granulační tkáně, neovaskularizace, kontrakce rány a reorganizaci ECM. Fyziologické poruchy v procesu hojení způsobují abnormální hojení ran, což má za následek nedokonalé zhojení, případně vznik ran chronických.

(Lowe et al. 2015). NO, jakožto vysoce reaktivní molekula produkovaná katalytickou reakcí L-argininového substrátu a NOS *in vivo*, se podílí každé fáze hojení ran. Ve fázi zánětu zprostředkovává NO vazodilataci a antiagregaci krevních destiček. Během proliferační fáze podporuje re-epitelaci a angiogenezi. V závěrečných krocích hojení, kdy dochází k reorganizaci ECM, podporuje NO ukládání kolagenu.

Na základě těchto poznatků byl NO v řadě studií začleňován do polymerních nosičů (nanočástice, nanovláknenné vrstvy) za účelem přípravy DDS, výrazně podporujících hojení ran. Nurhasani et al. (2015) vyvinuli PEI/NONOate nanočástice začleněné v PLGA matrici s prodlouženým uvolňování NO, ten byl uvolňován po dobu 6 dní. Mimo silný baktericidní účinek byl potvrzen příznivý účinek při hojení ran (myší modely ran infikované MRSA) se zrychlenou redukcí velikosti ran. Lowe et al. (2015) představili obvazy pro zlepšení hojení ran. Obvazy byly připraveny elektrostatickým zvlákňováním kopolymerů na bázi akrylonitrilu (akrylonitril/1-vinylimidazol/butylakrylát; akrylonitril/1-vinylimidazol/ isopren) s navázaným NO, kdy byl polymerní nosič vystaven tlaku NO o 4 atmosférách po dobu 60 minut. Tyto materiály byly schopny uvolnit až 79 $\mu\text{mol/g}$ polymeru v průběhu 14 dní a velice pozitivně ovlivnily proces hojení ran a rychlost redukce velikosti ran.

3.6.2 NO pro kardiovaskulární aplikace

Onemocnění kardiovaskulární soustavy, ať už ateroskleróza, aneurysma a další poškození cév, patří v současné době k celosvětově nejrozšířenějším chorobám a ročně na ně umírají miliony lidí. Tato onemocnění vážným způsobem narušují funkce celého cévního systému a v konečném důsledku způsobují přerušování cirkulace krve v těle. Tomu lze předejít implantací správné cévní náhrady (autologní či umělé) nebo stentu. Proto je snahou vytvářet tyko stenty i cévní náhrady, které budou díky začleněným donorům NO, schopny NO kontinuálně uvolňovat, neboť NO by mohl pozitivně ovlivňovat kardiovaskulární fyziologii.

Yang et al. (2015) využili strategie tvorby povlaku na běžně využívaném stentu. Použili 316L SS stent, běžně používaný v praxi a funkcionalizovali jej povlakem PPAam (plazmaticky polymerizovaného allylaminu). Takto modifikovaný stent byl ponořen do roztoku kyseliny 3,3-diselenodipropionické (SeDPA), jakožto donoru NO.

Ty modifikované stenty vykazovali inhibici krevních destiček, adhezi, proliferaci a migraci arteriálních buněk hladkého svalstva. Dále výrazně zvýšili migraci a růst endoteliálních buněk. I po 30 dnech působení donoru NO byla pozorována účinná NO-katalitické aktivita, dobré biologické účinky na krevní destičky, EC a SMC.

Parent et al. (2015) připravily porézní PLGA nebo PLGA/PCL scaffoldy s inkorporovanými NO donory (SNOs, GSNO, ISMM). Příprava scaffoldů spočívala v rozpuštění polymerů v NMP, po ochlazení byly do roztoku přidány donory NO. Následně byl přidán NaCl, jakožto porogen. Po homogenizaci byla směs přenesena do roztoku vody s Pyrexem (krystalizátor), tím došlo k difuzi NMP a porogenu do vody, a vznikl tak tuhý porézní scaffold. Nejvhodnějším kandidátem z testovaných scaffoldů se pro vývoj klinicky vhodného lešení pro cévní tkáňové inženýrství jevil PLGA/PCL/GSNO scaffold. Pozitivně podpořil uchycení buněk, zároveň držel jejich metabolickou aktivitu a výrazně zvýšil jejich produkci proteinu. Tyto výsledky ukazují, že scaffoldy z PLGA či PCL s inkorporovaným GSNO mají potenciál pro kardiovaskulární tkáňové inženýrství.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části práce bylo provést studium kinetiky uvolňování NO z elektrostaticky zvlákněných mikro a nanovlákněných vrstev, modifikovaných donorem NO v podobě S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillaminem (SNAPs). Pro přípravu vlákněných vrstev byl použit alifatický polyester polykaprolakton (PCL), který se lišil molekulovou hmotností (PCL: Mw 80 000, Sigma Aldrich a PCL: Mw 43 000, Polysciences). Oba materiály byly zvlákněny s různým množstvím donoru NO (0, 0,25 a 0,5 hm%), a následně bylo provedeno studium kinetiky uvolňování NO se zohledněním vlivu průměru vláken jednotlivých vrstev, koncentrace SNAPs ve zvlákněných vrstvách, vlivu použitého typu sterilizace a v neposlední řadě vlivu degradace vlákněných vrstev. Pro detekci NO a následné vyhodnocení kinetiky uvolňování bylo využito spektrofotometrické analýzy Griess assay. Tato metoda umožňuje stanovení koncentrace NO ve vzorcích, na základě proměření absorbance roztoků, obsahujících SA, NEDD a výluh z testovaných vzorků, obsahující NO (pufr, degradační médium) porovnáním s předem připravenými kalibračními křivkami. Dále bylo provedeno *In Vitro* testování zhotovených materiálů s endotelovými buňkami a byl zkoumán vliv uvolňujícího NO na nasazené buňky. *In vitro* testování zahrnovalo i test cytotoxicity samotného S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillaminu a test trombogenicity modifikovaných materiálů.

MATERIÁLY POUŽITÉ PRO JEDNOTLIVÉ EXPERIMENTY

Elektrostatické zvláknění:

PCL – Mw: 80 000 g·mol⁻¹, T_m: 60 °C, hustota: 1,145 g·mL⁻¹ (při 25 °C), polydisperzita: <2 (Sigma Aldrich)

PCL – Mw: 43 000 g·mol⁻¹, T_m: 55-65 °C (Polysciences)

SNAPs – předem nasyntetizované; zvolené navážky

Chloroform (PENTA) /Ethanol (PENTA) /Kyselina octová (PENTA) – rozpouštědlový systém v poměru 8/1/1

Syntéza SNAPs:

S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin (SNAPs) – Mw: 220,25 g·mol⁻¹ (Sigma Aldrich)

Methanol (MetOH) - (PENTA)

Kyselina chlorovodíková (HCl) - (PENTA)

Kyselina sírová (H_2SO_4) - $c_{\text{H}_2\text{SO}_4}$: $17,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Dusitan sodný (NaNO_2) – M_w : $69 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Sterilizace:

Ethylenoxid ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$)

70% Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) – (PENTA)

Griess assay:

Kyselina sulfanilová (SA) – M_w : $173,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

N-(1-naftyl) etylendiamindihydrochlorid (NEDD) – M_w : $259,17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Fosfátový pufr - PBS (pH 7,4)

dH₂O

Enzymatická degradace:

Lipáza (*Pseudomonas cepacia*) – $30 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, cat. n. 623 09

dH₂O

PBS s 0,1% azidu sodného (pH 7,4)

PBS bez přísady azidu sodného (pH 7,4)

4 PŘÍPRAVA MATERIÁLŮ

Příprava materiálů zahrnovala nejprve syntézu donoru SNAPs, následně přípravu roztoků PCL, do kterých byl připravený donor NO přidáván v různém množství. To bylo zvoleno na základě předchozích optimalizačních studií a experimentů, ze kterých bylo známo, že nejvyšší množství SNAPs rozpuštěné v polymerních roztocích určených ke zvlákňování činí přibližně 25 mg donoru NO na 5 g roztoku, což odpovídá 0,5 hm% koncentraci SNAPs. Následně byly z roztoků elektrostatickým zvlákňováním zhotoveny mikro a nanovlákněné vrstvy, které byly následně využity pro experimenty studia kinetiky uvolňování NO z těchto funkcionalizovaných materiálů a biologické testování materiálů s endotelovými buňkami.

4.1 Syntéza SNAPs

Pro modifikaci elektrostaticky zvlákňovaných vrstev byl vybrán donor NO ze skupiny *S*-nitrosothioly (RSNO), konkrétně sloučenina *S*-nitroso-*N*-acetyl-DL-penicillaminem (SNAPs). Příprava SNAPs spočívala nejprve v rozpuštění 200 mg *N*-acetyl-DL-penicillaminem (NAP, $M_w = 220,25 \text{ g/mol}$) v 5 ml methanolu a následné sonifikaci roztoku v ultrazvukové lázni. Dále bylo přidáno 1,5 ml kyseliny chlorovodíkové ($1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 100 μl kyseliny sírové ($17,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a roztok byl promíchán. Posléze bylo přidáno 144,9 mg dusitanu sodného ($M_w = 96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) a směs byla míchána až do úplného rozpuštění poslední přidané komponenty (cca 30 minut). Zároveň během této doby docházelo k reakci mezi jednotlivými složkami směsi, což se projevilo zelenou barvou výsledného roztoku. Po rozmíchání byla směs chlazena ledem po dobu 45 minut, což vedlo ke změně barvy na tmavě zelenou, až s nádechem do černa. Posledním krokem bylo odpaření methanolu pomocí rotační odparky (RVO 400, Ingos) při teplotě lázně na 40 °C a podtlaku 200-210 hPa, dokud nedošlo k vytvoření tmavě zelených krystalů. Ty byly poté vysušeny při pokojové teplotě ve vakuu po dobu dvou dní. Připravené SNAPs byly uchovávány v chladu (4 °C) a bez přístupu světla. Charakteristickou krystalickou strukturu a tmavě zelený nádech SNAPsu lze pozorovat na obrázku 15.



Obr. 15: Nasyntetizovaný donor NO ze skupiny S-nitrosothiolů (SNAPs,) určený k modifikaci PCL vláknenných vrstev, vyhotovených elektrostatickým zvlákňováním. Přesným dodržáním postupu syntézy SNAPs (viz výše) dochází ke vzniku charakteristické krystalické struktury temně zelené barvy.

4.2 Příprava roztoků PCL

Pro přípravu roztoků byly použity dva typy polykaprolaktonu (PCL), konkrétně PCL 80 000 (Sigma Aldrich) a PCL 43 000 (Polysciences), které se tedy lišily svoji molekulovou hmotností. Rozpouštědlový systém byl pro oba zmíněné polymery shodný, jednalo se o chloroform, ethanol a kyselinu octovou v poměru 8/1/1 (v/v/v). Odlišné ovšem byly koncentrace roztoků, které byly zvoleny na základě optimalizace z předešlých studií, tak aby bylo možné roztoky snadno zvlákňovat a docházelo k tvorbě, co možná nejhomogennějších vláknenných vrstev. Proto byly namíchány roztoky o koncentraci 10 hm% pro PCL 80 a 16 hm% pro PCL 43.

Hodinu před samotným zvlákňováním byl do roztoků přidán předem připravený donor NO (jak je popsáno výše), kdy hmotnostní koncentrace SNAPs činila 0, 0,25 a 0,5 hm%. Daná navážka SNAPs byla v roztoku rozmíchávána pomocí magnetického míchadla po dobu 30 minut, tak aby bylo zajištěno rozpuštění veškerých krystalů SNAPs.

4.3 Elektrostatické zvlákňování

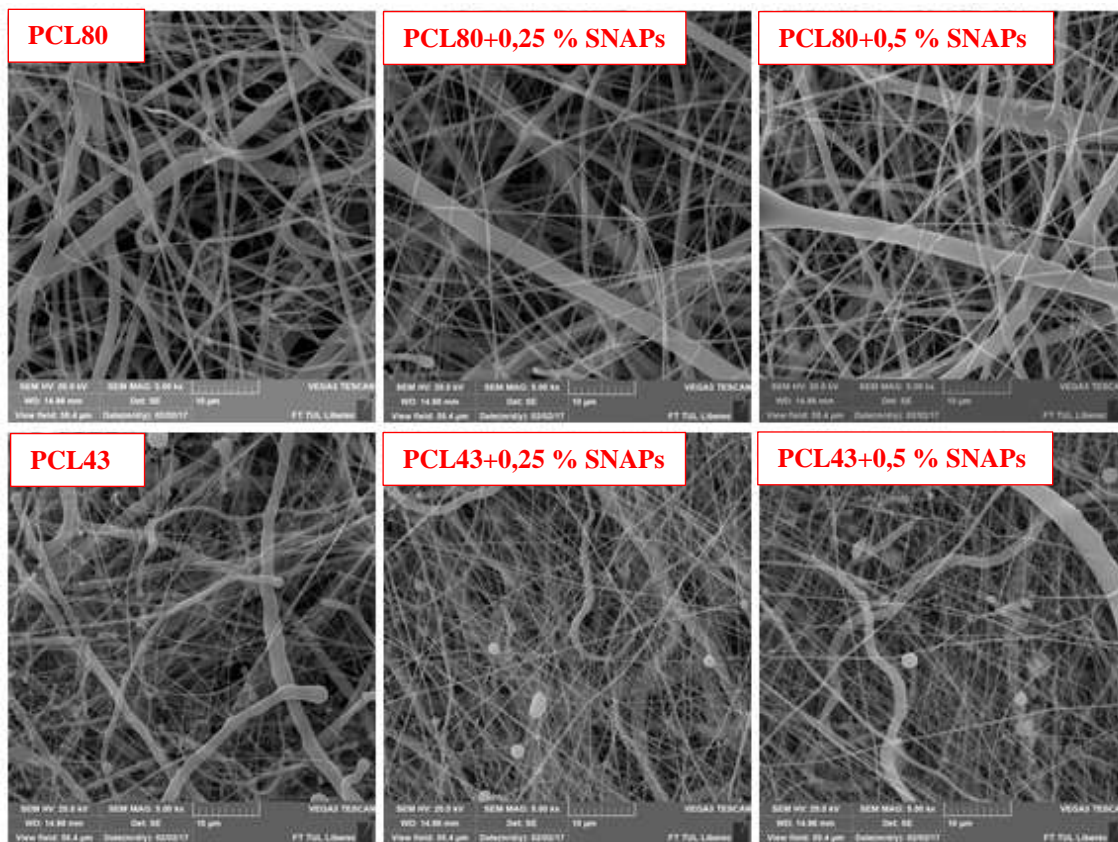
Planární vrstvy byly připraveny elektrostatickým zvlákňováním pomocí přístroje Nanospider NS LAB. Zvlákňováno bylo vždy 100 g polymerního roztoku PCL o koncentraci 10 hm% (pro PCL 80) a 16 hm% (pro PCL 43) s danou navážkou SNAPs, která činila 0,250 a 500 mg. Zvlákňování probíhalo za použití struny o průměru 0,2 mm, na kterou byl polymerní roztok konstantně nanášen ze zásobní nádržky vlivem

úzké štěrbinou rychlostí 200 mm/s. Vlákna byla ukládána na podkladovou netkanou textilii o šíři 500 mm a byla odtahována rychlostí 20 mm/min. Zvlákňující struna byla od kolektoru vzdálena 180 mm. Použité napětí bylo 50 kV pro strunu a 10 kV pro kolektor. Teplota byla udržována na 24°C a relativní vlhkost na 35%.

Výsledky elektrostatického zvlákňování jednotlivých polymerních roztoků s danými hmotnostními koncentracemi SNAPs zachycuje obrázek 15. Vzhledem k rozdílné molekulové hmotnosti použitého PCL, která neumožňuje připravit roztoky o stejné koncentraci, neboť výsledkem by byla vysoká nehomogenita vlákenné vrstvy nebo jiné negativní projevy, případně problémy se samotným zvlákňováním jednoho či druhého polymerního roztoku, je zde možné pozorovat viditelné rozdíly v průměrech vznikajících vláken a struktuře vlákenných vrstev, které jsou pozorovatelné v mikroskopickém i makroskopickém měřítku.

Jemnějších vláken bylo dosaženo zvlákňováním PCL s M_w 43 000, a to i s různými navážkami SNAPs, nicméně je zde možné pozorovat výskyt i výrazně silnějších vláken o průměru nad 1 μm , a také přítomnost defektů v podobě „korálků“, vznikajících na vláknech. Zatímco PCL s M_w 80 000 s různými navážkami SNAPs vytvářel vlákna o větších průměrech, s větším množstvím vláken přesahujících 1 μm , ovšem bez přítomnosti defektů. Vizuelní zhodnocení bylo podpořeno statistickým vyhodnocením, které bylo provedeno pomocí software NisElements. Na základě 150 měření pro každou zvlákňovanou vrstvu, byly stanoveny základní statistické parametry průměru vláken. Jednalo se o průměr, směrodatnou odchylku, minimální a maximální hodnotu, viz tabulka 1. Hystogramy četností pro jednotlivá měření je možné nalézt v příloze 1. Z těchto údajů lze vyčíst, že v případě PCL s M_w 80 000 jednotlivé navážky SNAPs neměly na průměr vláken nikterak výrazný vliv a průměr vláken se u jednotlivých vrstev pohyboval kolem 583 nm se směrodatnou odchylkou kolem 458 nm, která byla způsobena velkým rozsahem průměru vznikajících vláken. U PCL s M_w 43 000 a odlišnými navážkami SNAPs se jemné rozdíly vyskytují, průměry vláken jednotlivých vrstev se pohybovaly od 206,5 nm do 240 nm, kdy nejmenších vláken bylo dosaženo u PCL vlákenné vrstvy s největší navážkou SNAPs, zatímco PCL s obsahem 0,25 hm% SNAPs produkoval vlákna nejsilnější. Přihlédneme-li však ke směrodatným odchýlkám, tak těmto rozdílům nelze připsávat

významnou váhu. Nicméně směrodatné odchylky byly výrazně nižší oproti vrstvám z PCL 80 000, což bylo nejspíše způsobeno nižším výskytem vláken s vysokým průměrem.



Obr. 15: Snímky PCL vláken z elektronového mikroskopu ukazující vliv molekulové hmotnosti, potažmo koncentrace na průměr vláken. Zvětšení (5000x)

Tab. 1: Statistické charakteristiky průměru PCL vláken pro všechny zhotovené planární vláknenné vrstvy.

Vláknenný materiál	Průměr vláken [nm]	Směrodatná odchylka [nm]	Minimum [nm]	Maximum [nm]
PCL80	580,6	414,6	150,0	2720,0
PCL80+0,25 % SNAPs	585,1	496,3	230,0	3080,0
PCL80+0,5 % SNAPs	583,3	462,2	159,5	3272,8
PCL43	230,9	199,0	69,5	1677,8
PC 43+0,25 % SNAPs	240,0	147,8	96,8	1169,2
PCL 43+0,5 % SNAPs	206,5	79,8	102,1	734,0

4.4 Sterilizace materiálů

Vzhledem k potenciální aplikaci těchto vlákných vrstev, ať už v planární, tubulární či jiné formě, v tkáňovém inženýrství, potažmo medicíně, je nutné tyto materiály sterilizovat. Proto již v rámci výzkumu jsou materiály sterilizaci podrobovány, a výsledky experimentů jsou často porovnávány s výsledky experimentů pro nesterilní materiály. Účinky sterilizace totiž mohou, v některých případech dokonce prokazatelně, snižovat aktivitu a uvolňování modifikující látky. To je reakce nežádoucí, nicméně sterilizaci se nelze vyhnout. Pravidlo sterilizace též platí i v případě biologického testování materiálů v rámci výzkumu, tak aby bylo zamezeno nežádoucím reakcím nasazených buněk s nesterilním materiálem, obsahujícím řadu nečistot či cizorodých zárodků.

4.4.1 Sterilizace ethylenoxidem

Ethylenoxid je organická heterocyklická sloučenina, obsahující ve svém cyklu atom kyslíku. Za běžných podmínek se jedná o bezbarvý hořlavý plyn s nasládlou vůní, velmi reaktivní, toxickou, karcinogenní a mutagenní látku.

Sterilizace materiálů probíhala ve sterilizátoru Anprolene dle platné normy ČSN EN ISO 11135-1 Sterilizace výrobků pro zdravotní péči - Sterilizace ethylenoxidem - Část 1: Požadavky na vývoj, validaci a průběžnou kontrolu sterilizačního postupu pro zdravotnické prostředky. Materiály v planární formě nebo již nastříhané vzorky, umístěné v plastových zkumavkách, byly před samotným procesem sterilizace zabaleny do sterilizační folie. Ta byla následně na kocích obalu svařena. Sterilizace probíhala při 37°C po dobu 12 hodin. Následovalo týdenní až třítýdenní odvětrání materiálů při pokojové teplotě.

Právě teplota je příčinou výběru tohoto druhu sterilizace. 37 °C (až 55 °C), při nichž ke sterilizaci dochází, jsou teploty snesitelné pro některé druhy materiálů s nižšími teplotami tání, jako je právě PCL, jehož T_m se pohybuje v rozmezí 55-60 °C.

4.4.2 Sterilizace ethanolem

Ethanol je druhý nejnížší alkohol, čiré barvy, ostré alkoholové vůně a vysoce hořlavý. Mimo celou řadu aplikací je též vhodným dezinfekčním prostředkem, neboť

denaturuje proteiny a rozpouští lipidy, takže účinně ničí mnoho druhů bakterií a virových buněk. Pro dezinfekční a sterilizační aplikace je využíváno ethanolu o koncentraci 70%, protože vyšší koncentrace se rychle odpařují a nestačí dostatečně proniknout skrze buněčnou membránu a nižší koncentrace nejsou dostatečně účinné.

Sterilizace materiálů (vzorků) probíhala dle normy. Podstatou bylo smočení materiálů v 70 % ethanolu po dobu 30 minut a následné sušení.

5 STUDIUM KINETIKY UVOLŇOVÁNÍ NO

Kinetika uvolňování NO z PCL vlákných vrstev, modifikovaných pomocí SNAPs, byla pozorována v rámci dvou hlavních experimentů. První z nich sledoval uvolňování NO z modifikovaných PCL vrstev pomocí SNAPs, podrobených různým druhům sterilizace, kdy k uvolňování NO docházelo v pufovaném fyziologickém roztoku (PSB) bez přítomnosti enzymů, podporujících degradaci materiálů. Druhý experiment naopak sledoval uvolňování NO z modifikovaných PCL vrstev pomocí SNAPs, během enzymatické degradace, vyvolané Lipázou (30 U/mg), která byla přítomna v PBS.

5.1 Griess assay

Detekce NO probíhala pomocí metody Griess assay. Vzorky vlákných materiálů o předem zvolených navážkách, případně plochách, obsahující donor NO (SNAPs), jej uvolňovaly v podobě dusitanů do média (PBS, PBS+Lypáza), které bylo v přesných intervalech odebíráno, a posléze bylo použito pro Griessovu reakci a stanovení koncentrace NO v dílčích roztocích, potažmo vzorcích.

5.1.1 Metodika reakce

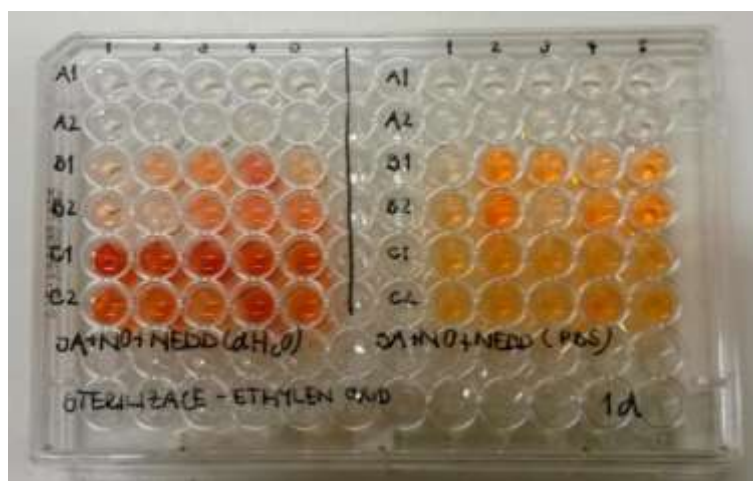
Griessova metoda probíhala vlivem reakce kyseliny sulfanilové (SA), dusičnanu (NO_x), obsaženém v odebíraném médiu a N-(1-naftyl) ethylendiamindichloridu (NEDD). Prvním krokem byla příprava SA o molární koncentraci 17 mM a NEDD o molární koncentraci 0,4 mM, kdy množství jednotlivých sloučenin na daný objem roztoku bylo přepočítáno pomocí rovnice pro molární koncentraci (10).

$$c = \frac{m_A}{M_A \cdot V}, \quad (9)$$

kde c je molární koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$; $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} = \text{M}$], m_A je hmotnost složky A [kg], M_A je molární hmotnost složky [$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$] a V je celkový objem roztoku [l].

Následovalo jednoduché dávkování jednotlivých sloučenin, ve formě roztoků, do 96 jamkových destiček v poměru 1/1/1 (SA/ NO_x /NEDD) pomocí pipety, o rozsahu 100-1000 μl , kdy bylo dávkováno 100 μl od každé sloučeniny. Rozpouštědlem pro SA byla demineralizovaná voda (dH_2O), pro NEDD to bylo PBS i dH_2O . Nejprve byla

nadávkována SA, k ní byly přidávány odebíraná média s obsahem NO_x , kdy dílčím koncentracím SNAPs v PCL vzorcích příslušely jednotlivé řádky. Dávkování roztoků s dusitanem probíhalo vzestupně, od nejnižšího množství SNAPs v modifikovaných vzorcích k nejvyššímu. Tyto dvě složky byly následně ponechány cca 5 minut, tak aby mezi nimi došlo k dostatečné reakci. Posléze byl přidán NEDD, což se téměř ihned po jeho nadávkování projevilo zbarvením roztoků do žluto-oranžova až oranžova (viz obrázek 16), a to pro vzorky, ke kterým byl přidán NEDD v PBS i dH_2O . Nedochovalo tedy k růžovému zbarvení roztoků s NEDD v dH_2O , jak uvádí literatura. Patrně způsobeno citlivostí metody na změnu pH. Vzhledem k tomu byla všechna následující vyhodnocení prováděna pouze se získanými absorbancemi vzorků při 490 nm, kdy pro Greiss Assay byl použit NEDD v PBS.



Obr. 16: Ukázka zbarvení testovaných roztoků vlivem Griessovy metody pro stanovení množství uvolněného NO pro vzorky sterilizované ethylenoxidem. Dávkování jednotlivých komponent: 100 μl 17 mM SA + 100 μl média s NO, o neznámé koncentraci + 0,4 mM 100 μl NEDD). (A1) PLC80, (A2) PCL43, (B1) PCL80+0,25 % SNAPs, (B2) PCL43+0,25 % SNAPs, (C1) PCL80+0,5 % SNAPs, (C2) PCL43+0,5 % SNAPs.

Dalším krokem tedy bylo proměření vzniklých roztoků spektrofotometrem (BioTek, ELx808) Proměřování probíhalo při vlnové délce 490 nm (pro NEDD v PBS), neboť vlivem definovaných parametrů stroje nelze provádět proměřování pro vlnovou délku 496 nm. Naměřené hodnoty absorbance byly poté porovnány s předem připravenými kalibračními křivkami se známými koncentracemi NO_x , čímž byla stanovena koncentrace dusitanu pro PCL vlákenné vrstvy s různým množstvím donoru NO.

5.1.2 Stanovení kalibračních křivek

Tvorba kalibračních křivek pro stanovení množství uvolňovaného NO spočívala v přípravě roztoku dusitanu sodného (NaNO_2) o molární koncentraci 1,445 mM, následným smísením s 17 mM SA a 0,4 mM NEDD v poměru 1/1/1. Tímto způsobem byly namíchány dva počáteční roztoky, kdy do jednoho byl přidán NEDD připravený v PBS a do druhého NEDD připravený v dH_2O . Takto připravené roztoky byly následně dvojnásobně ředěny na koncentrace 722.5, 361.25, 180.625, 90.313, 45.156, 22.578, 11.289 μM (viz obrázek 17). Jednotlivé roztoky obou kalibračních řad byly posléze proměřeny na spektrofotometru GBC Cintra 202 v rozsahu vlnových délek 380-780 nm. Absorbanční maxima obou kalibračních řad se pohybovala okolo hodnoty 490 nm, nikoli 496 nm, což bylo pravděpodobně způsobeno změnou pH během přípravy roztoků. Proto pro tvorbu kalibračních křivek nebyly brány hodnoty při 496 nm, ale 490 nm, které odpovídaly absorbančním maximům jednotlivých křivek, a zároveň korespondují s proměřováním odebíraných výluhů během následujících experimentů, které byly proměřovány právě při 490 nm. Získané hodnoty absorbance byly posléze vyneseny do grafu závislosti absorbance a koncentrace dusitanu sodného a lineární extrapolací byly generovány kalibrační křivky pro určení koncentrace NO v roztocích (viz příloha: 2)



Obr. 17: Kalibrační řada roztoků dusitanu sodného (NaNO_2) +SA +NEDD pro tvorbu kalibračních křivek, pro vyhodnocení množství uvolněného NO z testovaných vzorků. Molární koncentrace roztoků NaNO_2 (zleva): 1,445 mM, 722.5, 361.25, 180.625, 90.313, 45.156, 22.578, 11.289 μM .

Tvorba kalibračních křivek byla inspirována článkem (Nims et al. 1995), odlišnost je v molární koncentraci roztoku dusitanu sodného, kdy v článku bylo užito roztoku NaNO_2 o molární koncentraci $110 \mu\text{M}$. Nicméně při použití takového roztoku bylo zabarvení již počátečního roztoku velice slabé, tudíž byla koncentrace zvýšena ($1,445 \text{ mM}$).

5.2 Kinetika uvolňování NO vlivem difuze

Při těchto experimentech byly vzorky smáčeny v PBS a bylo pozorováno uvolňování NO pouze vlivem difuze, tedy bez jakéhokoliv urychlení rozpadu materiálu či podnětu pro urychlení uvolňování. V prvním experimentu bylo porovnáváno uvolňování NO u vzorků, které byly podrobeny odlišným druhům sterilizace (vzorky zcela bez sterilizace, vzorky sterilizované ethylenoxidem a vzorky sterilizované 70% ethanolom), především za účelem stanovení dopadu sterilizace na modifikaci vlákných vrstev. Další dva experimenty již byly zaměřeny pouze na nesterilní materiály a materiály sterilizované ethylenoxidem, které, jak bude uvedené níže, dosahují vyššího uvolnění NO. Vyhodnocování uvolňování NO probíhalo pomocí Griess assay a porovnání s kalibračními křivkami o známých koncentracích NO_x .

5.2.1 Kinetika uvolňování NO se zohledněním vlivu sterilizace

Materiály pro stanovení kinetik uvolňování NO ze vzorků byly označeny následovně:

- PCL 80
- PCL 80+0,25 % SNAPs
- PCL 80+0,5 % SNAPs
- PCL 43
- PCL 43+0,25 % SNAPs
- PCL 43+0,5 % SNAPs

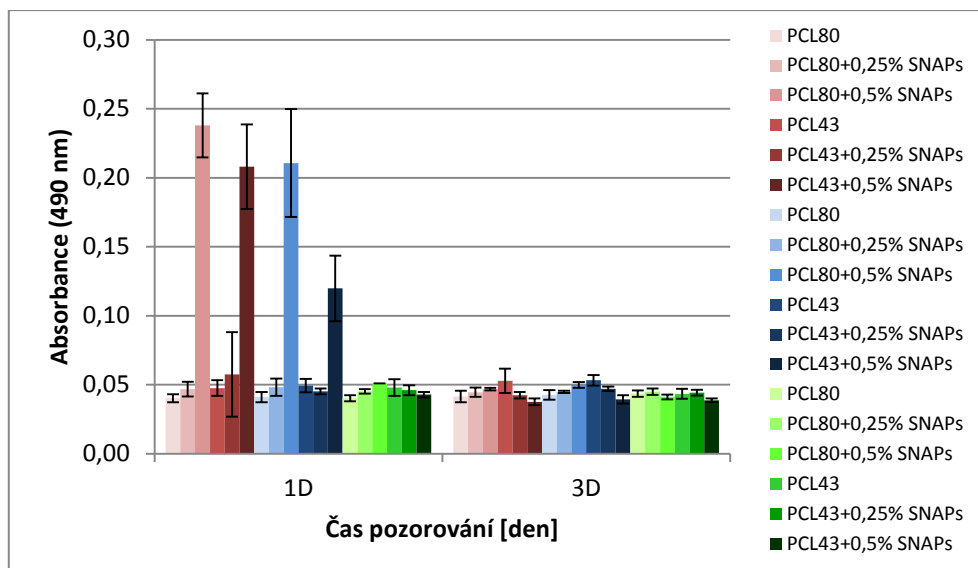
Byly připraveny 3 sady (3 typy sterilizace) po 5 vzorcích od každého materiálu. Z jednotlivých materiálů byly připraveny kruhové vzorky o průměru 1 cm a byly vloženy do 24jamkové kultivační destičky, následně byly vystaveny sterilizaci. Poté byly do každé jamky přidány 3 ml PBS ($\text{pH}=7,4$) a vzorky byly vloženy do inkubátoru temperovaného na teplotu 37°C . Výluhy pro jednotlivé vzorky byly pravidelně odebrány po 24 hodinách (1D), vzorky byly doplněny o nové PSB

a po 72 hodinách (3D) byly výluhy opět odebrány. Sebraná média pak byla použita pro stanovení uvolňování NO pomocí Griess assay (viz kapitola 5.1.1) pro všechny typy sterilizace.

Získané hodnoty absorbancí byly vyneseny pro všechny typy sterilizací do společného grafu (viz obr. 18.). Hodnoty molárních koncentrací uvolněného NO, stanovené dle kalibračních křivek, byly poté zaznamenány do tabulky 2-4. Samostatné grafy pro jednotlivé druhy sterilizací lze nalézt v příloze 3.

Výsledky uvolňování NO v závislosti na druhu sterilizace

Z výsledků je patrné, že k největšímu uvolňování dochází pouze první den, kdy jsou hodnoty absorbance, potažmo koncentrace NO nejvyšší. Třetí den jsou hodnoty absorbancí u všech vzorků (i nemoifikovaných) téměř srovnatelné, v některých případech dokonce absorbance u modifikovaných materiálů dosahují hodnot nižších a k uvolňování tedy již nedochází. Je ale zřejmé, že u vzorků sterilizovaných 70 % ethanolem k uvolňování nedochází prakticky vůbec, což je pravděpodobně způsobeno vymytím donorů NO během sterilizace. Proto je možné shledat 70% ethanol jako nevhodný typ sterilizace pro tyto aplikace. Vzorky nesterilizované a sterilizované ethylenoxidem dosahovaly daleko vyšších hodnot absorbancí. Nejvyšší hodnota koncentrace NO byla zaznamenána u nesterilního PCL80+0,5 % SNAPs (989 μM), následovaly absorbance u PCL80+0,5% SNAPs (848 μM) vysterilizovaného ethylenoxidem a nesterilního PCL43+0,5 % SNAPs (753 μM). Hodnota koncentrace NO z PCL43+0,5 % SNAPs vysterilizovaného ethylenoxidem potom byla téměř poloviční (352 μM) oproti PCL80+0,5 % SNAPs, podrobeného téže sterilizaci. U PCL80+0,25 % SNAPs a PCL43+0,25 % SNAPs, nesterilních vzorků i sterilizovaných ethylenoxidem, byl pozorován zcela minimální nárůst uvolněného NO oproti nemoifikovaným vrstvám. Není tedy možné říci, že byla zaznamenána rostoucí tendence absorbance v závislosti na koncentraci SNAPs.



Obr. 18: Výsledky kinetiky uvolňování NO ze vzorků po 1 a 3 dnech pro všechny druhy sterilizace. Naměřené hodnoty absorbancí byly získány na základě Griess Assay a proměření jednotlivých roztoků při vlnové délce 490 nm. Odstíny růžové – vzorky bez sterilizace, odstíny modré – vzorky sterilizované ethylenoxidem, odstíny zelené – vzorky sterilizované 70% ethanolem.

Tab. 2: Naměřené hodnoty absorbancí a příslušné hodnoty molárních koncentrací NO, uvolněného z nesterilních vzorků.

1D	Průměrná absorbance	Průměrná molární koncentrace NO [μM]	Směrodatná odchylka [μM]	Průměrná molární koncentrace NO [μM] (po odečtení slepých vzorků)
PCL80	0,040	201,000	14,967	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,047	234,000	26,344	33,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,238	1190,000	115,715	989,000
PCL43	0,048	238,000	28,566	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,057	287,000	48,847	49,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,208	1040,000	152,938	753,000
3D				
PCL80	0,041	207	20,881	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,045	223	16,310	16,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,047	234	4,899	27,000
PCL43	0,053	264	44,204	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,042	212	6,782	0,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,038	188	12,083	0,000

Tab. 3: Naměřené hodnoty absorbancí a příslušné hodnoty molárních koncentrací NO, uvolněného ze vzorků, vysterilizovaných ethylenoxidem.

1D	Průměrná absorbance	Průměrná molární koncentrace NO [μM]	Směrodatná odchylka [μM]	Průměrná molární koncentrace NO [μM] (po odečtení slepých vzorků)
PCL80	0,0410	205,0000	18,7083	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,0482	241,0000	30,8869	36,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,2106	1053,0000	195,4891	848,000
PCL43	0,0494	247,0000	24,0000	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,0452	226,0000	10,6771	0,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,1198	599,0000	118,6339	352,000
3D				
PCL80	0,0426	213,0000	17,4929	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,0448	224,0000	3,7417	11,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,0498	249,0000	10,6771	36,000
PCL43	0,0532	266,0000	19,3391	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,047	235,0000	7,7460	0,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,0394	197,0000	15,0333	0,000

Tab. 4: Naměřené hodnoty absorbancí a příslušné hodnoty molárních koncentrací NO, uvolněného ze vzorků, vysterilizovaných 70 % ethanolem.

1D	Průměrná absorbance	Průměrná molární koncentrace NO [μM]	Směrodatná odchylka [μM]	Průměrná molární koncentrace NO [μM] (po odečtení slepých vzorků)
PCL80	0,0402	201,0000	10,6771	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,0452	226,0000	8,6023	25,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,0510	255,0000	0,0000	54,000
PCL43	0,0480	240,0000	30,4959	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,0460	230,0000	17,6068	0,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,0428	214,0000	9,6954	0,000
3D				
PCL80	0,0436	218,0000	11,2250	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,0450	225,0000	11,4018	7,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,0412	206,0000	8,6023	0,000
PCL43	0,0434	217,0000	17,7764	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,0442	221,0000	10,1980	4,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,0388	194,0000	5,8310	0,000

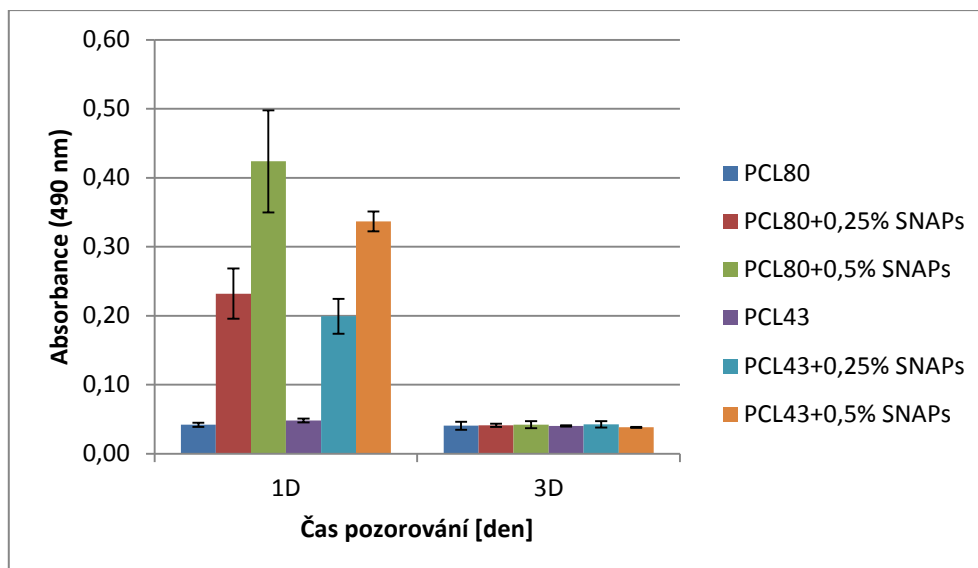
5.2.2 Kinetika uvolňování NO z nesterilních materiálů

Označení materiálů zůstalo stejné jako u předešlého experimentu. Nicméně nyní bylo připraveno po 4 nesterilních vzorcích od každého materiálu o navážce 50 ± 5 mg (hmotnosti jednotlivých vzorků viz příloha 4A). Ty byly vloženy do 15ml plastových zkumavek. Do každé bylo následně přidáno 10 ml PBS a vzorky byly umístěny do inkubátoru a při teplotě 37°C byly smáčeny po dobu 24 hodin (1D). Poté byly výluhy jednotlivých vzorků odebrány. Vzorky byly opatřeny novým PBS a postup se opakoval, s tím rozdílem, že výluhy byly sebrány až 3 den od začátku experimentu.

Postup vyhodnocení zůstal naprosto stejný. Získané hodnoty absorbance byly opět vyneseny do grafu (viz obr. 19) a hodnoty molárních koncentrací uvolněného NO, stanovené dle kalibračních křivek, byly zaznamenány do tabulky 5.

Výsledky uvolňování NO z nesterilních materiálů

Z výsledků je patrné, že k uvolňování dochází opět pouze první den, neboť dosažené hodnoty absorbancí u modifikovaných vrstev jsou třetí den srovnatelné s hodnotami nemodifikovaných vrstev, některé jsou dokonce nižší. Po prvním dni je ovšem patrná rostoucí tendence absorbance v závislosti na koncentraci SNAPs, což je pozorovatelné pro PCL80 i PCL43. Porovnáme-li jednotlivé PCL mezi sebou, pak vyšších hodnot koncentrací uvolněného NO, po jednom dni, dosahovaly materiály z PCL80+0,25 % SNAPs ($950 \mu\text{M}$) a PCL80+0,5 % SNAPs ($1908,75 \mu\text{M}$) oproti PCL43+0,25 % SNAPs ($755 \mu\text{M}$) a PCL43+0,5 % SNAPs ($1442,5 \mu\text{M}$). Uvedené hodnoty byly získány odečtením hodnot molárních koncentrací, příslušející nemodifikovaným vzorkům, které neobsahují žádné donory NO. Přihlédneme-li však ke směrodatným odchylkám, pak jsou rozdíly mezi jednotlivými PCL výrazně menší.



Obr. 19: Výsledky kinetiky uvolňování NO z nesterilních vzorků (o navážce 50 ± 5 mg) po 1 a 3 dnech. Naměřené hodnoty absorbancí byly získány na základě Griess assay a proměření jednotlivých roztoků při vlnové délce 490 nm.

Tab. 5: Naměřené hodnoty absorbancí a příslušné hodnoty molárních koncentrací NO, uvolněného z nesterilních vzorků.

1D	Průměrná absorbance	Průměrná molární koncentrace NO [μ M]	Směrodatná odchylka [μ M]	Průměrná molární koncentrace NO [μ M] (po odečtení slepých vzorků)
PCL80	0,042	210,000	14,577	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,232	1160,000	182,037	950,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,424	2118,750	370,141	1908,750
PCL43	0,048	241,250	13,405	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,199	996,250	126,312	755,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,337	1683,750	72,144	1442,500
3D				
PCL80	0,0405	202,500	27,951	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,0413	206,250	11,388	3,750
PCL80+0,5 % SNAPs	0,0423	211,250	25,830	8,750
PCL43	0,0403	201,250	4,146	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,0425	212,500	23,585	11,250
PCL43+0,5 % SNAPs	0,0383	191,250	4,146	0,000

5.2.3 Kinetika uvolňování NO ze sterilních materiálů (ethylenoxid)

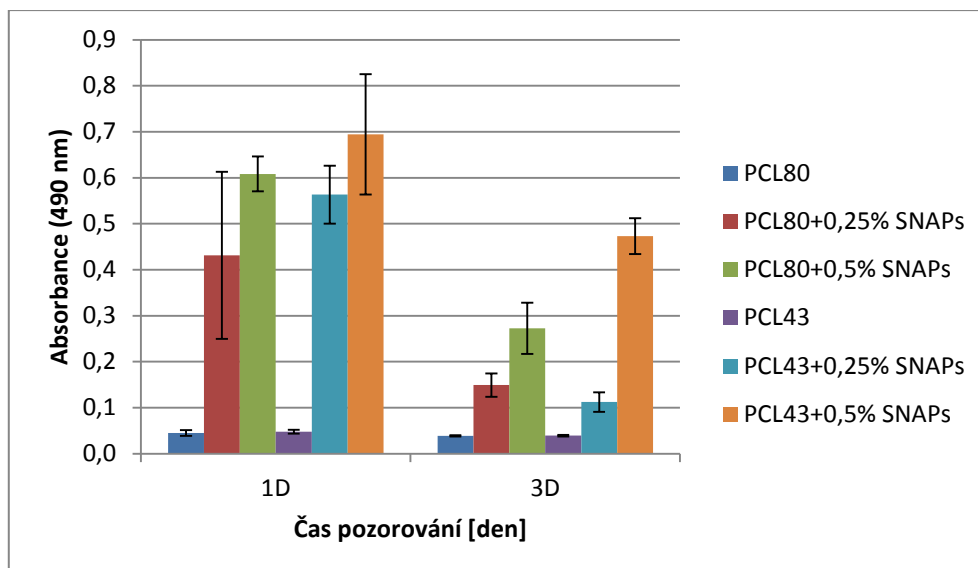
Značení materiálů zůstalo stejné jako v předešlých experimentech. Od každého materiálu vysterilizovaného ethylenoxidem bylo připraveno po 5 vzorcích o navážce 100 ± 5 mg (hmotnosti jednotlivých vzorků viz příloha 4B), které byly opět vkládány do 15ml plastových zkumavek. Vyšší hmotnost vzorků oproti předchozímu experimentu byla zvolena z důvodu sníženého uvolňování NO vlivem sterilizace ethylenoxidem. Množství přidaného PBS, intervaly jeho výměny i odebrání výluhů zůstaly stejné jako v předchozím případě.

Postup vyhodnocení opět spočíval ve stanovení absorbancí jednotlivých roztoků pomocí Griessovy metody a proměření na spektrofotometru. Získané hodnoty byly poté vyneseny do grafu na obrázku 20 a určené molární koncentrace NO byly zaznamenány do tabulky 6.

Výsledky uvolňování NO ze sterilních materiálů

V případě tohoto experimentu, kdy navážka vzorků byla vyšší oproti předešlému experimentu, je patrné, že k uvolňování NO docházelo po celou dobu sledování. Vyšších hodnot absorbancí, potažmo koncentrací uvolněného NO, bylo dosaženo opět první den experimentu, třetí den již byly hodnoty nižší. I zde je patrná vzrůstající tendence absorbance v závislosti na koncentraci SNAPs. Porovnáme-li opět PCL80 a PCL43, pak v tomto experimentu dosahovaly vyšších hodnot koncentrací NO materiály z PCL43.

Nejvyšších hodnot dosahovaly vzorky PCL43+0,5% SNAPs ($3235 \mu\text{M}$) a PCL80+0,5 % SNAPs ($2817 \mu\text{M}$), nižších hodnot pak dosahovaly vzorky PCL43+0,25% SNAPs ($2578 \mu\text{M}$) a PCL80+0,25 % SNAPs ($1930 \mu\text{M}$). Třetí den vykazoval podobný trend, nejvyšších hodnot opět dosahovaly vzorky PCL43+0,5% SNAPs ($2169 \mu\text{M}$) a PCL80+0,5 % SNAPs ($2817 \mu\text{M}$), vzorky s obsahem 0,25% SNAPs pak dosahovaly hodnot nižších, nicméně nastala změna, kdy vyšší hodnoty v tomto případě dosahoval PCL80 ($552 \mu\text{M}$) a PCL43 dosahoval koncentrace NO $360 \mu\text{M}$.



Obr. 20: Výsledky kinetiky uvolňování NO ze vzorků, vysterilizovaných ethylenoxidem (o navážce 100 ± 5 mg) po 1 a 3 dnech. Naměřené hodnoty absorbance byly získány na základě Griess assay a proměření jednotlivých roztoků při vlnové délce 490 nm.

Tab. 6: Naměřené hodnoty absorbancí a příslušné hodnoty molárních koncentrací NO, uvolněného ze vzorků, vysterilizovaných ethylenoxidem

1D	Průměrná absorbance	Průměrná molární koncentrace NO [μ M]	Směrodatná odchylka [μ M]	Průměrná molární koncentrace NO [μ M] (po odečtení slepých vzorků)
PCL80	0,045	225,000	31,464	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,431	2155,000	908,091	1930,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,608	3042,000	190,594	2817,000
PCL43	0,048	238,000	20,881	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,563	2816,000	305,228	2578,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,695	3473,000	556,090	3235,000
3D				
PCL80	0,0388	194,000	8,602	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,1492	746,000	125,674	552,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,2726	1363,000	277,968	1169,000
PCL43	0,0392	196,000	8,000	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,1124	562,000	105,906	366,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,4730	2365,000	193,701	2169,000

5.3 Stanovení kinetiky uvolňování NO během degradace PCL materiálů

V tomto experimentu byla sledována kinetika uvolňování během degradace materiálů pomocí enzymu (Lipáza), který výrazně urychlil rozpad materiálů vlivem hydrolytického štěpení PCL řetězců. Průběh degradace byl hodnocen na základě hmotnostních úbytků jednotlivých materiálů během degradace a pomocí SEM analýzy. Kinetika uvolňování NO byla stanovena pomocí Griess assay a následného porovnání s předem připravenými kalibračními křivkami o známých koncentracích NO_x .

Materiály a metodika pro enzymatickou degradaci

Označení testovaných materiálů opět zůstalo stejné jako u předešlých experimentů. Z jednotlivých materiálů (sterilizace ethylenoxidem) byly nastříhány vzorky o navážce 50 ± 5 mg, následně byly vkládány do 15ml zkumavek. Poté bylo k vzorkům přidáno degradační médium, které sestávalo z enzymu – Lipáza (Sigma Aldrich, 30 U/mg) o koncentraci 4 U/ml, rozmíchaného v 5 ml PBS (pH= 7,4) s přidavkem azidu sodného (0,02 hm%), jakožto antibakteriální činidlo. Testované vzorky, zcela ponořené v médiu, byly následně umístěny do inkubátoru a byly inkubovány při konstantní teplotě 37°C po celou dobu experimentu. Degradační médium pak bylo každých 24 hodin po dobu 5 nebo 3 dní (v závislosti na experimentu) odebíráno (pro studium kinetiky uvolňování) a nahrazováno čerstvým, takže aktivita enzymu byla po celou dobu udržována na požadované úrovni. Spolu s degradačními médii byly každý den odebírány i vzorky k tomu určené (3 pro první experiment, 2 pro druhý experiment), ty byly pečlivě opláchnuty destilovanou vodou a následně sušeny. Tyto vzorky pak sloužily pro studium hmotnostního úbytku během degradace u jednotlivých materiálů, dále pro SEM analýzu k porovnání povrchových změn vlákných vrstev. Jako negativní kontroly byly použity vzorky jednotlivých materiálů, které byly smáčeny pouze v PBS. Sloužily tedy jako reference k porovnání povrchových změn degradovaných materiálu. Zároveň média odebíraná od negativních kontrol, kde docházelo k uvolňování pouze vlivem difuze, sloužila jako reference k porovnání uvolňování NO z modifikovaných materiálů vlivem degradace.

Byly provedeny dva experimenty enzymatické degradace, neboť azid sodný, přidávaný do PBS, použitého pro přípravu degradačního média, s největší

pravděpodobností blokuje Griess assay, a znemožňuje tak studium kinetiky uvolňování NO z modifikovaných materiálů vlivem degradace. První experiment, který probíhal po dobu 5 dní, tedy přinesl pouze výsledky o degradaci materiálů (analýza hmotnostních úbytků a SEM analýza), nikoli o kinetice uvolňování NO. Proto byl proveden další, zkrácený experiment, který probíhal pouze po dobu 3 dní. Pro tento experiment bylo pro přípravu degradačních médií využíváno PBS (pH=7,4) bez přídavku azidu sodného. PBS bylo před použitím pouze přefiltrováno přes stříkačkový filtr.

Výsledky enzymatické degradace

Vyhodnocení průběhu enzymatických degradací bylo provedeno pomocí analýzy hmotnostních úbytků v průběhu degradace a SEM analýzy, pomocí níž bylo možné porovnat změny struktury vláken vlivem hydrolytického štěpení způsobené lipázou.

Degradace pomocí roztoku lipázy v PBS s azidem sodným

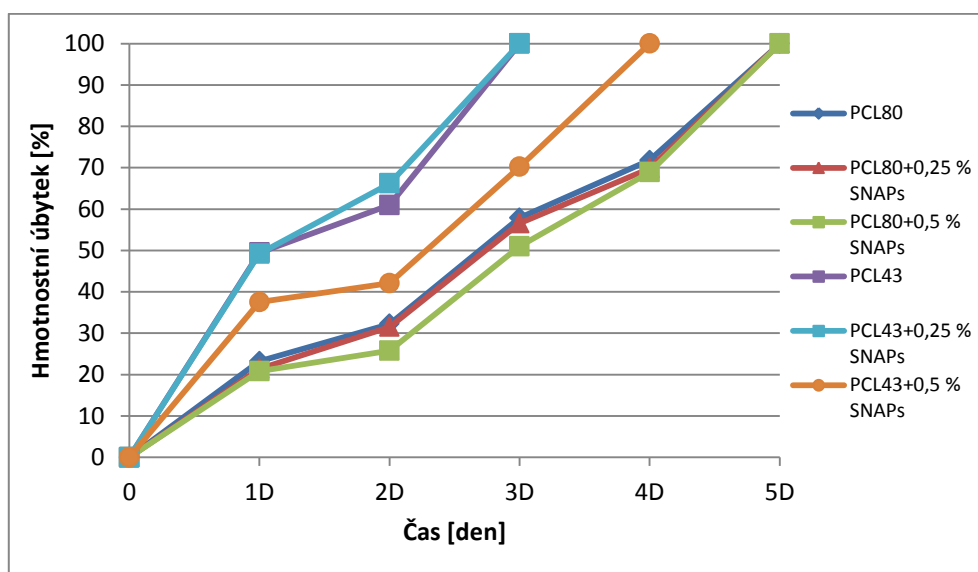
- **Analýza hmotnostních úbytků**

Vážením odebíraných vzorků a porovnáním s jejich původní hmotností, byly stanoveny hmotnostní úbytky pro jednotlivé materiály. Hodnoty úbytků uváděných v % shrnuje tabulka 7. Průběh změny hmotností pro testované vzorky během degradace, vykresluje graf na obrázku 21. Z těchto výsledků je patrné, že rychleji degraduje PCL s nižší molekulovou hmotností, kdy PCL43 a PCL 43+0,25 % SNAPs dosáhl po prvním dni 50% úbytku na hmotnosti, následující den to byla ztráta více jak 60% a třetí den dosáhl ztráty 100%. PCL43+0,5 % SNAPs degradoval o něco málo pomaleji, 50% úbytku dosáhl až druhý den, třetí den činila ztráta jeho hmotnosti 70% a čtvrtý den byl zcela zdegradován. U PCL 80, PCL80+0,25 % SNAPs a PCL80+0,5 % SNAPs probíhala degradace velmi podobně, nicméně 50% úbytku na hmotnosti bylo dosaženo třetí den degradace, čtvrtý den pak úbytek činil 70% a pátý den dosáhly materiály 100% hmotnostního úbytku.

Nebylo tedy zaznamenáno, že by rozdílné koncentrace SNAPs nějak ovlivňovaly enzymatickou degradaci, ve smyslu pomalejší degradace se vzrůstající hodnotou koncentrace SNAPs.

Tab. 7: Hodnoty hmotnostních úbytků pro materiály podrobené enzymatické degradaci pomocí lipázy.

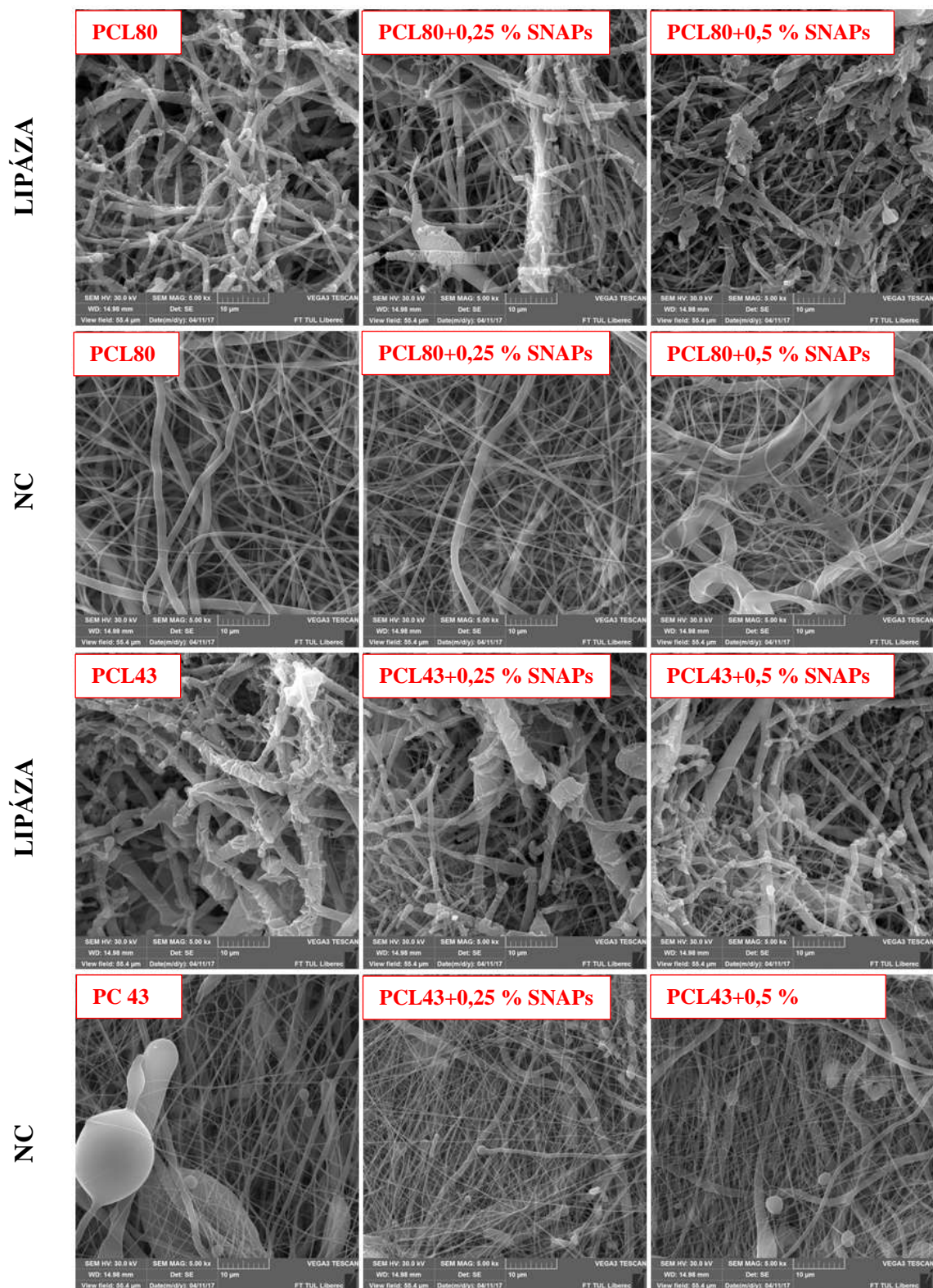
Materiál	Hmotnostní úbytky [%]				
	1D	2D	3D	4D	5D
PCL80	23,22	32,22	57,86	71,80	100,00
PCL80+0,25 % SNAPs	21,40	31,54	56,54	69,80	100,00
PCL80+0,5 % SNAPs	20,79	25,74	50,99	68,89	100,00
PCL43	49,47	60,94	100,00	-	-
PCL43+0,25 % SNAPs	49,22	66,17	100,00	-	-
PCL43+0,5 % SNAPs	37,51	42,08	70,19	100,00	-



Obr. 21: Graf zachycující hmotnostní úbytky jednotlivých materiálů vlivem enzymatické degradace (Lipáza o koncentraci 4 U/ml degradačního roztoku) po 1, 2, 3, 4 a 5 dnech.

- SEM analýza

Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (VEGA3 Tescan) dokládají, že morfologie vláken během degradace se výrazně mění, což lze pozorovat na obrázku 22 (snímky po dvou dnech degradace; ostatní snímky viz příloha 5A). U obou typů materiálu bylo možné v průběhu enzymatické degradace pozorovat rekrystalizaci a lámání vláken, kdežto u negativních kontrol (materiály smáčené pouze v PBS bez přístupu lipázy) zůstávala vlákna hladká, nepolámaná a bez defektů (krátery, jamky).



Obr. 22: SEM analýza testovaných vzorků. Snímky po 2 dnech degradace vlivem Lipázy + NC pro všechny vláknenné materiály. Zvětšení 5000x.

Degradace pomocí roztoku lipázy v PBS bez azidu sodného

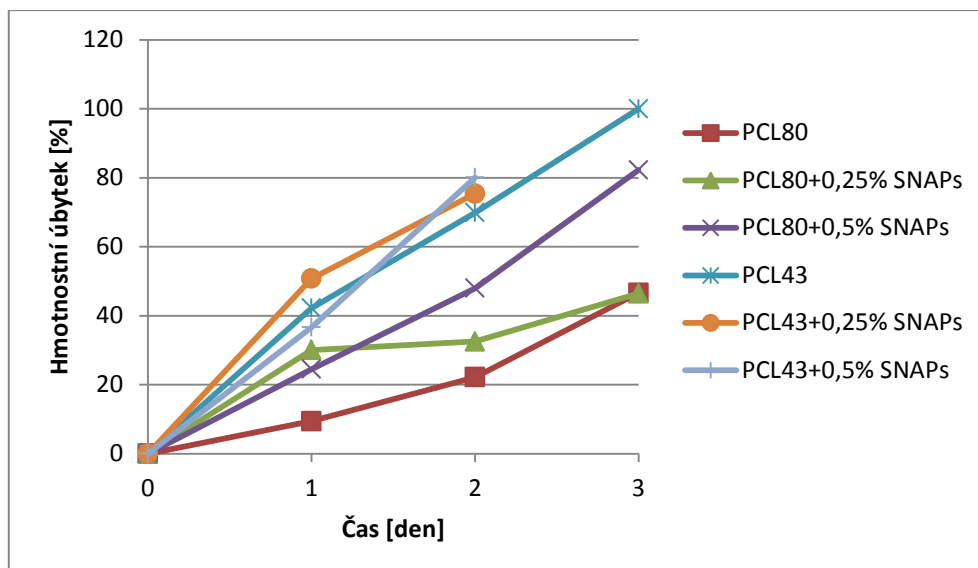
Vyhodnocení probíhalo stejným způsobem jako v předešlém případě, opět byla provedena analýza hmotnostních úbytků testovaných materiálů a SEM analýza.

- **Analýza hmotnostních úbytků**

Hodnoty úbytků uváděných v % shrnuje tabulka 8. Průběh změny hmotností pro testované vzorky během degradace, vykresluje graf na obrázku 23. Výsledky ukazují, že průběh degradace byl velmi podobný jako v předchozím experimentu, kdy opět rychleji degradoval PCL43, PCL43+0,25% SNAPs a PCL43+0,5 % SNAPs, kdy druhý den všechny materiály vyhazovaly úbytky na hmotnosti v rozmezí 70-80 %, kdy pro PCL43+0,25 % SNAPs a PCL43+0,5 % SNAPs byl experiment ukončen, neboť vzorky již byly téměř zdegradovány. PCL43 pak třetí den vykazoval absolutní ztrátu na hmotnosti. Zatímco PCL80 a PCL80+0,25 % SNAPs dosáhl poslední den degradačního pokusu hmotnostního úbytku necelých 50 %, nicméně PCL80+0,5 % SNAPs vykazoval třetí den degradace ztrátu na hmotnosti 82 %. To mohlo být způsobeno vyšší nehomogeností vlákných vrstev z PCL o molekulové hmotnosti 80 tis g·mol⁻¹, případně těsnějším navinutím vzorků PCL80 a PCL80+0,25 % SNAPs při vkládání do zkumavek, což způsobilo nižší pronikání enzymu k materiálu, tím tedy nižší míru degradace.

Tab. 8: Hodnoty hmotnostních úbytků pro materiály podrobené enzymatické degradaci pomocí lipázy (PBS bez přídavku azidu sodného)

Materiál	Hmotnostní úbytky [%]		
	1D	2D	3D
PCL80	9,44	22,20	46,63
PCL80+0,25 % SNAPs	30,05	32,51	46,44
PCL80+0,5 % SNAPs	24,48	47,95	82,28
PCL43	42,20	69,86	-
PCL43+0,25 % SNAPs	50,74	75,37	-
PCL43+0,5 % SNAPs	36,65	80,08	100,00



Obr. 23: Graf zachycující hmotnostní úbytky jednotlivých materiálů vlivem enzymatické degradace (Lipáza o koncentraci 4 U/ml degradačního roztoku) po 1, 2 a 3 dnech.

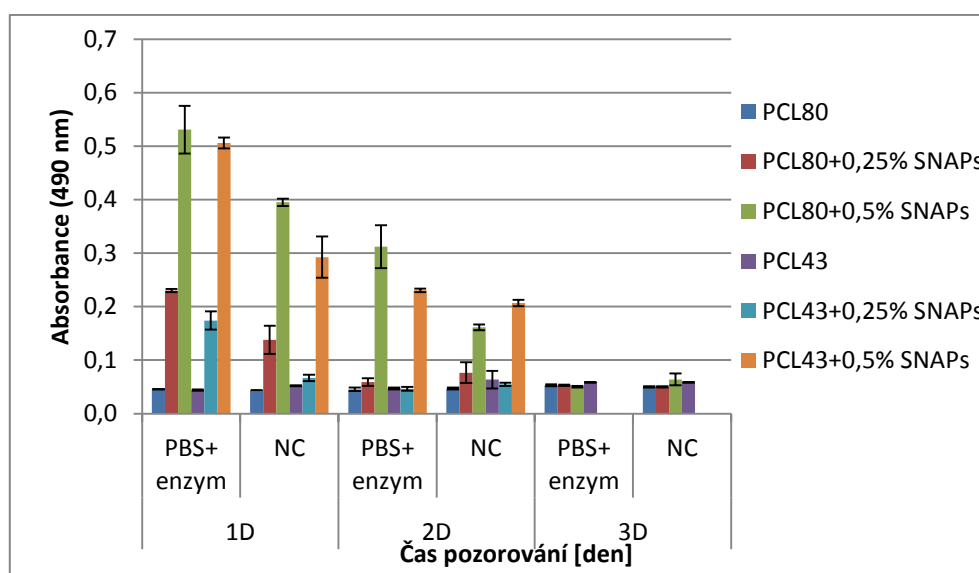
- **SEM analýza**

I zde byla potvrzena měnící se morfologie PCL vláken vlivem účinků degradace. U obou typů materiálů bylo opět možné pozorovat rekrystalizaci, lámání a defekty, vznikající na vláknech, v porovnání se strukturou vláken negativních kontrol. Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu mapující průběh 3denní degradace je možné nalézt v příloze 5B.

Výsledky uvolňování NO pro materiály vystavené degradaci

Vyhodnocení kinetiky uvolňování NO z materiálů probíhalo pomocí Griess assay a následného proměření zbarvených roztoků pomocí spektrofotometru při vlnové délce 490 nm. Vzhledem k tomu, že byly proměřovány degradační média, ale i média negativních kontrol (viz obrázek 24), bylo následně možné stanovit uvolňování NO vlivem degradace. Hodnoty absorbancí naměřené pro negativní kontroly byly odečteny od hodnot absorbancí naměřených pro degradované vzorky. Výsledkem tohoto rozdílu bylo stanovení absorbancí, potažmo koncentrací uvolněného NO pouze vlivem degradace. Tyto hodnoty pak byly vyneseny do grafu (viz příloha 5C) a zaneseny do tabulky 9.

Z těchto výsledků je patrné, že degradace opravdu napomáhá intenzivnějšímu uvolňování NO oproti pouhému uvolňování vlivem difuze. Vyšší koncentrace uvolněného NO vlivem degradace lze pozorovat u obou testovaných materiálů pro obě koncentrace přidaných SNAPs. Po prvním dni degradace dosáhly nejvyšší hodnoty uvolněného NO vzorky PCL80+0,25 % SNAPs (1462,5 μM) a PCL430+0,5 % SNAPs (1107,5 μM). Zhruba polovičních hodnot oproti výše zmíněným dosahovaly vzorky PCL80+0,5 % SNAPs (672,5 μM) a PCL43+0,25 % SNAPs (575 μM). Vyšší hodnota koncentrace NO u PCL80+0,25 % SNAPs oproti PCL80+0,5 % SNAPs byla pravděpodobně způsobena vyšším účinkem degradace, což dokládají hmotnostní úbytky uvedené v tab. 8. Druhý den degradace pak docházelo k uvolňování NO bez vlivu difuze pouze u PCL80+0,5 % SNAPs a PCL43+0,5 % SNAPs, což je pravděpodobně dáno vyšší koncentrací SNAPs. Navíc u obou zmíněných materiálů byly zaznamenány, oproti ostatním materiálům, vyšší hodnota hmotnostních úbytky, tudíž lze přepokládat, že uvolňování NO opravdu způsobil rozpad materiálů v důsledku enzymatické degradace. Třetí den již nedocházelo k uvolňování NO účinkem degradace vůbec, neboť naměřené hodnoty absorbancí, potažmo koncentrací NO dosahovaly přibližně stejných hodnot. V některých případech byly dokonce hodnoty koncentrací pro negativní kontroly vyšší, tudíž po odečtení od hodnot naměřených pro degradované vzorky, byly stanoveny záporné hodnoty koncentrací uvolněného NO, které byly brány jako nula.



Obr. 24: Výsledky kinetiky uvolňování NO ze vzorků (o navážce 50 ± 5 mg) během enzymatické degradace (vzorky +PBS +Lipáza o koncentraci 4 U/ml) a vlivem difuze (NC - vzorky + PBS) po 1, 2 a 3 dnech.

Tab. 9: Průměrné hodnoty molárních koncentrací uvolňovaného NO vlivem degradace s vyloučením vlivu difuze.

1D	Průměrná molární koncentrace NO [μM] (po odečtení slepých vzorků)		
	Degradace (PBS + enzym)	Difuze (NC)	Rozdíl
PCL80	0	0	0
PCL80+0,25% SNAPs	1932,5	470	1462,5
PCL80+0,5% SNAPs	2427,5	1755	672,5
PCL43	0	0	0
PCL43+0,25% SNAPs	650	75	575
PCL43+0,5% SNAPs	2310	1202,5	1107,5
2D			
PCL80	0	0	0
PCL80+0,25% SNAPs	67,5	147,5	-80
PCL80+0,5% SNAPs	1452,5	572,5	880
PCL43	0	0	0
PCL43+0,25% SNAPs	0	0	0
PCL43+0,5% SNAPs	917,5	717,5	200
3D			
PCL80	0,000	0	0
PCL80+0,25% SNAPs	0,000	0	0
PCL80+0,5% SNAPs	0,000	50	-50,000
PCL43	0,000	0	0

6 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ PCL VLÁKENNÝCH VRSTEV, MODIFIKOVANÝCH POMOCÍ SNAPs

6.1 *In vitro* testování materiálů s endotelovými buňkami

Elektrostaticky zvlákněné vrstvy PCL o dvou různých molekulových hmotnostech (80 a 43 tisíc $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) obohacené donory NO (SNAPs) v koncentracích 0, 0,25 a 0,5% byly podrobeny *In vitro* testování s endotelovými buňkami, aby byl zjištěn vliv uvolňujícího se NO na nasazené buňky.

Materiály a metody kultivace scaffoldů s endotelovými buňkami

- **PCL vzorky**

Materiály pro *In vitro* testování byly označeny stejně jako v případě vyhodnocování kinetik uvolňování z daných vrstev, tedy:

- PCL80
- PCL80+0,25 % SNAPs
- PCL80+0,5 % SNAPs
- PCL43
- PCL43+0,25 % SNAPs
- PCL43+0,5 % SNAPs

Před nasazením buněk byly materiály nařezány na kruhové vzorky o průměru 1 cm a vloženy do 24jamkových destiček a následně vysterylizovány ethylenoxidem (parametry sterilizace viz kapitola 4.4.1). Během kultivace byly materiály zatíženy skleněnými kroužky, aby bylo zabráněno plování vzorků, které je způsobeno vlivem hydrofobnosti PCL.

- **Endotelové buňky, jejich nasazení a kultivace**

Lidské endotelové buňky pupečních cév - Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) byly kultivovány v basálním médiu pro endotelové buňky (EBM-2, Lonza) doplněném o růstové médium pro endotelové buňky (EGM-2 Single Quots), obsahující lidský epidermální růstový faktor [hEGF], Hydrokortison, bovinní mozkový extrakt [BBE], kyselinu askorbovou, fetální bovinní sérum [FBS]

a Gentamicin/Amphotericin-B [GA]. Buňky byly umístěny ve zvlhčovaném inkubátoru při atmosféře 5% CO₂ a 37°C. Ve chvíli, kdy se buňky staly konfluentními, byly suspendovány použitím trypsinu-EDTA (Lonza). Následně byly endotelové buňky (pasáž 8) nasazeny na svrchní plochu vzorků v hustotě 1·10⁴ buněk na jamku. Vzorky byly analyzovány po 1 dni a 7 dnech kultivace za použití fluorescenční a elektronové rastrovací mikroskopie (vždy po 1 vzorku od každého materiálu). Pro stanovení viability buněk byl proveden metabolický test MTT (po 3 vzorcích). Jako negativní kontroly byly vzaty vzorky, které byly smočeny pouze v kompletním médiu bez buněk (po 1 vzorku).

- **MTT test**

Buněčná viabilita nasazených buněk na testovaných vzorcích byla testována metabolickým MTT testem po 1 a 7 dnech kultivace. Tato metoda je založena na redukci solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan, který vytvoří nerozpustné fialové krystalky. Redukce je způsobena mitochondriální dehydrogenázou, což značí normální metabolismus. 250 µl MTT roztoku bylo přidáno k 750 µl kompletního média a vzorky byly inkubovány podobu 4 hodin. Formazanové krystalky byly následně rozpuštěny přidáním okyseleného isopropanolu, a tím došlo k zabarvení buněčné suspenze. Zabarvené suspenze byly následně spektrofotometricky vyhodnocovány při vlnové délce 570 nm (referenční vlnová délka 650 nm), kdy hodnota naměřené absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk. Čím tmavší zbarvení roztok má, tím vyšší procento živých buněk obsahoval. Pro každý testovací den bylo proměřováno po 3 vzorcích elektrostaticky zvlákněných vrstev + jedna negativní kontrola od každého materiálu, které byly inkubovány s roztokem MTT. Naměřené hodnoty absorbance negativních kontrol byly odečítány od testovaných vzorků. Průměrné hodnoty absorbance ± standardní odchylka byly vyneseny do grafu porovnávající viabilitu buněk kultivovaných na všech testovaných materiálech.

- **Analýza pomocí fluorescenční mikroskopie**

Analýza pomocí fluorescenční mikroskopie (FM) probíhala opět po 1 a 7 dnech. Vzorky byly vždy dvakrát propláchnuty v PBS a fixovány 2,5 % glutaraldehydem

po dobu 15 minut. Poté byl přidán 0,1 % Triton X-100 v 0,1 % BSA (hovězí sérový albumin) v PBS, který byl použit jako blokovací pufr po dobu 10 minut. Vzorky byly zabarvené pomocí phalloidin-FITC, který se váže na aktinové filamenty v zelené oblasti spektra. Roztok DAPI byl použit pro barvení buněčných jader v modré oblasti spektra. Zabarvené buňky byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse. Pro celkové porovnání byl stanoven počet buněk na 1 mm² testovaných vzorků, který byl stanoven z 10 zorných polí (objektiv 10x) pomocí softwaru MATLAB. Následně byla získaná data vynesena do grafu ukazujícího průměrnou \pm standardní odchylka počtu buněk na plochu.

- **SEM**

Příprava vzorků pro SEM analýzu probíhala tak, že vzorky byly nejprve dvakrát propláchnuty v PBS a fixovány 2,5 % glutaraldehydem po dobu 15 minut při 4 °C. Následně byly vzorky dehydratovány vlivem stupňující se ethanolové řady (60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % a 100%). Po kompletním vysušení vzorků byly materiály umístěny na terčíky, pozlaceny 7 nm silnou vrstvou a analyzovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (Vega 3 TESCAN).

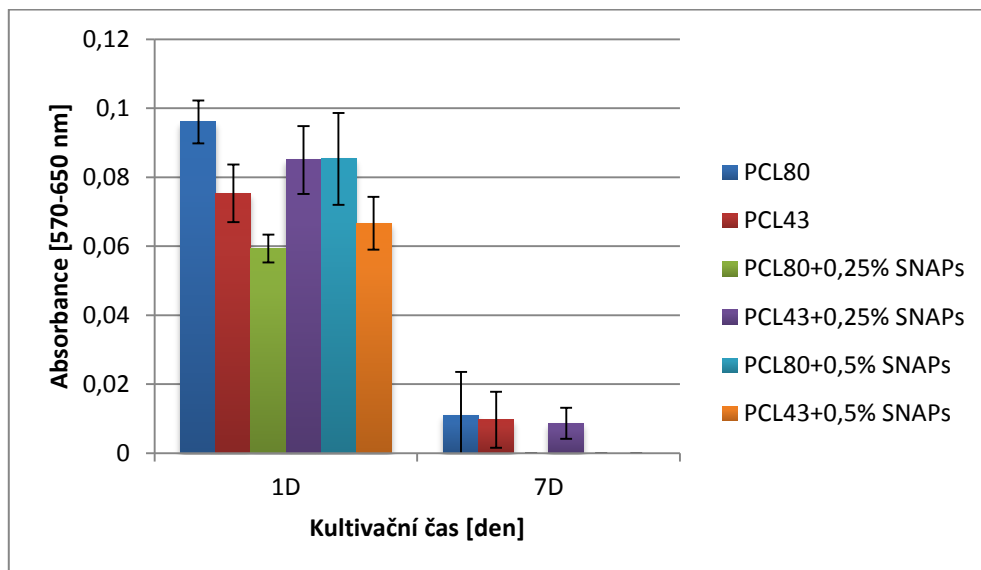
Výsledky kultivace a hodnocení cytokompatibility

Elektrostaticky zvlákněné PCL vrstvy modifikované donorem uvolňující NO byly osázeny endotelovými buňkami a cytokompatibilita těchto materiálů byla vyhodnocena kombinací metod pro měření buněčné viability (MTT test), počet buněk na plochu scaffoldu (FM) a interakce nasazených buněk s vláknennými vrstvami (SEM).

- **MTT test**

Buněčná životaschopnost byla stanovena pomocí metabolického testu (MTT), a to po 1 a 7 dnech inkubace endotelových buněk s testovanými vláknennými vrstvami., kdy získané průměrné hodnoty absorbance (po odečtení hodnot absorbance negativních kontrol) jsou obrazem buněčné viability buněk. Buněčná viabilita byla v obou testovacích dnech velmi nízká, po 7 den kultivace bylo téměř nemožné hodnoty viability stanovit, některé byly dokonce pod detekčním limitem, viz obr. 25. První den po nasazení buněk, poklesla jejich viabilita u vzorků se zvýšeným obsahem SNAPS,

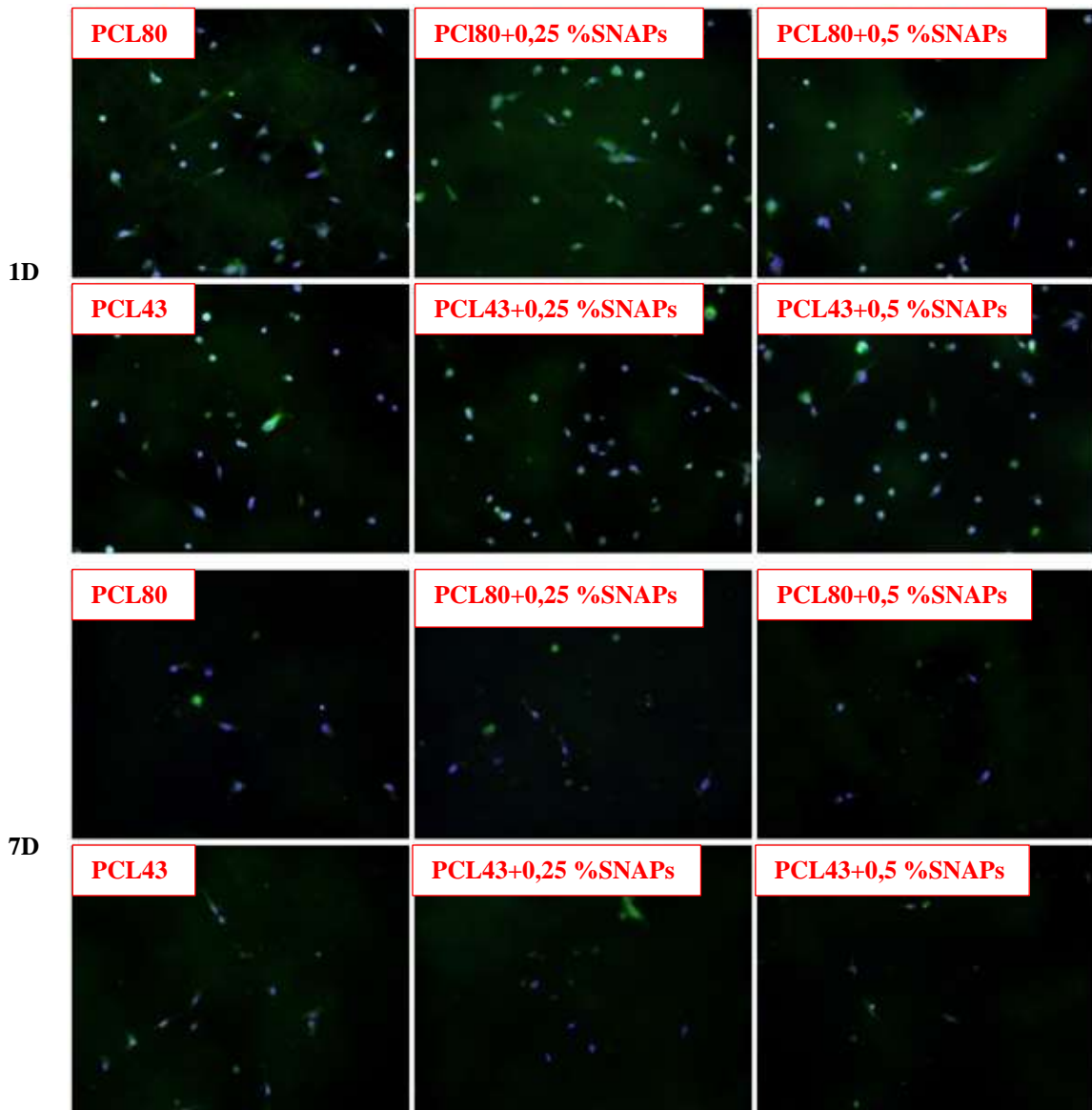
Vztah mezi množstvím SNAPs v materiálu a buněčnou viabilitou byl pozorován hlavně u vrstev z PCL80, u PCL43 již tento vztah nebyl tak zřejmý.



Obr. 25: Výsledky MTT testu po 1 a 7 dnech kultivace endotelových buněk na elektrostaticky zvlákněných PCL materiálech modifikovaných SNAPs

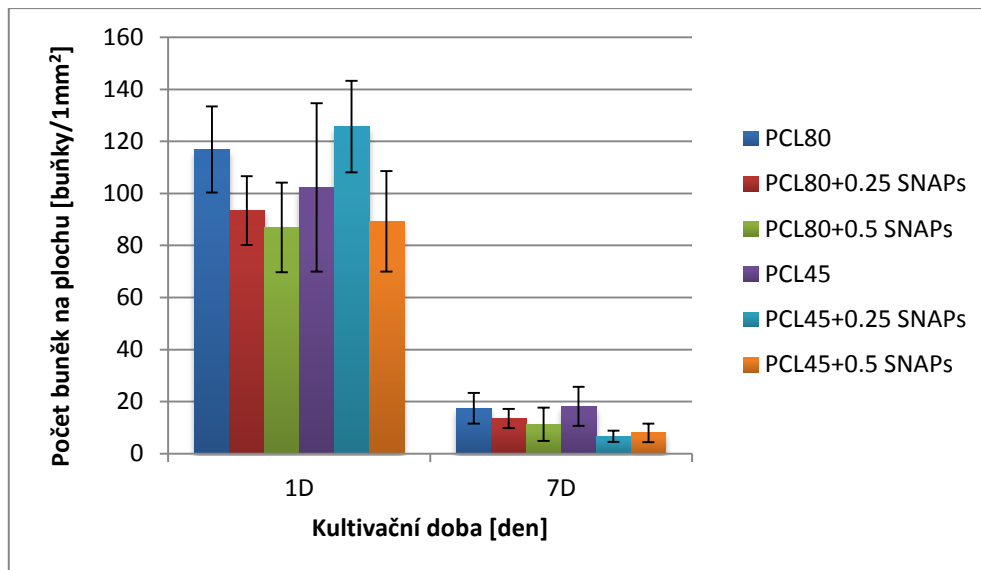
- **Analýza pomocí FM**

Snímky nasazených buněk po 1 a 7 dnech byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu, jak ukazuje obrázek 26. Tento snímek zcela koresponduje s výsledky MTT testu. První testovací den byly pozorovány buňky přisedlé na testovaných materiálech, kdy jejich rozprostření (spreading) bylo značně omezeno, především pak na vrstvách obsahujících SNAPs. Po 7 dnech kultivace již bylo nalezeno pouze minimální množství životaschopných buněk.



Obr. 26: Endotelové buňky zachycené na elektrostaticky zvlákněných vrstvách, modifikovaných SNAPs, obarvené faloidin-FITC (zelená) a DAPI (modrá) po 1 a 7 dnech.

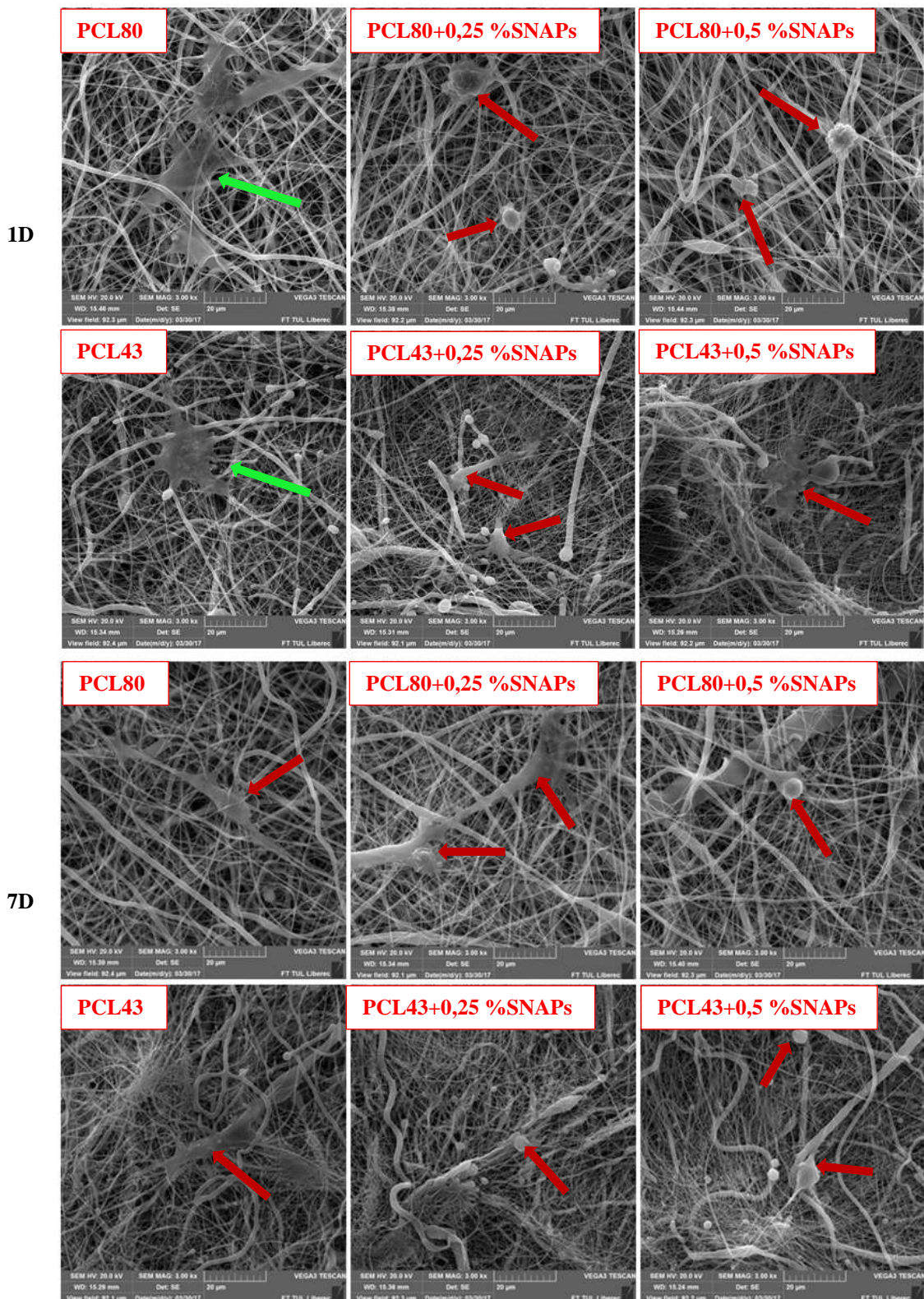
Množství buněk na plochu (1 mm^2) v závislosti na době kultivace, poté bylo stanoveno automatickým propočtem buněk z obrázků endotelových buněk obarvených DAPI. Výsledky shrnuje obrázek 27. V případě PCL80 bylo množství buněk na plochu první testovací den opět nižší u vzorků obsahujících SNAPs, i zde je tedy možné pozorovat vztah mezi dávkou SNAPs a počtem buněk. U PCL43 byly stanoveny velmi podobné počty buněk na 1 mm^2 po 1 dni kultivace. Ovšem po týdně kultivace byl největší počet buněk stanoven pro PCL bez přídavku SNAPs. Výrazný pokles buněk byl však pozorovatelný u všech vzorků.



Obr. 27: Počet buněk na 1 mm² pro všechny testované PCL vlákenné materiály po 1 a 7 dnech kultivace s endotelovými buňkami.

- **SEM**

Zhodnocení adheze buněk s testovanými materiály bylo provedeno na základě snímků pořízených rastrovacím elektronovým mikroskopem. Hlavním parametrem, který zde byl hodnocen, bylo rozptýlení (spreading) buněk po vlákenném povrchu, neboť to napomáhá buňkám lépe adherovat k materiálu, a zároveň jim umožňuje dále proliferovat. Ze snímků na obr. 28 je patrné, že k adhezi buněk s materiálem a jejich rozprostření po povrchu došlo po prvním testovacím dni pouze u vzorků PCL80 a PCL43 bez přídavku donoru uvolňujícího NO (buňky označeny v obrázku zelenou šipkou). Naproti tomu u vzorků obsahujících SNAPs bylo možné již po prvním dni od nasazení pozorovat poškozené buňky, což se projevovalo nerozprostřením buněk po povrchu, jejich scvrknutím se do sebe a zaoblením, viz červené šipky v obrázku. Po 7 dnech kultivace již byly pouze sporadicky nacházeny vysoce poškozené buňky (v obr. 28 opět značeno červenými šipkami).



Obr. 28: Obrázky endotelových buněk, adherovaných na testovaných materiálech po 1 a 7 dnech kultivace. Snímky pořízeny rastrovacím elektronovým mikroskopem. (Zvětšení 3000x)

Shrnutí výsledků In Vitro testování materiálů s endotelovými buňkami

Z výsledků in vitro testování materiálů s endotelovými buňka je patrné, že elektrostaticky zvlákněné vrstvy, obohacené o donor uvolňující NO (SNAPs), nepodporují adhezi a proliferaci endotelových buněk. To dokládají výsledky MTT testu, analýza pomocí FM a SEM, které jednoznačně potvrzují výrazné snižování viability buněk během obou testovaných dnů. Je tedy možné se přiklonit k tvrzení (viz Heller et al. 1999, Sarkar 1997), že exogenní zdroje NO brání adhezi těchto buněk a inhibují jejich další proliferaci, potažmo viabilitu.

Z těchto důvodů byl navržen experiment testování cytotoxicity samotných SNAPs, a to s endotelovými buňkami a trombocyty. Tím bylo možné vyloučit vliv testovaných PCL materiálů a bylo tedy možné potvrdit účinek SNAPs na chování endotelových buněk i trombocytů.

6.2 Testování cytotoxicity SNAPs

Testování cytotoxicity S-nitroso-N-acetylpenicillaminu bylo provedeno pro objasnění účinku SNAPs především na endotelové buňky, dále pak na trombocyty, jak již bylo uvedeno výše.

6.2.1 Testování cytotoxického účinku SNAPs na endotelové buňky

S přihlédnutím k rozporuplným výsledkům testování proliferace endotelových buněk na elektrostaticky zvlákněných mikrovlákných a nanovlákných vrstvách, modifikovaných donory uvolňující NO, bylo hodnoceno cytotoxické působení SNAPs a byla stanovena limitní cytotoxická koncentrace pro endotelové buňky.

Materiály a metody kultivace buněk s roztokem SNAPs

Pro experiment byly použity lidské endotelové buňky (HUVEC, pasáž 7). Buňky byly nasazeny do 96jamonové kultivační destičky (v hustotě $1 \cdot 10^4$ buněk na jamku) a následně vloženy do inkubátoru a byly kultivovány při teplotě 37°C, až do dosažení stadia semikonfluence (24 hodin).

- **MTT**

Cytotoxicita donoru NO byla vyhodnocena metabolickým MTT testem dle normy ISO 10993-5. Za účelem vyhodnocení cytotoxického účinku SNAPs bylo nasazeno po 12 jamkách od každého materiálu (zvolené koncentrace SNAPs, viz níže). Krystalky SNAPs byly rozpuštěny v kompletním médiu pro endotelové buňky (EBM-2) o koncentraci 50mg/10g (22,7 mM); 25 mg/10g (11,35 mM); 10 mg/10g (4,54 mM); 5 mg/10 g (2,27 mM); 2,5 mg/10g (1,135 mM); 1 mg/10g (454 μM). Tyto koncentrace byly zvoleny na základě předchozího experimentu, kdy dvě nejvyšší koncentrace SNAPs byly přidávány k PCL roztoku, jehož zvlákněním vznikaly vláknenné vrstvy, primárně testované na množství uvolněného NO a proliferaci endotelových buněk. Před přidáním k buňkám byl roztok SNAPs s médiem přefiltrován přes stříkačkový filtr.

Po 24hodinové inkubaci endotelových buněk bylo odsáto médium a k buňkám bylo přidáno po 100 μl média nebo roztoku SNAPs s médiem pro endotelové buňky (EBM-2) viz následující schéma:

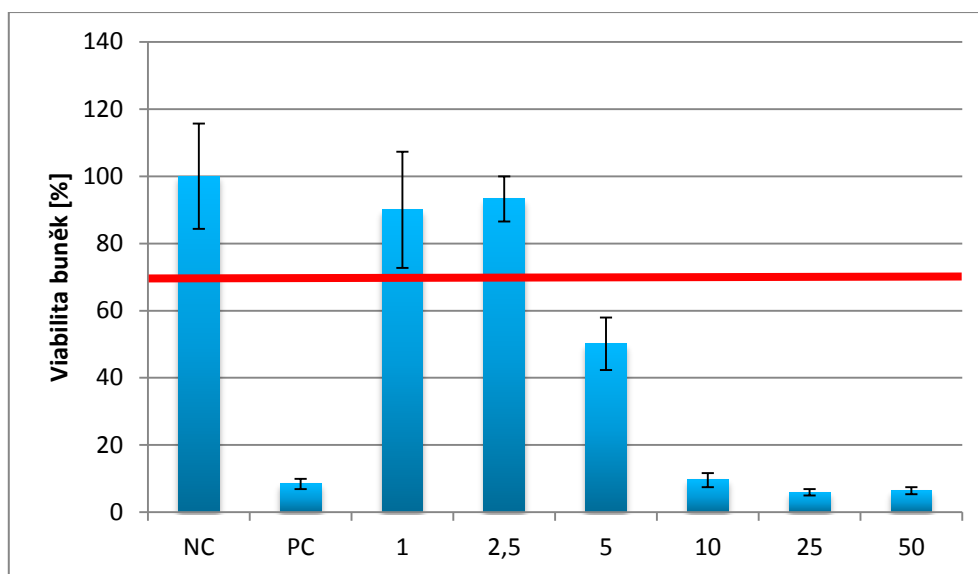
- Negativní kontrola (NC) – 100 μl kompletního média (viabilita 100%)
- Pozitivní kontrola (PC) - 100 μl média s cytotoxickým Tritonem X-100 (1%)
- **1 mg SNAPs**
- **2,5 mg SNAPs**
- **5 mg SNAPs**
- **10 mg SNAPs**
- **25 mg SNAPs**
- **50 mg SNAPs**

Kultivační destička s takto nasazenými materiály byla následně inkubována po dobu 24 hodin při 37 °C. Posléze bylo odsáto médium a do každé jamky bylo přidáno 50 μl roztoku MTT. Destička byla opět kultivována při 37°C, nyní po dobu 4 hodin. Po uplynutí tohoto času bylo MTT odsáto a fialové krystalky formazanu byly rozpuštěny přidáním 100 μl okyseleného isopropanolu. Následně byla proměřena absorbance při 570 nm (referenční vlnová délka 650 nm). Výsledky byly přepočteny

na procenta viability buněk v porovnání s pozitivní kontrolou, tedy v porovnání s buňkami, neovlivněnými přídatkem SNAPs.

Výsledky testu cytotoxicity SNAPs s endotelovými buňkami

Hodnoty buněčné viability po 24hodinové inkubaci buněk s jednotlivými koncentracemi SNAPs byly vyneseny do grafu na obrázku 29. Získané hodnoty absorbance byly přepočítány na buněčnou viabilitu [%], kdy viabilita buněk pozitivní kontroly byla brána jako 100 %. Z obrázku je patrné, že cytotoxické působení SNAPs se projevilo pro koncentrace 5, 10, 25 a 50 mg/10g, kdy hodnoty buněčné viability jsou pod limitem cytotoxického působení (viz červená čára v grafu). Dále je možné říci, že pro koncentrace nad 10 mg/10 g byl cytotoxický účinek SNAPs natolik velký, že buněčná viabilita byla srovnatelná s pozitivní kontrolou (buňky inkubované s cytotoxickým 1 % Tritonem X-100). Při těchto koncentracích tedy dochází k totálnímu poklesu buněčné viability. Koncentrace 5 mg/10 g způsobila pokles buněčné viability zhruba na polovinu.



Obr. 29: Výsledky buněčné viability po 24hodinové inkubaci endotelových buněk s médiem (NC), s médiem obsahujícím 1% Tritonu X-100 (PC) a roztoky média s různou koncentrací SNAPs.

6.2.2 Testování cytotoxického účinku SNAPs na trombocyty

Účinek uvolňujícího se NO na aktivaci trombocytů je dle literatury zcela jednotný. Oxid dusnatý prokazatelně způsobuje inhibici krevních elementů

(destiček), čili donory NO jsou velmi žádané pro aplikace, kde je potřeba snížit, potažmo zcela zamezit vzniku trombů. Následující experiment tedy sloužil k potvrzení tohoto účinku NO na trombocyty.

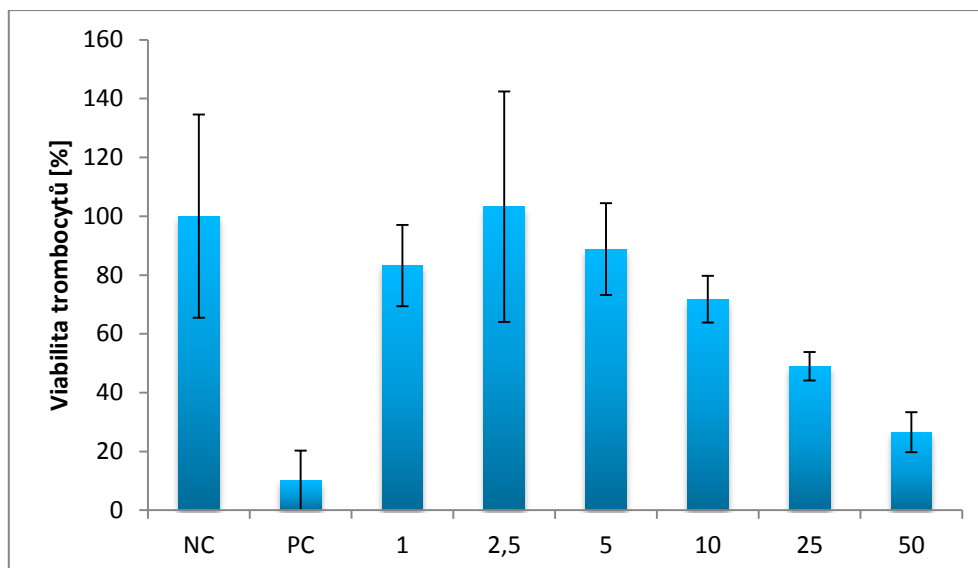
Materiály a metody kultivace trombocytů s roztokem SNAPs

Experiment probíhal velmi podobně jako v experimentu předchozím. Opět byly připraveny roztoky SNAPs o stejných koncentracích, nicméně pro rozpuštění krystalek bylo použito médium pro trombocyty (Composol), stejné byly i média pro pozitivní i negativní kontrolu.

Roztok trombocytů TRSA11170405 o koncentraci $830 \cdot 10^6/\text{ml}$ byl nasazen do 96jamkové kultivační destičky ($200 \mu\text{l} \sim 166 \cdot 10^6/\text{ml}$), opět po 12 vzorcích pro každý materiál. Do každé jamky bylo přidáno po $100 \mu\text{l}$ Composolu (NC), $100 \mu\text{l}$ Composolu s 1% Tritonem (PC) a $100 \mu\text{l}$ naředěných roztoků SNAPs. Kultivační destička připravená tímto způsobem byla inkubována po dobu 2 hodin při teplotě 37°C . Následně bylo odsáto médium, bylo přidáno $50 \mu\text{l}$ MTT a destička byla opět inkubována, nyní po dobu 4 hodin. Posléze byla proměřena absorbance roztoků při 570 nm (referenční vlnová délka 650 nm), přepočtem byla získána % viabilita krevních destiček.

Výsledky testu cytotoxicity SNAPs s trombocyty

Získané hodnoty viability trombocytů [%] jednoznačně potvrzují inhibiční vliv SNAPs na aktivitu trombocytů, jak je možné vidět v grafu na obr. 30. Uvolňování exogenně dodaného donoru NO způsobilo pokles viability trombocytů, a to od koncentrace $10 \text{ mg}/10 \text{ g}$ ($4,45 \text{ mM}$), kdy pokles viability činil 28%. Pro koncentraci $25 \text{ mg}/10 \text{ g}$ ($11,35 \text{ mM}$) již viabilita poklesla o 51 % a u koncentrace $50 \text{ mg}/10 \text{ g}$ došlo ke snížení viability trombocytů o 73%.



Obr. 30: Buněčná viabilita po 2hodinové inkubaci trombocytů s médiem (NC), s médiem obsahujícím 1% Trtonu X-100 (PC) a roztoky SNAPs v různých koncentracích.

6.3 Testování trombogenicity materiálů s obsahem SNAPs

Hodnocení probíhalo po 2hodinové inkubaci materiálů se suspenzí trombocytů pomocí metabolického MTT testu, kdy byla stanovována metabolická aktivita trombocytů. Dále pak hodnocení probíhalo na základě pořízených SEM snímků.

Materiály a metodika měření aktivity trombocytů

Značení materiálů pro testování trombogenicity bylo opět stejné jako v předchozích experimentech. Z jednotlivých materiálů byly zhotoveny vzorky (9 pro MTT test, 1 jako NC a 2 pro SEM od každého materiálu) o průměru 6 mm, které byly vkládány do 96jamkové kultivační destičky. Následně byly vysterilizovány 70% ethanolem po dobu 30 minut, poté byly dvakrát propláchnuty v PBS a do každé jamky bylo posléze přidáno 200 μ l suspenze trombocytů TRSA 11170405 o koncentraci $830 \cdot 10^6$ trombo/ml, což zhruba odpovídá $166 \cdot 10^6$ trombo v 200 μ l. Materiály pak byly spolu se suspenzí inkubovány po dobu 2 hodin při teplotě 37°C. Materiály připravené pro negativní kontroly byly inkubovány pouze v médiu pro trombocyty (Composol PS). Kontrolním materiálem byl kultivační plastik (dno testovací jamky), značeno TCP.

Po uplynutí doby inkubace vzorků se suspenzí trombocytů, byly vzorky pro MTT test přesunuty do čistého Composolu PS (150 μ l), a následně bylo přidáno

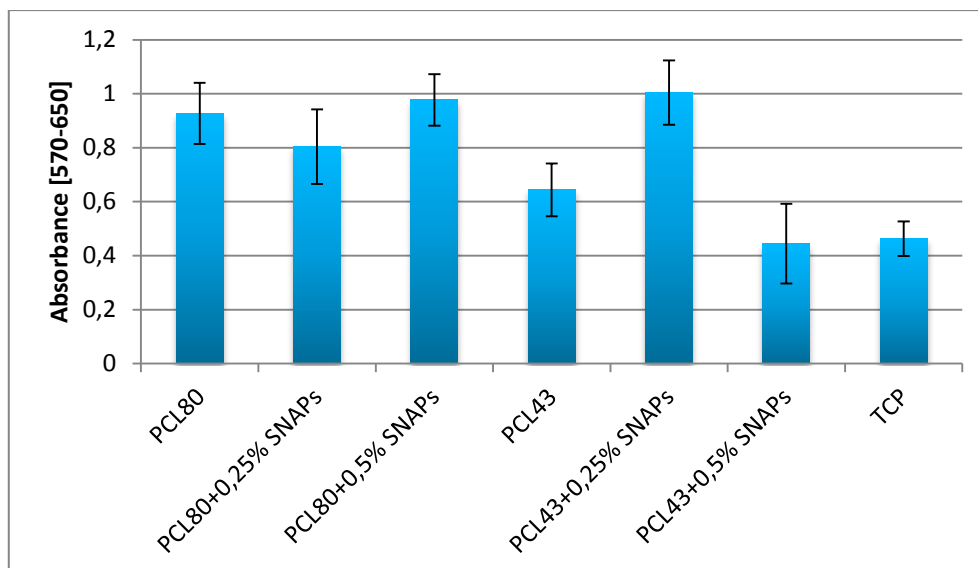
50 μ l roztoku MTT. Fialové krystalky byly opět rozpuštěny pomocí okyseleného isopropanolu. Poté proběhlo měření absorbance roztoků při vlnových délkách 570 a 650 nm, přičemž naměřené hodnoty byly zprůměrovány a výsledná absorbance byla dána rozdílem absorbancí vzorků a negativních kontrol.

Vzorky pro SEM byly po inkubaci připraveny stejným způsobem jako v předchozích experimentech (viz kapitola 6.1.1)

Výsledky měření trombogenicity

- **MTT**

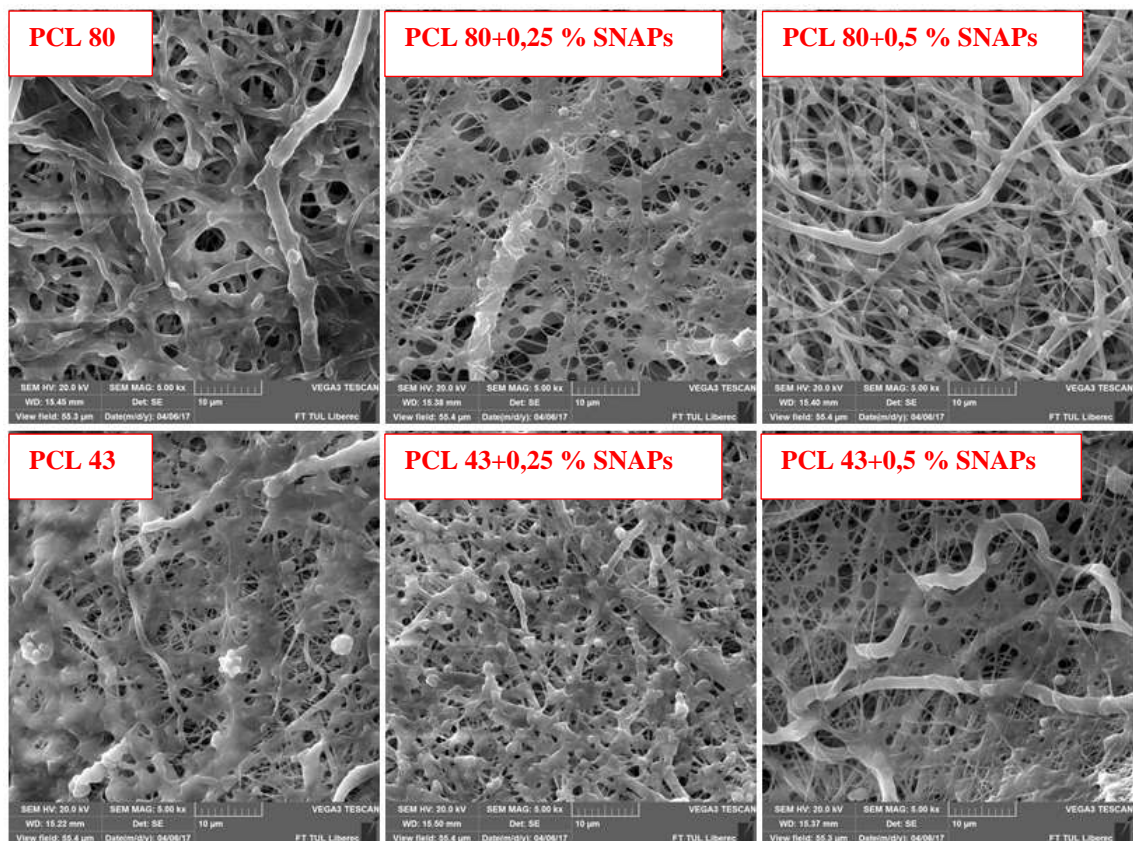
Výsledky testu metabolické aktivity trombocytů byly zpracovány do grafu, viz obr. 31. Z něj je patrné, že materiály způsobovaly velkou aktivaci trombocytů, svědčí o tom hodnoty absorbancí u PCL80, PCL80+0,25 % SNAPs, PCL80+0,5 % SNAPs a PCL43+0,25 % SNAPs, kdy se absorbance pro zmíněné vzorky pohybovala v rozmezí 0,8-1. K výraznějšímu poklesu aktivace trombocytů došlo pouze u vzorků PCL43+0,5 % SNAPs, což bylo pravděpodobně způsobeno uvolňujícím se NO z přítomného SNAPs. Takovéto snížení metabolické aktivity krevních destiček bylo předpokládáno u všech materiálů s obsahem SNAPs, nicméně výsledky jej nepotvrzují. Testování cytotoxického účinku SNAPs s trombocyty však dokládá jejich cytotoxické působení právě pro koncentrace SNAPs 0,25 a 0,5 %. Z toho je možné usuzovat, že během sterilizaci 70% ethanolem a následným promýváním v PBS došlo pravděpodobně k vymytí donoru NO. Kontrolní materiál TCP, potom oproti vlákněným materiálům, jevil nízkou aktivitu destiček. Hodnota naměřené absorbance byla podobná jako pro vzorek PCL43+0,5 % (cca 0,5), pravděpodobně vlivem hladkého plastového povrchu.



Obr. 31: Metabolická aktivita trombocytů hodnocená pomocí MTT testu po 2hodinové inkubaci testovaných materiálů a kontroly (TCP) se suspenzí trombocytů.

- **SEM analýza**

Snímky pořízené rastrovacím elektronovým mikroskopem zachycují morfologii krevních destiček, která je výrazně závislá na jejich aktivaci. Neaktivované destičky jsou kulaté, o průměru přibližně 7 μm . Při jejich aktivaci pak dochází ke změně tvaru, kdy se rozprostírají po povrchu materiálu a dochází k jejich napojování vlivem výběžků, které se během aktivace formují. Téměř na všech snímcích je možné pozorovat typické chování trombocytů na nanovlákněných vrstvách, tedy souvislý povlak aktivovaných a rozprostřených destiček na povrchu materiálu. To je pozorovatelné u vrstev PCL80, PCL80+0,25 % SNAPs, PCL43, PCL43+0,25 % na obrázku 32. U vrstvy PCL80+0,5 % SNAPs bylo pozorováno méně aktivovaných destiček, destičky byly spíše kulaté, málo rozprostřené v porovnání s vrstvami PCL80 a PCL80+0,25 % SNAPs. To by nasvědčovalo nižší aktivaci, nicméně výsledek metabolického testu mluví zcela proti. Vrstva PCL43+0,5 % SNAPs obsahovala menší množství trombocytů oproti vrstvám PCL43 a PCL43+0,25 % SNAPs, což odpovídá výsledku MTT testu, neboť u této vrstvy byl zaznamenán nejnižší pokles aktivace.



Obr. 32: SEM snímky trombocytů po 2hodinové inkubaci s testovanými vzorky. Zvětšení 5000x.

7 ZÁVĚR

Práce byla primárně zaměřena na studium kinetiky uvolňování oxidu dusnatého z polykaprolaktonových mikrovláknenných a nanovláknenných vrstev. Pro přípravu vláknenných vrstev bylo použito 10 hm% roztoku PCL o molekulové hmotnosti $80\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 16 hm% roztoku PCL o molekulové hmotnosti $43\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Z těchto roztoků byly elektrostatickým zvlákňováním připraveny 3 sady vláknenných vrstev, obsahující různé koncentrace S-nitroso-N-acetylpenicillaminu (SNAPs), donoru oxidu dusnatého, který byl předem syntetizován (viz kapitola 4.1). Byly zvoleny koncentrace 0 %, 0,25 % a, 0,5 % SNAPs. Materiály byly poté vystaveny různým druhům sterilizace (ethylenoxid, 70% ethanol) a následně bylo pozorováno uvolňování NO vlivem difuze a byl zkoumán právě vliv sterilizace. Dále byla pozorována kinetika uvolňování během enzymatické degradace, která byla působena a katalizována lipázou. Tím docházelo k hydrolytickému štěpení polymerních vazeb a pozvolné destrukci materiálu, kdy byl zkoumán vliv tohoto působení na kinetiku uvolňování NO z donoru, obsaženého ve vláknech. Výsledky těchto experimentů byly klasifikovány pomocí Griess assay, metody vhodné k detekci NO_x v roztocích (médiích), ve kterých byly smáčeny testované materiály. Jedná se o reakci dusitanu, kyseliny sulfanilové (SA) a N-(1-naftyl)ethylendiamin dihydrochloridu (NEDD), což způsobí zabarvení roztoků s obsahem NO_x do oranžova (případně fialova, v závislosti na rozpouštědle pro NEDD). Naměřené hodnoty absorbancí daných vzorků byly následně porovnány s předem připravenými kalibračními křivkami. Tím bylo možné stanovit hodnoty koncentrace uvolňovaného NO.

Výsledky experimentů uvolňování NO vlivem difuze potom dokládají, že sterilizace ovlivňuje množství uvolněného NO, respektive ji snižuje (popsáno v kapitole 5.2). Vzorky vysterilizované ethylenoxidem vykazovaly první den pozorování nižší koncentrace uvolňovaného NO oproti vzorkům nesterilním, nicméně rozdíly nebyly ve všech případech tak výrazné. Zatímco sterilizace 70% ethanolem měla na uvolňování fatální dopad, kdy k uvolňování NO nedocházelo prakticky vůbec ani jeden testovaný den. Pravděpodobně způsobeno vymytím SNAPs během sterilizace a následného promývání. V tomto experimentu pak nebyla prokázána vzrůstající tendence koncentrace NO v závislosti na koncentraci SNAPs, což bylo zřejmě

způsobem malou velikostí a navázkou vzorků. V dalších experimentech, kdy bylo sledováno uvolňování NO z nesterilních a ethylenoxidem vysterilizovaných materiálů, bylo tuto vzrůstající tendence koncentrace uvolněného NO možné pozorovat první i třetí testovaný den, což bylo velmi pravděpodobně zapříčiněno vyšší navázkou testovaných vzorků.

Na základě výsledků monitorování kinetiky uvolňování NO vlivem enzymatické degradace (uvedeno v kapitole 5.3), kdy byl během vyhodnocování vyloučen vliv difuze, je možné říci, že degradace materiálů napomáhala rychlejšímu a intenzivnějšímu uvolňování NO oproti prosté difuzi. Důležitými parametry, které potom výrazně ovlivňují průběh degradace, a tím i proces uvolňování, jsou jednoznačně molekulová hmotnost polymeru, homogenita vlákenné vrstvy daného testovaného vzorku, koncentrace exogenního donoru NO, a zároveň parametry enzymu – typ, koncentrace a jeho aktivita. Všechny tyto parametry totiž ovlivňují rychlost a intenzitu degradace, a tím i koncentraci uvolňovaného NO. Jedná se tedy o velice komplikovaný a komplexně provázaný proces, který je velmi citlivý na jakékoliv změny, pravděpodobně nejen výše zmíněných parametrů. To je i jeden z důvodů, proč je obtížné predikovat a popsat kinetiky uvolňování NO během degradace.

Přínosem experimentu, sledování kinetiky uvolňování NO během degradace PCL vlákenných materiálů, je zjištění, že azid sodný, přidávaný do roztoků PBS s lipázou, jakožto antibakteriální činidlo, s největší pravděpodobností interaguje s reaktanty Griess assay. Tím maří tuto reakci a znemožňuje tak detekci NO_x a stanovení jeho koncentrace.

V návaznosti na problematiku uvolňování NO bylo za účelem potenciální aplikace těchto materiálů v tkáňovém inženýrství, především pak pro kardiovaskulární aplikace, provedeno *In Vitro* testování zmíněných materiálů, obsahujících donory NO, s endotelovými buňkami. Následně byl hodnocen vliv uvolňovaného NO na tyto buňky, který je v literatuře značně rozporuplný. Výsledky experimentu (shrnuté v kapitole 6.1), kdy byla hodnocena cytokompatibilita modifikovaných materiálů, však nejsou zcela uspokojivé. MTT test, analýza pomocí fluorescenční mikroskopie a SEM analýza dokládají, že vlákenné vrstvy obsahující SNAPs nepodporují adhezi a proliferaci buněk, což vede k výraznému snižování viability endotelových buněk a jejich apoptóze.

Tím pádem je možné se připojit k tvrzení (viz Heller et al. 1999, Sarkar 1997), že donory uvolňující NO naopak vykazují inhibiční účinek na proliferaci endotelových buněk.

Na popud těchto výsledků byl proveden další experiment, který měl potvrdit, případně vyvrátit cytotoxicitu samotného SNAPs. Cytotoxické působení bylo testováno pro koncentrační řadu roztoků SNAPs s endotelovými buňkami (22,7 mM; 11,35 mM; 4,54 mM; 2,27 mM; 1,135 mM a 454 μ M), přičemž cytotoxický účinek se projevil od koncentrace 2,27 mM, kdy buněčná viabilita poklesla téměř o 50%. Tím tedy byla potvrzena cytotoxicita SNAPs s vyloučením vlivu PCL materiálů. Provedeno bylo i testování cytotoxicity SNAPs s trombocyty, kdy byly potvrzeny očekávaný výsledek, tedy inhybiční účinek SNAPs na testované krevní destičky.

Posledním experimentem biologického testování PCL materiálů modifikovaných SNAPs bylo testování trombogenicity těchto materiálů, kdy mělo být potvrzeno prokazatelné snížení aktivace trombocytů vlivem přítomnosti uvolňujícího se NO, jak uvádí literatura (*Vilahuret et al. 2004; Brisboris et al. 2013*). Nicméně snížení metabolické aktivity krevních destiček bylo pozorováno pouze u vzorku PCL43+0,5 % SNAPs, u ostatních nikoli. Důvodem pak pravděpodobně byla sterilizace, kdy vzorky musely být vysterilizovány 70% ethanolem.

Za stávající situace nejsou tedy zmiňované materiály, funkcionalizované SNAPs vhodnými kandidáty pro kardiovaskulární tkáňové nosiče, neboť nebyl prokázán pozitivní účinek uvolňujícího se NO na adhezi a proliferaci endotelových buněk, jež tvoří vnitřní stěnu nativní cévy. Naopak bylo potvrzeno jeho inhibiční působení. Nicméně z výše popsaných důvodů je možné vyvodit, že při inkorporaci exogenních donorů NO do vlákných vrstev je třeba brát v potaz koncentraci SNAPs, neboť ta výrazně ovlivňuje následnou adhezi a proliferaci buněk, potažmo jejich viabilitu.

LITERATURA

- ALDERTON, W. K., COOPER, CH. E., KNOWLES, R. G., (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. Vol. 357, pp. 593-615.
- AL-SADONI, H., FERRO, A., (2000). S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Chemical Science*. Vol. 98, No. 5, pp. 507-520.
- ANDREW, P. J., MAYER, B., (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*. Vol. 43, pp. 521-531.
- BARNES, C. P., (2007). Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 59, No. 14, pp. 1413-1433.
- BRISBOIS E. J., et al. (2013). Long-term nitric oxide release and elevated temperature stability with S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAPs)-doped Elast-eon E2As polymer. *Biomaterials*. Vol 34., pp. 6957-6966.
- CANELAS, D. A., HERLIHY, K. P., DESIMONE, J. M., (2010). Top-Down Particle Fabrication: Control of Size and Shape for Diagnostic Imaging and Drug Delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. Vol. 1, No. 4, pp. 391-404.
- CHAKRABOTY, I., MASCHARK, P. P., (2016). Mesoporous silica materials and nanoparticles as carriers for controlled and site-specific delivery of gaseous signaling molecules. *Microporous and Mesoporous Materials*. Vol. 234, pp. 409-419.
- CHANG, W.-L., et al., (2015). Nitric oxide-releasing S-nitrosothiol-modified silica/chitosan core-shell nanoparticles. *Polymer*. Vol. 57, pp. 70-76.
- COTTANEO, D., et al. (2016). Tuning the nitric oxide release from CPO-27 MOFs. *RSC Advances*. Vol. 6, pp. 14059-1467.
- CONNIT, J., et al., (2014). Cancer immunotherapy nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers in Chemistry*. Vol. 2.
- COUVREUR, P., (2013). Nanoparticles in Drug Delivery: Past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 65, No. 1, pp 21-23.
- DAHLIN, R. L., (2011). Polymeric NANofibers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. Vol. 17, No. 5, pp 349-367.
- DANIEL, M-C. Drug delivery carriers. In: Emerging Applications of Colloidal Noble Metals in Cancer Nanomedicine. Lakowicz JR, Zhang J (Eds). *Future Medicine*. London, UK, 2012, 54–67. eISBN (PDF): 978-1-78084-072-7.
- DE JONG, W. H., BORM, P. J. A., (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of NANomedicine*. Vol. 3, No. 2, pp. 133-149.

DESAI, A., V., SAMANTA, P., MANNA, B., GHOSH, S., (2015). Aqueous phase nitric oxide detection by an amine-decorated metal–organic Framework. *Chemical Communications*. Vol. 51, pp. 6111-6114.

FÖSTERMANN, U., SESSA, W., (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. Vol. 33, No. 7, pp. 829-837.

FU, Y, KAO, W. J., (2011). Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert opinion and drug delivery*. Vol. 7, No. 4, pp. 429-444.

GAUCHER, C., et al. (2013). S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of S-nitrosothiols. *Current pharmaceutical design*. Vol. 19. No. 3, pp. 458-472.

GOOCH K.J., DANGLER C.A., FRANGOS, J.A, (1997). Exogeneous, basal, and flow-induced intric oxide production and endothelial cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology*. Vol. 171, No 3, pp. 252-8.

GUNATILLAKE, P. A., ADHIKARI, R., (2003). Biodegradable synthetic polymer for tissue engineering. *European Cell and Materials*. Vol. 5, pp. 1-16.

HAIGHI, A. K., (2012). *Electrospinning of Nanofibers in Textiles*, Toronto: Academis Press; eBook Collection, [online]. [cit. 28. 2. 2015].

Dostupné z:

<<http://web.b.ebscohost.com/ipac.kvkli.cz:8080/ehost/ebookviewer/ebook/bmxlYmtfXzQzNzcwNi9fQU41?sid=2e78e594-92b2-472c-ae87-f18214e02697@sessionmgr110&vid=2&format=EB&rid=1>>

HELLER R., POLACK T., GRABNER R., TILL U, (1999). Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis*. Vol. 144, pp. 49-57.

HETRICK, E. M., SCHOENFISCH, M. H., (2009). Analytical Chemistry of Nitric Oxide. *Annual Review of Analytical Chemistry*. Vol. 2, pp. 49-433.

HOWARD, D. et al., (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*. Vol. 23, No. 1, pp. 66-72.

HU, X., et al., (2014). Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*. Vol. 165, s. 12-21.

HUANG, CH.-B., HUANG, J., XU, L., (2015). A highly selective fluorescent probe for fast detection of nitric oxide in aqueous solution. *RSC Advances*. Vol. 5, pp. 13307-13310.

IGNARRO, L. J., NAPOLI, C., LOSCALZO, J., (2002). Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide. An Overview. *Circulation Research*. Vol. 90, pp. 21-28.

JANSSEN, M., et al., (2014). Drugs and Polymers for Delivery Systems in OA Joints Clinical Needs and Opportunities. *Polymers*. Vol. 6, No. 3, pp. 799-819.

- KELM, M., (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Vol. 1411, No. 2-3, pp. 273-289.
- KOJIMA, H., et al., (1998). Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*. Vol. 70, No. 13, pp. 2446-2453.
- KOSHLAND, D. E., Jr., (1992). The molecule of the Year. *Science*. Vol. 285, No. 5090, pp. 1861.
- KŘÍŽENECKÁ, S., SYNEK, V., (2014). *Základy analytické chemie*. Ústí nad Labem: UJEP. [online]. [cit. 30. 3. 2015].
- Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/zach/zach.pdf>
- KUMARI, A., YADAV, S., K., YADAV, S., C., (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 75, No. 1, s. 1-18.
- LAUTNER, G., MEYERHOFF, M., SCHWENDEMAN, S. P., (2016). Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres loaded with S-nitroso-N-acetyl-D-penicillamine for controlled nitric oxide delivery. *Journal of Controlled Release*. Vol. 225, pp. 133-139.
- LEE, K., SILVA, E. A., MOONEY, D. J., (2010). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of Royal Society*. Vol. 8, No. 55, pp. 153-170.
- LEI, J., VODOVOTZ, Y., TZENG, E., BILLIAR, T. R., (2013). Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide*. Vol. 35, pp. 175-185.
- LI, Y., et al., (2016). A new fluorescence biosensor for nitric oxide detection based on cytochrome P450 55B1. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Vol. 230, pp. 405-410.
- LI, Z., WANG, C., *One-Dimensional nanostructures*. Electrospinning Technique and Unique Nanofibers. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. 141 pp. 1st edition, ISBN 978-3-642-36427-3.
- LIANG, H., NACHARAJU, P., FRIEDMAN, A., FRIEDMAN, J. M., (2015). Nitric oxide generating/releasing materials. *Future Science*. Vol. 1, No. 1.
- LIU, T., ZHANG, W., YANG, W., LI, CH., (2015). Hollow polymer nanoparticles with S-nitrosothiols as scaffolds for nitric oxide release. *Journal of Colloid and Interface Science*. Vol. 459, pp. 115-122.
- LOWE, A., et al. (2015). Electrospun nitric oxide releasing bandage with enhanced wound healing. *Acta Biomaterialia*. Vol. 13, pp. 121-130.
- LU, Y., et al. (2015) S-Nitrosothiol-modified nitric oxide-releasing chitosan oligosaccharides as antibacterial agents. *Acta Biomaterialia*. Vol. 12, pp. 62-69.
- MA, P. X., (2004). Scaffolds for tissue fabrication. *Materials today*. Vol. 7, No. 5, pp. 30-40.
- MASOOD, N., et al., (2016). Nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Material Science and Engineering: C*. Vol. 60, pp. 569-578.

- MIKOS, A. G., et al., (2006). Engineering Complex Tissue. *Tissue Engineering*. Vol. 12, No. 12.
- MILLER, M. R., MEGSON, I. L., (2007). Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 153, No. 3, pp. 305-321.
- MURPHY, M. P., (1999). Nitric Oxide and Cell Death. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)*. Vol. 1411, No. 2-3, pp. 401-414.
- NAMDEV, A., ISSARANIT, R., KHINCHI, M. P., (2015). Microspheres as a novel drug delivery system. A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. Vol. 3, No. 1.
- NAPOLI, C., et. al. (2013). Effects of Nitric Oxide on Cell Proliferation : Novel Insights. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 62, No. 2, pp. 89-95.
- NGUYEN, T.-K., et al., (2016). Co-delivery of nitric oxide and antibiotic using polymeric nanoparticles. *Chemical Science*. Vol. 7, pp. 1016-1027.
- Nobelprize.org, 2014. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998*. Nobel Media A B. [online]. [cit. 16. 12. 2016]. Dostupné z: <<https://nobelprize.org/nobel-prizes/medicine/laureats/1998/>>
- NIMS, R. W., et al., (1995). Colorimetric Methods for the Determination of Nitric Oxide Concentration in Neutral Aqueous Solutions. *Methods*. Vol. 7, No. 1, pp. 4854.
- HURHASNI, H., et al., (2015). Nitric oxide-releasing poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethylenimine nanoparticles for prolonged nitric oxide release, antibacterial efficacy, and in vivo wound healing activity. *International Journal of Nanomedicine*. Vol. 10, pp. 3065-3080
- PARENT, M., et al., (2015). Nitric oxide-eluting scaffolds and their interaction with smooth muscle cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. Vol. 103, No. 10, pp. 3303-3311.
- PATHAK, Y., THASSU, D. *Drug Nanoparticles Formulation and Characterization*. Informa Health Care USA, New York. NY, USA, 2009, 416 pp.
- QUINN, J. F., WHITTAKER, M. R., DAVIS, T. P., (2015). Delivering nitric oxide with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. Vol. 205, pp. 190-205.
- RANA, D., ARULKUMAR, S., VISHWAKARMA, A., RAMALINGAM, M., (2015). *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Academic Press, s. 133-148. ISBN 13: 978-0-12-397157-9.
- RANGASAMY, M., PARTHIBAN, G., (2010). Recent advances in novel drug delivery system. *IJRAP*. Vol. 1, No. 2, pp. 316-326.
- REIS, C., P., NEUFELD, R., J., RIBERIO, A., J., VEIGA, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. Vol. 2, No 1, s. 8-21.
- SARKAR R., WEBB R. C., STANLEY J. C., (1995). Nitric oxide inhibition of endothelial cell mitogenesis and proliferation. *Surgery*. Vol. 118, No. 8, pp. 274-9.

- SEABRA, A. B., JUSTO, G. Z., HADDAD, P. S., (2015). State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. *Biotechnology Advances*. Vol. 33, No. 6, Part 3, pp. 1370-1379.
- SHEKHAR, K., MADHU, M. N., PRADEEP, B., BANJI, D., (2010). A Review On Microencapsulation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. Vol. 5, No. 2, s. 58-62.
- SILL, T., RECUM, H. A., von, (2008) Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Biomaterials*. Vol. 29, No 13, s. 1989-2006.
- SINGH, R. J., HOGG, N., JOSEPH, J., KALYANARAMAN, B., (1996). Mechanism of Nitric Oxide Release from S-Nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 271, No. 31, pp. 18596-18603.
- SINGH, R. S., et al., (2016). Recent insights on applications of pullulan in tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 153, pp. 455-462.
- SUCHYTA, D. J., SCHOENFISCH, M. H., (2015). Encapsulation of N-Diazoniumdiolates within Liposomes for Enhanced Nitric Oxide Donor Stability and Delivery. *Molecular Pharmaceutics*. Vol. 12, No. 10, pp. 3569-3574.
- THOMAS, D. D., et al., (2008). The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 45, No. 1, pp 18-31.
- TOMARO-DUCHESNEAU, C., SAHA, S., MALHOTRA, M., KAHOUILLI, PRAKASH, S. (2012). Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions. *Journal of Pharmaceutics*. Vol. 2013, 19 s.
- TOMÍČEK, O., (1958). *Kvantitativní analýza*. Praha: SZdN, 4th ed., 428 s.
- VARMA, M. V. S., KAUSHAL, A., GARG, A., GARB, S., (2004). Factors Affecting Mechanism and Kinetics of Drug. *American Journal of Drug Delivery*. Vol. 2, No. 1, pp. 43-57.
- Wikipedia, 2016. *Nitride Oxid*. [online]. [cit. 16. 12. 2016] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Nitric_oxide>
- VILAHUR G., et al. (2004). Inhibition of thrombosis by a novel platelet selective S-nitrosothiol compound without hemodynamic side effects. *Cardiovascular Research*. Vol. 61, No. 4, pp. 806-16.
- VOIGT, N., et al., (2014). Toxicity of polymeric nanoparticles in vivo and in vitro. *J. Nanopart Res*. Vol. 16, No. 6.
- WANG, P. G., CAI, T. B. & TANIGUCHI, N. eds., 2005. Nitric oxide donors: for pharmaceutical and biological applications [First edition]., Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 390 pp. ISBN 3-527-31015-0.
- WANG, Y., et al., (2015). Shot-noise Limited Faraday Rotation Spectroscopy for Detection of Nitric Oxide Isotopes in Breath, Urine, and Blood. *Scientific Reports*. Vol. 5, pp. 1-8.

WENNMALM, Å., BENTHIN, G., PETERSSON, A-S., 1992. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 106, No. 3, pp 507-508.

WERENGOWSKA-CIEĆWIERZ, K., et al., (2015). The Chemistry of Bioconjugation in Nanoparticles-Based Drug Delivery System. *Advances in Condensed Matter Physics*. Vol. 2015, 27 pp.

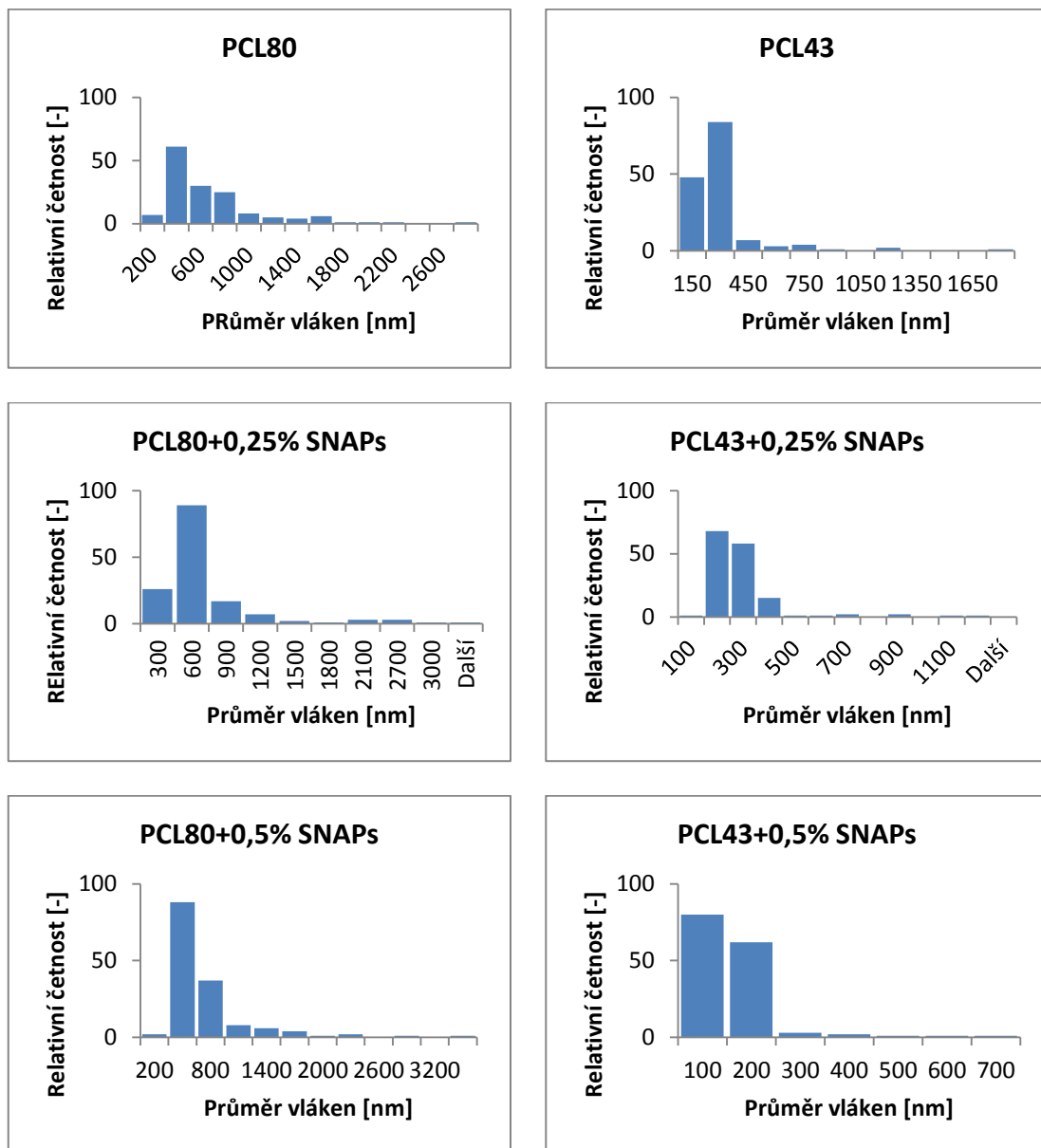
WILCZEWSKA, A., NIEMIROWICZ, K., MARKIEWICZ, K., CAR, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*. Vol. 64, s. 1020-1037. ISSN 1734-1140.

YANG, Z., et al., (2015). Nitric oxide producing coating mimicking endothelium function for multifunctional vascular stents. *Biomaterials*. Vol. 63, pp. 80-92.

YOO, H. S., KIM, T. G., PAKR., T. G., (2009). Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 61, No. 12, pp. 1033-1042.

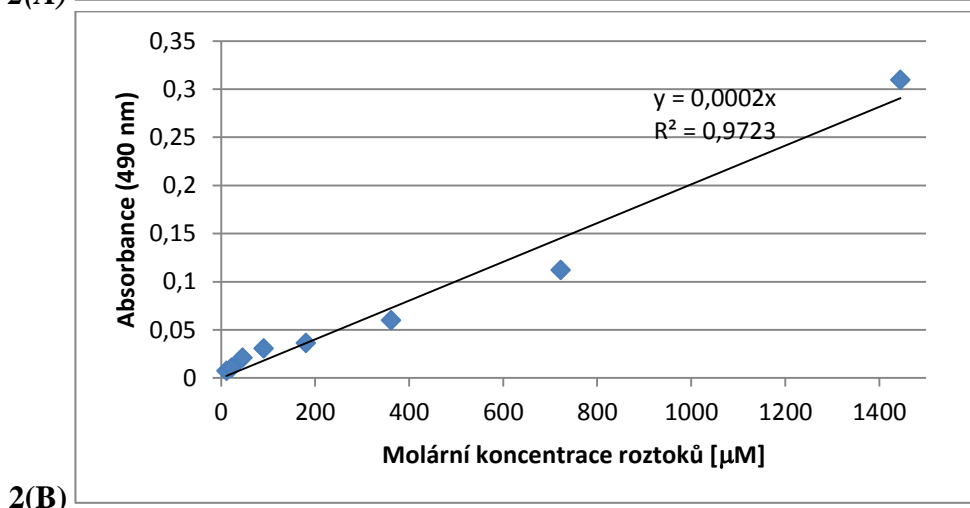
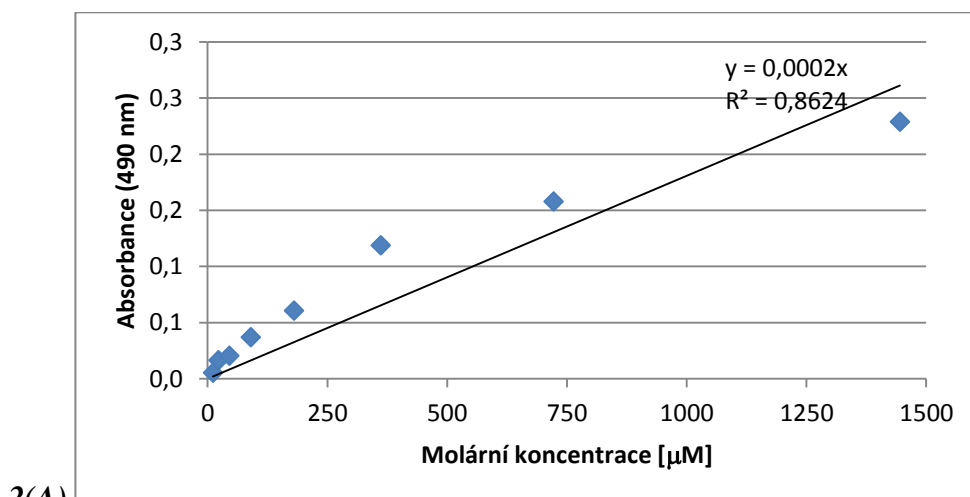
PŘÍLOHY

PŘÍLOHA 1: Doplnění kapitoly 4.3



Obr. P1: Histogramy hustoty pravděpodobnosti pro průměry PCL vláken s různou koncentrací přidaného donoru NO (SNAPs).

PŘÍLOHA 2: Doplnění kapitoly 5.1.2



Obr. P2: Kalibrační křivky o známé koncentraci dusitanů (NaNO_2) pro stanovení molární koncentrace uvolňovaného NO ze vzorků vlivem difuze, případně během degradace. Stanoveno pomocí Griess assay za použití SA a NEDD. (2A) NEDD v PBS, (2B) NEDD v dH_2O .

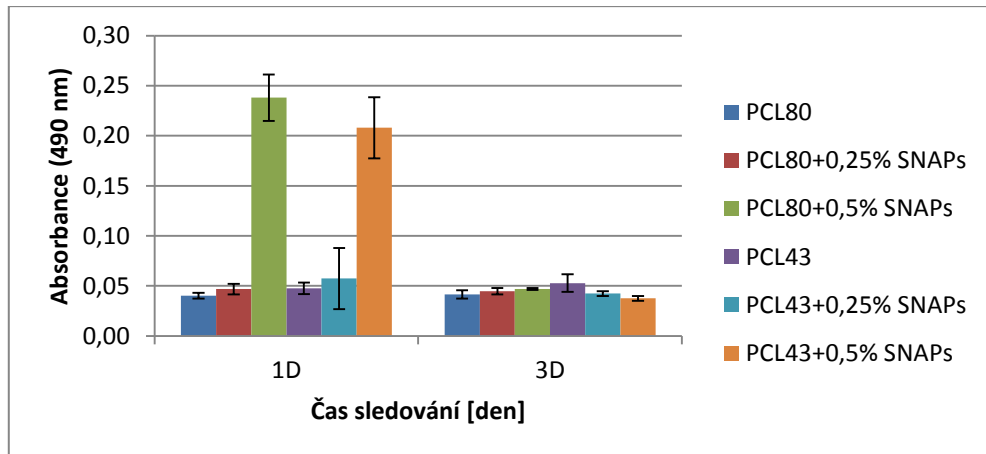
2(C)

Tab. P2: Hodnoty absorbancí, odpovídající molárním koncentracím dusitanu sodného. Generováno lineární extrapolací naměřených hodnot absorbancí kalibračních roztoků o známých koncentracích.

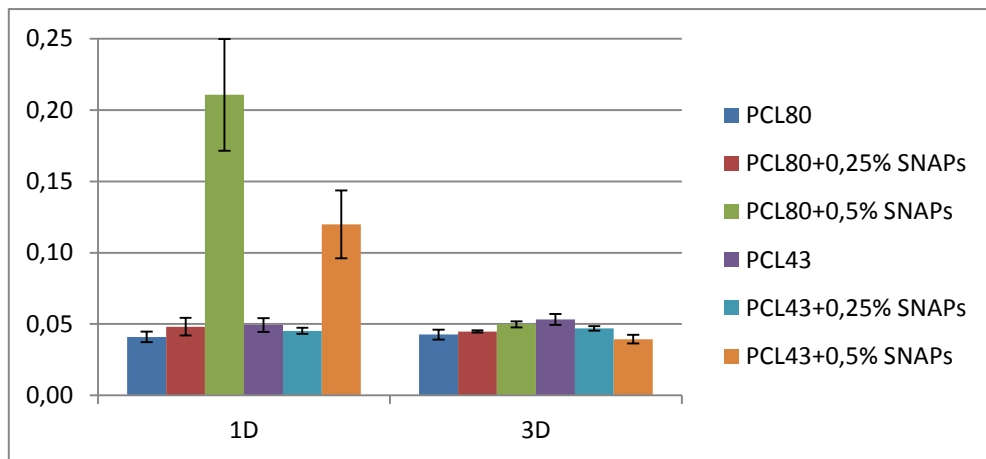
Molární koncentrace [µM]	11,289	22,578	45,156	90,313	180,625	361,250	722,500	1445,000
Absorbance (NEDD v dH_2O)	0,02726	0,02952	0,03403	0,04306	0,06113	0,09725	0,16950	0,31400
Absorbance (NEDD v PBS)	0,0039	0,0061	0,0106	0,0197	0,0377	0,0739	0,1461	0,2906

PŘÍLOHA 3: Doplnění kapitoly 5.2.1.1

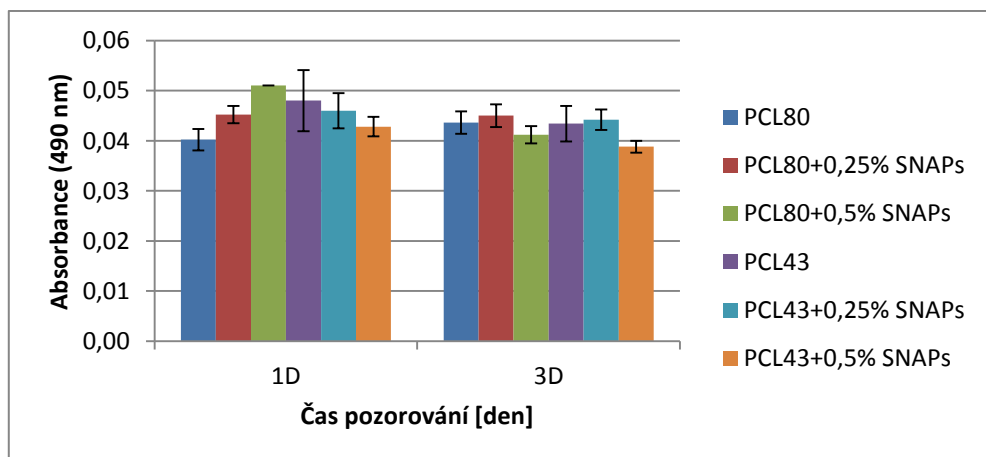
3(A)



3(B)



3(C)



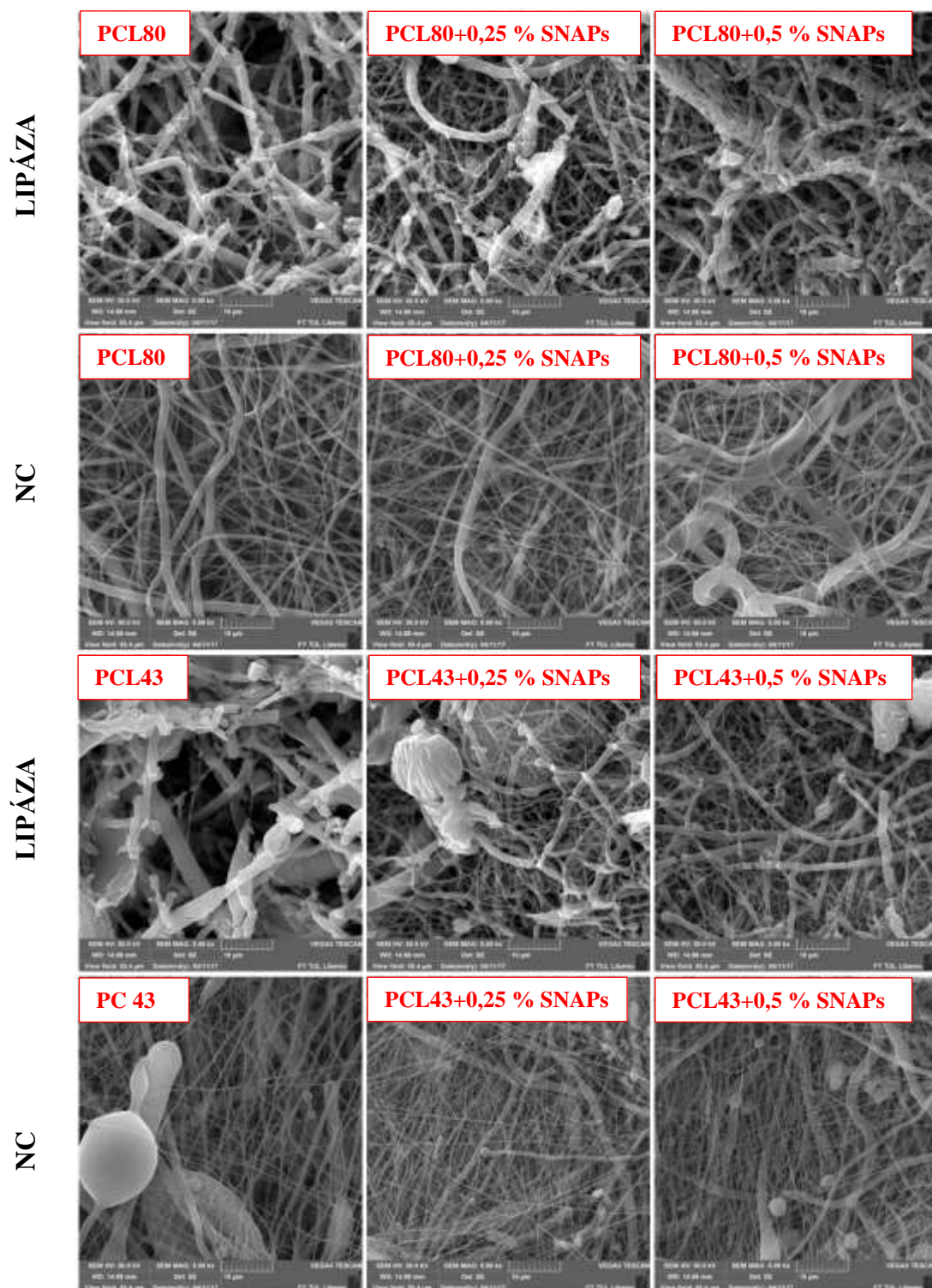
Obr. P3: Výsledky kinetiky uvolňování NO ze vzorků o průměru 1 cm po 1 a 3 dnech: (A) vzorky bez sterilizace, (B) vzorky sterilizované ethylenoxidem, (C) vzorky sterilizované 70 % ethanolom. Naměřené hodnoty absorbance byly získány na základě Griess assay a proměření jednotlivých roztoků při vlnové délce 490 nm.

PŘÍLOHA 4:**4(A) Doplnění kapitoly 5.2.2***Tab. P4 (A) Hmotnost nesterilních vzorků pro sledování kinetiky uvolňování NO.*

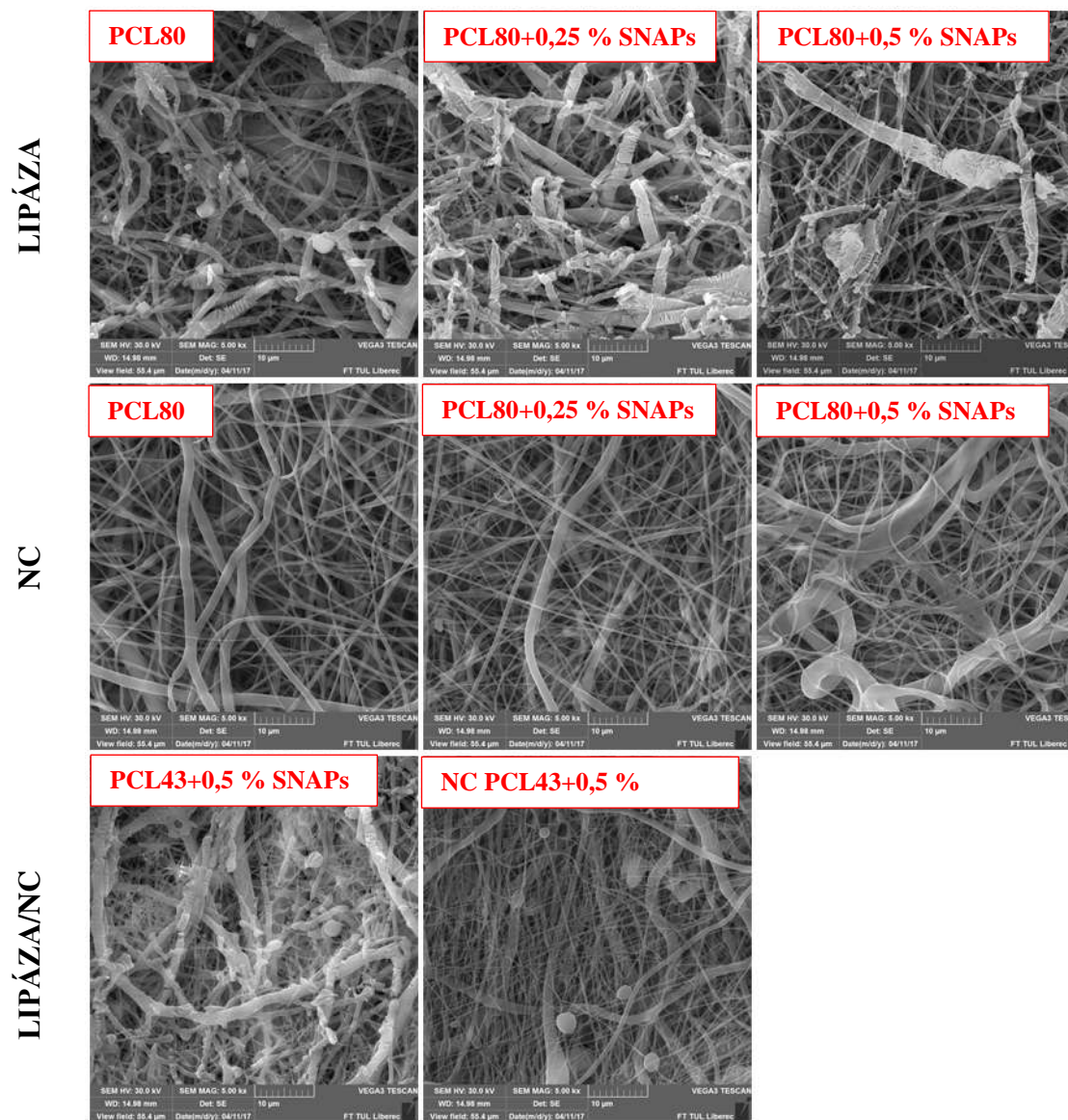
Materiál	Hmotnost vzorků [mg]				
	1	2	3	4	Průměr
PCL80	53,70	54,10	54,10	51,50	53,35
PC80 0,25 % SNAPs	53,90	50,40	48,60	53,00	51,48
PCL80 0,5 % SNAPs	49,20	45,70	51,10	52,50	49,63
PCL43	50,70	50,40	49,40	47,60	49,53
PCL43 0,25 % SNAPs	45,30	45,40	45,20	46,40	45,58
PCL43 0,5 % SNAPs	46,90	45,60	48,90	50,10	47,88

4(B) Doplnění kapitoly 5.2.3*Tab. P4 (B) Hmotnost vzorků vysterilizovaných ethylenoxidem pro sledování kinetiky uvolňování NO.*

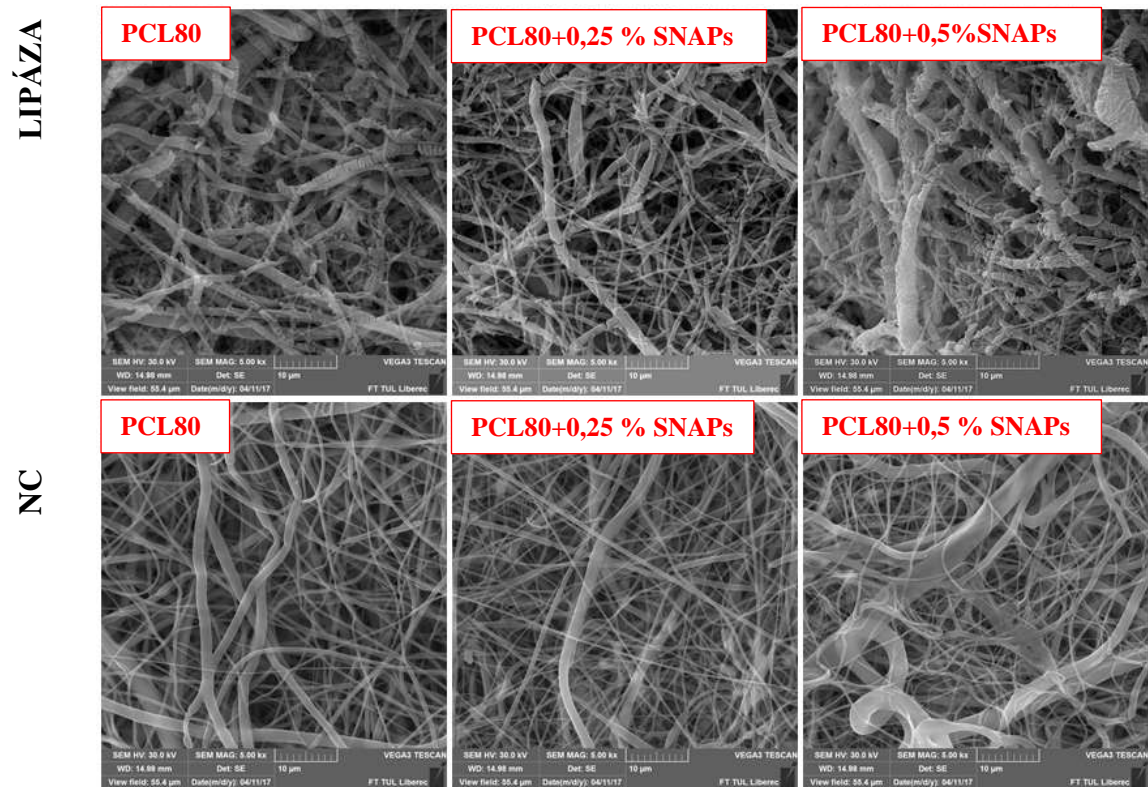
Materiál	Hmotnost vzorků [mg]					
	1	2	3	4	5	Průměr
PCL80	99,70	99,30	100,30	100,60	99,80	99,94
PCL80 0,25 % SNAPs	99,50	100,30	99,40	100,90	99,30	99,88
PCL80 0,5 % SNAPs	111,00	100,20	99,30	98,70	100,00	101,84
PCL43	98,90	100,60	99,80	98,80	100,60	99,74
PCL43 0,25 % SNAPs	99,70	100,70	99,40	100,90	99,20	99,98
PCL43 0,5 % SNAPs	101,70	99,80	99,80	100,20	100,70	100,44

PŘÍLOHA 5: Doplnění kapitoly 5.3.**5(A) 5denní enzymatická degradace (Lipáza + PBS s azidem sodným)**

Obr. P5A1: SEM analýza vzorků po 1 dni degradace vlivem Lipázy + NC pro všechny vlákněné materiály. Zvětšení 5000x.

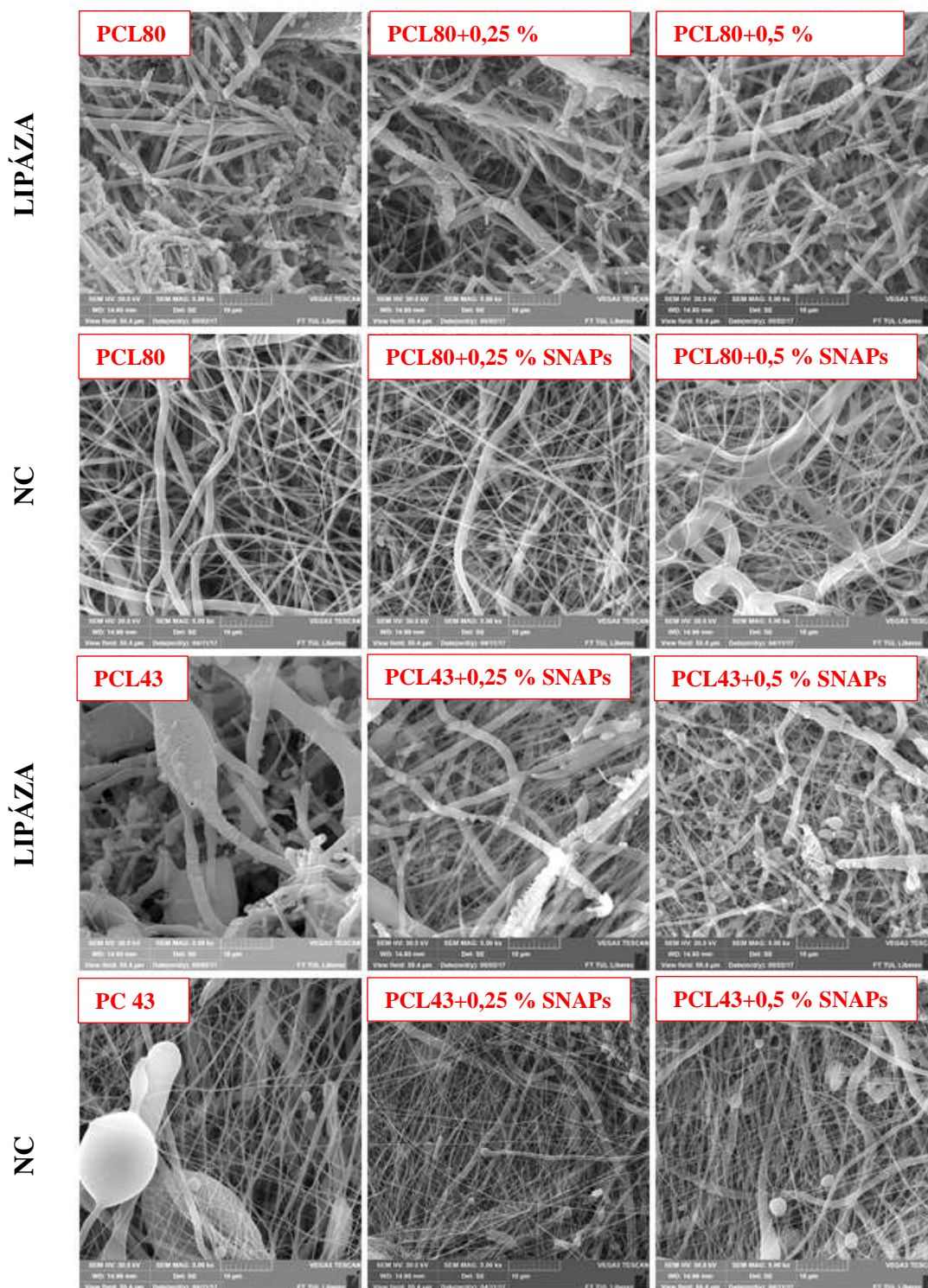


Obr. P5A2: SEM analýza vzorků po 3 dnech degradace vlivem Lipázy + NC pro všechny vláknenné materiály. Zvětšení 5000x.

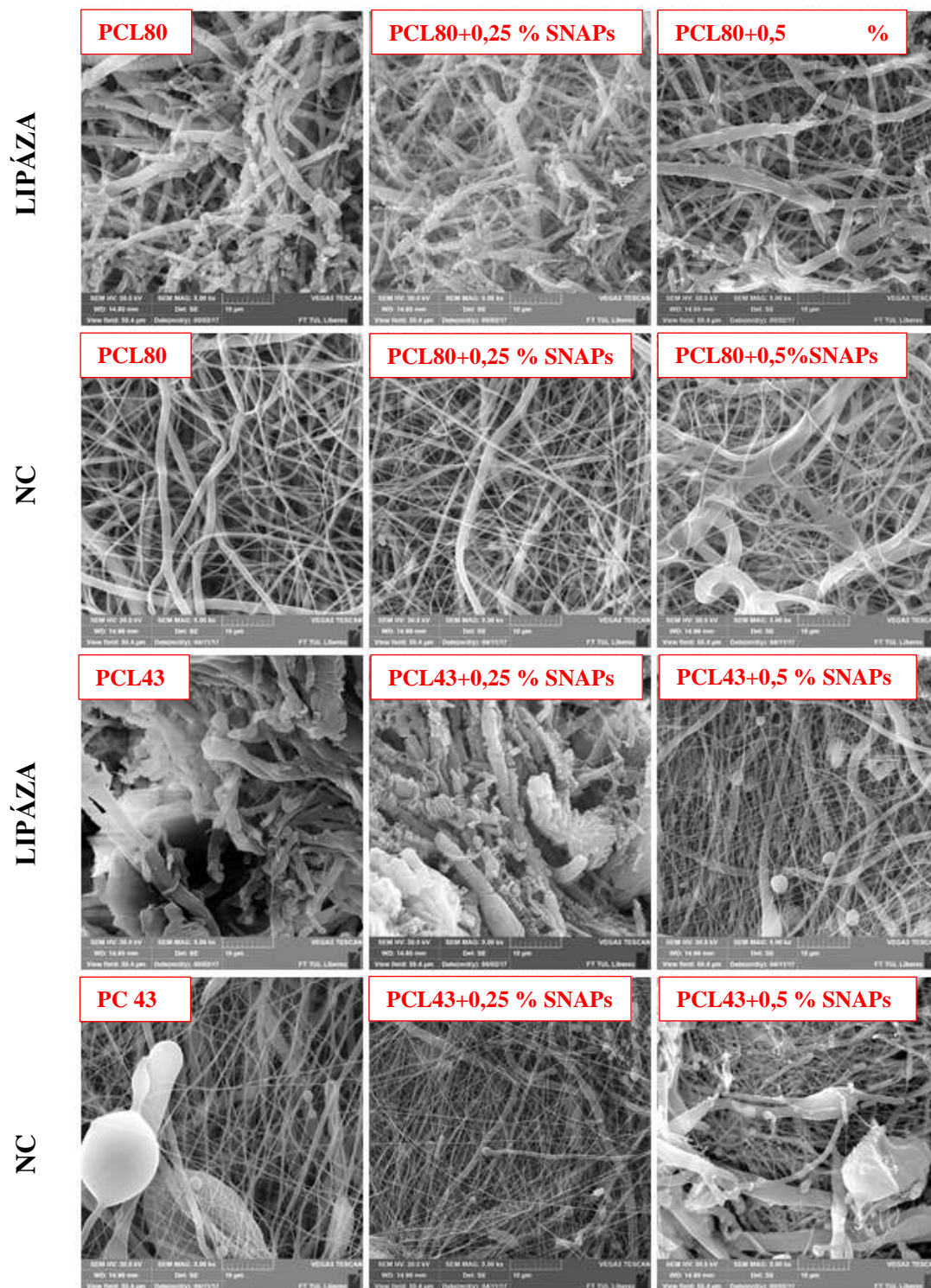


Obr. P5A3: SEM analýza vzorků po 3 dnech degradace vlivem Lipázy + NC pro všechny vláknenné materiály. Zvětšení 5000x.

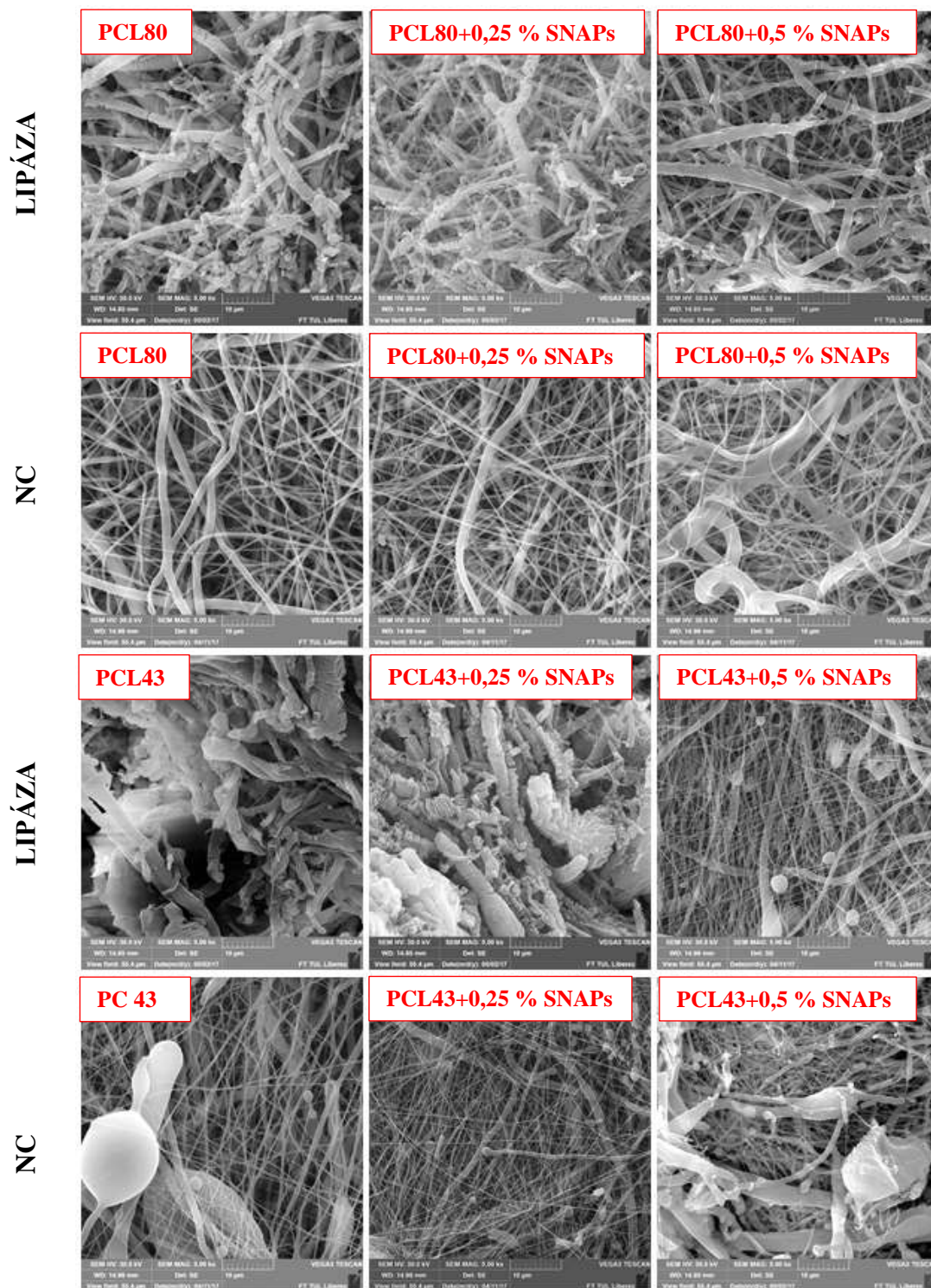
5(B) 3denní enzymatická degradace (Lipáza + PBS bez azidu sodného)



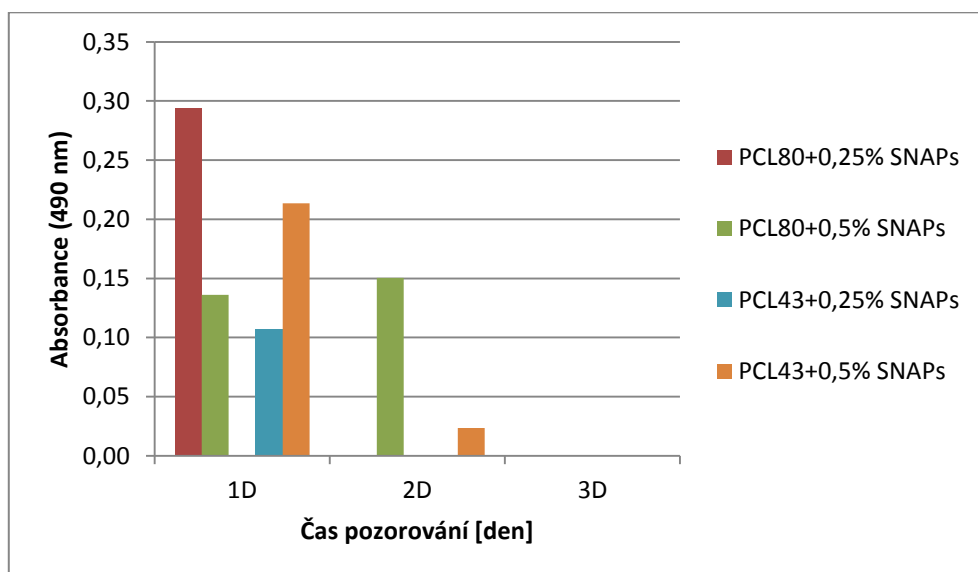
Obr. P5B1: SEM analýza vzorků po 1 dni degradace vlivem Lipázy + NC pro všechny vlákné materiály. Zvětšení 5000x.



Obr. P5B2: SEM analýza vzorků po 2 dnech degradace vlivem Lipázy + NC pro všechny vláknenné materiály. Zvětšení 5000x.



Obr. P5B3: SEM analýza vzorků po 3 dnech degradace vlivem Lipázy + NC pro všechny vláknenné materiály. Zvětšení 5000x.

5(C) 3denní enzymatická degradace (Lipáza + PBS bez azidu sodného)

Obr. P5C: Výsledky kinetiky uvolňování NO ze vzorků (o navážce 50 ± 5 mg) pouze vlivem enzymatické degradace (vzorky +PBS +Lipáza o koncentraci 4 U/ml) po 1, 2 a 3 dnech. Hodnoty byly získány odečtením hodnot absorbancí negativních kontrol od hodnot absorbancí naměřených pro degradované vzorky. Naměřené hodnoty absorbance byly získány na základě Griess assay a proměření jednotlivých roztoků při vlnové délce 490 nm.

PŘÍLOHA 6: Doplnění kapitoly 5.3.3

Tab P6(A): Naměřené hodnoty absorbancí a příslušné hodnoty molárních koncentrací NO, uvolněného ze vzorků během působení enzymatické degradace pro 1., 2. a 3. den.

1D	Průměrná absorbance	Průměrná molární koncentrace NO [mM]	Směrodatná odchylka [mM]	Průměrná molární koncentrace NO [μM] (po odečtení slepých vzorků)
PCL80	0,046	227,500	2,500	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,432	2160,000	15,000	1932,500
PCL80+0,5 % SNAPs	0,531	2655,000	105,000	2427,500
PCL43	0,044	220,000	5,000	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,174	870,000	85,000	650,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,506	2530,000	50,000	2310,000
2D				
PCL80	0,046	227,500	17,500	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,059	295,000	35,000	67,500
PCL80+0,5 % SNAPs	0,336	1680,000	80,000	1452,500
PCL43	0,047	235,000	10,000	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,047	232,500	17,500	0,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,231	1152,500	17,500	917,500
3D				
PCL80	0,0530	265,000	10,000	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,0530	265,000	5,000	0,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,0505	252,500	7,500	0,000
PCL43	0,0585	292,500	2,500	0,000

Tab P6(A): Naměřené hodnoty absorpance a příslušné hodnoty molárních koncentrací NO, uvolněného ze vzorků (negativní kontroly) vlivem difuze pro 1., 2., 3. den.

1D	Průměrná absorpance	Průměrná molární koncentrace NO [μM]	Směrodatná odchylka [μM]	Průměrná molární koncentrace NO [μM] (po odečtení slepých vzorků)
PCL80	0,044	220,000	0,000	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,138	690,000	90,000	470,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,395	1975,000	25,000	1755,000
PCL43	0,052	260,000	5,000	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,067	335,000	30,000	75,000
PCL43+0,5 % SNAPs	0,293	1462,500	37,500	1202,500
2D				
PCL80	0,047	235,000	10,000	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,077	382,500	97,500	147,500
PCL80+0,5 % SNAPs	0,162	807,500	27,500	572,500
PCL43	0,064	317,500	82,500	0,000
PCL43+0,25 % SNAPs	0,055	275,000	15,000	0,000
PCL43+0,5 % SNAPs		1035,000	30,000	717,500
3D				
PCL80	0,0500	250,000	5,000	0,000
PCL80+0,25 % SNAPs	0,0500	250,000	5,000	0,000
PCL80+0,5 % SNAPs	0,0640	320,000	55,000	50,000
PCL43	0,0585	292,500	2,500	0,000