

**UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**Mgr. Martin Pařízek**

**Interakce cévních a kostních buněk s bioaktivními  
polymery pro konstrukci tkáňových náhrad**

Interactions of vascular and bone cells with bioactive polymers for construction  
of tissue replacements

*Disertační práce*

Školitelka: MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 14.12.2012

Martin Pařízek

### **Identifikační záznam:**

PAŘÍZEK, Martin. Interakce cévních a kostních buněk s bioaktivními polymery pro konstrukci cévních a kostních náhrad (Interactions of vascular and bone cells with bioactive polymers for construction of tissue replacements). Praha, 2012. Počet stran 91, počet příloh 10. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Fyziologický ústav AV ČR. Vedoucí závěrečné práce MUDr. Lucie Bačáková CSc.

## Abstrakt

Tato práce se zabývá interakcí buněk s modifikovanými i nově vytvářenými materiály pro inženýrství cévní a kostní tkáně a cílenou dodávku léčiv do implantátů.

V první části práce jsme modifikovali povrch polyetylenových fólií plasmatem Ar a následně je roubovali bioaktivními molekulami (glycin, polyetylen glykol, albumin) a nanočásticemi C či Au. Tyto modifikace vhodným způsobem upravily fyzikální a chemické vlastnosti materiálu, a podpořily tak adhezi a růst cévních hladkých svalových buněk (HSB) i jejich fenotypickou maturaci směrem ke kontraktilnímu fenotypu.

V druhé části práce jsme se zabývali vývojem nového perivaskulárního systému pro cílenou dodávku antiproliferačního léčiva Sirolimu do autologních žilních štěpů, užívaných ke konstrukci aortokoronárního bypassu. Systém se skládá se z polyesterové síťky, která zajišťuje mechanickou stabilitu systému i žilní stěny, dále z kopolymeru kyseliny L-mléčné a  $\epsilon$ -kaprolaktonu, který je nosičem antiproliferativního léčiva, a ze samotné antiproliferační látky Sirolimus. Nově vyvinutý systém snížil proliferaci HSB v pokusech *in vitro* i *in vivo* na modelu králíka domácího.

V části poslední, věnované inženýrství kostní tkáně, jsme metodou elektrostatického zvláknování vytvořili nanovláknenné membrány z kopolymeru L-laktidu a glykolidu (PLGA). Některé membrány byly obohaceny nanodiamanty. Oba typy membrán podpořily iniciální adhezi i následný růst lidských kostních buněk MG 63 v kulturách. Nanovláknenné membrány s nanodiamanty vykázaly lepší mechanické vlastnosti, přičemž na nich nebyly zaznamenány významné projevy cytotoxického poškození či imunitní aktivace buněk. Tento nový materiál se tedy jeví jako slibný pro využití v oblasti inženýrství kostní tkáně.

**Klíčová slova:** syntetické polymery, povrchové modifikace, cévní hladké svalové buňky, kostní buňky, cílená dodávka léčiv, Sirolimus, nanovláknna, nanodiamanty, elektrostatické zvláknování, tkáňové inženýrství

## Abstract

This study is focused on the interaction of cells with surface-modified existing or newly created materials designed for vascular and bone tissue engineering, and also for controlled drug delivery into implants.

In the first part of the study, the surface of polyethylene foils was irradiated with Ar plasma and then grafted with various bioactive molecules (glycine, polyethylene glycol, albumin) or with colloidal carbon or gold nanoparticles. These modifications adjusted the physical and chemical properties of the material for the adhesion, growth and also phenotypic maturation of vascular smooth muscle cells (VSMC) towards the contractile phenotype.

In the second part of the study, we developed a novel perivascular system for controlled drug delivery into autologous vein grafts, currently used for constructing aortocoronary bypasses. The system comprised a polyester mesh, which ensures the mechanical stability of the system and of the venous wall, and a copolymer of L-lactide and  $\epsilon$ -caprolactone (Purasorb), which serves as a carrier of the antiproliferative drug Sirolimus. This system inhibited the proliferation of VSMC *in vitro* and also *in vivo* in a rabbit model.

Finally, we created composite nanofibrous membranes containing a copolymer of L-lactide and glycolide (PLGA) and diamond nanoparticles (ND) by an electrospinning technique. These membranes supported the attachment, spreading and subsequent proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells *in vitro*. The PLGA-ND membranes showed higher mechanical resistance without considerable cytotoxic injury or inflammatory activation of the cells.

**Key words:** Synthetic polymers, surface modification, vascular smooth muscle cells, bone cells, controlled drug delivery, Sirolimus, nanofibers, nanodiamonds, electrospinning, tissue engineering

## Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat své školitelce, MUDr. Lucii Bačákové, CSc. (Fyziologický ústav Akademie Věd ČR), a to nejen za trpělivost, kterou se mnou měla po celou dobu mého studia, ale hlavně za příkladné vedení při pokusech, které jsou podkladem této disertační práce. Dále bych rád poděkoval všem svým spolupracovníkům, kteří se podíleli na přípravě vzorků, bez kterých bychom nemohli plně rozvinout naše teorie o biokompatibilitě materiálů, a sice prof. Ing. Václavu Švorčíkovi, DrSc., Ing. Nikole Slepíčkové Kasálkové, PhD. (VŠCHT, Praha) a Timothy Douglasovi, PhD (Polymer Chemistry and Biomaterials Group, Ghent University, Ghent, Belgie). Nesmím zapomenout ani na své kolegy z Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu AV ČR (Odd. 11), díky kterým byla má vědecká činnost nepoměrně příjemnější a od kterých se mi dostalo mnoha cenných rad i usměrňujících připomínek. Další, komu patří slova díky, je oponent a členové komise, kteří věnovali čas této mé práci a připomínkovali ji.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu a účast, kterou projevovala po celou dobu mého postgraduálního studia.

## Seznam zkratek

3T3	linie myších embryonálních fibroblastů (3-day transfer, inoculum $3 \times 10^5$ cells);
a-C	amorfní uhlík
AFM	mikroskop atomárních sil (atomic force microscope)
ANOVA	Analysis of Variance, statistický test
BSA	hovězí (bovinní) sérový albumin
CD 31	diferenciační skupina 31 (cluster of differentiation 31)
CD 144	diferenciační skupina 144 (cluster of differentiation 144)
DMEM	Dulbeccova modifikace Eaglova minimálního esenciálního média (Dulbecco's Modified Eagle's Minimum Essential Medium)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
ELISA	enzymatická imunosorbentní esej (enzyme-linked immunosorbent assay)
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELAM-1	endoteliální-leukocytární adhezní molekula-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1)
FBS	fetální hovězí sérum
FTIR	Fourierova infračervená spektroskopie (Fourier transform infrared)
HAp	hydroxyapatit
HDPE	polyetylén o vysoké hustotě (high-density polyethylene)
hm. %	hmotnostní procenta
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HSB	hladké svalové buňky
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula-1 (intercellular adhesion molecule-1)
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$
KRSR	Lys-Arg-Ser-Arg, lysin-arginin-serin-arginin, ligand pro adhezní receptory osteoblastů
LDPE	polyetylén o nízké hustotě (low-density polyethylene)
MG 63	buněčná linie lidských buněk podobných osteoblastům (human osteoblast-like cells)
m.h.	molekulová hmotnost
NIH	National Institutes of Health

PBS	fyziologický roztok pufrovaný fosfáty (phosphate-buffered saline)
PDGF	růstový faktor krevních destiček (platelet-derived growth factor)
PE	polyetylén
PECAM	molekula pro adhezi krevních destiček k endotelu (platelet-endothelial cell adhesion molecule)
PEG	polyetylén glykol
PES Mesh	polyesterová síťka
PET	poly (ethylen tereftalát)
PCL	poly( $\epsilon$ -kaprolakton)
PLGA	kopolymer laktidu a glykolidu
PLLA	kyselina poly (L-mléčná); poly (L-lactic acid)
PTFE	polytetrafluoroetylen
PVDF	polyvinyliden fluorid
RBS	Rutherfordova spektroskopie zpětného rozptylu (Rutherford back-scattering spectroscopy)
RGD	Arg-Gly-Asp, arginin-glycin-kyselina asparagová; oligopeptidický ligand pro integrinové adhezní receptory buněk
RMS	efektivní hodnota drsnosti (root mean square)
SEM	rastrovací (skenovací) elektronový mikroskop (scanning electron microscope)
S.E.M.	střední chyba průměru (Standard Error of Mean)
S.D.	standardní odchylka (Standard Deviation)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )
UHPLC	velmi vysoce účinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UV	ultrafialový
VCAM-1	adhezní molekula cévních buněk-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VE-kadherin	vaskulární endoteliální kadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor; vaskulární endotelový růstový faktor
VÚP	Výzkumný ústav pletářský
v/v	poměr objem/objem (volume/volume)



# Obsah

1. Úvod.....	11
1.1. Poškození cévy a potřeba její náhrady.....	11
1.2. Poškození kostí a kloubů a potřeba jejich náhrady.....	15
1.3. Materiály pro konstrukci cévních a kostních náhrad.....	17
1.3.1. Polymery pro konstrukci klinicky užívaných i experimentálních cévních náhrad.....	17
1.3.2. Polymery pro konstrukci klinicky užívaných i experimentálních kostních náhrad.....	19
1.3.3. Metodika modifikací polymerů.....	21
1.4. Mechanismus adheze buňka-materiál.....	25
1.4.1. Proteiny zprostředkující adhezi buňka-materiál.....	25
1.4.2. Mechanismus vazby ECM-materiál a ECM-buňka.....	27
1.5. Metody studia interakce buňka – materiál.....	29
2.5.1. Podmínky kultivace buněk <i>in vitro</i> .....	29
2.5.2. Parametry chování buněk hodnocené na materiálech <i>in vitro</i> .....	31
2. Hypotézy a cíle práce.....	33
3. Materiál a metody.....	34
3.1. Modifikace polyetylénu a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti.....	34
3.2. Příprava polyesterové síťky pro uvolňování Sirolimu v pokusech <i>in vitro</i> a v živém králičím modelu.....	35
3.3. Příprava nanovláknenných nosičů a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.....	37
3.4. Buněčné modely a kultivační podmínky.....	39
3.5. Chování buněk na zkoumaných materiálech.....	41
3.6. Statistická analýza.....	42
4. Výsledky.....	43
4.1. Cévní hladké svalové buňky v kulturách na modifikovaném polyetylénu.....	43
4.2. Polymerní síťky řízeně uvolňující Sirolimus pro prevenci hyperplazie cévních HSB v bypassu z autologní žíly.....	47
4.3. Růst kostních MG 63 buněk na kompozitních nanovláknenných membránách z PLGA kombinovaných s nanodiamanty.....	49
5. Diskuse.....	53
5.1. Cévní hladké svalové buňky v kulturách na modifikovaném polyetylénu.....	53

5.2. Polymerní sítě řízeně uvolňující Sirolimus pro prevenci hyperplazie cévních HSB v bypassu z autologní žíly.....	60
5.3. Růst kostních MG 63 buněk na kompozitních nanovlákných membránách z PLGA kombinovaných s nanodiamanty.....	63
6. Závěr a další výhledy.....	68
7. Souhrn.....	69
8. Literatura.....	72
9. Publikační aktivita.....	83
9.1. Primární články v mezinárodních impaktovaných časopisech.....	83
9.2. Přehledné články v mezinárodních impaktovaných časopisech.....	84
9.3. Ukazatelé publikační aktivity podle Web of Science.....	84
9.4. Primární články v mezinárodních neimpaktovaných časopisech.....	84
9.5. Publikovaná abstrakta ku příležitosti konferencí.....	86
9.6. Prezentace na konferencích.....	87
9.6.1. Zahraniční konference.....	87
9.6.2. Tuzemské konference.....	88
10. Zahraniční stáže.....	89
11. Přílohy.....	90

# 1. Úvod

## 1.1. Poškození cévní stěny a potřeba její náhrady

Kardiovaskulární onemocnění, jako je ateroskleróza a hypertenze, jsou často spojena s ireverzibilním poškozením cév a ztrátou jejich funkce. Tato onemocnění jsou v naší společnosti poměrně rozšířená a patří mezi důležité rizikové faktory významně ovlivňující délku a kvalitu života. Hladké svalové buňky (HSB) hrají důležitou roli v mechanismu tvorby aterosklerotického plátu a ztlustění cévní stěny při hypertenzi. Tyto poruchy jsou iniciovány mechanickým poškozením endotelové výstelky cévy, zejména nefyziologicky vysokým krevním tlakem v cévě a biochemickým poškozením této výstelky. Toto poškození je velmi častým důsledkem nesprávného životního stylu a civilizačního stressu (např. se jedná o zvýšenou hladinu cholesterolu či glukózy v krvi, kouření apod.). Propustnost endotelové výstelky cévy se zvyšuje a do nitra cévní stěny se dostávají molekuly, které se zde za fyziologických okolností nevyskytují, jako jsou růstové faktory, především růstový faktor krevních destiček (Platelet-derived growth factor, PDGF), chemotaktický a mitogenní pro HSB. Molekuly podobné PDGF mohou být za patologických okolností autokrinně produkovány i v samotných HSB (pro přehled viz [Bačáková – Řeřábková 1990](#)). Do cévy mohou pronikat i další proteiny přítomné v krvi, jako je albumin, fibronektin a vitronektin, a kvalitativně měnit složení extracelulární matrix (ECM) cévy. Kromě toho reaguje endotel na poškození i svou imunitní aktivací, která se projevuje syntézou imunoglobulinových a selektivních adhezních molekul, jako je intercelulární adhezní molekula-1 (ICAM-1), vaskulární adhezní molekula-1 (VCAM-1) či endoteliální-leukocytární adhezní molekula-1 (ELAM-1) a jejich přítomností na buněčném povrchu. Tyto molekuly pak slouží jako receptory pro buňky imunitního systému, jako jsou leukocyty, lymfocyty, monocyty, makrofágy a v neposlední řadě i mastocyty. Úloha posledně zmíněného buněčného typu v patologii cévní stěny byla často podceňována, ačkoli v patologicky změněné cévní stěně může být až každá pátá buňka mastocytom ([Rohatgi et al. 2009](#)). Buňky zánětlivé reakce pronikají do cévní stěny, kde svými působky, jako jsou například metaloproteázy, narušují ECM a uvolňují tak HSB z migrační a růstové inhibice, která se ve zdravé cévě uskutečňuje právě prostřednictvím této matrix. Buňky imunitního systému navíc produkují četné cytokiny, například interleukiny či faktory nádorové nekrózy (tumor necrosis factors, TNF), které podobně jako PDGF stimulují HSB ke změně fenotypu z kontraktilního na syntetický, čili k tzv. fenotypické modulaci ([Orr et al. 2009](#)). Tato modulace je charakterizována zejména úbytkem specifických isoform

kontraktilních proteinů, jako je alfa-aktin a SM1 a SM2 myosin, a naproti tomu přibýváním  $\beta$ -isoformy aktinu a rovněž buněčných organel zúčastněných v proteosyntéze, jako je endoplasmatické retikulum, ribosomy či Golgiho komplex (Fager *et al.* 1989). Fenotypicky modulované HSB jsou pak ochotné k hyperplastickému i hypertrofickému růstu, migraci do *tunica intima*, a významně se tak podílejí na remodelaci cévní stěny, jejím ztluštění a tvorbě aterosklerotického plátu.

Aterosklerotický plát je kromě HSB složen také z cholesterolu pohlceného makrofágy i samotnými HSB, trombocytů, vazivové tkáně, a případně může i kalcifikovat, neboť HSB mohou produkovat glykoproteiny vázající vápník, jako například osteopontin (Orr *et al.* 2009) a osteokalcin (Liu *et al.* 2011). Průsvit cévy je zúžen až úplně uzavřen, a zásobování tkání a orgánů okysličenou krví je tak výrazně omezeno. V pokročilém stadiu se jedná o ireverzibilní jev. Ateroskleróza je ve vyšším věku příčinou většiny případů infarktu a mozkové mrtvice, tedy příhod s často smrtelnými následky (Slevin *et al.* 2009). Léčba atherosklerózy probíhá většinou pomocí specifických nízkotučných diet, příklonem ke zdravému životnímu stylu a léčbou medikamenty, např. statiny.

V některých případech však nezbyvá nic jiného, než nevratně poškozenou cévu nahradit a to náhradou autologní nebo náhradou umělou.

Proto se ve své disertační práci zabývám především testováním materiálů potenciálně využitelných pro konstrukci umělých cévních náhrad. Materiály jsou testovány pomocí cévních HSB, tedy přesněji sledováním interakcemi mezi materiálem a buňkou v podmínkách buněčné kultury. Na umělých materiálech je sledována adheze, růst a vybrané markery fenotypické maturace tohoto typu buněk.

Cévní náhrada je v představách moderního tkáňového inženýrství charakterizována jako náhrada tzv. bioarteficiální, tj. sestávající z umělého nosiče a buněk. Umělý nosič by měl být konstruován v podobě trojrozměrné porézní či vláknité sítě, která bývá v mezinárodní literatuře nazývána jako „scaffolds“, neboť skutečně připomíná určité „lešení“ pro uchycení buněk. Vnitřek „lešení“ je určen pro osídlení HSB, o nichž se předpokládá, že podobně jako v podmínkách *in situ* budou formovat několikvrstevnou kontraktilní strukturu, a rovněž je určen pro vrůstání vyživujících kapilár (tzv. *vasa vasorum*) a nervových vláken. Vnitřní povrch bioarteficiální náhrady pak bude osídlen buňkami endotelovými, které budou vytvářet souvislou, fenotypicky vyzrálou a tudíž polopropustnou, neimunogenní a netrombogenní vrstvu (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, Bačáková *et Švorčík* 2008, Chlupáč *et al.* 2009, Pařízek *et al.* 2011).

Důležitou vlastností umělého nosiče buněk v moderní bioarteficiální cévní náhradě je fakt, že tento nosič není pouze pasivně tolerován buňkami (jako tomu bylo v případě materiálu cévních i dalších tkáňových náhradách minulých generací), ale že napodobuje funkce přirozené ECM. Znamená to, že umělý materiál reguluje rozsah a sílu adheze buněk, jejich růstovou aktivitu, diferenciaci a maturaci buněk do určitého fenotypu i další buněčné funkce. Za vhodné bývá považováno „lešení“ z resorbovatelných materiálů, obvykle syntetických polymerů, které je postupně nahrazováno buňkami a jejich přirozenou ECM, takže vlastně slouží ne jako trvalá cévní náhrada, ale jako dočasná podpurná struktura stimulující regeneraci poškozené cévy. V experimentech na zvířatech se však projevilo, že degradovatelné syntetické polymery mají často nedostatečné mechanické vlastnosti, které mohou vést k vytvoření aneurysmatu cévy či k její ruptuře. K těmto nedostatečným mechanickým vlastnostem přispívá i relativně rychlá degradace polymeru a pomalá novotvorba tkáně cévní stěny. Resorbovatelné polymery často užívané v tkáňovém inženýrství, jako jsou polylaktidy, polyglykolidy, polykarprolakton a jejich kopolymery, degradují obvykle v řádu týdnů až měsíců, zatímco pro rekonstrukci lidské cévy, zvláště u starších pacientů s dalšími interkurentními chorobami, by se tato doba měla uvažovat spíše v řádu několika let. Proto při rekonstrukci cév dochází i v moderních přístupech k určité „renesanci“ stabilních polymerů, nebo se uvažovalo i o konstrukci semidegradabilních protéz obsahujících složku stabilní a složku resorbovatelnou (Xue *et Greisler* 2003). V současné době je vyvíjena nová generace degradovatelných polymerů, jako jsou degradovatelné varianty polyuretanu (Sharifpoor *et al.* 2009) či elastomery, které jsou pružné a zároveň relativně pevné, a tudíž se svými mechanickými vlastnostmi více blíží vlastnostem cévní stěny než degradovatelné polymery klasické (Soletti *et al.* 2010, Song *et al.* 2010).

Pokud jde o buněčnou složku cévní náhrady, obvykle se uvažuje o osazení materiálu diferencovanými endotelovými a hladkými svalovými buňkami, odebranými obvykle z podkožních žil pacienta před plánovanou operací. Buňky jsou posléze namnoženy v podmínkách *in vitro* a nasazeny na syntetický nosič. Po určitém „dozrání“ konstruktu buňka-materiál *in vitro*, nejlépe v dynamických kultivačních systémech, lze pak konstrukt implantovat do organismu pacienta. Po určité době lze pak očekávat, že se umělé „lešení“ vstřebá a pacient vytvoří novou vlastní plnohodnotnou cévu (pro přehled viz Bačáková *et Švorčík* 2008, Pařízek *et al.* 2011). Při nedostatku diferencovaných endotelových a hladkých svalových buněk pacienta se plánuje i využití buněk kmenových, jako jsou např. kmenové buňky přítomné v kostní dřeni, krvi, tukové tkáni či satelitní buňky kosterního svalu (pro přehled viz Filová *et al.* 2009a, Chlupáč *et al.* 2009), které jsou vlivem složení kultivačního média, vhodných

dynamických kultivačních podmínek a v neposlední řadě i vlastnostmi umělého nosiče diferencovány v žádoucí fenotyp.

Uvedené přístupy, třebaže nadějně pro budoucnost, zůstávají však v současných podmínkách stále ještě spíše v oblasti teorie (tj. na úrovni experimentů *in vitro* či na laboratorních zvířatech). Za nejkvalitnější náhradu poškozených cév je stále ještě považována céva autologní - klasickým příkladem je aortokoronární bypass vytvořený z podkožních žil dolních končetin (v. *saphena*) či z *a. thoracica interna*. Ten přístup má však své limity, jako je dostupnost kvalitní cévy k vytvoření náhrady. U značné části zvláště starší populace jsou v civilizované společnosti rozvinuty cévní choroby, zvláště výše zmíněná ateroskleróza. Navíc i u cév zdravých bývá problémem dostupnost tkáně v dostatečném množství (Chlupáč *et al.* 2009). Problém činí i špatná adaptace žilní tkáně na zvýšené mechanické nároky po implantaci této tkáně na arteriální pozici. Tato maladaptace se obvykle projevuje aktivací migrace, proliferace a syntetické aktivity HSB, tj. jevů, které spolu s poškozením endotelové vrstvy a formací trombů vedou k restenoze autologní cévní náhrady. Existují i možnosti allogenních či dokonce i xenogenních náhrad z organismů zdravých dárců, ale při tomto postupu narážíme na riziko imunitní rejekce implantátů a rovněž riziko přenosu infekce (Kakisis *et al.* 2005).

Pokud jde o cévní náhrady umělé, v současné době se klinicky využívají cévní protézy z běžně dostupných syntetických polymerů, konkrétně z polyetylén tereftalátu (PET) a expandovaného polytetrafluoroethylenu (ePTFE). Tyto náhrady mají poměrně vhodné mechanické vlastnosti a jsou odolné vůči případnému poškození tlaky v cévním řečišti. Jejich perspektiva dlouhodobé trvanlivosti v těle pacienta však není příliš dobrá (Xue *et Geisler* 2003). Tyto protézy mají poměrně dost negativních fyzikálních vlastností, zabraňujících úspěšnému vhojení. Především jsou vysoce hydrofobní, což je hlavní faktor limitující adhezi buněk, tedy i případnou rekonstrukci souvislé zralé endotelové vrstvy, která je považována za nejkvalitnější antitrombogenní povrch. Uvnitř náhrad cév velkých průměrů chybění endotelové vrstvy není faktorem výrazně omezujícím dlouhodobou průchodnost cévy, neboť rychlost průtoku krve zamezuje adhezi trombocytů a dalších buněk krve v cévní náhradě (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, Chlupáč *et al.* 2009). U cévních náhrad menších průměrů, tj. méně než 6 mm, je však průtok krve pomalejší, a tak zde může dojít k hromadění trombocytů a dalších složek krve včetně buněk imunitního systému při stěnách cévní náhrady, a tím k následnému zúžení až úplnému uzavření cévního průsvitu. Pacient je také po zbytek života odkázán na antikoagulační léčbu, která uvedené jevy kauzálně neřeší, ale pouze oddaluje, a má i jiné negativní účinky na jeho organismus. U cév menšího průměru se tedy obzvláště projevuje potřeba konstrukce bioarteficiální cévní protézy s vyzrálou konfluentní vrstvou

netrombogenního endotelu. Rekonstrukce takovéto vrstvy endotelu byla donedávna středem zájmu všech inovací polymerních cévních protéz (Chlupáč *et al.* 2009), zatímco HSB byly obvykle z konstrukce cévních náhrad vylučovány pro riziko jejich nadměrné proliferace a následné restenózy cévní náhrady. Na druhé straně je nutno si uvědomit, že HSB představují nejpočetnější buněčný typ zastoupený v cévní stěně, a kontraktilní vrstva těchto buněk je přirozenou součástí této stěny. Proto by *tunica media* obsahující HSB měla být rekonstruována i v cévních náhradách. Vlastnosti umělého materiálu v těchto náhradách i kultivační prostředí, v němž jsou buňky na materiálu pěstovány, by měly nasměrovat HSB k jejich fenotypické maturaci od fenotypu syntetického, obvyklého v systému konvenčních buněčných kultur, směrem ke klidovému kontraktilnímu fenotypu (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a, Bačáková *et Švorčík* 2008, Chlupáč *et al.* 2009, Pařízek *et al.* 2011). Proto jsem se ve své disertační práci soustředil na interakci umělých materiálů nejen s buňkami endotelovými, ale především HSB.

## 1.2. Poškození kostí a kloubů a potřeba jejich náhrady

Kromě náhrad poškozených cév je další neméně důležitou oblastí moderního tkáňového inženýrství i náhrada poškozené tkáně kostí a kloubů. K jejich ireversibilnímu poškození v civilizované společnosti vedou především degenerativní a zánětlivá onemocnění, jako jsou artritidy a artrózy, onemocnění nádorová, a rovněž úrazy dopravní či pracovní.

Stejně jako v případě cév, je i u kostí možnost nahrazení kostní tkáně vlastním štěpem, případně tkání pocházející od jiného vhodného dárce, nebo náhradou umělou.

Vlastní (tj. autologní) štěpy mají oproti štěpům pocházejícím z osoby jiné (tj. alogenním) několik nesporných výhod. Jsou plně imunokompatibilní a osteokonduktivní, což znamená, že umožňují formování a následnou regeneraci kosti. Kromě toho jsou také i osteinduktivní, tj. indukují vyžívání prekurzorů osteoblastů do vyžívých kostních buněk. Mezi jejich hlavní nevýhody ovšem patří především kvalita a množství materiálu použitelného jako autologní štěp, nehledě na zdravotní možnosti daného samodárce.

Mezi hlavní výhody štěpů alogenních patří zejména jejich lepší dostupnost, tím však jejich výhody prakticky končí. K jejich získání je většinou potřeba invazivního chirurgického zákroku, mezi dárce a příjemce může docházet k přenosu chorob, a na základě imunitní nekompatibility neřídka dochází i k odvrhnutí implantovaného štěpu organismem dárce (pro přehled viz Vagaská *et al.* 2010, Vandrovcová *et al.* 2011a). Další možností náhrady poškozené kostní tkáně, jejíž význam a aktuálnost v současné době neustále stoupá, je použití náhrady

umělé. Pro zátěžové aplikace, tj. vystavené vysokému stupni mechanického namáhání (typickým příkladem jsou náhrady kyčelního a kolenního kloubu nesoucí hmotnost organismu pacienta), nebyly dosud překonány materiály kovové. Tyto materiály se používají zejména pro konstrukci těch částí kloubních náhrad, které jsou ukotveny do kosti, např. u protézy kyčelního kloubu to je dřík ukotvený do kosti stehenní a jamka ukotvená do kosti kyčelní.

Starší, ale dosud používaná generace kovových materiálů je zastoupena především nerezovou ocelí (norma AISI 316L) či slitinami kobaltu a chromu. Nevýhodou těchto materiálů je však obrovský nepoměr mezi jejich tuhostí a tuhostí tkáně kostní. Modul pružnosti těchto materiálů převyšuje 200 GPa, zatímco u kosti je to pouhých 10-40 GPa. V 50. letech bylo dosaženo určitého pokroku zavedením slitiny Ti-6Al-4V, jejíž modul pružnosti je již jen 110 GPa (Geetha *et al.* 2009). Stále však tato relativně vysoká tuhost i měrná hmotnost (hustota) kovových materiálů může způsobovat poškození a aseptickou nekrózu kosti v okolí implantátu. Navíc jmenované kovové materiály mohou uvolňovat cytotoxické, imunogenní i alergenní ionty (pro přehled viz Vagaská *et al.* 2010, Vandrovcová *et al.* 2011a). V současné době je velká naděje vkládána do tzv. beta-slitin titanu, tj. slitin titanu s niobem, tantalem či zirkonem, jejichž modul pružnosti se již výrazně přibližuje kosti (může dosáhnout pouhých 60 GPa), přičemž jejich cytotoxicita či prozánětlivé působení jsou velmi nízké (Hanada *et al.* 2005, Wang *et al.* 2008).

Pro konstrukci kloubních náhrad se v současné používají i materiály keramické a polymerní, a to pro konstrukci kloubních hlavic a vnitřní části kloubní jamky, přiléhající k hlavici. Tyto materiály jsou však perspektivní i pro konstrukci náhrad kostní tkáně. Keramické materiály, zejména na bázi fosfátů vápníku, jako je hydroxyapatit a trikalciumfosfát, napodobují svým chemickým složením i strukturou (například svou nanokrystalickou podobou) anorganickou složku přirozené ECM kostní tkáně. Polymerní materiály naproti tomu napodobují organickou složku kostní ECM, a to podle své struktury buď její vláknitou nebo amorfní složku. Například ve formě nanovláken mohou polymerní materiály napodobit kolagenní vlákna v kostní matici. Nevýhodou keramických materiálů je však jejich křehkost, zatímco polymery jsou pro zátěžové aplikace příliš ohebné a měkké. Nabízí se ale myšlenka oba typy materiálů zkombinovat, například vyztužit polymerní nanovláknem keramickými nanočásticemi. Tento materiál by pak sloužil jako bioaktivní prostorový porézní nosič kostních buněk, které by vrůstaly do nitra materiálu a časem by vytvořily kompletní regenerovanou kostní tkáň, přičemž samotný scaffold by se postupem doby zcela resorboval (pro přehled viz Vagaská *et al.* 2010, Vandrovcová *et al.* 2011a).



### 1.3. Materiály pro konstrukci cévních a kostních náhrad

Kapitola je zaměřena na charakteristiku nejvíce používaných materiálů.

#### 1.3.1. Polymery pro konstrukci klinicky užívaných i experimentálních cévních náhrad

Jak již bylo zmíněno, v klinické praxi se v současné době využívají především cévní náhrady na bázi polyetylén tereftalátu (PET) a polytetrafluorethylenu (PTFE). Nadějným materiálem blízkým klinickému využití je polyuretan, který byl v souvislosti s cévním systémem zatím aplikován ve formě hemodialyzačních katétrů (pro přehled viz [Chlupáč et al. 2009](#)). Polyetylén o nízké hustotě je vzhledem ke svým vhodným mechanickým vlastnostem, jako je pružnost a ohebnost, užíván ke konstrukci intravaskulárních katétrů pro arteriografii a angioplastiku ([Caldwell et al. 2002](#)). Niméně pro vlastní konstrukci cévních protéz zůstává stále v oblasti experimentální, podobně jako další polymery biostabilní, jako je např. polypropylen (PP), či polymery degradabilní, jako jsou polylaktidy, polyglykolidy, polykaprolakton a jejich kopolymery.

Ve svých studiích jsem z tohoto výčtu polymerů pracoval s PET, PTFE a PE, a proto se v následujícím podrobnějším popisu vlastností polymerů zaměřím již pouze na uvedené materiály.

##### *Polyetylén tereftalát (PET)*

PET ( $\text{O-C=O-C}_6\text{H}_4\text{-O-C=O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ) byl prvně zaveden v Anglii v roce 1939. V roce 1950 byl na základě předchozího vývoje patentován společností DuPont pod obchodním názvem Dacron. Je to termoplastický polymer ze skupiny polyesterů, vzniklý na základě polykondenzace, přičemž katalyzátorem je v tomto případě kyselina ftalová. Tento polymer je vysoce hydrofobní ([Švorčík et al. 2006a](#)). Pro záměry konstrukce cévních náhrad se využívá především ve formě vláken, která se dále zpracovávají tkaním nebo pletením do požadovaného tvaru napodobujícího vlastní cévu (pro přehled viz [Chlupáč et al. 2009](#), [Pařízek et al. 2011](#)).

Při konstrukci obou typů protéz však narážíme na úskalí propustnosti výsledného produktu, která je vyšší při zpracování pomocí pletařských technologií. Tento jev se dá odstranit pomocí impregnace některými proteiny, jako je albumin, kolagen nebo želatina. Protože trvalá přítomnost proteinu, obvykle xenogenního původu, není žádoucí, je možné například albumin předem upravit pomocí glutaraldehydu nebo formaldehydu za účelem postupné degradace proteinu v řádu týdnů po implantaci ([Marois et al. 1996](#)). Tato modifikace je však zatížena rizikem retence a následného uvolňování cytotoxických fixativ z materiálu.

### ***Polytetrafluorethylen (PTFE)***

PTFE (-CF<sub>2</sub>-CF<sub>2</sub>-) je známý především pod obchodními jmény Teflon a Goretex. Teflon je chráněnou značkou firmy DuPont, která ho uvedla na trh v roce 1937, Goretex je patentem firmy Gore z roku 1969. Je to termoplastický fluorovaný polymer s vysokým kyslíkovým číslem, prakticky nehořlavý, teplotně velmi odolný.

Z klinického hlediska je PTFE materiál poměrně biostabilní s nízkou reaktivitou vzhledem ke krevním komponentám. Pro výrobu cévních protéz se užívá tzv. expandovaný PTFE (ePTFE), u něhož je speciální technologií výroby, spočívající v tepelných úpravách, natahování a protlačování, navozena porézní struktura. Mechanické vlastnosti PTFE jsou pro konstrukci cévních protéz velmi dobré (Guidoin *et al.* 1993). Co se týče vlastností fyzikálně-chemických, v nemodifikovaném stavu je podobně jako PET rovněž vysoce hydrofobní, což je limitující faktor pro případnou adhezi buněk při jeho předpokládaném využití jako nosiče buněk pro konstrukci bioarteficiální cévní protézy (pro přehled viz Heitz *et al.* 2003, Chlupáč *et al.* 2009, Pařízek *et al.* 2011).

### ***Polyetylén (PE)***

Jako modelový materiál se často využívá polyetylén, neboť je to materiál lehce dostupný, levný a poměrně snadno opracovatelný metodami užívanými k modifikaci povrchů polymerů. Je pevný, odolný vůči vodě, mrazu a většině chemikálií. Vyrábí se ve formě igelitu nebo mikrotenu, který je pro naše použití vhodnější, a proto s ním v našich pokusech pracujeme především, a také s ním máme nejvíce zkušeností po praktické stránce. Nejčastěji se používají dvě formy PE, a sice PE s nízkou hustotou (low density PE, označovaný jako LDPE, hustota 0,922 g/cm<sup>3</sup>) a PE s vysokou hustotou (high density PE, HDPE, hustota 0,951 g/cm<sup>3</sup>) (Švorčík *et al.* 2006b).

Co se týče fyzikálně-chemických vlastností, LDPE má mírně nižší kontaktní úhel vodní kapky, který činí 98°, zatímco HDPE má hodnotu kontaktního úhlu 102°. Tento rozdíl je tedy poměrně malý – lze říci, že oba polymery jsou vysoce hydrofobní. Oba typy polymerů se však již výrazněji liší svou strukturou. Zatímco HDPE má řetězce lineární, LDPE je má rozvětvené (Ducháček 2006, Malpass 2010). Tím by bylo možno alespoň do jisté míry vysvětlit jev pozorovaný v našich studiích, a sice že v čistém nemodifikovaném stavu LDPE podporuje adhezi a růst buněk ve vyšší míře než HDPE. Oba typy PE jsou rovněž různě citlivé k modifikacím a vykazují i různé povrchové fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je odolnost v tahu, pružnost, krystaličnost, drsnost (Pařízek *et al.* 2012a, zasláno).

Jak bylo ověřeno např. Rutherfordovou spektroskopií zpětného rozptylu iontů (Rutherford Backscattering Spectroscopy, RBS), povrch polyetylénu je z chemického a biologického hlediska poměrně inertní, bez přítomnosti kyslíkových radikálů a funkčních skupin s obsahem kyslíku, které by usnadnily vazbu proteinů ECM zprostředkujících adhezi buněk (Švorčík *et al.* 2006b). V souladu s tímto zjištěním vyplynulo z našich pokusů, že nemodifikovaný PE není optimálním nosičem pro cévní HSB. Buňky na něm sice do určité míry adherují a rostou, ale ve významně nižších počtech než na polyetylénu modifikovaném, a plocha rozprostření buněk, tj. plocha buňky přicházející do kontaktu s materiálem, je také výrazně menší (Pařízek *et al.* 2009).

Za účelem vytvoření bioaktivního povrchu atraktivního pro osídlení buňkami se používá celá škála fyzikálně-chemických modifikací, jako je ozáření ultrafialovým světlem, ionty či plasmatem, na které může navázat roubování různých biomolekul či i nanočástic na nově vzniklá vazebná místa po ozáření polymeru. Těmito místy jsou volné radikály, vzniklé po odštěpení atomů vodíku z uhlíkových řetězců, rozštěpení těchto řetězců apod., jak bude popsáno dále v kapitole 1.3.3.

### **1.3.2. Polymery pro konstrukci klinicky užívaných i experimentálních kostních náhrad**

Jak již bylo zmíněno, polymery mají pro konstrukci kostních náhrad a implantátů nevýhody, spočívající především v jejich mechanických vlastnostech, obvykle nedostatečných pro zátěžové aplikace. Přesto se polymery široce používají při rekonstrukci poškozených kostí i kloubů, třebaže často ve formě kompozitů s jinými materiály, jako jsou materiály kovové, keramické či uhlíkové, které mají za úkol vylepšit jejich mechanickou odolnost i bioaktivitu. V současné době jsou velmi populární i tzv. kompozity polymer-polymer, tj. materiály s polymerní matricí vyztuženou polymerními vlákny. V každém případě jsou kompozitní materiály pro inženýrství kostní tkáně vhodnější než materiály jednosložkové, neboť lépe vystihují přirozenou strukturu přirozené kostní tkáně, která je mnohasložkovým kompozitem zahrnujícím organické i anorganické, jakož i vláknité a amorfni součásti (pro přehled viz Vagaská *et al.* 2010, Vandrovcová *et al.* 2011a).

Pro konstrukci kostních náhrad jsou využívány polymery přírodního i syntetického původu. Z přírodních polymerů to je především kolagen, důležitou součást přirozené ECM kostní tkáně s vazebnými místy pro uchycení kostních buněk i se schopností mineralizace. Lze ho využít ke konstrukci prostorových „trojrozměrných“ náhrad i k modifikaci povrchů umělých materiálů, přičemž ho lze zkombinovat s dalšími složkami ECM kostní tkáně, jako jsou různé glykosaminoglykany, např. chondroitin sulfát (Vandrovcová *et al.* 2011b).

Ze syntetických polymerů se pro kostní tkánové inženýrství využívá v zásadě obdobné spektrum biostabilních i degradovatelných polymerů, jaké bylo popsáno již v případě cévních protéz. Mezi biostabilní polymery patří např. PTFE, PET, HDPE, polyuretan, polyamidy, siloxan. HDPE byl dokonce i klinicky použit pro rekonstrukci defektů lebečních kostí (Mokal *et al.* 2011). V experimentální práci jsou vyvíjeny kompozity HDPE s hydroxyapatitem (Zhang *et al.* 2007) či trikalciemfosfátem (Homaieghar *et al.* 2006) pro kostní náhrady, kompozity HDPE s grafitem pro náhrady kyčelního kloubu (Fouad a Elleithy 2011) a kompozity HDPE s kyselinou hyaluronovou pro rekonstrukci osteochondrálních defektů (Oldinski *et al.* 2011). Významné postavení v konstrukci kostních náhrad rovněž zaujímá poly-ether-ether-keton (PEEK) s relativně dobrými mechanickými vlastnostmi i poměrně vysokou atraktivitou pro osídlení kostními buňkami (Sagomyants *et al.* 2008), nebo polyvinyliden fluorid (PVDF) pro svou schopnost projevit piezoelektrický efekt, stimulující regeneraci kostní tkáně (Reis *et al.* 2012).

Mezi degradabilní polymery patří již tradiční polylaktid (PLA), polyglykolid (PGA), polykaprolakton (PCL) a jejich kopolymery, zejména poly- (laktid-co-glykolid) (PLGA). Tento kopolymer je v porovnání se samotným PLA méně křehký a ve srovnání s PGA pomaleji degradovatelný, a tudíž trvanlivější. Z tohoto hlediska je poměrně vhodný pro podporu regenerace kostní tkáně, která v organismu člověka může trvat i několik měsíců (Pamula *et al.* 2008, 2009; pro přehled viz Vagaská *et al.* 2010).

Jako zajímavé a nadějné pro inženýrství kostní tkáně se jeví využití PLGA a dalších degradovatelných polymerů ve formě prostorových nosičů konstruovaných z nanovláken. V této struktuře pak „scaffold“ napodobuje přirozenou vláknitou složku ECM kostní tkáně, jakou je již výše zmíněný kolagen. Na druhé straně mají polymerní nanovláknenné nosiče obvykle velmi nedostatečné mechanické vlastnosti pro konstrukci kostních náhrad. Tyto mechanické vlastnosti se mohou zlepšit po osídlení nosičů osteoblasty produkujícími mineralizovanou kostní matrix. Lze je však vylepšit ještě před osídlením kostními buňkami, a to přidáním anorganických materiálů ve formě nanočástic, protože nanokrystalická anorganická složka se přirozeně vyskytuje v kostní tkáni – konkrétně se jedná o hydroxyapatit, trikalciem fosfát a další fosfáty vápníku (pro přehled viz Vagaská *et al.* 2010).

Nabízí se ovšem myšlenka nahradit přirozené keramické nanočástice i jinými nanostrukturovanými materiály s ještě lepšími mechanickými vlastnostmi i bioaktivitou, která by podpořila regeneraci kostní tkáně na umělém nosiči. V tomto směru se jako vhodné jeví uhlíkové nanotrubičky, které mají vynikající mechanické vlastnosti (např. pevnost v tahu u jednostěnných nanotrubiček je cca 100 x vyšší než u oceli) i dobrou elektrickou vodivost. Je

známo, že elektrická vodivost materiálu podporuje adhezi, růst a osteogenní diferenciaci kostních buněk i bez aktivní stimulace konstruktů buňka-materiál elektrickým proudem. Navíc se nanotrubičky dají využít i pro cílenou dodávku růstových a diferenciacních faktorů podporujících regeneraci kostní tkáně. Na druhé straně však je nutno mít na paměti potenciální cytotoxicitu, genotoxicitu, mutagenicitu a tumorigenicitu uhlíkových nanotrubiček (pro přehled viz [Bačáková et al. 2008, 2011b](#)).

Existují ovšem i mechanicky odolné a bioaktivní uhlíkové nanočástice, u nichž je riziko cytotoxicity, genotoxicity i imunogenicity podstatně nižší než u uhlíkových nanotrubiček. Takovými nanočásticemi jsou syntetické nanokrystalické diamanty. V části své práce věnované inženýrství kostní tkáně jsem se proto zaměřil na využití přídavku nanodiamantů do nanovláken. Navázal jsem tak na předchozí studie naší skupiny i dalších autorů, v nichž vrstvy nanokrystalického diamantu deponované na povrchu materiálů podporovaly růst osteoblastů i dalších typů buněk ([Grausová et al. 2009, 2011](#); [Schrand et al. 2007](#), [Kalbáčová et al. 2009](#); pro přehled viz [Bačáková et al. 2008, 2011b](#)). Očekával jsem, že nanodiamanty nejen vyztuží a zpevní nanovlákněný polymerní nosič, ale podpoří i jeho osídlení osteoblasty. Tato podpora bude mimo jiné spočívat i ve vytvoření přídatné nanostruktury nanovlákněného nosiče, a to tak, že nanodiamanty budou alespoň místy vyčnívat z povrchu nanovláken. Nanostrukturované materiály jsou totiž považovány za obzvláště výhodné pro inženýrství kostní tkáně. Ze všech molekul podporujících adhezi buněk adsorbují přednostně vitronektin, a to díky jeho relativně malé, jednoduché a lineární molekule. Vitronektin obsahuje aminokyselinové sekvence Lys-Arg-Ser-Arg (KRSR), které jsou přednostně rozpoznávány osteoblasty ve srovnání s dalšími buněčnými typy včetně fibroblastů. Tak mohou nanostrukturované materiály alespoň do jisté míry i zabránit případnému fibróznímu opouzdření materiálu a podpořit tak jeho integraci do okolní kostní tkáně ([Webster et al. 2000](#), [Price et al. 2004](#); pro přehled viz [Bačáková et al. 2008, 2011a,b](#); [Vandrovcová et al. 2011a](#)).

Určitou nevýhodou nanodiamantů oproti částicím keramickým je jejich nedegradovatelnost. Avšak podobně jako uhlíkové nanotrubičky by mohly být po degradaci polymerních nanovláken z organismu vyloučeny glomerulární filtrací (pro přehled viz [Bačáková et al. 2008](#), [Pařízek et al. 2012b](#)).

### **1.3.3. Metodika modifikací polymerů**

Cílem modifikací polymerů použitých v našich studiích je měnit jejich povrchové fyzikální a chemické vlastnosti, jako je polarita, smáčivost, chemické složení (např. obsah kyslíkových a jiných chemických funkčních skupin, obsah volných radikálů, obsah uhlíku),

povrchová drsnost a topografie, elektrický náboj a vodivost. Tyto fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu polymeru jsou klíčové pro adsorpci molekul ECM, ke které dochází spontánně v biologických tekutinách, jako je kultivační médium či krev.

Povrchové vlastnosti materiálu určují typ adsorbovaných molekul. Například hydrofilní povrchy přednostně adsorbují molekuly podporující adhezi buněk, jako je vitronektin, fibronektin či kolagen, zatímco povrchy hydrofobní adsorbují přednostně albumin, který je pro buňky neadhezivní. Povrchové vlastnosti materiálu dále ovlivňují množství a geometrickou konformaci adsorbovaných molekul. Například na hydrofobních površích jsou proteiny zprostředkující adhezi buněk adsorbovány spíše v rigidní a denaturované podobě, nevhodné k vazbě buněk. Naproti tomu na povrchy smáčivé jsou tyto proteiny adsorbovány ve flexibilní a přestavitelné podobě, která je blízká fyziologické konformaci těchto molekul. Specifická bioaktivní místa těchto molekul, která slouží jako ligandy pro adhezni receptory buněk (např. oligopeptidy s obsahem aminokyselinové sekvence RGD), jsou pak snadno dosažitelná těmito receptory, což umožní adhezi, migraci, růst, diferenciaci, životaschopnost a další funkce buněk (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a; Bačáková *et Švorčík* 2008, Pařízek *et al.* 2011).

### ***Ozáření polymerů UV světlem***

Jak již bylo připomenuto výše, ke změně fyzikálně-chemických vlastností polymerů za účelem zvýšení jejich bioaktivity lze výhodně použít poměrně jednoduchou a snadno dostupnou technologii ozáření ultrafialovým (UV) světlem. Pro naše studie byly polymery ozařovány na spolupracujícím pracovišti v Rakousku, a sice v Department of Applied Physics, Institute of Experimental Physics, Johannes-Kepler-University, Linz (Prof. Johannes Heitz). Bylo použito UV světlo generované Xe<sub>2</sub> lampou Heraeus-Noblelight (Hanau, Německo) o vlnové délce 172 nm, vlnovém rozsahu 16 nm a intenzitě 20 mW/cm<sup>2</sup>. Doba ozáření se pohybovala v různých časových intervalech v řádech minut (Heitz *et al.* 2003).

Modifikace polymerů UV světlem či i dalšími způsoby ozáření za účelem zvýšení jeho atraktivity pro buňky se nejčastěji provádí homogenně po celém povrchu polymeru. Je však rovněž možno na povrchu polymeru vytvořit ozářené mikrodomény různých velikostí, tvarů a rozložení po povrchu polymeru, a to za účelem navození regionálně selektivní adheze a růstu buněk. K tomu se používají kovové (např. niklové) kontaktní masky s otvory o velikosti obvykle v řádu desítek až stovek mikrometrů a vzdálenostech obvykle ve stovkách mikrometrů či v milimetrech, aby se předešlo případnému „přemostění“ neozářených úseků polymeru buňkami (Mikulíková *et al.* 2005, Pařízek *et al.* 2006, pro přehled viz Bačáková *et al.* 2011a).

Jak již bylo zmíněno, záměrem ozáření polymeru je změnit vlastnosti původně spíše bioinertního povrchu polymeru tak, aby umožnil adhezi buněk. Díky ozáření dochází ke snížení hydrofobicity povrchu polymeru. Mechanismem této změny je degradace polymerních řetězců polymeru, odštěpení některých atomů, zejména vodíku či i fluoru v případě PTFE, a vznik radikálů. Tyto radikály pak reagují se vzdušným kyslíkem, což vede k vytvoření chemických funkčních skupin obsahujících kyslík na povrchu polymeru (Heitz *et al.* 2003). Kyslíkové skupiny pak zvyšují polaritu a smáčivost polymeru, a příznivě tak ovlivňují adsorpci molekul ECM, které zprostředkují adhezi buněk. Tyto molekuly, mezi něž patří např. vitronektin, fibronektin, kolagen či laminin, jsou přítomny ve standardním kultivačním médiu doplněném krevním sérem, v krvi samotné, v tkáňovém moku, a rovněž jsou syntetizovány a deponovány na polymer samotnými buňkami, které polymer osídlují (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a; Bačáková *et Švorčík* 2008, Pařízek *et al.* 2011).

Změny v polymeru vzniklé následkem ozáření mohou být dále zintenzivněny ozářením polymeru v reaktivních atmosférách, jako je  $\text{NH}_3$  či acetylen. V našich pokusech měla na adhezi buněk příznivý vliv zvláště atmosféra  $\text{NH}_3$ . Při ozáření OV světlem v uvedené atmosféře byly atomy fluoru nahrazeny vazbami C-H, C=O a zejména C-NH<sub>2</sub>. Je známo, že aminoskupiny nejen výrazně zvyšují smáčivost materiálu, ale navozují i jeho kladný náboj, který má rovněž příznivý vliv na adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi buněk (Heitz *et al.* 2003, Mikulíková *et al.* 2005, Liu *et al.* 2007, pro přehled viz Bačáková *et Švorčík* 2008, Bačáková *et al.* 2011a).

### ***Ozáření polymerů ionty***

Na podobném principu jako modifikace polymerů ozářením UV světlem se zakládá i modifikace polymerů ozářením ionty neboli metoda tzv. iontové implantace. Tato metoda byla původně vyvinuta pro technické účely, například pro zavedení iontů kovů do materiálů pro elektroniku (Fink *et al.* 2004, Macková *et al.* 2006). Touto metodou lze obohacovat různé materiály různými ionty i pro biologické účely, například lze takto zavést vápník do materiálů pro kostní náhrady (Davenas *et al.* 2003, Lewis *et al.* 1992). V našich studiích jsme se soustředili na modifikaci polymerů ionty plynů, a to takových, které lze považovat za biokompatibilní. Patří sem ionty kyslíku, uhlíku, halogenů, např. fluor, či ionty vzácných plynů, jako je argon (Bačáková *et al.* 2000a,b; Švorčík *et al.* 1993, pro přehled viz Bačáková *et Švorčík* 2008). Při bombardování polymeru uvedenými ionty nejsou tyto ionty obvykle zadržovány ve struktuře polymeru (či jsou zachycovány pouze v nepatrné míře, která je obvykle pod hranicí detekce dostupných měřících metod, jako např. RBS; Bačáková *et al.*

2001), ale důležité je, že v polymeru navodí změny vedoucí k jeho oxidaci a následnému zvýšení polaritu a smáčivosti. Podobně jako při ozáření UV světlem dochází k degradaci polymerních řetězců, odštěpení různých atomů, vzniku radikálů a jejich reakci s kyslíkem, a to buď již přímo v implantační komoře, kde vakuum není absolutní (zbytkový tlak v implantační komoře se pohybuje okolo  $10^{-4}$  Pa) anebo po expozici ozářeného materiálu v atmosféře vzduchu. Na povrchu polymeru rovněž vznikají chemické funkční skupiny s obsahem kyslíku (karbonylové, karboxylové, hydroxylové, éterové a esterové), které zvyšují polaritu a smáčivost povrchu a navozují adsorpci molekul zprostředkujících adhezi buněk v geometrických konformacích výhodných pro dosažitelnost specifických úseků těchto molekul adhezními receptory buněk (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a; Bačáková *et Švorčík* 2008).

Pokud jde o energii a dávku iontů, povrch polymerních vzorků v našich studiích (obvykle polyetylen, polystyrén či polypropylen) byl bombardován energiemi iontů od 15 do 150 keV a dávkami v rozmezí  $10^{12}$  do  $10^{15}$  iontů/cm<sup>2</sup>. V případě vyšších energií a dávek iontů docházelo k zajímavému jevu, a sice tzv. relativní karbonizaci polymeru. Znamená to, že u polymeru po intenzivním ozáření převážilo odštěpování neuhlíkových atomů nad navazováním nových atomů z okolní atmosféry k polymeru. Obsah neuhlíkových atomů v polymeru tak výrazně klesl a relativně převážil obsah uhlíku, i když absolutní množství uhlíku ve vzorku se nezměnilo. Mezi atomy uhlíku se začaly vyvářet řetězce konjugovaných dvojných vazeb a polymer se stal elektricky vodivým - jeho elektrický odpor byl schopen poklesnout až o 15 řádů. Nově nastolená elektrická vodivost rovněž významně podpořila kolonizaci polymeru buňkami (Bačáková *et al.* 1996, 2000a,b; Bačáková *et al.* 2001). I u jiných typů materiálů je známo, že jejich elektrická vodivost zvyšuje adhezi a růst buněk, a to i bez aktivní stimulace buněk elektrickým proudem (Jeong *et al.* 2008, Mihardja *et al.* 2008, Bettinger *et al.* 2009; pro přehled viz Bačáková *et al.* 2011a,b).

Podobně jako v případě ozáření UV, i v případě iontové implantace lze kromě celoplošného ozáření použít i kontaktní kovové masky za účelem vytvoření mikrodomén adhezivních pro buňky (Pařízek *et al.* 2006, pro přehled viz Bačáková *et Švorčík* 2008, Bačáková *et al.* 2011a).

### ***Ozáření polymerů plasmatem***

Argon je využíván nejen pro iontovou implantaci, ale i pro příbuznou technologii, a to modifikaci polymerů tzv. plasmatickým výbojem, čili ozářením plasmatem. V našich studiích jsme k tomuto účelu použili přístroj Balzer SCD 050, kde jsme polymery ozařovali plasmatem v různých časových intervalech v řádu desítek až stovek sekund (obvykle 50 - 400 s). Princip



modifikace polymeru plasmatem je obdobný jako v případě ozáření UV světlem a ionty – odštěpování vodíku a dalších atomů na polymerních řetězcích, rozštěpení samotných řetězců a vznik radikálů. Povrch polymeru je po ozáření natolik reaktivní, že i při krátké expozici v atmosféře vzduchu na něm vznikají chemické funkční skupiny s obsahem kyslíku, a mezi uhlíky se vytvářejí dvojně vazby. Na tato aktivní místa, právě tak jako na místa s reaktivními radikály, se mohou navázat neboli „naroubovat“ různé biologicky aktivní molekuly, jako jsou například aminokyseliny (glycin, arginin), proteiny (albumin, fibronectin), další syntetické polymery (polyetylen glykol) (Kasálková *et al.* 2007, 2010), a dokonce i prvky, jako je například uhlík či zlato (Pařízek *et al.* 2009; Švorčík *et al.* 2009). Posledně jmenované prvky lze na aktivovaný polymer uchytit ve formě nanočástic z koloidní suspenze těchto částic ve vodě.

## **1.4. Mechanismus adheze buňka-materiál**

Jak již bylo připomenuto v souvislosti s modifikacemi polymerů, buňka se ke konvenčním biomateriálům (tj. k těm, co na svém povrchu neobsahují již předem cíleně navázané ligandy pro adhezní receptory buněk) váže prostřednictvím proteinů ECM, spontánně adsorbovaných k povrchu materiálu. Tyto proteiny se v podmínkách *in vivo* adsorbují z tělních tekutin, a v případě studií *in vitro* ze séra kultivačního média. Rovněž mohou být syntetizovány a na polymer deponovány přímo buňkami. Buňky se sice na povrchu materiálu mohou uchytit i bez adsorbovaných proteinů, a to slabými chemickými vazbami mezi molekulami buněčné membrány a povrchem materiálu, ale tato vazba je nespecifická, není zprostředkována adhezními receptory a nepřenáší tak adekvátní signály do buněk, zaručující jejich životaschopnost, růst, diferenciaci a další specifické funkce (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a; Bačáková a Švorčík 2008, Pařízek *et al.* 2011).

### **1.4.1. Proteiny zprostředkující adhezi buňka-materiál**

Mezi proteiny ECM, které zprostředkují adhezi buňka-materiál a významným způsobem tak ovlivňují jejich následné funkce, jako je jejich rozprostření a tvar, migrace, proliferační a metabolická aktivita, životaschopnost, diferenciaci a fenotypická maturace, patří kolagen, elastin, fibronectin, vitronectin a laminin. Většina z těchto proteinů je i důležitou součástí ECM cévní stěny *in vivo* a hrají tudíž důležitou roli v její rekonstrukci i regeneraci.

**Kolagen** je nejrozšířenějším proteinem v tkáních savců, tvoří až 25-30% všech proteinů v organismu savců. Molekuly vláknitého kolagenu jsou tvořeny třemi kolem sebe ovinutými polypeptidovými řetězci. Secernované molekuly kolagenu polymerizují v extracelulární kolagenové fibrily o šířce 10 až 300 nm. Fibrily jsou navzájem spojeny kovalentními vazbami, což dodává celé síti velkou mechanickou pevnost. V současnosti je známo nejméně 29 rozdílných typů kolagenu. Nejrozšířenější je typ I, který představuje 90% kolagenu v organismech, je přítomen v pokožce, šlachách, kostech a zubech. Je i důležitou součástí ECM cévní stěny. Typ II se vyskytuje v chrupavkách. Typ III je kolagen embryonálního vývoje, (později je nahrazen typem I), a jeho obsah stoupá v cévní stěně za patologických okolností, což lze přičíst dediferencovanému syntetickému fenotypu HSB, který se řadou znaků podobá fenotypu embryonálnímu a fetálnímu (pro přehled viz [Bačáková et al. 2002](#)). Typ IV se spolu s lamininem vyskytuje v bazální membráně buněk. Na HSB se váže prostřednictvím  $\beta_1$  integrinových adhezních molekul, především  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$  a  $\alpha_3\beta_1$  (Glukhova a Koteliansky 1995).

**Elastin** je definován jako nerozpustný skleroprotein, který je hlavní složkou pružných (elastických) vláken ve tkáních živočichů (vlákna šlach, průdušek, plic a cévních stěn). Obsahuje vysoký podíl glycinu, prolinu a alifatických aminokyselin (alanin, valin, leucin a isoleucin). Vyznačuje se také poměrně vysokým obsahem bazických lysinových zbytků. Pokud jde o cévní stěnu, velké množství elastinu se vyskytuje ve velkých cévách poblíž srdce, jako je hrudní aorta či karotické tepny. HSB se k němu váže prostřednictvím neintegrinového adhezního receptoru rozpoznávajícího aminokyselinovou sekvenci VAPG (Val-Ala-Pro-Gly) v molekule elastinu ([Gobin a West 2003](#)). Jelikož elastin udržuje HSB v klidovém diferencovaném kontraktilem stavu ([Karnik et al. 2003](#)), uvažuje se o využití rekombinantních proteinů podobných elastinu se sekvencemi VAPG pro konstrukci bioarteficiálních cévních náhrad ([Bandiera et al. 2005](#)).

**Fibronektin** patří do rodiny dimerních glykoproteinů (molekulová hmotnost kolem 600 kDa). Má vazebná místa i pro jiné molekuly ECM, a rovněž pro fibronektinový receptor buněk (integrin  $\alpha_5\beta_1$ ). Fibronektin může spojovat více molekul ECM do souvislé sítě. Je rovněž důležitou součástí krevního séra, kterým bývají doplňována kultivační média pro buňky (pro přehled viz [Bačáková et Švorčík 2008](#)). V buněčných kulturách i v cévní stěně in situ jsou určité typy fibronektinu spojeny s HSB v diferencovaném kontaktilním stavu, jiné však podporují migraci a proliferaci HSB ([Barnes et al. 1995](#), [Roy et al. 2002](#), pro přehled viz [Pařízek et al. 2011](#)).

**Vitronektin** je plazmatický glykoprotein cirkulující v krvi v koncentraci 200 – 400  $\mu\text{g/ml}$ . Vitronektin je jeden z hlavních glykoproteinů umožňujících buněčnou adhezi. Je hlavním ligandem vitronektinových receptorů buněk, jako  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ . Mezi další funkce vitronektinu patří vazba k heparinu, kolagenu. V buněčných kulturách navozuje vitronektin migraci a proliferaci HSB a jejich syntetický fenotyp (Dufourcq *et al.* 2002).

**Laminin** je vysokomolekulární trimerní protein (850 kDa), je spolu s kolagenem IV a proteoglykany součástí bazální membrány buněk. V cévní stěně spolu se sulfatovanými a heparinu podobnými glykosaminoglykany a elastinem udržuje HSB v klidovém diferencovaném kontraktilním stavu (pro přehled viz Bačáková – Řeřábková 1990). V této souvislosti je nutno podotknout, že buňky se k růstové podložce vážou i pomocí molekul ECM na sacharidové bázi, jako jsou například proteoglykany. Ty jsou tvořeny polypeptidovým řetězcem, na který jsou napojeny glykosaminoglykany (polysacharidy obsahující glukosamin). Polysacharidové řetězce jsou hydrofilní a poutají velké množství vody - dá se říci, že tvoří gel (Nečas *et al.* 2000). Buňka váže proteoglykany adhezními receptory neintegrinové povahy, což jsou rovněž molekuly na sacharidové bázi, které dosud čekají na své důkladné prozkoumání a systemizaci (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, Bačáková *et Švorčík* 2008).

#### 1.4.2. Mechanismus vazby ECM-materiál a ECM-buňka

Vazba buněk na molekuly ECM pomocí adhezních receptorů, zejména vazba na proteinové molekuly pomocí integrinů, byla intenzívně zkoumána v celé řadě studií (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a; Bačáková *et Švorčík* 2008). Ve srovnání s tím je stále relativně málo známo o vazbách mezi molekulami ECM, spontánně adsorbovanými na povrch umělého materiálu, a tímto materiálem. Jedná se obvykle o slabé chemické vazby, jako jsou vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, polární a elektrostatické interakce. Se stoupající hydrofilní povrchu jsou proteinové molekuly na povrch materiálu vázány slaběji, což umožňuje flexibilitu těchto molekul, jejich snadnou přestavitelnost a snadnou dosažitelnost jejich specifických vazebných míst adhezními receptory buněk. Na druhé straně extrémně hydrofilní povrchy prakticky znemožňují stabilní adsorpci proteinů, a tím i adhezi buněk. Proto je adheze buněk nejvyšší na mírně hydrofilních površích, jejichž kontaktní úhel vodní kapky se pohybuje obvykle mezi 50-80°. Silně hydrofobní povrchy (kontaktní úhel více než 100°) adsorbují molekuly ECM obvykle v rigidní a denaturované podobě, což ztěžuje až znemožňuje vazby adhezních receptorů buněk (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2007a, 2011a; Bačáková *et Švorčík* 2008). Na druhé straně však lze i na hydrofobní povrchy navázat molekuly ECM

cíleným způsobem kovalentně, a do jisté míry tak rekonstruovat fyziologickou ECM a podpořit adhezi buněk (Brynda *et al.* 2005, Filová *et al.* 2009b).

Buňky se nevážou na celé makromolekuly proteinů, ale jen na jejich určité aminokyselinové sekvence, které mohou být typické pro určitý protein nebo preferující vazbu k určitému buněčnému typu. Sekvence typické pro laminin jsou např. YIGSR, IKVAV, pro fibronektin REDV, pro kolagen DGEA, sekvence typická pro elastin je VAPG, pro vitronektin a fibronektin to jsou sekvence RGD, KQAGDV (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a; Bačáková *et Švorčík* 2008).

Co se týče sekvencí aminokyselin preferovaných určitým buněčným typem, jsou např. sekvence RGD a DGEA bez výrazných preferencí, sekvence KQAGDV a VAPG jsou pro adhezi preferovány cévními HSB, REDV buňkami endotelu, sekvence KRSR jsou vázány osteoblasty a sekvence YIGSR, IKVAV buňkami nervovými (Bačáková *et al.* 2004, 2007a, 2011a; Bačáková *et Švorčík* 2008, Kubišta 1998, Nečas *et al.* 2000).

Buňky se na uvedené sekvence adsorbovaných proteinů vážou pomocí adhezních receptorů, které se nacházejí na buněčné membráně. Nejlépe prozkoumaným typem adhezních receptorů jsou integriny. Jsou to dimerní proteiny s vazebnými místy pro molekuly ECM, exponovanými na vnější straně buněčné membrány. Mají také vazebná místa pro proteiny na vnitřní ploše buněčné membrány, asociované s aktinovým cytoskeletem. Mezi tyto proteiny patří např. paxillin, talin a vinkulin. Tyto proteiny bývají také nazývány jako „proteiny membránového cytoskeletu“, zatímco aktinový cytoskelet je nazýván cytoskeletem cytoplasmatickým. Proteiny membránového cytoskeletu bývají rovněž nazývány jako strukturální proteiny fokálních adhezí, zatímco enzymatická složka fokálních adhezí, jako je např. fokální adhezní kináza, jsou označovány jako proteiny signální. Toto dělení však z funkčního hlediska není takto striktní, neboť i tzv. strukturální proteiny mohou být fosforylovány a podílejí se na přenosu signálu z adhezního substrátu do buňky (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a, Bačáková *et Švorčík* 2008, Ochsenhirt *et al.* 2006, Vagaská *et al.* 2010). Koncepce membránového skeletu podstatným způsobem opravuje či doplňuje představy, že plazmatická membrána je pouze tekutý biomolekulární film lipidů s mozaikou membránových proteinů. Membránový skelet omezuje fluiditu proteinů, determinuje funkční odlišení částí membrány a polaritu buňky, např. u epiteliálních buněk jejich apikální a bazální část. Transmembránový charakter membránového skeletu (tj. dráha od integrinových receptorů až po aktinový cytoskelet) umožňuje též přímou interakci okolních faktorů s vnitřkem buňky a naopak (Nečas *et al.* 2000; pro přehled viz Pařízek *et al.* 2011).

## 1.5. Metody studia interakce buňka – materiál

### 1.5.1. Podmínky kultivace buněk *in vitro*

V našich studiích se soustředujeme především na sledování interakce buňka-materiál v podmínkách *in vitro*. Našemu záměru nahrává obecná vlastnost buněk závislých na ukotvení (tzv. anchorage-dependent cells), mezi něž patří i cévní HSB a osteoblasty, adherovat k podložce. Jak již bylo připomenuto, tato podložka musí mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, a sice vhodné chemické složení, smáčivost, elektrický náboj a vodivost, drsnost a topografii. Nezanedbatelné jsou i mechanické vlastnosti adhezního substrátu – musí být natolik pevný, aby odolal trakčním silám produkovaným adhezním aparátem buňky při uchycování a rozprostírání buňky, a umožnil tak zdárnou tvorbu fokálních adhezí. Jak již bylo vysvětleno, jsou to specifické domény na buněčné membráně, kde se integrinové a další adhezní receptory seskupují a komunikují s dalšími strukturálními a signálními proteiny buněčné membrány i cytoplasmy, jako je např. paxillin, talin, vinkulin, fokální adhezní kináza a aktinový cytoskelet. Tvorba, vyžívání a funkce fokálních adhezí je nezbytná pro následující životaschopnost, dělení, diferenciaci, fenotypickou maturaci i funkci buněk (pro přehled viz [Bačáková et al. 2004](#), [2011a](#), [Bačáková et Švorčík 2008](#), [Vagaská et al. 2010](#), [Pařízek et al. 2011](#)).

Testování biomateriálů a tvorba konstruktů buňka-materiál obvykle začíná v konvenčním statickém systému buněčné kultury. Buňky na materiálech se pěstují ve speciálních plastových (obvykle polystyrénových) lahvích, miskách či kultivačních destičkách s jamkami. Výživu pro kulturu zajišťuje kultivační medium, které by mělo obsahovat esenciální aminokyseliny, vitaminy, anorganické soli, glukózu, pyruvát a linolovou kyselinu. Pro standardní kultivaci buněk se používá médium doplněné obvykle o 5-20% krevního séra, obvykle fetálního bovinního, které obsahuje růstové faktory a proteiny zprostředkující adhezi buněk (vitronektin, fibronektin). Ve speciálních případech se dá použít medium bezsérové, např. doplněné pouze nezbytnými růstovými faktory, za účelem zjištění schopnosti buňky vázat se na materiál bez pomoci proteinů adsorbovaných ze séra. Při přípravě média je nutné dodržet optimální pH (7,35), osmolalitu (290 mosm/kg). Atmosféra v inkubátoru pro kultivaci buněk musí kromě vzduchu obsahovat i poměrně vysoké procento oxidu uhličitého – 5%. Toto procento je obdobné koncentraci CO<sub>2</sub> v tkáních *in vivo*, a v podmínkách *in vitro* hraje důležitou roli při udržování pH kultivačního média. Ve vhodných podmínkách *in vitro* se pak buňky množí, metabolizují a vyčerpávají tak živiny v kultivačním médiu, kam navíc produkují kyselé metabolity, a tak je kromě výměny média třeba i po určité době buňky pasážovat, tj. „přesadit“ do čerstvého média a nových kultivačních nádob. Buňky se při pasážování obvykle uvolňují

enzymaticky pomocí trypsinu či i jiných proteolytických enzymů. Trypsin bývá často kombinován s kyselinou etylendiaminotetraoctovou (EDTA), která vyvazuje vápník, nutný pro funkci adhezních receptorů. Pro některé studie, například týkající se extracelulárních konců integrinových receptorů či produkce ECM, se buňky od substrátu uvolňují mechanicky, např. gumovou škrabkou. Uvolněné buňky je možno zmrazit a skladovat v hlubokomrazicím boxu po dobu 1 roku či v tekutém dusíku po dobu více let (pro přehled viz [Bačáková et Švorčík 2008](#), [Nečas et al. 2000](#), [Pařízek et al. 2011](#)).

Ve statickém systému se jedná o kompromis mezi poměrně nízkou úrovní zásobování buněk kyslíkem a živinami, na druhou stranu nedochází k odplavování buněk z povrchu materiálu a buňky mají dostatek času adherovat a růst na povrchu zkoumaného vzorku.

Pro pokročilá bádání v sofistikovanějších kultivačních systémech, které lépe než systémy statické napodobují podmínky v organismu, a rovněž pro konstrukci bioarteficiálních tkáňových a orgánových náhrad metodami tkáňového inženýrství, je však výhodnější použití dynamických kultivačních systémů. Pro konstrukci bioarteficiálních cévních či chlopenních náhrad lze použít např. systém perfúzní (např. Provitro, Německo) nebo rotační (Cellon, Lucembursko). V obou systémech dochází k cirkulaci media v uzavřeném systému. Buňky zde mohou být vystaveny působení laminárního i tubulárního proudění, pulsnímu namáhání i zvýšenému tlaku podobně jako v krevním oběhu, tj. mechanické stimulaci. Tato stimulace výrazně podporuje fenotypickou maturaci buněk – například laminární smykové proudění napomáhá vyžrávání endotelové výstelky, zatímco pulzní namáhání provázené natahováním a smršťováním konstruktů buňka-materiál navozuje kontraktilní fenotyp u HSB. Dynamické systémy navíc umožňují lepší přístup čerstvého kultivačního média k buňkám, a to i skrze testovaný materiál, pokud je tento materiál konstruován ve formě prostorových porézních či vláknitých nosičů (pro přehled viz [Bačáková et Švorčík 2008](#), [Bačáková et al. 2011a](#), [Pařízek et al. 2011](#)).

Uvedených výhod dynamických bioreaktorů využíváme i při kultivaci kostních buněk, zvláště na prostorových „trojrozměrných“ porézních nosičích buněk na bázi polymerů, keramiky či jejich kompozitů, kdy lepší přístup kyslíku a živin k buňkám rostoucím uvnitř těchto materiálů i odstraňování zplodin buněčného metabolismu jsou nutné pro husté a rovnoměrné osídlení nitra nosiče buňkami ([Pamula et al. 2008, 2009](#)). Navíc kostní buňky kultivované v dynamických podmínkách vykazují výrazně zvýšenou proliferaci, viabilitu a osteogenní diferenciaci v porovnání se systémem statickým ([Olivier et al. 2007](#), [Meretoja et al. 2009](#); pro přehled viz [Vagaská et al. 2010](#), [Vandrovcová et al. 2011a](#)).

### 1.5.2. Parametry chování buněk hodnocené na materiálech *in vitro*

V průběhu mnohaleté praxe při studiu interakce buňka-materiál a konstrukce tkáňových náhrad na podkladě umělého materiálu a buněk si naše laboratoř vypracovala určitý standardní postup testování, které spolehlivě ukáže vhodnost určitého materiálu jako nosiče buněk, vhodnost chování buněk na tomto nosiči i celkovou kvalitu konstruktu buňka-materiál. Obvykle začínáme od jednoduchých a povšechných ukazatelů chování buněk a postupujeme směrem k ukazatelům na molekulární úrovni. Sledujeme následující projevy buněk:

***Ukazatelé adheze buněk:*** počet iniciálně adherovaných buněk za 24 hodin po nasazení, velikost jejich adhezní plochy, tvorba, velikost a počet fokálních adhezních plaků, zastoupení a koncentrace jejich jednotlivých složek (různé typy integrinových receptorů a s nimi asociovaných molekul, jako je paxillin, talin, vinkulin,  $\alpha$ -aktinin, fokální adhezni kináza). Dále sledujeme tvorbu, uspořádání a složení cytoskeletu, resistenci buněk k oddělení od podložky proteolytickými enzymy, proudem kultivačního média při dynamické kultivaci či při dlouhodobé kultivaci. K ukazatelům adheze patří i množství a spektrum proteinů zprostředkujících adhezi buněk či proteinů neadhezivních, adsorbovaných k materiálu.

***Ukazatelé růstu buněk:*** počet buněk na materiálu v různých časových intervalech (obvykle v průběhu 1 či více týdnů kultivace na materiálu), konstrukce růstových křivek a výpočet doby zdvojnásobení počtu buněk v populaci. Obsah DNA či testy metabolické aktivity buněk v případě, že nelze uvolnit buňky z materiálu či je počítat na mikrofotografiích. Inkorporace bromodeoxyuridinu do nově syntetizované DNA, stanovení značkovacího indexu a růstové frakce buněk, měření délky buněčného cyklu a jeho fází. Obsah proliferčních antigenů PCNA a Ki-67. Proliferační aktivitu buněk hodnotíme i na základě měření elektrického odporu v senzorickém přístroji xCELLigence (Roche), kdy je velikost elektrického odporu přímo úměrná pokryvu dna speciálních jamek se zlatými elektrodami buňkami. Tento způsob hodnocení využíváme zejména pro výluhy z materiálů, testování různých látek přidaných do kultivačního média, nebo pro molekulární vrstvy biomateriálů, nanesené na dno kultivačních jamek přístroje.

***Ukazatelé metabolické aktivity buněk:*** aktivita mitochondriálních enzymů buněk sledovaná pomocí testů (MTT, XTT, WST), které jsou založeny na konversi tetrazoliových solí na barevné formazany metabolicky aktivními buňkami. Tyto testy rovněž nepřímo vypovídají o počtu buněk, a lze je užít i v případě materiálů, na nichž nelze buňky přímo spočítat (porézní prostorové nosiče či nosiče, z nichž nelze buňky enzymaticky či jinak oddělit).

**Ukazatelé životaschopnosti buněk:** propustnost buněčné membrány u poškozených a mrtvých buněk pro barviva jako trypanová modř, propidium jodid, Hoechst 33258, ethidium homodimer-1, enzymatická aktivita buněk (aktivita esteráz, sledovaná komerčně dostupnými kity typu LIVE/DEAD, a aktivita mitochondriálních enzymů sledovaná testy MTT, XTT, WST). Sledujeme i dlouhodobou životaschopnost buněk na materiálech po dobu několika měsíců.

**Ukazatelé diference (fenotypické maturace) buněk:**

U cévních HSB sledujeme především přítomnost, uspořádání a koncentraci kontaktilních proteinů  $\alpha$ -aktinu a SM1a SM2 myosinů, a dále svalového tropomyosinu, T-troponinu, h-caldesmonu, h1-calponinu, meta-vinkulinu, proteinu intermediálních filament desminu.

U buněk endotelových sledujeme především přítomnost a koncentraci von Willebrandova faktoru (tj. stabilizačního faktoru pro koagulační faktor VIII, skladovaného ve Weibel-Paladeho tělíscích buněk. Dalšími sledovanými molekulami je CD31 (PECAM-1), multifunkční molekula hrající roli např. v modulaci buněčné adheze zprostředkované integriny, v transendoteliální migraci buněk, v angiogenezi a v regulaci imunitní reakce, a CD34, povrchový antigen lidských progenitorových buněk krevní řady a buněk endotelových. Za marker určité zralosti endotelových buněk je považována i přítomnost silných svazků filament  $\beta$ -aktinu i pevná mezibuněčná adheze nutná pro vytvoření souvislé polopropustné vrstvy endotelu. Významným ukazatelem kvality mezibuněčné adheze je množství a uspořádání vaskulárního endoteliálního kadherinu (VE-cadherin, označovaný též jako CD 144).

U osteoblastů sledujeme časné, střednědobé a pozdní markery osteogenní diference. K časným ukazatelům patří produkce kolagenu I, ke střednědobým koncentrace a aktivita alkalické fosfatázy, tj. enzymu zúčastněného v mineralizaci kostní matrix, a osteopontinu, glykoproteinu ECM vázajícího vápník. Pozdní markery osteogenní diference zahrnují produkci osteokalcinu, glykoproteinu typického pro kostní tkáň a vázajícího vápník, a mineralizaci kostní matrix (tvorba fosfátů kalcia, které lze prokázat von Kossovou reakcí, barvením alizarinem i fotometricky).

**Ukazatelé potenciální imunitní aktivace:** u buněk endotelových a HSB sledujeme přítomnost a koncentraci imunoglobulinových a selektinových adhezních molekul, jako je ICAM-1, VCAM-1 a ELAM-1, u osteoblastů obvykle jen ICAM-1. U všech buněčných typů dále sledujeme produkci cytokinů, zejména TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Zkoumáme i imunitní aktivaci



makrofágů na umělých materiálech a porovnáváme ji s aktivací těchto buněk pod vlivem různých koncentrací bakteriálního lipopolysacharidu.

**Ukazatelé poškození DNA:** fosfospecifickými protilátkami detekujeme  $\gamma$ -H2AX, tj. histon H2AX fosforylovaný na Ser139 (tato fosforylace je vyvolána zlomy dvoušroubovice DNA). Dále sledujeme přítomnost proteinu vázajícího p53 (53BP1), jehož funkcí je reparovat. Fragmentaci DNA detekujeme i pomocí metody TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling). Jako ukazatele apoptózy používáme Annexin-V a aktivitu kaspázy-3.

Uvedené ukazatele sledujeme širokým spektrem metod, zahrnující konvenční optickou, fluorescenční a konfokální mikroskopii, imunocytochemické techniky, jako je imunofluorescenční a imunoperoxidázové barvení, enzymatická imunosorbentní esej (ELISA), průtoková cytometrie, techniky biochemické jako elektroforéza a blotting, PCR v reálném čase, zařízením na bázi senzoru (přístroj xCELLigence).

## 2. Hypotézy a cíle práce

V prvním oddílu mé disertační práce se zabývám modelovým řešením problému konstrukce bioarteficiálních cévních náhrad. Vycházíme z hypotézy, že změna fyzikálně chemických vlastností povrchu polymerů vlivem specifických modifikací bude mít pozitivní vliv pro zvýšení jejich atraktivity pro osídlení nejen cévními endotelovými buňkami, ale zejména cévními hladkými svalovými buňkami. Naším cílem je vytvořit takový povrch cévní náhrady, na kterém bude podpořena adheze a následný růst cévních buněk, a rovněž porovnat několik druhů polymerů a jejich následných fyzikálně-chemických modifikací z hlediska perspektivy jejich využití při tvorbě cévních náhrad.

Cílem druhé části práce je vyvinutí periadventiciálního systému s řízeným uvolňováním léčiva Sirolimu, obalující aortokoronární bypass vytvořený z autologního žilního štěpu. Jde zejména o potvrzení naší hypotézy, že takový systém zabrání nadměrné proliferaci cévních HSB, která by mohla způsobit restenózu a selhání štěpu. Reakce HSB na tento systém je studována nejen v buněčných kulturách, ale následně i ověřena v pokusech *in vivo* na laboratorních králících plemene Činčila velká.

Cílem třetí části této práce je konstruovat polymerní nanovláknenný nosič buněk obohacený nanokrystalickými diamanty pro potenciální využití v inženýrství kostní tkáně. Podle naší hypotézy by vyztužení nanodiamanty mělo zlepšit mechanické vlastnosti

nanovláknenného nosiče i adhezi, růst a životaschopnost lidských kostních buněk v kulturách na tomto materiálu, a zároveň nevyvolat imunitní aktivaci těchto buněk ani makrofágů.

### 3. Materiál a metody

Disertační práci jsem napsal na základě výsledků publikovaných v 10 odborných pracích (v 8 primárních a ve 2 přehledných článcích), které byly zveřejněny v mezinárodních impaktovaných časopisech. U tří z těchto prací jsem prvním autorem, v dalších spoluautorem. Navíc jsem zaslal další prvoautorský článek do impaktovaného časopisu. Výsledky zveřejněné v této disertační práci byly publikovány i ve 4 článcích v odborných neimpaktovaných časopisech.

Tato disertační práce patří mezi práce mezioborové. Jednotlivé pokusy se skládají z přípravy vzorků umělého materiálu, hodnocení jejich fyzikálně-chemických vlastností a studia jejich interakce s buňkami a tkáněmi v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Na získání výsledků se kromě mne a členů naší laboratoře podíleli i spolupracovníci z institucí zaměřených na obory materiálového inženýrství, chemie a fyziky. Kapitola Materiál a metody je v této práci podána poněkud stručnější formou, neboť podrobně je tato problematika popsána v příložených publikacích.

#### 3.1. Modifikace polyetylénu a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti

Modifikace polyetylénu byly prováděny ve spolupráci s Prof. Ing. Václavem Švorčíkem, DrSc. a jeho kolegy (zejména Ing. Nikolou Kasálkovou-Slepičkovou, PhD) z Ústavu inženýrství pevných látek (VŠCHT, Fakulta chemické technologie).

Byl použit polyetylén o vysoké hustotě (HDPE, typ Microten M\*S, hustota  $0.951 \text{ g.cm}^{-3}$ ) a polyetylén o nízké hustotě (LDPE, hustota  $0.922 \text{ g.cm}^{-3}$ ) ve formě fólií o tloušťce  $40 \mu\text{m}$  (výrobce Granitol a.s., Moravský Beroun). Vzorky o průměru 2 cm byly připraveny pomocí raznice a následně modifikovány ozářením argonovým plasmatem v zařízení Balzer SCD 050. Doba ozáření plasmatem činila 0-400 sekund a síla výboje plasmatu byla 1,7-2,0 W. Neprodleně po skončení modifikace byly některé vzorky ponořeny do vodného roztoku glycinu (Gly; Merck, Darmstadt, Německo, kat. č. 104201), bovinního sérového albuminu (BSA; Sigma-Aldrich, Německo, kat. č. A9418), polyetylén glykolu (PEG; Merck, Darmstadt, Německo, kat. č. 817018, m.h. 300 nebo 20 000). Dále byly některé vzorky modifikované plazmatem nebo plasmatem a BSA ponořeny do suspense obsahující koloidní nanočástice

uhlíku (C nebo BSA+C; Spezial Schwartz 4, Degussa AG, Německo). Všechny látky sloužící k následné modifikaci polymerů po ozáření byly použity v koncentraci 2 hmotnostních % a doba ponoření činila 12 hodin při pokojové teplotě. Tato technika modifikace materiálu se nazývá „roubování“ („grafting“). Roubované látky, které se nenavázaly na povrch vzorku aktivovaný ozářením, byly posléze odmyty během 24 h po ponoření do destilované vody (Kasálková *et al.* 2007, 2010, Pařízek *et al.* 2009).

Kromě výše zmíněných látek byly pro modifikaci roubováním použity i nanočástice zlata (Au) v koloidním roztoku. Tento roztok byl připraven citrátovou redukcí  $K(AuCl_4)$ . Jak ukázala transmisní elektronová mikroskopie (TEM), průměrná velikost nanočástic Au činila přibližně 12 nm. Nenavázané částice zlata byly opět opláchnuty v destilované vodě (Švorčík *et al.* 2009).

Fyzikálně-chemické vlastnosti modifikovaného polyetylénu byly hodnoceny pomocí následujících analytických metod:

Chemické složení povrchu, tj. přítomnost různých prvků, chemických funkčních skupin a nanočástic Au, bylo hodnoceno rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (X-Ray Photoelectron spectroscopy, XPS) a Rutherfordovou spektroskopií zpětného rozptylu (Rutherford Backscattering Spectroscopy, RBS).

Morfologie povrchu polymerů byla zkoumána mikroskopií atomárních sil (Atomic Force Microscopy, AFM) na přístroji VEECO CP II, kde byla hodnocena zejména drsnost povrchu, tj. velikost nerovností popsána parametrem RMS (efektivní hodnota drsnosti) a jeho topografie, tj. tvar a uspořádání nerovností.

Smáčivost povrchu byla hodnocena kontaktním úhlem vodní kapky na materiálu pomocí reflexního goniometru (Surface Energy Evaluation System, Advex Instruments, Masarykova Universita, Brno). Smáčivost povrchu je nepřímo úměrná velikosti kontaktního úhlu.

Modifikace a fyzikálně-chemická charakterizace polyetylenových nosičů buněk je podrobněji popsána v příložených publikacích Kasálková *et al.* 2007, Kasálková *et al.* 2010, Pařízek *et al.* 2009, Švorčík *et al.* 2009.

### **3.2. Příprava polyesterové sítěky pro uvolňování Sirolimu v pokusech *in vitro* a v živém králičím modelu**

K pokusům byly použity polyesterové sítěky (CHS 50, PES Mesh) vyrobené pletařskou technologií v podniku VÚP a.s., Brno) z příze o průměru 90  $\mu\text{m}$  (průměr jednotlivých vláken 17,5  $\mu\text{m}$ ).

Sít'ky byly použity neimpregované nebo byly impregnovány kopolymerem poly (L-laktidu a  $\epsilon$ -kaprolaktonu, poměr obou složek 70:30, obchodní název kopolymeru Purasorb PLC 7015, PURAC Biomaterials) a léčivem Sirolimus (Rapamycin ze Streptomycet, Sigma-Aldrich, Německo, R0395). K impregnaci byly použity následné kombinace:

**Sít'ka 1** = impregnována roztokem číslo 1, tj. s rozpuštěným Purasorbem a Sirolimem (36,4 mg Purasorbu a 5,2 mg Sirolimu v 1 ml směsi chlorbenzen-etanol; 1,75 : 1 v/v),

**Sít'ka 2** = impregnována roztokem č. 2 s rozpuštěným Purasorbem a Sirolimem (36,4 mg Purasorbu a 10,4 mg Sirolimu v 1 ml směsi chlorbenzen-etanol; 1,75 : 1 v/v) a následným překrytím roztokem č. 3 (36,4 mg Purasorbu v 1 ml směsi chlorbenzen-etanol; 1,75 : 1 v/v).

**Sít'ka Purasorb** = polyesterová sít'ka impregnována pouze Purasorbem (roztokem č. 3), sloužila jako referenční materiál.

Uvedené modifikace polyesterových sít'ek byly provedeny na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. v rámci spolupráce se skupinou RNDr. Eduarda Bryndy, CSc.

K měření uvolňování Sirolimu byly sít'ky nastříhány na vzorky o velikosti 0,5 nebo 1 cm<sup>2</sup>, které byly vloženy do nádob s 5 ml fyziologického roztoku pufovaného fosfáty (PBS) a umístěny na třepačce při teplotě 37°C. Doba inkubace činila 0 - 42 dní, intervaly odběru byly 0, 1, 4, 7, 9, 11, 14, 17, 21, 28, 35 a 42 dní, přičemž PBS bylo u všech vzorků denně měněno. Pro každý časový interval a každou skupinu bylo použito 3 - 8 vzorků.

Byla hodnocena stabilita Sirolimu v různých rozpouštědlech (PBS, metanol, dichlormetan), o různých koncentracích (12,5; 50 a 750 ng/ml), za různých teplot (37°C, 25°C, -20°C a -75°C) a po různou dobu (od 5 minut do 3 měsíců). Hodnocení bylo provedeno pomocí Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC).

Zbylé koncentrace Sirolimu byly měřeny na vysušených sít'kách, které byly vloženy do dichlormetanu, ve kterém se polymer a Sirolimus rozpustily. Rozpouštědlo bylo posléze odpařeno. Látka zbylá po odpaření byla rozpuštěna v 1 ml metanolu, centrifugována 5 min při 13 000 rpm, a přítomnost Sirolimu v supernatantu byla neprodleně analyzována pomocí systému Acquity UHPLC vybaveného detektorem 2966 PDA.

Veškerá měření pomocí UHPLC byla provedena ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem AV ČR, v.v.i. (RNDr. Jana Olšovská, PhD, Mgr. Zdeněk Kameník).

Popsaná metodika je podrobněji rozpracována ve studii [Filová \*et al.\* 2011](#).

Při pokusech na živém králičím modelu byla použita polyesterová sít'ka obsahující 36,4 mg Purasorbu a 5,2 mg Sirolimu v 1 ml směsi chlorbenzen-etanol; 1,75 : 1 v/v, obsah Sirolimu v sít'ce činil 0,14 mg / cm<sup>2</sup>.

Chirurgická část studie na živém králičím modelu byla provedena ve spolupráci s Institutem klinické a experimentální medicíny (IKEM), Praha (MUDr. Ivo Skalský, MUDr. Ondřej Szárszoi, PhD).

K pokusu byli použiti samci laboratorního králíka plemene Činčila velká (3,0 – 3,5 kg; n= 50). Před operací byla provedena anestézie intramuskulární injekcí ketamin hydrochloridu (30 mg/kg). Anestézie byla dále udržována inhalací isofluranu (2,5 - 3,0%). Proti možnému srážení krve byl nitrožilně podán heparin (300 IU/Kg).

Žilní štěp byl vytvořen z pravé vnější jugulární žíly a použit ve formě bypassu na pravé společné karotické arterii. Polyesterové sítky se Sirolimem a bez této látky byly omotány okolo žilního štěpu a fixovány polypropylenovou nití. Život pokusných zvířat byl ukončen za 3 a 6 týdnů po implantaci. Štěpy byly vyjmuty a vyšetřeny histologicky i histochemicky na parafinových a kryostatových řezech. Byla sledována tloušťka intimy a média, přítomnost proliferčního antigenu PCNA v HSB, přítomnost buněk zánětlivého infiltrátu a případná kalcifikace tkáně.

Uvedené metodiky jsou podrobně popsány v publikacích [Skalský \*et al.\* 2011](#), [Skalský \*et al.\* 2012](#).

### **3.3. Příprava nanovláknenných nosičů a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti**

Nanovláknenné nosiče buněk jsem připravil v rámci své stáže Erasmus na zahraničním pracovišti Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University of Kiel, Kiel, Germany pod vedením dr. Timothy Douglase.

Nosiče byly připraveny z kopolymeru L-laktidu a glykolidu (PLGA, poměr obou složek 85:15), získaného od firmy Purac Biomaterials, Frankfurt, Německo. PLGA byl rozpuštěn ve směsi metylenchloridu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a dimetyl formamidu (Sigma). Poměr rozpouštědel činil 2:3 a výsledná koncentrace PLGA byla 2,3 hmotnostních %.

Nanovláknenné membrány byly vyrobeny metodou elektrostatického zvláknování (elektrospiningu) na přístroji Nanospider (Elmarco, Česká Republika) za použití vertikální trnové elektrody při napětí 24,6 kV, vzdálenosti mezi elektrodami 145 mm a síle elektrického pole 1,79 kV/cm. Vlákna se formovala po dosažení daného napětí v elektrickém poli mezi elektrodami a koncentrovala se na polypropylenové látce umístěné na horní elektrodě. Látka sloužila jako podklad pro výslednou nanovláknennou membránu o průměru cca 10 cm. Pro optimální pracovní tloušťku membrány byly použity 4 ml roztoku, který byl v dávce 50  $\mu$ l dávkován mikropipetou na elektrodu ve tvaru svislé kovové tyčky.

Dále byl vytvořen druhý typ nanomembrán, kdy do roztoku PLGA v rozpouštědlech byly přidány nanodiamanty (NanoAmando, Japonsko) v koncentraci 0,7 hm.%. Suspenze nanodiamantů byla intenzívně míchána a sonikována, aby se předešlo shlukování nanočástic. Po odpaření rozpouštědel byla výsledná koncentrace nanodiamantů v kompozitních membránách kolem 23 hm.%.

Pokud jde o fyzikálně-chemické vlastnosti nanovláknenných nosičů, ještě na pracovišti v Kielu jsem charakterizoval pod vedením dr. Douglase jejich morfologii pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM; XL30CP, mikroskop Phillips Electron Optics GmbH, Německo). Na mikrofotografiích ze SEM byla hodnocena tloušťka nanovláken, plošná velikost mezer (tj. vstupů do pórů) mezi nimi, počet a velikost shluků materiálu.

Další charakterizace nanovláknenných membrán byla provedena v rámci spolupráce s Fyzikálním ústavem AV ČR, v.v.i. (Ing. Alexander Kromka, PhD). Přítomnost a distribuce nanodiamantů v PLGA nanovláknenech zde byla hodnocena na snímcích pořízených pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM, Philips CM120). Smáčivost nanovláknenných membrán byla měřena pomocí kontaktního úhlu vodní kapky na reflexním goniometru (Surface Energy Evaluation System, Advex Instruments, Masarykova Universita, Brno, ČR).

Molekulární struktura nanovláknenných membrán byla hodnocena Fourierovou infračervenou spektroskopií (FTIR) na Universitě v Ghentu, Belgie (Polymer Chemistry and Biomaterials Group, Ghent University, Ghent; Dr. Timothy Douglas). Na tomto pracovišti byly měřeny i některé mechanické parametry membrán, a sice jejich odolnost proti protržení (dr. Ana dos Santos, dr. Timothy Douglas). K tomuto účelu byl použit analyzátor struktury TA500 (Lloyd Instruments, Fareham, UK) a sonda Instron. Membrány byly upevněny v kruhových plastových úchytech Cell Crowns (Scaffdex Oy, Tampere, Finsko, průměr a výška 10 mm). Odolnost membrán vůči deformaci byla zkoušena cylindrickou sondou o průměru 3 mm, která tlačil do středu membrány. Byla zaznamenána síla nutná k protržení membrány a maximální možná deformace membrány před jejím protržením.

Další mechanický parametr membrán, a sice pevnost v tahu, byla hodnocena na Stavební Fakultě ČVUT, Praha (Ing. Pavel Tesárek PhD, Ing. Pavla Ryparová). Pruhy membrán o délce 40 mm a šířce 21-25 mm) byly upevněny do přístroje LabTes4.100 SP1 a vystaveny konstantnímu tahu. Byla zaznamenána maximální síla tahu, která vedla k přetržení membrán.

Uvedená metodika je podrobně popsána v práci [Pařízek \*et al.\* 2012b](#).

### 3.4. Buněčné modely a kultivační podmínky

Veškeré biologické analýzy použité v této práci, včetně kultivace buněk, byly provedeny ve Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR.

V první části práce, a sice ve studiích týkajících se hodnocení modifikací polyetylénu z biologického hlediska, používám hladké svalové buňky izolované explantační metodou z *tunica media* hrudní aorty potkana kmene Wistar (Loukotová *et al.* 1998, Bačáková *et al.* 1997, 2002). Jejich hlavní výhodou je, že se jedná o primokultury či kultury nízce pasážované (3.- 5. pasáž), které si lépe než buňky komerčně dostupných linií zachovávají vlastnosti charakteristické pro svůj fenotyp. Jsou tak i více citlivé k fyzikálně-chemickým vlastnostem podložky, na které se pěstují, a díky tomu se na nich lépe projevují účinky v rozdílech mezi jednotlivými testovanými materiály.

K pokusům v buněčných kulturách byly vzorky PE použity až po alespoň 20 dnech „zrání“, tj. uskladnění ve tmě a při pokojové teplotě, které mělo chemicky stabilizovat jejich povrch. Vzorky PE o průměru 2 cm byly rozstříhány na čtyři části, sterilizovány 70% etanolem po dobu jedné hodiny a posléze byly vloženy do kultivačních destiček s 24 jamkami o průměru 1,5 cm (TPP, Trasadingen, Švýcarsko). Proti vyplavání po přidání média se suspenzí buněk byly vzorky zatíženy kroužky z polyamidu.

Buňky byly v jednotlivých pokusech na materiál nasazeny obvykle v koncentracích 17 000 buněk/cm<sup>2</sup> (30 000 buněk na jamku) a 1,5 ml média na jamku. Jako kultivační médium byla použita Dulbeccova modifikace Eaglova minimálního esenciálního média (DMEM, Sigma, USA, #D5648), obohacená o 10% fetálního bovinního séra (FBS, Sebak GmbH, Aidenbach, Německo) a gentamicin (40 µg/ml, LEK, Ljubljana, Slovinsko). Sledované parametry chování buněk byly odečítány v průběhu 1 týdne kultivace, obvykle v časových intervalech 1, 2, 3, 5 a 7 dní po nasazení. Pro každou experimentální skupinu a každý časový interval byly použity tři až čtyři vzorky.

Při roubování povrchu PE, aktivovaného ozářením plasmatem, nanočásticemi Au byly k hodnocení úspěšnosti modifikace použity i embryonální myší NIH fibroblasty linie 3T3 (darované RNDr. B. Dvořánkovou, Anatomický ústav 1. LF UK, Praha). Tyto buňky byly na vzorky materiálu nasazeny v hustotě 11 000 buněk/cm<sup>2</sup> (20 000 buněk/jamka, 1,5 ml média). Jako kultivační médium bylo použito výše zmíněné médium DMEM s 10% FBS, 1% roztokem vitamínů (MEM) a antibiotiky (10 000 U/ml penicilin G, 10 mg/ml streptomycin sulfátu, 25

µg/ml amfotericinu B). Sledované parametry byly odečítány v časových intervalech 1, 3 a 5 dní po nasazení.

HSB hrudní aorty potkana byly použity i v pokusech *in vitro* v souvislosti s konstrukcí periadventiciálního systému uvolňujícího Sirolimus. Buňky byly nasazeny v hustotě 9 000 buněk/cm<sup>2</sup> a kultivovány v médiu DMEM s 10% FBS a gentamicinem (40 µg/ml, LEK, Ljubljana, Slovinsko). Buňky byly použity v 5. - 10. pasáži. Byly nejprve nasazeny do čistých jamek polystyrénových kultivačních destiček (TPP, Trasadingen, Švýcarsko; průměr jamky 1,5 cm). Po 24 hodinách byly k jednotlivým skupinám přidány vzorky. Sledované parametry byly odečítány v časových intervalech 0, 2, 7 a 14 dní po nasazení. Pro každou experimentální skupinu a každý časový interval byly použity tři vzorky.

Pro sledování biokompatibility nanovláknenných nosičů z PLGA a nanodiamantů jsme použili lidské kostní buňky podobné osteoblastům linie MG 63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Velká Británie). Ačkoliv byla tato linie izolována z osteosarkomu a dlouhodobě kultivována po řadu let, stále si zachovává důležité znaky osteogenní diferenciace, jako je například produkce osteocalcinu a aktivita alkalické fosfatázy (Finch *et al.* 2001, Sun *et al.* 2009, Qu *et al.* 2011, Grausová *et al.* 2011).

Nanovláknenné nosiče byly uchyceny do plastových držáků Cell Crowns (Scaffdex Oy, Tampere, Finsko) a sterilizovány pomocí gama záření podle ISO 11137. Před nasazením buněk byly opláchnuty DMEM po dobu 24 hodin a umístěny do 24-jamkové kultivační destičky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko; průměr jamek 1,5 cm).

Nosiče pak byly osazeny buňkami MG 63 v koncentraci 17 000 buněk/cm<sup>2</sup> (30 000 buněk na jamku) a 1,5 ml média na jamku. Jako kultivační médium bylo použito obvyklé médium DMEM s 10% FBS a gentamycinem (40µg/ml). Sledované parametry chování buněk byly odečítány v časových intervalech 1, 3, 7 dní po nasazení. Pro každou experimentální skupinu a každý časový interval byly použity čtyři vzorky.

Pro sledování potenciální imunogenicity nanovláknenných membrán byla kromě buněk MG 63 použita i linie myších makrofágů RAW 264.7 (ATCC, USA.). Rovněž tento typ buněk byl nasazen v koncentraci 17 000 buněk/cm<sup>2</sup> (30 000 buněk na jamku) na membrány uchycené v Cell Crowns (Scaffdex, Finland), které byly umístěny do 24-jamkových kultivačních destiček (TPP, Trasadingen, Švýcarsko). Pro kultivaci bylo použito médium RPMI-1640 (Sigma, kat. č. R8758) s 10% FBS a 40 µg/ml gentamycinu. Všechny tři typy buněk (HSB, 3T3 fibroblasty i MG 63) byly inkubovány v termostatu s nastavenými podmínkami relativní vlhkostí atmosféry kolem 90% (aby se snížilo odpařování tekutiny z média a tím nedocházelo ke změně koncentrace jeho složek), a koncentrací CO<sub>2</sub> 5% v atmosféře vzduchu, která je obdobná jako



v extracelurární tekutině živých organismů a dále se podílí i na udržování pH kultivačního media. Teplota při kultivaci byla 37°C, což odpovídá teplokrevným organismům, ze kterých dané buňky původně pocházejí.

### **3.5. Chování buněk na zkoumaných materiálech**

Biokompatibilitu materiálů vytvořených v této práci jsme hodnotili některými standardizovanými testy vzešlými z předchozí praxe, jejichž celkový přehled je v úvodu k této práci.

Nejprve jsme se zaměřili na základní parametry hodnocení interakce buňka-materiál, které představuje počet buněk a plocha jejich rozprostření na materiálu. K hodnocení počtu buněk byly použity dvě metody. První spočívala v počítání buněk na mikrofotografiích. Buňky fixované 70% etanolem byly obarveny kombinací fluorescenčních barviv Texas Red (Molecular Probes, Invitrogen, kat. č. T6008), které barví proteiny buněčné membrány i cytoplasmu, a Hoechst 33342 (Sigma, USA), které barví buněčná jádra. Buňky na plošných materiálech byly fotografovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 51, vybaveném digitální kamerou DP 70. Pro buňky na nanovlákných membránách, které měly do jisté míry prostorový charakter, byl použit mikroskop Nikon Eclipse Ti-E vybavený Z-posunem a digitální kamerou Nikon DS-Qi1. Toto zařízení umožnilo 3D rekonstrukci sledovaných objektů a dekonvoluci snímků.

Při druhé metodě počítání buněk jsme buňky oddělili od podkladu pomocí kombinace trypsinu-EDTA nebo pouze pomocí EDTA (v případě makrofágů). Buňky pak byly počítány pod mikroskopem v Bürkerově komůrce (v případě nízkých počtů buněk řádově v tisících buněk) nebo automaticky přístrojem Vi-CELL Analyzer (Beckman Coulter, USA), a to při vyšších počtech nad limitem detekce přístroje (řádově desítky a stovky tisíc buněk). V našich pokusech jsme zjistili, že vhodné časové intervaly pro hodnocení změn počtu buněk jsou 1, 3 a 7 dní po nasazení, případně 1, 2, 3, 5 a 7 dní. Delší kultivace buněk než 7 dní již obvykle vyžaduje výměnu média, což ovlivní průběh růstových křivek buněk.

Dále jsme se zaměřili na velikost plochy rozprostření buněk na materiálu, tj. parametr, který citlivě vypovídá o povrchových vlastnostech materiálu a jeho vhodnosti jako nosiče buněk pro danou aplikaci. Tuto plochu jsme sledovali v prvních dvou dnech pokusu, kdy je populační hustota buněk obvykle ještě nízká, buňky jsou spolu v minimálním kontaktu, a plocha rozprostření buněk je tak prakticky výhradně závislá na vlastnostech materiálu. Tato

plocha byla měřena na mikrofotografiích buněk pomocí programu Atlas (Tescan Ltd., Brno, ČR).

Hodnocení životaschopnosti (viability) buněk bylo provedeno v pokusech na sítkách uvolňujících Sirolimus, a rovněž na nanovlákných membránách z PLGA a nanodiamantů, aby se vyloučilo případné cytotoxické působení těchto materiálů. Vzorky s buňkami byly opláchnuty v PBS a obarveny pomocí LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kitu (Invitrogen, Molecular Probes, USA). Principem testu je detekce aktivních esteráz u živých buněk pomocí calceinu AM (emituje zelenou fluorescenci) a detekce propustnosti buněčné membrány mrtvých buněk pomocí ethidium homodimeru-1 (proniká do mrtvých buněk, barví jejich jádra a emituje červenou fluorescenci). Obarvené buňky byly poté fotografovány v mikroskopu Olympus IX 51, vybaveným digitální kamerou DP 70. Z pořízených fotografií byl odečítán poměr živých a mrtvých buněk.

Adhezi buněk jsme dále hodnotili pomocí hlubších molekulárních ukazatelů, jako je koncentrace a distribuce integrinových adhezních receptorů a s nimi asociovaných molekul, tj. strukturálních a signálních proteinů fokálních adhezí. Zaměřili jsme se především na sledování talinu, vinkulinu, paxillinu a alfa-aktininu (Pařízek *et al.* 2009, 2012a,b).

U HSB jsme dále hodnotili markery fenotypické maturace směrem ke kontraktilnímu fenotypu, a to koncentraci alfa-aktinu a isoform myosinu SM1 a SM2 a jejich uspořádání do svazků filament.

Koncentrace uvedených molekul v buňkách (na mg proteinu) byla hodnocena enzymatickou imunosorbentní esejí (ELISA), a jejich uspořádání imunofluorescenčním barvením.

Tyto metody jsou detailně popsány v příložených publikacích, zejména Kasálková *et al.* 2007, Pařízek *et al.* 2009, Švorčík *et al.* 2009, Kasálková *et al.* 2010, Filová *et al.* 2011, Pařízek *et al.* 2012b.

### 3.6. Statistická analýza

Kvantitativní data byla obvykle vyjádřena jako průměr  $\pm$  S.E.M. (střední chyba průměru; Standard Error of Mean), řidčeji jako průměr  $\pm$  S.D. (Standardní odchylka; Standard Deviation) a dále statisticky zpracována programem SigmaStat (Jandel Corporation, USA). Statistická významnost rozdílů mezi experimentálními byla hodnocena testem Analysis of Variance (ANOVA), a to Student-Newman-Keulsovou metodou nebo párovým t-testem. Za statisticky významnou byla považována hodnota  $p \leq 0.05$ .

## 4. Výsledky

### 4.1. Cévní hladké svalové buňky v kulturách na modifikovaném polyetylenu

Kasálková N, Kolářová V, Bačáková L, Pařízek M, Švorčík V: Cell adhesion and proliferation on modified PE. **Mater Sci Forum** 567-568, 269-272, 2007; **IF = 0.399**

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Slepíčka P, Lisá V, Blažková M, Švorčík V: Improved adhesion, growth and maturation of vascular smooth muscle cells on polyethylene grafted with bioactive molecules and carbon particles. **Int J Mol Sci** 10(10): 4352-4374, 2009; **IF = 2.279**

Kasálková N, Makajová Z, Pařízek M, Slepíčka P, Kolářová K, Bačáková L, Hnatowicz V, Švorčík V: Cell adhesion and proliferation on plasma-treated and poly(ethylene glycol)-grafted polyethylene. **J Adhes Sci Technol** 24(4): 743-754, 2010; **IF = 0.992**

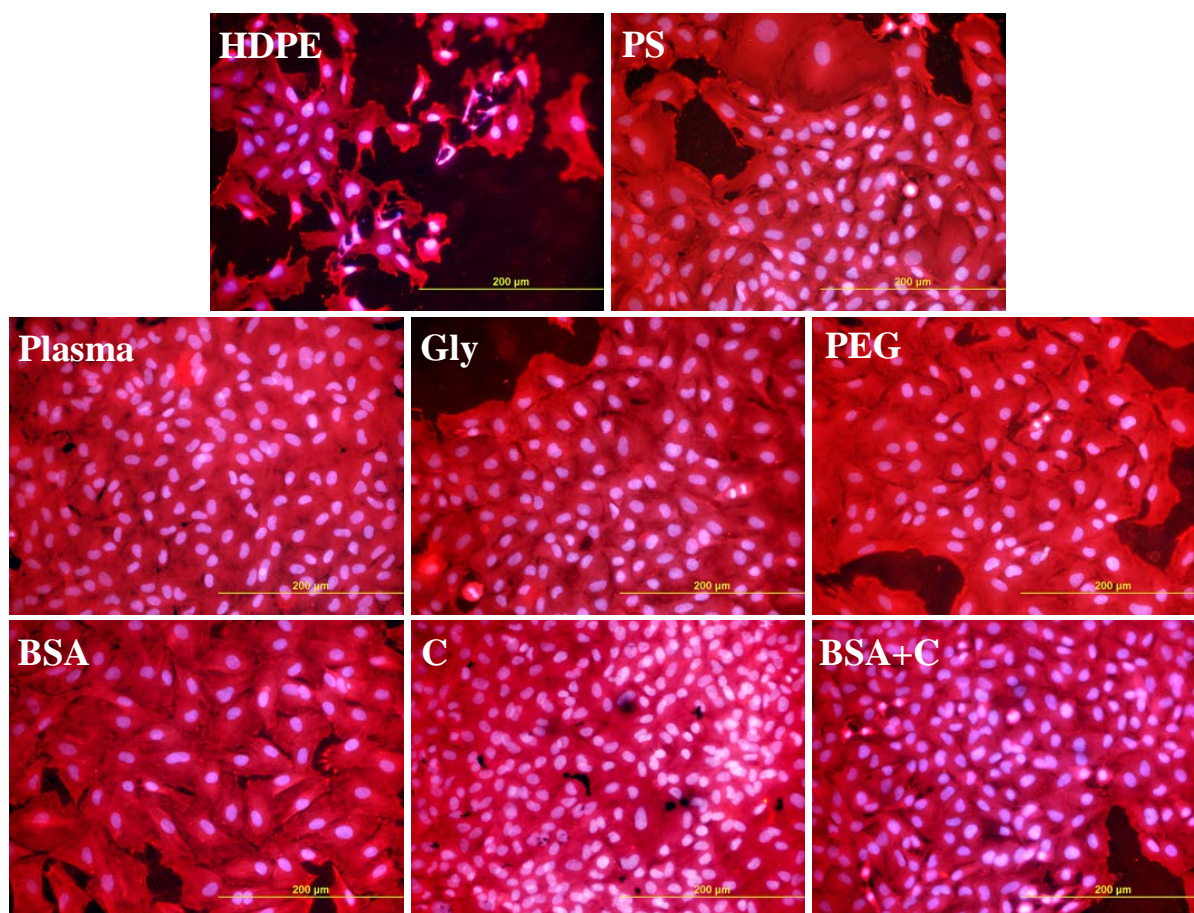
Švorčík V, Kasálková N, Slepíčka P, Záruba K, Král V, Bačáková L, Pařízek M, Lisá V, Ruml T, Gbelcová H, Rimpelová S, Macková A: Cytocompatibility of Ar(+) plasma treated and Au nanoparticle-grafted PE. **Nucl Instr Meth Phys Res B** 267(11): 1904-1910, 2009; **IF = 1.842**

V uvedených studiích jsme se zabývali problémem modifikací polyetylenu a následných možnostech jejich využití v oblasti tkáňového inženýrství cévní stěny. Samotný polyetylén je relativně vysoce hydrofobní, což je limitující faktor pro růst buněk. Tento stav se dá zvrátit pomocí fyzikálních modifikací i následným upravením aktivního povrchu za pomoci roubování biologicky aktivních molekul a nanočástic.

V první z prací ([Kasálková et al. 2007](#)) jsme porovnávali vliv ozáření argonovým plasmatem na atraktivitu polyetylenu o vysoké hustotě (HDPE) a nízké hustotě (LDPE) pro adhezi a růst HSB aorty potkana *in vitro*. Zjistili jsme, že u obou polymerů zvýšilo ozáření počet iniciálně adherovaných buněk za 1 den po nasazení i jejich následný růst v průběhu následujícího týdne. Tento účinek byl dále zvýšen roubováním glycinu na oba typy PE. Vyšších počtů buněk a vyšší rovnoměrnosti jejich distribuce bylo dosaženo na LDPE než na

HDPE. Avšak rozdíly v počtu buněk na polymeru před ozáření a po ozáření byly lépe patrné na HDPE, neboť LDPE již před modifikacemi umožňoval adhezi relativně vysokého počtu buněk. Navíc HDPE po ozáření i roubování projevoval výraznější změny ve fyzikálně-chemických vlastnostech svého povrchu – výrazněji zvyšoval svou smáčivost i drsnost řádově v nanometrech. Proto byl pro další studie vlivu ozáření plasmatem a roubováním biomolekulami a nanočásticemi vybrán HDPE. Zvýšení smáčivosti polymerů po ozáření plasmatem bylo rovněž výraznější spíše u kratších časů ozařování (50 s) než u časů delších (150 s a 400 s), proto byl v následující studii HDPE ozařován pouze po dobu 50 s.

Ve druhé z prací (Pařízek *et al.* 2009) byl povrch HDPE aktivován ozáření plasmatem Ar po dobu 50 s a následně roubován molekulami glycinu (Gly), polyetylén glykolu (PEG, molekulová hmotnost 20 000), bovinním sérovým albuminem (BSA), koloidními částicemi uhlíku (C) a jejich kombinací s bovinním sérovým albuminem (BSA+C). Pomocí a Ruthefordovy spektroskopie (RBS), reflexní goniometrie a mikroskopie atomárních sil (AFM) se prokázalo, že ozáření výrazně změnilo chemické složení i morfologii povrchu HDPE. V polymeru stoupal obsah kyslíku a klesal kontaktní úhel vodní kapky na povrchu polymeru, což bylo známkou zvýšení smáčivosti materiálu. Tento jev byl dále umocněn roubováním Gly a PEG na polymer aktivovaný ozáření. Všeobecně lze říci, že modifikované vzorky HDPE podpořily adhezi a růst HSB aorty potkana ve srovnání s nemodifikovaným polymerem (**obr. 1**). Počet iniciálně adherovaných buněk za 1 den po nasazení, plocha jejich rozprostření 2. den a jejich počty 3. a 7. den po nasazení byly relativně vysoké na HDPE roubovaném PEG. Jak ukázalo imunofluorescenční barvení talinu, i fokální adhezní plaky byly dobře vyvinuté u buněk rostoucích na HDPE modifikovaném PEG. Tento výsledek odpovídal i výsledkům měření provedenými metodou ELISA – v buňkách rostoucích na površích modifikovaných PEG byly nalezeny relativně vysoké koncentrace proteinů fokálních adhezí talinu, vinkulinu i paxillinu. Podobně se chovaly i buňky rostoucí na HDPE roubovaném Gly a BSA+C. Buňky na substrátech s PEG a Gly dosahovaly i relativně vysokých koncentrací  $\alpha$ -aktinu, markeru fenotypické maturace HSB směrem ke kontraktilnímu fenotypu. Svazky filament obsahujících  $\alpha$ -aktin a isoformy SM1 a SM2 myosinu byly v buňkách na všech modifikovaných vzorcích silnější a početnější než na materiálu nemodifikovaném.



**Obr. 1.** Cévní hladké svalové buňky aorty potkana 5. den kultivace na čistém polyetylenu o vysoké hustotě (HDPE), polystyrénu pro tkáňové kultury (PS), HDPE ozářeném plasmatem (Plasma) a následně roubovaném glycinem (Gly), polyetylén glykolem (PEG), bovinním sérovým albuminem (BSA), koloidními nanočásticemi uhlíku (C) nebo BSA kombinovaným s C (BSA+C). Buňky fixovány etanolem a obarveny kombinací Hoechst 33342 (modrá fluorescence) a Texas Red C<sub>2</sub>-maleimid (červená fluorescence). Mikroskopem Olympus IX 51, obj. 20×, digitální kamera DP 70. Měřítko = 100 μm (Pařízek *et al.* 2009).

Ve třetí publikaci (Kasálková *et al.* 2010) jsme se zaměřili na vliv délky řetězce PEG (vyjádřené jeho molekulovou hmotností), naroubovaného na povrch HDPE aktivovaného ozářením argonovým plasmatem, na fyzikálně chemické vlastnosti tohoto polymeru a jeho atraktivitu pro adhezi a růst HSB. Po ozáření argonovým plasmatem byl HDPE roubován PEG o molekulové hmotnosti 300 a 20 000. HDPE roubovaný delšími řetězci PEG (m.h. 20 000) obsahoval více kyslíku a měl vyšší smáčivost než polymer roubovaný řetězci kratšími (m.h. 300). I změny v morfologii povrchu byly výraznější u HDPE roubovaného delšími řetězci PEG. Na povrchu tohoto materiálu se objevily rozvětvené hvězdčité struktury, zatímco polymer

roubovaný řetězci kratšími si podržel svou původní lamelární strukturu. Oba typy PEG výrazně zvýšily nárůst počtu buněk na HDPE za 3 dny a zejména za 7 dnů po nasazení ve srovnání s nemodifikovaným či pouze ozářeným HDPE, přičemž toto zvýšení bylo výraznější na HDPE roubovaném delšími řetězci PEG. Roubování PEG nezvýšilo počet iniciálně adherovaných buněk ve srovnání s nemodifikovaným či pouze ozářeným polymerem, ba dokonce ho mělo tendenci spíše snížit. Toto snížení však bylo méně nápadné na HDPE s delšími řetězci PEG.

Ve čtvrté publikaci (Švorčík *et al.* 2009) jsme se soustředili na roubování povrchu HDPE nanočásticemi. HDPE byl aktivován argonovým plasmatem a následně ponořen do roztoku obsahujícího nanočástice zlata (Au) o přibližné velikosti 12 nm. Metodami XPS, RBS a reflexní goniometrií bylo prokázáno, že došlo ke změnám fyzikálně-chemických vlastností povrchu HDPE, zejména se zvýšil obsah kyslíku v jeho povrchové vrstvě a snížil se kontaktní úhel vodní kapky na jeho povrchu (tj. zvýšila se jeho smáčivost). Rovněž se zvýšila drsnost povrchu v řádu nanometrů oproti nemodifikovanému HDPE, třebaže velikost nerovností byla menší než u HDPE pouze ozářeného plasmatem. Oproti pouze ozářenému polymeru se změnil i tvar nerovností na povrchu, a to z původních převážně konických špičatých útvarů na útvary zaoblené a vláknité. Jak ukázalo hodnocení morfologie povrchu pomocí AFM, nanočástice zlata byly víceméně rovnoměrně uchyceny na povrchu HDPE a nevytvářely větší aglomeráty. Zlaté nanočástice se nevyskytovaly pouze na povrchu HDPE, ale byly zaznamenány až do hloubky 100 nm pod povrchem modifikovaného vzorku, třebaže se jejich koncentrace se s hloubkou snižovala.

Pokus pokračoval osazením vzorků HSB aorty potkana a myšími embryonálními fibroblasty linie NIH 3T3. Modifikace nanočásticemi Au se ukázala jako úspěšná z hlediska kolonizace buňkami, neboť iniciální adheze a následný nárůst počtu obou typů buněk na substrátech s Au byly významně vyšší ve srovnání nejenom s nemodifikovaným HDPE, ale i s pouze ozářeným polymerem. Tento rozdíl byl však nápadnější u fibroblastů 3T3 než u HSB. Fibroblasty 3T3 adherovaly na modifikované materiály jednoznačně lépe než na čistý HDPE a v průběhu pokusu byla jejich proliferace také výrazně rychlejší na materiálech modifikovaných, zejména na materiálech roubovaných nanočásticemi Au. Během krátké doby vytvořily buňky 3T3 konfluentní vrstvy a pokus musel být z důvodu jejich vysoké populační hustoty předčasně (již 3. den) ukončen. Přesto však měly fibroblasty 3T3 na modifikovaných materiálech typický vřetenovitý tvar bez přítomnosti granulárních útvarů uvnitř buněk, což ukazovalo na jejich dobrý fyziologický stav. Naproti tomu čistý HDPE se ukázal jako naprosto nevyhovující materiál pro adhezi a následnou proliferaci buněk 3T3. Buňky měly kulovitý tvar, slabě

adherovaly k podkladu a nejdéle po pěti dnech kultivace došlo k jejich úplnému odloučení od podložky a vytvoření jejich suspenze v kultivačním médiu. Rovněž přítomnost granulárních útvarů uvnitř buněk 3T3 na nemodifikovaném HDPE byla vysoká. HSB se ukázaly k čistému HDPE jako poměrně tolerantní. Adherovaly v obdobném počtu jako na modifikované vzorky HDPE, i když plocha jejich rozptřeni byla významně menší než na modifikovaném HDPE, zejména roubováním nanočástic Au. Ve srovnání s fibroblasty 3T3 byla dynamika jejich proliferace relativně umírněná a buňky byly na površích modifikovaných i nemodifikovaných vzorků stabilní nejméně po 7 dnů kultivace, přičemž konfluentního stádia dosáhly nejdříve 5. den kultivace (buňky na HDPE roubovaném nanočásticemi zlata). Ve srovnání s fibroblasty 3T3 byly HSB na podkladu rozptřeny i větší plochou a zaujímaly převážně polygonální tvar (Švorčík *et al.* 2009).

#### 4.2. Polymerní sítě řízeně uvolňující Sirolimus pro prevenci hyperplazie cévních HSB v bypassu z autologní žíly

Filová E, Pařízek M, Olšovská J, Kameník Z, Brynda E, Riedel T, Vandrovcová M, Lisá V, Machová L, Skalský I, Szarszoi O, Suchý T, Bačáková L: Perivascular sirolimus-delivery system. **Int J Pharm** 404(1-2): 94-101, 2011; **IF = 3.607**

Skalský I, Filová E, Szarszoi O, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Čapek M, Pirk J, Bačáková L: A periadventitial sirolimus-releasing mesh decreased intimal hyperplasia in a rabbit model. **Physiol Res** 60(3): 585-588, 2011; **IF = 1.646**

Skalský I, Szarszoi O, Filová E, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Čapek M, Pirk J, Bačáková L: A perivascular system releasing sirolimus prevented intimal hyperplasia in a rabbit model in a medium-term study. **Int J Pharm** 427(2): 311-319, 2012; **IF = 3.607**

Tyto práce se zabývají možností prevence hyperplazie cévních HSB vlivem antiproliferačního léčiva Sirolimus (Rapamycin izolovaný ze Streptomycet).

V první práci (Filová *et al.* 2011) sledujeme vliv výše zmíněného léku v podmínkách *in vitro* na buněčných kulturách cévních HSB izolovaných z aorty laboratorního potkana kmene

Wistar, v práci druhé a třetí (Skalský *et al.* 2011, 2012) se zabýváme působením Sirolimu ve zvířecím modelu (králík) při implantaci autologního žilního bypassu z *v. jugularis externa* na *a. carotis communis* (obr. 2).

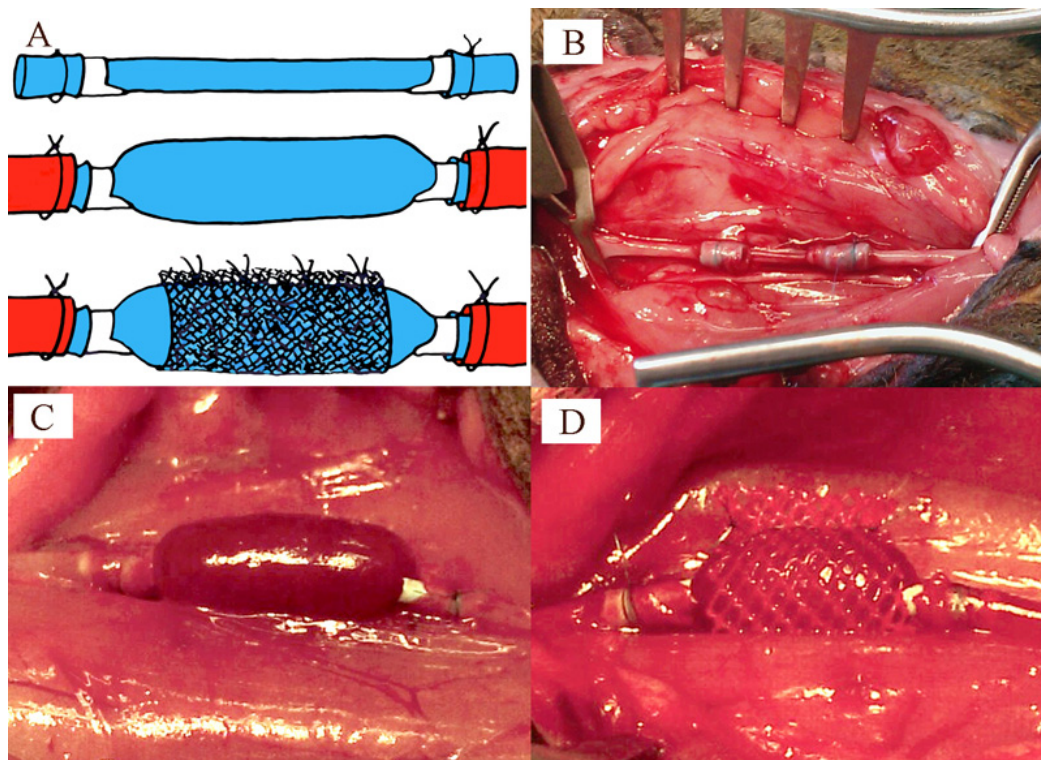
Pozvolné uvolňování léčiva bylo vyřešeno jeho zabudováním do polyesterové síťky, která ve formě periadventiciálního obalu zajišťovala i mechanickou podporu žilního bypassu. Síťka byla impregnována rozpuštěným polymerem Purasorb (kopolymer kyseliny L-mléčné a  $\epsilon$ -kaprolaktonu) a Sirolimem v chlorbenzen-etanolu.

Ve studii *in vitro* (Filová *et al.* 2011) jsme sledovali vliv sítěk s nižší a vyšší koncentrací léčiva (síťka 1, síťka 2), přičemž síťka 2 byla následně překryta ještě jednou vrstvou Purasorb. Třetím typem vzorku, který posloužil i jako kontrolní materiál, byla síťka impregnovaná samotným Purasorbem bez Sirolimu. Jako další referenční vzorek nám posloužilo dno polystyrenových kultivačních misek.

Přítomnost sítěk významně neovlivnila viabilitu HSB *in vitro*. Procento životaschopných buněk v populaci se pohybovalo mezi 86 – 98%. Avšak podle předpokladu došlo ke snížení proliferační aktivity HSB působením uvolňovaného léčiva. U síťky 1 došlo ke statisticky významnému snížení počtu HSB v časových intervalech 2, 7 a 14 dní. V porovnání s počtem buněk rostoucích na kontrolním polystyrenu se počet buněk ve výše zmíněných intervalech snížil o cca 22%, 29% a 25%. U síťky č. 2 došlo ve stejných časových intervalech ke snížení počtů buněk dokonce o 68%, 76% a 60% (v porovnání s počty buněk na kontrolním polystyrenu).

Při pokusu ve výše zmíněném zvířecím modelu polyesterová síťka obsahující Purasorb v kombinaci se Sirolimem (0.14 mg / cm<sup>2</sup>) sloužila i jako mechanická podpora žilního bypassu, který byl do síťky zabalen neprodleně po jeho našití (obr. 2). Za tři týdny došlo ke snížení tloušťky intimy o  $47 \pm 10\%$  v porovnání s intimou kontrolního cévního štěpu bez síťky. I samotná polyesterová síťka bez přítomnosti Sirolimu měla vliv na tloušťku intimy - jejím působením došlo ke snížení tloušťky intimy o  $35 \pm 9\%$  (Skalský *et al.* 2011). Výrazně se snížila i tloušťka *tunica intima* i celého komplexu *tunica intima-media*, a tento příznivý stav se udržel i za 6 týdnů po implantaci (Skalský *et al.* 2012).





**Obr. 2.** Systém uvolňující Sirolimus přiložený periadventiciálně na autologní bypass vytvořený z *v. iugularis ext.* a našitý na *a. carotis communis* laboratorního králíka. **A:** schéma chirurgické techniky vytvoření a implantace bypassu, **B:** autologní vena před vytvořením bypassu, **C:** samotný venózní bypass s výraznou dilatací, **D:** venózní bypass s periadventiciálním systémem uvolňujícím léčivo a poskytujícím oporu cévní stěně (Skalský *et al.* 2012)

### 4.3. Růst kostních MG 63 buněk na kompozitních nanovláknenných membránách z PLGA kombinovaných s nanodiamanty

Pařízek M, Douglas TEL, Novotná K, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Jarošová M, Palatinus L, Tesárek P, Ryparová P, Lisá V, dos Santos AM, Bačáková L: Nanofibrous poly(lactide-co-glycolide) membranes loaded with diamond nanoparticles as promising substrates for bone tissue engineering. **Int J Nanomed** 7: 1931-1951, 2012b; **IF = 4.976**

V této práci jsme odbočili z oblasti cévního tkáňového inženýrství a věnovali se inženýrství tkáně kostní. Na přístroji Nanospider (Elmarco, Liberec) jsme metodou elektrostatického zvláknování připravili nanovláknenné nosiče kostních buněk z kopolymeru PLGA obohaceného nanokrystalickými diamanty (cca 23 hm. % ve výsledné membráně).

Vlákna membrán s nanodiamanty byla o něco tlustší (průměr  $270 \pm 9$  nm) než vlákna membrán z čistého PLGA ( $218 \pm 4$  nm). Plocha vstupů do pórů mezi vlákny byla menší u membrán s nanodiamanty ( $0.46 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ ) než u membrán z čistého PLGA ( $1.28 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ ). Membrány s nanodiamanty obsahovaly více shluků materiálu ( $33\,361 \pm 6\,182$  shluků na  $\text{mm}^2$  ve srovnání s  $8\,340 \pm 1\,495$  shluky /  $\text{mm}^2$  na membránách z čistého PLGA), a tyto shluky byly větší (plocha shluků na mikrofotografiích činila  $3.54 \pm 0.90 \mu\text{m}^2$  ve srovnání s  $2.13 \pm 0.75 \mu\text{m}^2$  na membránách z čistého PLGA). Transmisní elektronová mikroskopie prokázala, že shluky materiálu jsou tvořeny převážně nanodiamanty. Větší shluky nanodiamantů se vyskytovaly i mimo vlákna PLGA (vzájemně propojovaly i několik vláken), menší shluky vyčnívaly z vláken. Nanodiamanty se však vyskytovaly i rovnoměrně rozptýlené uvnitř nanovláken (**obr. 3**).

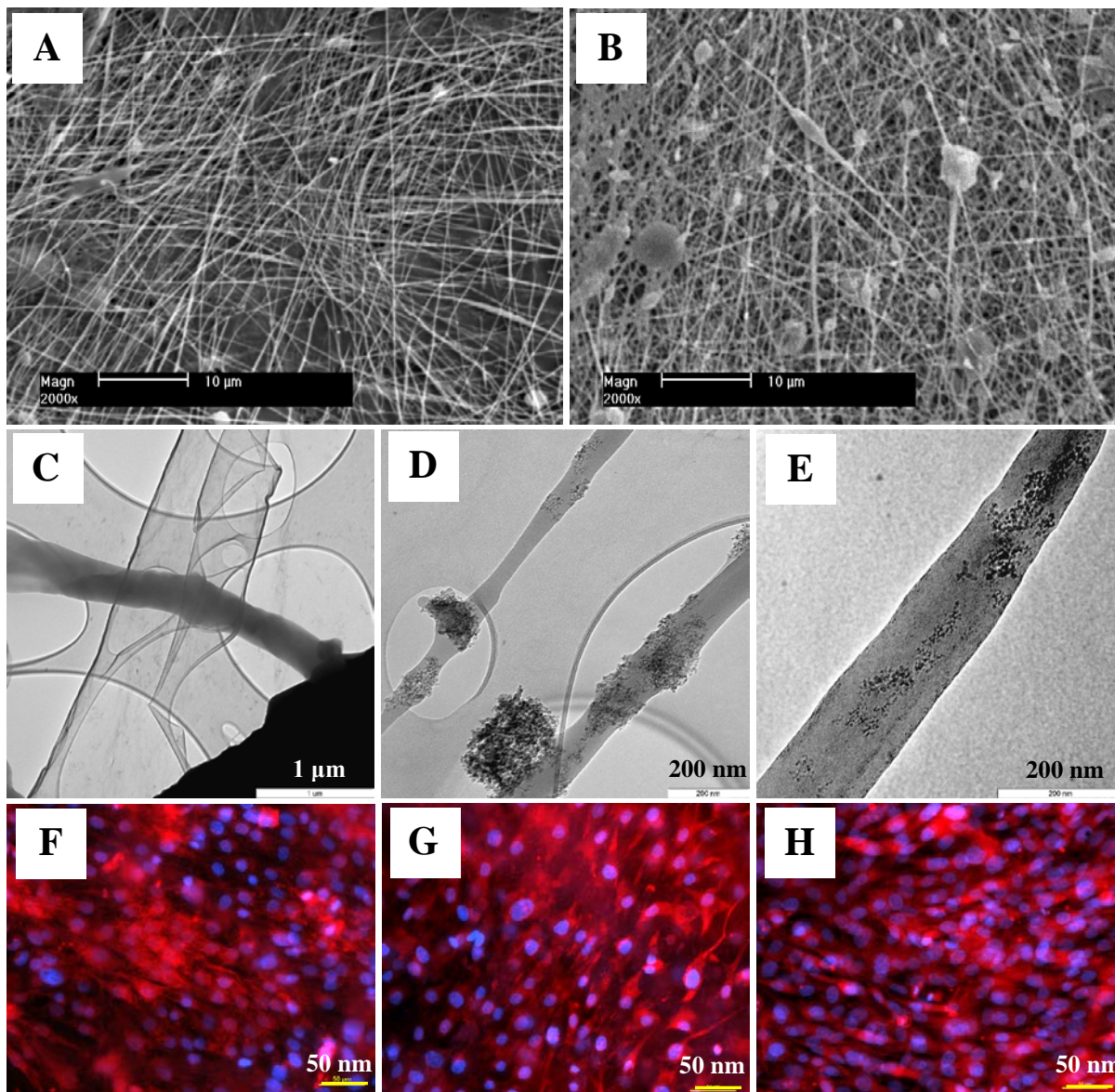
Při testech zkoumajících mechanickou odolnost membrán proti protržení byly lepší výsledky zaznamenány u PLGA membrány s nanodiamanty. U testů na pevnost v tahu nebyly však mezi membránami pozorovány žádné statisticky významné rozdíly.

V rámci výzkumu potenciálního využití membrán pro inženýrství kostní tkáně jsme tyto nosiče osadili lidskými kostními buňkami linie MG 63. Počáteční adheze i následná proliferace buněk probíhala úspěšně a byla obdobná u obou typů membrán, i když počty buněk na membránách a plocha jejich rozprostření byly nižší než v kontrolních polystyrénových jamkách. Nicméně růst buněk na obou typech membrán byl po celou dobu pokusu (1-7 dní) kontinuální, měl výrazně vzestupnou tendenci, a tak sedmý den po nasazení byly membrány rovnoměrně a souvisle osídleny buňkami. Jejich tvar byl typický pro MG 63 buňky, tj.

polygonální či protáhlý, a obdobný jako u buněk rostoucích na kontrolním polystyrenu (**obr. 3**). Ačkoliv plocha rozprostření buněk a dynamika jejich růstu na obou typech membrán byly prakticky shodné, buňky na membránách s nanodiamanty měly početnější, větší a pravidelněji rozmístěné fokální adhezní plaky obsahující talin než buňky na membránách z čistého PLGA, třebaže tyto plaky přece jen nebyly tak nápadně vytvořené jako u buněk paralelně rostoucích na kontrolním polystyrenu.

Viabilita buněk, tj. procento životaschopných buněk v populaci, posuzované komerčně dostupným testem LIVE/DEAD, činilo 92 až 97% na obou typech membrán. Tyto hodnoty byly sice poněkud nižší než u buněk na kontrolním polystyrenu, nicméně stále ještě je lze považovat za vysoké a odrážející fyziologický úbytek buněk v normálních buněčných populacích. Hodnoty životaschopnosti buněk byly rovněž poněkud nižší na membránách s nanodiamanty než na membránách čistých.

Jak ukázalo měření produkce TNF- $\alpha$  buňkami MG 63 i makrofágy RAW 264.7 do kultivačního média, a rovněž sledování koncentrace molekul ICAM-1 v homogenátech získaných z uvedených buněk, nevyvolávaly námi vytvořené nanovlákněné mebrány s nanodiamanty významnou imunitní aktivaci buněk ve srovnání s kontrolními polystyrénovými miskami. Obsah uvedených faktorů v kultivačním médiu i buněčných homogenátech byl dokonce nižší než v případě buněk pěstovaných na PLGA obohacených srovnatelnou koncentrací nanočástic hydroxyapatitu (~23 hm.%).



**Obr. 3.** Morfologie nanovláknenných membrán a lidských kostních buněk linie MG 63 v sedmidenních kulturách na těchto nosičích. **A, C:** membrány z čistého PLGA; **B, D, E:** membrány z PLGA s příměsí nanokrystalických diamantů; **F-H:** buňky MG 63 na membránách z čistého PLGA (**F**), z PLGA s nanodiamanty (**G**) a na kontrolním kultivačním polystyrénu (**H**). A, B: skenovací elektronový mikroskop; C-E: transmisní elektronový mikroskop; F-G optický mikroskop Nikon Eclipse Ti-E, obj. 20x1.5, digitální kamera Nikon DS-Qi1 MC, software NIS-Elements AR, verze 3.10; sumarizace Z-řezů s dekonvolucí (Pařízek *et al.* 2012b).

## 5. Diskuse

Tato práce se zabývá třemi základními úseky problematiky biomateriálů a tkáňového inženýrství, a sice studiem interakce cévních hladkých svalových buněk s materiály vyvíjenými pro potenciální konstrukci cévních náhrad, cílenou dodávkou léčiv do autologních cévních náhrad za účelem zabránit nadměrné proliferaci HSB a interakcí kostních buněk s kompozitními nanovláknými a nanočásticovými nosiči.

Pokud jde o cévní náhrady, vyrobit syntetickou polymerní cévní protézu je v současné době poměrně jednoduchý proces, ale vyrobit jí tak, aby byla biokompatibilní, bioaktivní a umožňovala osídlení funkčními buňkami typickými pro fyziologickou cévní stěnu, je úkol již nepoměrně náročnější.

### 5.1. Cévní hladké svalové buňky v kulturách na modifikovaném polyetylénu

V první části této práce, věnované problematice cévních náhrad, jsme se zaměřili především na úpravy povrchu modelového materiálu polyetylénu o vysoké hustotě (HDPE) a nízké hustotě (LDPE), a chování HSB v kulturách na těchto nosičích.

Polyetylén v nemodifikované podobě není příliš vhodným materiálem pro adhezi a růst buněk. Je totiž poměrně vysoce hydrofobní - hodnoty kontaktního úhlu vodní kapky na jeho povrchu se pohybují okolo 100 stupňů. Je známo, adheze buněk k umělému materiálu je zprostředkována specifickými molekulami, které jsou spontánně adsorbovány k tomuto materiálu z tělních tekutin v podmínkách *in vivo*, a ze séra kultivačního média v podmínkách *in vitro*. Jedná se v podstatě o molekuly dočasné či trvalé extracelulární matrix, jako je např. fibrinogen, fibrin, vitronektin, fibronectin, kolagen, laminin. Uvedené molekuly mohou být rovněž syntetizovány a deponovány na materiál buňkami v blízkém kontaktu s materiálem. Ovšem k vysoce hydrofobním materiálům se tyto molekuly adsorbují v rigidní denaturované podobě, a jejich specifická vazebná místa, např. peptidy s RGD sekvencemi, jsou tak méně dostupná adhezním receptorům buněk (pro přehled viz [Bačáková et al. 2004, 2011a](#); [Bačáková et Švorčík 2008](#), [Pařízek et al. 2011](#)). Polyetylén v nemodifikované podobě je tedy možno považovat za materiál bioinertní, který je sice tolerován buňkami, ale není schopen v buňkách navodit specifické biologické odpovědi a aktivně regulovat jejich chování na svém povrchu. Takové chování je však možno navodit fyzikálně-chemickými úpravami jeho povrchu.

Prvním stupněm úpravy materiálu, který byl společný pro všechny studie provedené na polyetylénu, bylo ozáření plasmatem argonu. Ozáření plasmatem, podobně jako ozáření ionty

či UV světlem, obecně zvyšuje atraktivitu povrchů polymerních materiálů pro adhezi a následný růst buněk. Jak bylo již naznačeno v úvodní části této práce, mechanismus této příznivé změny je následující: vlivem ozáření dochází k odštěpování vodíku (a v případě polymerů jiných než polyetylén i dalších atomů) na polymerních řetězcích, k rozštěpení samotných řetězců, a tím ke vzniku radikálů. Radikály reagují s kyslíkem z okolní atmosféry (včetně zbytkové atmosféry v ozařovací komoře, kde obvykle nebývá dosaženo absolutního vakua), a v povrchové modifikované vrstvě polymeru se vytvářejí chemické funkční skupiny s obsahem kyslíku. Jak lze prokázat pomocí metodami FTIR, RBS či XPS, jedná se zejména o skupiny peroxidové, esterové, éterové, hydroxylové, karbonylové, karboxylové a amidové (Švorčík *et al.* 2006b, pro přehled viz Bačáková *et Švorčík* 2008, Pařízek *et al.* 2009, 2011). V celkovém výsledku mají funkční skupiny s obsahem kyslíku pozitivní vliv na smáčivost povrchu materiálu (Ročková *et al.* 2004, Kotál *et al.* 2007), což je jedna z vlastností materiálů, která rozhoduje o úspěchu adheze a následném růstu buněk v naší představě biokompatibilní cévní náhrady (Bačáková *et al.* 2001, Ročková *et al.* 2004). Skupiny obsahující kyslík zvyšují smáčivost polymeru, a tato smáčivost umožňuje absorpci molekul ECM ve výhodné geometrické konformaci, ve které jsou specifická vazebná místa (obvykle specifické aminokyselinové sekvence), dobře přístupná adhezním receptorům buněk, z nichž byly zatím nejdokonaleji popsány integriny. V této souvislosti je nutno podotknout, že smáčivost materiálu musí být přiměřená. Příliš vysoká smáčivost povrchu materiálu, spojená navíc s jeho mobilitou, znemožňuje adsorpci proteinů, či alespoň jsou proteiny adsorbovány slabě a nestabilně. Buňky potom buď vůbec nejsou schopny k materiálu adherovat, nebo jsou uchyceny slabě, adherují malou plochou a jsou náchylné ke spontánnímu odtržení od materiálu (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2007a, 2011a, Bačáková *et Švorčík* 2008).

Ozáření plazmou se projevilo přímo i na struktuře povrchu modifikovaných materiálů, kdy došlo ke zvýšení drsnosti povrchu materiálů v řádu nanometrů. Jak bylo prokázáno metodou AFM, tato nanodrsnost povrchu modifikovaných vzorků byla v přímé pozitivní spojitosti s přítomností skupin obsahujících kyslík a smáčivostí povrchu. Lze říci, že nanodrsnost navozuje (synergisticky se smáčivostí) adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi buněk ve výhodné geometrické konformaci a zlepšuje tak adhezi buněk (Webster *et al.* 2000, Price *et al.* 2004; pro přehled viz Bačáková *et al.* 2011a). Nerovnosti na povrchu PE měly obvykle podobu lamelárních struktur, které vznikly v oblastech přechodu mezi krystalickými a amorfními fázemi na povrchu polyetylénu (Švorčík *et al.* 2006b).

Radikály vzniklé po rozštěpení polymerních řetězců vlivem ozáření reagují i vzájemně mezi sebou, což vede ke vzniku konjugovaných dvojných vazeb v uhlíkových řetězcích

polymeru. Povrchová vrstva polymeru se totiž stává elektricky vodivou, což se projevuje výrazným poklesem jejího elektrického odporu o několik řádů (Bačáková *et al.* 1996, 2001, pro přehled viz Bačáková *et Švorčík* 2008, Bačáková *et al.* 2011a,b). I tato skutečnost se mohla podílet na zlepšené adhezi a růstu buněk na polyetylenu ozářeném plasmatem – bylo např. prokázáno, že elektroaktivní materiály zvyšují buněčnou kolonizaci, a to i bez aktivní elektrické stimulace komplexu buňka-materiál. Vysvětlením je opět zlepšení adsorpce proteinů zprostředkujících adhezi buněk či metabolických parametrů buněk, jako je mitochondriální aktivita, proteosyntéza a zejména přenos signálu iontovými kanály (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2011b).

Délka ozáření polyetylenu v našich pokusech činila 50-400 sekund, přičemž pozitivní změny povrchu materiálu se nejvíce projevily v kratších časových intervalech ozáření. Při delším intervalu ozáření již hrozil zvýšený výskyt volných radikálů, jejichž přítomnost má negativní vliv na kultivované buňky. Při déletrvajícím expozici je také zvýšené riziko druhotného odštěpení již vzniklých kyslíkových skupin, a polymer tak v důsledku toho opět sníží svou smáčivost (Pařízek *et al.* 2009, Švorčík *et al.* 2009, Kasálková *et al.* 2007, 2010).

Dalším zajímavým výsledkem našich studií bylo, že na modifikaci plasmatem výrazněji reagoval HDPE než LDPE, což se projevilo výraznějším zvýšením jeho smáčivosti a povrchové drsnosti řádově v nanometrech, a v důsledku toho i výraznějším zvýšením buněčné kolonizace. Jinými slovy, rozdíl v počtu buněk na HDPE před ozářením a po ozáření byly lépe patrné než na LDPE, neboť LDPE již před modifikacemi umožňoval adhezi relativně vysokého počtu buněk (Švorčík *et al.* 2006b , Kasálková *et al.* 2007). Jedním z vysvětlení zvýšené citlivosti HDPE k ozáření plasmatem by mohla být rozdílná struktura obou typů polyetylenu. Molekuly LDPE jsou rozvětvenější než molekuly HDPE, jsou méně krystalické a jsou méně přiléhavě uspořádány, v důsledku čehož jsou k sobě vázány nižšími intermolekulárními silami a materiál vykazuje nižší pevnost v tahu. Na druhé straně je však LDPE pružnější a má vyšší schopnost návratnosti do původního stavu po deformaci (Malpass 2010). Kvůli vyšší citlivosti k modifikaci plasmatem byl k návazným modifikacím a studiím chování buněk proto nadále používán HDPE.

Dalším stupněm modifikace materiálu, který navazoval na ozáření plasmatem, bylo roubování biomolekul a nanočástic, konkrétně glycinu, polyetylén glykolu, albuminu, koloidních částic uhlíku samotných či v kombinaci s albuminem a nanočástic zlata (Pařízek *et al.* 2009, Švorčík *et al.* 2009, Kasálková *et al.* 2007, 2010). Na uchycení těchto látek na

povrchu polymeru se podílely jednak radikály, jednak i další reaktivní místa materiálu, jako jsou kyslíkové skupiny a dvojně vazby.

Roubování HDPE molekulami Gly a PEG ještě více snížilo kontaktní úhel a zvýšilo smáčivost povrchu polymeru oproti povrchu ozářeného pouze plasmou. Lze to vysvětlit především dalším zvýšením koncentrace kyslíku v povrchové vrstvě polymeru po roubování uvedených molekul. Na druhé straně po roubování molekulami BSA, částicemi C a BSA+C hodnota kontaktního úhlu vzrostla (tj. smáčivost klesla) oproti hodnotám naměřeným na vzorcích modifikovaných pouze plasmatem. Ovšem tato smáčivost zůstávala stále vyšší než na nemodifikovaném HDPE. Rovněž modifikace nanočásticemi Au měla příznivý vliv na snížení hodnot kontaktního úhlu (tj. zvýšení smáčivosti) oproti materiálu nemodifikovanému. Navíc dodala materiálu nerovnosti v řádu nanometrů příznivého (tj. zaobleného) tvaru pro kolonizaci buňkami. Proto bylo možno očekávat, že modifikace biomolekulami a nanočásticemi ještě dále zkvalitní povrch polymeru po ozáření plasmatem pro kolonizaci buňkami.

Protože všechny modifikace biomolekulami, uhlíkem i zlatem byly prováděny ve vodném prostředí, a vzorky byly následně vystaveny dalšímu vlivu tohoto prostředí v buněčných kulturách, bylo nutné posoudit vliv vody na povrchovou vrstvu polyetylenu ozářeného plasmatem. Jak již bylo řečeno, povrchová vrstva polymeru podléhá po ozáření degradaci na nízkomolekulární fragmenty – jinými slovy, dochází k tzv. ablaci povrchové vrstvy polymeru. Ve vodném prostředí pak dále dochází k tzv. odleptání zmíněných nízkomolekulárních fragmentů. Kyslíkové funkční skupiny původně umístěné na povrchu materiálu jsou tak z velké části smyty. Ovšem na povrch materiálu se dostává kyslík, původně deponovaný pod povrchem materiálu (maximální koncentrace v hloubce 20 nm), a dochází tak k vytvoření nových povrchově orientovaných polárních skupin, generujících smáčivost polymeru. Přítomnost vody měla vliv i na změny v morfologii povrchu. Drsnost povrchu byla vlivem rozpuštění nízkomolekulárních fragmentů poněkud snížena, nicméně následné roubování molekulami Gly, PEG, BSA, BSA+C i Au drsnost povrchu opět navýšilo (Pařízek *et al.* 2009, Švorčík *et al.* 2009).

Dalším důležitým aspektem studií interakce buněk s modifikovanými polymery bylo tzv. vyžrávání těchto vzorků. Tyto studie byly prováděny na materiálech starších 20 dnů, kdy došlo k jejich stabilizaci, čili konečnému ustálení orientace kyslíkových skupin, biomolekul a nanočástic v povrchové vrstvě.

Jako srovnávací materiál pro vzorky HDPE jsme použili polystyren (PS), ze kterého byly vyrobeny kultivační misky. Jedná se v podstatě o ideální materiál pro kultivaci buněk, jehož kontaktní úhel se pohybuje v rozmezí cca 56° - 64°, tj. v rozmezí mírné, přiměřené smáčivosti



(Corning 1994-2012, internetová citace). Ze získaných výsledků vyplynulo, že modifikované vzorky HDPE byly pro adhezi a růst buněk výrazně vhodnější než polymer nemodifikovaný, a v některých případech byla kultivace buněk dokonce úspěšnější než na kontrolním PS (Pařízek *et al.* 2009). Na nemodifikovaném polyetylénu nebyla zjištěna žádná přítomnost kyslíku či dvojných vazeb, a pokusy o jeho modifikaci roubováním výše zmíněných molekul a nanočástic se ukázaly jako neúspěšné. Jeho povrch tedy reagoval jako bioinertní, což byl hlavní faktor limitující adhezi a růst buněk. V souladu s tímto nálezy adherovaly buňky na nemodifikovaný HDPE v nízkém počtu a zůstávaly převážně kulovité, tj. neschopné rozprostření. Nedostatečnou adhezi k materiálu kompenzovaly adhezí mezibuněčnou, což vedlo k vytváření aglomerátů buněk a nerovnoměrnému osídlení povrchu polymeru, které bylo ostrůvkovitého charakteru.

Naproti tomu na všech vzorcích modifikovaných ozářením plasmatem a roubováním biologicky aktivních látek adherovaly buňky rovnoměrně po celém povrchu a byly dobře rozprostřené, obvykle polygonálního tvaru. Měly dobře vyvinuté fokální adhezní plaky i  $\alpha$ - a  $\beta$ -aktinový cytoskelet. Jejich proliferace měla vzestupnou tendenci v čase a vedla k vytvoření konfluentního buněčného pokryvu vzorků. Buňky rovněž nevykazovaly známky cytotoxického poškození, jak bylo možno usuzovat z procentuálního zastoupení živých buněk, určeného při automatickém počítání buněk přístrojem Vi-CELL XR Analyser. Počty životaschopných buněk se pohybovaly mezi 73 - 97% a v průběhu pokusu se zvyšovaly. Je pravděpodobné, že na úmrtnosti buněk se nejvíce podílela trypsinizace a následná samotná procedura počítání v přístroji.

Vysoké počty buněk a velikost adhezních ploch, právě tak jako výrazně vyvinuté fokální adhezní plaky, relativně vysoké koncentrace proteinů fokálních adhezních plaků talinu, vinkulinu a paxillinu, a rovněž relativně vysoké koncentrace kontraktilních proteinů alfa-aktinu a isoform SM1a SM2 myosinu, tj. markerů diferenciace HSB ke kontraktilnímu fenotypu, byly pozorovány zejména na HDPE modifikovaném PEG nebo BSA. Tyto výsledky jsme považovali za zajímavé a nečekané, neboť z jiných studií jsou PEG a BSA známé jako neadhezivní pro buňky a byly dokonce využívány pro konstrukci povrchů zabraňujících buněčné adhezi (Bačáková *et al.* 2007a). V případě PEG byla konstrukce antiadhezivních povrchů založena na jeho vysoké hydrofilii, a pokud byl řetězec PEG na povrchu podložního materiálu ukotven jedním ze svých konců, i na vysoké mobilitě povrchu, způsobené „vláním“ řetězců ve vodném prostředí, např. kultivačního média. Vysoká hydrofilie povrchu spojená s jeho mobilitou je výraznou překážkou pro adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi buněk. Avšak je nutno mít na paměti, že antiadhezivní vlastnosti PEG jsou závislé na jeho koncentraci

na povrchu polymeru a také na délce jeho řetězců (určené molekulovou hmotností řetězců). V naší předchozí studii, která sledovala růst HSB na kopolymeru poly(DL-laktidu) a PEG, byl největší překážkou pro úspěšnou adhezi a následný růst buněk PEG v koncentraci 33-45 hmotnostních % na povrchu vzorku a o molekulové hmotnosti (m.h.) řetězce 11 000. Nižší i vyšší koncentrace (tj. 5 až 18 hm. % a 70 hm. %) a délky řetězců PEG (m.h. 5 000 a 38 000) umožňovaly adhezi, tvorbu fokálních adhezních plaků obsahujících vinkulin a následný růst buněk (Filová *et al.* 2004, Bačáková *et al.* 2007a).

Jaké je vysvětlení těchto pozoruhodných jevů? Krátké řetězce o nízkých koncentracích, tj. o relativně dlouhých vzájemných vzdálenostech, zřejmě nepokrývají dostatečně povrch materiálu, nezajišťují tak jeho vysokou dostatečnou hydrofilii a zejména mobilitu, a umožňují tak adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi buněk v prostorech mezi řetězci. Dlouhé řetězce s hustou distribucí se vzájemně propletou, ztratí mobilitu a rovněž tak umožní adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi buněk. Propletení řetězců mohlo nastat i ve studii Pařízka *et al.* (2009), neboť PEG užitý v této studii byl relativně dlouhý (m.h. 20 000). Navíc byly dlouhé řetězce PEG na polymer aktivovaný zářením zřejmě ukotveny v mnoha bodech, což dále snižovalo jejich mobilitu.

Abychom hlouběji analyzovali tuto problematiku, porovnali jsme adhezi a růst HSB na HDPE roubovaném PEG s velmi krátkými řetězci (m.h. 300) a řetězci dlouhými (m.h. 20 000) (Kasálková *et al.* 2010). Na povrchu s krátkými řetězci byl počet iniciálně adherovaných buněk i jejich další nárůst výrazně nižší než na povrchu s dlouhými řetězci. Lze předpokládat, že kratší řetězce PEG měly větší pravděpodobnost být na povrchu HDPE aktivovaného ozářením ukotveny pouze v 1 bodě, tj. jedním ze svých konců, a tím měly větší možnost mobility v tekutém prostředí kultivačního média, přičemž jejich koncentrace na povrchu polymeru mohla být vzhledem k vysokému počtu vazebných míst vzniklých ozářením relativně vysoká. Naproti tomu dlouhé řetězce PEG byly pravděpodobně ukotveny ve více bodech, což jejich mobilitu výrazně snižovalo. Pro ukotvení PEG s dlouhými řetězci ve více bodech mluví i tvorba rozvětvených hvězdicovitých formací PEG na povrchu HDPE, která však může být způsobena i procesem krystalizace PEG (Kubová *et al.* 2007, Kasálková *et al.* 2010). Nicméně, na HDPE roubovaném krátkými řetězci PEG podobné útvary nebyly pozorovány a HDPE si podržel svou původní lamelární strukturu. HDPE s krátkými řetězci PEG byl méně hydrofilní než HDPE roubovaný dlouhými řetězci PEG, a to zřejmě kvůli nižšímu obsahu kyslíku. Jelikož se však kontaktní úhel vodní kapky u obou materiálů pohyboval v rozmezí přiměřené hydrofilie (cca 55°-70°), tato okolnost nehrála zřejmě výraznější roli v rozdílech v buněčné kolonizaci obou povrchů.

BSA je protein, který neobsahuje vhodné aminokyselinové sekvence pro vazbu adhezních receptorů buněk. Avšak tento protein napomáhá adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi buněk, jako je vitronektin a fibronektin, v geometrických konformacích vhodných pro navázání adhezních receptorů buněk. Tento jev by mohl vysvětlit zvýšenou adhezi a růst HSB na HDPE roubovaném BSA i jejich diferenciaci směrem ke kontraktilnímu fenotypu. Toto příznivé chování HSB bylo dále zlepšeno roubováním povrchů s BSA koloidními částicemi uhlíku. Tento náález je v souladu s výsledky našich předchozích studií i studií jiných autorů, kdy obohacení substrátu uhlíkem různými technikami, např. po jeho ozáření ionty (Pignataro *et al.* 1997, Bačáková *et al.* 1996, 2000a,b) potažení vrstvou amorfního uhlíku (Kubová *et al.* 2007) nebo depozicí uhlíkových nanočástic, jako jsou fullereny, nanotuby či nanodiamanty (Bačáková *et al.* 2007b) mělo pozitivní vliv na adhezi a následný růst buněk v kulturách na těchto materiálech.

Roubování glycinu na povrch HDPE ozářeného plasmatem mělo rovněž pozitivní účinek na adhezi, růst a fenotypickou maturaci HSB. Tato aminokyselina je sice součástí sekvence RGD, ligandu pro integrinové adhezní receptory buněk, ale sama o sobě se přímo na tyto receptory neváže. Přítomnost kyslíkových skupin a aminoskupin však zvyšuje polaritu i kladný elektrický náboj adhezního substrátu buněk, což působí příznivě na adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi buněk, zejména na jejich žádoucí geometrickou konformaci (Heitz *et al.* 2003, Mikulíková *et al.* 2005; pro přehled viz Bačáková *et al.* 2011a).

Rovněž roubování nanočásticemi Au mělo podobně pozitivní vliv na růst buněk jako roubování biomolekulami a koloidními částicemi uhlíku v předchozích studiích. Tento výsledek lze opět vysvětlit snížením kontaktního úhlu a zvýšením smáčivosti povrchu vzorku. Navíc roubování nanočásticemi Au zaoblilo původně relativně ostrý a špičatý tvar nerovností na HDPE pouze ozářeném plasmatem, což dále podpořilo adhezi i následnou proliferační aktivitu buněk. Zajímavým nálezem byla zvýšená citlivost fibroblastů linie 3T3 k uvedeným modifikacím ve srovnání s cévními HSB, která se projevila výraznějším zlepšením adheze a růstu buněk 3T3 na modifikovaném HDPE. Bylo by totiž možno očekávat opačný výsledek, a to z toho důvodu, že buňky linií, dlouhodobě adaptované na podmínky buněčné kultury, reagují obvykle méně citlivě na změny kultivačního prostředí, včetně změn adhezního substrátu, než buňky v primokulturách či subkulturách, za jaké lze považovat HSB, které jsme v našich pokusech přímo izolovali z aorty potkana. Na druhé straně se v našich pokusech jevila schopnost adheze fibroblastů 3T3 jako nápadně nižší ve srovnání s HSB, a to i na substrátech pro adhezi vhodných, jako jsou modifikované polymery a polystyrenové misky upravené pro tkáňové kultury. Buňky 3T3 adherují výrazně menší plochou a jsou náchylnější ke

spontánnímu oddělení od substrátu, a proto jsou zřejmě náročnější k fyzikálně-chemickým vlastnostem adhezního substrátu než HSB. HSB primárně adherují větší plochou i pevněji, a proto jsou zřejmě schopny snést i méně vhodné substráty. Díky své relativně pevné adhezi a většímu rozprostření pak zřejmě proliferují i pomaleji. Je totiž známo, že růst buněk dosahuje nejvyšších hodnot při střední pevnosti jejich adheze. Pokud je tato pevnost vysoká, tj. buňky adherují velkou plochou a početnými dobře vytvořenými fokálními adhezními plaky, mají tendenci snížit svou proliferační aktivitu a nastartovat diferenciací program (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a; Bačáková *et Švorčík* 2008).

## **5.2. Polymerní sít'ky řízeně uvolňující Sirolimus pro prevenci hyperplazie cévních HSB v bypassu z autologní žíly**

Druhá část této práce byla věnována cílenému působení léčiva na HSB autologních cévních náhrad, a to v podmínkách *in vitro* (Filová *et al.* 2011) a *in vivo* ve zvířecím modelu (Skalský *et al.* 2011, 2012). Jednalo se o vývoj perivaskulárního systému s řízeným uvolňováním antiproliferační látky Sirolimus. Naším cílem bylo snížení rizika případných restenóz transplantovaných autologních cévních štěpů (například pro vytvoření aortokoronárního bypassu) za pomoci uvolňování léčiva ze speciální polymerní sít'ky umístěné periadventiciálně. Vycházeli jsme z předpokladu, že lokální uvolňování léčiv přímo do cévní stěny má pozitivní vliv na prevenci restenóz a nezpůsobuje jiné, nežádoucí reakce organismu, časté při celkovém podání léčiv (Pires *et al.* 2005). Léčivo působí přímo v konkrétním postiženém místě, účinná látka není vystavena riziku degradace při cestě organismem do místa určení (Golomb *et al.* 1996), a tudíž může být podána i v daleko nižší dávce. Pro lokální podání léčiv do cévní stěny byly už dříve využívány intravaskulární stenty. Z výsledků studií zabývajících se dlouhodobým sledováním účinků antiproliferativních léčiv podávaných formou těchto stentů (např. Paclitaxel, Sirolimus nebo Tacrolimus) jsou známy nežádoucí reakce vyplývající z mechanického i biochemického poškození cévní stěny stentem umístěným intraluminálně. Jednalo se zejména o poškození endotelu, zvýšenou agregační aktivitu krevních destiček a z toho plynoucí riziko následné trombozy, vyvolání apoptózy cévních HSB, a na druhé straně i nedostatečné snížení neointimální hyperplazie poté, co bylo léčivo kompletně ze stentu uvolněno (Suzuki *et al.* 2001). Kromě toho je zvýšeno riziko zánětu cévní stěny jako důsledek reakce na přítomnost polymerní složky stentu (která slouží jako nosič léčiva), což má rovněž negativní vliv na hojení endotelu a zvyšuje riziko následné trombózy. Samotné antiproliferační léčivo se navíc v první řadě dostává k endotelu, a může zpomalovat jeho

regeneraci. Teprve po překonání endoteliální bariéry se až druhotně dostává na své hlavní místo určení, tj. k HSB, jejichž nežádoucí proliferaci má zamezovat.

Naproti tomu z perivaskulárního stentu proniká antiproliferativní léčivo nejprve k vrstvě HSB, a lze předpokládat, že k endotelu se dostane již v zanedbatelných koncentracích. Už i samotná koncentrace Sirolimu dostatečná k potlačení proliferace HSB je relativně nízká (IC 50 = 5 ng/ml; Owen *et al.* 2010), takže ani relativně dlouhodobé uvolňování Sirolimu (4-6 týdnů), potřebné k udržení HSB v neproliferativním stavu, by nemělo bránit hojení endotelové vrstvy štěpu po jejím případném poškození během implantace štěpu a jeho následné dilataci. V naší studii provedené v podmínkách *in vivo* na králících byly venózní štěpy, implantované na arteriální pozici a opatřené periadventiciálním systémem uvolňujícím Sirolimus, nejpozději za 6 týdnů po implantaci plně endotelizovány (Skalský *et al.* 2011, 2012).

Navíc perivaskulární stent z vhodně zvoleného materiálu plní obdobnou funkci jako vnější elastická membrána cévní stěny, a slouží tak jako významná mechanická opora cévního transplantátu, zejména žilního, který je na arteriální pozici vystaven působení vyššího krevního tlaku a vyššímu mechanickému namáhání. Předchází tak nadměrnému roztažení štěpu po implantaci, která může aktivovat migraci a proliferaci HSB, a tím rozvoj intimální hyperplasie (Dobrin *et al.* 1989, Mehta *et al.* 1998).

V našich studiích jsme použili stabilní polyesterovou síťku, která má lepší předpoklady pro mechanickou podporu žilního štěpu než materiály biodegradabilní, které mohou měnit své vlastnosti a přestat tak plnit funkci mechanické podpory i v době potřebné ke zhojení štěpu. Tento materiál byl zvolen na základě výsledků předchozích publikovaných studií díky své přijatelné propustnosti, flexibilitě, biokompatibilitě, přičemž jeho přítomnost nevyvolávala zánětlivé reakce (Hinrichs *et al.* 1994, Mehta *et al.* 1998).

Síťky byly pokryty biodegradabilním kopolymerem L-laktidu a  $\epsilon$ -kaprolaktonu (tj. Purasorbem) s obsahem Sirolimu. Proces uvolňování látky z degradabilní matrice obvykle probíhá ve třech fázích: nejprve dojde k počátečnímu prudkému uvolnění látky, následuje její pozvolná difúze a nakonec proběhne řízená degradace nosiče látky (Venkatraman *et Boey* 2007). Kinetika uvolňování léčiva je závislá na fyzikálních a chemických vlastnostech léčiva, volbě polymeru nebo kopolymeru a jejich uspořádání do vrstev s léčivem nebo bez léčiva (Finkelstein *et al.* 2003).

Po dvou a čtyřech týdnech inkubace sítěk v PBS jsme pozorovali pouze malé erozní změny na povrchu. Sirolimus se tedy uvolňoval z polymerní matrice difúzí a nikoli degradací polymeru. Ze sítěk I se Sirolimus zcela uvolnil po 6 týdnech, kdežto ze sítěk II po 4 týdnech. Ze sítěk I se během prvního týdne uvolnila podstatná část léčiva, zatímco uvolňování Sirolimu

ze sítěky II bylo rovnoměrnější (tj. bez počátečního prudkého uvolnění). Tyto rozdíly v rychlosti uvolňování Sirolimu byly způsobeny odlišným způsobem potahování sítěk. Zatímco síťka I byla potažena homogenní vrstvou Purasorbu v kombinaci se Sirolimem, síťka II obsahovala nejprve vrstvu Purasorbu s dvojnásobnou koncentrací Sirolimu, než tomu bylo u sítěky I, a následně byla tato základní vrstva překryta ještě jednou vrstvou tvořenou čistým Purasorbem. Tato svrchní vrstva omezila počáteční prudké uvolnění Sirolimu, který tak postupně difundoval skrze čistý kopolymer (Filová *et al.* 2011).

Z předchozích studií je známo, že časový interval potřebný k úplnému uvolnění léčiva z polymerního nosiče se může pohybovat v rozmezí 15 až 90 dní (Venkatraman *et Boey* 2007, Hausleiter *et al.* 2005). Pires *et al.* (2005) uvádí, že z perivaskulární poly( $\epsilon$ -kaprolaktonové) (PCL) manžety se veškerý Paclitaxel nebo Rapamycin uvolnil po třech týdnech. Oproti tomu filmy vyrobené z PLGA, smíšeného s metoxypolyetylén glykolem (MePEG) a použité jako perivaskulární obal s obsahem Paclitaxelu, uvolnily tuto antiproliferační látku po třech týdnech pouze z 5 - 10% (Jackson *et al.* 2004).

Ve studiích provedených v podmínkách *in vitro* námi vyvinuté sítěky významně neovlivnily životaschopnost HSB kultivovaných v jejich přítomnosti, jak bylo zjištěno testem viability pomocí kitu LIVE/DEAD. Podle předpokladu však došlo ke snížení proliferační aktivity HSB díky uvolňovanému léčivu. Toto snížení bylo výraznější u sítěky č. 2. Působením uvolňovaného Sirolimu sice tedy došlo ke snížení počtu HSB kultury ve srovnání s kontrolní kulturou bez Sirolimu, ale fyziologické funkce těchto buněk zůstaly zachovány, tudíž lze předpokládat, že i v cévní stěně *in vivo* budou tyto klidové neproliferující HSB zastávat svou kontraktilní funkci.

V pokusu konaném v podmínkách *in vivo* v živém králičím modelu jsme testovali synergické působení sítěky z PES a Sirolimu na remodelaci stěny žilního štěpu. Jak již bylo zmíněno výše, kromě přímé dodávky antiproliferativního léčiva může perivaskulární systém bránit proliferaci HSB ještě mechanickou podporou žilní stěny (Mehta *et al.* 1998). V naší studii se synergické působení potvrdilo, neboť nejen síťka obsahující Sirolimus, ale i čistá síťka významně snížila tloušťku intimy v porovnání s kontrolnímu štěpu v intervalu 3 a 6 týdnů po implantaci. Zajímavé bylo, že mezi těmito intervaly se však již tloušťka intimy neměnila. Tento nálezný je v souladu s pozorováním, že maximální proliferační aktivity HSB i endotelu je dosaženo během prvních dvou dnů po implantaci žilního štěpu. Ve standardních podmínkách se tato proliferační aktivita vrací k fyziologickým hodnotám, tj. prakticky ustává, po 12 týdnech (Zwolak *et al.* 1987, Kalra *et Miller* 2000). Je tedy pravděpodobné, že masivní uvolnění Sirolimu první týden pokusu mělo důraznější protektivní účinek proti intimální hyperplasii než

stabilní a kontinuální uvolňování této látky v nižší koncentraci po zbytek pokusu, které má pak spíše již jen udržovací účinek (Skalský *et al.* 2011, 2012).

### **5.3. Růst kostních MG 63 buněk na kompozitních nanovláknenných membránách z PLGA kombinovaných s nanodiamanty**

V třetí části své práce jsem se věnoval možnostem využití nanovláknenných mebrán pro inženýrství kostní tkáně.

Vycházeli jsme z předpokladu, že struktura membrán složených z vláken vzniklých metodou elektrostatického zvláknění (tj. elektrospinningu) PLGA bude podobná struktuře ECM kostní tkáně, především tedy bude napodobovat kolagenní vlákna obsažená v této matrici. Další složkou nanovláknenných sítí byly nanočástice diamantu, které měly napodobovat anorganickou složku ECM kostní tkáně, jako jsou především fosfáty vápníku (hydroxyapatit, trikalciumfosfát). Zkonstruovali jsme tedy nanovláknenné membrány z čistého PLGA a z PLGA v kombinaci s nanodiamanty (cca 23 hm.%).

Výroba nanovláken je závislá na mnoha faktorech. Jedná se o typ použitého polymeru, jeho koncentrace, typ a vzájemný poměr rozpouštědel a čas jejich odpaření. Zajímavých zkušeností jsme dosáhli při nastavování optimální koncentrace polymeru. Zatímco při koncentraci 2,3 hm. % PLGA v rozpouštědle (metylenchlorid a dimethylformamid v poměru 2:3) jsme vytvářeli dlouhá jemná nanovláknna, již jen malý pokles koncentrace na 2,0 hm. % způsobil tvorbu shluků polymeru o velikosti několika  $\mu\text{m}$ , které byly spojeny krátkými tenkými vlákny.

O průměru vláken rozhoduje povrchové napětí polymeru, elektrostatické síly v procesu elektrospinningu (jedná se hlavně o napětí a vzdálenost mezi elektrodami, které musí být v přiměřeném poměru, Huang *et al.* 2001, Bish *et al.* 2011) i výsledná viskozita roztoku. Zásadní je i charakter samotné metody elektrospinningu. Zatímco v naší studii docházelo k formování nanovláken čistě pomocí elektrostatických sil v přístroji Nanospider (Elmarco, Liberec, Česká Republika), v převážné většině ostatních prací (např. Behler *et al.* 2009). Systémy na bázi zásobní stříkačky, kdy je tvorba nanovláken v elektrickém poli podpořena kontinuálním pumpováním roztoku polymeru (např. rychlostí 0,015 cm/min), a samotná vlákna se formují ve výtrysku z jehly.

V případě kompozitních polymerních nanovláken s nanočásticemi je nutno věnovat velkou pozornost přípravě suspenze nanočástic v roztoku polymeru, zejména jejímu řádnému promíchání spojenému se sonikací ultrazvukem, což omezuje shlukování nanočástic. I přes

intenzivní míchání na magnetické míchače a sonikaci vytvářely však nanodiamanty v našich nanovlákných sítích shluky, třebaže v řadě nanovláken byly i homogenně dispergovány v polymerní matici. Shluky vyčnívaly na povrch vláken, formovaly se i mezi vlákny a v některých případech byly poměrně velké vzhledem k průměru vlákna. Naproti tomu autoři [Behler et al. \(2009\)](#), kteří jako první vytvořili nanovlákná polymeru v kombinaci s nanodiamanty metodou elektrostatického zvlákňování, sice rovněž zaznamenali přítomnost shluků nanodiamantů, ale jejich průměr však nepřesahoval průměr vláken. Použili však jiné polymery, zejména polyamid nebo polyakrylonitril. Koncentrace nanodiamantů v jejich nanovlákněch činila až 80% hm. %, zatímco v naší studii to bylo pouze 23 hm.%, přičemž za optimální koncentraci nanodiamantů pro tvorbu kompozitních nanovláken na bázi polyamidu je považována 40 hm.%. Nanovlákná s nanodiamanty ve studii [Behlera et al. \(2009\)](#) byla vyvinuta pro technické účely, např. pro přípravu ochranných obalů proti UV záření. Z dostupné literatury vyplývá, že v naší studii ([Pařízek et al. 2012b](#)) byla nanovlákná s nanodiamanty poprvé na světě vyvinuta pro potenciální biomedicínské aplikace.

Co se týče vlastního růstu lidských kostních buněk MG 63, zjistili jsme, že počty iniciálně adherentních buněk, plocha jejich rozprostření a dynamika následné proliferace buněk byly prakticky shodné u obou typů nanovlákných membrán. Jelikož tato studie je první prací, ve které byl sledován růst buněk na nanovlákném nosiči vytvořeném kombinací polymeru a nanodiamantů, nemáme žádnou možnost srovnání našich nálezů s výsledky jiných autorů. Přídavek nanočástic jiného typu do polymerního nanovlákného nosiče však obvykle podpořil růst buněk na daném materiálu. Jako příklad může posloužit kompozitní nosič vytvořený z nanovláken polylaktidu (PLA) a mnohostěnných uhlíkových nanotrubiček (MWNT), na kterém byl růst lidských mesenchymálních kmenových buněk kostní dřene významně vyšší než na čistých nanovlákněch z PLA. Kompozitní vlákna z PLA a MWNT sice měla menší průměr, ale rovněž velikost prostor (pórů) mezi vlákny byla menší než u vláken z čistého PLA. Buňky rostoucí na kompozitních nanovlákněch z PLA a MWNT tak přemostňovaly pouze menší mezery a vsupovaly do častějších kontaktů s materiálem, a proto k němu adherovaly početnějšími fokálními adhezemi ([McCullen et al. 2007](#)). Podobná situace nastala i v naší studii na kompozitních nanovlákných membránách z PLGA a nanodiamantů. Prostory mezi vlákny kompozitních membrán byly menší, a buňky na těchto membránách měly početnější, nápadnější a rovnoměrněji rozmístěné fokální adhezni plaky než buňky na čistých PLGA membránách.

Rovněž je pravděpodobné, že výskyt lépe vyvinutých fokální adhezni plaků u buněk na kompozitních nanovlákných membránách s nanodiamanty byl umožněn lepšími



mechanickými vlastnostmi těchto membrán v porovnání s membránami z čistého PLGA. Mechanicky odolnější materiály jsou méně deformovány trakčními silami, které produkuje aktinový cytoskelet, a díky tomu mohou lépe stimulovat uchycení buňky k materiálu a následnou tvorbu fokálních adhezních plaků (Engler *et al.* 2004). Testy mechanické odolnosti ukázaly, že kompozitní membrány s nanodiamanty jsou odolnější vůči protržení než membrány ze samotného PLGA. Nanovlákná v kompozitních membránách byla zřejmě posílena jednak zabudováním nanodiamantů přímo do vlákna, jednak prostřednictvím shluků materiálu, které byly v kontaktu současně s více vlákny a tak mohly zvýšit soudržnost membrány. Podobně přídavek nanodiamantů zvýšil i odolnost a tvrdost matrice z polyvinyl alkoholu (PVA) (Prasad *et al.* 2009) či polylaktidu (Zhao *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2011; pro přehled viz Pařízek *et al.* 2012a).

Fokální adhezní plaky u buněk na kompozitních nanovláknenných membránách však přece jen nebyly tak velké a početné jako u buněk rostoucích na kontrolním polystyrenu. Mohutné plaky ve tvaru pruhů, typické pro buňky pěstované na klasických „dvojměrných“ dimenzionálních substrátech (polystyren, sklo) ve statických kultivačních podmínkách, jsou však některými autory považovány spíše za „artefakt buněčných kultur“. Fokální adhezní plaky tohoto typu nebývají obvykle pozorovány u buněk v podmínkách *in vivo* nebo u buněk rostoucích na trojrozměrně strukturovaných materiálech a v kulturách v dynamických systémech. Z tohoto úhlu pohledu se poměrně jemné fokální adhezní plaky u buněk na nanovláknenných substrátech jeví jako více fyziologické a blíží se přirozené podobě fokálních adhezních plaků v podmínkách *in situ*.

Velikost adhezních ploch buněk, rychlost jejich proliferace a hustota populací buněk rostoucích na obou typech nanovláknenných membrán byly významně nižší než hodnoty zjištěné u buněk rostoucích na dně kontrolních polystyrenových misek. Tento výsledek byl poněkud překvapivý, neboť nanovláknenné substráty jsou tradičně považovány takřka za optimální pro kolonizaci buňkami, a to díky své architektuře podobající se přirozené ECM. Ovšem prostory mezi nanovláknny v přirozené ECM obvykle bývají vyplněny amorfni složkou ECM (v případě kostní tkáně i anorganickou složkou krystalickou), a buňky v tomto systému, který je navíc plně trojrozměrný, vstupují prakticky celou svou membránou do kontaktu s ECM. V našem systému byl kvůli přítomnosti mezer mezi vlákny i kvůli relativně tenkému průměru vláken (řádově desítky a stovky nanometrů) kontakt buněk s materiálem, který je nutný pro úspěšnou kolonizaci materiálu buňkami, omezen. Podobně ve studii zaměřené na růst fibroblastů linie NIH 3T3 na tkanině z PLGA byly plochy rozprostření buněk na této tkanině o průměru vláken 140 a 740 nm významně menší než na kontinuálním filmu PLGA. Hodnoty naměřené na tomto

filmu byly srovnatelné pouze s hodnotami zjištěnými na vláknech o průměru 3600 nm (Kumbar *et al.* 2008; pro přehled viz Pařízek *et al.* 2012a).

Mírně znepokojivým výsledkem bylo, že životaschopnost buněk rostoucích na obou typech nanovláknenných membrán byla poněkud nižší než na kontrolním polystyrenu. Vysvětlení tohoto jevu by mohlo být podobné jako u nižší schopnosti adheze a růstu buněk na těchto membránách, a sice menší kontakt buňka-materiál. U buněk závislých na ukotvení (tzv. anchorage-dependent cells) je stupeň adheze k podložce rozhodující pro jejich další životaschopnost, růst a funkci (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2011a). Avšak je nutno mít na paměti i použití poměrně toxických rozpouštědel PLGA při přípravě nanovláknenných sítí, která mohla být zadržena v materiálu a v podmínkách buněčné kultury z něj uvolňována. Podobně nelze vyloučit ani určitý negativní vliv nanodiamantů, ačkoliv jsou tyto nanočástice všeobecně uznávány za prakticky netoxické, neimunogenní a nemutagenní (Mitura *et al.* 2006, Schrand *et al.* 2007, Amaral *et al.* 2008; pro přehled viz Bačáková *et al.* 2008). Je však známo, že nanodiamanty často obsahují nežádoucí příměsi, jako je grafit či dokonce iridium (pro přehled viz Grausová *et al.* 2011, Pařízek *et al.* 2012a). Navíc nanodiamanty mohly být i uvolněny z nanovláknenného nosiče a mohly proniknout do buněk. Nedávno bylo popsáno poškození DNA u myších embryonálních kmenových buněk nanodiamanty v suspenzi v kultivačním médiu, ačkoliv toto poškození bylo méně závažné než v případě MWNT (Xing *et al.* 2011). Poškození buněk nanodiamanty bylo vysvětlováno jednak produkcí kyslíkových radikálů nanodiamanty, ale i adsorpcí relativně velkého množství sodných iontů na nanodiamanty a jejich dodávkou do buněk (Zhu *et al.* 2012). Na druhé straně bylo poškození buněk nanodiamanty pozorováno v médiu bez séra, zatímco médium se sérem, ve kterém byly provedeny i naše studie, mělo proti tomuto poškození protektivní účinek (Zhu *et al.* 2012).

Nicméně procento životaschopných buněk bylo i přes popsaná rizika na obou typech nanovláknenných membrán poměrně vysoké, a sice 92 až 97%. Tyto hodnoty stále ještě odrážejí fyziologický úbytek buněk v normálních buněčných populacích. Například při studiu pohlavních rozdílů v adhezi a růstu HSB z aorty samců a samic potkana bylo zjištěno, že úbytek buněk, způsobený spontánním odlučováním buněk od polystyrénových misek a jejich následnou smrtí, se pohybuje přibližně mezi 3 až 22% (Bačáková *et al.* 1997).

Důležitým poznatkem této studie bylo, že nanovláknenné nosiče nezpůsobují významnou prozánětlivou aktivaci buněk. Koncentrace faktoru TNF- $\alpha$ , měřená v kultivačním médiu lidských kostních buněk MG 63 rostoucích na kompozitních nosičích s nanodiamanty, byla sice vyšší než u buněk na nosičích z čistého PLGA, je však nutno si uvědomit, že v obou případech byla koncentrace velmi nízká a zcela na hranici detekce kitem pro měření lidského TNF- $\alpha$

(Human TNF- $\alpha$  Quantikine ELISA kit; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Dokonce i po intenzivní stimulaci buněk MG 63 bakteriálním lipopolysacharidem (LPS) zůstala koncentrace faktoru TNF- $\alpha$  v médiu pod hranicí detekce, což ukazuje na velmi nízkou citlivost buněk MG 63 k imunitní aktivaci. Proto jsme ke studiu imunitní aktivace použili linii myších makrofágů RAW 264.7, která byla ke stimulaci LPS i umělým materiálem již citlivější. Koncentrace faktoru TNF- $\alpha$  v kultivačním médiu buněk RAW 264.7 rostoucích na nosičích s nanodiamanty (~26 pg/100 000 buněk, což odpovídá ~237 pg/ml média) byla obdobná jako v médiu buněk rostoucích na nosičích z čistého PLGA, a byla dokonce nižší než v médiu buněk kultivovaných na nosičích z PLGA obohacených nanočásticemi hydroxyapatitu (HAp) ve srovnatelné koncentraci jako u nanodiamantů (~23 hm.%). Koncentrace TNF- $\alpha$  produkované makrofágy RAW 264.7 na námi testovaných materiálech lze však celkově považovat za poměrně nízké a souhlasit s tvrzením autorů [Dimitrievska et al.](#) (2008), že HAp je materiál s nízkým zánětlivým potenciálem. Pro srovnání lze uvést, že po stimulaci buněk RAW 264.7 částicemi hydrogelu (0,03-3 obj.% v kultivačním médiu) byla koncentrace faktoru TNF- $\alpha$  kolem 1000 pg/ml, a po stimulaci 0,1  $\mu$ m/ml LPS po dobu 24 hodin se zvýšila dokonce na více než 15 000 pg/ml ([Yim et al.](#) 2009).

Koncentrace ICAM-1 v homogenátu připraveného z buněk MG 63 nebo RAW 264.7 rostoucích na nanovlákných membránách s nanodiamanty či HAp byla podobná jako u buněk na membránách z čistého PLGA a kontrolním polystyrenu. Srovnatelných výsledků jsme dosáhli i v našich předchozích studiích, kde jsme sledovali chování buněk MG 63 v kulturách na vrstvách nanokrystalického diamantu čistého i dopovaného bórem ([Grausová et al.](#) 2009, 2011).

Na základě výše zmíněných výsledků jsme tedy došli k závěru, že riziko cytotoxického poškození i imunitní aktivace buněk rostoucích na nanovlákných nosičích z PLGA obohaceného nanodiamanty je nízké, a tyto nosiče lze považovat za perspektivní pro inženýrství kostní tkáně.

## 6. Závěr a další výhledy

Cévní hladké svalové buňky hrají významnou roli ve stavbě a fyziologických funkcích cévní stěny. Proto jsou i nezbytným buněčným typem při testování nových biomateriálů pro potenciální cévní náhrady a pro moderní tkáňové inženýrství cévní stěny. Jejich schopnost adheze, proliferace a fenotypické maturace citlivě reaguje na fyzikální a chemické vlastnosti kultivačního substrátu, a proto jsou tyto buňky vhodným modelem pro vytvoření vhodného biomateriálu, využitelného následně i v klinické praxi. Vedle buněk endotelových by se i hladké svalové buňky měly stát důležitou a nepostradatelnou součástí plnohodnotných bioarteficiálních cévních náhrad. Vytvoření těchto náhrad představuje komplexní problém, k jehož řešení přispěje i pochopení mechanismu vztahu buňka – umělý materiál, jehož problematika byla detailně rozebrána ve studiích věnovaných růstu hladkých svalových buněk na modifikovaném polyetylénu.

Cévní náhrady nové generace nelze již chápat pouze jako umělé, rigidní a bioinertní „trubice“, které jsou víceméně pasivně tolerovány organismem, ale jejich základem by měl být biomimetický umělý materiál, aktivně ovlivňující adhezi, růst a fenotypické vyžívání cévních buněk, a následně i podporující dokonalé dlouhodobé vhojení náhrady do organismu pacienta. Za tímto účelem je nutné zkoumat fyzikálně chemické, ale i biologické modifikace materiálů užívaných ke konstrukci cévních protéz, o což jsme se pokusili v první části mé disertační práce, kdy jsme prováděli modifikaci povrchu modelového materiálu polyetylénu plasmatem argonu a následně roubovali bioaktivní molekuly (Gly, PEG, BSA) a nanočástice C a Au. Z výsledků jasně vyplývá, že tyto modifikace byly z hlediska adheze, následného růstu i fenotypické maturace HSB úspěšné a dají se v budoucnu využít i u materiálů, ze kterých se v současné době vyrábí klinicky užívané cévní protézy. Potvrdili jsme tedy hypotézu, že změna fyzikálně chemických vlastností povrchu polymerů vlivem specifických modifikací má pozitivní vliv pro zvýšení jejich atraktivity pro osídlení cévními hladkými svalovými buňkami. Tato problematika však vyžaduje další soustavné bádání v této oblasti.

V druhé části této práce jsme se zabývali vývojem perivaskulárního systému pro cílenou dodávku antiproliferačního léčiva Sirolimu. Námi vytvořený perivaskulární systém je určen k ovinutí kolem žilního štěpu pro implantaci do arteriální pozice, jako je např. aortokoronární bypass. Systém se skládá z polyesterové sítěky, která zajišťuje jeho mechanickou stabilitu, dále z kopolymeru kyseliny L-mléčné a  $\epsilon$ -kapolaktonu a z antiproliferační látky Sirolimus. Vytvořili jsme dva typy sítěk s odlišnou koncentrací Sirolimu. V obou případech sítěky snížily v

kultuře *in vitro* proliferaci hladkých svalových buněk. Tyto pozitivní výsledky byly dále ověřeny i v následujících pokusech *in vivo* na zvířecím modelu (králík), kde významně omezily proliferaci HSB v implantovaném venosním stentu, což potvrdilo naši prvotní hypotézu. Uvedený perivaskulární systém s řízeným uvolňováním Sirolimu je velmi perspektivní v prevenci vzniku intimální hyperplázie a následné stenózy štěpu.

V poslední studii jsme sledovali biokompatibilitu metodou elektrospiningu zkonstruované kompozitní nanovlákněné membrány z PLGA a nanodiamantů. V tomto případě nedošlo k úplnému potvrzení naší počáteční hypotézy, neboť iniciální adheze i následný růst lidských kostních buněk linie MG 63 byly na obou typech membrán podobné a nevykazovaly statisticky významné rozdíly. Ovšem kompozitní membrány s nanodiamanty měly dle našeho předpokladu lepší mechanické vlastnosti, což se příznivě projevilo i na morfologii buněk MG 63. Oba typy membrán nevykazovaly významné známky cytotoxicity a imunogenicity. Na základě těchto výsledků můžeme říci, že se jedná o slibný materiál s využitím v inženýrství kostní tkáně.

## 7. Souhrn

Tato práce se zabývá interakcí buněk s modifikovanými i nově vytvářenými materiály pro inženýrství cévní a kostní tkáně a cílenou dodávku léčiv do implantátů.

V první části práce jsme ozářili povrch polyetylenových fólií plasmatem Ar a následně je roubovali bioaktivními molekulami (glycin, polyetylen glykol, albumin) a nanočásticemi C či Au. Tyto modifikace vhodným způsobem upravily fyzikální a chemické vlastnosti materiálu a podpořily adhezi a růst cévních hladkých svalových buněk (HSB) i jejich fenotypickou maturaci směrem ke kontraktilnímu fenotypu. Tyto modifikace lze v budoucnu využít i u materiálů, ze kterých se v současné době vyrábějí cévní protézy, a to za účelem zvýšení jejich biokompatibility.

V druhé části práce jsme se zabývali vývojem nového perivaskulárního systému pro cílenou dodávku antiproliferačního léčiva Sirolimu, a jeho testováním *in vitro* a *in vivo*. Tento perivaskulární systém je určen k ovinutí kolem žilního štěpu, implantovaného do arteriální pozice, jako je tomu např. u aortokoronárního bypassu. Skládá z polyesterové sítě, která zajišťuje mechanickou stabilitu systému i žilní stěny, dále z kopolymeru kyseliny L-mléčné a  $\epsilon$ -kapolaktonu, který je nosičem antiproliferačního léčiva, a ze samotné antiproliferační látky Sirolimus. Vytvořili jsme dva typy sítěk s odlišnou koncentrací Sirolimu. V obou případech vzorky snížily v kultuře proliferaci HSB. Tyto pozitivní výsledky byly dále ověřeny i

v následujících pokusech *in vivo* na králících, kdy síťky významně omezily proliferaci HSB v implantovaném venosním bypassu. Náš nově vyvinutý perivaskulární systém s řízeným uvolňováním je velmi perspektivní v prevenci vzniku intimální hyperplázie a následné stenózy štěpu.

V části poslední, věnované inženýrství kostní tkáně, jsme metodou elektrostatického zvláknování vytvořili nanovláknenné membrány z kopolymeru L-laktidu a glykolidu (PLGA). Některé membrány byly obohaceny nanodiamanty. Oba typy membrán podpořily iniciální adhezi i následný růst lidských kostních buněk MG 63 v kulturách. Kompozitní nanovláknenné membrány s nanodiamanty vykázaly lepší mechanické vlastnosti a nebyly na nich zaznamenány významné projevy cytotoxického poškození či imunitní aktivace buněk. Tento nový materiál se tedy jeví jako slibný pro využití v oblasti inženýrství kostní tkáně.

## Summary

This work deals with the interaction of cells with surface-modified existing or newly created materials developed for vascular and bone tissue engineering, and also for controlled drug delivery into implants.

In the first part of this work, we modified the surface of the polyethylene foil by Ar plasma, and then we grafted them with bioactive molecules (glycine, polyethylene glycol, albumin) and with C or Au nanoparticles. These modifications improved the chemical and physical characteristics of the material for the adhesion and growth of vascular smooth muscle cells (VSMC), and also for their phenotypic maturation towards the contractile phenotype. In future, these modifications can be also used for material currently used for fabrication of vascular prostheses in order to increase their biocompatibility.

The aim of the second part of this work was to develop a perivascular Sirolimus-delivery system that would release the antiproliferative drug Sirolimus under the conditions *in vitro* and *in vivo*. This perivascular system is designed to be wrapped around a venous graft, implanted to the arterial position, such as in the case of the aortocoronary bypass. The system comprises a polyester mesh, which ensures the mechanical stability of the system and of the venous wall, and of a copolymer of L-lactide and  $\epsilon$ -caprolactone (Purasorb), serving as a carrier for the antiproliferative drug Sirolimus. We prepared two types of meshes with different concentrations of Sirolimus. Both types of meshes inhibited the proliferation of rat vascular smooth muscle cells during 14-day culture period and preserved excellent cell viability. These

positive results were confirmed in experiments *in vivo* performed on rabbits, where the meshes inhibited the proliferation of VSMC in an implanted venous bypass. The newly developed Sirolimus-releasing perivascular meshes are promising devices for preventing the intimal hyperplasia and autologous graft restenosis.

In the last part of this work, focused on bone tissue engineering, we prepared composite nanofibrous membranes containing a copolymer of L-lactide and glycolide (PLGA) and diamond nanoparticles (ND) by an electrospinning technique. Both types of membranes enabled the attachment, spreading and subsequent proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells *in vitro*. The PLGA-ND membranes showed a higher mechanical resistance than pure PLGA meshes and did not show considerable symptoms of cytotoxic injury or inflammatory activation of the cells. Thus, this novel material has an interesting potential for its application in bone tissue engineering.

## 8. Literatura

1. Amaral M, Dias AG, Gomes PS, Lopes MA, Silva RF, Santos JD, Fernandes MH: Nanocrystalline diamond: in vitro biocompatibility assessment by MG 63 and human bone marrow cells cultures. *J Biomed Mater Res A* 87: 91-99, 2008
2. Bačáková–Řeřábková L: Význam kultivace hladkých svalových buněk pro poznání fyziologie a patofyziologie cévní stěny. *Československá fyziologie* 39: 412-427, 1990
3. Bačáková L, Švorčík V, Rybka V, Míček I, Hnatowicz V, Lisá V, Kocourek F: Adhesion and proliferation of cultured human vascular smooth muscle cells on polystyrene implanted with  $N^+$ ,  $F^+$  and  $Ar^+$  ions. *Biomaterials* 17: 1121-1126, 1996
4. Bačáková L, Mareš V, Lisá V, Bottone MG, Pellicciari C, Kocourek F. Sex-related differences in the migration and proliferation of rat aortic smooth muscle cells in short and long term culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 33: 410–413, 1997
5. Bačáková L, Mareš V, Bottone MG, Pellicciari C, Lisá V, Švorčík V: Fluorine ion-implanted polystyrene improves growth and viability of vascular smooth muscle cells in culture. *J Biomed Mater Res* 49: 369-379, 2000a.
6. Bačáková L, Mareš V, Lisá V, Švorčík V: Molecular mechanisms of improved adhesion and growth of an endothelial cell line cultured on polystyrene implanted with fluorine ions. *Biomaterials* 21: 1173-1179, 2000b
7. Bačáková L, Walachová K, Švorčík V, Hnatowicz V: Adhesion and proliferation of rat vascular smooth muscle cells on polyethylene implanted with  $O^+$  and  $C^+$  ions. *J Biomater Sci - Polym Ed* 12: 817-834, 2001
8. Bačáková L, Lisá V, Kubínová L, Wilhelm J, Novotná J, Eckhart A, Herget J: Ultraviolet light-irradiated collagen III modulates expression of cytoskeletal and surface adhesion molecules in rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Virchows Arch* 440: 50-62, 2002
9. Bačáková L, Filová E, Rypáček F, Švorčík V, Starý V: Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res* 53: S35-S45, 2004
10. Bačáková L, Filová E, Kubies D, Machová L, Proks V, Malinová V, Lisá V, Rypáček F: Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on bioactive RGD peptide-carrying polylactides. *J Mater Sci Mater Med* 18: 1317-23, 2007a
11. Bačáková L, Grausová L, Vacík J, Fraczek A, Blazewicz S, Kromka A, Vaněček M, Švorčík V: Improved adhesion and growth of human osteoblast-like MG 63 cells on biomaterials modified with carbon nanoparticles. *Diam Relat Mater* 16: 2133-2140, 2007b



12. Bačáková L, Grausová L, Vandrovcová M, Vacík J, Frazcek A, Blazewicz S, Kromka, A, Vaněček M, Nesládek M, Švorčík V, Kopeček M: Carbon nanoparticles as substrates for cell adhesion and growth. In: *Nanoparticles: New Research* (Simone Luca Lombardi, Ed), Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, New York, USA 2008, pp 39-107
13. Bačáková L, Švorčík V: Cell colonization control by physical and chemical modification of materials. In: *Cell Growth Processes: New Research*. (D KIMURA, Ed), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, USA, 2008, pp 5-56
14. Bačáková L, Filová E, Pařízek M, Ruml T, Švorčík V: Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv* 29: 739-767, 2011a
15. Bačáková L, Grausová L, Vacík J, Kromka A, Biederman H, Choukourov A, Starý V: Nanocomposite and nanostructured carbon-based films as growth substrates for bone cells. In: *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites*. (Boreddy Reddy, Ed), Intech, Open Access Publisher, pp 399-435, 2011b
16. Bandiera A, Taglienti A, Micali F, Pani B, Tamaro M, Crescenzi V, Manzini G: Expression and characterization of human-elastin-repeat-based temperature-responsive protein polymers for biotechnological purposes. *Biotechnol Appl Biochem* 42: 247-256, 2005
17. Barnes JL, Torres ES, Mitchell RJ, Peters JH: Expression of alternatively spliced fibronectin variants during remodeling in proliferative glomerulonephritis. *Am J Pathol* 147: 1361-1371, 1995
18. Behler KD, Stravato A, Mochalin V, Korneva G, Yushin G, Gogotsi Y: Nanodiamond-polymer composite fibers and coatings. *ACS Nano* 2009 3: 363-369, 2009
19. Bettinger CJ, Bruggeman JP, Misra A, Borenstein JT, Langer R: Biocompatibility of biodegradable semiconducting melanin films for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 30: 3050-3057, 2009
20. Bish GS, Canton G, Mirsepassi A, Kulinsky L, Oh S, Dunn-Rankin D, Madou MJ: Controlled continuous patterning of polymeric nanofibers on three-dimensional substrates using low voltage near-field electrospinning. *Nano Lett* 11: 1831-1837, 2011
21. Brynda E, Pacherník J, Houska M, Pientka Z, Dvořák P: Surface immobilized protein multilayers for cell seeding. *Langmuir* 21: 7877-7883, 2005
22. Caldwell RA, Woodell JE, Ho SP, Shalaby SW, Boland T, Langan EM, LaBerge M: In vitro evaluation of phosphonylated low-density polyethylene for vascular applications. *J Biomed Mater Res* 62: 514-524, 2002

23. Corning: [http://www.corning.com/lifesciences/us\\_canada/en/technical\\_resources/surfaces/culture/corning\\_cellbind\\_polystyrene.aspx/](http://www.corning.com/lifesciences/us_canada/en/technical_resources/surfaces/culture/corning_cellbind_polystyrene.aspx/) (accessed date)
24. Davenas J, Thévenard P: Models of the hydrogen release from polymers under ion beam irradiation. *Nucl Instr Meth* 208: 170-175, 2003
25. Dimitrievska S, Petit A, Ajji A, Bureau MN, Yahia L: Biocompatibility of novel polymer-apatite nanocomposite fibers. *J Biomed Mater Res A* 84:44–53, 2008
26. Dobrin PB, Littoy FN, Endean ED: Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery* 105: 393–400, 1989
27. Dufourcq P, Couffignal T, Alzieu P, Daret D, Moreau C, Duplâa C, Bonnet J: Vitronectin is up-regulated after vascular injury and vitronectin blockade prevents neointima formation. *Cardiovasc Res* 53: 952-62, 2002
28. Ducháček V.: *Polymery – výroba, vlastnosti, zpracování, použití*, VŠCHT, Praha 2006
29. Engler A, Bačáková L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Discher D: Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J* 86: 617–628, 2004
30. Fager G, Hansson GK, Gown AM, Larson DM, Skalli O, Bondjers G: Human arterial smooth muscle cells in culture: inverse relationship between proliferation and expression of contractile proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 511-520, 1989
31. Filová, E., Bačáková, L, Lisá V, Kubies D, Machová L, Lapčíková M. Rypáček F: Adhesion and proliferation of vascular smooth muscle cells on polylactide-polyethylene oxide copolymers with different content and length of polyethylene oxide chains. *Eng Biomater* 7: 19–21, 2004
32. Filová E, Straka F, Mirejovský T, Mašín J, Bačáková L: Tissue-engineered heart valves. *Physiol Res* 58 (Suppl 2): S141-S158, 2009a
33. Filova E, Brynda E, Riedel T, Bačáková L, Chlupáč J, Lisá V, Houska M, Dyr J E: Vascular endothelial cells on two- and three-dimensional fibrin assemblies for biomaterial coatings. *J Biomed Mater Res A* 90: 55-69, 2009b
34. Filová E, Pařízek M, Olšovská J, Kameník Z, Brynda E, Riedel T, Vandrovcová M, Lisá V, Machová L, Skalský I, Szarszoi O, Suchý T, Bačáková L: Perivascular sirolimus-delivery system. *Int J Pharm* 404: 94-101, 2011
35. Finch JL, Dusso AS, Pavlopoulos T, Slatopolsky EA: Relative potencies of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 19-Nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> on inducing differentiation and markers of bone formation in MG-63 cells. *J Am Soc Nephrol* 12: 1468-1474, 2001
36. Fink D (Ed): *Fundamentals of Ion-Irradiated Polymers*. Series: Springer Series in Materials Science 63: 2004

37. Finkelstein A, McClean D, Kar S, Takizawa K, Varghese K, Baek N, Park K, Fishbein MC, Makkar R, Litvack F, Eigler NL: Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics. *Circulation* 107: 777-784, 2003
38. Fouad H, Elleithy R. High density polyethylene/graphite nano-composites for total hip joint replacements: processing and in vitro characterization. *J Mech Behav Biomed Mater* 4: 1376-1383, 2011
39. Getha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK: Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants. *Progress in Materials Science* 54: 397-425, 2009
40. Glukhova MA, Koteliansky VE. Integrins, cytoskeletal and extracellular matrix proteins in developing smooth muscle cells of human aorta. In: Schwartz SM, Mecham RP, eds. *The Vascular Smooth Muscle Cell: Molecular and Biological Responses to the Extracellular Matrix*. Academic Press Inc, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokio, Toronto, 1995, pp 37-79.
41. Gobin AS, West JL: Val-ala-pro-gly, an elastin-derived non-integrin ligand: smooth muscle cell adhesion and specificity. *J Biomed Mater Res A* 67: 255-259, 2003
42. Golomb G, Fishbein I, Banai S, Mishaly D, Moscovitz D, Gertz SD, Gazit A, Poradosu E, Levitzki A: Controlled delivery of a tyrphostin inhibits intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *Arteriosclerosis* 125: 171-182, 1996
43. Grausová L, Bačáková L, Kromka A, Vaněček M, Rezek B, Lisá V: Molecular markers of adhesion, maturation and immune activation of human osteoblast-like MG 63 cells on nanocrystalline diamond films. *Diam Relat Mater* 18: 258-263, 2009
44. Grausová L, Kromka A, Burdíková Z, Eckhardt A, Rezek B, Vacík J, Haenen K, Lisá V, Bačáková L: Enhanced growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells on boron-doped nanocrystalline diamond thin films. *PLoS One* 6(6): e20943, 2011
45. Guidoin R, Maurel S, Chakfé N, How T, Zhang Z, Therrien M, Formichi M, Gosselin C: Expanded polytetrafluoroethylene arterial prostheses in humans: chemical analysis of 79 explanted specimens. *Biomaterials* 14: 694-704, 1993
46. Hanada S, Matsumoto H, Watanabe S: Mechanical compatibility of titanium implants in hard tissues. *International Congress Series* 1284: 239-247, 2005
47. Hausleiter J, Kastrati A, Wessely R, Dibra A, Mehilli J, Schratzenstaller T, Graf I, Renke-Gluszko M, Behnisch B, Dirschinger J, Wintermantel E, Schomig A: FASTTRACK - Prevention of restenosis by a novel drug-eluting stent system with a dose-adjustable, polymerfree, on-site stent coating. *European Heart Journal* 26: 1475-1481, 2005

48. Heitz J, Švorčík V, Bačáková L, Ročková K, Ratajová E, Gumpenberger T, Bauerle D, Dvořánková B, Kahr H, Graz I, Romanin C: Cell adhesion on polytetrafluoroethylene modified by UV-irradiation in an ammonia atmosphere. *J Biomed Mater Res A* 67: 130-137, 2003
49. Hinrichs WLJ, Zweep HP, Satoh S, Feijen J, Wildevuur CRH: Supporting, microporous, elastomeric, degradable prostheses to improve the arterialization of autologous vein grafts. *Biomaterials* 15: 83–91, 1994
50. Homaeigohar SS, Shokrgozar MA, Javadpour J, Khavandi A, Sadi AY: Effect of reinforcement particle size on in vitro behavior of beta-tricalcium phosphate-reinforced high-density polyethylene: a novel orthopedic composite. *J Biomed Mater Res A* 78: 129-38, 2006
51. Huang L, Nagapudi K, Apkarian RP, Chaikof EL: Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. *J Biomater Sci Polym Ed* 12: 979–993, 2001
52. Chlupáč J, Filová E, Bačáková L: Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery. *Physiol Res* 58 (Suppl. 2): S119-S139, 2009
53. Jackson JK, Smith J, Letchford K, Babiuk KA, Lindsay M, Signore P, Hunter WL, Wang KY, Burt HM: Characterization of perivascular poly (lactic-co-glycolic acid) films containing paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* 283: 97-109, 2004
54. Jeong SI, Jun ID, Choi MJ, Nho YC, Lee YM, Shin H: Development of electroactive and elastic nanofibers that contain polyaniline and poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) for the control of cell adhesion. *Macromol Biosci.* 7/8: 627-637, 2008
55. Kakisis JD, Liapis CD, Breuer C, Sumpio BE: Links artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery. *Vasc Surg* 41: 349-354, 2005
56. Kalbáčová M, Rezek B, Barešová V, Wolf-Brandstetter C, Kromka A: Nanoscale topography of nanocrystalline diamonds promotes differentiation of osteoblasts. *Acta Biomater* 5: 3076-3085, 2009
57. Kalra M, Miller VM: Early remodeling of saphenous vein grafts: proliferation, migration, and apoptosis of adventitial and medial cells occur simultaneously with changes in graft diameter and blood flow. *J Vasc Res* 37: 576–584, 2000
58. Karnik SK, Brooke BS, Bayes-Genis A, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, Keating MT, Li DY: A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* 130: 411-423, 2003

59. Kasálková N, Kolářová K, Bačáková L, Pařízek M, Švorčík V: Cell adhesion and proliferation on modified PE. *Mater Sci Forum*: 269-272, 2007
60. Kasálková N, Makajová Z, Pařízek M, Slepíčka P, Kolářová K, Bačáková L, Hnatowicz V, Švorčík V: Cell adhesion and proliferation on plasma-treated and poly(ethylene glycol)-grafted polyethylene. *J Adhes Sci Technol* 24: 743-754, 2010
61. Kotál V, Švorčík V, Slepíčka P, Blahová O, Sutta P, Hnatowicz V: Gold coating of PET modified by argon plasma. *Plasma Proc. Polym* 4: 69-75, 2007
62. Kubišta V: *Buněčné základy životních dějů*. 1998, pp 138-140
63. Kubová O, Švorčík V, Heitz J, Moritz S, Romanin C, Matějka P, Macková A: Characterization and cytocompatibility of carbon layers prepared by photo-induced chemical vapor deposition. *Thin Solid Films* 515: 6765-6772, 2007
64. Kumbar SG, Nukavarapu SP, James R, Nair LS, Laurencin CT: Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 29: 4100–4107, 2008
65. Lewis MB, Lee EH: Chemical G-values of ion-irradiated polymers. *Nucl Instr Meth B* 69: 341-348, 1992
66. Liu X, Lim JY, Donahue HJ, Dhurjati R, Mastro AM, Vogler EA: Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. *Biomaterials* 28: 4535-4550, 2007
67. Liu Y, Wang T, Yan J, Jiagbogu N, Heideman DA, Canfield AE, Alexander MY: HGF/c-Met signalling promotes Notch3 activation and human vascular smooth muscle cell osteogenic differentiation in vitro. *Atherosclerosis* 219: 440-447, 2011
68. Loukotová J, Bačáková L, Zicha J, Kuneš J: The influence of angiotensin II on sex-dependent proliferation of aortic VSMC isolated from SHR. *Physiol Res* 47: 501-5, 1998
69. Macková A, Švorčík V, Strýhal Z, Pavlík J: RBS and AFM study of Ag and Au diffusion into PET influenced by plasma treatment. *Surf Interf Anal* 38: 335, 2006
70. Malpass DB: *Introduction to Industrial Polyethylene: Properties, Catalysts, and Processes*. John Wiley & Sons, 2010
71. Marois Y, Chakfé N, Guidoin R, Duhamel RC, Roy R, Marois M, King MW, Douville Y: An albumin-coated polyester arterial graft: in vivo assessment of biocompatibility and healing characteristics. *Biomaterials* 17: 3-14, 1996

72. McCullen SD, Stevens DR, Roberts WA, Clarke LI, Bernacki SH, Gorga RE, Lobo EG. Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine* 2: 253-263, 2007
73. Mehta D, George SJ, Jeremy JY, Izzat MB, Southgate KM, Bryan AJ, Newby AC, Angelini GD: External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat Med* 4: 235–239, 1998
74. Meretoja VV, Malin M, Seppälä JV, Närhi TO: Osteoblast response to continuous phase macroporous scaffolds under static and dynamic culture conditions. *J Biomed Mat Res A* 89: 317-325, 2009
75. Mihardja SS, Sievers RE, Lee RJ.: The effect of polypyrrole on arteriogenesis in an acute rat infarct model. *Biomaterials* 29: 4205-10, 2008
76. Mikulíková R, Moritz S, Gumpenberger T, Olbrich M, Romanin C, Bačáková L, Švorčík V, Heitz J: Cell microarrays on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 26/27: 5572-5580, 2005
77. Mitura S, Mitura K, Niedzielski P, Louda P, Danilenko V. Nanocrystalline diamond, its synthesis, properties and applications. *J AMME* 16: 9-16, 2006
78. Mokal NJ, Desai MF: Calvarial reconstruction using high-density porous polyethylene cranial hemispheres. *Indian J Plast Surg* 44: 422-431, 2011
79. Nečas O, Svoboda A, Hejtmánek M, Janisch R, Červinka M, Lenhart K, Kolář Z: *Obecná biologie*. H & H, Praha, 2000, pp 257-261 a pp 276-278
80. Ochsenhirt SE, Kokkoli E, McCarthy JB, Tirrell M: Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement. *Biomaterials* 27: 3863-3874, 2006
81. Oldinski RA, Ruckh TT, Staiger MP, Popat KC, James SP: Dynamic mechanical analysis and biomineralization of hyaluronan-polyethylene copolymers for potential use in osteochondral defect repair. *Acta Biomater* 7: 1184-1191, 2011
82. Olivier V, Hivart P, Descamps M, Hardouin P: In vitro culture of large bone substitutes in a new bioreactor: importance of the flow direction. *Biomedical Materials* 2: 174-180, 2007
83. Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, Wamhoff BR: Complex Regulation and Function of the Inflammatory Smooth Muscle Cell Phenotype in Atherosclerosis. *J Vasc Res* 47: 168-180, 2009

84. Owen SC, Li H, Sanders WG, Cheung AK, Terry CM: Correlation of tissue drug concentrations with in vivo magnetic resonance images of polymer drug depot around arteriovenous graft. *J Controll Rel* 146: 23-40, 2010
85. Pamula E, Bačáková L, Filová E, Buczynská J, Dobrzynski P, Nosková L Grausová L: The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 19: 425-435, 2008
86. Pamula E, Filová E, Bačáková L, Lisá V, Adamczyk D: Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: The influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J Biomed Mater Res A* 89A(2): 432-443, 2009
87. Pařízek M, Bačáková L, Lisá V, Kubová O, Švorčík V, Heitz J: Vascular smooth muscle cells in cultures on synthetic polymers with adhesive microdomains. *Engineering of Biomaterials (Inzynieria Biomaterialów)* 9(58-60): (7-10), 2006
88. Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Slepíčka P, Lisá V, Blažková M, Švorčík V: Improved Adhesion, Growth and Maturation of Vascular Smooth Muscle Cells on Polyethylene Grafted with Bioactive Molecules and Carbon Particles. *Int J Mol Sci* 10: 4352-4374, 2009
89. Pařízek M, Novotná K, Bačáková L: The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers. *Physiol Res* 60: 419-437, 2011
90. Pařízek M, Slepíčková N, Kasálková N, Bačáková L, Lisá V, Švindrych Z, Slepíčka P, Švorčík V: Adhesion, Growth and Maturation of Vascular Smooth Muscle Cells on Low-Density Polyethylene Grafted with Bioactive Substance. *Zasláno do Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012a
91. Pařízek M, Douglas TEL, Novotná K, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Jarošová M, Palatinus L, Tesárek P, Ryparová P, Lisá V, dos Santos AM, Bačáková L: Nanofibrous poly(lactide-co-glycolide) membranes loaded with diamond nanoparticles as promising substrates for bone tissue engineering. *Int J Nanomed* 7: 1931-1951, 2012b
92. Pignataro B, Conte E, Scandurra A, Marletta G: Improved cell adhesion to ion beam-irradiated polymer surfaces. *Biomaterials* 18, 1461-1470, 1997
93. Pires NMM, van der Hoeven BL, de Vries MR, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Hennink WE, Quax PH, Jukema JW: Local perivascular delivery of anti-restenotic agents from a drug-eluting poly( $\epsilon$ -caprolactone) stent cuff. *Biomaterials* 26, 5386-5394, 2005

94. Prasad KE, Das B, Maitra U, Ramamurty U, Rao CN: Extraordinary synergy in the mechanical properties of polymer matrix composites reinforced with 2 nanocarbons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13186–13189, 2009
95. Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ: Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J Biomed Mater Res A*. 70: 129-138, 2004
96. Qu Z, Andrukhov O, Laky M, Ulm C, Matejka M, Dard M, Rausch-Fan X: Effect of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of osteoblast cells grown on the titanium implant surface. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 111: 517-522, 2011
97. Reis J, Frias C, Canto e Castro C, Botelho ML, Marques AT, Simões JA, Capela e Silva F, Potes J: A new piezoelectric actuator induces bone formation in vivo: a preliminary study. *J Biomed Biotechnol* 2012: 613403, 2012
98. Ročková K, Švorčík V, Bačáková L, Dvořánková B, Heitz J: Biocompatibility of ion beam-modified and RGD-grafted polyethylene. *Nucl Instrum Meth B* 225: 275-279, 2004
99. Rohatgi A, Owens AW, Khera A, Ayers CR, Banks K, Das SR, Berry JD, McGuire DK, de Lemos JA: Differential associations between soluble cellular adhesion molecules and atherosclerosis in the Dallas Heart Study: a distinct role for soluble endothelial cell-selective adhesion molecule. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1684-1690, 2009
100. Roy J, Tran PK, Religa P, Kazi M, Henderson B, Lundmark K, Hedin U: Fibronectin promotes cell cycle entry in smooth muscle cells in primary culture. *Exp Cell Res* 15: 169-177, 2002
101. Sagomonyants KB, Jarman-Smith ML, Devine JN, Aronow MS, Gronowicz GA: The in vitro response of human osteoblasts to polyetheretherketone (PEEK) substrates compared to commercially pure titanium. *Biomaterials* 29: 1563-1572, 2008
102. Sharifpoor S, Labow RS, Santerre JP: Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 10: 2729-2739, 2009
103. Schrand AM, Huang H, Carlson C, Schlager JJ, Osawa E, Hussain SM, Dai L: Are diamond nanoparticles cytotoxic? *J Phys Chem* 111: 2-7, 2007
104. Skalský I, Filová E, Szárszoi O, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Čapek M, Pirk J, Bačáková L: A periadventitial sirolimus-releasing mesh decreased intimal hyperplasia in a rabbit model. *Physiol Res* 60: 585-588, 2011



105. Skalský I, Szárszoi O, Filová E, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Čapek M, Pirk J, Bačáková L: A perivascular system releasing sirolimus prevented intimal hyperplasia in a rabbit model in a medium-term study. *Int J Pharm* 427: 311-319, 2012
106. Slevin M, Krupinski J, Badimon L: Controlling the angiogenic switch in developing atherosclerotic plaques: Possible targets for therapeutic intervention. *J Angiogenes Res* 21:1-4, 2009
107. Soletti L, Hong Y, Guan J, Stankus JJ, El-Kurdi MS, Wagner WR, Vorp DA: A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Acta Biomater* 6: 110-122, 2010
108. Song Y, Wennink JW, Kamphuis MM, Vermes I, Poot AA, Feijen J, Grijpma DW: Effective seeding of smooth muscle cells into tubular poly(trimethylene carbonate) scaffolds for vascular tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 95: 440-446, 2010
109. Sun J, Wei L, Liu X, Li J, Li B, Wang G, Meng F: Influences of ionic dissolution products of dicalcium silicate coating on osteoblastic proliferation, differentiation and gene expression. *Acta Biomater* 5: 1284-1293, 2009
110. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Leon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao PS, Falotico R, Carter AJ: Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 104: 1188-1193, 2001
111. Švorčík V, Rybka V, Endršt R, Hnatowicz V, Kvítek J: Ion implantation into polyethylene. *J Electrochem Soc* 140: 549, 1993
112. Švorčík V, Kubová O, Slepíčka P, Dvořánková B, Macková A, Hnatowicz V: Structural, chemical and biological properties of carbon layers sputtered on PET. *J Mater Sci Mater Med* 17: 229, 2006a
113. Švorčík V, Kolářová K, Slepíčka P, Macková A, Novotná M, Hnatowicz V: Modification of surface properties of high and low density PE by Ar plasma discharge. *Polym Degr Stab* 91: 1219-1225, 2006b
114. Švorčík V, Kasálková N, Slepíčka P, Záruba K, Bačáková L, Pařízek M, Lisá V, Ruml T, Gbelcová H, Rimpelová S, Macková A: Cytocompatibility of Ar<sup>+</sup> plasma-treated and Au nanoparticle-grafted PE. *Nucl Instr Meth B* 267: 1904-1910, 2009
115. Vagaská B, Bačáková L, Filová E, Balík K: Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiol Res* 59: 309-322, 2010

116. Vandrovcová M, Bačáková L: Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol Res* 60: 403-417, 2011a
117. Vandrovcová M, Douglas T, Hauk D, Grössner-Schreiber B, Wiltfang J, Bačáková L, Warnke PH: Influence of collagen and chondroitin sulfate (CS) coatings on poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) on MG 63 osteoblast-like cells. *Physiol Res* 60: 797-813, 2011b
118. Venkatraman S, Boey F: Release profiles in drug-eluting stents: Issues and uncertainties *J Controll Rel* 120: 149-160, 2007
119. Wang V, Misra G, Amsden B: Immobilization of a bone and cartilage stimulating peptide to a synthetic bone graft. *J Mater Sci Mater Med* 19: 2145-2155, 2008
120. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R: Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* 51: 475-83, 2000
121. Xing Y, Xiong W, Zhu L, Osawa E, Hussin S, Dai L: DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds. *ACS Nano* 5: 2376-2384, 2011
122. Xue L, Greisler HP: Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J Vasc Surg* 37: 472-478, 2003
123. Yim ES, Zhao B, Myung D, Kourtis LC, Frank CW, Carter D, Smith RL, Goodman SB. Biocompatibility of poly(ethylene glycol)/poly(acrylic acid) interpenetrating polymer network hydrogel particles in RAW 264.7 macrophage and MG-63 osteoblast cell lines. *J Biomed Mater Res A* 91: 894–902, 2009
124. Zhang Y, Tanner KE, Gurav N, Di Silvio L: In vitro osteoblastic response to 30 vol% hydroxyapatite-polyethylene composite. *J Biomed Mater Res A* 81: 409-417, 2007
125. Zhang Q, Mochalin VN, Neitzel I, Knoke IY, Han J, Klug CA, Zhou JG, Lelkes PI, Gogotsi Y: Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering. *Biomaterials* 32: 87–94, 2011
126. Zhao Y-Q, Lau K-T, Kim J-K, Xu C-L, Zhao D-D, Li H-L: Nanodiamond/poly (lactic acid) nanocomposites: Effect of nanodiamond on structure and properties of poly (lactic acid). *Composites: Part B* 41: 646–653, 2010
127. Zhu Y, Li W, Zhang Y, Li J, Liang L, Zhang X, Chen N, Sun Y, Chen W, Tai R, Fan C, Huang Q: Excessive Sodium Ions Delivered into Cells by Nanodiamonds: Implications for Tumor Therapy. *Small* 8: 1771-1779, 2012
128. Zwolak RM, Adams MC, Clowes AW: Kinetics of vein graft hyperplasia: association with tangential stress. *J Vasc Surg* 5: 126–136, 1987

## 9. Publikační aktivita

### 9.1. Primární články v mezinárodních impaktovaných časopisech

Kasálková N, Kolářová V, Bačáková L, Pařízek M, Švorčík V: Cell adhesion and proliferation on modified PE. **Mater Sci Forum** 567-568, 269-272, 2007; **IF = 0.399**

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Slepíčka P, Lisá V, Blažková M, Švorčík V: Improved adhesion, growth and maturation of vascular smooth muscle cells on polyethylene grafted with bioactive molecules and carbon particles. **Int J Mol Sci** 10(10): 4352-4374, 2009; **IF = 2.279**

Kasálková N, Makajová Z, Pařízek M, Slepíčka P, Kolářová K, Bačáková L, Hnatowicz V, Švorčík V: Cell adhesion and proliferation on plasma-treated and poly(ethylene glycol)-grafted polyethylene. **J Adhes Sci Technol** 24(4): 743-754, 2010; **IF = 0.992**

Švorčík V, Kasálková N, Slepíčka P, Záruba K, Král V, Bačáková L, Pařízek M, Lisá V, Ruml T, Gbelcová H, Rimpelová S, Macková A: Cytocompatibility of Ar(+) plasma treated and Au nanoparticle-grafted PE. **Nucl Instr Meth Phys Res B** 267(11): 1904-1910, 2009; **IF = 1.842**

Filová E, Pařízek M, Olšovská J, Kameník Z, Brynda E, Riedel T, Vandrovcová M, Lisá V, Machová L, Skalský I, Szarszoi O, Suchý T, Bačáková L: Perivascular sirolimus-delivery system. **Int J Pharm** 404(1-2): 94-101, 2011; **IF = 3.607**

Skalský I, Filová E, Szarszoi O, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Čapek M, Pirk J, Bačáková L: A periadventitial sirolimus-releasing mesh decreased intimal hyperplasia in a rabbit model. **Physiol Res** 60(3): 585-588, 2011; **IF = 1.646**

Skalský I, Szarszoi O, Filová E, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Čapek M, Pirk J, Bačáková L: A perivascular system releasing sirolimus prevented intimal hyperplasia in a rabbit model in a medium-term study. **Int J Pharm** 427(2): 311-319, 2012; **IF = 3.607**

Pařízek M, Douglas TEL, Novotná K, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Jarošová M, Palatinus L, Tesárek P, Ryparová P, Lisá V, dos Santos AM, Báčáková L: Nanofibrous poly(lactide-co-glycolide) membranes loaded with diamond nanoparticles as promising substrates for bone tissue engineering. **Int J Nanomed** 7: 1931-1951, 2012; **IF = 4.976**

## 9.2. Přehledné články v mezinárodních impaktovaných časopisech

Pařízek M, Novotná K, Bačáková L: The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers. **Physiol Res** 60(3): 419-437, 2011; **IF = 1.646**

Báčáková L, Filová E, Pařízek M, Ruml T, Švorčík V: Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnol Adv** 29(6): 739-767, 2011; **IF = 7.600**

## 9.3. Ukazatelé publikační aktivity podle Web of Science

Results found:	10
Sum of the Times Cited <a href="#">[?]</a> :	53
Sum of Times Cited without self-citations <a href="#">[?]</a> :	39
Citing Articles <a href="#">[?]</a> :	<a href="#">37</a>
Citing Articles without self-citations <a href="#">[?]</a> :	<a href="#">31</a>
Average Citations per Item <a href="#">[?]</a> :	5.30
h-index <a href="#">[?]</a> :	5

## 9.4. Primární články v mezinárodních neimpaktovaných časopisech:

Pařízek M, Bačáková L, Lisá V, Kubová O, Švorčík V, Heitz J: Vascular smooth muscle cells in cultures on synthetic polymers with adhesive microdomains. **Engineering of Biomaterials** (Inzynieria Biomaterialów) 9(58-60): 7-10, 2006 (ISSN 1429-7248, ISBN 83-89541-51-3)

Kaczmarczyk M, Pamula E, Bačáková L, Pařízek M, Dobrzyński P: Surface modification of poly(glycolide-co-L-lactide) for bone tissue engineering. **Engineering of Biomaterials** (Inzynieria Biomaterialów) 10(62):12-17, 2007 (ISSN 1429-7248, ISBN 83-89541-51-3)

Buczyńska J, Pamula E, Blazewicz S, Bačáková L, Pařízek M, Chlupáč J, Mikolajczyk T, Bogun M, Dobrzyński P: Fibrous scaffolds for bone tissue engineering: static and dynamic *in vitro* studies with MG 63 cells. **Engineering of Biomaterials** (Inzynieria Biomaterialów) 10(65-66): 1-6, 2007 (ISSN 1429-7248, ISBN 83-89541-51-3)

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Improved adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on polyethylene modified by plasma discharge. **Engineering of Biomaterials** (Inzynieria Biomaterialów) 10(67-68): 1-4, 2007 (ISSN 1429-7248, ISBN 83-89541-51-3)

Pařízek M, Baše T, Londesborough MGS, Lisá V, Báčáková L: The adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on carboranethiol-modified gold films. **Engineering of Biomaterials** (Inzynieria Biomaterialów), 11(81-84): 117-119, 2008 (ISSN 1429-7248, ISBN 83-89541-51-3)

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Vascular smooth muscle cells in cultures on low density polyethylene modified with plasma discharge and biofunctionalization. **Engineering of Biomaterials** (Inzynieria Biomaterialów) 12 (89-91): 25-28, 2009 (ISSN 1429-7248, ISBN 83-89541-51-3)

Báčáková L, Filová E, Grausová L, Vandrovcová M, Pařízek M, Novotná K, Švorčík V, Vacík J, Rypáček F, Kromka A, Heitz J, Shard A: Micro- and nanopatterned surfaces for guided adhesion, growth and phenotypic maturation of cells. **Engineering of Biomaterials** (Inzynieria Biomaterialów) 12(89-91): 18-21, 2009 (ISSN 1429-7248, ISBN 83-89541-51-3)

Pařízek M, Douglas TEL, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Warnke PH, Bačáková L: Human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on nanofibrous PLGA membranes loaded with nanodiamonds. **Engineering of Biomaterials** (Inzynieria Biomaterialów), 13(94): 11-13, 2010 (ISSN 1429-7248, ISBN 83-89541-51-3)

## **9.5. Publikovaná abstrakta u příležitosti konferencí**

Pařízek M, Bačáková L, Lisá V, Kubová O, Švorčík V, Heitz J: Vascular smooth muscle cells in cultures on synthetic polymers patterned with adhesive microdomains. **Physiol Res** 55(4): 37, 2006

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Vascular smooth muscle cells on plasma-modified low- and high density polyethylene for potential tissue engineering. **Physiol Res** 56(3): 27, 2007

Pařízek M, Bačáková L, Lisá V, Kubová O, Švorčík V, Heitz J: Vascular smooth muscle cells in cultures on synthetic polymers with adhesive microdomains. International Symposium

on Polymeric Materials for Regenerative Medicine, 2. - 4. 4. 2007, Montreal, Kanada; abstrakt publikován v **Abstract book of PMRM 2007**, str. 85-86.

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Vascular smooth muscle cells on plasma-modified low- and high density polyethylene for potential tissue engineering. **Abstract book of the symposium Euromat 2007**, 10. - 13. 9. 2007, Norimberk, Německo; <http://www.euromat2007.fems.org>

Pařízek M, Baše T, Londesborough MGS , Bačáková L, Lisá V: The improved adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on carboranethiol-modified gold films. **Abstract book of Chemical Biophysics Symposium 2008**, 18. - 20. 4., 2008, Toronto, Kanada, str. 43

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Vascular smooth muscle cells in culture on modified high density polyethylene for tissue engineering. **PhD Student Workshop**, 2 - 4. 6. 2008, Seč, Česká republika; abstrakt ve sborníku na str. 49.

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Improved adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on modified polyethylene. Elektronický sborník konference „**The 31<sup>st</sup> Conference of the Canadian Medical and Biological Engineering Society**“, 11. - 13. 6. 2008, Montreal, Kanada.

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Improved adhesion, growth and maturation of vascular smooth muscle cells on polyethylene grafted with biomolecules. Poster na konferenci „**Euromat 2009**“, 6. - 10. 9. 2009, Glasgow, Velká Británie. Abstrakt v elektronickém sborníku konference na <http://www.euromat2009.fems.eu/>, Topic L, X-41, název v Programme na str. 67.

## **9.6. Prezentace na konferencích**

### **9.6.1. Zahraniční konference**

Pařízek M, Bačáková L, Lisá V, Kubová O, Švorčík V, Heitz J: Vascular smooth muscle cells in cultures on synthetic polymers with adhesive microdomains. Předneseno na konferenci **Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine**, 10. -12. 10. 2006, Rytro, Polsko

Pařízek M, Bačáková L, Lisá V, Kubová O, Švorčík V, Heitz J: Vascular smooth muscle cells in cultures on synthetic polymers with adhesive domains created by UV irradiation or ion implantation. Předneseno na semináři **Katedry Biomaterialów, Akademia Gorniczno-Hutniczna, Krakow, Polsko**, 16. 3. 2007

Pařízek M, Bačáková L, Lisá V, Kubová O, Švorčík V, Heitz J: Vascular smooth muscle cells in cultures on polymers with adhesive microdomains. Poster na **International Symposium on Polymeric Materiale for Regenerative Medicíně (PMRM 2007)**, 2. - 4. 4. 2007, Montreal, Kanada.

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Vascular smooth muscle cells in cultures on Polyethylene modified by plasma discharge. Oral poster na konferenci **Euromat 2007**, 10. -13. 9. 2007, Norimberk, Německo.

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Improved adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on polyethylene modified by plasma discharge. Poster, oceněn cenou poroty na konferenci **Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine**, konané 11. -13. 10. 2007, Rytro, Polsko

Pařízek M, Baše T, Londesborough MGS, Bačáková L, Lisá V: The Improved adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on carboranethiol-modified gold films. Poster na konferenci **Chemical Biophysics Symposium 2008**, 18. - 20. 4, 2008, Toronto, Kanada.

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Vascular smooth muscle cells in cultures on modified polyethylene. Poster na konferenci **The 31<sup>st</sup> Conference of the Canadian Medical and Biological Engineering Society**, 11. - 13.6, 2008, Montreal, Kanada

Pařízek M, Baše T, Londesborough M G S , Bačáková L, , Lisá V: The adhesion and growth of Vascular smooth muscle cells in cultures on carboranethiol-modified gold films. Předneseno na konferenci **Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine**, 5. - 8. 11. 2008, Rytro, Polsko

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Improved adhesion, growth and maturation of vascular smooth muscle cells on polyethylene grafted with biomolecules. Poster na konferenci **Euromat 2009**, 6. - 10. 9. 2009, Glasgow, Velká Británie

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Vascular smooth muscle cells in cultures on low density polyethylene modified with plasma discharge and biofunctionalization. Přednáška na konferenci **Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine**, 15. -18. 10. 2009, Rytro, Polsko

Pařízek M, Douglas TEL, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Warnke PH, Bačáková L: Human osteoblast- like MG63 cells in cultures on nanofibrous PLGA membranes loaded with nanodiamonds. Poster na konferenci **Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine**, 14. -17. 10. 2010, Rytro, Polsko

### 9.6.2. Tuzemské konference

Pařízek M, Bačáková L, Kubová O, Švorčík J, Heitz J: Vascular smooth muscle cells in cultures on synthetic polymers patterned with adhesive microdomains. Předneseno na **82. Fyziologických dnech** konaných v Praze ve dnech 7. - 9. února 2006

Pařízek M, Bačáková L, Kubová O, Švorčík J, Heitz J : Hladké svalové buňky cév v kulturách na syntetických polymerech s adhezivními mikrodomény. Předneseno na **Výjezdním zasedání postgraduálních studentů FgÚ AV ČR** , konaném 24. - 27. 5. 2006 v Jizbici.

Pařízek M, Bačáková L, Kubová O, Švorčík J, Heitz J: Cévní hladké svalové buňky na mikrostrukturovaných površích pro tkáňové inženýrství. Předneseno na **Konferenci Centra výzkumu chorob srdce a cév**, konané 2. 10. - 4. 10. 2006 v Harrachově.

Pařízek M, Bačáková L, Kasálková N, Švorčík V, Kolářová K: Vascular smooth muscle cells on plasma-modified low- and high density polyethylene for potential tissue engineering. Předneseno na **83. Fyziologických dnech** konaných v Brně ve dnech 6. - 8. února 2007

Pařízek M, Bačáková L: Cévní hladké svalové buňky v kulturách na modifikovaných oxycelulozových materiálech. Předneseno 12. 6. 2007 na workshopu **Oxyceluloza 2007** v Pardubicích.

Pařízek M, Bačáková L, Kasálková N, Švorčík V, Kolářová K: Růst cévních hladkých svalových buněk na polyethylenu modifikovaném plasmatickým výbojem a roubováním glycinem. Předneseno na **Konferenci Centra výzkumu chorob srdce a cév**, konané 1. 10. – 3. 10. 2007 v Harrachově

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolářová K, Lisá V, Švorčík V: Improved adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on modified polyethylene. Předneseno na **Výjezdním zasedání postgraduálních studentů FgÚ AV ČR**, konaném 15. - 18. 5. 2008 v Seči.



Pařízek M, Bačáková L, Kasálková N, Švorčík V, Kolářová K: Růst cévních hladkých svalových buněk na modifikovaném polyethyleny. Předneseno na **Konferenci Centra výzkumu chorob srdce a cév**, konané 29. 9. – 1. 10. 2008 v Harrachově

Pařízek M, Bačáková L, Kasálková N, Švorčík V, Kolářová K: Zvýšený růst hladkých svalových buněk na polyethyleny modifikovaném plasmatickým výbojem a roubováním biomolekul. Předneseno na **Konferenci Centra výzkumu chorob srdce a cév**, 19. 10. – 21. 10. 2009 v Harrachově

Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Kolařová K, Lisá V, Švorčík V: Improved adhesion, growth and maturation of vascular smooth muscle cells on polyethylene grafted with biomolecules. Poster na **Vědecké konferenci 2. LF UK**, Praha, ČR 7. - 8. 4. 2010.

Pařízek M, Douglas TEL, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Warnke PH, Bačáková L: Adhesion and Growth of human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on nanofibrous PLGA membranes loaded with nanodiamonds. Předneseno na **Výjezdním zasedání postgraduálních studentů FgÚ AV ČR**, konaném 15. - 17. 3. 2011 v Třešti.

## 10. Zahraniční stáže

**14. - 25. 3. 2007:** AGH University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biomaterials, Krakow, Poland; školitelé: Prof. Stanislaw Blazewicz, Dr. Elzbieta Pamula.

**1.1. - 15. 3. a 1. 4. - 30. 4. 2009:** Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Dept of Oral and Maxillofacial Surgery), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany. Erasmus program at Christian - Albrechts Universität zu Kiel. Školitel: Dr. Timothy Douglas, studijní pobyt v programu Erasmus.

## Přílohy

1. Kasálková N, Kolářová V, Bačáková L, Pařízek M, Švorčík V: Cell adhesion and proliferation on modified PE. **Mater Sci Forum** 567-568, 269-272, 2007; **IF = 0.399**
2. Pařízek M, Kasálková N, Bačáková L, Slepíčka P, Lisá V, Blažková M, Švorčík V: Improved adhesion, growth and maturation of vascular smooth muscle cells on polyethylene grafted with bioactive molecules and carbon particles. **Int J Mol Sci** 10(10): 4352-4374, 2009; **IF = 2.279**
3. Kasálková N, Makajová Z, Pařízek M, Slepíčka P, Kolářová K, Bačáková L, Hnatowicz V, Švorčík V: Cell adhesion and proliferation on plasma-treated and poly(ethylene glycol)-grafted polyethylene. **J Adhes Sci Technol** 24(4): 743-754, 2010; **IF = 0.992**
4. Švorčík V, Kasálková N, Slepíčka P, Záruba K, Král V, Bačáková L, Pařízek M, Lisá V, Ruml T, Gbelcová H, Rimpelová S, Macková A: Cytocompatibility of Ar(+) plasma treated and Au nanoparticle-grafted PE. **Nucl Instr Meth Phys Res B** 267(11): 1904-1910, 2009; **IF = 1.842**
5. Filová E, Pařízek M, Olšovská J, Kameník Z, Brynda E, Riedel T, Vandrovcová M, Lisá V, Machová L, Skalský I, Szarszoi O, Suchý T, Bačáková L: Perivascular sirolimus-delivery system. **Int J Pharm** 404(1-2): 94-101, 2011; **IF = 3.607**
6. Skalský I, Filová E, Szárszoi O, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Čapek M, Pirk J, Bačáková L: A periadventitial sirolimus-releasing mesh decreased intimal hyperplasia in a rabbit model. **Physiol Res** 60(3): 585-588, 2011; **IF = 1.646**
7. Skalský I, Szárszoi O, Filová E, Pařízek M, Lytvynets A, Malušková J, Lodererová A, Brynda E, Lisá V, Burdíková Z, Čapek M, Pirk J, Bačáková L: A perivascular system releasing sirolimus prevented intimal hyperplasia in a rabbit model in a medium-term study. **Int J Pharm** 427(2): 311-319, 2012; **IF = 3.607**
8. Pařízek M, Douglas TEL, Novotná K, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Jarošová M, Palatinus L, Tesárek P, Ryparová P, Lisá V, dos Santos AM, Bačáková L: Nanofibrous poly(lactide-co-glycolide) membranes loaded with diamond nanoparticles as promising substrates for bone tissue engineering. **Int J Nanomed** 7: 1931-1951, 2012; **IF = 4.976**

9. Pařízek M, Novotná K, Bačáková L: The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers. **Physiol Res** 60(3): 419-437, 2011; **IF = 1.646**
10. Bačáková L, Filová E, Pařízek M, Ruml T, Švorčík V: Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnol Adv** 29(6): 739-767, 2011; **IF = 7.600**