

Hemokompatibilita upravených polyanilinových filmů

Bc. Lada Utěkalová

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lada Utěkalová**
Osobní číslo: **T14478**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Hemokompatibilita upravených polyanilinových filmů**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými studii o biologických vlastnostech polyanilinu, možnostech jeho povrchové modifikace a charakterizace. V návaznosti na takto získané informace naplánuje a provede sérii experimentů za účelem stanovení možnosti modifikace hemokompatibility polyanilinových filmů. Takto upravené filmy následně charakterizuje z hlediska jejich povrchových a biologických vlastností. Studentka se detailně seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a s metodami syntézy, modifikace a charakterizace polyanilinových filmů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.

DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání diplomové práce:

15. ledna 2016

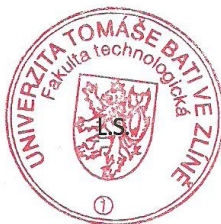
Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2016

Ve Zlíně dne 1. března 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Utěkalová Lada

Obor: Inženýrství polymerů

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 5.5. 2016

Utěkalová

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Kompatibilita různých materiálů s krví je dlouho studovaným tématem, které však dosud nebylo zcela vyřešeno. Proto stále existuje snaha vytvořit nový materiál nebo modifikovat některý v současnosti používaný materiál tak, aby měl co nejmenší vliv na krevní koagulaci a další parametry hemokompatibility. Materiálem, který byl předmětem této práce, byl polyanilin (PANI), který má díky své elektrické vodivosti široké možnosti uplatnění v medicínských aplikacích.

Pro testy vlivu materiálu na krevní koagulaci byly použity polyanilinové filmy. Zkoumanými formami byly PANI sůl (PANI-S), PANI báze (PANI-B) a polyanilin modifikovaný pomocí polyvinylpyrrolidonu (PANI-PVP), dodecylsulfátu sodného (PANI-SDS), dodecylbenzensulfonátu sodného (PANI-SDBS) nebo taurinu (PANI-T), a to přidáním látky přímo do reakční směsi (M), nebo adsorpcí látky na povrch polyanilinové soli (F) či báze (BF). Materiály byly popsány pomocí povrchové energie a elektrické vodivosti, pro popis hemokompatibility byly použity testy vlivu materiálu na vybrané parametry krevní koagulace. Dále byly provedeny testy buněčné adheze a proliferace. Účelem práce bylo zjistit, jestli je některá ze zkoumaných modifikací polyanilinu materiálem vhodným pro použití v aplikacích, ve kterých by se polyanilin dostal do kontaktu s krví.

Klíčová slova: polyanilin, polyvinylpyrrolidon, dodecylsulfát sodný, dodecylbenzensulfonát sodný, taurin, hemokompatibilita

ABSTRACT

Although hemocompatibility of different materials is a long-studied topic in biomaterial science field there is no known fully hemocompatible material to the date. Thus, the efforts to prepare a hemocompatible material or to modify an existing material to enhance its hemocompatibility still exists. The material studied in this thesis is polyaniline (PANI), which has wide spectrum of use in medical applications thanks to its conductivity.

Several different types of polyaniline films were used to determine their impact on some hemocompatibility parameters. Concretely polyaniline salt (PANI-S), polyaniline base (PANI-B) and polyaniline modified by polyvinylpyrrolidone (PANI-PVP), sodium dodecyl sulfate (PANI-SDS), sodium dodecylbenzenesulfonate (PANI-SDBS) or taurine (PANI-T) were studied. Those samples were prepared either by adding the agent into the polymerization mixture (M) or by its adsorption on the polyaniline salt (F) or polyaniline base (BF) surface. The materials were characterized by surface energy test and conductivity. The hemocompatibility of materials was evaluated by testing the impact on chosen coagulation parameters. The impact on cell adhesion and proliferation were also evaluated. The purpose of this work was to find out if any of polyaniline surface modifications is applicable for use as a blood-contacting material.

Keywords: polyaniline, polyvinylpyrrolidone, sodium dodecyl sulfate, sodium dodecylbenzenesulfonate, taurine, hemocompatibility

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za odborný dohled a rady při psaní této práce a Ing. Zdence Kucekové, Ph.D. za pomoc při laboratorní práci.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a veškerou použitou literaturu a prameny jsem řádně citovala.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická, nahraná do STAG, jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BOKOMPATIBILITA A HEMOKOMPATIBILITA	13
2 HEMOSTÁZA	15
2.1 HEMOKOAGULACE	15
2.1.1 Vnější dráha	18
2.1.2 Vnitřní dráha	18
2.1.3 Společná dráha	19
2.1.4 Regulace krevní koagulace	20
2.2 REAKCE KREVNÍCH DESTIČEK	21
2.2.1 Morfologie krevních destiček	21
2.2.2 Funkce krevních destiček	24
2.2.2.1 Adheze	25
2.2.2.2 Aktivace	25
2.2.2.3 Agregace	26
3 SRÁŽENÍ KRVE NA MATERIÁLECH	27
3.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HEMOKOMPATIBILITU MATERIÁLU	27
3.1.1 Chemické složení materiálu	28
3.1.2 Smáčivost a povrchová energie materiálu	29
3.1.3 Topografie materiálu	31
3.1.3.1 Vliv na hemokompatibilitu	31
3.1.4 Konformace proteinů	33
3.1.4.1 Smykové napětí	34
3.1.4.2 Smáčivost materiálu a koncentrace proteinů	34
3.1.4.3 Přítomnost dalších látek	35
3.2 POVRCHOVÉ MODIFIKACE ZLEPŠUJÍCÍ HEMOKOMPATIBILITU	35
3.2.1 Cíle povrchových modifikací materiálů	35
3.2.2 Používané metody	36
3.2.2.1 Polyetylenglykol	37
3.2.2.2 Amfifilní látky	37
3.2.2.3 Funkcionalizace	38
3.2.3 Problémy	39
3.3 MODIFIKACE VODIVÝCH POLYMERŮ	39
3.3.1 Příprava kompozitů	41
3.3.2 Adsorpce látek na povrch	41
3.3.3 Imobilizace heparinu	42
4 POLYANILIN	43
4.1 BOKOMPATIBILITA POLYANILINU	44
4.2 APLIKACE POLYANILINU	46
4.2.1 Aplikace polyanilinu v medicíně	46
II PRAKTICKÁ ČÁST	48
5 METODIKA	49

5.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	49
5.1.1	See system	49
5.1.2	Sysmex CA-1500	49
5.2	POUŽITÉ LÁTKY	50
5.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ	50
5.4	POVRCHOVÁ ENERGIE	52
5.5	MĚRNÁ ELEKTRICKÁ VODIVOST	52
5.6	TESTY KREVŇÍ KOAGULACE	54
5.7	TESTY BUNĚČNÉ ADHEZE	55
5.8	TESTY BUNĚČNÉ PROLIFERACE.....	55
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
6.1	STANOVENÍ POVRCHOVÉ ENERGIE	57
6.2	STANOVENÍ MĚRNÉ ELEKTRICKÉ VODIVOSTI	60
6.3	TESTY KREVŇÍ KOAGULACE	62
6.4	TESTY BUNĚČNÉ ADHEZE	64
6.5	TESTY BUNĚČNÉ PROLIFERACE.....	67
	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	75
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	86
	SEZNAM OBRÁZKŮ	88
	SEZNAM TABULEK.....	89

ÚVOD

Především v posledních desetiletích je v populaci stále častější výskyt kardiovaskulárních chorob a zejména ve vyspělých zemích jsou choroby srdce často příčinou úmrtí a nemocnosti. Kardiovaskulární choroby (především ischemická choroba srdeční) jsou hlavní příčinou úmrtí také v České republice, s hodnotami dlouhodobě se pohybujícími okolo 50 %. Podobně jsou kardiovaskulární choroby také nejčastější příčinou hospitalizace. Tyto choroby často vyžadují lékařský zásah s použitím implantátů (např. cévní náhrady). Materiálem pro jejich výrobu mohou být také polymery. Kontakt krve s povrchem cizorodého materiálu však způsobuje, kromě ostatních obranných reakcí organismu, také krevní srážení, podobně jako v případě poranění cévy, což značně omezuje použití materiálů v medicíně. Proto je snaha modifikovat materiály používané pro tyto účely tak, aby bylo dosaženo jejich hemokompatibility.

Tato práce je zaměřena na vliv polymerů na krevní srážení a metody modifikace těchto materiálů, které by mohly vést k zlepšení jejich hemokompatibility. Práce se soustřeďuje především na polyanilin, který by díky své elektrické vodivosti mohl nabízet zajímavé možnosti uplatnění v medicínských aplikacích, jako nosiče léků nebo scaffoldy pro tkáňové inženýrství. Konkrétně je studován vliv polyanilinu na krevní srážlivost, a to u čistého polyanilinu i v několika různých modifikacích. Cílem práce je zhodnotit hemokompatibilitu zkoumaných materiálů a zjistit, jestli je polyanilin nebo některá z jeho modifikací vhodným materiálem pro použití v kontaktu s krví.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOKOMPATIBILITA A HEMOKOMPATIBILITA

V dnešní době jsou jako biomateriály, tedy materiály, které jsou vhodné pro použití v kontaktu s živým organismem, používány nejen kovy a keramika, ale díky své všestrannosti a relativně jednoduchému zpracování především polymery, které nabízejí mnohem širší výběr vlastností a umožňují tedy použití ve větším počtu různých aplikací [1]. Polymery jsou v současnosti běžně používanými materiály pro výrobu implantátů a jiných zdravotnických pomůcek, které přicházejí do styku s živým organismem, případně jsou používány v kontaktu s biologickými systémy *in vitro* či *in vivo* [2]. Tyto pomůcky jsou pak často nezbytnými prostředky v péči o zdraví, a to v mnoha různých typech aplikací, od chirurgických nástrojů až po implantáty [1].

Při použití polymeru jako materiálu pro výrobu zdravotnických pomůcek je také, podobně jako u jiných materiálů, nutné dbát na jeho biokompatibilitu.

Podle nejčastěji používané definice je biokompatibilita materiálu jeho schopnost plnit svoji funkci a přitom nepoškozovat organismus a vyvolávat reakci, která je vhodná pro konkrétní aplikaci a je pro tuto aplikaci požadována. Pro různé aplikace se pak mohou požadavky různit [2]. Biomateriály se na základě svých vlastností dají rozdělovat podle různých kritérií, nejčastěji podle toho, jestli jsou inertní nebo aktivní, tedy jestli s biologickým systémem nějakým způsobem interagují, dalším častým rozdělením je potom jejich rozdělování na základě jejich stability, a to na materiály biodegradabilní, tedy ty, které se po určité době v prostředí organismu rozloží, a ty, které v organismu zůstanou beze změny [3]. Zároveň musí materiály splňovat také požadavky na mechanické vlastnosti, musí mít vhodné optické vlastnosti a umožňovat sterilizaci [2].

Materiály vykazující biokompatibilitu mohou být použity pro výrobu zdravotnických pomůcek, ať už pro použití vně (např. biosenzory, kontaktní čočky) nebo uvnitř (implantáty) těla [1]. V případech, kdy se materiál dostává do přímého kontaktu s krví (kanyly, cévní náhrady atd.), je nutné zajistit také hemokompatibilitu materiálu, tedy to, aby nedocházelo k nežádoucí reakci [4], která je způsobena kontaktem krve s povrchem materiálu. Při tom dochází k adhezi krevních bílkovin, která je často doprovázena aktivací koagulačního a imunitního systému [5].

To, co určuje hemokompatibilitu materiálu, jsou tedy především jeho povrchové vlastnosti (v závislosti na konkrétní aplikaci), které ovlivňují adhezi krevních bílkovin. Vzhledem k tomu, že s klesající adhezí bílkovin na povrch materiálu roste jeho hemokompatibilita,

upravují se materiály obvykle tak, aby se omezila adheze krevních bílkovin [6]. K tomu se používají různé metody úpravy povrchu, od změn struktury nebo morfologie až po naroubování látek na povrch materiálu, jako je třeba heparin nebo inhibitory některých enzymů koagulační kaskády [4]. Dalším ukazatelem hemokompatibility materiálu je také aktivace krevních destiček, která je např. u PET výrazně omezena například naroubováním cysteinu na povrch materiálu [6], u PUR, které je jako biomateriál nejpoužívanější, je možné kompatibilitu zvýšit naroubováním chitinu nebo chitosanu [1].

Ačkoli se povrchové vlastnosti materiálu dají za účelem zvýšení kompatibility modifikovat mnoha různými způsoby, a je tak možné upravit odpověď organismu na tento materiál, hemokompatibilita běžně používaných materiálů stále není dokonalá a kontakt krve s materiály tak stále vyvolává nežádoucí reakce organismu, včetně krevního srážení. [7].

2 HEMOSTÁZA

Hemostáza je složitý obranný mechanismus těla, který zajišťuje zachování proudění krve za fyziologických podmínek, a zároveň zabezpečuje rychlé, lokálně omezené srážení krve v případech, že dojde k poranění organismu tak, aby nedocházelo k velkým ztrátám krve [8]. Podobné jevy, které probíhají během hemostázy, se pak odehrávají také při kontaktu krve s cizorodým materiálem [9].

V neporušené cévě za normálních okolností nedochází ke srážení krve, protože buňky cévního endotelia produkují antikoagulační látky, které mu zabraňují, důležitá je také nepřítomnost záporného náboje na povrchu nepoškozené cévy a absence produkce tkáňového faktoru. Při porušení cévy naopak dochází ke kontaktu krve s tkání, která obklopuje buňky vnitřní stěny cévy, probíhá adheze krevních destiček na povrch cévního subendotelia, což vede k vytvoření hemostatické zátky, dochází k odkrytí tkáně se záporným nábojem [10] a na povrchu odhalených buněk dochází k expresi tkáňového faktoru, čímž dojde ke spuštění procesu krevní koagulace [11]. Uvolněné chemokiny navíc způsobují zvýšení koncentrace leukocytů v místě zranění, a tím podporují hojení a brání vzniku infekce [10]. Zároveň dochází také ke změně proudění krve v cévě, což přispívá ke krevnímu srážení v místě poranění [12], k uzavření poškozené cévy přispívá také zúžení cévy v místě poranění, které je rychlé a přechodné, s charakterem přímé odpovědi stěny cévy na poranění, takzvaná vazokonstrikce [13].

To znamená, že proces srážení krve je založen na vzájemných reakcích mezi povrchem poškozené cévy nebo cizorodého materiálu, krevními destičkami a koagulačními faktory, a jeho výsledkem je vytvoření krevní sraženiny v místě poranění nebo kontaktu s cizorodým materiálem [9], a to už během několika sekund. Téměř okamžitě dochází také ke stimulaci fibrinolytického systému, který omezuje množství vzniklého fibrinu a brání další aktivaci koagulační kaskády tak, aby byla zachována plynulost toku krve v krevním řečišti [10], poranění cévy a především potom přítomnost cizorodého materiálu v krvi ale může vyvolat také odpověď imunitního systému organismu, reakci komplementu [9] nebo způsobit hemolýzu červených krvinek [14].

2.1 Hemokoagulace

Samotná hemokoagulace je řetězcem enzymatických reakcí, během kterých dochází k přeměně neaktivních enzymů (koagulačních faktorů), přítomných v krevní plasmě, na

jejich aktivní formu, a to po kontaktu s nějakým povrchem (např. kontaktní aktivace faktoru XII) nebo po reakci s jiným enzymem. Koagulační faktory bývají obvykle označovány římskými číslicemi, podle pořadí, v jakém byly objevovány, často předtím, než byla objevena jejich role v systému krevní koagulace. Jejich výčet je vidět v tabulce 1.

Tabulka 1: koagulační faktory, upraveno dle [15]

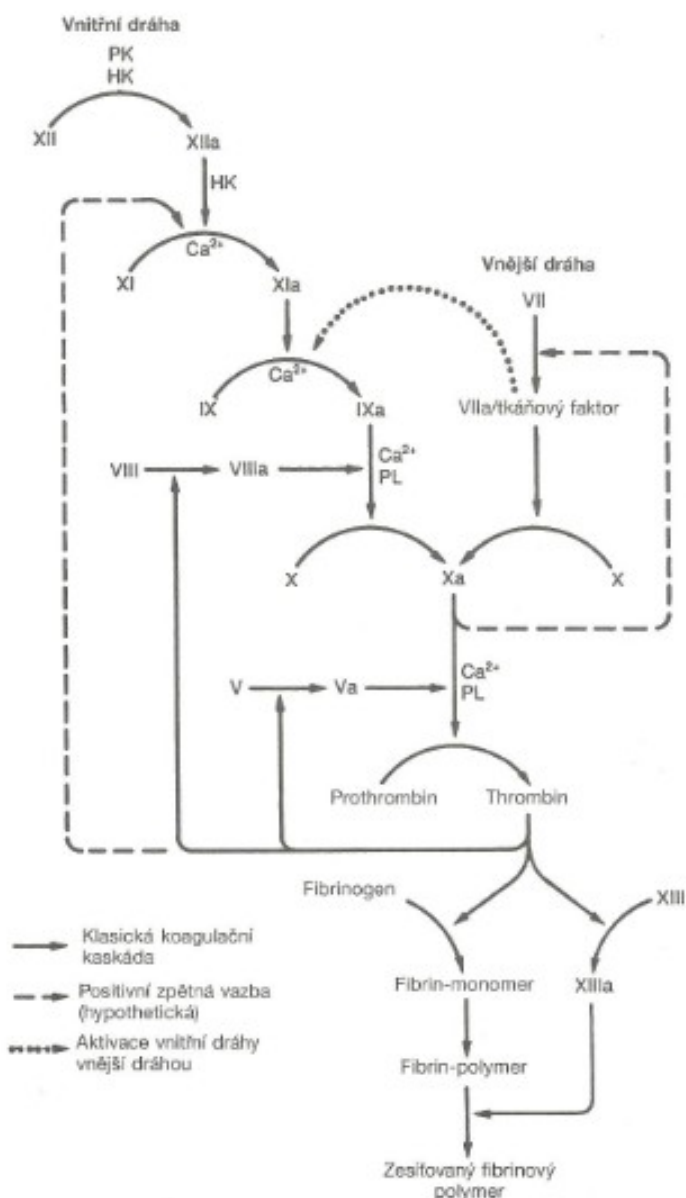
faktor	obecný název	kofaktor
I	fibrinogen	obvykle se nazývají obecnými jmény
II	protrombin	
III	tkáňový faktor	obvykle se neoznačují jako koagulační
IV	Ca ²⁺	
V	proakcelerin, labilní faktor, akceleratorový (Ac-) globulin	
VII	prokonvertin, sérový akcelerator konverse protrombinu (SPCA), kotromboplastin	kofaktorem je faktor III
VIII	antihemofilický faktor A, antihemofilický globulin (AHG)	
IX	antihemofilický faktor B, Christmas faktor, plasmová tromboplastinová složka (PTC)	kofaktorem je faktor VIII
X	Stuartův-Prowerův faktor	kofaktorem je faktor V
XI	plasmatický předchůdce tromboplastinu (PTA)	
XII	Hagemanův faktor	
XIII	faktor stabilizující fibrin (FSF), fibrinoligasa	

Celý proces hemokoagulace probíhá v několika krocích (znázorněno na obrázku 1), kdy jeden aktivovaný faktor může ovlivnit několik dalších. Tím dochází k rychlému zesílení efektu reakce, takže v krátké době dochází k produkci dostatečného množství trombinu, který podporuje aktivaci krevních destiček a tvorbu fibrinu. Z tohoto důvodu bývá tato reakce označována jako koagulační kaskáda [9]. Ta je obvykle pro zjednodušení rozdělována do dvou větví, vnější a vnitřní. Ty se však spojují do společné části, jejímž výsledkem je produkce trombinu, který pak hydrolyzuje fibrinogen a umožňuje jeho přeměnu na nerozpustný fibrin.

Zatímco vnější dráha koagulace zodpovídá za srážení krve v případě zranění (tj. porušení celistvosti cévy), vnitřní dráha má zřejmě vliv při kontaktu krve s cizorodým materiálem, a může být příčinou jejich špatné hemokompatibility [16], uvádí se také, že úlohou vnitřní

dráhy by mohlo být zesílení efektu aktivace koagulace způsobené vnější dráhou koagulační kaskády [10]. Obě dráhy jsou navíc propojené a vzájemně se ovlivňují.

Důležitým prvkem většiny kroků kaskády je přítomnost vápenatých kationtů a průběh celého procesu je výrazně omezován na oblast zranění nejen vlivem inhibitorů koagulace, ale i proto, že tokem krve dochází k ředění aktivovaných koagulačních faktorů. Některé kroky koagulační kaskády mohou navíc s dostatečnou intenzitou probíhat pouze na povrchu aktivovaných krevních destiček nebo v místě poraněné tkáně [9].



Obrázek 1: koagulační kaskáda [15]

2.1.1 Vnější dráha

Vnější dráha koagulační kaskády je zahájena poškozením cévy. Tkáňový faktor (FIII), glykoprotein, který je za fyziologických podmínek izolován v monocytech a endoteliálních buňkách, je při poškození cévy odkryt na plasmatické membráně buňky, interaguje s faktorem VII nebo jeho aktivovanou formou, a dojde k vytvoření enzymaticky aktivního komplexu, jeho základní funkcí je aktivace faktoru X, zúčastňuje se ale také aktivace faktoru IX [11].

Na rozdíl od ostatních koagulačních faktorů se tkáňový faktor v těle nevyskytuje v neaktivní formě, a díky svojí pozici na začátku koagulační kaskády je považován za nezbytný k životu. Za normálních podmínek se nevyskytuje v buňkách, které se dostávají do kontaktu s krevní plasmou, a ke spuštění krevní koagulace tak dojde pouze v případě, že se krev dostane do styku s buňkami spodních vrstev cévy, tedy při zranění. Kromě toho může docházet k produkci tkáňového faktoru při zánětlivých reakcích.

Faktor VII je enzym závislý na vitamínu K, jeho nedostatek je vzácný, ale vede k výrazným problémům s krevní srážlivostí. V krvi se v malém množství vyskytuje ve své aktivované podobě, sám však nemá výraznou enzymatickou aktivitu, zatímco v komplexu s tkáňovým faktorem vytváří nejsilnější známý aktivátor krevní koagulace [10].

2.1.2 Vnitřní dráha

Začátek vnitřní dráhy hemokoagulace bývá obvykle označován jako kontaktní aktivace a týká se čtyř proteinů, kterými jsou faktor XII, HMW kininogen, prekalikrein a faktor XI. Základní reakcí tohoto kroku je aktivace faktoru XII. K té může dojít několika různými způsoby, a to buď 1) kontaktní autoaktivací, kdy k aktivaci faktoru dojde změnou konformace po jeho adsorpci na nějaký povrch, 2) autohydrolyzou, kdy aktivovaný FXIIa zpětně hydrolyzuje další molekuly FXII, nebo 3) reciprokou aktivací, při které FXIIa může přeměnit prekalikrein v komplexu s HMW kininogenem na kalikrein, který zpětně aktivuje FXII. Tyto tři způsoby aktivace neprobíhají v krevní plasmě ve stejné míře jako v definovaných roztocích při jejich studiu *in vitro*, a matematické modely ukazují, že v prostředí organismu je nejdůležitější pravděpodobně autoaktivace vlivem povrchu [17].

Aktivovaný faktor XIIa vede k aktivaci faktoru XI (k jeho aktivaci může docházet i vlivem trombinu), dochází také k přeměně prekalikreinu na kalikrein a štěpení HMW kininogenu.

Všechny tyto změny ústí k přeměně FIX na jeho aktivovanou formu, která je pak jednou z příčin aktivace faktoru X.

Přestože je vnitřní dráha hemokoagulace často považována za nedůležitou (za fyziologických podmínek, bez kontaktu krve s cizorodým materiálem), zdá se, že některé z enzymů, které jsou její součástí, vykazují i jiné funkce, jako je role prekalikreinu a HMW kininogenu v regulaci krevního tlaku nebo jejich podíl na fibrinolýze [10], kontaktní aktivace má navíc vliv na stabilitu krevní sraženiny, vzhledem k tomu, že FXIIa zřejmě inhibuje agregaci krevních destiček vyvolanou trombinem [18]. K aktivaci vnitřní dráhy hemokoagulace dochází kontaktem krve se záporně nabitým povrchem nebo cizorodým materiálem [10], a i když je aktivace faktoru XII, způsobená kontaktem s cizorodým povrchem (a podle tradičních poznatků je nejintenzivnější na povrchu materiálu, který má záporný náboj nebo je hydrofilní, i když novější studie naznačují, že FXII nevykazuje specifickou vazbu na tyto materiály [16]), klíčovým krokem pro vnitřní dráhu hemokoagulace, její mechanismus stále není plně vysvětlen, například není známo, jestli k aktivaci FXII dochází až po kontaktu s povrchem, nebo jestli se nějaké malé množství aktivovaného faktoru vyskytuje v krvi i za fyziologických podmínek [19].

2.1.3 Společná dráha

Společná část koagulace začíná aktivací FX, ať už k ní dojde vlivem vnitřní nebo vnější dráhy. Aktivovaný FXa za přítomnosti faktoru Va, vápenatých kationtů a fosfolipidů krevních destiček tvoří takzvaný protrombinázový komplex, jehož úlohou je aktivace protrombinu na trombin. Jedná se o reakci, která umožňuje malému množství iniciátoru vygenerovat velké množství trombinu, s ohledem na koncentraci protrombinu v krvi [9]. Vytvořený trombin potom iniciuje několik reakcí, které zpětnou vazbou podporují jeho vlastní produkci, a tedy rychlejší tvorbu krevní sraženiny v místě zranění, jako je aktivace FXI (dále aktivuje FIX), disociace neaktivního komplexu faktoru VIII s von Willebrandovým faktorem a aktivace FVIII, přičemž obě tyto reakce přispívají k tvorbě tzv. tenázového komplexu, který je složen z FIXa, FVIIIa, fosfolipidů a vápenatých kationtů, a podporuje další aktivaci faktoru X.

Další reakcí, kterou iniciuje trombin, je aktivace faktoru V, čímž se zvyšuje množství protrombinázového komplexu a tím i objem trombinu, vliv má i trombinem vyvolaná aktivace krevních destiček v místě zranění, která zvyšuje dostupnost fosfolipidů [11], kromě toho trombin aktivuje některé inhibitory krevního srážení, jako je protein C.

Posledním krokem koagulační kaskády je reakce trombinu s fibrinogenem a faktorem XIII, kdy jsou z molekuly fibrinogenu působením trombinu odštěpeny dva malé fibrinopeptidy, označované jako fibrinopeptid A a fibrinopeptid B [10]. Zbytek molekuly pak tvoří monomerní fibrin. Jejich polymerací pak vznikají vlákna, která agregují a tvoří síť, která je zpevněna příčnými vazbami, jejichž vznik je katalyzován pomocí FXIIIa, aktivovaného působením trombinu [9]. Takto vytvořený nerozpustný fibrin potom zpevňuje agregáty krevních destiček [11].

2.1.4 Regulace krevní koagulace

Proces krevní koagulace je efektivní pouze tehdy, pokud se omezuje na oblast zranění a je aktivní pouze tak dlouho, aby došlo k tvorbě dostatečného množství fibrinu pro uzavření rány [10]. Důležitou součástí systému srážení krve jsou tedy také inhibitory koagulace, které zabraňují přehnané tvorbě krevních sraženin. Nejjednodušším způsobem, jakým dochází k regulaci intenzity krevního srážení, je tok krve v cévách, který zajišťuje snížení koncentrace koagulačních faktorů v místě zranění. Některé kroky koagulační kaskády navíc probíhají efektivní rychlostí pouze v případě, že jsou katalyzovány nějakým povrchem, což platí například pro aktivaci faktoru X pomocí komplexu tkáňového faktoru a faktoru VII [9]. Jiné jsou závislé na látkách, jako je tkáňový faktor nebo fosfolipidy, které jsou dostupné pouze v místě poranění [10]. Další cestou jsou přirozeně se vyskytující antikoagulační látky, jako je antitrombin III, který je důležitým inhibítoem trombinu a některých dalších koagulačních faktorů, nebo TFPI (tissue factor pathway inhibitor), který v přítomnosti faktoru Xa inhibuje funkci komplexu faktoru VII a tkáňového faktoru. Během koagulace vznikají také enzymy, jejichž úlohou je degradace některých kofaktorů. Příkladem může být trombomodulin, který se nachází na povrchu endoteliálních buněk cév, a který degraduje trombin. Komplex trombinu s trombomodulinem pak aktivuje protein C, který je díky tomu, že degraduje faktory V a VIII, považován za základní antikoagulační mechanismus.

Nejlépe prostudovaným fibrinolytickým enzymem je plasmin, který se v krvi běžně vyskytuje v neaktivní formě, jako plasminogen. Ten je během koagulace inkorporován do krevní sraženiny, aktivován pomocí látek, které jsou v krvi nebo uvolněné z tkání (případně dodané terapeuticky), jako je například urokináza nebo tkáňový aktivátor plasminogenu (tPA). Aktivovaný plasmin potom rozkládá fibrin [9].

V některých případech je obvyklé dodávat antikoagulační látky pacientům terapeuticky, v takových případech se většinou jedná o warfarin, který brání správné funkci vitamínu K,

a tím ovlivňuje tvorbu některých koagulačních faktorů (FVII, FIX, FX a protrombin), nebo heparin, který blokuje funkci především trombinu a fibrinu [20].

2.2 Reakce krevních destiček

Krevní destičky jsou bezjaderné krevní buňky, které vznikají z megakaryocytů v kostní dřeni a v krvi cirkulují v množství asi $300 \cdot 10^9$ /litr [21]. Obsahují více než 1100 proteinů, včetně růstových faktorů, enzymů a jiných bioaktivních molekul, v organismu se tedy podílejí na mnoha různých procesech, jako jsou tvorba zánětu, obrana těla před mikroorganismy nebo hojení tkání, především ale krevní srážlivost [22]. Hlavním podílem krevních destiček na udržování hemostázy je jejich rychlá reakce při porušení cévy a adheze v místě poranění [23], a tudíž zajištění neporušenosti cévní stěny tvorbou destičkové zátky v případě jejího poškození [24], a její stabilizace katalyzací koagulačních reakcí, které vedou k tvorbě fibrinu [9]. Zároveň podporují také proces hojení uvolňováním cytokinů [25].

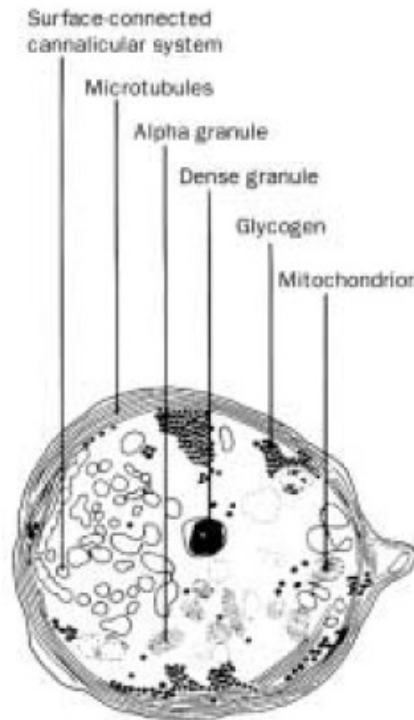
Poruchy tvorby nebo funkce krevních destiček se projevují buď zvýšenou krvácivostí, nebo naopak patologickým srážením krve, což ukazuje na důležitost jejich role pro udržení hemostázy organismu [26], především pak v kůži a sliznicích, na rozdíl od poruch hemokoagulace, která se projevuje spíše krvácením v hlubších tkáních [21]. Funkce krevních destiček může být oslabena nebo narušena více než 100 různými vitaminy, jidly, kořením nebo léky, včetně aspirinu, který je často používán jako prevence infarktu myokardu [27].

Rozsah adheze a aktivace krevních destiček na povrch biomateriálu bývá považován za jeden z důležitých indikátorů, podle kterých se posuzuje hemokompatibilita materiálu, zároveň se také jedná o zásadní kroky, na které při krvácení navazuje tvorba krevní sraženiny [28]. Obecně nízká intenzita adheze a aktivace destiček vypovídá o dobré hemokompatibilitě materiálu, zatímco velká míra jejich adheze a aktivace může ústít v tvorbu krevních sraženin [14].

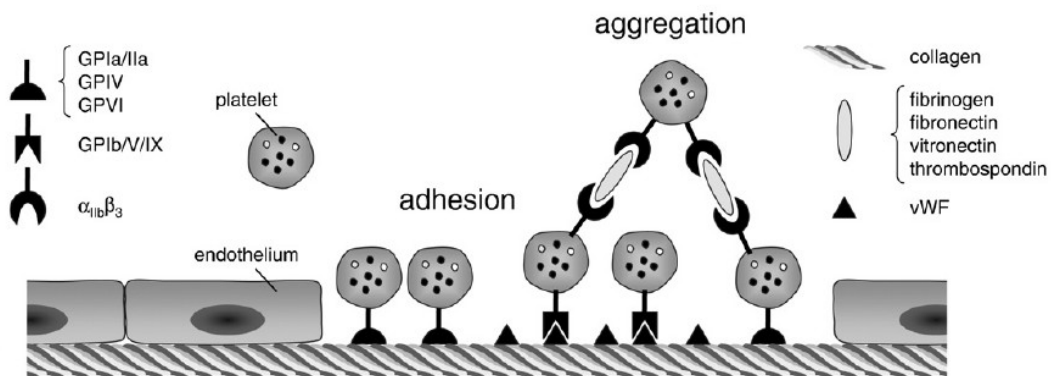
2.2.1 Morfologie krevních destiček

Krevní destičky mají diskoidní tvar, o průměru 2 – 4 μm , s životností mezi 8 a 14 dny, jejich struktura je zjednodušeně naznačena na obrázku 2. Za normálních podmínek cirkulují v krevním řečišti bez jakékoli interakce [29]. Jejich plasmatická membrána je tvořena fosfolipidy, a na její vnitřní straně jsou negativně nabitě fosfolipidy jako fosfatidylserin nebo fosfatidylinositol, které se po aktivaci krevních destiček obnaží a umožňují aktivaci koagulačních faktorů [30]. Na vnější straně membrány krevních destiček jsou potom recep-

tory, které umožňují interakce mezi destičkou a povrchem (adheze) a destičkami vzájemně (agregace), příklad je možno nalézt na obrázku 3. Dále obsahují lysosomální granula, obsahující hydrolázy [9].



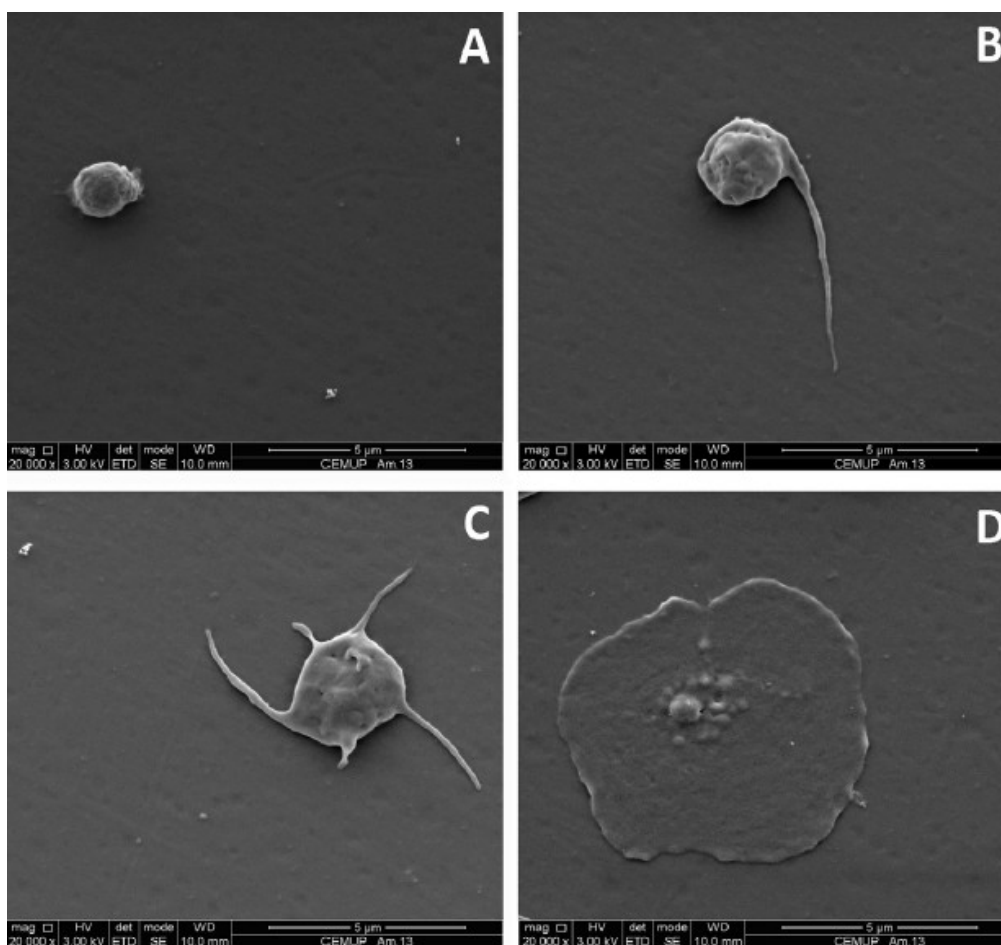
Obrázek 2: krevní destička [27]



Obrázek 3: adheze krevních destiček na povrch poškozené cévní stěny [31]

Cytoskelet krevních destiček je tvořen proteinovými mikrotubuly a vlákny. Kromě nich se uvnitř destiček nacházejí dva různé intercelulární membránové systémy, z nichž první se nazývá denzní tubulární systém (denzní granula). Ten je uzavřený a dochází v něm především k tvorbě ADP a ukládání vápníku. Druhým je otevřený systém invaginací plasmatické membrány, který po aktivaci destiček zvětšuje jejich povrch. Ty jsou označovány jako α -granula a mimo jiné obsahují také glykoproteiny (např. von Willebrandův faktor), destičkové proteiny nebo některé koagulační faktory (faktor Va, VIII, fibrinogen) [30].

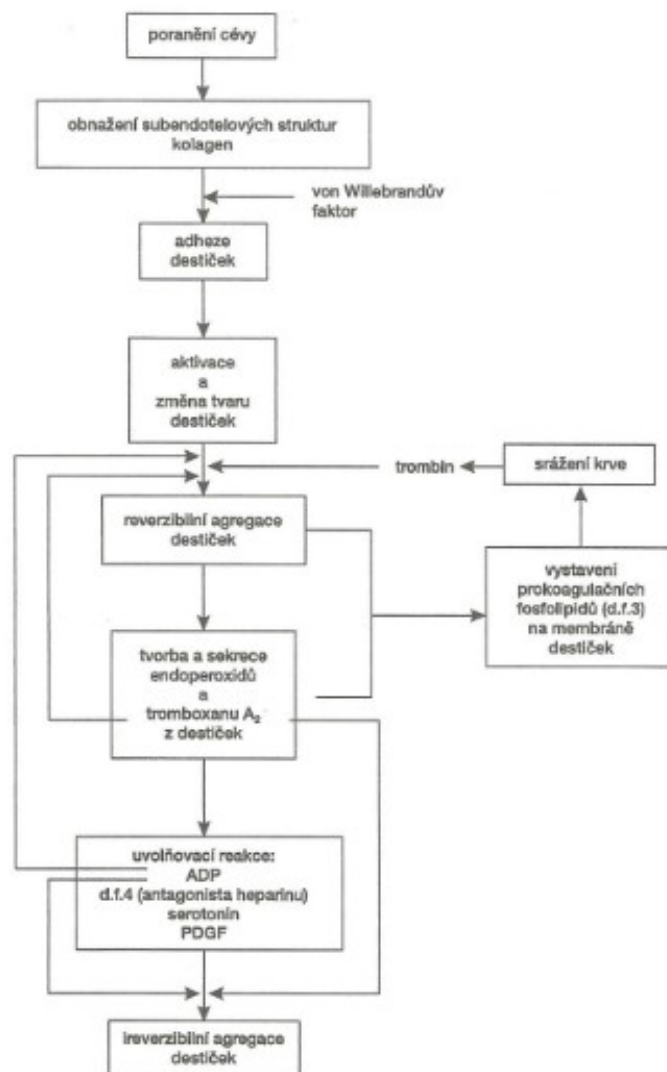
Krevní destičky jsou citlivé a mohou odpovídat i na minimální stimulaci [9]. Jejich aktivace vede ke změně morfologie z neaktivované krevní destičky na aktivovanou, jak je vidět na obrázku 4 (4a, 4b krevní destička neaktivovaná, 4c, 4d aktivovaná). Dojde k přeuspořádání cytoskeletu, tvorbě pseudopod a destička ztrácí svůj diskovitý tvar a stává se dendritickou [32], což je provázeno vnitřní kontrakcí destičky a vypuzením obsahu granul [9].



Obrázek 4: krevní destička: a,b) neaktivovaná c,d) aktivovaná [33]

2.2.2 Funkce krevních destiček

Kromě fibrinu, který je výsledkem koagulační kaskády, jsou součástí krevní sraženiny také krevní destičky [18], jejichž důležitost pro krevní srážení je známa už od čtyřicátých let, kdy bylo zjištěno, že krevní plasma chudá na destičky se po opětovném přidání vápenatých kationtů sráží pomaleji, než plasma bohatá na krevní destičky [34]. V organismu se krevní destičky účastní mnoha různých pochodů, včetně podpory vazokonstrikce tím, že po své aktivaci uvolňují vazokonstriktory [21], jejich nejdůležitější funkcí je ale právě jejich role při zástavě krvácení. Na obrázku 5 je schéma jejich funkce, a jak je vidět, po poškození cévy se krevní destičky dostávají do kontaktu s odkrytou extracelulární matrix, což vede k jejich adhezi a aktivaci. Tím dojde k uvolnění některých látek, které se účastní hemokoagulace. Výsledkem celého procesu je potom tvorba hemostatické zátky zpevněné fibrinovými vlákny [26].



Obrázek 5: schéma funkce krevních destiček [35]

Účast krevních destiček na procesu hemostázy se dá rozdělit na adhezi, aktivaci, sekreci a agregaci [29] a jejich chování může být proti poznatkům získaným *in vitro* ovlivněno také jejich vystavením smykovému namáhání, které je způsobeno tokem krve. Tímto způsobem může také dojít k jejich aktivaci a agregaci (tzv. SIPA, shear-induced platelet activation-aggregation), toto může působit také v kombinaci s kontaktem destiček s cizorodým povrchem v případě biomateriálů [34].

2.2.2.1 Adheze

Za fyziologických podmínek je adhezi krevních destiček k cévní stěně zabráněno vysokou lokální koncentrací prostacyklinu a oxidu dusnatého [8], při obnažení cévního endotelia nebo subendoteliálních komponent dochází k rychlé adhezi krevních destiček, což je reakce zprostředkovávaná ligandy vyskytující se v místě zranění, které se vážou na specifické receptory na membráně krevních destiček. Příkladem je kolagen, který tvoří vazbu s destičkovým receptorem GPIa, zatímco von Willebrandův faktor, který se vyskytuje v krevní plasmě nebo je vytvářen endoteliem, megakaryocyty a pojivovými tkáněmi subendotelia, se váže na receptor GPIb [29] a tvoří můstek s molekulou kolagenu [8], kromě nich můžou ale destičky interagovat také s fibrinogenem, fibronectinem nebo vitronektinem [28].

V případě použití biomateriálu dochází k adhezi krevních destiček na jeho povrch primárně skrze interakci mezi receptory destiček a proteiny krevní plasmy, adsorbovanými na povrchu materiálu [36], především fibrinogenem, který se váže na destičkový receptor glykoprotein IIb/IIIa [32].

2.2.2.2 Aktivace

Pokud dojde k adhezi krevních destiček na povrch obnaženého subendotelia nebo se destičky dostanou do kontaktu s aktivátory, jako je například trombin, což je hlavní aktivátor krevních destiček, který aktivuje nejméně tři různé receptory na jejich povrchu, dojde k jejich aktivaci. V případě biomateriálů je aktivace krevních destiček iniciovaná kontaktem s povrchem a záleží na složení vrstvy adsorbovaných proteinů na povrchu materiálu [18].

Kromě toho, že aktivace krevních destiček vyvolává u endoteliálních buněk syntézu a sekreci molekul, které omezují tvorbu krevní sraženiny [26], jejich aktivace vede ke změně jejich morfologie, tedy ke změně z jejich původního diskoidního tvaru v kouli s dlouhými

dendritickými výběžky, které usnadňují další adhezi. Tato změna tvaru je umožněna velkým obsahem aktinu a myosinu v cytoplasmě destiček [27].

Během aktivace destiček dochází k několika procesům, předně se jedná o zpřístupnění obsahu granul, kdy jsou biologicky aktivní látky (např. serotonin, vápenaté kationty nebo ADP) uvolněny do okolí krevní destičky, dále o expresi glykoproteinu P-selektin na povrchu membrány, což umožní adhezi aktivované destičky k buňkám. Změna tvaru destičky nejen usnadňuje její adhezi, ale taky podporuje spojení tenázového a protrombinázového na fosfolipidech, důležitá je také iniciace dráhy eikosanoidů a syntéza a uvolnění kyseliny arachidonové, prostaglandinů [24] a tromboxanu A₂, který podporuje agregaci [29]. Při aktivaci dojde také k uvolnění mikročástic, které zřejmě slouží ke zvětšení fosfolipidového povrchu krevních destiček pro uchycení a shromáždění koagulačních nebo antikoagulačních faktorů, a tedy urychlení hemostázy [34], zřejmě se ale podílejí také na tvorbě sraženiny (díky vysokému obsahu faktoru Va a některých jiných látek) [24], fibrinolýze, adhezi bílých krvinek a interakci mezi krevními destičkami a endoteliem [34].

2.2.2.3 Agregace

Během aktivace krevních destiček dojde ke změně konformace membránového receptoru označovaného jako glykoprotein IIb/IIIa. Tím je umožněna jeho vazba na fibrinogen, a tedy tvorba násobných stabilních vazeb mezi sousedícími destičkami, což umožňuje rychlou akumulaci krevních destiček v místě zranění [29]. Dále je agregace destiček podporována především působením trombinu, a je důležitá pro zachování hemostázy organismu, pokud však probíhá abnormálně, přispívá k rozvoji kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních chorob nebo aterosklerózy [37].

Agregát krevních destiček je pak pokryt a zpevněn kovalentně vázaným fibrinem [38].

3 SRÁŽENÍ KRVE NA MATERIÁLECH

Vlastností, která umožňuje, aby byl materiál používán v prostředí organismu, je jeho schopnost být v kontaktu s živou tkání a nijak ji přitom nepoškozovat. To je požadováno především v případě zařízení nebo pomůcek určených pro dlouhodobé použití, důležité je i umístění a způsob, jakým je materiál používán.

Vlastnosti materiálu se obecně rozdělují do dvou skupin, a to na vlastnosti objemové, jako je například krystalinita, porosita nebo mechanické vlastnosti, a vlastnosti povrchové. [3]. Vzhledem k tomu, že povrch materiálu je tím, co přichází do kontaktu s krví nebo živou tkání, jsou pro aplikaci biomateriálů velice důležité jejich povrchové vlastnosti a z nich plynoucí odpověď organismu [6]. Hemokompatibilita materiálu tedy záleží nejen na umístění zařízení, délce jeho kontaktu s krví a dynamice toku krve, ale také na povrchových vlastnostech materiálu [4], přičemž důležitými faktory hemokompatibility jsou mimo jiné chemické složení povrchu, povrchová energie materiálu, jeho smáčivost, topografie a drsnost. Tyto vlastnosti ovlivňují adsorpci proteinů na povrch materiálu, změny jejich konformace a jejich funkci [17].

3.1 Faktory ovlivňující hemokompatibilitu materiálu

Podobně jako v případě, že vlivem zranění dojde k porušení cévy, se krev sráží tehdy, když se dostane do kontaktu s cizorodým materiálem. To způsobuje značné problémy a omezení při používání lékařských pomůcek a může způsobit také ohrožení jejich funkčnosti [18]. Adsorpce krevních bílkovin na povrch takto používaných materiálů je považována za důležitý mediátor hemokompatibility, adheze krevních destiček a tvorby krevních sraženin [39]. Za kritické se přitom považují povrchové vlastnosti materiálu [7]. Snahy o zlepšení hemokompatibility používaných materiálů tak směřují ke snížení adsorpce krevních bílkovin na jejich povrch, s cílem omezit adhezi krevních destiček [32].

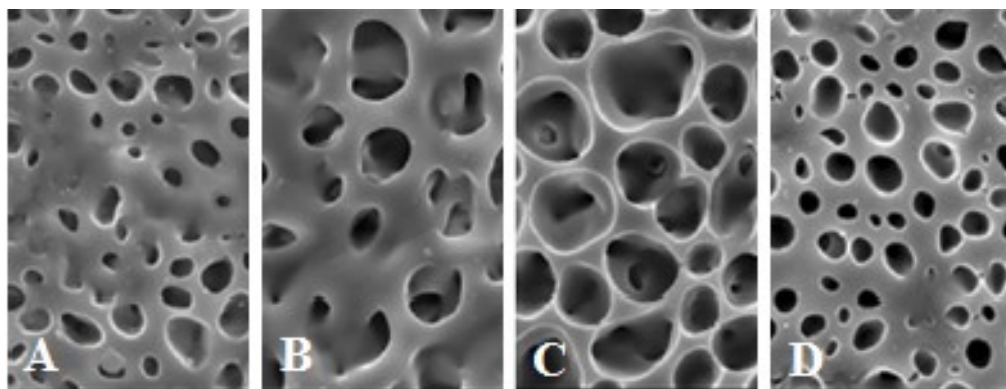
Kromě procesů spojených s krevními destičkami je krevní srážení na povrchu materiálu ovlivňováno také reakcemi imunitního systému a reakcemi s koagulačními faktory po jejich adsorpci na povrch materiálu, především v případě faktorů XII a XI, prekalkreinu a HMW kininogenu, které jsou součástí vnitřní dráhy koagulační kaskády a u kterých dochází při styku s cizorodým materiálem k takzvané kontaktní aktivaci. Aktivace faktoru XII při kontaktu s povrchem, potažmo celá vnitřní dráha koagulační kaskády, hraje důležitou roli při krevním srážení způsobeném kontaktem s cizorodým materiálem. Jeho úloha na

krvním srážení *in vivo* však stále není plně známa, vzhledem k tomu, že absence koagulačního faktoru XII nevede k poruchám krevního srážení [18].

Reakce organismu na přítomnost cizorodého materiálu je složitá a závislá na působení mnoha faktorů [17]. Přestože biomateriály, a do velké míry pak polymery, mají široké uplatnění v medicíně, jejich používání stále vyvolává nežádoucí reakci v případě, že se dostanou do kontaktu s krví, a první reakcí krve v takovém případě je nespecifická adsorpce krevních bílkovin na povrch materiálu, což kromě vzniku zánětu a možné infekce vede také k adhezi a aktivaci krevních destiček a spuštění koagulační kaskády, důsledkem čehož je potom tvorba krevních sraženin. Proto je tento problém krevního srážení v kontaktu s cizorodým materiálem spojován především s běžně používanými kardiovaskulárními pomůckami, jako jsou katétry, umělé srdeční chlopně nebo cévní štěpy [7].

3.1.1 Chemické složení materiálu

Často používanými biomateriály jsou díky širokému rozpětí mechanických vlastností a dobré odolnosti vůči únavě materiálu například polyuretany, které mají strukturu blokového kopolymeru. U těchto materiálů dochází k mikrofázové separaci, která je důsledkem nemísitelnosti segmentů tvrdých a polárních s měkkými a relativně nepolárními, a má vliv na kompatibilitu materiálu s krví. Výsledky ukazují sníženou míru aktivace hemokoagulační ve srovnání například se sklem, což ukazuje na to, že mikrofázová separace vytváří na povrchu materiálu mikroprostředí, které ovlivňuje odpověď proteinů a buněk na povrch [17], jak dokázala také studie, kde byl do polyuretanu přidán druhý typ měkkého, nepolárního segmentu. Vzorky byly připraveny jako membrány s různým poměrem prepolymeru na bázi polypropylenoxidu (PUR) a PCL-diolu (polykaprolakton, druhý měkký segment), a jak je vidět (uvedeno v obrázku 6 a tabulce 2), s měnícím se obsahem přidané látky se měnila nejen velikost pórů, ale také intenzita adheze krevních destiček na povrch upravovaného materiálu [40]. Studie také ukazují, že odpověď organismu se liší v různých částech povrchu materiálu, a že vliv na hemokompatibilitu materiálu má chemická heterogenita povrchu v rozměru nanometrů, s nízkými adhezními silami v oblastech tvrdých segmentů. Polyuretany navíc procházejí ve vodném prostředí reorganizací, pro snížení volné povrchové energie. Ta vede k přesunu tvrdých segmentů na povrch materiálu, což omezuje adsorpci krevních bílkovin a aktivitu adsorbovaného fibrinogenu.



Obrázek 6: snímky ze skenovací elektronové mikroskopie (zvětšeno 3500x), porézní povrch modifikovaného materiálu a) PEUU 100 b) PEUU 95 c) PEUU 90 d) PEUU 85, upraveno dle [40]

Tabulka 2: hodnoty velikostí pórů materiálů a jejich pokrytí krevními destičkami, upraveno dle [40]

	poměr složek PUR/PCL-diol [hm.%]	průměrná velikost pórů [μm]	pokrytí povrchu krevními destičkami [%]
PEUU 100	100/0	< 3,5	$8 \pm 0,1$
PEUU 95	95/5	< 5,5	$6 \pm 0,3$
PEUU 90	90/10	< 5,5	$5 \pm 0,3$
PEUU 85	85/15	< 2,0	$2 \pm 0,1$

Obecně jsou materiály upravovány tak, aby nepodporovaly adsorpci krevních bílkovin, jsou tedy hydrofilní, bez náboje a obsahují prvky s vysokou elektronegativitou, jako je kyslík nebo dusík [17].

3.1.2 Smáčivost a povrchová energie materiálu

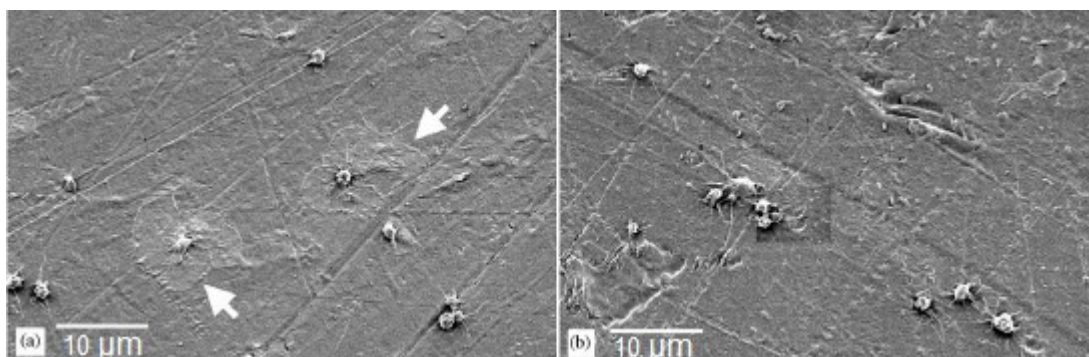
Chemická struktura materiálu ovlivňuje jeho náboj, povrchovou energii, polaritu a smáčivost, například funkční skupiny obsahující kyslík zvyšují polaritu a povrchovou energii materiálu a snižují kontaktní úhel vody. Již dříve bylo dokázáno, že hydrofilní materiály vykazují výrazně nižší adsorpci krevních bílkovin, proto bývají řetězce hydrofilního polymeru pro zlepšení hemokompatibility často používány také jako grafty navázané na povrchu materiálu hydrofobního [20]. Při kontaktu materiálu s krví dochází ke vzniku nového rozhraní, a k hodnocení hemokompatibility materiálu tak může být použita hodnota volné

energie na rozhraní materiálů, která je dána hodnotami povrchové energie pevné a kapalné fáze. Doporučená hodnota volné energie na rozhraní materiálů pro soustavu krev (krevní plasma) a biomateriál se pro dlouhodobou kompatibilitu materiálu s krví pohybuje v rozmezí 1 – 3 mN/m a výpočty volné energie na rozhraní, vycházející z hodnot povrchové energie materiálu, pomáhají porozumět mechanismu adsorpce proteinů na různé povrchy. Srovnáním intenzity adsorpce proteinů na různých polymerních materiálech bylo zároveň zjištěno, že k intenzivnější adsorpci dochází na materiálech s nižší povrchovou energií.

Smáčivost materiálu (možno vidět na obrázku 7), která vychází z jeho povrchové energie, je přitom klíčovým faktorem pro adsorpční kinetiku a množství adsorbovaného proteinu, s obecným pravidlem, které říká, že k intenzivnější adsorpci proteinů dochází na hydrofobních površích, jak ukazuje obrázek 8. Molekuly vody, navázané na povrchu hydrofilních materiálů, jsou totiž jen těžko nahrazovány proteiny. To také vysvětluje výrazné změny v adsorpci proteinů na površích s kontaktním úhlem vody okolo 65° .



Obrázek 7: smáčivost materiálu a) špatná, b) dobrá [41]



Obrázek 8: SEM snímky krevních destiček na povrchu a) hydrofobního, b) hydrofilního materiálu, upraveno dle [42]

Aktivace koagulačního faktoru XII, který stojí na začátku vnitřní dráhy hemokoagulace je zřejmě intenzivnější při kontaktu FXII s hydrofilními materiály nebo s materiály se záporným nábojem, experimentálně ale bylo prokázáno, že hydrofilní a hydrofobní materiály vykazují v pufovaném roztoku faktoru XII téměř stejnou intenzitu aktivace, a aktivace tohoto koagulačního faktoru tedy není omezena pouze na hydrofilní materiály. Naopak má parabolický průběh závislý na povrchové energii materiálu, s minimem v oblastech kontaktního úhlu vody mezi 55° a 75°, materiály s kontaktním úhlem vody v tomto rozmezí tedy vykazují nejnižší aktivaci hemokoagulace. Jeho aktivace je pak ovlivňována také složením proteinů obsažených v roztoku a jejich adsorpcí na povrch materiálu, kdy adsorbované proteiny brání kontaktu FXII s povrchem, omezují tak jeho aktivaci a podporují tak zaměření FXII na hydrofilní materiály, zároveň ale nahrazují už aktivované molekuly FXIIa, a ty se tak dostávají zpátky do plasmy a podporují hemokoagulaci. Aktivace FXII je také zřejmě omezována nějakou autoinhibiční reakcí [17].

3.1.3 Topografie materiálu

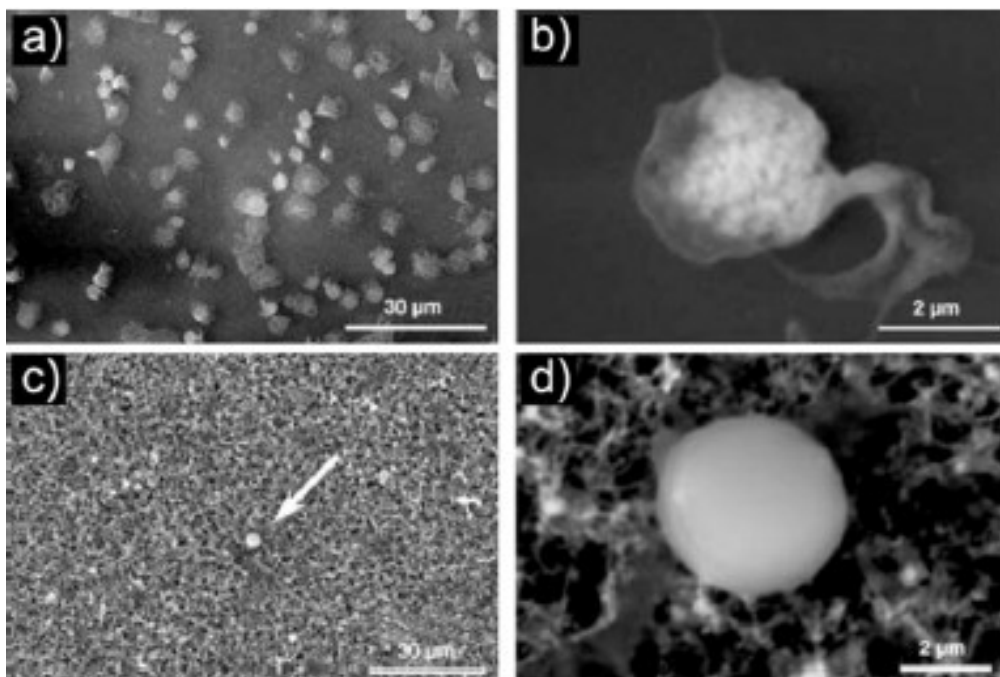
Kromě úpravy chemického složení povrchu materiálu je hemokompatibilitu možno ovlivnit také přípravou materiálu se specifickou topografií povrchu [32]. Různé studie prokázaly, že mikro- nebo nanostrukturovaný povrch ovlivňuje chování buněk, jako je jejich prostorová orientace, morfologie, adheze nebo proliferace, regulace jejich funkce, dokonce jejich genová exprese, ovlivňuje také adhezi bakterií a krevních destiček, nebo adsorpci bílkovin [17].

3.1.3.1 Vliv na hemokompatibilitu

Při testech adsorpce fibrinogenu na povrchy s různou topografií bylo zjištěno, že fibrinogen je adsorbován na povrchy s topografickými prvky o rozměru 100 nebo 250 nm výrazně méně, než pokud je použitý rozměr prvků 500 nm. To je pravděpodobně způsobeno tím, že na prvcích o větším průměru mají molekuly fibrinogenu větší plochu možného kontaktu, což vede také k větší přilnavosti na povrch materiálu. Tyto výsledky naznačují důležitost rozměrů struktury povrchu materiálů pro dosažení požadované míry adsorpce krevních proteinů, tedy i krevních destiček, jak ukazuje obrázek 9, který znázorňuje rozdíly v adhezi a aktivaci krevních destiček na hladkém a nenostukturovaném povrchu, s výrazně sníženou adsorpcí proteinů u materiálů s topografickými znaky v rozměrech pod cca 300 nm [32]. Topografie má ale vliv také na konformační změny proteinů a afinitu různých proteinů k povrchu materiálu, pokud je materiál nanostrukturovaný. Naopak mikrostrukturované

materiály mají větší vliv na buněčnou odpověď, zatímco vliv na adsorpci proteinů by u takových materiálů měl být minimální, zdá se ale, že i v tomto případě má topografie materiálu vliv na adsorpci proteinů.

Topografie vhodná pro omezení adsorpce proteinů, konkrétně fibrinogenu, na povrch hydrofobního materiálu by tedy měla být v nanoměřítku, s velkým poměrem stran topografických znaků a malými mezerami (pod 200 nm) mezi jednotlivými znaky, což nejen výrazně omezuje adsorpci proteinů na povrch, ale také podporuje desorpci proteinů z povrchu vlivem toku krve. Přesto však zatím nebylo vysledováno všeobecné pravidlo, které by tento vztah mezi topografií povrchu a intenzitou adsorpce bílkovin popisovalo, dokonce ani v rámci jednoho konkrétního proteinu.



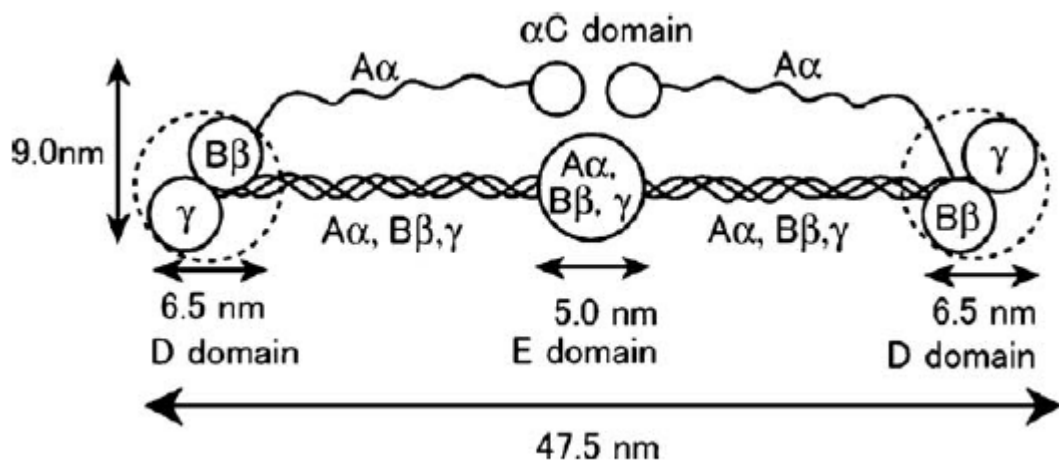
Obrázek 9: vliv topografie povrchu na adhezi krevních destiček na a) hladkém povrchu, c) nanostrukturovaném povrchu s b) a d) odpovídajícími krevními destičkami [43]

Adsorpce proteinů na povrch biomateriálu je tedy zřejmě komplexním procesem, který je ovlivněn mnoha různými faktory, které se navzájem doplňují. Topografie povrchu má vliv na jeho smáčivost, a to až do té míry, kdy může z hydrofobního materiálu udělat materiál superhydrofobní, s kontaktním úhlem vody i více než 150° , nebo naopak zvýšit smáčivost

hydrofilního materiálu. Tyto změny v povrchových vlastnostech materiálu mohou podpořit nebo bránit adsorpci krevních bílkovin v závislosti na velikosti, tvaru nebo skladbě topografických prvků, a na typu bílkoviny [17].

3.1.4 Konformace proteinů

Je všeobecně přijímáno, že hemokompatibilita materiálu závisí na vlastnostech jeho povrchu, to znamená na jeho náboji a na tom, jak je hydrofilní, což má výrazný vliv na adsorpci krevních bílkovin, jako jsou fibrinogen nebo von Willebrandův faktor, které potom podporují buněčnou adhezi na povrch materiálu. Přestože je známo, že na hydrofobních površích dochází k výrazně intenzivnější adsorpci krevních bílkovin [18], z nichž především fibrinogen (jehož zjednodušená struktura je vidět na obrázku 10) má výrazný vliv na další reakci krevních destiček, neznamená to nutně, že povrchy se stejným množstvím adsorbovaného fibrinogenu vykazují stejnou hemokompatibilitu. Ta totiž kromě na množství adsorbovaných bílkovin závisí i na jejich prostorové orientaci, která má vliv na adhezi a aktivaci krevních destiček. To potvrzuje i fakt, že krevní destičky výrazně interagují s fibrinogenem, který je adsorbovaný na nějakém povrchu, ale už ne s molekulami fibrinogenu, které jsou v krvi ve své nativní konformaci [44]. Stejně tak nedochází k aktivaci krevních destiček přímo v krevním řečišti, při styku s molekulami vitronektinu nebo fibronektinu, pokud jsou v nativním stavu, ale při kontaktu s proteiny adsorbovanými na povrch materiálu k nim destičky adherují a dochází k jejich aktivaci [39].



Obrázek 10: zjednodušená struktura molekuly fibrinogenu [45]

Zdá se tedy, že intenzita adheze krevních destiček nezávisí tolik na množství adsorbovaného fibrinu, jako na změně prostorové struktury fibrinogenu způsobené jeho adsorpcí na povrch biomateriálu. Důležitost vlivu změny konformace fibrinogenu na adhezi krevních destiček byl potvrzen také zjištěním, že u materiálů, které mají různé chemické složení povrchu, a s různým stupněm změny konformace adsorbovaného fibrinogenu, dochází k výrazně rozdílné intenzitě adheze krevních destiček, ačkoli množství adsorbovaného fibrinogenu je téměř stejné. Změna konformace fibrinogenu a ztráta struktury α -helixu, způsobené adsorpcí proteinu na povrch biomateriálu, tedy zřejmě vedou k odkrytí vazebných míst pro krevní destičky, které jsou při nativním stavu fibrinogenu nepřístupné, a umožňují zvýšenou adhezi destiček. Podle tohoto zjištění by pak úpravy biomateriálu pro zajištění jejich větší hemokompatibility měly spíše než k úpravám materiálů pro dosažení omezení adsorpce fibrinogenu na povrch směřovat k tvorbě materiálů, které v co nejvyšší míře zachovávají nativní informaci adsorbovaného fibrinogenu, což silně koreluje s intenzitou adheze krevních destiček, lépe hodnotí hemokompatibilitu materiálu a přesněji popisuje odpověď organismu na takový materiál [44].

Ačkoli jsou změny konformace proteinů způsobené adsorpcí obvykle studovány s použitím modelových substrátů, spíše než reálně používaných biomateriálů, existují důkazy, že konformace fibrinogenu souvisí s chemickým složením a povrchovými vlastnostmi použitého polymeru. Závisí ale zřejmě i na flexibilitě řetězců polymeru, a na polymerech s flexibilnějšími řetězci fibrinogen zachovává nativnější konformaci.

3.1.4.1 Smykové napětí

Přestože je fibrinogen hlavním proteinem procesu krevního srážení vyvolaného kontaktem krve s cizorodým materiálem, typ krevních bílkovin, které jsou důležité pro adhezi krevních destiček, závisí také na proudění krve. Při nižších smykových napětích je bílkovinou, jejíž adsorpce na povrch materiálu je nejintenzivnější, a která potom podporuje adhezi krevních destiček a jejich vzájemnou vazbu, fibrinogen, při vysokých smykových napětích plní podobnou funkci von Willebrandův faktor [17].

3.1.4.2 Smáčivost materiálu a koncentrace proteinů

K výraznější změně konformace fibrinogenu, vyvolané adsorpcí fibrinogenu na povrch materiálu, dochází v případě, že se fibrinogen v roztoku vyskytuje v nižší koncentraci, protože u koncentrovanějších roztoků je adsorpce fibrinogenu na povrch tak rychlá, že nestačí

dojít ke změně konformace předtím, než dojde k maximálnímu nasycení povrchu, a konformace molekul adsorbovaného fibrinogenu je tak mnohem bližší jeho nativní formě [44]. Změny konformace fibrinogenu probíhají v čase a bylo zjištěno, že ke změně prostorového uspořádání fibrinogenu dochází intenzivněji na hydrofobních materiálech. Také síly mezi molekulami fibrinogenu a povrchem materiálu jsou slabší při použití hydrofilních materiálů.

3.1.4.3 Přítomnost dalších látek

Na biologickou aktivitu adsorbovaného fibrinogenu mají vliv také přítomnost dalších proteinů, jako je například albumin [17], který je díky své vysoké koncentraci v krvi a malé molekulární hmotnosti obvykle prvním proteinem, který se dostane do kontaktu s cizorodým materiálem. Na rozdíl od fibrinogenu ale zřejmě nepodporuje adhezi krevních destiček, a je tak často používán jako povrchová vrstva zvyšující hemokompatibilitu biomateriálů nebo při studiu adheze krevních destiček, a to pro blokování interakce mezi destičkami a povrchem materiálu. Některé studie však naznačují, že krevní destičky jsou schopné adheze na albumin adsorbovaný na nějakém povrchu, což je podobně jako u fibrinogenu spojeno se změnou konformace proteinu, vzhledem k tomu, že míra adheze rostla lineárně s intenzitou změny prostorového uspořádání albuminu [39]. Záleží také na vzájemném poměru proteinů.

3.2 Povrchové modifikace zlepšující hemokompatibilitu

Protože hemokompatibilita materiálu je založena na kontaktu materiálu s krevními komponentami, bývají pro zvýšení hemokompatibility materiálu a nastavení požadované reakce organismu na přítomnost cizorodého materiálu v posledních letech používány různé metody povrchových úprav [7].

3.2.1 Cíle povrchových modifikací materiálů

Vzhledem k tomu, že adsorpce krevních bílkovin na povrch biomateriálu je obecně označována za důležitý faktor adheze krevních destiček, krevního srážení a hemokompatibility [39], důležitým krokem je rozlišení toho, jestli je příčinou zhoršení hemokompatibility materiálu množství fibrinogenu, který je adsorbovaný na jeho povrchu, nebo změna jeho konformace, způsobená jeho adsorpcí na povrch. To totiž vede ke dvěma rozdílným postupům pro tvorbu materiálu se zvýšenou hemokompatibilitou, kdy je cílem úpravy materiálu buďto omezit, případně zabránit, adsorpci fibrinogenu, bez ohledu na jeho konformaci,

nebo materiál připravit tak, aby adsorpce fibrinogenu probíhala beze změn v jeho konformaci, tedy tak, aby si fibrinogen v co nejvyšší míře zachoval svoji nativní podobu, bez ohledu na množství, které je na povrchu adsorbováno [44].

Cílem je tedy krevní koagulaci způsobené přítomností cizorodého materiálu zabránit, nebo lokálně podpořit fibrinolýzu, aby došlo k rozpadu a odstranění vytvořené krevní sraženiny.

3.2.2 Používané metody

K tomu bylo zavedeno nebo alespoň testováno mnoho různých metod povrchových úprav materiálu, které je možno obecně rozdělit na metody, které vytváří pasivní povrch, tedy povrch, který je biologicky inertní. Tím dojde k omezení negativních reakcí organismu. Inertní povrchy také redukují adsorpci krevních bílkovin na povrch materiálu, čímž zlepšují hemokompatibilitu implantátu. Jedná se o metody, jako je roubování řetězců hydrofilních polymerů, které potom tvoří bariéru mezi tkání a materiálem. Druhou možností jsou pak metody, u kterých je výsledný povrch bioaktivní, a je tedy připraven tak, aby vzbuzoval nějakou specifickou odpověď organismu [7]. Příkladem může být vytvoření bioaktivní vrstvy pomocí imobilizace molekul heparinu nebo jiných biologických látek [32], jako je albumin nebo molekuly DNA, nebo látky obsahující funkční skupiny se záporným nábojem, především skupiny sulfonové a karboxylové [20].

Klasické rozdělení metod povrchové modifikace materiálů je rozdělení na metody fyzikální a chemické, a zatímco fyzikální metody zahrnují především modifikaci povrchu působením plasm, čímž dochází k vytvoření specifických funkčních skupin, nebo adsorpci hydrofilních komponent, polymerních řetězců či jiných látek na povrch upravovaného materiálu, chemické metody jsou obvykle zaměřené na roubování polymerních řetězců na povrch materiálu (v mnoha případech hydrofilního polyetylenoxidu, kde se efekt zvyšuje s rostoucí délkou řetězce [20], podobným případem je použití polyetylen glykolu [17] nebo polymerních zwitterionů [7]), případně roubování látek s vhodnými funkčními skupinami, které umožňují další modifikace např. pomocí albuminu nebo heparinu. Roubovací reakce může být někdy iniciovaná teplem, zářením, působením plasm nebo proudem elektronů.

Příkladem povrchových úprav prostředků používaných ve zdravotnictví může být modifikace membrán používaných v dialyzátorech. Tyto membrány se standardně vyrábí z polyetersulfonu, který ale nevykazuje dobrou hemokompatibilitu, a v současné době existuje mnoho různých metod, které se používají pro zlepšení jeho vlastností. Některá aditiva fungují jako antikoagulanty, zpomalují tedy tvorbu krevních sraženin a prodlužují

koagulační časy, některé biologické látky, jako je albumin, vykazují anti-trombogenní efekt a zlepšují kompatibilitu materiálu s buňkami. Povlak tvořený albuminem a heparinem omezuje adhezi krevních destiček, problémem je ale vysoká rozpustnost albuminu ve vodných roztocích a relativně nízká odolnost povlaku. Další možností jsou potom tvorba povlaku pomocí látek obsahujících karboxylové a sulfátové skupiny, nebo polyetylenoxid, v obou těchto případech dochází k redukci adsorpce krevních proteinů [20]. Jinou možností je úprava materiálu tak, aby napodoboval povrch buněčné membrány, adsorpci proteinů dobře odolávají například glykoproteiny obsahující glukózu, které zároveň vykazují také nižší adhezi krevních destiček a menší intenzitu jejich morfologických změn vlivem jejich aktivace [7].

3.2.2.1 Polyetylen glykol

Polyetylen glykol (PEG), který je vysoce hydrofilní a jehož inertní charakter je spojen s minimální hodnotou volné energie na rozhraní s vodou [20], je jedním z nejčastěji používaných právě díky své schopnosti odolávat adsorpci různých druhů bílkovin, inhibovat adhezi krevních destiček a bránit zachycování buněk, konkrétní vlastnosti potom záleží také na molekulární hmotnosti, hustotě naroubovaných řetězců a obsažených funkčních skupinách. Vzhledem k problémům při přípravě povrchu, který by byl hustě pokrytý PEG řetězcí, z polymeru o vysoké molekulární hmotnosti, je možné pro přípravu použít PEG makromonomery. Výsledkem reakce je navázání řetězců, hustě pokrývajících povrch materiálu (jedny z prvních studií používaly jako substrát například oxid křemičitý). Jako výchozí látku je možno použít různé typy PEG makromonomerů, případně i jiných sloučenin, než je polyetylen glykol, např. poly(2-etyl-2-oxazolín) (PEtOX), který výrazným způsobem omezuje adsorpci některých proteinů, nebo látky obsahující hydroxylové skupiny, které jsou vysoce hydrofilní a vykazují odolnost nesespecifické adsorpci proteinů [7].

3.2.2.2 Amfifilní látky

Nejběžnějším způsobem úpravy polyetersulfonových membrán je ale smíchání s polyvinylpyrrolidonem (PVP), který funguje jako hydrofilní aditivum. Při tomto typu úpravy však často dochází k vyluhování PVP z matrice, což se dá řešit navázáním PVP na styren nebo PMMA, které zajišťují silnější vazbu mezi hydrofilním PVP a hydrofobním polyetersulfonem. Podobně jsou vlastnosti materiálu vylepšeny v případě, že je aditivem nanokompozit PVP se silikou.

Možné je také použití jiných amfifilních látek, které po smíchání s polyetersulfonem nebo jinými polymery spontánně migrují na povrch membrány, zvyšují smáčivost materiálu vodou a vykazují lepší biokompatibilitu [20], důležité je také použití amfifilních polymerů, původně připravovaných proto, aby napodobovaly fosforylcholin, který se obvykle vyskytuje v buněčné membráně. Navázané amfifilní řetězce mají dobré výsledky při omezování adsorpce proteinů, což je mimo jiné způsobeno i hydratační vrstvou, která vzniká při solvataci kladně i záporně nabitých funkčních skupin. Výborné antitrombotické vlastnosti mají i polymery založené na fosforylcholinu, hůře se u nich však kontroluje hustota řetězců a jejich molekulární hmotnost [7].

3.2.2.3 Funkcionalizace

V biomedicině bývají také často používány polysulfonové membrány, díky svým dobrým mechanickým vlastnostem a chemické inertnosti. Jejich nízká smáčivost a nedokonalá kompatibilita s krví je ale překážkou jejich dalšího užití. Pro získání větší smáčivosti a hemokompatibility bývají modifikovány, například chemicky. Na povrch polysulfonu mohou být zavedeny různé typy funkčních skupin, s prokazatelným nárůstem smáčivosti, při použití karboxylových nebo sulfonových skupin dochází také ke zlepšení hemokompatibility materiálu. Další metodou úprav polysulfonu je potom třeba roubování jiných látek na jeho povrch [46].

Protože většina krevních proteinů má záporný náboj a mají tedy menší tendence adsorbovat na záporně nabitým povrchu, bývají biomateriály (např. polyetersulfon) často upravovány karboxylací nebo sulfonací (chlorsulfonací), které zvýší poměr záporně nabitých funkčních skupin a tím negativní náboj polymeru [20]. Použití povrchů s různým poměrem karboxylových a metylových funkčních skupin při inkubaci s krví ukázalo, že materiál se 100% obsahem karboxylových funkčních skupin silně podporuje kontaktní aktivaci koagulační kaskády, a s poklesem množství $-COOH$ skupin klesá také intenzita aktivace krevního srážení. Zároveň povrchy s velkým množstvím hydrofilních $-COOH$ skupin vykazují sníženou míru adheze krevních destiček a jejich množství se zvyšuje s rostoucím obsahem metylových skupin, což odpovídá tomu, že krevní proteiny (jako fibrinogen) mají sklony adsorbovat spíše na hydrofobní povrchy. Ani samotná adheze destiček na hydrofobním povrchu ani samotná kontaktní aktivace koagulace na záporně nabitým povrchu však bez druhého jevu nevedla k výrazné tvorbě sraženiny. Pokud ale došlo ke kontaktní aktivaci, stačila k propagaci krevního srážení i jen malé množství krevních destiček, vzhledem

k tomu, že se oba procesy vzájemně doplňují a podporují. Zároveň to také znamená, že při posuzování hemokompatibility materiálu je nutné posuzovat celý proces a ne jen jeho části [18].

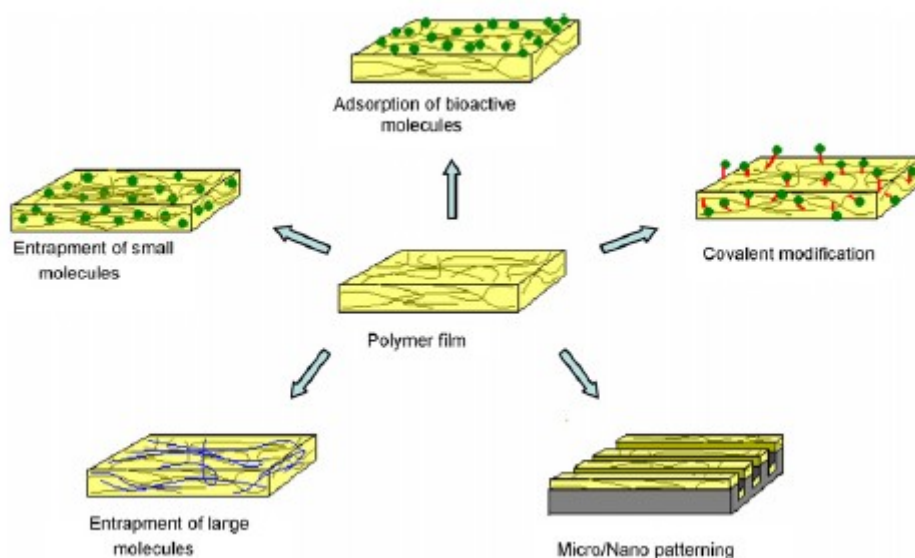
3.2.3 Problémy

Jedním z problémů při používání materiálů, které jsou upravené podobným způsobem, je možná delaminace vlivem napětí způsobeném tokem krve, dalšími problémy může být složitost přípravy nebo cena, v poslední době se proto pozornost studií výrazně obrátila směrem k vlivu topografie na biokompatibilitu materiálu, především s ohledem na buňky, méně už na hemokompatibilitu, kde se výzkum soustřeďuje spíše na chemické úpravy povrchu [32]. I po letech výzkumu ale krevní srážení při kontaktu krve s cizorodým materiálem zůstává důležitým faktorem, který omezuje a zpomaluje vývoj některých lékařských pomůcek, a ke srážení krve nakonec dochází na všech v současnosti používaných materiálech [16]. Příprava materiálu, který by byl skutečně hemokompatibilní, je tak stále jedním z hlavních problémů v oboru biomateriálů [44], podobně jako příprava materiálu, který by nevyvolával odpověď imunitního systému organismu [7].

3.3 Modifikace vodivých polymerů

Vodivé polymery tvoří samostatnou skupinu polymerních materiálů a díky své unikátní kombinaci vlastností si našly široké uplatnění v různých oborech, od elektroniky po biologické aplikace, především proto, že mají relativně dobrou biokompatibilitu, mohou pojmout a pak kontrolovaně uvolňovat některé biologicky účinné molekuly (tzv. reverzibilní dopování), umí přenášet náboj a dají se snadno modifikovat tak, aby jejich vlastnosti odpovídaly požadavkům aplikace [47], a to jak během syntézy, tak i pomocí dodatečných úprav. Vodivé polymery obecně umožňují výrazné úpravy svých vlastností, především elektrických a mechanických, a řízení jejich vlastností se obvykle soustřeďuje na vodivost, molární hmotnost a rozpustnost ve vodě. Do jisté míry je jejich vlastnosti možné ovlivnit podmínkami syntézy, jako je teplota nebo polymerace v různých kyselinách [48].

Dva základní požadavky kladené na vodivé polymery využívané v medicíně jsou kromě elektrické vodivosti biokompatibilita a redoxní stabilita materiálu, jinak se konkrétní požadavky liší a mohou zahrnovat smáčivost materiálu, drsnost povrchu nebo třeba funkcionizaci povrchu biologickými molekulami nebo specifickými funkčními skupinami.



Obrázek 11: způsoby povrchové modifikace vodivých polymerů [47]

Klasický způsob modifikace vodivých polymerů je inkorporace bioaktivních molekul do materiálu. Toho se dá dosáhnout několika způsoby, jak je vidět na obrázku 11, od adsorpce na povrch (příkladem jedny z nejstarších úprav polypyrrolu používaného pro výrobu senzorů glukózy nebo DNA biosenzorů), kdy ale může docházet k odseparování, dalšími možnostmi jsou dopování materiálu látkou s požadovaným biologickým efektem, nebo přidání látky přímo do reakční směsi, což je v současnosti nejpoužívanější, hlavně u elektrochemických polymerací [47]. Bylo dokázáno, že typ dopantu má vliv také na vlastnosti, jako jsou morfologie materiálu, drsnost jeho povrchu nebo smáčivost, které jsou důležité pro použití polymeru jako biomateriálu, protože ovlivňují adhezi a proliferaci buněk [49]. Výhodou této metody je jednoduchost, mírné reakční podmínky a polymerace i imobilizace bioaktivních molekul probíhající v jednom kroku, nevýhodou to, že hydrofobní polymer může narušovat prostorové uspořádání biologických molekul, a tím ovlivňovat jejich funkci. Způsobem, u kterého dochází k tvorbě kovalentních vazeb, je potom úprava monomeru tak, aby obsahoval požadované funkční skupiny předtím, než dojde k polymeraci, možná, i když u nerozpustných polymerů složitější, je potom také úprava po ukončení polymerace, případně funkcionalizace bioaktivními molekulami. Důležitý je taky vliv sterických efektů inkorporovaných funkčních skupin na uspořádání konjugovaného systému vazeb, a tím pak na elektrickou vodivost materiálu. Možné je i použití standardních metod modifikace, jako je roubování [47], které například u polyanilinu snížilo adsorpci proteinů až o 80 % oproti čistému polyanilinu, pokud byl roubovanou látkou polyetylenoxid [50].

Povrchovou modifikaci vodivých polymerů je možno dosáhnout také změny topografie povrchu materiálu nebo jeho drsnosti, změny porozity, mechanických vlastností, redoxní stability, smáčivosti nebo degradace [47].

3.3.1 Příprava kompozitů

Uvedení vodivých polymerů do různých typů aplikací v optice, elektronice nebo biomedicíně bylo umožněno díky přípravě kompozitů, přesto je však stále problémem příprava vodivého kompozitu, který by byl homogenní. Metody, které se používají pro přípravu kompozitů na bázi polyanilinu, zahrnují disperzní polymeraci anilinu v přítomnosti matrice, radikálově iniciovanou polymeraci anilinu v matrici nebo v roztoku obsahujícím matrici, elektrochemickou polymeraci anilinu v matrici a roubování jiného polymeru na povrch polyanilinu. Existují i metody pro přípravu nanokompozitů, a přestože se všechny tyto metody často používají, nejsou příliš efektivní [51]. Přímou během syntézy je možné vytvořit také kompozity jako polypyrrol s PMMA, PVC, PS nebo PUR, dobrou biokompatibilitu vykazuje také kompozit polypyrrolu s uhlíkovými nanotrubičkami, podobně kompozit polyanilin-polypropylen, vytvořený pro aplikace v neurobiologii (tato kompozitní vlákna podporují růst některých typů neuronů), nebo polyanilin-polykaprolakton pro regeneraci srdeční tkáně.

Vodivé polymery je možné polymerovat také uvnitř hydrogelové sítě. To umožňuje přípravu elektricky vodivých hydrogelů, což je ideální například pro výrobu biosenzorů nebo zařízení na uvolňování léčiv [49]. Při přípravě hydrogelu složeného z kyseliny polyakrylové (PAA) a polyvinylalkoholu (PVA), který obsahoval nanočástice polyanilinu, bylo zjištěno, že zatímco samotný hydrogel je relativně homogenní, přidáním polyanilinu svoji homogenitu ztrácí, protože PANI molekuly tvoří v matrici shluky o rozměrech 0,5 – 2 μm , zřejmě vlivem hydrofobních interakcí. Prováděné testy hemokompatibility hodnotily tvorbu krevní sraženiny a hemolýzu a bylo zjištěno, že přidání PANI nanočástic do hydrogelu zvyšuje objem vytvořené sraženiny ve srovnání s neupraveným hydrogelem, a zároveň dochází ke snížení intenzity hemolýzy [51].

3.3.2 Adsorpce látek na povrch

V případě, kdy byl na povrch polyanilinu adsorbován blokovaný kopolymer složený ze dvou typů bloků, kdy jeden byl hydrofobní a druhý hydrofilní, a substrát byl po vytažení ze solventu ponořen do vody, došlo k orientaci kopolymeru na povrchu materiálu tak, že hydro-

filní blok zůstal vystaven vodě, zatímco hydrofobní část zůstala usazena v polymeru. Pokud byly stejným způsobem použity tříblokové kopolymery (Pluronic), došlo při testování biokompatibility ve srovnání s neupraveným polyanilinem k nižší adsorpci albuminu, a to asi o polovinu, při prodlužování hydrofilního bloku (tvořen polyetylenoxidem) pak docházelo k dalšímu poklesu adsorpce proteinů [52].

Podobným způsobem je možné použít k modifikaci polyanilinu polymerní kyselinu PAMPSA (poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)), a to buď jejím přídavkem přímo do polymerační směsi, nebo reprotonací polyanilinové báze. Při modifikaci polyanilinu reprotonací dochází k úplnému vyblokování krevní koagulace vlivem účinku na některé koagulační faktory, zároveň na povrchu modifikovaného materiálu dochází k výraznému omezení adheze krevních destiček. Pokud je PAMPSA přidána rovnou do polymerační směsi, dojde ke snížení adheze krevních destiček, ale materiál nemá prokazatelný vliv na krevní koagulaci [53].

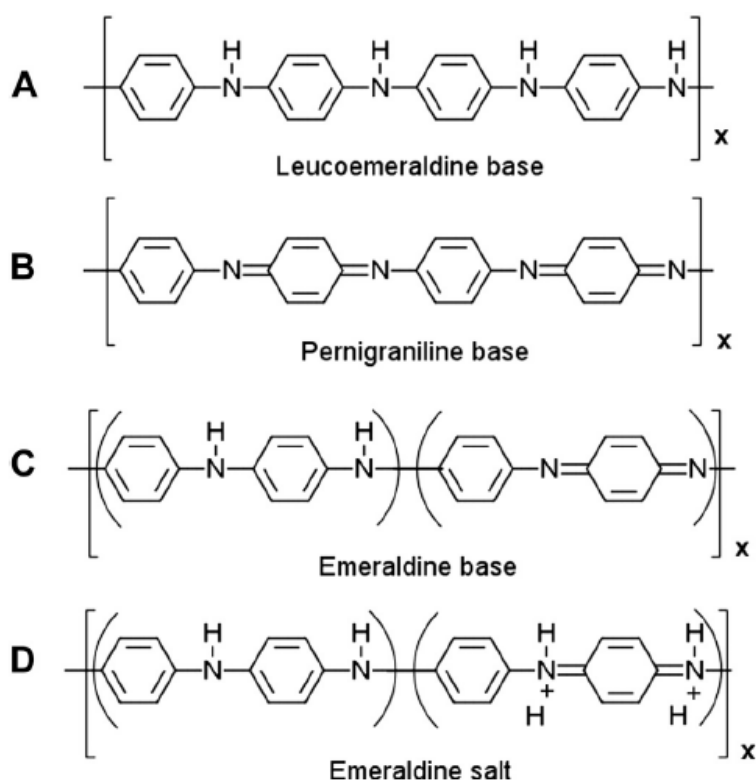
3.3.3 Imobilizace heparinu

Častým způsobem modifikace polymerních materiálů je imobilizace heparinu na jejich povrch. Při použití polypyrrolu byl polymer modifikován naroubováním řetězců PEGMA (poly(etylenglykol) metakrylát) a aktivován trichlortriazinem. Heparin byl poté imobilizován na aktivovaném povrchu reakcí mezi chloridovými skupinami trichlortriazinu a hydroxylovými nebo amino skupinami heparinu. Po provedení modifikace si polypyrrolové filmy zachovaly elektrickou vodivost (i když byla snižena), ale vykazovaly vyšší smáčivost a výrazné omezení adheze a aktivace krevních destiček. Při některých studiích byl heparin na povrchu materiálu s kladným nábojem imobilizován iontově, při kontaktu s krví ale na povrchu materiálu nevydržel, pro dlouhodobé modifikace je tedy vhodnější modifikace kovalentní. Takto modifikovaný polypyrrol může být použit jako substrát pro přichycení a růst endoteliálních buněk, podobně jako u jiných bioaktivních látek kovalentně navázaných na substrát u něj však dochází k omezení biologické funkce nejen kvůli změně jeho konformace, ale také kvůli omezenému přístupu k buňkám, proteinům nebo krvi [54].

4 POLYANILIN

Polyanilin patří do skupiny vnitřně vodivých polymerů, které byly poprvé připraveny už před několika desítkami let. Dosud bylo objeveno více než 25 různých vodivých polymerních systémů. Ty v sobě spojují vlastnosti běžných polymerů, jako je snadná příprava a zpracování, s elektrickými vlastnostmi kovů [49].

S ohledem na své vlastnosti a možnost přípravy různých struktur (kromě globulárního polyanilinu také filmy, nanotrubky nebo nanovlákná) je polyanilin jedním z nejvíce studovaných vodivých polymerů [55]. Jak je vidět na obrázku 12, vyskytuje se v různých formách v závislosti na stupni oxidace, z nichž nejvyšší vodivost vykazuje napůl oxidovaná a stabilní emeraldinová sůl. Ve srovnání s jinými vodivými polymery se polyanilin vyznačuje také vlastnostmi jako je snadná syntéza, nízká cena a dobrá stabilita, stejně jako možnost jeho přechodu mezi různými oxidačními stavy, čehož se dosahuje pomocí dopování. To je reverzibilní děj, při kterém se do struktury polyanilinu dostávají nosiče náboje (včetně některých biologických molekul), obvykle během syntézy, a druh i množství dopantu mají vliv nejen na vodivost konečného polymeru, ale i na jeho další vlastnosti.



Obrázek 12: oxidační stavy polyanilinu [50]

To, co vodivým polymerům dává jejich elektrické vlastnosti, je fakt, že umožňují přeskoky elektronů v rámci jednoho řetězce, i mezi nimi. Obecně je jejich vodivost způsobena přítomností řetězce s konjugovanými dvojnými vazbami, což umožňuje snadnější delokalizaci elektronů, důležitá je také přítomnost dopantu. K dopování dochází během syntézy a může se provádět chemicky, elektrochemicky nebo jako fotodopování, a existuje vztah mezi množstvím použitého dopantu a výslednou vodivostí, stejně jako je důležitý typ dopantu. Ty se dají rozdělit do dvou skupin, na malé a velké, které více ovlivňují mechanické vlastnosti materiálu, ale dávají stabilnější elektrochemické vlastnosti [49].

Polyanilin je obvykle syntetizován chemicky, a to oxidační polymerací anilinu ve vodném médiu, za přítomnosti oxidačního agens. Elektrická vodivost polyanilinu může být ovlivněna mnoha faktory, především pak typem dopantu, což je obvykle kyselina, nejčastěji chlorovodíková, sírová nebo sulfonová, stupněm oxidace, množstvím solventu, délkou polymerních řetězců a stupněm krystalizace [50], a zatímco vodivost polyanilinové báze se pohybuje v řádu 10^{-10} S/cm (je tedy prakticky nevodivá), jeho sůl může mít vodivost až 30 S/cm, přesné hodnoty záleží na metodě přípravy. Výrazný nárůst vodivosti je způsoben vzájemným odpuzováním nábojů dopantu, které částečně narovná polymerní řetězec a umožní volnější pohyb elektronů [49].

4.1 Biokompatibilita polyanilinu

Jedním z nejčastějších způsobů navrhovaného použití vodivých polymerů (především polyanilinu) jako biomateriálu je v podobě filmu na povrchu materiálů, které jsou již používané pro výrobu implantátů. Jedním z důvodů jsou jeho elektrické vlastnosti, dalšími pak jeho dobrá biokompatibilita, která zahrnuje dobrou reakci ve styku s peroxidem vodíku, glukózou, tuky nebo cholesterolem. Při *in vivo* testech na hlodavcích bylo dokázáno, že vodivá ani nevodivá forma polyanilinu ve styku s tkání nevyvolává tvorbu zánětů, což ukazuje na dobrou snášenlivost materiálu.

Při posuzování biokompatibility materiálu jsou nejdůležitějším faktorem vlastnosti povrchu, který přichází do styku s okolní tkání, a zkoumá se chování a tolerance materiálu *in vitro* i *in vivo*, s ohledem na tkáň i krev [56]. Pro mnoho aplikací v biomedicíně je důležitá dobrá reakce okolních buněk na biomateriál, a je proto výhodné, že různé vodivé polymery podporují růst mnoha typů buněk, a zároveň také umožňují relativně snadné vylepšení povrchových vlastností navázáním bioaktivních molekul na svůj povrch v případě, že je biokompatibilita materiálu pro danou aplikaci nedostatečná.

Je uváděno, že polyanilin podporuje růst nervových buněk, které vykazují přijatelnou adhezi k materiálu i proliferaci, a nezpůsobuje zanícení. Polyanilin je kompatibilní se srdečními myoblasty, dalším výzkumem bylo také zjištěno, že žádná z forem polyanilinu nezpůsobuje zanícení při dlouhodobých testech na krysách. Testy ukazují, že polyanilin není cytotoxický, zároveň ale vyžaduje úpravy povrchu pro zvýšení biokompatibility [47]. Při pokusech zvýšit biokompatibilitu platinových neurálních sond jejich potažením polyanilinem (modifikovaný polyetylglykolem) bylo zjištěno, že při použití polyanilinu dochází ke zvýšení intenzity adsorpce proteinů oproti vzorkům neobsahujícím polyanilin, tento efekt byl ještě zvýrazněn, pokud během inkubace docházelo k elektrické stimulaci vzorků [57].

Ukázky biokompatibility polyanilinu *in vivo* vyvolaly zájem o jeho aplikaci v oblasti tkáňového inženýrství, přestože studium možného využití polyanilinu bylo pomalejší než výzkum polypyrrol pro využití v podobných aplikacích. Studie biokompatibility neupravovaného polyanilinu prokázaly nepřítomnost výrazného zanícení v místě implantátu při použití polyanilinu, zároveň však dochází k enkapsulaci implantátu fibrózní tkání a k výskytu buněk imunitního systému v místě implantátu [47]. Některé studie však naopak uvádějí špatnou buněčnou adhezi a růst a špatnou kompatibilitu polyanilinu s tkání, v některých případech i cytotoxicitu [49], což je nejspíše způsobeno rozdíly v přípravě materiálu. Polyanilin je nerozpustný ve vodě a ve vodných roztocích je stabilní, sám o sobě je proto netoxický a jeho případná cytotoxicita je pravděpodobně způsobena možnými nízkomolekulárními komponenty, což můžou být anilinové oligomery nebo kyseliny, které byly použity při přípravě polymeru. Důležitá je proto purifikace materiálu [55]. Z tohoto důvodu jsou vyhledávány metody modifikace polyanilinu tak, aby došlo ke zlepšení biokompatibility za současného zachování elektrických vlastností materiálu [47].

První pokusy o použití polyanilinu pro tkáňové inženýrství se objevily po zjištění, že je polyanilin dlouhodobě biokompatibilní (testy prováděné na krysách, po dobu 90 týdnů), bez známek toxicity nebo zanícení okolní tkáně. *In vitro* byla biokompatibilita polyanilinu nebo směsí polyanilinu s jinými polymery potvrzena u mnoha typů buněk, při pokusech *in vivo* ale občas dochází k mírnému zanícení nebo zapouzdření, proto je na rozdíl od polypyrrolu použití polyanilinu v biologických aplikacích omezeno, což je zčásti způsobeno i tím, že polyanilin není biodegradabilní a jeho dlouhodobá přítomnost v organismu může vést k jeho opotřebování a znehodnocování. Tento problém je potom možné řešit přípravou kopolymeru na bázi polyanilinu s hydrolyzovatelnými skupinami, který si udrží elektrické

vlastnosti polyanilinu a je biodegradabilní. Bylo také prokázáno, že polyanilin působí antibakteriálně, pravděpodobně kvůli přítomnosti kyselých dopantů na polymerním řetězci.

Úprava materiálových vlastností pro jejich použití v konkrétní aplikaci je proveditelná různými způsoby, a jedná se o purifikaci materiálu po syntéze, úpravu jeho povrchových vlastností, přípravu kopolymerů nebo kompozitů polyanilinu s biokompatibilními materiály jako například želatina [50], nebo navázání biologických molekul na polymerní řetězec, ať už kovalentně, adsorpcí, přidáním látky přímo do reakční směsi nebo dopováním [49].

4.2 Aplikace polyanilinu

Právě s ohledem na své elektrické vlastnosti jsou vodivé polymery (potažmo polyanilin) aplikovány například v diodách, fotovoltaických panelech [50], senzorech nebo jako ochrana proti korozi [58].

4.2.1 Aplikace polyanilinu v medicíně

Další možností využití polyanilinu jsou medicínské aplikace, které by umožňovaly nejen monitorování životních funkcí živého organismu, ale i jeho stimulaci, díky elektrickým vlastnostem, které by mohly umožnit přenos náboje mezi elektrony a ionty přes rozhraní mezi tkání a povrchem elektrody. Tato problematika se soustřeďuje především na srdeční a nervovou tkáň [55]. Pro zvýšení citlivosti a specifčnosti takového senzoru je možno použít redoxní mediátory (např. ferrocen), které zlepšují přenos elektronů. Do polyanilinového filmu je možné je dostat během polymerační reakce, jako dopanty, nebo je chemicky navázat na monomer [47]. Příkladem použití polyanilinu pro přípravu senzorů je vodivý biosenzor pro detekci patogenních bakterií, který pro biologickou detekci bakterií používá protilátky a polyanilin jako převodník a zesilovač signálu [48].

Použití polyanilinu pro medicínské aplikace je omezeno možnostmi zpracování, tím, že může způsobovat chronické záněty a nepodléhá biodegradaci, přesto se polyanilin používá jako materiál pro výrobu biosenzorů nebo pro tkáňové inženýrství, hlavně kvůli možnosti přímého dodávání elektrických stimulů buňkám, zatímco charakteristika materiálu samotného umožňuje výraznou kontrolu nad jeho elektrickými, optickými i biologickými vlastnostmi [49]. Zároveň bylo dokázáno, že vodivé polymery jsou kompatibilní s buňkami a jinými biologickými molekulami (biokompatibilita polyanilinu bylo prokázána *in vitro* i *in vivo*), a jsou proto používány například jako substráty pro buněčnou stimulaci nebo syntézu DNA, nedávno také jako kompozity na bázi polyanilinu k přípravě scaffoldů pro tkáňo-

vé inženýrství, jako antibakteriální substráty nebo nosiče léčiv. V současnosti se zkoumají také kopolymery polyanilinu, které by byly zároveň vodivé a biodegradabilní [50].

Protože mnoho buněčných funkcí, především adheze, proliferace a migrace, mohou být ovlivňovány elektrickou stimulací [59], elektrická vodivost těchto materiálů může mít mnoho výhodných účinků na biologické systémy a tkáně, včetně podpory regenerace nervů, což umožňuje jejich použití pro scaffoldy schopné elektricky stimulovat buňky, což v případě nervových buněk nejčastěji spěje k intenzivnějšímu růstu neuritů. To bylo prokázáno i při použití scaffoldu tvořeného nanovláknem polyanilinu dopovaného směsí poly(ϵ -kaprolaktonu) a želatiny [49]. Takto používaný scaffold by měl nejen směřovat růst axonů, aby došlo k přemostění místa s porušeným nervstvem, ale také zajišťovat cestu pro biomolekuly uvolňované na koncích poraněných nervů [1]. Elektrická stimulace ale může podporovat také proliferaci jiných typů buněk, jako NIH-3T3 fibroblasty nebo kardiomyocyty [49], a potencionálním adeptem pro materiál na výrobu scaffoldů je i kompozit kolagenu a polyanilinových nanovláken [58].

Protetika, jako jsou neurální sondy nebo implantabilní elektrody, které jsou implantovány do mozku za účelem stimulovat okolní buňky, nebo naopak nahrávat signály z neuronů, což umožňuje ovládání například robotické končetiny. Efektivní přenos signálu ovšem vyžaduje přímý kontakt tkáně a elektrody, a pro vytvoření tohoto rozhraní se stále častěji využívá polyanilinu, který našel uplatnění také jako film pokrývající povrch elektrod tvořících neurální sondy [50].

Vhodné využití pro vodivé polymery nabízí také materiály pro řízené uvolňování léčiv nebo jiných látek (například pro zemědělství), je totiž možné připravit je v porézní podobě a uvolňování navázaných aktivních látek řídit pomocí elektrického potenciálu, a již bylo dosaženo dobrých výsledků při použití látek jako dopamin, dexametazon nebo heparin, především však s použitím polypyrrolu. K uvolňování látek však dochází ve velice krátké době, což může nebo nemusí být vhodné, v závislosti na konkrétní aplikaci, dalšími problémy jsou difuze navázaných látek do okolí, a to, že je možné na polymer navázat jen omezené množství aktivní látky. Problémem je také opakovaná elektrická stimulace.

Změny objemu materiálu při přechodu mezi jednotlivými redoxními stavy vodivých polymerů a jeho schopnost vykonávat tímto způsobem práci v závislosti na elektrochemické reakci, nabízejí také využití v podobě umělých svalů, problémem je však dlouhá reakční doba [49].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

S ohledem na charakter použitých testovacích metod byla v laboratořích Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně provedena jen část experimentálních prací, konkrétně měření povrchové energie materiálu, měření vodivosti a testy buněčné adheze a proliferace na povrchu materiálu.

Analýza vlivu materiálů na parametry krevní koagulace byla prováděna v Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně.

5.1 Přístrojové vybavení

5.1.1 See system

See system (surface energy evaluation system) (Advex Instruments, Česká republika) je zařízení používané pro vyhodnocení kontaktního úhlu a povrchové energie materiálu. Měření se provádí pomocí nanesení kapky na rovný povrch pevné látky, přičemž se kapka může rozlít do stran po povrchu materiálu, nebo si do různé míry může zachovat kulatý tvar, v závislosti na použité kapalině a vlastnostech materiálu. Kontaktní úhel kapky je vyhodnocen softwarem a určuje povrchovou energii materiálu a jeho smáčivost. Podle smáčivosti vodou se pak materiály rozdělují do dvou skupin, a to na smáčivé (hydrofilní) a nescháčivé (hydrofobní) [60].

5.1.2 Sysmex CA-1500

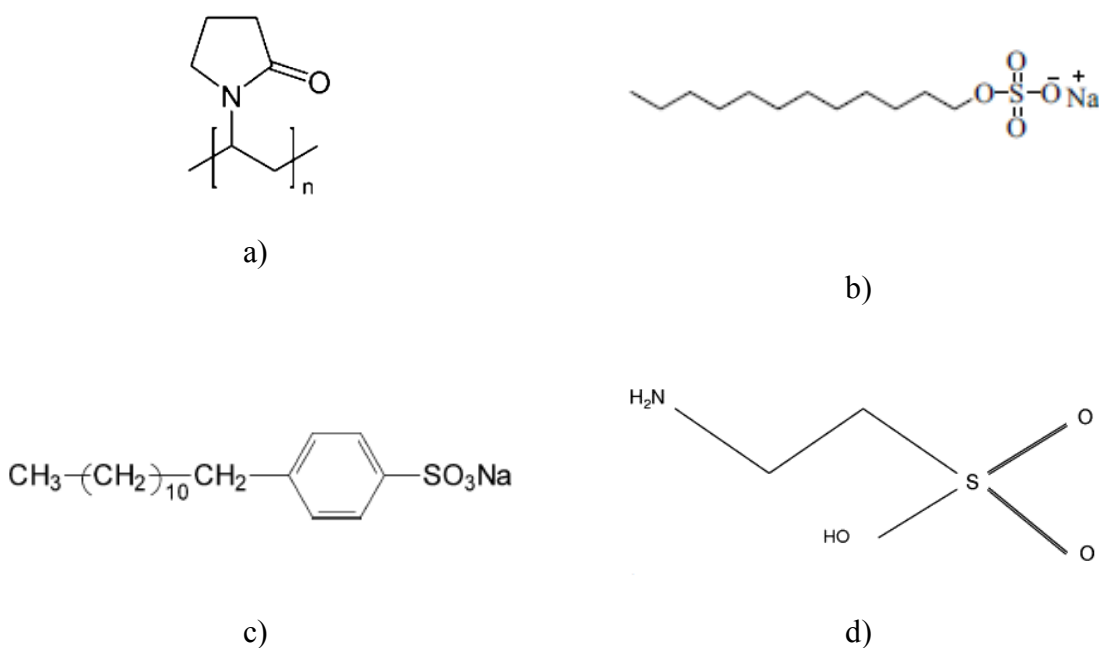
Přístroj Sysmex CA-1500 (Siemens, Německo) je automatický systém pro analýzu koagulačních, chromogenních a imunologických testů [61]. Měření parametrů koagulace je prováděno opticky, s použitím světla o vlnové délce 660 nm. To prochází vzorkem a hodnotí změnu hustoty, pomocí změny rozptylu světla. Získané údaje jsou zpracovány bodovou detekční metodou. Čas koagulace je pak čas potřebný k tomu, aby bylo dosaženo konkrétního stupně rozptylu světla, výsledkem testu je koagulační křivka. Jinou metodou je metoda chromogenní, kdy se ke vzorku s reagenty po inkubaci přidá substrát měnící zabarvení. K vyhodnocení se pak využívá změna barvy vzorku, detekovaná fotodiodou, a hodnotí se jako snížení absorbance po průchodu proužkem vzorkem. Hladiny proteinů se potom odečítají z kalibrační křivky [62].

Analýzátor umí vyhodnotit testy koagulace i různé typy imunologických testů a případně této práce byl použit k vyhodnocení koagulačních parametrů PT, aPPT a TCT.

5.2 Použité látky

Pro úpravu polyanilinu byly v této práci použity polyvinylpyrrolidon (PVP, molekulová hmotnost 360000 g/mol), dodecylsulfát sodný (SDS, molekulová hmotnost 288,38 g/mol), dodecylbenzensulfonát sodný (SDBS, molekulová hmotnost 348,48 g/mol) a taurin (molekulová hmotnost 125,15 g/mol).

Tyto látky jsou rozpustné ve vodě, a jak je vidět na obrázku 13 (13a) polyvinylpyrrolidon, 13b) SDS, 13c) SDBS, 13d) taurin), všechny tyto látky mají ve své molekule hydrofilní a hydrofobní část. To umožňuje kontrolu růstu částic vytvořením pasivní vrstvy, která částicím brání v agregaci, používají se tedy (především PVP a SDS) jako povrchově aktivní látky [63],[64],[65],[66].



Obrázek 13: struktura a) PVP [63] b) SDS [67] c) SDBS [68] d) taurinu [69]

5.3 Příprava vzorků

Pro testování byly použity různé druhy polyanilinových povrchů, kromě polyanilinové soli (PANI-S) a báze (PANI-B) také polyanilinová sůl nebo báze modifikovaná pomocí PVP, SDS, SDBS nebo taurinu. Všechny vzorky byly připraveny ve formě filmů. Polyani-

linové filmy byly také připraveny na různých površích, podle způsobu dalšího testování, a to na polypropylenové fólii, na kultivačních miskách a destičkách, a v PET zkumavkách.

Vzorky polyanilinu používané v této práci byly připraveny standardně, oxidací anilin hydrochloridu (Iach:ner, Česká republika) amonium peroxydisulfátem (APS, Sigma-Aldrich, USA). Byly připravené vodné roztoky obou látek (anilin hydrochlorid $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$, amonium peroxydisulfát $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$), jejich smícháním při pokojové teplotě začala polymerační reakce. Směs byla okamžitě rozlita do misek a polymerace pak probíhala po dobu 15 minut. Po ukončení polymerace byly vytvořené filmy opláchnuty $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl, aby byl odstraněn polyanilinový prášek, a po opláchnutí metanolem byly ponechány uschnout na vzduchu [70].

Vzorky PANI-S filmů, které byly deprotonací převáděny na PANI-B, byly po uschnutí na 1 hodinu ponořeny do destilované vody, a potom na 12 hodin do hydroxidu amonného (1 mol.l^{-1} , Sigma-Aldrich, USA). Po vytažení z hydroxidu amonného byly vzorky opláchnuty metanolem.

Dále byly připraveny vzorky s použitím polyvinylpyrrolidonu (PVP), dodecylsulfátu sodného (SDS), dodecylbenzenusulfonátu sodného (SDBS) a taurinu (všechny Sigma-Aldrich, USA), a to se stabilizátorem vmíchaným přímo do reakční směsi, a se stabilizátorem tvořícím film na předem připraveném vzorku PANI-S nebo PANI-B.

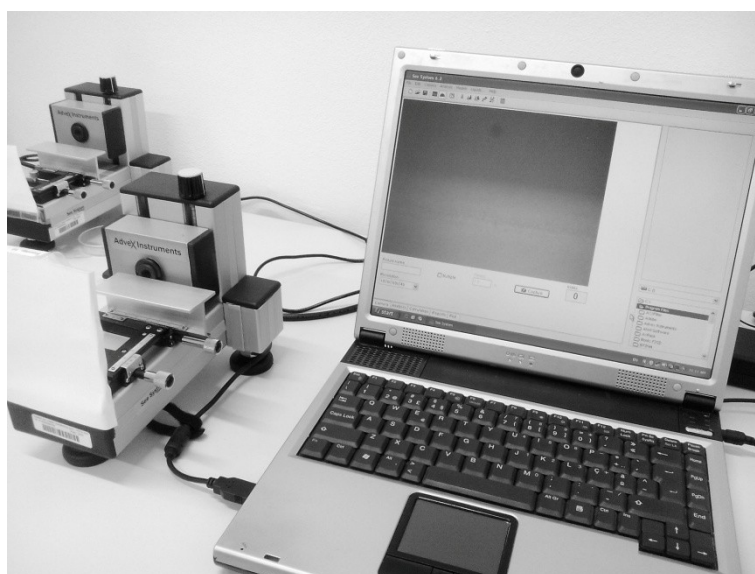
Pro polyanilin oxidovaný v přítomnosti 2 hm. % stabilizátoru (označeno jako PANI-X-M, kde X je stabilizátor) byl anilin hydrochlorid ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) rozpuštěn ve vodném roztoku stabilizátoru (40 g.l^{-1}) a smíchán s připraveným vodným roztokem amonium peroxydisulfátu ($0,25 \text{ mol.l}^{-1}$). Zatímco při použití PVP a taurinu byly používané roztoky až do smíchání s APS a začátku polymerace čiré, vodné roztoky SDS a SDBS získaly po přidání anilin hydrochloridu mléčné zbarvení, způsobené jejich micelární strukturou. Polymerace v přítomnosti stabilizátorů probíhala při pokojové teplotě, po dobu 30 minut, po ukončení reakce byly vzorky opláchnuty $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl, a poté metanolem. Pro přípravu filmu stabilizátoru na povrchu polyanilinu byly vzorky PANI-S (označeny jako PANI-X-F) a PANI-B (PANI-X-BF) ponořeny do vodného roztoku (2 hm. %) stabilizátoru. Po 24 hodinách byly přebytečné roztoky vylity a vzorky byly opláchnuty metanolem. V případě použití dodecylsulfátu sodného docházelo při přípravě vzorků PANI-SDS-F a PANI-SDS-BF k částečnému vykrystalizování SDS z roztoku na povrch vzorků, a to především při přípravě vzorků na kultivačních miskách.

Ve všech případech byly vzorky po opláchnutí metanolem ponechány uschnout na vzduchu.

5.4 Povrchová energie

Vzorky pro měření povrchové energie byly připraveny jako filmy na biodegradabilní polypropylenové fólii (Snopake, obdélníky o rozměru 3x7 cm), popsáním způsobem.

Pro měření povrchové energie byl použit software „See system“, s použitím počítače s připojenou kamerou, jak je znázorněno na obrázku 14. Kapalinami, které byly použity pro měření, byly destilovaná voda, etylenglykol a diiodometan nebo 1-bromnaftalen (všechny Sigma-Aldrich, USA). Používaný objem kapek byl 5 μl . Povrchová energie zkoumaných materiálů byla ze získaných údajů vypočítána pomocí metody kyselina/zásada.



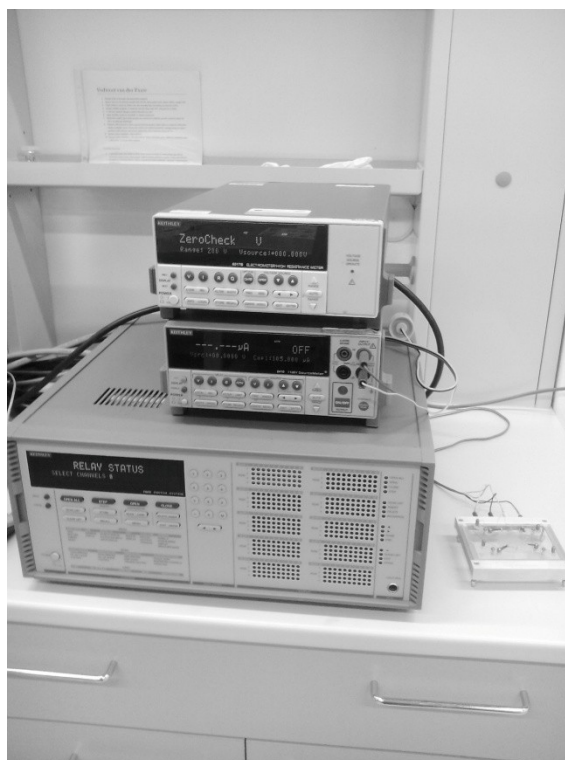
Obrázek 14: počítač s připojenou kamerou použité při měření povrchové energie

5.5 Měrná elektrická vodivost

Polyanilinové filmy použité pro měření vodivosti byly připraveny popsáním způsobem. Jako substrát byla použita biodegradabilní polypropylenová fólie (Snopake) v podobě čtverců o rozměru 2,5 cm, filmy byly na substrátu připraveny pouze z jedné strany.

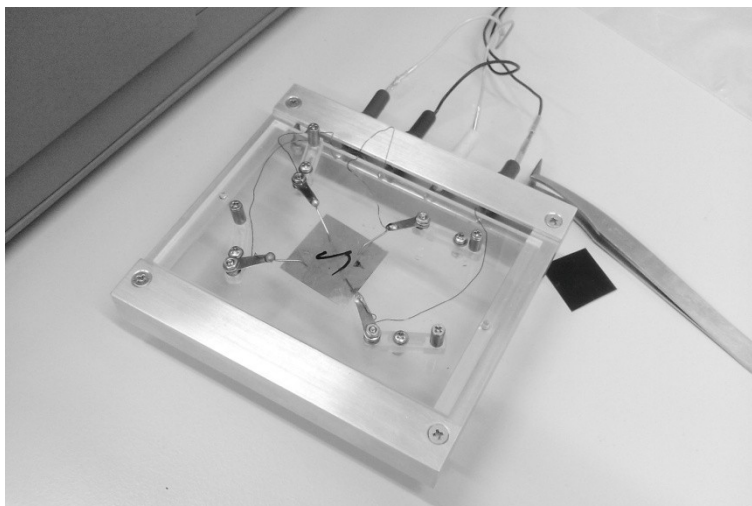
Vodivost materiálu byla hodnocena metodou van der Pauw, určené k měření měrného elektrického odporu tenkých vzorků. Ta s použitím čtyř elektrod na držáku připojeném

k aparatuře obsahující scanner K7002, programovatelný napěťový zdroj K2410, digitální elektroměr K6517, spínací kartu K7011-S (všechno Keithley Instruments Inc., USA), a osobní počítač se dvěma PCI kartami (GPIB karta a převodníková karta AD25PCI) znázorněné na obrázku 15, měří měrný odpor materiálu. Získané hodnoty byly poté výpočtem převedeny na měrnou elektrickou vodivost.



Obrázek 15: zařízení pro měření vodivosti materiálu (scanner, zdroj, elektroměr, držák s elektrodami)

Přístroj neumožňuje měření vzorků s vodivostí nižší než 10^{-4} S/cm, ty tedy byly vyhodnoceny jako nevodivé. Měření probíhalo jako cyklické měření při konstantním proudu, hodnota proudu byla $1 \cdot 10^{-5}$ A, jako tloušťka vzorku byla udána hodnota 15 μm . Vzorky byly vkládány do držáku tak, aby bylo možné umístit měřicí elektrody po obvodu vzorku, jak je možné vidět na obrázku 16, se zajištěním dobrého kontaktu mezi elektrodami a povrchem vzorku. Měření probíhalo ve třech cyklech, se dvěma různými vzorky pro každou použitou úpravu materiálu. Samotné vyhodnocení probíhalo pomocí programu VDP.



Obrázek 16: vzorek umístěný v držáku s elektrodami

5.6 Testy krevní koagulace

Pro testy krevní koagulace byly vzorky připraveny na povrchu PET VACUETTE® zkumavek (greiner bio-one, Rakousko), určených pro odběry krve. Zkumavky byly před použitím vypláchnuty destilovanou vodou, aby byly zbaveny nánosů K3EDTA.

Z důvodu předchozího testování krevní koagulace s použitím polyanilinových filmů obsahujících PVP a SDS byly pro přípravu vzorků vybrány pouze materiály modifikované použitím SDBS a taurinu, a to vzorky připravované jako filmy na povrchu PANI soli a báze (PANI-X-BF, PANI-X-F), i vzorky se stabilizátory přidanými přímo do reakční směsi (PANI-X-M). Pro posouzení vlivu modifikace materiálu na hemokoagulaci byly vybrány parametry PT (pro-thrombin time), aPPT (activated partial thromboplastin time) a TCT (thrombin clotting time). Pro testování byla použita krev, která byla odebrána dobrovolným dárcům, v souladu s Helsinskou deklarací. Všechny testy byly prováděny v Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně. Hodnoty pro každý vzorek byly změřeny dvakrát.

Test PT se používá k hodnocení vnější a společné dráhy krevní koagulace. Pro jeho provedení je třeba vzorek žilní krve dekalciфикovat (krev se odebírá do zkumavky s citrátem nebo oxalátem), aby nedošlo k předčasnému srážení krve. Krevní buňky jsou od plasmy odděleny centrifugací, a test se pak provádí přidáním krevní plasmy ke zdroji tkáňového faktoru, aby došlo k přeměně protrombinu na trombin. Vzorek je na jednu až dvě minuty ponořen do vodní lázně o teplotě 37 °C, než se přidá CaCl_2 , který vyblokuje působení citrátu a umožní srážení krve. Sledovaný čas se měří od chvíle, kdy dojde k přidání CaCl_2 , do

doby, než se krev srazí. Parametr PT hodnotí aktivitu koagulačních faktorů V, VII a X, dále také fibrinogenu a protrombinu, jeho fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí cca 12 – 13 s [71].

Podobně jako při hodnocení PT je i pro testy aPPT používána dekalciifikovaná a centrifugovaná krev. Ta je inkubovaná při teplotě 37 °C, potom se do vzorku přidá vápník a aktivatory (kefalin a kaolin, všechno předehřáté na 37 °C). Čas se měří od přidání vápníku do vytvoření krevní sraženiny. Test aPPT hodnotí vnitřní a společnou dráhu krevní koagulace, s fyziologickými hodnotami cca 27 – 35 s. Vyšší hodnoty ukazují na deficit koagulačního faktoru XII, XI, IX, VIII nebo některého z faktorů společné dráhy krevní koagulace [72].

Test TCT se provádí přidáním bovinního nebo lidského trombinu ke krevní plasmě chudé na destičky (při teplotě 37 °C) a hodnotí rychlost přeměny fibrinogenu na fibrin. Zároveň je tento test citlivý na přítomnost inhibitorů koagulace. Jeho hodnoty u zdravého člověka se pohybují v rozmezí 13 – 15 s. K prodloužení tohoto času dojde při obsahu fibrinogenu nižším než 1 g/l [73], zatímco jeho normální obsah v krvi je asi 3 g/l [15].

5.7 Testy buněčné adheze

Vzorky pro testy buněčné adheze byly připraveny na povrchu kultivačních misek o průměru 3,5 cm (TPP, Švýcarsko), jako referenční materiál byl použit tkáňový polystyren. Všechny vzorky byly před použitím sterilizovány pomocí UV záření (258 nm), vyzařovaného nízkotlakou Hg lampou (UV-C Long Life 30W/G30TB, Phillips, Holandsko).

Pro testy buněčné adheze byly použity fibroblasty (NIH/3T3, ATCC CRL-1658, USA). Buňky byly na misky nasazeny 14 dní po přípravě vzorků, v koncentraci 10^6 buněk/ml kultivačního média. Po dobu 3 hodin byly buňky kultivovány při teplotě 37 °C, s použitím média DMEM, s vysokým obsahem glukózy, 10% přidavkem telecího séra a přidavkem antibiotik Penicillin/Streptomycin 100 U/ml (všechno BioSera, Francie). Poté byly misky opláchnuty pomocí PBS a následně fotografovány při 40 násobném zvětšení.

5.8 Testy buněčné proliferace

Vzorky pro testy buněčné proliferace a morfologie byly připraveny stejným způsobem jako ostatní vzorky, s filmy syntetizovanými na povrchu 24-jamkových kultivačních destiček (TPP, Švýcarsko), jako referenční materiál byl stejně jako u testů buněčné adheze použit

tkáňový polystyren. Vzorčky byly sterilizovány UV zářením (258 nm), vyzařovaným nízkotlakou Hg lampou (UV-C Long Life 30W/G30TB, Phillips, Holandsko).

Buněčnou linií použitou pro hodnocení buněčné proliferace a morfologie byly myší fibroblasty (NIH/3T3, ATCC CRL-1658, USA). Buňky byly nasazeny na povrch testovaných materiálů 5. den po přípravě vzorků, v koncentraci 10^5 buněk/ml kultivačního média, kultivovány při teplotě 37 °C. Ke kultivaci bylo použito médium DMEM, s vysokým obsahem glukózy, 10% přídatkem telecího séra a přídatkem antibiotik Penicillin/Streptomycin 100 U/ml (všechno BioSera, Francie). Buňky byly fotografovány při 100 násobném zvětšení po 24 a 48 hodinách.

Po 48 hodinách kultivace buněk na površích testovaných materiálů byla pomocí fluorescenční mikroskopie zvýrazněna jádra a cytoskelet. Před fluorescenčním barvením byly buňky fixovány 4% roztokem formaldehydu (Penta, Česká republika) po dobu 15 minut, opláchnuty PBS (Invitrogen, USA) a na 5 minut zality 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) pro permeabilizaci buněk. Poté byly vzorčky 3 krát opláchnuty s použitím PBS. Následně byly buňky zality PBS a obarveny fluorescenčními barvivy, konkrétně barvami Hoechst 33258 (Invitrogen, USA), v koncentraci 5 µg/ml PBS, a ActinRed™ (Thermo Fisher Scientific, USA), v koncentraci 2 kapky/ml PBS. Vzorčky byly po dobu 30 minut inkubovány ve tmě a poté fotografovány při 100 násobném zvětšení pomocí inverzního mikroskopu s fázovým kontrastem (Olympus IX 81, Japonsko).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Stanovení povrchové energie

Při vyhodnocování povrchové energie zkoumaných materiálů bylo zjištěno, že hodnoty jejich povrchové energie se od sebe výrazně liší. Vzorky byly měřeny v průběhu dvou týdnů, aby byla známa také stabilita v čase, a ze získaných výsledků (uvedeny v tabulce 3) je možné vyvodit, že ve srovnání s referenčními vzorky PANI-S a PANI-B vykazují některé modifikované materiály (především materiály obsahující polyvinylpyrrolidon) vyšší povrchovou energii, a to o několik mN/m. Pro srovnání, povrchová energie PANI-S se pohybuje okolo 47 mN/m, zatímco vzorky, které mají na svém povrchu film tvořený PANI-PVP, mají povrchovou energii v rozmezí 50 – 70 mN/m. Jsou tedy výrazně hydrofilnější než PANI-S, ve srovnání s ostatními vzorky, jejichž povrchová energie se pohybuje zhruba ve stejných hodnotách jako povrchová energie referenčních vzorků, tedy PANI-S a PANI-B.

Hydrofilní povrchy se vyznačují sníženou adsorpcí krevních bílkovin [20], což bylo dokázáno například studií, ve které po modifikaci materiálu, jež vedla ke zvýšení jeho hydrofility, došlo na povrchu materiálu ke snížení intenzity adheze krevních destiček a zvýšení množství neaktivovaných krevních destiček [74]. Podobně byl vliv povrchové energie na adsorpci krevních bílkovin, s poklesem intenzity adsorpce zároveň s rostoucí hodnotou povrchové energie, prokázán také srovnáním adsorpce krevních bílkovin na polymerních materiálech, jako jsou polystyren, PMMA a polydimetylsiloxan. Ve všech těchto případech dochází k výrazně intenzivnější adsorpci na materiálech s nižší povrchovou energií, stejné výsledky vykazují také povrchy modifikované přidáním hydrofilních funkčních skupin. Tato studie ukázala pokles míry adsorpce fibrinogenu, adheze krevních destiček a jejich aktivace, zároveň s rostoucím obsahem hydrofilních hydroxylových skupin [17]. Podobně při studii, která zkoumala hemokompatibilitu kopolymeru obsahujícího hydrofilní DPEG metakrylát, bylo zjištěno, že s rostoucím obsahem DPEG metakrylátu roste hydrofilita materiálu (pokles kontaktního úhlu vody z 89,4° při 10% obsahu DPEG metakrylátu v kopolymeru až na 20,9° při 90% obsahu). Úměrně tomu dochází k výraznému poklesu adsorpce albuminu a fibrinogenu na povrchu takového materiálu a k poklesu adheze krevních destiček, u kterých navíc nedochází k aktivaci [75].

Tabulka 3: hodnoty povrchové energie materiálů

		povrchová energie [mN/m]						
		den 0	den 1	den 4	den 7	den 11	den 14	
PANI-S	γ^{tot}	56	44	48	47	49	45,5	
	σ^+	5	5	3	2	2	2,0	
	σ^-	5	3	3	2	2	0,5	
PANI-B	γ^{tot}	52	52	49	50,3	49	51,1	
	σ^+	2	2	8	0,6	2	0,8	
	σ^-	2	3	3	1,0	4	2,0	
PANI-PVP	M	γ^{tot}	70	45	64	39	45	47
		σ^+	6	4	9	18	4	9
		σ^-	7	5	12	4	2	3
	BF	γ^{tot}	72	68	61	64	47	56
		σ^+	10	5	12	23	15	5
		σ^-	9	4	14	14	6	6
	F	γ^{tot}	56	59	56	51	54	48
		σ^+	2	12	7	7	3	19
		σ^-	3	9	3	6	4	7
PANI-SDS	M	γ^{tot}	46	42	53	44	42	48
		σ^+	3	2	17	2	12	9
		σ^-	10	2	12	7	5	3
	BF	γ^{tot}	45	45	49	45	48	58
		σ^+	6	5	5	6	14	13
		σ^-	8	19	4	18	3	8
	F	γ^{tot}	47	48	45,3	48	45	45
		σ^+	1	3	5,0	2	2	3
		σ^-	2	4	0,4	3	4	5
PANI-SDBS	M	γ^{tot}	46	48	48	47	47	46
		σ^+	6	4	3	2	2	5
		σ^-	6	4	3	5	4	4
	BF	γ^{tot}	51	47	52	51,2	52,0	50
		σ^+	3	3	8	0,7	0,2	8
		σ^-	5	3	3	3,0	3,0	6
	F	γ^{tot}	51	46	50	47	47	44
		σ^+	1	2	2	6	2	4
		σ^-	5	3	4	2	3	4
PANI-T	M	γ^{tot}	53	41	47	44	47	46
		σ^+	4	5	1	16	3	5
		σ^-	4	2	2	5	4	4
	BF	γ^{tot}	51	52	52,8	53	53	38
		σ^+	3	1	0,9	2	2	17
		σ^-	11	2	0,8	3	3	6
	F	γ^{tot}	55	51	47	45	47	47
		σ^+	7	3	2	10	2	2
		σ^-	8	4	2	4	3	2

Zdá se také, že u hydrofobních materiálů dochází více ke změně konformace molekul fibrinogenu, což je kromě množství fibrinogenu adsorbovaného na povrchu materiálu další faktor podporující adhezi krevních destiček. To znovu potvrzuje předpoklad, že pro zařízení nebo zdravotnické pomůcky přicházející do kontaktu s krví jsou vhodnější hydrofilní materiály [17].

Vzhledem k závislosti intenzity adsorpce bílkovin na povrchové energii se dá očekávat, že vzorky obsahující PVP, a především pak vzorky, které mají PVP jako vrstvu na povrchu PANI filmu (PANI-PVP-BF a PANI-PVP-F), budou ve srovnání s ostatními zkoumanými materiály vykazovat menší buněčnou adhezi a nižší míru adheze krevních destiček, a měly by tedy být vhodnější pro použití v kontaktu s krví.

Změny hodnot povrchové energie byly kromě závislosti na typu modifikace materiálu znamenány také v závislosti na čase, opět především u materiálu obsahujícího PVP (PANI-PVP-M), jehož povrchová energie výrazně klesla během prvních 24 hodin. Podrobnější analýza dat je ovšem omezena velkými odchylkami v měření, které byly zřejmě způsobeny nedostatečně homogenním povrchem zkoumaných vzorků, hlavně u materiálů obsahujících PVP nebo SDS. U ostatních vzorků jsou hodnoty povrchové energie relativně stabilní, s hodnotami vyššími u materiálů, u kterých byla vrstva SDBS nebo taurinu připravena na povrchu PANI báze, než na povrchu PANI soli nebo když byla stejná látka přidána přímo do reakční směsi.

Obecně by materiály s vysokou povrchovou energií měly být vhodnější pro použití v kontaktu s krví, z důvodu snížené adheze krevních bílkovin, potažmo krevních destiček [44]. Na druhou stranu hydrofilní povrchy stále podporují kontaktní aktivaci koagulačního faktoru XII, a ke spuštění koagulační kaskády tak dochází, ačkoli hydrofilní povrch nepodporuje výraznou adsorpci krevních proteinů [17]. To tedy znamená, že i v případě, kdy na povrchu materiálu nedochází k adsorpci fibrinogenu z důvodu jeho vysoké povrchové energie, může k aktivaci procesu srážení krve a k tvorbě krevní sraženiny dojít jiným mechanismem a příprava hemokompatibilního materiálu se tedy nedá omezit výhradně na hydrofilní materiály.

6.2 Stanovení měrné elektrické vodivosti

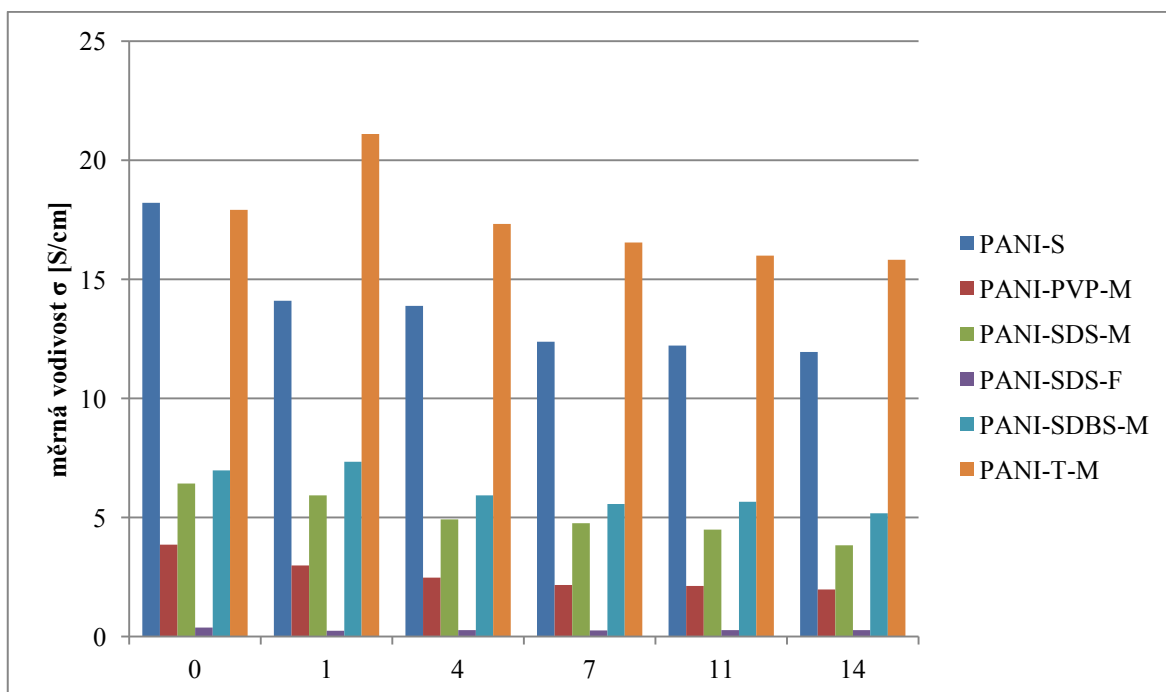
Při měření měrné elektrické vodivosti připravených vzorků metodou van der Pauw bylo zjištěno, že ze všech zkoumaných materiálů je jich jen pět elektricky vodivých. Materiály, které byly při měření vyhodnoceny jako nevodivé, jsou kromě PANI-B také všechny vzorky připravené modifikací polyanilinové báze, o své elektrické vlastnosti přišly kromě PANI-SDS-F také všechny vzorky, na kterých byl polyanilin modifikován vytvořením filmu na povrchu materiálu. Naopak elektrickou vodivost si zachovaly všechny materiály, které byly připraveny přidáním některé z používaných látek přímo do reakční směsi. Elektricky vodivé vzorky byly dále vyhodnocovány, a jak je vidět v tabulce 4 (obrázku 17), jejich měrná elektrická vodivost se pohybuje v širokém rozsahu hodnot.

Srovnáním výsledků měrné elektrické vodivosti z měření bylo zjištěno, že měrná elektrická vodivost standardního vzorku PANI-S, který byl použit jako reference, se během dvou týdnů měření pohybuje v hodnotách 10 – 20 S/cm. Všechny ostatní použité materiály ve srovnání s ním ztrácejí svou modifikací velkou část své elektrické vodivosti, s velice podobnými hodnotami u vzorků PANI-SDS-M a PANI-SDBS-M. Nejvýraznější je pokles vodivosti u vzorku PANI-SDS-F, jehož měrná elektrická vodivost klesla dokonce až na hodnoty okolo 0,3 S/cm, což je oproti referenčnímu PANI-S asi padesátkrát méně. Tyto nízké hodnoty odpovídají tomu, že všechny ostatní vzorky připravené stejným způsobem jsou elektricky nevodivé. Jediným materiálem, jehož měrná elektrická vodivost se po modifikaci hodnotám standardního PANI-S nejen blíží, ale dokonce ho překonává, je vzorek PANI-T-M, tedy vzorek připravený přidáním taurinu do polymerační směsi.

Je také vidět, že hodnoty měrné elektrické vodivosti materiálů klesají s časem, což je výrazné například u vzorku PANI-S, jehož vodivost v čase klesá nejrychleji během prvních sedmi dnů měření. Hodnoty vodivosti ostatních materiálů vykazují podobný pokles, výjimkou je vzorek PANI-SDS-F, jehož vodivost výrazně klesá pouze během prvních cca 24 hodin, a později se její hodnoty prakticky nemění. Pro aplikace, ve kterých je třeba zachovat vodivost materiálu, se jako nejvhodnější volba jeví kombinace PANI-T-M, která ve dni 0 vykazuje podobnou měrnou elektrickou vodivost jako neupravovaná polyanilinová sůl (17,9 S/cm pro PANI-SDS-F a 18,2 S/cm pro PANI-S), ale s časem její hodnoty neklesají tak rychle, jen o cca 8 % po prvních sedmi dnech ve srovnání s PANI-S, jehož vodivost po prvním týdnu klesne asi o třetinu, a od 24 hodin od přípravy vzorků je jeho elektrická vodivost vyšší než vodivost referenční PANI-S.

Tabulka 4: hodnoty měrné elektrické vodivosti materiálů

	měrná vodivost σ [S/cm]					
	den 0	den 1	den 4	den 7	den 11	den 14
PANI-S	18,210 ± 0,005	14,107 ± 0,007	13,882 ± 0,003	12,382 ± 0,004	12,216 ± 0,005	11,943 ± 0,006
PANI-PVP-M	3,853 ± 0,008	2,990 ± 0,002	2,479 ± 0,001	2,1730 ± 0,0008	2,1254 ± 0,0004	1,9752 ± 0,0006
PANI-SDS-M	6,428 ± 0,005	5,931 ± 0,002	4,926 ± 0,002	4,7590 ± 0,0007	4,490 ± 0,002	3,838 ± 0,003
PANI-SDS-F	0,3782 ± 0,0002	0,2452 ± 0,0002	0,26525 ± 0,00009	0,2567 ± 0,0002	0,2701 ± 0,0002	0,2777 ± 0,0004
PANI-SDBS-M	6,98 ± 0,03	7,341 ± 0,002	5,928 ± 0,002	5,569 ± 0,002	5,654 ± 0,002	5,181 ± 0,004
PANI-T-M	17,912 ± 0,009	21,096 ± 0,005	17,328 ± 0,005	16,540 ± 0,004	15,996 ± 0,005	15,816 ± 0,003



Obrázek 17: závislost měrné elektrické vodivosti materiálů na čase

6.3 Testy krevní koagulace

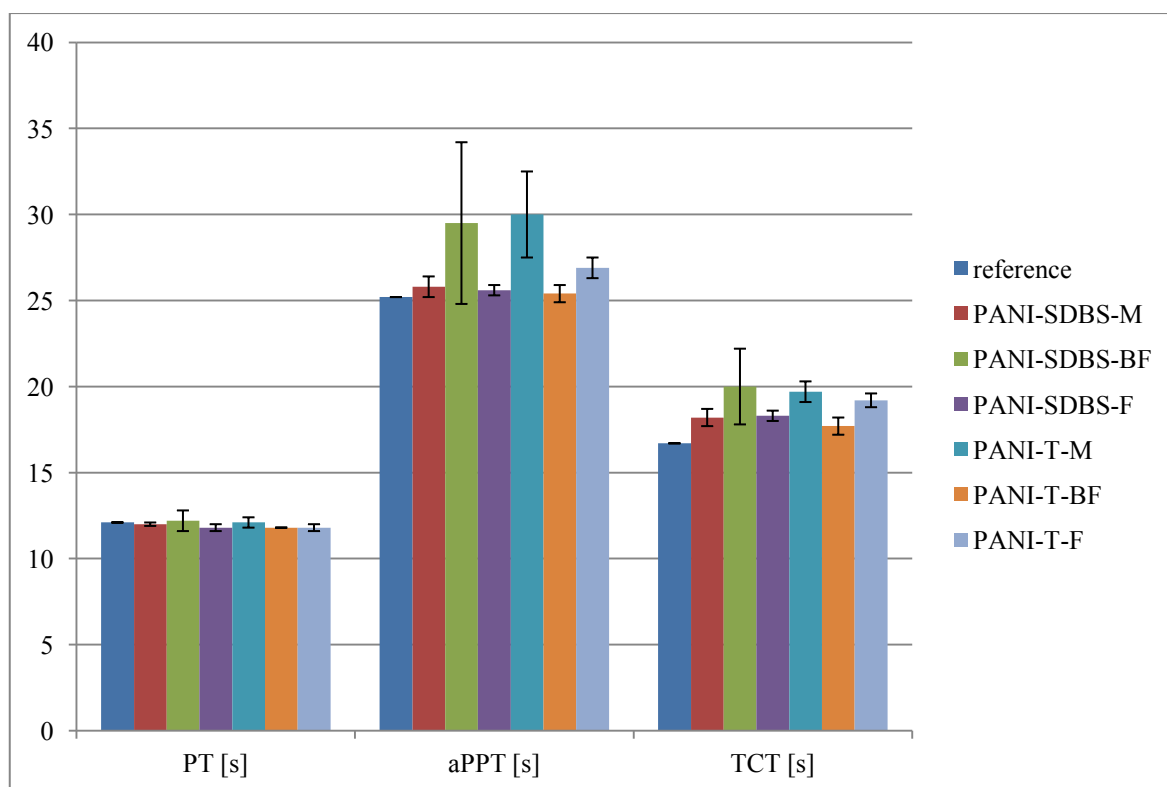
Výsledky testů vlivu různých modifikací polyanilinu na některé vybrané parametry krevní koagulace, uvedené v tabulce 5 (obrázku 18), ukazují, že hodnoty vyšetřovaných parametrů se u všech použitých vzorků pohybují okolo hodnot referenčního vzorku, bez výrazného rozdílu. V případě testů parametrů PT i aPPT se výsledky vzorků pohybují v rozmezí jejich fyziologických hodnot, bez ohledu na použitou látku nebo typ modifikace. Hemokoagulace tedy v tomto případě nebyla nijak ovlivněna. Při testování parametru TCT bylo zjištěno, že pro různé materiály dochází k mírnému prodloužení časů, oproti výsledku získanému při použití referenčního vzorku, všechny jsou ale stále pod spodní hranicí fyziologických hodnot tohoto parametru. Všechny tyto vzorky tedy vykazují mírný vliv na délku doby přeměny fibrinogenu na fibrin a to v menší míře než referenční vzorek. Žádný z testovaných vzorků nevykazuje výrazný vliv na rychlost hemokoagulace. Podobně nemá vliv na rychlost krevní koagulace ani neupravovaný polyanilin, ve formě soli ani báze [53].

V různých studiích bylo dokázáno, že při modifikaci materiálu polyvinylpyrrolidonem dochází ve srovnání s neupraveným materiálem ke snížení intenzity adsorpce fibrinogenu. Zároveň je omezena adheze krevních destiček, u kterých nedochází k aktivaci, a dochází k výraznému nárůstu hodnoty parametru TCT (až na 100 s), i parametru aPPT, což ukazuje na zlepšení kompatibility materiálu s krví při použití PVP graftů [76]. Tvorba směsi s polyvinylpyrrolidonem se používá například pro zlepšení hemokompatibility polysulfonových membrán užívaných při hemodialýze [77], nebo membrán vyrobených z polyamidu [78].

Do kontaktu s krví se například v podobě umělých ledvin nebo srdečních chlopní běžně dostávají různé materiály, jako jsou polytetrafluoretylen, polyvinylchlorid nebo polyetylen. Jedná se o materiály, které však v kontaktu s krví způsobují tvorbu krevní sraženiny, ať už adhezí a aktivací krevních destiček, aktivací koagulační kaskády nebo obojího [79]. Pro zlepšení hemokompatibility těchto materiálů (např. polyetersulfonových membrán) je možno použít různé metody, jako tvorba směsí, tvorba povrchových vrstev, navázání graftů [80], tvorba biomimetických povrchů nebo působení plasmu [79].

Tabulka 5: vliv materiálů na vybrané parametry koagulace

	PT [s]	aPPT [s]	TCT [s]
reference	12,1	25,2	16,7
PANI-SDBS-M	12,0 ± 0,1	25,8 ± 0,6	18,2 ± 0,5
PANI-SDBS-BF	12,2 ± 0,6	29,5 ± 4,7	20,0 ± 2,2
PANI-SDBS-F	11,8 ± 0,2	25,6 ± 0,3	18,3 ± 0,3
PANI-T-M	12,1 ± 0,3	30,0 ± 2,5	19,7 ± 0,6
PANI-T-BF	11,8 ± 0,0	25,4 ± 0,5	17,7 ± 0,5
PANI-T-F	11,8 ± 0,2	26,9 ± 0,6	19,2 ± 0,4
fyziologické hodnoty	11,0-13,5	25,0-32,0	>20,0



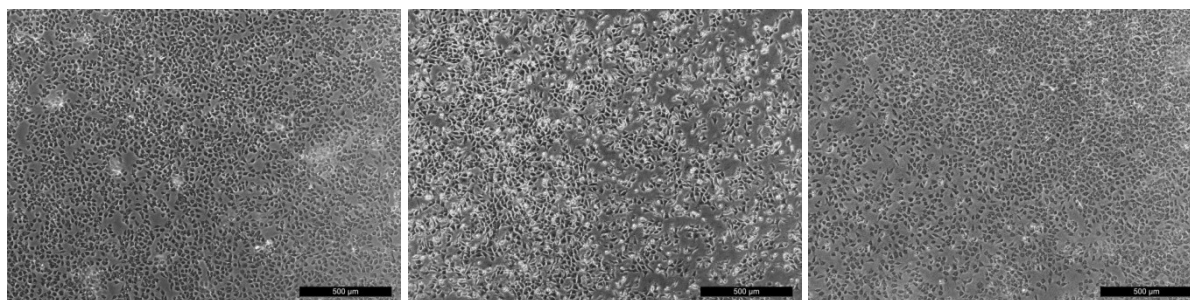
Obrázek 18: vliv materiálů na vybrané parametry koagulace

Vzhledem k tomu, že jedním z běžně používaných antikoagulantů je heparin, jehož antikoagulační aktivita je založena na vazbě antitrombinu, existují snahy navázat molekuly heparinu na povrch polymerního materiálu nebo napodobit jeho působení látkami, které mají

podobnou strukturu obsahující sulfonové skupiny. Obvykle se pak jedná o iontové polymery obsahující karboxylové, sulfátové nebo sulfonamidové funkční skupiny, jako jsou například poly(sulfobetaine methacrylate) (PSBMA) nebo některé jeho kopolymery, které vykazují sníženou adsorpci fibrinogenu a adhezi krevních destiček, společně s nárůstem koagulačních časů [81]. Podobné výsledky jsou vidět také při navázání PAMPSA řetězců na povrch polyanilinu, kdy dojde k úplnému zabránění krevní koagulaci, v důsledku vyblokování některých koagulačních faktorů. Na vliv PAMPSA polymeru na krevní koagulaci je možné usuzovat také z toho, že k zabránění krevní koagulaci dochází pouze v případě, kdy je PAMPSA navázaná přímo na povrchu polyanilinu, zatímco u vzorků, do kterých byla PAMPSA přidána přímo během polymerační reakce, koagulaci zabráněno není, podobně jako u neupraveného polyanilinu. Při srovnání s ostatními zkoumanými materiály také u vzorku s PAMPSA polymerem navázaným na povrch polyanilinu dochází k nejnižší adhezi krevních destiček, což je patrně způsobeno vyšší povrchovou energií tohoto materiálu [53]. Kromě těchto látek je pak možné použít i jiné, jako sulfonovaný polyetylenoxid nebo dextran sulfát, které při imobilizaci na povrchu materiálu vykazují zlepšení hemokompatibility [82].

6.4 Testy buněčné adheze

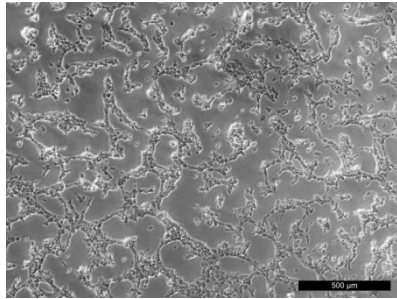
Pro testy buněčné adheze byly použity fibroblasty, které byly před opláchnutím na povrchu zkoumaných materiálů ponechány po dobu tří hodin, testy byly provedeny 14 dní po přípravě vzorků. Fotografie byly pořízeny při 40 násobném zvětšení, a jak je možné vidět na obrázku 19, intenzita adheze fibroblastů je na materiálech PANI-S a PANI-B od pohledu zhruba stejná jako na referenčním vzorku. Všechny tyto materiály vykazují intenzivní adhezi a relativně pravidelné rozmístění buněk na povrchu materiálu.



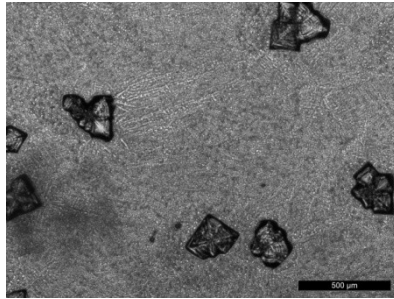
ref

PANI-S

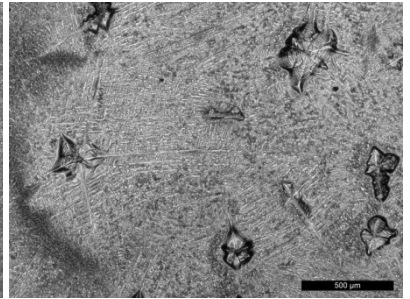
PANI-B



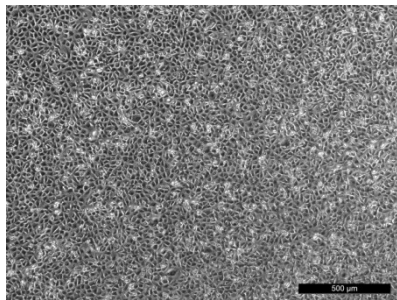
PANI-PVP-M



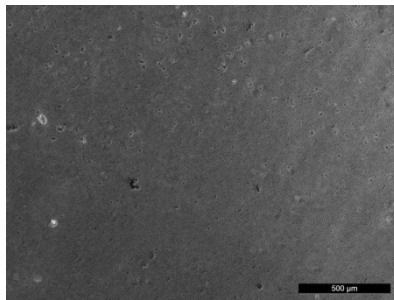
PANI-PVP-BF



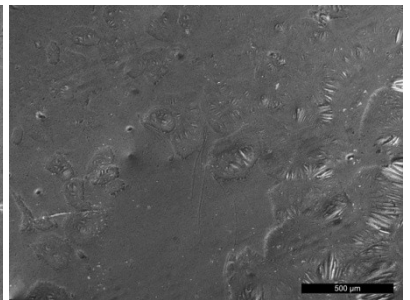
PANI-PVP-F



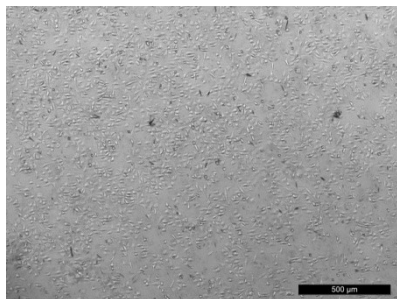
PANI-SDS-M



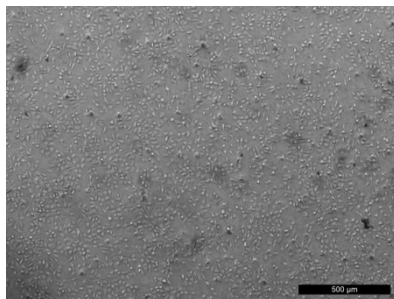
PANI-SDS-BF



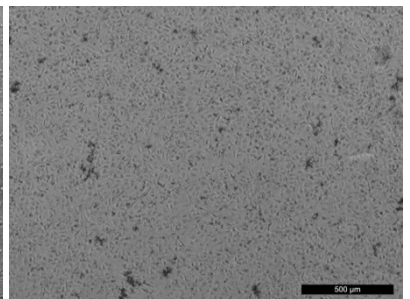
PANI-SDS-F



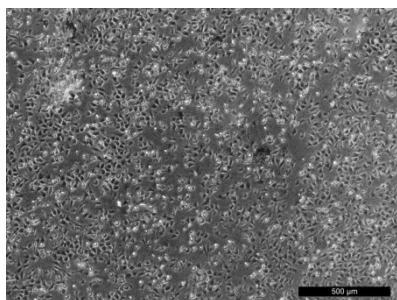
PANI-SDBS-M



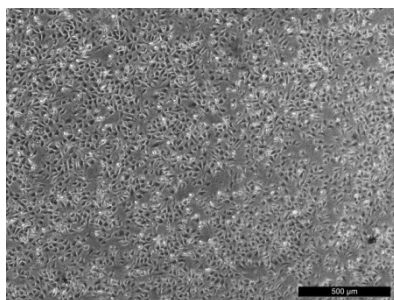
PANI-SDBS-BF



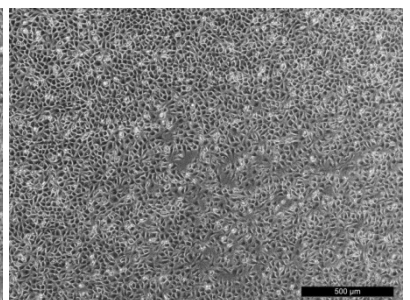
PANI-SDBS-F



PANI-T-M



PANI-T-BF



PANI-T-F

Obrázek 19: adheze fibroblastů, při 40 násobném zvětšení

Ve srovnání s referenčními vzorky vykazují ostatní použité materiály různé výsledky buněčné adheze. Podobné výsledky jako u referenčních vzorků je možné nalézt také u vzorků materiálů obsahujících taurin, a to u všech modifikací, u této látky tedy zřejmě tolik nezáleží na způsobu úpravy polyanilinu, jako spíše na množství taurinu. Podobné výsledky jako taurin vykazují také vzorky obsahující SDS a SDBS, s adhezí mírně intenzivnější u SDS. Jediná odchylka u těchto dvou látek se objevuje u vzorků PANI-SDS-BF a PANI-SDS-F, u kterých během přípravy vzorků došlo k vykrystalizování SDS na povrchu polyanilinového filmu, a tyto krystalky nebylo možné z povrchu materiálu odstranit, aniž by přitom došlo k poškození polyanilinového filmu. Zdá se tedy, že SDS, které je inkorporováno do polyanilinového filmu (vzorek PANI-SDS-M), nemá negativní vliv na použité buňky, zatímco v případě, kdy na povrchu materiálu zůstaly krystalky SDS, bylo adhezi fibroblastů na vzorcích téměř úplně zabráněno, vliv na adhezi buněk má tedy zřejmě to, jestli došlo k vazbě molekul SDS na polyanilin nebo ne.

Zajímavé výsledky vykazují vzorky obsahující polyvinylpyrrolidon (PVP). U těchto vzorků došlo k omezené adhezii fibroblastů v případě, že byl PVP přidán přímo do reakční směsi, a buňky na takovém povrchu tvoří struktury podobné řetízkům. U vzorků, které mají PVP jako vrstvu na povrchu polyanilinového filmu k adhezii fibroblastů nedochází vůbec, a na fotografovaném povrchu není vidět žádná buňka, což potvrzuje, že v případě PVP záleží na způsobu, jakým byla modifikace PANI provedena, s větším vlivem na zabránění buněčné adhezii, pokud se PVP vyskytuje přímo na povrchu materiálu. Toto zjištění zároveň potvrzuje použití PVP jako látky, která snižuje adsorpci proteinů na povrch, pokud je použit k modifikaci polyetersulfonových membrán [20].

Získané výsledky buněčné adheze odpovídají také hodnocení povrchové energie těchto materiálů. Je vidět, že materiály, které mají hodnoty povrchové energie blízké povrchové energii neupravovaného polyanilinu, vykazují také podobnou intenzitu buněčné adheze, zřejmě by tedy také vykazovaly podobné hodnoty intenzity adsorpce krevních bílkovin, především fibrinogenu, a v závislosti na tom i adheze krevních destiček. Naopak materiály s vyšší povrchovou energií (v tomto případě vzorky obsahující PVP) vykazují pouze omezenou adhezii fibroblastů, dá se tedy očekávat, že by při testování ukázaly také sníženou adsorpci krevních bílkovin a adhezii krevních destiček ve srovnání s referenčními materiály [76], což je jeden z důležitých faktorů hemokompatibility materiálu.

Protože je známo, že požadovanou vlastností materiálů, které přicházejí do kontaktu s krví, je jejich schopnost potlačovat nespecifickou adhezii, bývají materiály často za tímto účelem

modifikovány. Dobrých výsledků při přípravě materiálů odolávajících buněčné adhezi bylo dosaženo navázáním řetězců polyetylenglykolu nebo kopolymeru na bázi polyetylenglykolu, případně bioinertních polymerů (např. polytetrafluoretylen) na povrch materiálu [83] nebo použitím zwitterionů [84].

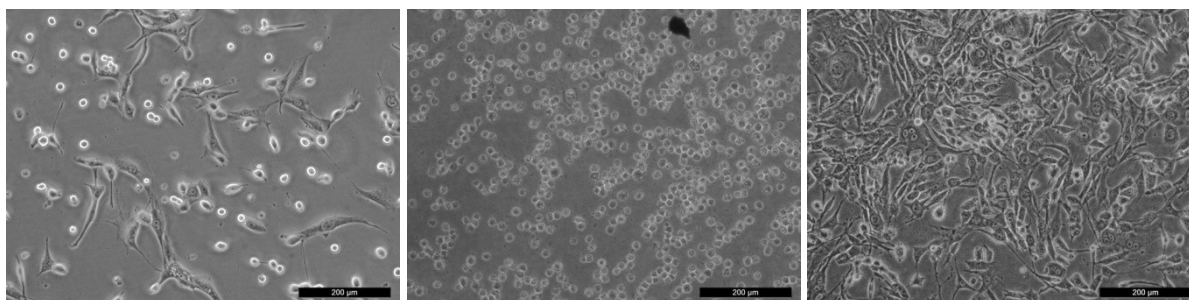
Obecně u materiálů, které vykazují nižší buněčnou adhezi, dochází také ke snížené adsorpci krevních bílkovin [76]. Přestože stále nejsou přesně popsány specifické vlastnosti materiálu, které by zajistily jeho hemokompatibilitu, kompatibilita materiálu s krví je z velké části ovlivňována adsorpcí krevních proteinů na povrch materiálu, ke které dojde při kontaktu materiálu s krví. To způsobuje adhezi a aktivaci krevních destiček, důsledkem čehož je potom tvorba krevní sraženiny [44].

Jedním z materiálů, které bývají používány pro přípravu membrán, je polyvinylidenfluorid (PVDF), který kvůli své hydrofobitě bývá často modifikován, a to různými způsoby, jako jsou ošetření plasmou nebo tvorba směsí, většinou s polymery obsahujícími sulfonové funkční skupiny [85]. Ačkoli jedním z nejčastějších způsobů, jak u materiálu dosáhnout nižší adsorpce krevních bílkovin, je navázání polyetylenglykolu na povrch materiálu, tento způsob modifikace není vhodný pro dlouhodobé použití *in vivo*, protože může docházet k jeho enzymatické oxidaci, a materiál ztratí svoji schopnost omezovat adsorpci bílkovin a buněčnou adhezi. Podobně často je používán také polyvinylpyrrolidon, jehož nevýhodou je však jeho vyluhování z materiálu, pokud je používán delší dobu. Tento problém může být značně omezen, pokud je PVP namísto přidání do polymerační směsi navázán na povrch upravovaného materiálu [76]. To potvrzuje i výsledky testů buněčné adheze, které ukazují výrazný rozdíl mezi adhezí fibroblastů na povrchu vzorků PANI-PVP. Je vidět, že na povrchu PANI-PVP-M, tedy vzorku, u kterého byl polyvinylpyrrolidon přidán přímo do reakční směsi, dochází k buněčné adhezi, přestože je proti referenčnímu vzorku omezená, zatímco u vzorků, které mají PVP na svém povrchu, k adhezi fibroblastů po třech hodinách vůbec nedochází.

6.5 Testy buněčné proliferace

Fibroblasty byly z provozních důvodů laboratoře na povrchy materiálů nasazeny 5 dní po jejich přípravě. Pro porovnání pak byly vzorky fotografovány po 24 a 48 hodinách. Fotografie vzorků po 24 hodinách od nasazení fibroblastů na povrch materiálů jsou vidět na obrázku 20, a jak je vidět, získané výsledky relativně odpovídají výsledkům hodnocení povrchové energie materiálů. Buňky rostou na materiálech s povrchovou energií blízkou

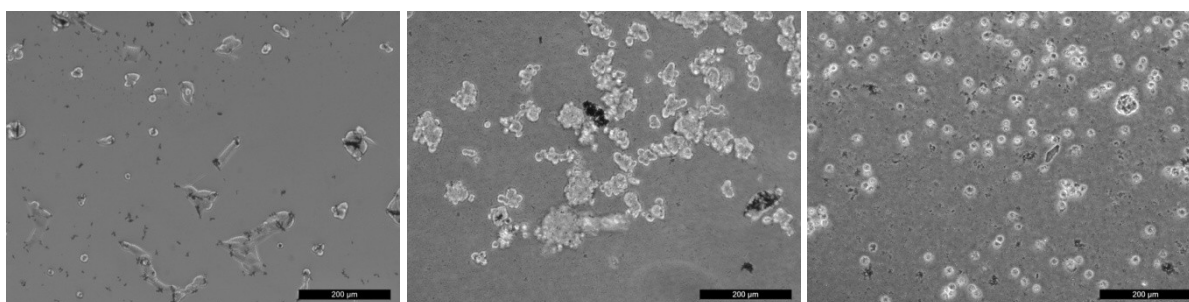
té, kterou mají referenční materiály, podobné výsledky jsou viditelné na vzorcích obsahujících SDS a SDBS, s proliferací nejintenzivnější na vzorcích PANI-SDS-F a PANI-SDBS-F. Na vzorcích, u kterých bylo SDS (nebo SDBS) přidáno během polymerace nebo z něj byl vytvořen film na povrchu PANI-B, je proliferace pomalejší a méně intenzivní, podobně jako na referenčním polystyrenu. Je také vidět, že k výrazné proliferaci fibroblastů v tomto případě dochází i na povrchu vzorků PANI-SDS-BF a především PANI-SDS-F, tedy těch, u kterých byla z SDS připravena vrstva na povrchu polyanilinového filmu. Na těchto vzorcích buňky proliferují i přesto, že při předchozích testech na těchto površích nedocházelo k buněčné adhezi, zřejmě z důvodu vykrytalizování SDS na povrchu PANI filmu u vzorků použitých k testům buněčné adheze, zatímco u vzorků použitých pro testy buněčné proliferace k vykrytalizování SDS nedošlo. Je proto zřejmé, že v případě použití SDS má na buňky vliv také to, v jaké podobě je látka na povrchu polyanilinu přítomná.



ref

PANI-S

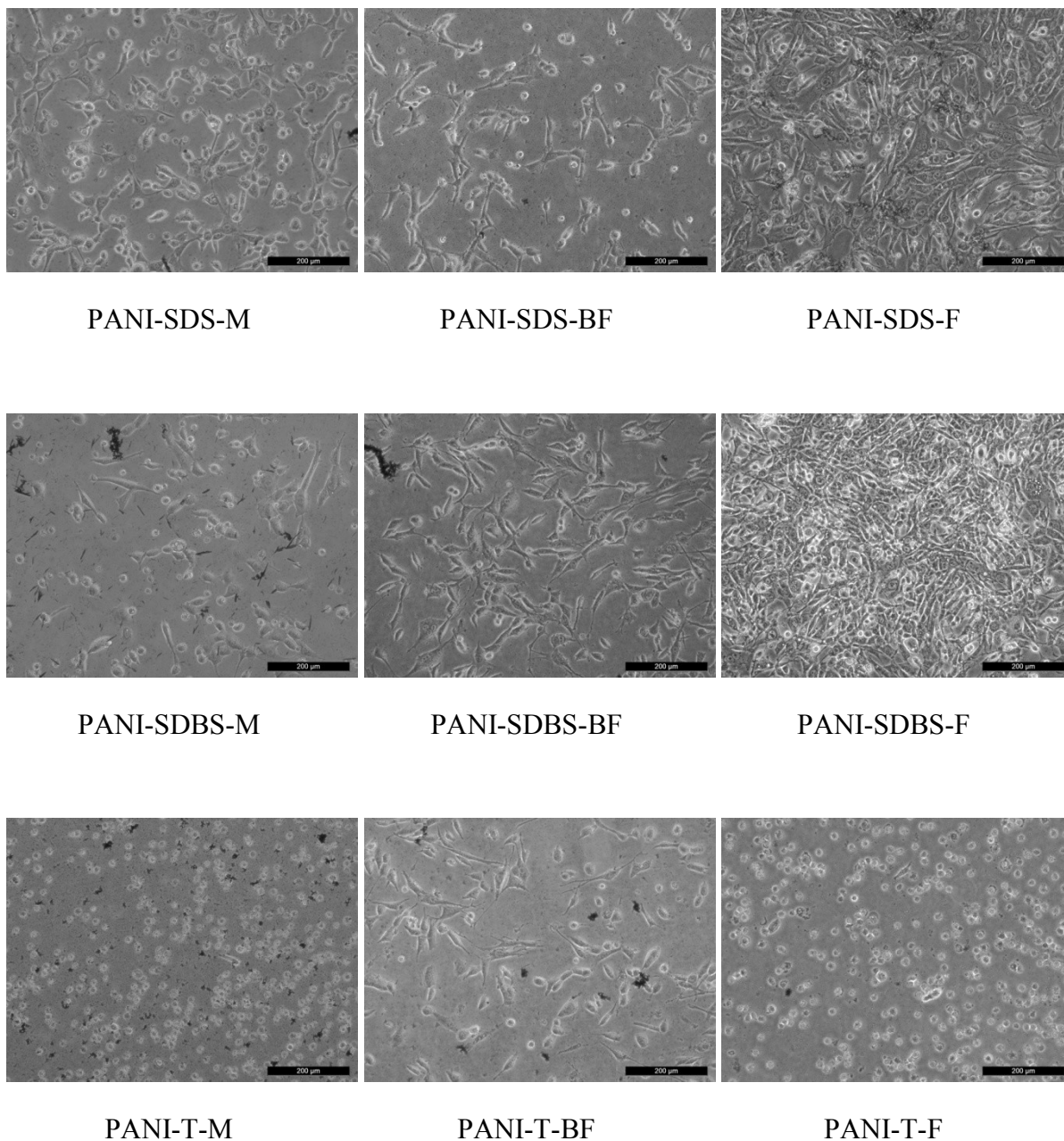
PANI-B



PANI-PVP-M

PANI-PVP-BF

PANI-PVP-F



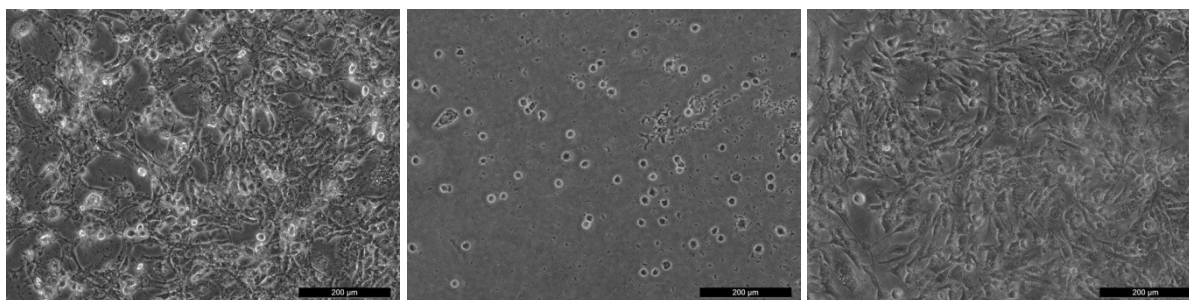
Obrázek 20: proliferace fibroblastů po 24 hodinách, při 100 násobném zvětšení

Je také vidět, že na povrchu vzorků obsahujících taurin fibroblasty prakticky neproliferují, a to pak především v případě vzorků PANI-T-M a PANI-T-F, tyto materiály jsou tedy teoreticky vhodnější pro použití v kontaktu s krví. Výsledkům testů buněčné adheze odpovídá proliferace fibroblastů na povrchu vzorků obsahujících PVP. Fibroblasty na povrchu těchto materiálů tvoří soustředěné ostrůvky a jejich proliferace je nejvýraznější u vzorku PANI-PVP-M, zatímco u ostatních modifikací pomocí PVP se buňky téměř nerozrůstají, přede-

vším pak u vzorku PANI-PVP-F, což ukazuje na vliv typu úpravy na buněčnou proliferaci, s výraznějším vlivem u vzorků, které mají PVP ve vrstvě na povrchu polyanilinu.

Zajímavé je také chování fibroblastů na povrchu referenční PANI-S, kde prakticky nedochází k buněčné proliferaci, což neodpovídá dříve publikovaným výsledkům, které uvádějí, že na povrchu polyanilinové soli k proliferaci buněk dochází (při použití lidských hepatocelulárních buněk), i když v menší míře než na povrchu PANI báze [86]. Je také uváděno, že polyanilin je biokompatibilní například s krysími myoblasty, a jako součást kompozitu i s myšími fibroblasty nebo krysími nervovými kmenovými buňkami [50]. Vykazuje také výrazně nižší cytotoxicitu (téměř o 50 %), při použití adipocytů, ve srovnání s polyuretanem [56].

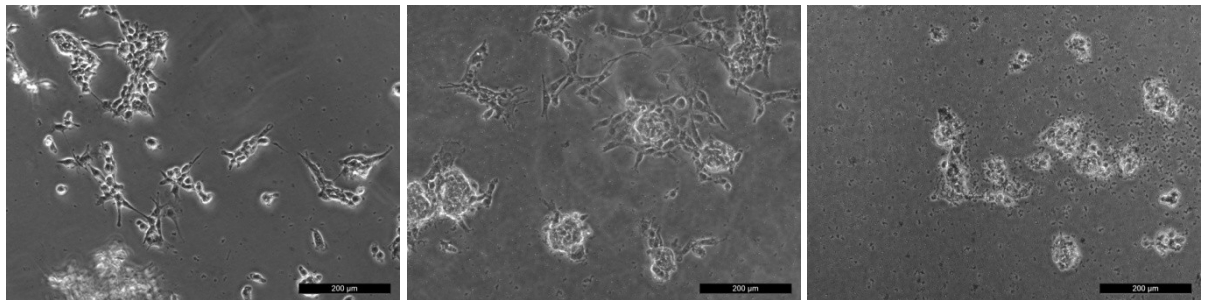
Fotografie pořízené po 48 hodinách (možné vidět na obrázku 21) potvrzují výsledky proliferace získané po 24 hodinách. Referenční vzorky kromě PANI-S vykazují intenzivní proliferaci, podobně jako vzorky obsahující SDS a SDBS, především pak ty, u kterých je některá z těchto látek přítomná pouze na povrchu materiálu. U materiálů obsahujících taurin se buňky projevují podobně jako při prvním fotografování, tedy bez proliferace u vzorků PANI-T-M a PANI-T-F, zatímco na povrchu materiálu s vrstvou taurinu na povrchu PANI-B je proliferace fibroblastů téměř stejně intenzivní jako při použití SDS nebo SDBS. Podobně i na povrchu vzorků obsahujících PVP zůstaly zachovány charakteristické struktury buněk, viditelné už po prvních 24 hodinách, s neintenzivnější proliferací u vzorku PANI-PVP-M.



ref

PANI-S

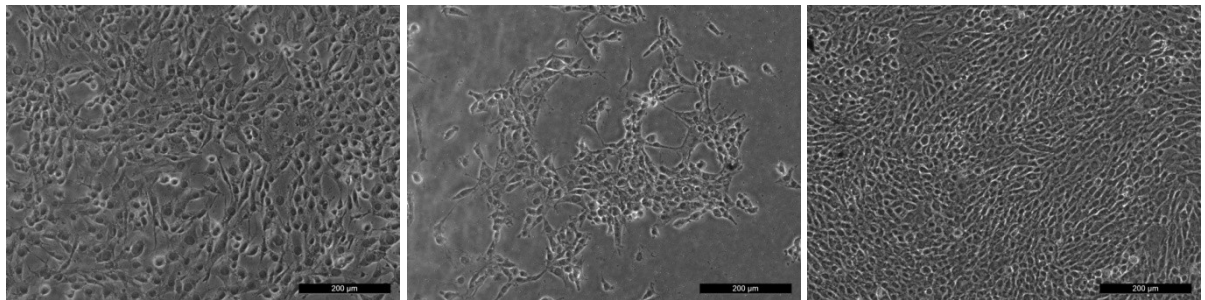
PANI-B



PANI-PVP-M

PANI-PVP-BF

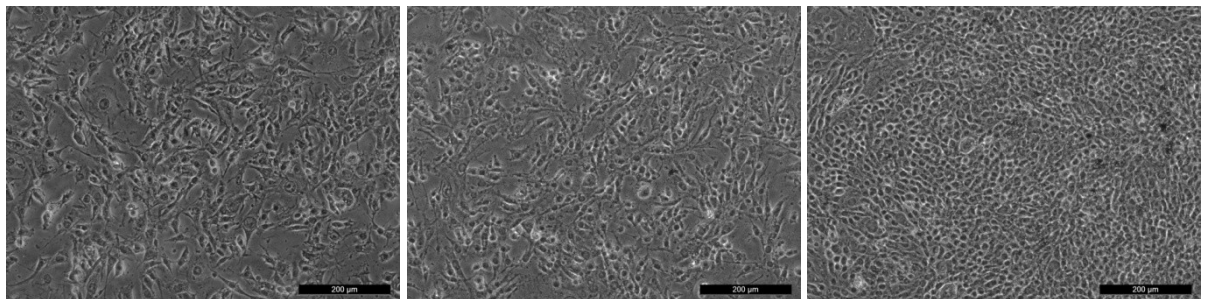
PANI-PVP-F



PANI-SDS-M

PANI-SDS-BF

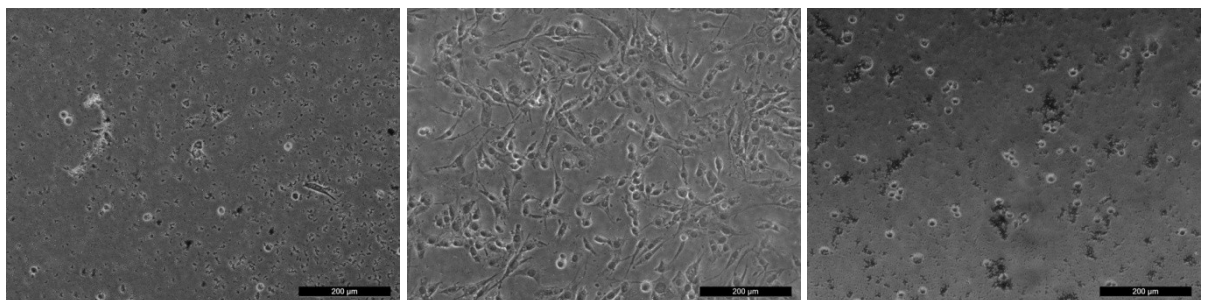
PANI-SDS-F



PANI-SDBS-M

PANI-SDBS-BF

PANI-SDBS-F



PANI-T-M

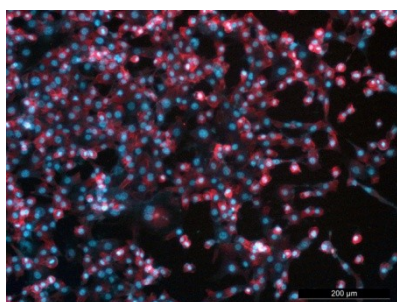
PANI-T-BF

PANI-T-F

Obrázek 21: proliferace fibroblastů po 48 hodinách, při 100 násobném zvětšení

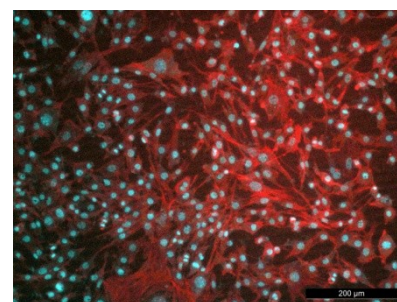
Po 48 hodinách růstu byly fibroblasty také fotografovány s použitím fluorescenčního mikroskopu, a jak je vidět na obrázku 22, výsledky fluorescenčního fotografování odpovídají fotografiím proliferace, s výraznou proliferací na vzorcích obsahujících SDS nebo SDBS (především na vzorcích PANI-SDS-BF a PANI-SDBS-BF), kde je vidět větší množství buněk než na referenčních vzorcích, podobně jako na vzorku PANI-T-BF. U buněk je vidět velké množství aktinu, což svědčí o rozvinutém cytoskeletu buňky, buňky se tedy po povrchu těchto materiálů rozrůstají. Naopak u materiálů obsahujících PVP je viditelné pouze malé množství aktinu, buňky se nijak nerozrůstají a vyskytují se po povrchu materiálů v nepravidelných shlucích.

Na povrchu vzorků, jejichž fotografie nejsou v tabulce uvedeny (PANI-S, PANI-PVP-F, PANI-T-M, PANI-T-F), nebyly po nabarvení fluorescenčními barvivy vidět žádné buňky.

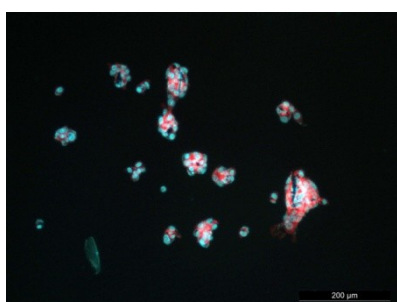


ref

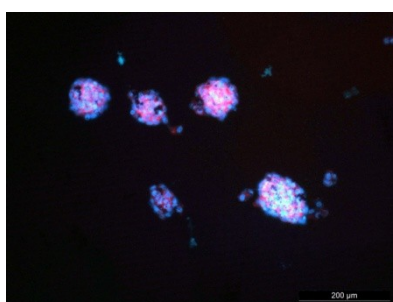
PANI-S



PANI-B

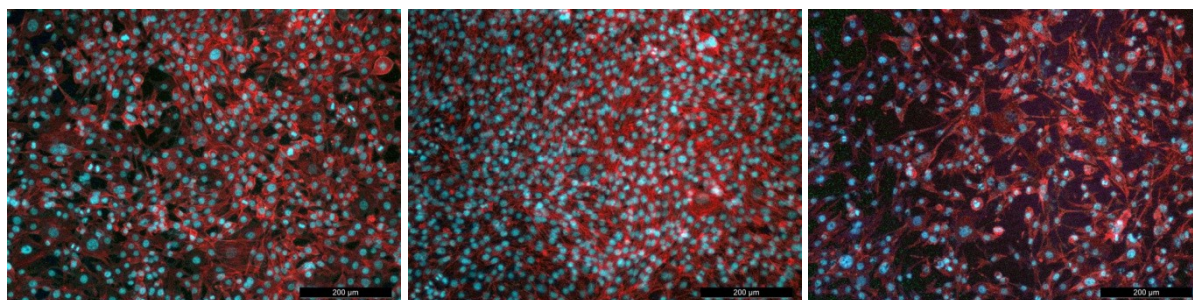


PANI-PVP-M



PANI-PVP-BF

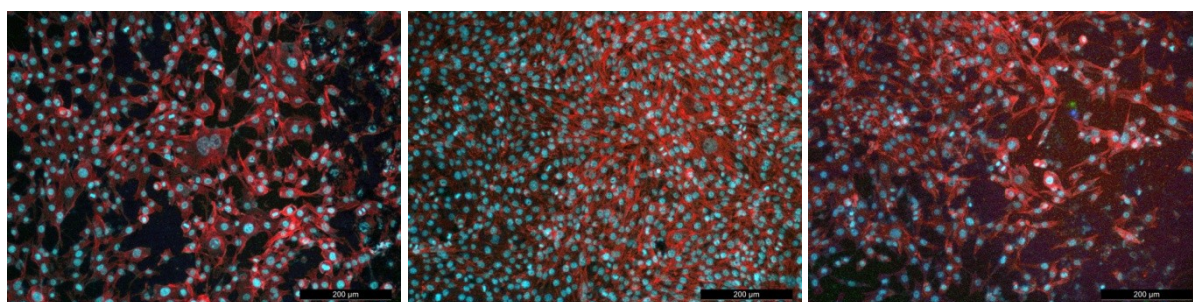
PANI-PVP-F



PANI-SDS-M

PANI-SDS-BF

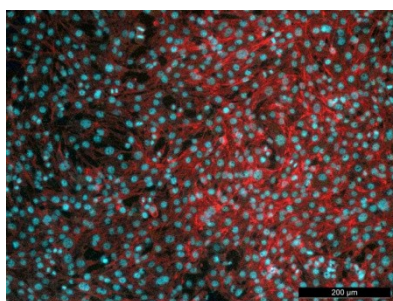
PANI-SDS-F



PANI-SDBS-M

PANI-SDBS-BF

PANI-SDBS-F



PANI-T-M

PANI-T-BF

PANI-T-F

Obrázek 22: fluorescenční fotografie fibroblastů po 48 hodinách, při 100 násobném zvětšení

ZÁVĚR

Jak je možné vyvodit ze získaných výsledků, i přes zajímavé výsledky testů, kdy především vzorky polyanilinu obsahující PVP nebo taurin (PANI-T-M a PANI-T-F) vykazují nízkou buněčnou proliferaci, což z těchto materiálů dělá materiály, které by mohly být potenciálně vhodné pro použití v kontaktu s krví, žádný ze zkoumaných materiálů, bez ohledu na přidanou látku i typ modifikace, nemá vliv na parametry krevní koagulace, který by se výrazně lišil od vlivu referenčních vzorků, a výsledky testů krevní koagulace všech sledovaných materiálů zůstává v rozmezí fyziologických hodnot.

To tedy znamená, že ani jeden ze zkoumaných materiálů nemá specifické vlastnosti, které by z něj dělaly materiál vhodný pro použití v medicínských aplikacích, v nich by se dostal do kontaktu s krví.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HE, W. a R. BENSON. 10 - Polymeric Biomaterials. In: *Applied Plastics Engineering Handbook: Processing and Materials*. 1. vydání. Editor KUTZ, M. Boston: Elsevier/William Andrew, 2011, s. 159–175. ISBN 978-1-4377-3514-7. DOI: 10.1016/B978-1-4377-3514-7.10010-8. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437735147100108>
- [2] *Polymer Science: A comprehensive Reference*. Editor MATYJASZEWSKI, K. a M. MÖLLER. Amsterdam: Elsevier, 2012. Kapitola 9, Polymers in Biology and Medicine. ISBN 978-0-444-53349-4. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780080878621>
- [3] WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008, roč. 29, č. 20, s. 2941–2953. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208002676>
- [4] RODGERS, K. Hemocompatibility. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. In: *Reference Module in Biomedical sciences*. 2014, s. 834–836. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00028-2. ISBN 978-0-12-801238-3. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543000282>
- [5] SEYFERT, U. T. et al. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomolecular Engineering*. 2002, roč. 19, č. 2–6, s. 91–96. DOI: 10.1016/S1389-0344(02)00015-1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034402000151>
- [6] LI, P. et al. Hemocompatibility and anti-biofouling property improvement of poly(ethylene terephthalate) via self-polymerization of dopamine and covalent graft of zwitterionic cysteine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, roč. 110, s. 327–332. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.044. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776513003020>
- [7] YU, K. et al. Engineering biomaterials surfaces to modulate the host response. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, roč. 124, s. 69–79. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.08.009. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514004317>

- [8] ALLFORD, S. L. a S. J. MACHIN. Haemostasis. *Surgery (Oxford)*. 2007, roč. 25, č. 6, s. 241–244. DOI: 10.1016/j.mpsur.2007.05.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931907000737>
- [9] HANSON, S. R. a E. I. TUCKER. Chapter II.2.6 – Blood Coagulation and Blood–Materials Interactions. In: *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 3. vydání. Editor RATNER, B. D. et al. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013, s. 551–557. ISBN 978-0-12-374626-9. DOI: 10.1016/B978-0-08-087780-8.00048-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080877808000486>
- [10] NORRIS, L. A. Blood coagulation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2003, roč. 17, č. 3, s. 369–383. DOI: 10.1016/S1521-6934(03)00014-2. ISSN 15216934. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693403000142>
- [11] GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal*. 2004, roč. 168, č. 3, s. 238–251. DOI: 10.1016/j.tvjl.2003.09.013. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023303001771>
- [12] MANN, K. G. et al. Models of blood coagulation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2006, roč. 36, č. 2, s. 108–117. DOI: 10.1016/j.bcnd.2005.12.034. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979606000076>
- [13] *Přehled fyziologie člověka II. díl. 3. přepracované vydání*. Redaktor POKORNÝ, J. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0229-6.
- [14] LI, Z. et al. Structure and blood compatibility of highly oriented poly(L-lactic acid) chain extended by ethylene glycol diglycidyl ether. *Polymer*. 2015, roč. 56, s. 523–534. DOI: 10.1016/j.polymer.2014.11.035. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386114010611>
- [15] MURRAY, R. K. *Harperova Biochemie*. 23. vydání, (4. české vydání), Jinočany: H&H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [16] VOGLER, E. A. a C. A. SIEDLECKI. Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*. 2009, roč. 30, č. 10, s. 1857–1869. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.041. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208010260>

- [17] XU, L. et al. Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, roč. 124, s. 49–68. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.040. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514005116>
- [18] SPERLING, C. et al. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials*. 2009, roč. 30, č. 27, s. 4447–4456. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.044. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209005109>
- [19] TERYTYEVA, V. A. et al. Kinetics and mechanisms of surface-dependent coagulation factor XII activation. *Journal of Theoretical Biology*. 2015, roč. 382, s. 235–243. DOI: 10.1016/j.jtbi.2015.07.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519315003306>
- [20] IRFAN, M. a A. IDRIS. Overview of PES biocompatible/hemodialysis membranes: PES–blood interactions and modification techniques. *Materials Science and Engineering: C*. 2015, roč. 56, s. 574–592. DOI: 10.1016/j.msec.2015.06.035. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115301673>
- [21] MINORS, D. S. Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2007, roč. 8, č. 5, s. 214–216. DOI: 10.1016/j.mpaic.2007.02.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472029907000525>
- [22] ARNOCZKY, S. P. et al. What Is Platelet-Rich Plasma? *Operative Techniques in Sports Medicine*. 2011, roč. 19, č. 3, s. 142–148. DOI: 10.1053/j.otsm.2010.12.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1060187210001632>
- [23] HANSEN, A. et al. Polymers for the rapid and effective activation and aggregation of platelets. *Biomaterials*. 2011, roč. 32, č. 29, s. 7034–7041. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211006661>
- [24] GORBET, M. B. a M. V. SEFTON. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004, roč. 25, č. 26, s. 5681–5703. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.023. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961204000687>

- [25] OKAMOTO, Y. et al. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*. 2003, roč. 53, č. 3, s. 337–342. DOI: 10.1016/S0144-8617(03)00076-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861703000766>
- [26] BROOS, K. et al. Blood platelet biochemistry. *Thrombosis Research*. 2012, roč. 129, č. 3, s. 245–249. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384811005780>
- [27] GEORGE, J. N. Platelets. *The Lancet*. 2000, roč. 355, č. 9214, s. 1531–1539. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02175-9. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600021759>
- [28] LORD, M. S. et al. The modulation of platelet adhesion and activation by chitosan through plasma and extracellular matrix proteins. *Biomaterials*. 2011, roč. 32, č. 28, s. 6655–6662. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.062. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211006077>
- [29] EYRE, L. a F. GAMLIN. Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 2010, roč. 11, č. 6, s. 244–246. DOI: 10.1016/j.mpaic.2010.02.015. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147202991000055X>
- [30] MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén, ©2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [31] TABUCHI, A. a W. M. KUEBLER. Endothelium–platelet interactions in inflammatory lung disease. *Vascular Pharmacology*. 2008, roč. 49, č. 4–6, s. 141–150. DOI: 10.1016/j.vph.2008.06.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537189108000645>
- [32] KOH, L. B. et al. The effect of topography of polymer surfaces on platelet adhesion. *Biomaterials*. 2010, roč. 31, č. 7, s. 1533–1545. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.022. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209012502>
- [33] PINTO, A. M. et al. Biocompatibility of poly(lactic acid) with incorporated graphene-based materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, roč. 104, 229–238. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.12.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776512007011>

- [34] HORSTMAN, L. a Y. S. AHN. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1999, roč. 30, č. 2, s. 111–142. DOI: 10.1016/S1040-8428(98)00044-4. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842898000444>
- [35] TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. 4. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [36] FRANZ, S. et al. Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 2011, roč. 32, č. 28, s. 6692–6709. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.078. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211006491>
- [37] PURI, R. N. Phospholipase A₂: its role in ADP- and thrombin-induced platelet activation mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1998, roč. 30, č. 10, s. 1107–1122. DOI: 10.1016/S1357-2725(98)00080-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272598000806>
- [38] BACHMAIR, E. M. et al. Dietary manipulation of platelet function. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014, roč. 144, č. 2, s. 97–113. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.05.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016372581400103X>
- [39] SIVARAMAN, B. a R. A. LATOUR. The Adherence of platelets to adsorbed albumin by receptor-mediated recognition of binding sites exposed by adsorption-induced unfolding. *Biomaterials*. 2010, roč. 31, č. 6, s. 1036–1044. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.017. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209011041>
- [40] FARIA, M. et al. Sub-micron tailoring of bi-soft segment asymmetric polyurethane membrane surfaces with enhanced hemocompatibility properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, roč. 86, č. 1, s. 21–27. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.03.021. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511001561>
- [41] KLEIN, N. S. et al. Evaluation of the wettability of mortar component granular materials through contact angle measurements. *Cement and Concrete Research*. 2012, roč. 42, č. 12, 1611–1620. DOI: 10.1016/j.cemconres.2012.09.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008884612001937>

- [42] SPIJKER, H. T. et al. Platelet adhesion and activation on a shielded plasma gradient prepared on polyethylene. *Biomaterials*. 2002, roč. 23, č. 3, s. 757–766. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00181-8. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961201001818>
- [43] CHEN, L. et al. On improving blood compatibility: From bioinspired to synthetic design and fabrication of biointerfacial topography at micro/nano scales. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, roč. 85, č. 1, s. 2–7. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.034. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776510005990>
- [44] SIVARAMAN, B. a R. A. LATOUR. The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen. *Biomaterials*. 2010, roč. 31, č. 5, s. 832–839. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209010837>
- [45] LEE, S. H. et al. Self-assembly of human plasma fibrinogens on binary organosilane monolayers with micro domains. *Applied Surface Science*. 2009, roč. 255, č. 18, s. 7912–7917. DOI: 10.1016/j.apsusc.2009.04.201. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433209005534>
- [46] XIANG, T. et al. Facile chemical modification of polysulfone membrane with improved hydrophilicity and blood compatibility. *Materials Letters*. 2014, roč. 137, s. 192–195. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.09.037. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X14016711>
- [47] GUIMARD, N. K. et al. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*. 2007, roč. 32, č. 8–9, s. 876–921. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670007000676>
- [48] TAHIR, Z. M. et al. Polyaniline synthesis and its biosensor application. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005, roč. 20, č. 8, s. 1690–1695. DOI: 10.1016/j.bios.2004.08.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566304003732>
- [49] BALINT, R. et al. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2014, roč. 10, č. 6, s. 2341–2353. DOI:

- 10.1016/j.actbio.2014.02.015. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706114000671>
- [50] QAZI, T. H. et al. Tissue engineering of electrically responsive tissues using polyaniline based polymers: A review. *Biomaterials*. 2014, roč. 35, č. 33, s. 9068–9086. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.020. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214008291>
- [51] BAJPAI, A. K. et al. Designing Polyaniline (PANI) and Polyvinyl Alcohol (PVA) Based Electrically Conductive Nanocomposites: Preparation, Characterization and Blood Compatible Study. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2009, roč. 46, č. 8, s. 774–782. DOI: 10.1080/10601320903004533. Dostupné také z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10601320903004533>
- [52] LI, Z. F. a E. RUCKENSTEIN. Two liquid adsorptive entrapment of a pluronic polymer into the surface of polyaniline films. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, roč. 264, č. 2, s. 370–377. DOI: 10.1016/S0021-9797(03)00442-9. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979703004429>
- [53] HUMPOLÍČEK, P. et al. Blood coagulation and platelet adhesion on polyaniline films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015, roč. 133, s. 278–285. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.06.008. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777651500380X>
- [54] LI, Y. et al. Physicochemical and blood compatibility characterization of polypyrrole surface functionalized with heparin. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, roč. 84, č. 3, s. 305–313. DOI: 10.1002/bit.10757. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.10757>
- [55] STEJSKAL, J. et al. Purification of a conducting polymer, polyaniline, for biomedical applications. *Synthetic Metals*. 2014, roč. 195, s. 286–293. DOI: 10.1016/j.synthmet.2014.06.020. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677914002252>
- [56] PRABHAKAR, P. K. et al. Biocompatibility studies on polyaniline and polyaniline–silver nanoparticle coated polyurethane composite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, roč. 86, č. 1, s. 146–153. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.03.033. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511001809>

- [57] WANG, L. et al. Protein adsorption under electrical stimulation of neural probe coated with polyaniline. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, roč. 80, č. 1, s. 72–78. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.05.034. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776510002900>
- [58] KIM, H. et al. Biocompatible composites of polyaniline nanofibers and collagen. *Synthetic Metals*. 2009, roč. 159, č. 13, s. 1313–1318. DOI: 10.1016/j.synthmet.2009.02.036. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677909001362>
- [59] LI, M. et al. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2006, roč. 27, č. 13, s. 2705–2715. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.037. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205010628>
- [60] Advex Instruments, s. r. o. Surface Free Energy. *Advex Instruments* [online]. Brno: Advex Instruments, s. r. o., ©2008 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: http://www.advex-instruments.cz/index.php?option=com_content&task=view&id=29&Itemid=39
- [61] Siemens. Sysmex CA-1500 System. *Siemens Global Website* [online]. Munich: Siemens AG, ©2016 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/hemostasis/systems/sysmex-ca-1500>
- [62] MATĚJKOVÁ, S. a M. PILOUSKOVÁ. Sysmex CA 1500. In: *Oblastní nemocnice Příbram, a. s.* [online]. Středočeský kraj, ©2009 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.nemocnicepribram.cz/doc/SLPOKH/HVEZDAAABG.htm>
- [63] ONWUDIWE, D. C. et al. Laser-assisted synthesis, and structural and thermal properties of ZnS nanoparticles stabilised in polyvinylpyrrolidone. *Applied Surface Science*. 2014, roč. 321, 197–204. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.10.022. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433214022272>
- [64] PAL, A. a A. PILLANIA. Modulating the aggregation behavior of aqueous sodium dodecylsulphate (SDS) with addition of trisubstituted imidazolium based ionic liquid 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate [bdmim][BF₄]. *Fluid Phase Equilibria*. 2014, roč. 375, s. 23–29. DOI: 10.1016/j.fluid.2014.04.027. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378381214002477>

- [65] SAHIHI, M. et al. Structure–function relationship of β -lactoglobulin in the presence of sodium dodecylbenzenesulfonate. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 2012, roč. 52, s. 16–23. DOI: 10.1016/j.jct.2011.12.017. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021961411004502>
- [66] ROMIH, T. et al. A novel approach to the measurement of surfactant parameters in arthropod digestive juices. *Journal of Insect Physiology*. 2016, roč. 88, s. 48–54. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2016.03.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191016300257>
- [67] PAL, A. a A. PILLANIA. Effect of trisubstituted imidazolium based ionic liquid 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium chloride on the aggregation behaviour of sodium dodecylsulphate in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, roč. 452, s. 18–24. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.03.061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775714002994>
- [68] LIM, S. a S. M. HUDSON. Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric as an antimicrobial textile finish. *Carbohydrate Polymers*. 2004, roč. 56, č. 2, s. 227–234. DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.02.005. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861704000463>
- [69] WÓJCIK, O. P. et al. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2010, roč. 208, č. 1, s. 19–25. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915009004328>
- [70] STEJSKAL, J. a I. SAPURINA. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry*. 2005, roč. 77, č. 5, 815–826. DOI: 10.1351/pac200577050815. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2005.77.issue-5/pac200577050815/pac200577050815.xml>
- [71] MISHRA N. R. et al. Prothrombin time and international normalized ratio in pediatric liver disease. *Journal of Global Biosciences* [online]. 2013, roč. 2, č. 6, s. 241–246 [cit. 2016-04-14]. ISSN 2320-1355. Dostupné z: <http://www.mutagens.co.in/jgb/vol.02/6/11.pdf>

- [72] PERRY, D. a T. TODD. Activated Partial Thromboplastin Time [APTT]. *Practical-Haemostasis.com: A Practical Guide to Laboratory Haemostasis* [online]. Aktualizace 2012 [cit. 2016-04-14]. Dostupné z: <http://www.practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/aptt.html>
- [73] PERRY, D. a T. TODD. Thrombin Time. *Practical-Haemostasis.com: A Practical Guide to Laboratory Haemostasis* [online]. Aktualizace 2012 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/tt.html>
- [74] YANG, P. et al. Wettability and biocompatibility of nitrogen-doped hydrogenated amorphous carbon films: Effect of nitrogen. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 2006, roč. 242, č. 1–2, s. 22–25. DOI: 10.1016/j.nimb.2005.08.081. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X0501459X>
- [75] NIE, N. et al. Synthesis of copolymers using dendronized polyethylene glycol and assay of their blood compatibility and antibacterial adhesion activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, roč. 97, s. 226–235. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776512002056>
- [76] XIANG, T. et al. Surface hydrophilic modification of polyethersulfone membranes by surface-initiated ATRP with enhanced blood compatibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, roč. 110, s. 15–21. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.034. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776513002920>
- [77] HIGUCHI, A. et al. Chemically modified polysulfone hollow fibers with vinylpyrrolidone having improved blood compatibility. *Biomaterials*. 2002, roč. 23, č. 13, s. 2659–2666. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00406-9. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961201004069>
- [78] DEPPISCH, R. et al. Blood material interactions at the surfaces of membranes in medical applications. *Separation and Purification Technology*. 1998, roč. 14, č. 1–3, s. 241–254. DOI: 10.1016/S1383-5866(98)00079-3. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586698000793>

- [79] MAO, C. et al. Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving hemocompatibility. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004, roč. 110, č. 1–2, s. 5–17. DOI: 10.1016/j.cis.2004.02.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868604000132>
- [80] WANG, L. R. et al. Direct synthesis of heparin-like poly(ether sulfone) polymer and its blood compatibility. *Acta Biomaterialia*. 2013, roč. 9, č. 11, s. 8851–8863. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.07.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113003498>
- [81] XIANG, T. et al. Blood compatibility comparison for polysulfone membranes modified by grafting block and random zwitterionic copolymers via surface-initiated ATRP. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2014, roč. 432, s. 47–56. DOI: 10.1016/j.jcis.2014.06.044. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979714004639>
- [82] LI, R. et al. In vitro hemocompatibility of sulfonated polypropylene non-woven fabric prepared via a facile γ -ray pre-irradiation grafting method. *Applied Surface Science*. 2015, roč. 356, s. 1221–1228. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.08.052. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433215018656>
- [83] LIH, E. et al. Polymers for cell/tissue anti-adhesion. *Progress in Polymer Science*. 2015, roč. 44, s. 28–61. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.10.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670014001166>
- [84] YU, Q. et al. Anti-fouling bioactive surfaces. *Acta Biomaterialia*. 2011, roč. 7, č. 4, s. 1550–1557. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.12.021. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706110005854>
- [85] WU, L. et al. Poly(vinylidene fluoride)/polyethersulfone blend membranes: Effects of solvent sort, polyethersulfone and polyvinylpyrrolidone concentration on their properties and morphology. *Journal of Membrane Science*. 2006, roč. 285, č. 1–2, s. 290–298. DOI: 10.1016/j.memsci.2006.08.033. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738806005850>
- [86] HUMPOLÍČEK, P. et al. Cell proliferation on a conducting polymer (polyaniline) [online]. *Chemické listy* 106, 2012, s. 380–383 [cit. 2016-05-02]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_05_380-383.pdf

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PET	Polyetylentereftalát.
PUR	Polyuretan.
SPCA	Sérový akcelerátor konverse protrombinu.
AHG	Antihemofilický globulin.
PTC	Plasmová tromboplastinová složka.
PTA	Plasmatický předchůdce tromboplastinu.
FSF	Faktor stabilizující fibrin.
HMW kininogen	High molecular weight kininogen.
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor.
tPA	Tkáňový aktivátor plasminogenu.
ADP	Adenosindifosfát.
SIPA	Shear-induced platelet activation-aggregation.
PCL	Polykaprolakton.
PEUU	Poly(ester urethane urea).
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
PEG	Polyetylenglykol.
PEtOX	Poly(2-etyl-2-oxyzolin).
PVP	Polyvinylpyrrolidon.
PMMA	Polymethylmetakrylát.
PVC	Polyvinylchlorid.
PS	Polystyren.
PAA	Kyselina polyakrylová.
PVA	Polyvinylalkohol.

PANI	Polyanilin.
PAMPSA	Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid).
PEGMA	Poly(etylen glykol) metakrylát.
PT	Pro-thrombin time.
aPPT	Activated partial thromboplastin time.
TCT	Thrombin clotting time.
SDS	Dodecylsulfát sodný.
SDBS	Dodecylbenzensulfonát sodný.
APS	Amonium peroxydisulfát.
HCl	Kyselina chlorovodíková.
K3EDTA	Tri-draselná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové.
CaCl ₂	Chlorid vápenatý.
NIH/3T3, ATCC CRL-1658	Označení buněčné linie.
PBS	Phosphate buffered saline.
DPEG metakrylát	Dendronizovaný polyetylen glykolmetakrylát.
γ^{tot}	Celková povrchová energie.
σ^+	Kladná odchylka.
σ^-	Záporná odchylka.
PSBMA	Poly(sulfobetaine methacrylate).
ref	Reference.
PVDF	Polyvinylidenfluorid.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: koagulační kaskáda [15].....	17
Obrázek 2: krevní destička [27].....	22
Obrázek 3: adheze krevních destiček na povrch poškozené cévní stěny [31].....	22
Obrázek 4: krevní destička: a,b) neaktivovaná c,d) aktivovaná [33].....	23
Obrázek 5: schéma funkce krevních destiček [35].....	24
Obrázek 6: snímky ze skenovací elektronové mikroskopie (zvětšeno 3500x), porésní povrch modifikovaného materiálu a) PEUU 100 b) PEUU 95 c) PEUU 90 d) PEUU 85, upraveno dle [40].....	29
Obrázek 7: smáčivost materiálu a) špatná, b) dobrá [41].....	30
Obrázek 8: SEM snímky krevních destiček na povrchu a) hydrofobního, b) hydrofilního materiálu, upraveno dle [42].....	30
Obrázek 9: vliv topografie povrchu na adhezi krevních destiček na a) hladkém povrchu, c) nanostrukturovaném povrchu s b) a d) odpovídajícími krevními destičkami [43].....	32
Obrázek 10: zjednodušená struktura molekuly fibrinogenu [45].....	33
Obrázek 11: způsoby povrchové modifikace vodivých polymerů [47].....	40
Obrázek 12: oxidační stavy polyanilinu [50].....	43
Obrázek 13: struktura a) PVP [63] b) SDS [67] c) SDBS [68] d) taurinu [69].....	50
Obrázek 14: počítač s připojenou kamerou použité při měření povrchové energie.....	52
Obrázek 15: zařízení pro měření vodivosti materiálu (scanner, zdroj, elektroměr, držák s elektrodami).....	53
Obrázek 16: vzorek umístěný v držáku s elektrodami.....	54
Obrázek 17: závislost měrné elektrické vodivosti materiálů na čase.....	61
Obrázek 18: vliv materiálů na vybrané parametry koagulace.....	63
Obrázek 19: adheze fibroblastů, při 40 násobném zvětšení.....	65
Obrázek 20: proliferace fibroblastů po 24 hodinách, při 100 násobném zvětšení.....	69
Obrázek 21: proliferace fibroblastů po 48 hodinách, při 100 násobném zvětšení.....	71
Obrázek 22: fluorescenční fotografie fibroblastů po 48 hodinách, při 100 násobném zvětšení.....	73

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: koagulační faktory, upraveno dle [15].....	16
Tabulka 2: hodnoty velikostí pórů materiálů a jejich pokrytí krevními destičkami, upraveno dle [40].....	29
Tabulka 3: hodnoty povrchové energie materiálů	58
Tabulka 4: hodnoty měrné elektrické vodivosti materiálů	61
Tabulka 5: vliv materiálů na vybrané parametry koagulace.....	63

