

Vliv polyanilinu na krevní srážlivost

Lada Utěkalová

Bakalářská práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lada Utěkalová**
Osobní číslo: **T11467**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv polyanilinu na krevní srážlivost.**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými informacemi o vztahu polymerních povrchů a jejich modifikací na krevní srážlivost. V teoretické části práce zpracuje informace o hemostázy a hemokoagulaci a možnosti jejich ovlivnění povrchovými úpravami polymerů. Prakticky se seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a osvojí si základní techniky práce v laboratoři. V praktické části provede a vyhodnotí testy vlivu polyanilinu na krevní srážlivost.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Polymers for regenerative medicine. Publisher: Berlin ; New York : Springer, (2006) ISBN 3540333533.

Biomedical technology and devices handbook. Publisher: Boca Raton : CRC Press, (2004) ISBN 0-8493-1140-3

Cell Biology: A Laboratory Handbook, Four Volume Set. Publisher: Academic Press, 3 edition (July 18, 2005). ISBN-10: 0121647307.

Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique. Publisher: Wiley-Liss; 5 edition (July 29, 2005) ISBN-10: 0471453293.

Culture of Cells for Tissue Engineering. Publisher: Wiley-Liss; 1 edition (February 3, 2006) ISBN-10: 0471629359.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

10. ledna 2014

Termín odevzdání bakalářské práce:

28. května 2014

Ve Zlíně dne 7. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Utěkalová Lada

Obor: Polymerní materiály a
technologie

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 19.5.2014

..... 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Problematika kompatibility různých materiálů s krví je dlouhodobě studovaným a dosud ne zcela vyřešeným problémem. Existuje tedy snaha vytvořit takový materiál nebo materiálovou modifikaci, která by měla na koagulaci a další parametry hemokompatibility co nejmenší vliv. Materiálem zkoumaným v této práci byl polyanilin (PANI), vodivý polymer, který má široké možnosti využití v medicínských aplikacích.

Pro testy vlivu materiálu na krevní koagulaci byly připraveny polyanilinové filmy. Připravenými materiály byly PANI sůl, PANI báze a PANI-PAMPSA (poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)) kopolymer, připravený přidáním PAMPSA přímo do polymerační směsi (PANI-PAMPSA-R-1:1 a PANI-PAMPSA-R-2:1) anebo adsorpcí PAMPSA polymeru na povrch PANI filmu (PANI-PAMPSA-D). Materiály byly popsány pomocí testu povrchové energie a pro vyhodnocení jejich vlivu na koagulaci byly provedeny testy jejich vlivu na parametry koagulace, vybrané koagulační faktory a adhezi krevních destiček na povrchu materiálu. Dále pak byly provedeny testy buněčné proliferace a migrace. Cílem práce bylo zjistit, jestli je polyanilin v některé z testovaných úprav materiálem vhodným pro medicínské aplikace, ve kterých by se dostal do kontaktu s krví.

Klíčová slova: polyanilin, poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid), hemokompatibilita

ABSTRACT

There is no known hemocompatible material to date as the contact of blood with most of foreign materials causes hemocoagulation or influences other parameters of hemocompatibility. Thus, the efforts to prepare a hemocompatible biomaterial exist for decades. The material examined in this work is polyaniline (PANI). It is a conducting polymer with a wide range of possible applications in medical field.

Several different types of polyaniline films were prepared to determine their impact on chosen hemocompatibility parameters. The prepared materials were polyaniline salt (PANI-S) and base (PANI-B) and PANI-PAMPSA (poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)) copolymer, prepared either by adding the PAMPSA polymer to the polymerization mixture (PANI-PAMPSA-R-1:1 a PANI-PAMPSA-R-2:1) or PAMPSA adsorption on the PANI surface (PANI-PAMPSA-D). The materials were characterized by surface energy test. The impact on chosen coagulation parameters and coagulation factors, along with the platelet adhesion tests were applied to evaluate the materials impact on blood coagulation. The interaction with cell migration and proliferation are also outlined. The purpose of this work was to find out if polyaniline or any of its surface modifications is applicable as a blood-contacting material.

Keywords: polyaniline, poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid), hemocompatibility

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za odborný dohled a cenné rady při psaní této práce a Ing. Zdence Kucekové za pomoc při laboratorní práci.

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

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 PRINCIP KOAGULACE	13
1.1 HEMOSTÁZA.....	13
1.1.1 Vazokonstrikce.....	13
1.1.2 Reakce krevních destiček.....	13
1.1.3 Hemokoagulace.....	14
1.1.3.1 Koagulační faktory	14
1.1.3.2 Vnější systém.....	18
1.1.3.3 Vnitřní systém.....	18
1.1.3.4 Společný systém	19
1.2 REGULACE HEMOKOAGULACE A FIBRINOLÝZA.....	20
1.2.1 Regulace hemokoagulace.....	21
1.2.1.1 TFPI (tissue factor pathway inhibitor).....	21
1.2.1.2 Antitrombin.....	21
1.2.1.3 Protein C	22
1.2.1.4 Trombomodulin	22
1.2.2 Fibrinolýza	22
2 LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ KREVŇÍ SRÁŽLIVOST	24
2.1 PŘÍRODNÍ LÁTKY	24
2.2 UMĚLÉ LÁTKY	26
2.3 POLYMERNÍ MATERIÁLY.....	27
2.3.1 Interakce materiálu s krví.....	28
2.3.2 Metody povrchových úprav	29
2.3.2.1 Chemické metody	29
2.3.2.2 Fyzikální metody	30
2.3.3 Konkrétní materiály	30
3 POLYANILIN	33
3.1 SYNTÉZA	35
3.2 MORFOLOGIE	36
3.3 VLASTNOSTI.....	38
3.3.1 Mechanické vlastnosti.....	38
3.3.2 Elektrické vlastnosti	38
3.3.3 Ostatní vlastnosti.....	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
4 METODIKA	41
4.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	41
4.1.1 See system.....	41
4.1.2 ACL Elite Pro.....	41
4.1.3 SYSMEX CA-1500.....	41
4.1.4 Sulphorhodamine B assay.....	42

4.2	PŘÍPRAVA POLYANILINOVÝCH FILMŮ	42
4.3	POVRCHOVÁ ENERGIE	43
4.4	TESTY KREVŇÍ KOAGULACE	44
4.5	TESTY VLIVU NA KOAGULAČNÍ FAKTORY	45
4.6	TESTY VAZBY KREVŇÍCH DESTIČEK.....	45
4.7	TESTY PROLIFERACE A MIGRACE BUNĚK	45
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
5.1	POVRCHOVÁ ENERGIE	47
5.2	TESTY KREVŇÍ KOAGULACE	48
5.3	TESTY VLIVU NA KOAGULAČNÍ FAKTORY	50
5.4	TESTY VAZBY KREVŇÍCH DESTIČEK.....	53
5.5	PROLIFERACE A MIGRACE BUNĚK	54
	ZÁVĚR	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	62
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	77
	SEZNAM TABULEK.....	78

ÚVOD

Zejména v posledních desítkách let se v populaci stále častěji vyskytují kardiovaskulární choroby, často takové, které vyžadují vnější zásah v podobě implantátů (př. srdeční chlopně, cévní náhrady). Ty musejí být v mnoha případech vyrobeny ze syntetických materiálů. Pokud se ale cizí materiál dostane do kontaktu s krví, vyvolává obrannou reakci organismu, jejíž součástí je také to, že se krev na povrchu tohoto materiálu začne srážet, proto existuje snaha vyvíjet takové materiály, které budou mít pro podobné použití vhodné vlastnosti, především musejí být co nejvíce hemokompatibilní.

Tato práce je tedy soustředěna na vliv syntetických materiálů na krevní srážlivost a metody, jakými se modifikuje jejich povrch tak, aby se tento vliv co nejvíce omezil. Především je pak zaměřena na polyanilin, který by díky svým vlastnostem mohl mít široké uplatnění v medicínských aplikacích, a sleduje jeho vliv na krevní srážlivost, jednak v čisté formě a jednak v jeho modifikacích. Cílem práce je zjistit, jestli je polyanilin nebo některá z jeho modifikací materiálem vhodným pro použití v medicínských aplikacích, ve kterých by se dostal do kontaktu s krví.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PRINCIP KOAGULACE

1.1 Hemostáza

Zástava krvácení je složitý, dynamický děj, který je odpovědí na narušení celistvosti cévní stěny a chrání organismus před krevními ztrátami, které by mohly ohrožovat jeho život. Hemostáza se skládá z reakce cév v místě poranění, reakce krevních destiček a vlastního srážení krve, tedy hemokoagulace [1].

1.1.1 Vazokonstrikce

V místě poranění dojde ke krátkodobému, ale rychlému zúžení cévy, způsobenému několika faktory. Jedná se o přímou odpověď stěny cévy na poškození [2], dále mají vliv některé látky, jako ADP, serotonin a derivát kyseliny arachidonové tromboxan, uvolňované při hemostatických dějích z krevních destiček [3].

1.1.2 Reakce krevních destiček

Pokud je celistvost vnitřního povrchu cévy porušena, dojde k obnažení subendotelární vrstvy cévní stěny. Ta je z velké části tvořena kolagenovými vlákny. Von Willebrandův faktor, glykoprotein syntetizovaný buňkami cévní výstelky, tvoří vazbu mezi receptory na povrchu krevních destiček a záporně nabitými vlákny kolagenu a umožní adhezi destiček, které zůstávají v místě poranění a nejsou odplavovány krví [1]. Vazbou na kolagen dochází k přenosu vnitrobuněčných signálů, které destičky aktivují a změni jejich funkci [3]. Aktivované destičky měni tvar, stávají se kulovitými a na jejich povrchu vznikají dlouhé a tenké výběžky (filopoidie).

Vlivem trombinu (důležitý aktivátor destiček, v malém množství rychle vzniká při srážení krve) a dalších agregačně působících látek dochází k agregaci (shlukování) destiček. Zároveň se z membrány destiček uvolňuje kyselina arachidonová a metabolizuje na tromboxan, který podporuje další agregaci destiček [2]. Další fází agregace destiček je uvolnění obsahu granul, především ADP, který podporuje aktivaci dalších destiček a také modifikuje povrch membrány krevních destiček tak, že dojde k vytvoření receptorů pro fibrinogen. Jeho molekuly se svými konci vážou na receptory dvou různých destiček a spojují je do agregátů [1]. Jednotlivé destičky se nakonec rozpadnou a splynou. Tím vzniká destičková (primární) zátka, která je potom dále zpevňována a stabilizována vlákny fibrinu vzniklými

hemokoagulaci [2]. Pod takto zpevněnou zátkou dochází k zacelování cévní stěny kolagenem [4]. Aktivované destičky mají podíl také na aktivaci srážecích faktorů II a X [1].

Činnost krevních destiček je kontrolována tak, aby se v případě poranění rychle aktivovaly a vytvořily trombus. Naopak neporušený povrch cévní stěny brání adhezi a agregaci krevních destiček, především produkcí prostacyklinu, který destičky inaktivuje, a tím brání zbytečné tvorbě trombů v neporušených cévách [3].

Podobně jako odhalená vlákna kolagenu můžou působit i jiné záporně nabitě povrchy jako např. sklo nebo některé polymerní materiály [5], jako je sulfonovaný kopolymer styrenu a metylmetakrylátu [6]. Jiné polymery, i když nemají záporný náboj, např. polyvinylchlorid, který je často používaný jako biomateriál, také způsobují srážení krve, pouze jiným mechanismem [5].

1.1.3 Hemokoagulace

Smyslem hemokoagulace je převedení rozpustného fibrinogenu na nerozpustný polymerní fibrin vlivem enzymu trombinu, k jehož vzniku dochází účinkem takzvané koagulační kaskády. Jedná se o sled navzájem navazujících enzymatických reakcí srážecích faktorů, při kterých dochází k postupné aktivaci neúčinných proenzymů [7]. Látky, které se reakcí zúčastňují, pocházejí z tkání, destiček a krevní plasmy. Aktivované mají obvykle podobu proteolytických enzymů, jejich aktivace je způsobena štěpením enzymem, který byl aktivovaný v předcházející reakci. Cílem koagulační kaskády je tvorba aktivátoru protrombinu [2].

Pro správnou funkci některých faktorů je třeba přítomnosti vitamínu K, který ovlivňuje modifikace struktury molekul enzymů [4], a všechny kroky kaskády, kromě tzv. kontaktní fáze, kterou začíná vnitřní systém, probíhají za přítomnosti vápenatých iontů [7].

1.1.3.1 Koagulační faktory

Už před stovkami let se lidé snažili vysvětlit, proč se krev při poranění sráží. Jednou z prvních teorií, kterou podporoval Aristoteles i Platon, bylo to, že se krev sráží, protože když opustí tělo, ochladí se. Až v sedmnáctém století zjistil Marcello Malpighi pomocí mikroskopu, že pokud z krevní sraženiny vymyje červené krvinky, zůstanou tenká vlákna, která nazval fibrin [8].

Na začátku dvacátého století vznikl první souvislejší popis koagulace, který zahrnoval čtyři koagulační faktory: trombokinázu, vápníkové kationty, protrombin a fibrinogen. Později byly objeveny další faktory koagulace, které byly označeny římskými číslicemi (historické důvody, číslování nepopisuje posloupnost reakcí), aktivované faktory jsou označovány písmenem a [2].

Faktor I (fibrinogen) je glykoprotein syntetizovaný v játrech. Do krevního oběhu je uvolňován jako molekula složená ze dvou podjednotek, z nichž každou tvoří tři různé polypeptidové řetězce Aa, Bb a c, spojené disulfidovými můstky [9]. Aktivace trombinem způsobuje odštěpení části A a B řetězců, a fibrinogen je přeměněn na fibrin-monomer, který spontánně polymeruje a tvoří vlákna [10]. Pomocí příčných vazeb tvořených faktorem XIIIa dochází k tvorbě stabilizované fibrinové sítě [11].

Faktor II (trombin) má nezastupitelnou úlohu v koagulační kaskádě. Zajišťuje aktivaci fibrinogenu a jeho přeměnu v nerozpustná vlákna fibrinu. Funguje také jako katalyzátor i pro mnoho dalších reakcí, jako je aktivace proteinu C a krevních destiček, nebo zpětnou aktivaci kofaktoru V nebo VIII, je proto častým cílem při léčbě antikoagulanty nebo antitrombotiky [12].

Faktor III (tkáňový tromboplastin, tkáňový faktor) je transmembránový glykoprotein tvořený endoteliálními buňkami a monocyty. Po buněčné aktivaci (následuje po narušení cévy) je tkáňový faktor exponován na plasmatické membráně buňky, kde interaguje s cirkulujícím faktorem VII nebo jeho aktivovanou formou VIIa [9]. Spolu s ním tvoří komplex připojený k buněčné membráně. Tento komplex je nejdůležitějším aktivátorem koagulační kaskády [13], tkáňový faktor ale také podporuje růst sraženiny [14].

Faktor IV, vápenaté ionty, je běžně přítomný v krevní plasmě, nachází se i v krevních destičkách a je důležitý pro hemokoagulaci, která je založena na kaskádovitě řadě enzymatických reakcí, které všechny probíhají právě za přítomnosti kationtů vápníku [15]. Přítomnost Ca^{2+} iontů je nutná k dosažení potřebné konformace N-konce řetězců enzymů, především ale umožňuje vytvoření můstků mezi jednotlivými enzymy, takže může dojít k reakci [16].

Faktorem V je proakcelerin, syntetizovaný především jaterními buňkami, jeho množství proto klesá při narušení funkce jater. V plasmě koluje jako neaktivní jednořetězcový poly-

peptid. Z menší části (asi 20 %) se ale vyskytuje také v destičkových granulech. Aktivovaný Va je kofaktorem protrombinázového komplexu, který aktivuje protrombin na trombin. Strukturou se podobá faktoru VIII.

Nedostatek faktoru má souvislost se zvýšenou krvácivostí, především po úrazech nebo operacích [17], mutace faktoru V mohou ale naopak zvyšovat riziko trombózy.

Faktor VII (prokonvertin) je syntetizovaný v játrech a závislý na vitamínu K, jeho nadbytek je rizikovým faktorem při vzniku trombotických onemocnění. V krevní plasmě se asi z 99 % vyskytuje jako enzymový prekurzor, zbylé 1 % je aktivovaný enzym, sám poměrně málo reaktivní, pokud netvoří komplex s faktorem III [13]. Pro plné dosažení jeho katalytických vlastností je nutná přítomnost tkáňového faktoru. Aktivovaný VIIa je serinová proteáza podobná například trypsinu [18].

Faktor VIII (antihemofilický faktor) je glykoprotein syntetizovaný v játrech jako velká jednořetězcová molekula. V krvi cirkuluje jako nekovalentní komplex s von Willebrandovým faktorem, který ho stabilizuje a brání jeho předčasné aktivaci [19]. Při aktivaci trombinem faktor VIIIa a von Willebrandův faktor disociují a VIIIa se váže na fosfolipidový povrch, kde interaguje s faktorem IXa. Ke správné funkci vyžaduje přítomnost dvouvalentních iontů kovu jako Ca^{2+} nebo Mn^{2+} [20].

Antihemofilický faktor je životně důležitý a v koagulační kaskádě plní mnoho různých funkcí. Jeho nedostatek způsobuje dědičnou hemofilii A [21].

Faktor IX (Christmasův faktor) je vitamin K závislý prekurzor IXa, syntetizovaný hepatocyty. Jeho nedostatek způsobuje hemofilii B [22].

Faktor X se nazývá Stuartův-Prowerův faktor. Je to proteáza závislá na přítomnosti vitamínu K, svojí strukturou připomíná strukturu ostatních faktorů závislých na vitamínu K [23]. Je syntetizovaný v játrech jako jednořetězcová molekula, v krevní plasmě ale potom cirkuluje jako dvouřetězcový glykoprotein, který hraje zásadní roli v koagulační kaskádě, protože po své aktivaci tvoří komplex s faktorem V a aktivuje protrombin na trombin [24].

Jeho deficit je jednou z nejvzácnějších dědičných poruch koagulace [23].

Faktor XI (plasmatický předchůdce tromboplastinu, PTA) vzniká v játrech, nezávisle na přítomnosti vitamínu K, a má roli ve vnitřním i vnějším koagulačním systému [25]. Je to homodimer tvořený dvěma identickými polypeptidovými řetězci spojenými kovalentní disulfidovou vazbou. Obě tyto podjednotky mohou reagovat s trombinem, faktorem XIIa nebo XIa za tvorby aktivního faktoru XIa [26]. Nedostatek PTA je vzácný a obvykle nezvyšuje tendence ke spontánnímu krvácení, může ale způsobovat krvácení spojené s operacemi nebo zraněními, v některých případech může být dědičný. Díky své souvislosti jak s koagulací, tak s fibrinolýzou, zvýšená hladina PTA zvyšuje riziko trombotických onemocnění, naopak jeho mírný nedostatek může vzniku stejných onemocnění zabránit [25].

Faktor XII (Hagemanův faktor) je syntetizován v játrech a skládá se ze dvou řetězců, lehkého a těžkého, které jsou navzájem spojeny disulfidickou vazbou [27]. Obsahuje proteázovou doménu, která je aktivována při kontaktu s negativním povrchem, a je tedy začátkem vnitřního koagulačního systému. Aktivovaný XIIa se také váže na endoteliální buňky a extracelulární matrix a má roli při hojení poškození cévy [28]. Nedostatek Hagemanova faktoru se neprojevuje zvýšenou krvácivostí [27].

Faktor XIII (fibrin stabilizující faktor) je tetramer složený ze dvou A–podjednotek a dvou B–podjednotek, které jsou dohromady spojeny nekovalentními vazbami. A–podjednotky jsou syntetizovány v játrech a kostní dřeni, B–podjednotky jsou syntetizovány v játrech a slouží jako nosič pro katalyticky aktivní podjednotky A [29]. Faktor XIII je aktivován trombinem za přítomnosti vápníkových kationtů. Hlavní funkcí XIIIa je stabilizace vznikající fibrinové sítě vytvořením příčných vazeb mezi molekulami fibrinu a vazba fibrinu na kolagen v cévních stěnách [30]. Ochrňuje také nově vzniklou sraženinu před fibrinolýzou, je nezbytný pro udržení těhotenství a zapojuje se do hojivých procesů [31].

Deficit faktoru XIII vyvolává vzácnou krvácivou chorobu a nedá se zjistit běžnými testy krvácivosti [32].

Koagulační děje se rozdělují do dvou systémů. Všechny faktory, které se účastní vnitřního systému, jsou obsaženy v krevní plasmě. Vnější systém začíná uvolněním tkáňového tromboplastinu. Výsledkem obou systémů je aktivovaný faktor X, proto bývá následující sled reakcí, které končí vytvořením fibrinu, považován za společný systém [2]. Toto rozdělení

je ovšem jen zjednodušující, ve skutečnosti se vnitřní a vnější systém do určité míry ovlivňují [3].

1.1.3.2 Vnější systém

Vnější systém hemokoagulace je rychlý a vede k aktivaci faktoru X. Je tvořen tkáňovým tromboplastinem (faktor III), plasmatickým faktorem VII, vápenatými ionty a faktorem X [7].

Systém začíná uvolněním tkáňového faktoru v místě poranění. Tkáňový faktor se váže na faktor VII, tím ho aktivuje a pak vystupuje jako jeho kofaktor při katalyzované aktivaci faktoru X [2]. Aktivace faktoru X zprostředkovává spojení mezi vnějším a vnitřním systémem, podobně se vnitřní dráhy zúčastňují také komplexy faktoru VIIa a tkáňového faktoru, které také aktivují faktor X.

1.1.3.3 Vnitřní systém

Na rozdíl od rychlého vnějšího systému je tvorba aktivovaného faktoru X prostřednictvím vnitřní dráhy hemokoagulace relativně pomalá. Začíná kontaktní fází, během které jsou faktory XII (Hagemanův faktor) a XI (plasmatický předchůdce tromboplastinu), prekalkikrein a vysokomolekulární kininogen (HMK) vystaveny negativně nabitému povrchu. Ten je obvykle představován strukturami odhalenými poraněním, tedy bazální membránou nebo kolagenem, ale také fosfolipidy aktivovaných destiček, pro testy *in vitro* se pak používají skleněné nebo kaolinové povrchy.

Stykem se záporně nabitým povrchem je prekalkikrein přeměňován na kalikrein a proteolytickou reakcí aktivuje faktor XII, aktivovaný faktor XIIa recipročně aktivuje další prekalkikrein, z HMK uvolňuje bradykinin, látku se silnými vasodilatačními účinky, a v dalším kroku kaskády rychle aktivuje faktor XI, jehož úkolem je aktivovat faktor IX (Christmasův faktor) [1].

K aktivaci faktoru IX je nutná přítomnost kationtů vápníku, může být aktivován jak faktorem XIa, ale také faktorem VIIa, vzniklým ve vnějším systému koagulace [2]. Faktor IXa v komplexu společně s tkáňovým faktorem (faktor III) a faktorem VIII (oba vzniklé vnějším systémem) v přítomnosti vápníkových kationtů přeměňují faktor X (Stuartův faktor)

na aktivovaný faktor Xa, a to na povrchu membrány destiček [3] nebo na buňkách endotelu cévy [2].

Úlohou HMK je přinášet do poraněného místa další prekalikrein a faktor XI, které by se mohly zapojit do reakce [3].

1.1.3.4 Společný systém

Vznikem faktoru Xa se sbíhají vnitřní a vnější systém koagulace a reakční kaskáda dále pokračuje jako společný systém.

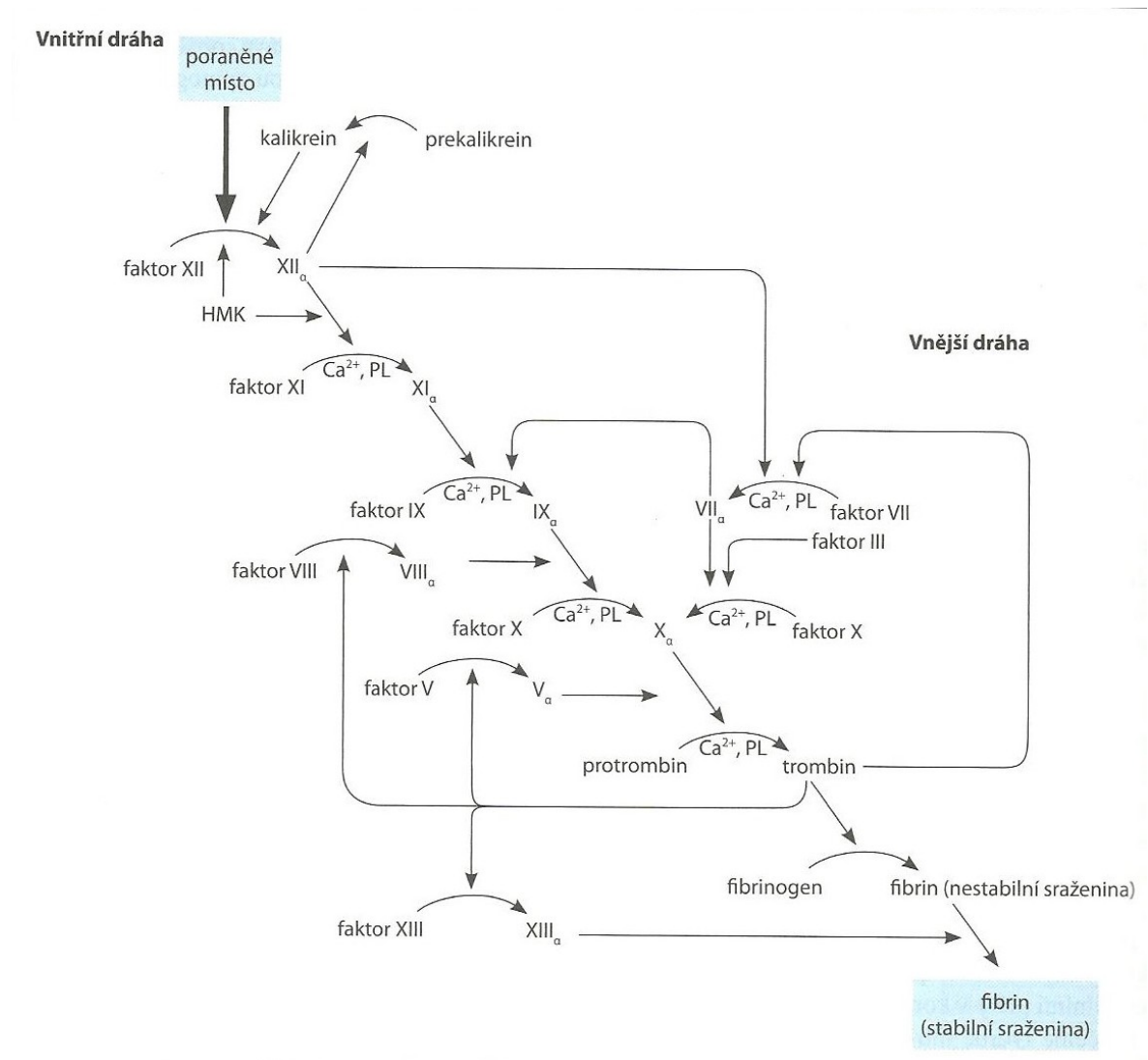
Faktor Xa je jediným enzymem, který dokáže štěpit vazby protrombinu a tak ho přeměnit na trombin. Reakce probíhá za přítomnosti faktoru V, fosfolipidů a vápenatých kationtů [7]. Dochází ke vzniku komplexu, jehož enzymem je Xa, Va je kofaktor s vysokou afinitou k fosfolipidům [2].

Faktor Xa je pomalý aktivátor, jeho aktivita roste v přítomnosti ostatních látek komplexu (především faktoru Va). Aktivovaný faktor X aktivuje protrombin na trombin (faktor IIa) [3], a to štěpením, které vytvoří aktivní dvouřetězcovou molekulu trombinu, ta je pak uvolněna z povrchu destičky, kde byla navázána můstky tvořenými ionty vápníku. Trombinové řetězce jsou spojeny disulfidovou vazbou [1]. Trombin má několik funkcí, urychluje aktivaci některých koagulačních faktorů v místě poranění, aktivuje faktory V, VIII a XIII, urychluje aktivaci faktoru IX, aktivuje i krevní destičky. Především ale způsobuje přeměnu fibrinogenu na fibrin [3].

Trombin reaguje s amino koncovými částmi α a β řetězců fibrinogenu a uvolňuje z něj dva malé fibrinopeptidy A a B. Zbytek molekuly se nazývá fibrin-monomer. Odštěpení fibrinopeptidů zpřístupní na molekule vazebná místa. Monomerní molekuly fibrinu spontánně agregují v pravidelném střídavém uspořádání, ve kterém jsou monomery spojeny nekovaletními vazbami, vzniká fibrin-polymer.

V této podobě může ještě docházet k depolymeraci fibrinu, ten je proto stabilizován faktorem XIIIa (fibrin stabilizující faktor). XIIIa je vysoce specializovaný enzym aktivovaný trombinem, který kovaletně zesiluje fibrin vytvořením peptidových vazeb mezi amidovými skupinami glutaminu a ϵ -aminoskupinami lysinových zbytků obsaženými v sousedních molekulách fibrinu. Tím dojde ke vzniku stabilnější sraženiny [1].

Takto stabilizovaný fibrin je odolnější, pevnější a pružnější. Fibrinová síť zpevňuje dočasný destičkový trombus a vytvoří tak definitivní hemostatickou zátku, která je hustá, nepropustná a mechanicky odolná. Ve fibrinové síti se zachycují krvinky, fibrin také podporuje hojivé procesy tkání [7].



Obrázek 1: Hemokoagulační kaskáda [3]

1.2 Regulace hemokoagulace a fibrinolýza

Krev cirkuluje v žilách jako tekutina, po narušení cévy se ale okamžitě rozběhne proces srážení krve, aby nedošlo k velkým krevním ztrátám. Tento proces probíhá velice rychle, první fibrin je vytvořen už po několika vteřinách po poranění, což je umožněno právě kaskádovitým postupem reakcí. Tato vlastnost krve musí být pečlivě regulována, aby se pře-

dešlo jak přehnané tvorbě sraženin, která by mohla působit zdravotní komplikace, tak zbytečnému srážení krve v neporušených cévách [13].

1.2.1 Regulace hemokoagulace

Celá hemokoagulace je ovládána systémem aktivačních a inhibičních signálů, které jsou navzájem v rovnováze. Nejjednodušší systém, který působí inhibičně vůči krevnímu srážení, je proud krve, který ředí koagulační faktory a odnáší je dál od místa zranění. V buňkách endotelu neporušené cévní stěny jsou syntetizovány látky s antikoagulačním účinkem, které brání spuštění koagulační kaskády [2].

Další možností je inhibice konkrétních koagulačních faktorů v místě poranění.

1.2.1.1 TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*)

Nejdůležitějším iniciátorem hemokoagulace je komplex tkáňového faktoru a faktoru VIIa. Tento komplex rychle aktivuje faktory IX a X, je proto nutné ho rychle inaktivovat, aby se koagulace omezila jenom na oblast poranění a ve správné míře. Toho je dosaženo pomocí TFPI, který je uvolňován endoteliálními buňkami. TFPI je multidoménový inhibitor, který tvoří komplex s Xa, a pak se váže na TF-VIIa komplex, čímž zabraňuje aktivaci koagulační kaskády.

1.2.1.2 Antitrombin

Antitrombin je serinová proteáza schopná inhibovat funkci některých aktivovaných faktorů koagulace. Jedná se o důležité faktory koagulace, jako jsou faktory IXa, Xa, komplex tkáňového faktoru a faktoru VIIa, stejně jako trombin. Tyto faktory se rychle vážou na molekuly antitrombinu, tvoří s nimi stabilní komplexy a jsou neutralizovány. Antitrombin se váže s volným trombinem a Xa mnohem lépe než s faktory, které už jsou obsaženy v komplexu, a odstraňuje je z krevního oběhu. Tato jeho schopnost je ještě zesílena heparinem, což je základ antikoagulační funkce farmaceutických heparinů.

Okolo 5 % pacientů s žilní trombózou trpí deficitem antitrombinu.

1.2.1.3 *Protein C*

Nejdůležitějším mechanismem inhibice krevní srážlivosti je dráha proteinu C. Protein C je plasmatický protein závislý na vitamínu K, v krvi cirkuluje jako neaktivní enzym. K jeho aktivaci je nutná vazba na transmembránový receptor prezentovaný na endoteliu (takzvaný endoteliální receptor proteinu C, EPCR) a přítomnost trombinu. Volný trombin se váže na trombomodulin a dostává se tak do kontaktu s proteinem C, připraveným k aktivaci.

Trombin v komplexu s trombomodulinem aktivuje protein C odštěpením části polypeptidu z těžkého řetězce zymogenu. Molekula proteinu C disociuje od EPCR a váže se s proteinem S. V této podobě omezuje proteolytické vlastnosti faktorů Va a VIIIa, jeho hlavní funkcí je tedy zabránit tvorbě sraženiny.

Existuje mnoho mutací genu pro protein C, které většinou vedou k defektům v jeho struktuře, nebo k jeho úplné absenci [13].

1.2.1.4 *Trombomodulin*

Trombomodulin je glykoprotein, který se nachází na povrchu membrány buněk cévní stěny. Jeho molekuly se vážou na volný trombin a brání tak tomu, aby katalyzoval přeměnu fibrinogenu na fibrin [3].

1.2.2 **Fibrinolýza**

Pokud dojde k poranění cévní stěny, uvolnění tkáňového faktoru spustí koagulační kaskádu a tvorby fibrinu je možno dosáhnout během několika sekund. Prakticky okamžitě se také nastartuje fibrinolytický systém, který omezuje přítomnost fibrinu jen na místo zranění a zároveň brání další nadměrné aktivaci koagulační kaskády.

Fibrinolýza je tedy kontrolní mechanismus hemokoagulace nutný k udržení hemostatické rovnováhy. Je tvořen enzymy, které štěpí fibrin na fragmenty nazývané degradační produkty fibrinu.

Enzymem, který degraduje fibrin na jeho degradační produkty, je plasmin. Ten se v krvi nachází jako neaktivní plasminogen. Vazbou na molekulu fibrinu dochází k jeho aktivaci na plasmin. K jeho aktivaci může docházet také pomocí faktorů XIIa, XIa a kallikreinu,

nejdůležitějším aktivátorem je ale tkáňový aktivátor plasminogenu (tPA, tissue plasminogen activator), jeho schopnost aktivovat plasminogen je výrazně zesílena vazbou na fibrin.

Aktivovaný plasmin může být inhibován působením α_2 -antiplasminu, který se snadno váže na volný plasmin (nenavázaný na fibrin) a tvoří s ním stabilní a nevratný plasmin-antiplasminový komplex. Zároveň byly dosud popsány čtyři typy inhibitorů aktivátorů plasminogenu, jejichž úlohou je regulace fibrinolýzy, nejdůležitějším z nich je PAI-1. Vzniká v endoteliálních buňkách a v krvi cirkuluje vázaný s tPA a brání tak spuštění fibrinolýzy a předčasnému rozpouštění fibrinové sítě. Aktivita plasminu může být inhibována také přímo, enzymem TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor), který je aktivován komplexem trombinu a trombomodulinu [13].

Fibrinolýza je zároveň ovlivňována strukturou fibrinové sítě. Tenčí fibrinová vlákna zpomalují tvorbu tPA a jsou také odolnější fibrinolýze než silnější vlákna, což je způsobeno tím, že sítě složené z tenčích vláken jsou hustěji propleteny a výrazněji tak limitují lytickou aktivitu plasminu [33].

2 LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ KREVNÍ SRÁŽLIVOST

Rychlost hemokoagulace nebo aktivitu krevních destiček je možné ovlivnit také vnějšími zásahy, fyzikálními nebo chemickými, tak, aby se srážení urychlilo nebo zpomalilo [34].

Například při krvácivých chorobách se rychlost srážení krve reguluje dodáváním chybějících nebo špatně funkčních koagulačních faktorů, tím je znovu umožněna nepřerušenosť koagulační kaskády. Podobný vliv mohou mít také některé hadí jedy. Ty často obsahují látky, které interagují s krevními destičkami nebo ovlivňují koagulační faktory a tím v některých případech koagulaci podporují, brání jí, anebo podporují fibrinolýzu [35]. Jedná se o různé typy chemických látek, jako jsou například nukleotidy, fosfolipázy nebo metaloproteinázy, a jejich činnost v organismu nejčastěji vede k degradaci fibrinogenu nebo jiných faktorů, v některých případech ale působí jako enzymy a aktivují vybrané koagulační faktory. Účinky rozdílných látek obsažených v hadích jedech jsou specifické, čehož se využívá při některých laboratorních testech [36].

V praxi, ať už pro laboratorní účely nebo při některých poruchách hemokoagulace, je ale mnohem častější snaha koagulaci zpomalit nebo jí úplně zabránit pomocí protisrážlivých činidel neboli antikoagulantů.

Zamezení srážení krve je možné dosáhnout fyzikálně, například defibrinací, tedy odstraněním fibrinu, ať už mechanicky nebo s pomocí hadích jedů. Dále je možné použít dekalciﬁkaci (vysrážení Ca^{2+} citrátem nebo šťavelanem) nebo zabránit kontaktní fázi koagulace umístěním krve do nádoby s nesmáčivým povrchem [2].

2.1 Přírodní látky

Jedním z prvních objevených antikoagulantů je hirudin, popsáný už v 19. století [37]. Je to malá jednořetězcová bílkovina izolovaná ze slinných žláz pijavky lékařské, která pomocí nekovalentních vazeb vytvoří komplex s trombinem a tak ho inaktivuje [38].

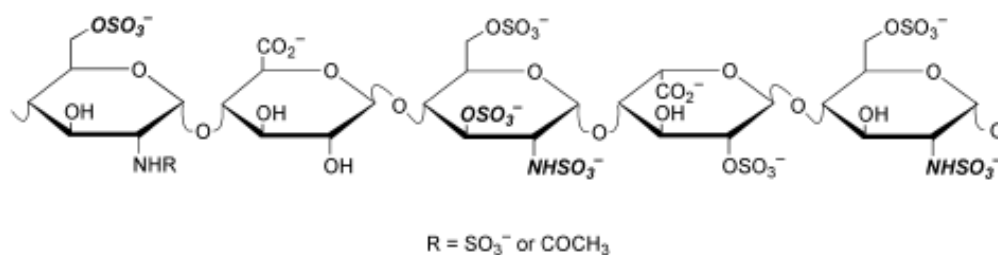
Běžně užívaným analgetikem a antipyretikem je aspirin (kyselina acetylsalicylová, derivát kyseliny salicylové), který ve větších dávkách (asi 50 mg/den) brání agregaci krevních destiček [39]. Aspirin nevratně acetyluje a tím inaktivuje cyklickou oxygenázu, která v nepřítomnosti aspirinu oxygenuje kyselinu arachidonovou na prostaglandin [40]. Metabolit

prostaglandinu tromboxan A₂ způsobuje změnu tvaru destiček a jejich agregaci, a nedostatek tromboxanu potom destičkám zabraňuje v aktivaci [41].

Velký význam má v koagulační kaskádě přítomnost vitamínu K, ten je nezbytný pro biosyntézu protrombinu, koagulačních faktorů VII, IX a X a některých dalších proteinů jako proteiny C a S [39]. Vitamin K se v organismu vyskytuje ve dvou formách. Fylochinon má rostlinný původ, zatímco menachinony jsou řada látek s různě dlouhými nenasycenými postraními řetězci, syntetizované bakteriemi střevní mikroflóry [42]. Přímými antagonisty vitamínu K jsou kumariny [43]. Kumarin je krystalická látka, která obsahuje aromatické jádro a laktonový kruh [44] a podobně jako jeho deriváty je používán jako antikoagulant. Jedním z nejpoužívanějších je warfarin, který zabraňuje tomu, aby vitamin K mohl fungovat jako kofaktor při syntéze proteinů, a tak je míra aktivace protrombinu redukována až o 50 %, aktivita dalších faktorů až o 40 %, a zpomaluje tak tvorbu trombinu a krevní sraženiny [45].

Pravděpodobně nejznámější antikoagulant heparin byl objeven v roce 1916 a byl izolován ze psích jater [37]. Heparin je polysacharid s antikoagulačním účinkem, přirozeně se nachází v různých tkáních a v bazofilních granulích žírných buněk. Je to směs glykosaminoglykanových řetězců, jednotlivé složky se liší svou molekulovou hmotností [39].

Účinek heparinu spočívá v interakci specifického pentasacharidového segmentu, na kterém jsou navázané sulfátové estery, s antitrombinem, čímž usnadňuje interakci antitrombinu s trombinem a faktorem Xa [46]. Heparin zvyrazňuje také inhibici aktivovaného faktoru XIa [25], přítomnost heparinu v krvi zvyšuje koncentraci TFPI (tissue factor pathway inhibitor) tím, že ho uvolňuje z komplexu, který TFPI tvoří s proteoglykany na povrchu endoteliálních buněk [47]. Heparin se ale váže také k endotelium a některým plasmatickým bílkovinám, čímž se snižuje jeho antikoagulační aktivita, protože se tak snižuje množství heparinu, který by mohl interagovat s antitrombinem [48].



Obrázek 2: Vazebné místo pro antitrombin na molekule heparinu [106]

V posledních letech je heparin pro lékařské účely často nahrazován nízkomolekulárními hepariny, což jsou frakce kratších řetězců o nižší hmotnosti, které si zachovávají své antitrombotické účinky, ale mají méně výraznou antikoagulační aktivitu [39].

2.2 Umělé látky

Kromě přírodních látek se pro léčbu trombotických onemocnění často používají také modifikované přírodní látky nebo látky plně syntetické. Ty se potom rozdělují do několika skupin, podle svého původu nebo mechanismu působení.

Jedněmi z často klinicky používaných antikoagulantů jsou antagonisté vitamínu K, z nichž nejčastěji používaným je warfarin, derivát kumarinu (4-hydroxykumarin). Warfarin zamezuje působení vitamínu K během syntézy faktorů II, VII, IX a X a snižuje jejich produkci až o 50 %, při současně redukci jejich biologické aktivity. Odvozením od klasického heparinu pak dále vzniká skupina nízkomolekulárních heparinů, jako jsou například dalteparin, enoxaparin nebo nadroparin. Tyto látky mají dobrou afinitu k antitrombinu III, a ve vazbě s ním urychlují inhibici faktoru Xa. Dále jsou schopné podporovat například uvolňování TPFI a mají vliv na agregaci krevních destiček.

Kromě heparinů ovlivňují agregaci destiček také další antiagregancia (inhibitory agregace trombocytů, např. klopidogrel, tiklopidin, indobufen, triflusal). Nejčastěji fungují jako antagonisté destičkového receptoru pro ADP nebo podobně jako kyselina acetylsalicylová blokuje destičkovou cyklooxygenázu a inhibují syntézu tromboxanu A₂.

Další skupinou antikoagulačně působících látek jsou enzymy, jako altepláza, retepláza nebo tenektepláza. Jedná se o rekombinantní aktivátory plasminogenu (tenektepláza vzniká

modifikací přirozeného tPA), které aktivují plasminogen na plasmin, ten potom štěpí fibrin, který je součástí trombu a rozpouští tak krevní sraženinu [49].

Protože velice důležitou roli v procesu krevního srážení hraje trombin, je mnoho moderních přípravků určených k zabránění koagulaci zaměřeno na zabránění vzniku trombinu nebo blokování jeho aktivity [50]. Takové látky jsou označovány jako přímé inhibitory trombinu (např. desirudin, bivalirudin) a jejich funkce často spočívá v jejich vazbě na katalytické vazebné místo vázaného i volného trombinu, který pak nemůže plnit svoji funkci a aktivovat další koagulační faktory, především fibrinogen na fibrin.

Poslední významnou skupinou jsou jiná antikoagulantia a antitrombotika. Například fondaparinux je syntetický selektivní inhibitor FXa. Vazbou na antitrombin III fondaparinux mnohonásobně zesiluje přirozenou deaktivaci faktoru Xa, tím přerušuje koagulační kaskádu a brání vzniku trombu, aniž by měl vliv na krevní destičky nebo trombin [49].

V posledních letech pak byl další výzkum antikoagulantů zaměřen především na látky s cílenou antikoagulační aktivitou, tedy takové, které mají účinky na některé specifické kroky koagulační kaskády [51], a kromě inhibitorů trombinu mezi ně patří například inhibitory faktorů VIIa, IXa, Xa, nebo látky, které podporují antikoagulační dráhu proteinu C [52].

2.3 Polymerní materiály

Jednou z nejčastějších příčin úmrtí v posledních letech, se stále se zvyšující četností, jsou kardiovaskulární choroby. Jednou z takových chorob je okluzivní choroba cév, která může vést až k srdečnímu selhání, pokud postihne koronární arterie a způsobí srdeční ischemii [53]. Důležitým problémem jsou také například vrozené malformace nebo chronické choroby srdečních chlopní, hlavně chlopně aortální, které sice většinou nejsou příčinou smrti, ale mají výrazný vliv na zdraví. Zároveň však mají značně omezené možnosti léčby, proto jsou operace srdečních chlopní druhým nejčastějším typem kardiovaskulárních operativních zákroků, přičemž v podstatě jediným způsobem léčby aortální chlopně je její náhrada umělou [54], je tedy třeba vyrábět kardiovaskulární implantáty, nejčastěji cévní stenty, srdeční chlopně nebo cévní grafty, s využitím materiálů, které mají dobrou hemokompatibilitu [53].

V posledních několika desítkách let se v medicíně stále častěji využívají biomateriály, ať už na výrobu katétrů, cévních štěpů, implantátů nebo chirurgických nástrojů [55]. Jako biomateriály a konstrukční materiály pro výrobu operačního vybavení se používají kovy, polymery, sklo, keramika i kompozity [56].

Vlastnosti biomateriálů se rozdělují na objemové vlastnosti materiálu a vlastnosti povrchové. Vlastnosti materiálu (mechanické, chemické, optické nebo magnetické) jsou určeny chemickou strukturou a vazbami. Interakce na rozhraní materiálu s prostředím je určena povrchovými vlastnostmi. Pro všechny typy implantátů je důležitou vlastností biokompatibilita [55], což je schopnost materiálu být v kontaktu s tkání, aniž by přitom způsobil poškození organismu [57]. Dokonale biokompatibilní materiál by neměl být toxický a neměl by nezpůsobovat žádnou zánětlivou nebo trombogenní odpověď organismu, neměl by být karcinogenní, mutagenní ani teratogenní, v současnosti ale žádný dokonale biokompatibilní materiál není dostupný. Běžný biomateriál je tělem rozpoznán a vyvolá obrannou reakci [55].

2.3.1 Interakce materiálu s krví

Když se krev dostane do kontaktu s materiálem, dojde k rychlé adsorpci proteinů na jeho povrch. Ta je závislá na vlastnostech povrchu biomateriálu a probíhá jako série střídavé adsorpce a desorpce proteinů. Tento jev je známý jako Vromanův efekt, podle kterého první proteiny, které adsorbují na povrch, jsou vysoce koncentrované proteiny jako fibrinogen, a ty jsou postupně nahrazovány méně koncentrovanými bílkovinami. Jednou z těchto méně koncentrovaných bílkovin je i koagulační faktor XII [58], ten je kontaktem se záporně nabitým povrchem materiálu (např. sklo) aktivován na faktor XIIa, který je začátkem vnitřní dráhy koagulační kaskády [5].

Adsorpce proteinů na povrch materiálu vede zároveň k jejich rozpoznání receptory krevních destiček, jejich adhezi a následné aktivaci, což přispívá k tvorbě trombu [59]. U materiálů, které nemají záporný náboj a nedochází na nich ke kontaktní aktivaci faktoru XII, dochází ke spuštění koagulační kaskády proto, že podporují aktivaci faktoru X [1].

Krevní sraženina se nakonec vytvoří na každém typu povrchu, i po desetiletích výzkumu biomateriálů je tedy hemokoagulace vyvolaná kontaktem krve s cizím materiálem stále problém bránící vývoji skutečně hemokompatibilního materiálu [60]. Jednou možností, jak

bránit srážení krve v kontaktu s biomateriálem, je farmakologická inhibice funkce enzymů klíčových pro koagulační kaskádu některou z antikoagulačních látek [61]. Stále častější je ale snaha o vylepšení hemokompatibility použitých materiálů, proto se jako biomateriály nejčastěji používají polymery, jejichž povrchové vlastnosti se dají relativně snadno dodatečně upravit podle zamýšlené aplikace [62]. Hlavním zaměřením je potom zlepšování hemokompatibility biomateriálů tak, aby se co nejvíce omezila adsorpce proteinů na jejich povrch [63]. Většina polymerních materiálů má hladké, spíše hydrofobní povrchy, které podporují adsorpci proteinů a zhoršují vlastnosti materiálu v *in vivo* podmínkách, povrchové úpravy se proto často soustřeďují na zvýšení polaritu materiálu. Dodnes bylo vyvinuto mnoho metod, fyzikálních i chemických, jak vylepšit povrchové vlastnosti polymerů [64].

2.3.2 Metody povrchových úprav

2.3.2.1 Chemické metody

Chemické metody zahrnují např. tvorbu směsí nebo povlaků a pokovování [65]. Často používanou technologií je úprava povrchu polymeru roubováním, pro které se používá mnoho různých typů sloučenin, nejčastěji heparin. Ten může být navázaný přímo na povrch, což ale zčásti potlačuje jeho antikoagulační vlastnosti v porovnání s volným heparinem. Pro zvýšení polaritu materiálu se stejným způsobem často používají hydrofilní polymery jako polyetylglykol (PEG) nebo polyetylenoxid (PEO), čímž se dá předcházet adsorpci proteinů, adhezi krevních destiček a tedy i tvorbě trombu [66]. Klinické využití materiálů modifikovaných polyetylglykolem je ale značně omezeno kvůli nízké odolnosti PEG povlaku [67].

Dalšími používanými metodami jsou roubování indukované působením ozonu nebo ionizujícím zářením [66].

Problémem roubovacích reakcí může být nedokonalé pokrytí povrchu roubovaným polymerem nebo nepravidelná distribuce reakčních center. Mnoho typů roubovacích reakcí může také zhoršovat mechanické vlastnosti materiálu a efekty povrchových úprav většinou nevydrží dlouho. Ve srovnání s ostatními metodami je výhodná roubovací polymerace indukovaná UV zářením, která je rychlá, levná a snadno použitelná průmyslově [64].

Dalším způsobem, jak vytvořit antikoagulační povrch materiálu, je pokrytí povrchu buňkami. Používaným typem buněk jsou v takovém případě především buňky endoteliální

nebo kmenové. Tyto modifikace se používají na syntetické štěpy, cévní stenty a umělé chlopně. Taková metoda připomíná tkáňové inženýrství, je časově náročná a drahá, širší klinické použití je omezeno také rizikem infekce nebo kontaminace.

Možností je také vytvoření biomimetického povrchu (tzn. povrch, který napodobuje přirozený povrch nepoškozené cévy), které je možné provést dvěma způsoby, tedy napodobením funkce endoteliálních buněk nebo extracelulární matrix. Toho je dosahováno imobilizací různých typů molekul (kolagen, fibronectin, růstové faktory...) na povrchu materiálu. Tyto molekuly na povrchu materiálu pak podporují adhezi a vazbu endoteliálních buněk a jejich expresi bioaktivních molekul, které brání krevnímu srážení [67].

2.3.2.2 Fyzikální metody

Jinou možností jsou metody fyzikální, které využívají radiaci, elektromagnetické vlny, nebo oxidaci plyny [65]. Často používanou fyzikální metodou je také adsorpce na povrch, která se dá použít jak pro vytvoření slabé vrstvy polymerů (např. derivát polyetylenoxidu, ve směsi s jiným polymerem, který má sklony k tvorbě filmů, př. polyetheruretan) na povrchu biomateriálu, tak pro heparin, s relativně dobrými výsledky.

Protože chemické metody roubování mohou kromě povrchových vlastností často měnit i vlastnosti celého materiálu, používá se často modifikace povrchu plasmou, která ovlivní jen povrch, nebo pomocí záření, ať už jde o viditelné světlo, UV záření nebo gamma záření. Záření ovlivňuje a mění chemickou strukturu materiálu, především na jeho povrchu, s cílem dosáhnout větší biokompatibility [66].

Fyzikálními metodami pokrývání povrchu substrátu jiným materiálem ovšem dochází ke vzniku nekovalentně vázaných povlaků, které nejsou příliš stabilní a dají se ze substrátu snadno odstranit [64].

2.3.3 Konkrétní materiály

Hemokompatibilita je důležitá pro biomateriály, které přicházejí do kontaktu s krví, jako jsou membrány pro hemodialýzu, kardiovaskulární pomůcky nebo třeba scaffoldy pro tkáňové inženýrství [68]. Ve tkáňovém inženýrství jsou často využívány syntetické polymery, díky své jednoduché přípravě a předvídatelným mechanickým a fyzikálním vlastnostem. V mnoha případech se výzkum pro zlepšení jejich biokompatibility zaměřuje na úpravy

povrchů syntetických materiálů pomocí aktivních molekul, nejčastěji heparinem, anebo pomocí molekul polyetylenoxidu [69].

Protože vlastnosti biomateriálu by se měly co nejvíce přibližovat vlastnostem původní tkáně, bylo během posledních několika desítek let zkoumáno mnoho elastomerů, jejichž elasticita je podobná elasticitě biologické tkáně. Vhodným materiálem pro pomůcky jako jsou ohebné hadičky pro infuzní zařízení nebo katetry jsou pryže [70]. Jako biomateriály např. pro umělé orgány jsou používány polyuretany, silikony, polyetylenoxid nebo polyetylen-tereftalát [71].

Často používaným polymerem je polyvinylchlorid (PVC), v medicínských aplikacích používaný ve formě PVC měkčeného, nejčastěji ftalátovými estery. Ty ale nejsou v měkčeném PVC vázány chemicky, a tak se mohou uvolňovat do prostředí, což může při dlouhodobějším kontaktu tohoto materiálu s tkáněmi nebo tělesnými tekutinami způsobovat zdravotní problémy [72]. Polyvinylchlorid je nejčastěji používaný materiál pro medicínské pomůcky na jedno použití, jako jsou sety pro odběry krve nebo hadičky pro vedení krve v mimotělním oběhu [73]. Asi jedna třetina všech medicínských pomůcek na jedno použití se vyrábí z měkčeného PVC [72], často i takových, které jsou vystavovány dlouhodobějším kontaktu s tělesnými tekutinami [74].

Pro výrobu stentů se využívají materiály, které nejsou biodegradabilní, jako polyetylen-tereftalát (PET), silikon nebo polyuretany. Experimentálně bylo zjištěno, že je možné z PET vyrobit endoprotézu, jejíž expanzní síla je srovnatelná s kovovou [75]. PET se ve formě pleteného Dacronu využívá také jako cévní náhrada.

Při výzkumu hemokompatibility PET bylo zjištěno, že ve srovnání s hodnotami naměřenými u čistého PET se adheze krevních destiček na povrch mírně snížila, pokud byly na PET naroubované polyetylenoxidové řetězce, výrazněji potom při imobilizaci insulinu a/nebo heparinu. Podle výsledků testů koagulace se přítomností PEO na povrchu materiálu hemokompatibilita zlepšila jen málo stejně jako proliferace endoteliálních buněk na povrchu cévního štěpu, zatímco při imobilizaci insulinu a/nebo heparinu výrazně.

Podobných výsledků bylo dosaženo také u polyuretanů [69]. Ty se pro výrobu pomůcek, které se dostávají do kontaktu s krví, používají kvůli jejich vysoké mechanické pružnosti a skvělým fyzikálně-chemickým vlastnostem [68], od začátku 90. let jsou navíc polyuretany

studovány s ohledem na využití pro inženýrství měkkých tkání. Díky své superelasticitě jsou vhodné také pro nápravy srdečního svalu [70]. I když biokompatibilita polyuretanů je celkem dobrá, je nutné ji především pro aplikace s dlouhodobým kontaktem s krví ještě vylepšit, kromě imobilizace heparinu nebo kyseliny hyaluronové také např. roubovací kopolymerací s polyetylglykolem, který výrazně redukuje adhezi krevních destiček a navíc je možné použít ho jako podklad pro imobilizaci biologicky aktivních molekul např. heparinu [68].

Dalšími polymery jsou medicínské silikony, což jsou syntetické polymery, nejčastěji vyrobené polymerací dimethyl siloxanu [76]. Díky svým dobrým mechanickým vlastnostem a biokompatibilitě [77] jsou silikony využívány v mnoha medicínských aplikacích, především v ortopedii, pro výrobu katetrů nebo drénů, krytí popálenin nebo implantáty [70]. V lidském těle jsou tepelně stabilní, trvanlivé a nereaktivní, jsou dobře tolerovány živou tkání. Jejich vlastnosti se dají ovlivnit délkou řetězců a jejich síťováním [78].

V posledních čtyřiceti letech se také výrazně zvýšila četnost použití polymerních biomateriálů na výrobu náhrad poškozených částí cév. Především se jedná o materiály jako polytetrafluoretylen (PTFE) nebo PET [79], nejčastěji ve formě Dacronu. Jejich mechanické vlastnosti a unikátní mikroporézní struktura dávají dobré vlastnosti cévním štěpům, včetně podpory hojení nebo odolnosti vůči stlačení. Na druhou stranu je jejich dlouhodobější funkce komplikována vznikem trombózy vyvolané materiálem. Možnosti vylepšení hemokompatibility zahrnují navázání vrstvy albuminu nebo kolagenu nebo impregnaci heparinu na povrch [80].

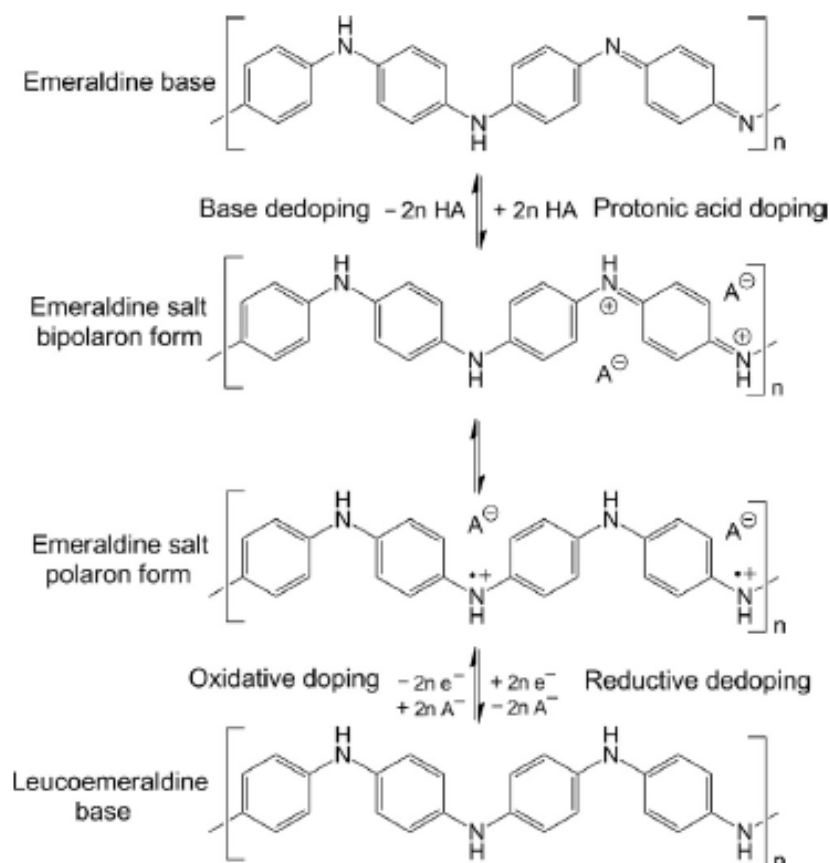
3 POLYANILIN

Polyanilin je jedním z materiálů ze skupiny vnitřně vodivých polymerů (intrinsically conducting polymers, ICP). To jsou materiály, které kombinují chemické vlastnosti organických polymerů a elektrické vlastnosti kovů, což jim dává širokou možnost uplatnění [81]. Někdy bývají označovány také jako „syntetické kovy“ a kromě polyanilinu mezi ně patří např. polyacetylen (PAC), polythiofen (PT), polypyrrol (PPy) a polyparafenylenvinylen (PPV) [82].

Vodivé polymery byly v posledních letech důležitou oblastí výzkumu, důležité místo pak mezi nimi má vzhledem ke svým vlastnostem polyanilin [83]. První zmínky o něm sahají až do roku 1834, kdy F. F. Runge zaznamenal, že při zahřívání směsi chloridu měďnatého a nitrátu anilinu na porcelánovém talíři na teplotu 100 °C vzniká tmavě zelená látka, která mění barvu na černou. O třicet let později byl zdokumentován vznik tmavě modrého produktu během elektrolýzy sulfátu anilinu. Obě tyto látky se pod názvem „anilinová čern“ začaly používat jako barvivo v tiskařském průmyslu.

Termín polyanilin (PANI) se začal používat až v polovině dvacátého století (do té doby se pro různé redoxní stavy anilinové černi používaly jen výrazy „emeraldin“ a „nigranilin“), v šedesátých letech bylo zjištěno, že vhodným způsobem připravený polyanilin má vysokou vodivost. V posledních třiceti letech je polyanilin vzhledem ke své jednoduché syntéze, nízké ceně, vysoké vodivosti, možnosti přecházet mezi jednotlivými redoxními stavy a dobré stabilitě v prostředí jedním z nejintenzivněji studovaných vodivých polymerů [84].

Polyanilin má obecný vzorec $[(-B-NH-B-NH)_y(B-N_yQ_yN)_{12y}]_x$, kde B označuje benzenový a Q chinoidní kruh. Atomy dusíku zabudované v řetězci umožňují redoxní vlastnosti, proto se oxidační stav polymeru může různit, z plně redukovaného leukoemeraldinového stavu (LM, $y = 1$), přes nigranilin, oxidovaný ze 75 % (NA, $y = 0,75$), napůl oxidovaný emeraldinový stav (EM, $y = 0,5$) až po plně oxidovaný pernigranilinový stav (PNA, $y = 0$) [83].



Obrázek 3: Oxidační dopování leukoemeraldinové báze a protonizace emeraldinové báze [84]

Obvykle je polyanilin připravován oxidační polymerací anilinu v kyselém vodném roztoku (produkt ve formě prášku). Polymer vzniká ve formě emeraldinové soli, což je stabilní vodivý stav polyanilinu. Takto připravený polymer má následkem dopování (protonace iminových fragmentů emeraldinové soli pomocí kyseliny) vodivost většinou do 10 S/cm. Sekundárním dopováním polyanilinu se dá jeho vodivost výrazně zvýšit až na 200–400 S/cm [85].

Pokud polymerace probíhá v přítomnosti substrátu, dochází ke vzniku směsí. Ty se dají připravit také mísením PANI s jinými polymery, nejčastěji z důvodu zlepšení mechanických vlastností nebo lepší zpracovatelnosti [86].

Vodivé polymery jsou výrazně flexibilní v upravování jejich chemické struktury. Jejich mechanické a elektrické vlastnosti je možné regulovat a upravovat chemickým modelová-

ním nebo při samotné syntéze, polymery je možné modifikovat tak, aby se vázaly s molekulami bílkovin, a mají také schopnost přenášet elektrický náboj vzniklý biochemickou reakcí do elektronických okruhů.

PANI je prvním komerčně používaným vodivým polymerem [87] a díky svým vlastnostem si našel široké spektrum uplatnění a v praxi je aplikován v různých oborech od chemie a fyziky, přes optiku až po biomedicínu [88]. Své uplatnění má v energetice (př. solární nebo palivové články), elektronických zařízeních, znovunabíjecích bateriích, senzorech (včetně chemických senzorů a biosenzorů), jako katalyzátor, superkapacitátor nebo třeba ve formě antikorozního nátěru [89].

3.1 Syntéza

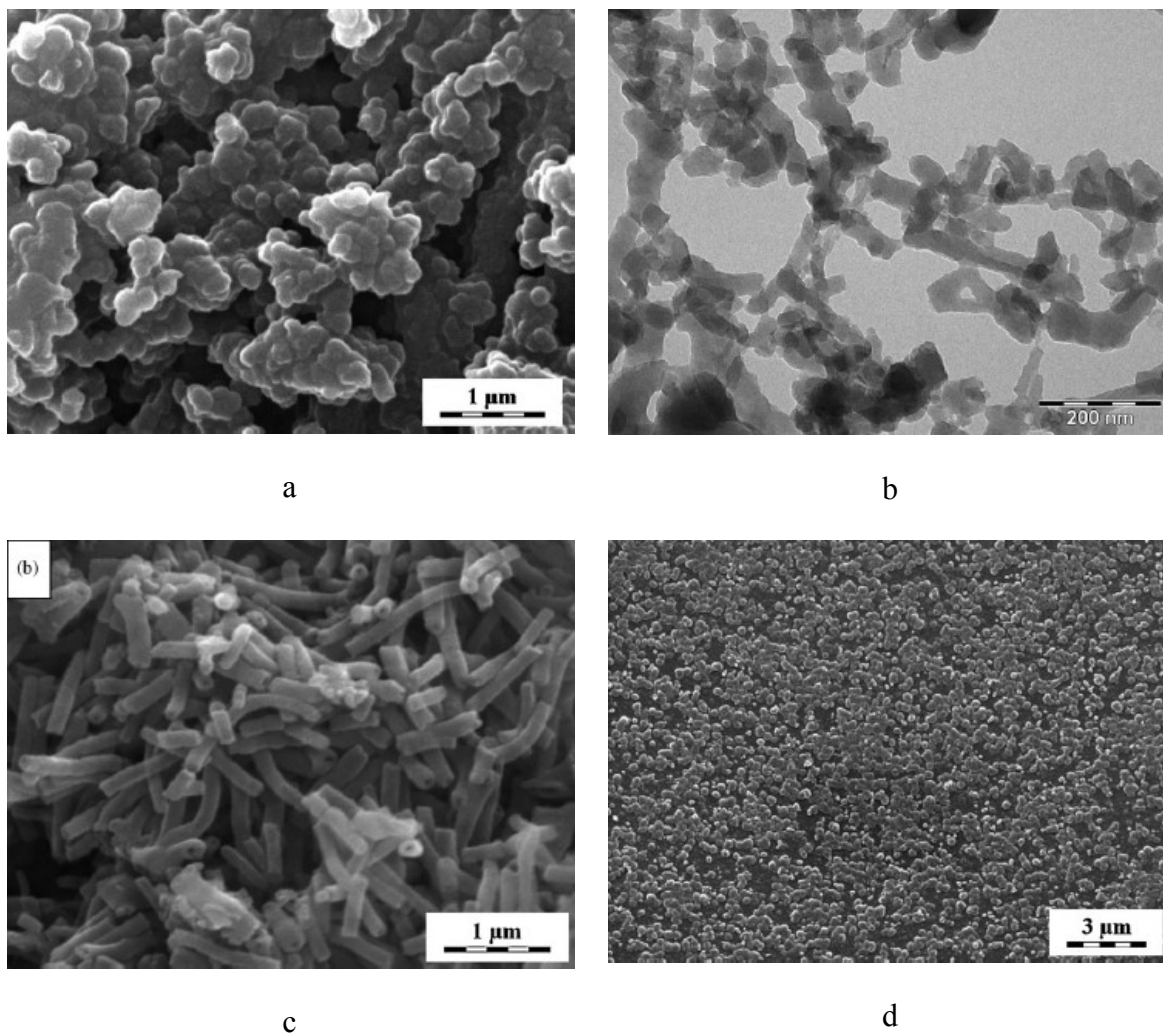
Polyanilin je nejčastěji připravován chemickou oxidací anilinu nebo některé z jeho solí (anilin sulfát, anilin hydrochlorid) ve vodném roztoku (silné) kyseliny, jako oxidant vystupuje obvykle amonium peroxydisulfát (amonium persulfát, APS). Během reakce dochází k uvolňování vodíkových protonů, jako vedlejší produkt reakce pak vzniká kyselina sírová, která snižuje pH reakční směsi [90]. Jedná se o silně exotermní reakci a uvolněné teplo může mít vliv na vlastnosti produktu reakce [91]. Jako každá polymerace má i výroba PANI tři kroky: iniciaci, propagaci a terminaci.

Iniciace není okamžitá, nejdříve se musí vytvořit anilinový trimer, který tvoří nukleát. Reakcí nukleátu s další molekulou anilinu vzniká tetramer, který se po protonaci stane iniciačním centrem. Během propagace řetězce rostou, ve své protonované podobě, což má za následek výrazně modré zbarvení reakční směsi, polymerace neprobíhá, pokud je $\text{pH} > 2,5$. Anilinové molekuly se vážou na rostoucí řetězec výhradně v poloze para. Terminace nastává hydrolýzou koncových amino skupin nebo reakcí s některým jiným řetězcem.

K adsorpci nukleárních jader polyanilinu dochází až na výjimky na všech typech povrchů a rozhraní a z těchto jader se pak PANI řetězce prodlužují. Dochází tak potom například ke vzniku tenkých filmů nebo povlaků na rozhraní kapalina–pevná látka.

Pokud reakce probíhá v zásaditém prostředí, dochází ke vzniku oligomerů, které pak tvoří krystaly.

3.2 Morfologie



Obrázek 4: Morfologie PANI (a) granule, (b) nanovlákná připravená s APS a HCl, (c) nanotrubičky připravované v přítomnosti kyseliny octové, (d) koloidní částice [90]

Polyanilin se může vyskytovat v několika různých morfológiích. Jeho nejtypičtější morfológií jsou granule, které vznikají srážecí reakcí v silně kyselém prostředí (př. H_2SO_4), s vysokou koncentrací anilinu.

Dalším typem jsou nanovlákná, jednorozměrné objekty s průměrem v řádu desítek nanometrů, zásadně větvené, o délce několik mikrometrů. Je to jedna z nejčastěji sledovaných

podob vodivých polymerů, někdy se pro ně využívá označení „nanodráty“. Často tvoří sítě nebo jiné komplexní struktury. Jednorozměrné jsou také nanotrubičky, které se od nanovláken liší větším průměrem a přítomností vnitřní dutiny. K jejich vzniku a růstu je třeba přítomnosti templátu. Stěny nanotrubiček můžou mít granulární strukturu nebo být kompaktní. Většinou jsou rovné a nevětví se.

Koloidní částice vznikají polymerací anilinu v přítomnosti vhodného polymeru rozpustného ve vodě nebo sterického stabilizátoru (disperzní polymerace). Mají různé tvary, vždy tvoří kompozit se stabilizátorem, předpokládá se, že dochází k adsorpci anilinových nukleací center na řetězcích polymerního stabilizátoru, kde dál rostou.

Polyanilin může tvořit i nadmolekulární struktury, jejichž vznik zahrnuje tři po sobě následující kroky, kterými jsou vytvoření nukleacních center (oligomery), jejich organizace a růst řetězců z nukleátů. Předpokládá se, že organizace nukleátů může probíhat samovolně nebo adsorpcí na povrchy nebo rozhraní, oba způsoby organizace mohou probíhat současně. Následujícím růstem řetězců dochází ke vzniku různých typů nanostruktur.

Morfologie vzniklého polyanilinu se dá ovlivnit modifikacemi podmínek polymerační reakce, především kyselostí prostředí, koncentrací reaktantů a teplotou, při které reakce probíhá.

Důležitým faktorem přípravy polyanilinu je pH prostředí reakční směsi. V méně kyselém prostředí ($\text{pH} > 3,5$) vznikají přednostně PANI oligomery, k polymeraci dochází pouze v prostředí silně kyselém ($\text{pH} < 2,5$). Důležité je jak výchozí pH reakční směsi, které záleží na výběru kyseliny, tak i na změnách acidity v průběhu reakce, např. pro tvorbu nanotrubiček je nutný roztok slabé kyseliny, jednosměrný růst polyanilinu podporuje také ředění reakční směsi (snižuje aciditu).

Dalším faktorem morfologie je poměr anilinu a oxidantu. Menší množství oxidantu vede ke snížení produkce kyseliny sírové, která je neutralizována přebytkem anilinu, což je vhodné pro růst jednorozměrných struktur.

Kromě teploty na začátku reakce je důležité zvážit teplotní profil celé reakce, především při vyšších koncentracích anilinu (nad 1 M). Teplota ovlivňuje rychlost oxidace anilinu a rozpustnost anilinu, tím pak má vliv na výslednou morfologii a molekulární hmotnost pro-

duktu, například nanovláknna jsou při vyšší teplotě delší a tenčí [90]. Pokud polymerace probíhá při nízkých teplotách (pod 0 °C), produkt má větší molekulovou hmotnost [87].

Tvorbu nanovláken je možné podpořit osvětlením reakční směsi UV zářením, podobně funguje i γ -záření, zatímco zvýšením viskozity reakční směsi přidáním polyetylenoxidu dochází ke vzniku malých jednorozměrných struktur podobných korálu, což se vysvětluje omezenou difuzí reaktantů [90].

3.3 Vlastnosti

3.3.1 Mechanické vlastnosti

Protože produktem polymerace anilinu je nejčastěji polyanilinový prášek, který je nevhodným vzorkem pro výzkum mechanických vlastností (nutné vytvořit PANI v pevné formě, což je možné slisováním do tablety, které ale také nejsou pro podobný výzkum ideální), nebyly mechanické vlastnosti čistého polyanilinu pravděpodobně nikdy blíže popsány.

Vlastnosti polyanilinu se obvykle zkoumají jen s ohledem na polyanilinové směsi, kde PANI figuruje jako vodivé plnivo, distribuované ve vhodné matrix (př. kaučuky, polyuretan), která zajišťuje mechanické vlastnosti. Obecně se se zvyšujícím se množstvím polyanilinu ve směsi zvyšuje tuhost a křehkost [86]. Polyanilin má relativně nízkou viskozitu, je stabilní na vzduchu i ve vyšších teplotách, deformuje se ale už při relativně nízkém napětí [92].

3.3.2 Elektrické vlastnosti

Elektrické vlastnosti polyanilinu se dají měnit protonací (deprotonací) nebo oxidací (redukci), dá se proto používat jako aktivní materiál pro elektrody [93].

Vysoce vodivé filmy tvořené polyanilinem protonovaným některými typy kyselin vykazují výraznou anizotropii strukturních, magnetických i elektrických vlastností. To je způsobeno vrstevnatou strukturou PANI řetězců, které leží převážně souběžně s povrchem filmu, a příčně se vrství, s jednotlivými vrstvami oddělenými dvojvrstvou aniontů dopantu. Anizotropní struktura má vliv na elektrické vlastnosti, které jsou výrazně lepší než u polymerů s méně pravidelně uspořádanou strukturou. Stejná vlastnost byla potvrzena i u dalších vodivých polymerů a nejvýrazněji se projevuje u jednorozměrných (1D) systémů [94].

Vodivost polyanilinu se dá ovlivnit také výběrem kyseliny, která se přidává do polymerační směsi. K vyšší vodivosti produktu vede použití anorganických nebo ve vodě rozpustných organických kyselin [87].

3.3.3 Ostatní vlastnosti

PANI vykazuje také teplotní vodivost, u některých ultratenkých filmů byla zjištěna fotoluminiscence, v některých formách absorbuje elektromagnetickou radiaci (až do cca 50 %), má antioxidační (tím výraznější, čím redukovánější PANI je) a antikoroziní vlastnosti [84].

Při různých způsobech použití se objevuje potřeba vlastnosti polyanilinu dodatečně upravovat, především na jeho povrchu nebo rozhraní, a to povrchovými modifikacemi materiálu. Ty se obvykle provádí roubovací kopolymerací, pro mnoho konvenčních polymerů (polyetylen, polyetylenetereftalát, polyvinylchlorid, polypropylen, syntetická vlákna) snadno a v mírných podmínkách, pokud byl povrch polymerů předtím ošetřen ozonem, vysokoenergetickou radiací nebo UV zářením [83]. Pro použití v biochemii nebo biomedicíně je třeba provádět povrchovou modifikaci pomocí biokompatibilních polymerů [93].

Pro další úpravy vlastností se PANI používá také ve formě kompozitů, například s polystyrenem [92], ušlechtilými kovy nebo karbonovými nanotrubičkami [90].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 METODIKA

S ohledem na téma práce byla v laboratořích Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně prováděna jen část experimentálních prací. Konkrétně se jednalo o test povrchové energie materiálu a testy buněčné proliferace a migrace. Analýza vlivu materiálů na parametry krevní koagulace byla provedena v Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně a testy adheze krevních destiček na The Jožef Stefan Institute (Slovenia).

4.1 Přístrojové vybavení

4.1.1 See system

See system (surface energy evaluation system) (Advex Instruments, Česká republika) je zařízení pro zjišťování kontaktního úhlu a povrchové energie materiálů. Na rovný povrch zkoumaného materiálu se nanese kapka. Podle povrchových vlastností materiálu a použité kapaliny se kapka může rozlít do stran nebo zůstat skoro kulatá. Podle tvaru kapky je potom pomocí speciálního softwaru dopočten kontaktní úhel, který určuje smáčivost materiálu. Materiály se potom rozdělují do dvou skupin. První jsou hydrofilní (smáčivé vodou), které mají vysokou povrchovou energii, druhou hydrofobní (nesmáčivé vodou), s nízkou povrchovou energií [95].

4.1.2 ACL Elite Pro

ACL Elite Pro (IL-Instruments, Itálie) užívá k detekci tvorby sraženiny nefelometrii. Jeho analyzátoři měří množství světla, které je rozptýleno částicemi obsaženými ve vzorku při průchodu paprsku kyvetou. Světlo je rozptylováno na všech částicích ve vzorku, jeho množství je zjištěno senzorem umístěným v pravém úhlu s LED zdrojem světla [96]. V této práci bylo přístroje ACL Elite Pro použito pro stanovení aktivity koagulačních faktorů X, V a II.

4.1.3 SYSMEX CA-1500

SYSMEX CA-1500 (Siemens, Německo) je plně automatický analyzátor pro *in vitro* diagnostiku krevní koagulace. Měření pomocí koagulační metody je založeno na optickém vyhodnocování změn hustoty vzorku pomocí změn rozptylu světla o vlnové délce 660 nm. Údaje o rozptylu světla jsou pak zpracovávány bodovou detekční metodou. Čas koagulace je spočten jako čas nutný k dosažení konkrétního stupně rozptylu světla. Součástí výsledků

je koagulační křivka. Druhou metodou je metoda chromogenní, založená na tom, že se ke vzorku s reagensí po inkubaci přidá substrát, který mění barvu. Změna barvy je detekována fotodiodou a vyhodnocuje se jako snížení absorbance při průchodu paprsku světla vzorkem. Hladiny měřených proteinů se odečítají z kalibrační křivky [97].

Přístroj umí vyhodnocovat různé typy imunologických testů i testy koagulace, a to jak rutinní tak i méně často prováděné, včetně PT, aPPT a TCT testů použitých v této práci [98], přístroj byl použit také ke zjištění vlivu materiálů na koagulační faktor I.

4.1.4 Sulphorhodamine B assay

Sulforhodamine B (SRB) assay (Sigma-Aldrich, USA) umožňuje kvantifikovat buněčnou proliferaci a cytotoxicitu. Základem je schopnost bílkovinného barviva sulforhodamine B se elektrostaticky (a se závislostí na hodnotě pH) [99] vázat na bílkovinné součásti buněk, které jsou pomocí kyseliny trichloroctové fixovány na povrchu laboratorní destičky. V mírně kyselém prostředí se sulforhodamine B naváže na buňky a při změně pH na mírně zásadité se z buněk uvolňuje. Množství barviva extrahovaného z nabarvených buněk odpovídá množství buněk [100]. Pro účely této práce byl přístroj použit pro počítání krevních destiček na povrchu zkoumaných materiálů.

4.2 Příprava polyanilinových filmů

Pro testy bylo použito několik forem polyanilinových povrchů, konkrétně PANI sůl (PANI-S) a báze (PANI-B) a kopolymer PANI-PAMPSA, s PAMPSA polymerem navázaným na povrchu PANI, v druhém případě pak byla PAMPSA přidána do reakční směsi. Všechny vzorky byly připravovány ve formě filmů.

Pro přípravu základních polyanilinových filmů (polyanilinová sůl, PANI-S) bylo rozpuštěno 2,59 g anilin hydrochloridu (Sigma-Aldrich) v 50 ml destilované vody (0,2 M), v dalších 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 5,71 g amonium peroxydisulfátu (0,25 M; Sigma-Aldrich). Oba roztoky byly na 1 hodinu ponechány při pokojové teplotě, pak byly smíchány [101]. Reakční směs byla okamžitě rozlita do připravených zkumavek a petriho misek. Po dalších asi patnácti minutách byly misky a zkumavky vypláchnuty 0,2 M HCl, aby se odstranil polyanilinový prášek. Misky byly vypláchnuty metanolem a vysušeny na vzduchu [102].

Některé filmy byly deprotonovány zalitím 1 M hydroxidem amonným po dobu 12 hodin pro vytvoření nevodivých filmů PANI báze (PANI-B). Pro vytvoření PANI filmů s navázaným poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) (PAMPSA; Sigma-Aldrich), PANI-PAMPSA-D, byly některé z připravených PANI-B filmů reprotonovány 7,5% vodným roztokem PAMPSA polymeru (typické $M = 2 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Toho bylo dosaženo vystavením roztoku PAMPSA polymeru povrchu filmu. Reakce probíhala 24 h, přebytečný roztok byl vylit a filmy byly opláchnuty metanolem a ponechány schnout.

Druhý typ kopolymeru, PANI-PAMPSA-R byl připraven přímo polymerační reakcí. Nejdříve byl připraven vodný roztok PAMPSA, v koncentraci odpovídající 0,028 mol jeho monomeru 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid. Pro vzorek PANI-PAMPSA-R-1:1 bylo do roztoku přidáno 0,028 mol anilin hydrochloridu a směs se nechala 1 h míchat. Odpovídající množství anilin hydrochloridu bylo stejným způsobem použito také pro vzorek PANI-PAMPSA-R-2:1. Oxidační činidlo amonium peroxydisulfát (0,028 mol, v poměru 1:0,9 k anilin hydrochloridu) bylo rozpuštěno v ultračisté vodě a přidáno k roztoku PAMPSA-anilin hydrochlorid. Reakční směs byla rozlita do zkumavek a petriho misek. Po uplynutí 1 h byly vzorky opláchnuty vodou a ponechány schnout na vzduchu.

4.3 Povrchová energie

Pro zjištění povrchové energie zkoumaných materiálů byl použit „See system“. Kapaliny použitými pro tvorbu kapek byly deionizovaná voda, etylenglykol a diiodometan (oboje Sigma–Aldrich). Objem kapek použitých pro všechny experimenty byl 2 ml a odečty kontaktního úhlu u všech experimentů byly provedeny v deseti opakováních. Hodnoty volné povrchové energie materiálů byly ze získaných výsledků vypočítány pomocí metody kyse-lina/zásada.

Zkoumanými materiály byly sůl a báze polyanilinu (PANI-S, PANI-B), polyanilin obsahující poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) (PAMPSA), připravený přímo polymerací v různých poměrech (PANI-PAMPSA-R-1:1, PANI-PAMPSA-R-2:1) nebo navázáním PAMPSA řetězců na PANI povrch (PANI-PAMPSA-D).

4.4 Testy krevní koagulace

Pro testy krevní srážlivosti, byly použity zkumavky pokryté tenkými filmy PANI-S, PANI-B a kopolymery PANI-PAMPSA-D, PANI-PAMPSA-R-1:1 a PANI-PAMPSA-R-2:1. Pro vyšetření krevní koagulace v závislosti na materiálu byly vybrány parametry PT (Prothrombin time), aPPT (Activated Partial Thromboplastin Time) a TCT (thrombin clotting time). K testům byla použita krev odebraná dobrovolným dárčům, v souladu s Helsinskou deklarací a testy byly provedeny v Krajské nemocnici T. Bati ve Zlíně. Hodnoty pro každý vzorek byly změřeny třikrát.

Pro provedení PT nebo aPPT testu je nutné krevní vzorek dekalciфикovat (odebráním do zkumavky s citrátem nebo oxalátem) a oddělit krevní buňky od plasmy centrifugací. PT test se provádí přidáním pacientovy plasmy k některému ze zdrojů tkáňového faktoru, což způsobí konverzi protrombinu na trombin. Vzorek je pak až na dvě minuty umístěn do vodní lázně o teplotě 37 °C. Přidáním CaCl_2 je vyblokováno působení citrátu, aby byla umožněna koagulace. Čas se měří od přidání CaCl_2 do plasmy, do vytvoření sraženiny. PT test vyšetřuje přítomnost faktorů VII, V a X, protrombinu a fibrinogenu. Fyziologická hodnota PT testu je 11-15 s, prodloužená hodnota ukazuje na deficit některého ze zkoumaných faktorů nebo na užívání antikoagulantů jako warfarin.

Na začátku aPPT testu jsou do připraveného vzorku přidány chloridové ionty a aktivační substance (kaolin a kefalin), které aktivují vnitřní koagulační kaskádu. Fyziologická hodnota je 35 s, prodloužená doba ukazuje na deficit některého z faktorů XII, XI, VIII nebo IX nebo společné koagulační dráhy [103].

TCT je často prováděný test koagulace, který sleduje přeměnu fibrinogenu na fibrin po přidání bovinního nebo lidského trombinu do krevní plasmy chudé na destičky při teplotě 37 °C, a zaznamenává dobu potřebnou pro vytvoření sraženiny. TCT test je citlivý na přítomnost inhibitorů koagulace, př. heparin, a hodnota u zdravého člověka je 13-15 s. K prodloužení dojde, pokud je obsah fibrinogenu nižší než 1 g/l (fyziologická hodnota 2-4 g/l) [104].

4.5 Testy vlivu na koagulační faktory

Pro testy byly použity zkumavky pokryté tenkými filmy PANI-S, PANI-B a kopolymery PANI-PAMPSA-D, PANI-PAMPSA-R-1:1 a PANI-PAMPSA-R-2:1. Pro přesnější popis interakce krevní plasmy a povrchu použitých PANI filmů byly provedeny testy vlivu na vybrané faktory krevní srážlivosti. Vliv materiálu na fibrinogen (faktor I) byl měřen pomocí SYSMEX CA-1500 (Siemens, Německo), aktivita dalších faktorů FX (Stuartův-Prowerův faktor), FV (proakcelerin) a FII (trombin) byla měřena pomocí ACL ELITE Pro (IL-Instruments, Itálie). Testovaná plasma byla naředěna a přidána ke komerční plasmě (HemosIL™, Instrumentation Laboratory, USA), ve které byl deficit testovaného faktoru.

4.6 Testy vazby krevních destiček

Pro testy adheze krevních destiček byly z PANI filmů vytvořeny kruhové vzorky o průměru 10 mm. Disky byly inkubovány v přítomnosti 1 ml lidské krve, v 24-jamkových mikrotitračních destičkách, při teplotě 37 °C na míchačce s frekvencí 200 otáček za minutu. Po ukončení inkubace byly vzorky opláchnuty fosfátovým pufrům, aby se odstranila zbývající krev, a fixovány 1 ml 50% kyseliny trichloroctové (Sigma-Aldrich) při teplotě 4 °C. Po uplynutí 1 hodiny byl počet destiček určen pomocí Sulphorhodamine B (Sigma-Aldrich, USA), absorbance byla měřena pro každý vzorek třikrát na Lambda 1050 UV/VIS/NIR spektrofotometru (Perkin Elmer, USA), při vlnové délce 565 nm.

4.7 Testy proliferace a migrace buněk

Pro zhodnocení chování buněk na povrchu zkoumaných materiálů byly materiály připraveny, stejně jako pro předchozí testy koagulace, ve formě filmů. Použitými materiály byly PANI-S, PANI-B, PANI-PAMPSA-R-1:1 a PANI-PAMPSA-R-2:1. Jako referenční vzorek byl použit tkáňový polystyren (TPP, Švýcarsko). K testování byly použity myší fibroblasty (NIH/3T3, ATCC CRL-1658) a prováděnými testy byly testy proliferace a migrace buněk na povrchu materiálu. Buňky byly kultivovány za využití média Dulbecco's Modified Eagle Medium, s vyšším obsahem glukózy. K médiu se pro kultivaci buněk přidává 10% telecího séra a antibiotika (Penicillin/Streptomycin, 100 U/ml (100µg/ml)), všechno od firmy PAA Laboratories GmbH, Austria.

Pro testy proliferace byly fibroblasty nasazeny na povrch zkoumaných materiálů v petriho miskách (koncentrace buněk 1×10^5 /ml kultivačního média) a pravidelně fotografovány pro další srovnání. Testy migrace byly prováděny na confluentních buňkách. Do jejich vrstvy byla udělána rýha, která byla vyfotografována, a její vytvoření bylo označeno za začátek experimentu. Další dny byla rýha v pravidelných časových intervalech fotografována pro srovnání rychlosti zarůstání rýhy na různých površích.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Povrchová energie

Z výsledků uvedených v tabulce 1 je vidět, že PANI-S i PANI-B mají velice podobné hodnoty celkové povrchové energie (γ^{tot}), i jejích komponent představujících disperzi (γ^{LW}) a polární část povrchové energie (γ^{AB}). Výrazný pokles celkové povrchové energie je pak vidět u kopolymeru PANI-PAMPSA-D, což je zřejmě způsobeno přítomností PAMPSA řetězců na povrchu materiálu. Tomu odpovídá i to, že podobné výsledky vykazuje také PANI-PAMPSA-R-1:1, kde vysoký poměr PAMPSA polymeru výrazně ovlivňuje povrchové vlastnosti kopolymeru. V případě PANI-PAMPSA-R-2:1 obsahuje kopolymer méně PAMPSA polymeru a hodnoty povrchové energie materiálu opět rostou a jsou podobné hodnotám čistého PANI. Z výsledků je tedy možné vyvodit, že u kopolymerů PANI-PAMPSA-D a PANI-PAMPSA-R-1:1 převládají povrchové vlastnosti PAMPSA polymeru nad vlastnostmi PANI, zatímco u PANI-PAMPSA-R-2:1 jsou povrchové vlastnosti více ovlivňovány přítomností polyanilinu.

Vzorek	Komponenty povrchové energie [mN/m]		
	γ^{tot}	γ^{LW}	γ^{AB}
PANI-S	52,54	46,05	6,49
PANI-B	50,88	46,54	4,35
PANI-PAMPSA-D	39,96	37,05	2,91
PANI-PAMPSA-R-1:1	41,85	40,98	0,87
PANI-PAMPSA-R-2:1	56,35	43,91	12,45

Tabulka 1: Výsledky měření povrchové energie

Je známo, že nejdůležitějším faktorem hemokompatibility materiálu jsou jeho povrchové vlastnosti jako elektrický náboj, to, jestli je hydrofilní nebo hydrofobní, a adsorpce proteinů na povrch. S tím souvisí také povrchová energie materiálu, a bylo zjištěno, že hydrofilní povrch materiálu, tedy materiál s větší povrchovou energií, způsobuje nižší adsorpci proteinů krevní plasmy a sníženou adhezi krevních destiček [71], a protože pro použití

v kontaktu s krví jsou vhodnější materiály, které mají menší adsorpci proteinů adhezi krevních destiček, je snaha o použití materiálů s vyšší hodnotou povrchové energie a tedy větší hydrofilitou.

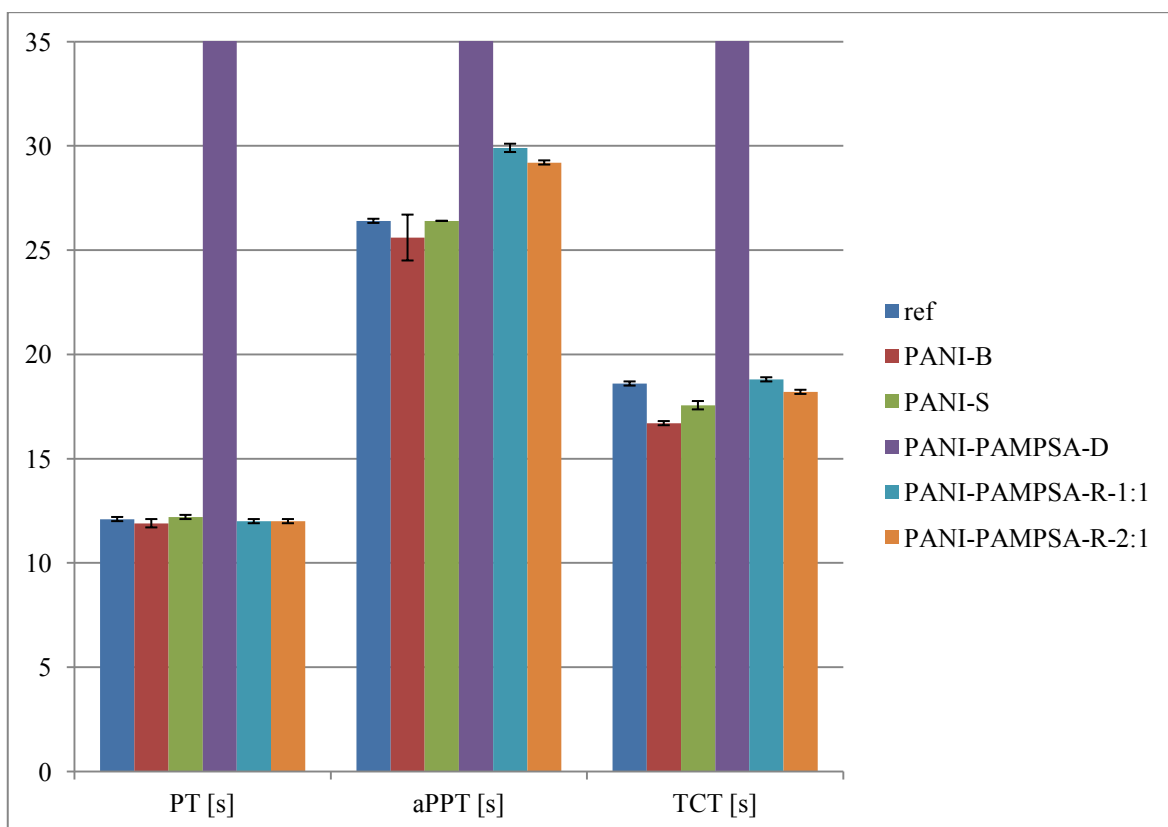
Zároveň vyšší povrchová energie způsobuje zvýšenou adhezi buněk. Srovnání získaných hodnot povrchových energií tedy ukazuje na to, že kopolymer PANI-PAMPSA-D bude díky své relativně nízké povrchové energii významně podporovat adsorpci proteinů krevní plasmy. Dá se také předpokládat, že na tomto materiálu bude výrazně snižena buněčná adheze.

5.2 Testy krevní koagulace

Z výsledků laboratorních testů krevního srážení na různě upravených PANI površích (tabulka 2, obrázek 5) lze vyčíst, že standardní PANI (PANI-S, PANI-B) ani PANI-PAMPSA-R krevní koagulaci v případě PT ani aPPT testu nijak výrazně neovlivňují a doba koagulace zůstává u těchto parametrů v mezích jejich fyziologických hodnot. Jediným ovlivněným parametrem je parametr TCT, jehož hodnota je ve srovnání s fyziologickou mírně snižena, u všech použitých vzorků. Naproti tomu ve zkumavkách pokrytých PANI-PAMPSA-D filmem bylo krevnímu srážení zcela zabráněno, a to u všech sledovaných parametrů, v rozporu s předpokladem, že na PANI-PAMPSA-D bude díky jeho nízké povrchové energii docházet ke zvýšené adsorpci krevních proteinů, což by mělo koagulaci spíše podporovat. To vzhledem k faktu, že použitým materiálem je kopolymer PANI a PAMPSA, a že na čistě polyanilinovém povrchu nebyla krevní koagulace ve srovnání s referencí nijak ovlivněna, ukazuje spíše na antikoagulační vlastnosti PAMPSA polymeru, než na to, že by měl PANI výrazný vliv na krevní srážení. Tomuto zjištění odpovídá i to, že na povrchu PANI-PAMPSA-R filmu, tedy materiálu, ve kterém PAMPSA řetězce netvoří vrstvu na povrchu filmu, ale jsou během polymerizace inkorporovány přímo do polyanilinu, a nemají tedy tak výrazný vliv na povrchové vlastnosti materiálu, ke koagulaci došlo.

	Reference	PANI-B	PANI-S	PANI-PAMP SA-D	PANI-PAMPSA- R-1:1	PANI-PAMPSA- R-2:1	Fyziologická hodnota
PT [s]	12,1 ± 0,1	11,9 ± 0,2	12,2 ± 0,1	NC	12,0 ± 0,1	12,0 ± 0,1	11,0-13,5
aPPT [s]	26,4 ± 0,1	25,6 ± 1,1	26,4 ± 0,0	NC	29,9 ± 0,2	29,2 ± 0,1	25-32
TCT [s]	18,6 ± 0,1	16,7 ± 0,1	17,56 ± 0,2	NC	18,8 ± 0,1	18,2 ± 0,1	>20

Tabulka 2: Vliv PANI povrchů na vybrané parametry koagulace



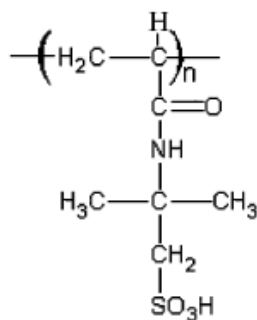
Obrázek 5: Vliv PANI povrchů na vybrané parametry koagulace

5.3 Testy vlivu na koagulační faktory

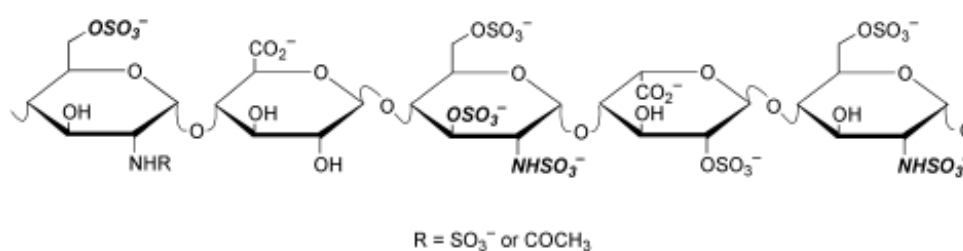
Pro účely testování se kvůli jistému zjednodušení hemokoagulační kaskáda obvykle rozděluje na vnější, vnitřní a společný systém, i když *in vivo* jsou všechny tři systémy navzájem provázány. Obecně PT sleduje vnější a společný systém koagulace, aPPT vnitřní a společný systém a TCT sleduje přeměnu fibrinogenu na fibrin po přidání trombinu, a rozlišuje tak poruchy tvorby trombinu (v případě normálních hodnot TCT) a jeho inhibici (jiné hodnoty TCT než fyziologické). Protože PANI-PAMPSA-D ovlivňuje výsledné hodnoty všech tří sledovaných parametrů, je pravděpodobné, že má vliv na společný koagulační systém, kvůli své interakci s některými faktory krevního srážení. Proto byl podrobněji testován vliv zkoumaných materiálů na důležité koagulační faktory společného systému, tedy faktor X, faktor V, faktor II a fibrinogen (faktor I).

Fyziologická aktivita vybraných faktorů byla označena hodnotou 100% a výsledky provedených testů (tabulka 3, obrázek 6) ukazují, že na rozdíl od ostatních PANI povrchů, které se sledovanými faktory neinteragují prakticky vůbec nebo jen v malé míře, a k ovlivnění koagulace tak dochází jen minimálně, PANI-PAMPSA-D výrazně interaguje se srážecími faktory X, V a II a snižuje jejich aktivitu, dokonce do té míry, že funkce faktorů V a II je kompletně blokována. Zároveň ale nedochází k výraznému ovlivnění obsahu fibrinogenu v krevní plasmě (obrázek 7), a ten zůstává v rozmezí svých fyziologických hodnot.

K podobné interakci dochází také u heparinu, který interaguje s koagulačními faktory, ale neovlivňuje přitom obsah fibrinogenu v krvi. To je pravděpodobně způsobeno jistou podobností struktury molekuly heparinu a PAMPSA polymeru. Zatímco za antikoagulační vlastnosti heparinu jsou zodpovědné sulfátové estery navázané na polysacharidu [46], u PAMPSA polymeru je příčinou nejspíše přítomnost sulfonových skupin na polymerním řetězci [105]. Tyto výsledky odpovídají také předpokladu, že krevní srážení je častěji podporováno materiály s kladným povrchovým nábojem a materiály určené pro použití v kontaktu s krví by proto měly mít na svém povrchu spíše záporně nabitě funkční skupiny [71].



Obrázek 6: Vzorec polymeru PAMPSA [107]

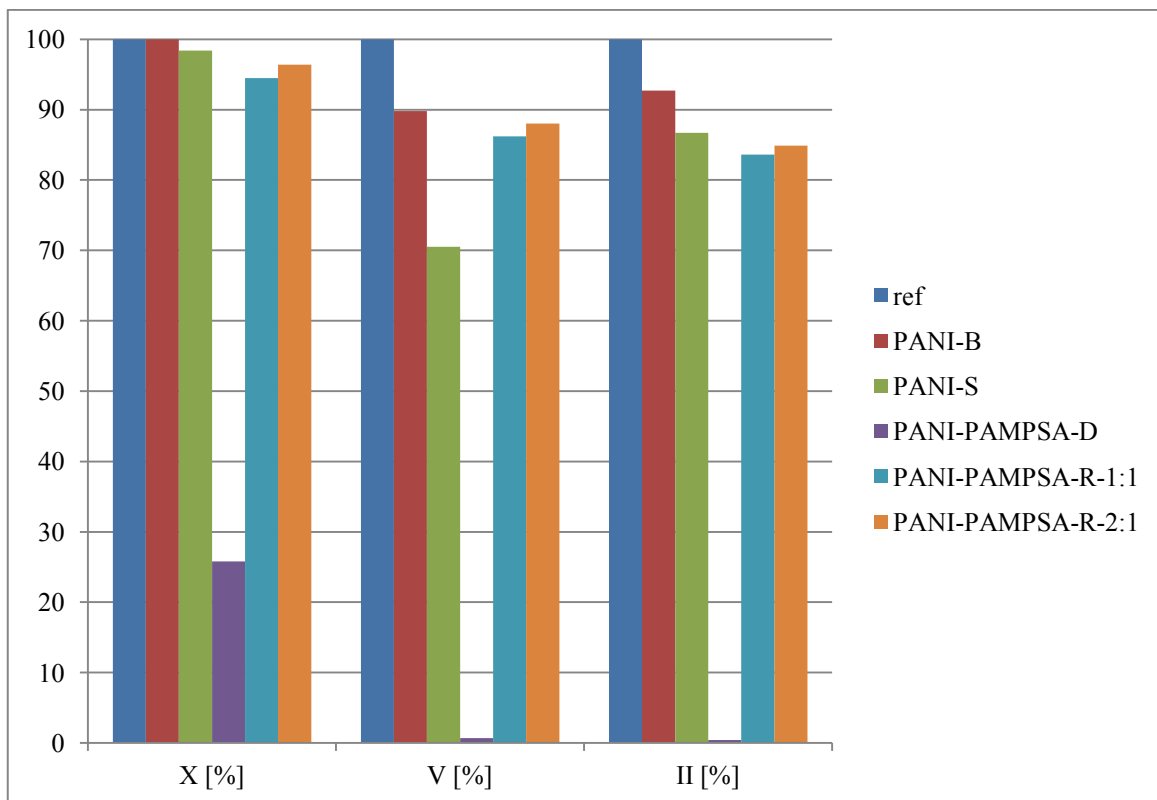


Obrázek 7: Vazebné místo pro antitrombin na molekule heparinu [106]

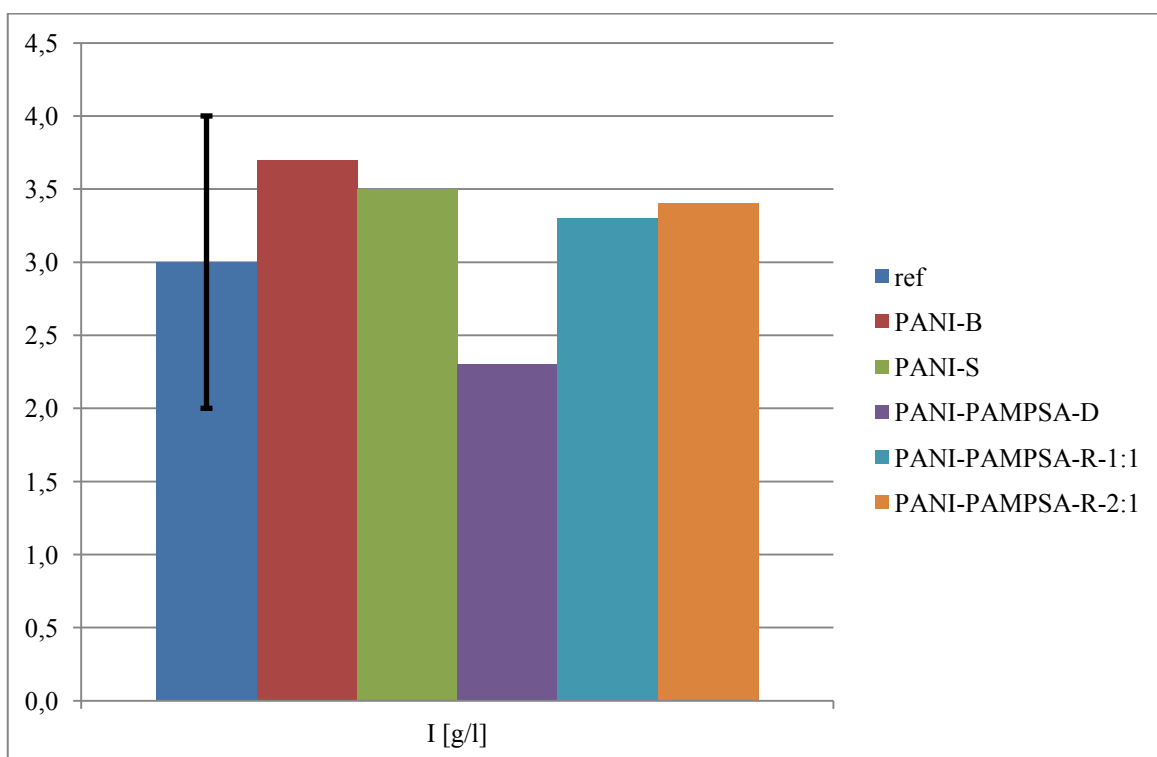
	Reference	PANI-B	PANI-S	PANI-PAMPSA-D	PANI-PAMPSA-R-1:1	PANI-PAMPSA-R-2:1
X [%]	100	100	98,4	25,8	94,5	96,4
V [%]	100	89,8	70,5	0,7	86,2	88,0
II [%]	100	92,7	86,7	0,4	83,6	84,9
I [g/l]	2-4*	3,7	3,5	2,3	3,3	3,4

Poznámka: *Fyziologická hodnota

Tabulka 3: Vliv PANI povrchů na vybrané koagulační faktory



Obrázek 8: Vliv PANI povrchů na koagulační faktory X, V a II



Obrázek 9: Vliv PANI povrchů na fibrinogen

5.4 Testy vazby krevních destiček

Výsledky testů adheze krevních destiček (tabulka 4, obrázek 8) zároveň ukazují, že na rozdíl od PANI-S a PANI-B došlo na všech PANI-PAMPSA povrchích k výraznému snížení adheze krevních destiček, bez ohledu na to, jakým způsobem byla PAMPSA do polyanilinu inkorporována. Nejnižší adhezi destiček v porovnání s referenčním polystyrenem vykazoval kopolymer PANI-PAMPSA-D, což přispívá k jeho antikoagulačním vlastnostem. Při srovnávání PANI-PAMPSA-R-1:1 a PANI-PAMPSA-R-2:1 bylo zjištěno, že k výraznějšímu snížení adheze destiček došlo na povrchu, který obsahoval méně PAMPSA polymeru. Na rozdíl od vlivu na koagulační faktory je vliv na adhezi krevních destiček podobný u všech použitých forem PANI-PAMPSA kopolymeru.

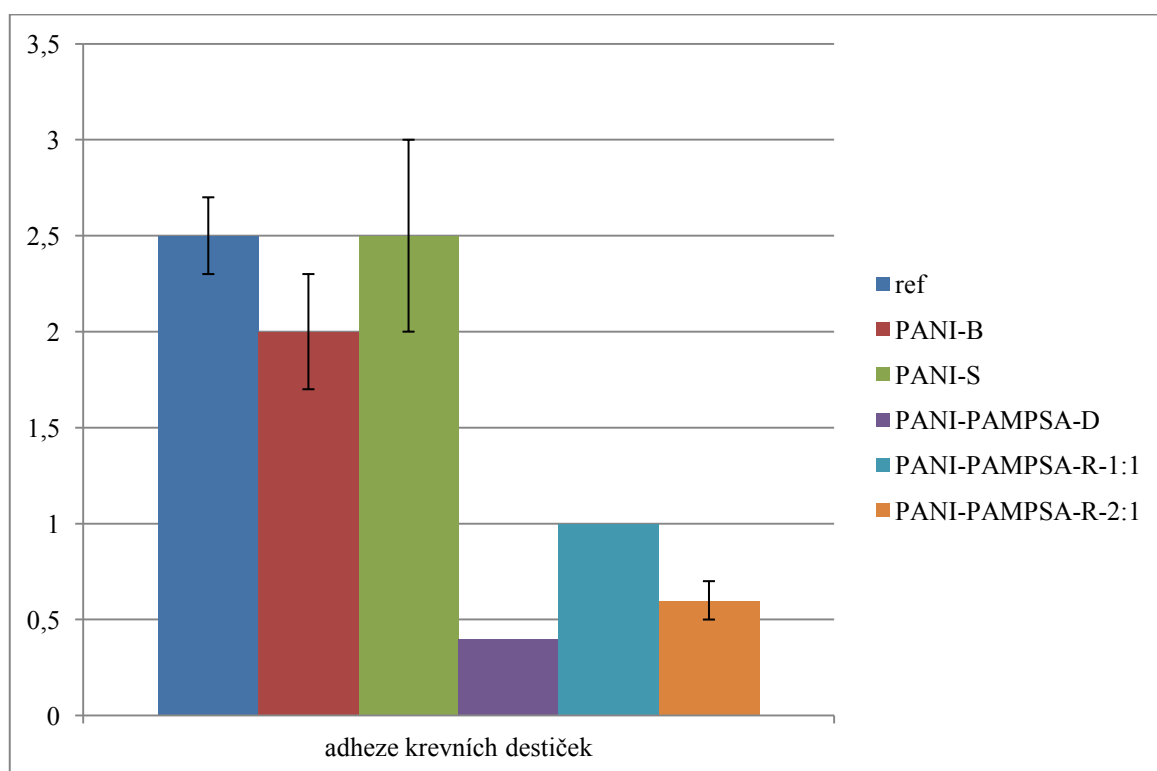
Protože základem vlivu materiálu na krevní srážení je adheze krevních destiček na jeho povrch a interakce s koagulačními faktory, je tento vliv větší u hydrofobních materiálů, které více podporují adsorpci proteinů a jejich aktivaci [60]. Materiály vysoce odolné adsorpci proteinů jsou materiály povrchově modifikované bioinertními polymery nebo antikoagulanty [82] a v současnosti zavedenými metodami k vylepšení hemokompatibility materiálů jsou imobilizace polyetylglykolu nebo heparinu na povrchu materiálu.

Podobných výsledků jako v této práci bylo dosaženo i ve studii, ve které byly pomocí různých bioaktivních molekul modifikovány Dacron a PTFE, a pak byla vyhodnocována jejich hemokompatibilita. Ta byla ve všech případech lepší než u neupravených materiálů, což bylo způsobeno sníženou adsorpcí fibrinogenu a adhezí krevních destiček [80]. Podobně byla hemokompatibilita polyetylentereftalátu (PET) mírně zvýšena také navázáním PEG řetězců, a výrazně imobilizací heparinu na povrch materiálu. Hemokompatibilita modifikovaného materiálu byla posuzována z hlediska krevní koagulace a adheze a aktivace krevních destiček. Doba koagulace byla imobilizací heparinu na povrchu materiálu výrazně prodloužena, a přítomnost heparinu také snížila adhezi krevních destiček [69].

Ve srovnání s těmito údaji je vidět, že kopolymer PANI-PAMPSA-D, který krevní koagulaci zabraňuje úplně, má lepší hemokompatibilitu a výraznější antikoagulační vlastnosti než jiné, standardně používané materiály, a má tedy potenciál jako materiál pro medicínské aplikace v kontaktu s krví.

	Reference	PANI-B	PANI-S	PANI-PAMPSA-D	PANI-PAMPSA-R-1:1	PANI-PAMPSA-R-2:1
Platelet adhesion	$2,5 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$	$0,6 \pm 0,1$

Tabulka 4: Adheze krevních destiček na PANI povrchy



Obrázek 10: Adheze krevních destiček na PANI povrchy

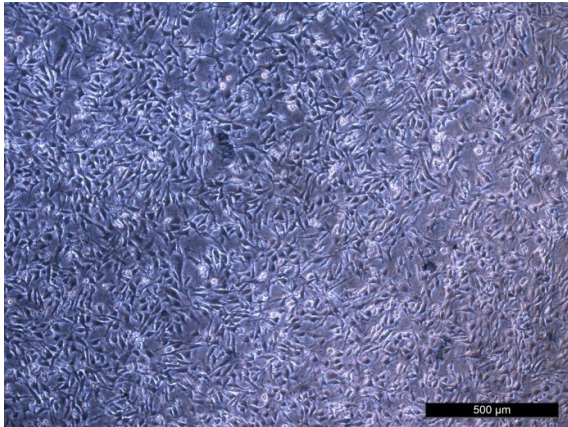
5.5 Proliferace a migrace buněk

Fotografie pořízené během testů buněčné proliferace (obrázek 9) ukazují, že zatímco na povrchu PANI-S i PANI-B je proliferace na pohled stejně intenzivní jako na referenčním vzorku (po 24 i 48 hodinách), na povrchu PANI-PAMPSA kopolymeru fibroblasty nerostou, výrazněji na vzorku PANI-PAMPSA-R-1:1 než na PANI-PAMPSA-R-2:1. K proliferaci buněk na PANI-PAMPSA kopolymeru dochází ve srovnání se vzorkem PANI (S i B) výrazně opožděně, první rostoucí buňky jsou viditelné na PANI-PAMPSA-

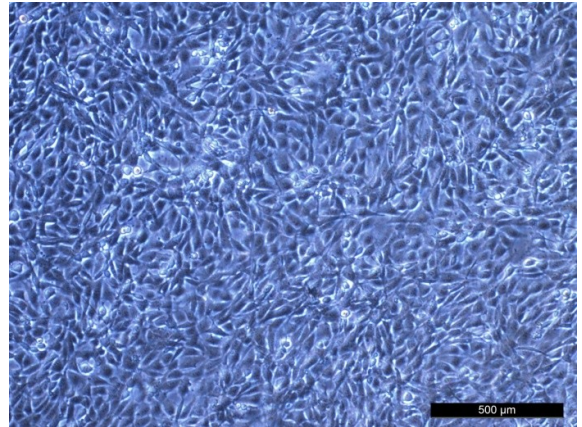
R-2:1 až po 72 hodinách, po šesti dnech testování jsou na obou PANI-PAMPSA vzorcích viditelné narostené fibroblasty, na povrchu PANI-PAMPSA-R-2:1 ve výrazných, nepravidelně uspořádaných strukturách.

Z fotografií buněčné migrace (obrázek 10) je poznat, že ve srovnání s referenčním vzorkem dochází k opětovnému zarůstání vytvořené rýhy ve vrstvě fibroblastů pomaleji u všech zkoumaných materiálů, k výrazně pomalé migraci pak dochází především na PANI-S a PANI-B. Na PANI-PAMPSA kopolymeru je migrace intenzivnější, s rychlejším postupem u PANI-PAMPSA-R-2:1. Na PANI-S i PANI-B je migrace téměř zanedbatelná a do jisté míry viditelná až po 48 hodinách.

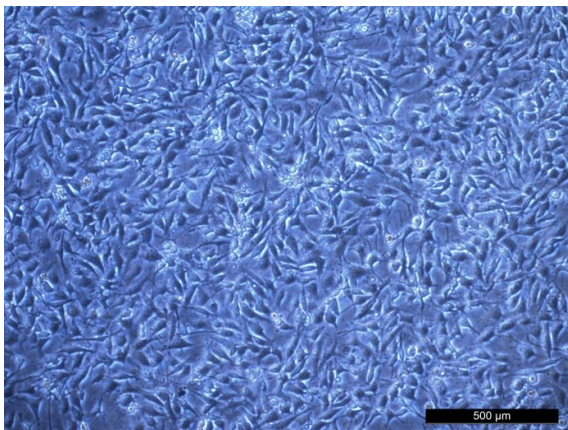
Ze srovnání fotografií proliferace a migrace buněk vyplývá, že povrch PANI-PAMPSA kopolymeru je výrazně méně vhodným materiálem pro růst buněk než polyanilin nebo referenční tkáňový polystyren. Buňky na povrchu kopolymeru PANI-PAMPSA začínají proliferovat později a s menší intenzitou. To, že k proliferaci dochází s nejmenší intenzitou na vzorku PANI-PAMPSA-R-1:1, který má ze všech uvedených vzorků největší obsah PAMPSA polymeru, ukazuje na vliv tohoto polymeru na interakci povrchu materiálu s buňkami, a odpovídá výsledkům testu povrchové energie. Podobný vliv na buněčnou proliferaci se dá předpovědět i u PANI-PAMPSA-D, jehož výsledky nejsou uvedeny, protože buňky na tomto povrchu téměř neadherovaly. Společně s jeho antikoagulačními vlastnostmi a sníženou adhezí krevních destiček to z kopolymeru PANI-PAMPSA-D dělá materiál, který je potencionálně vhodný pro použití v medicínských aplikacích, ve kterých by se dostal do kontaktu s krví.



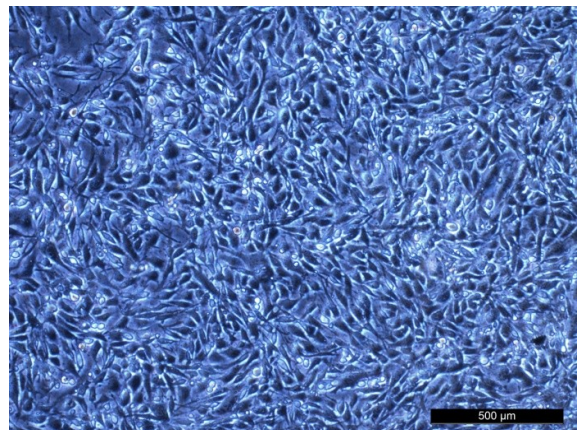
a



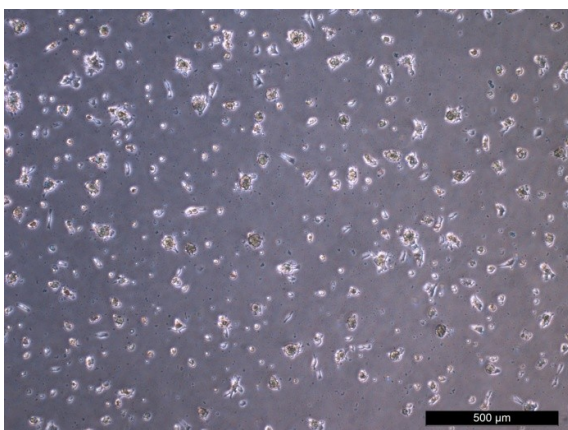
b



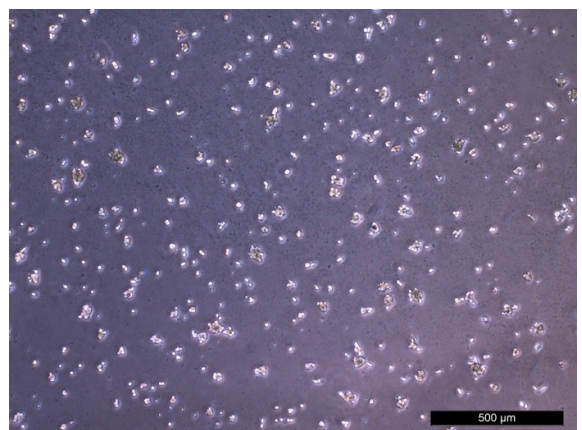
c



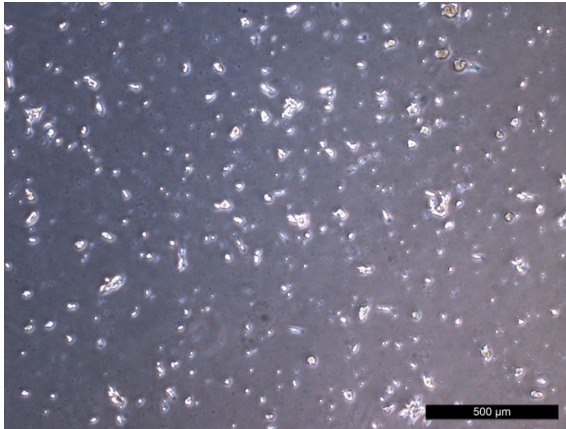
d



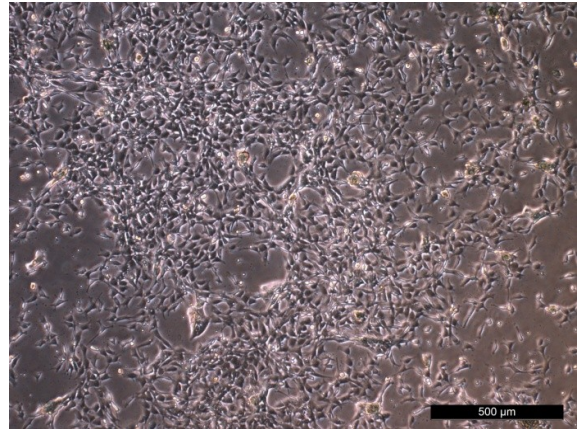
e



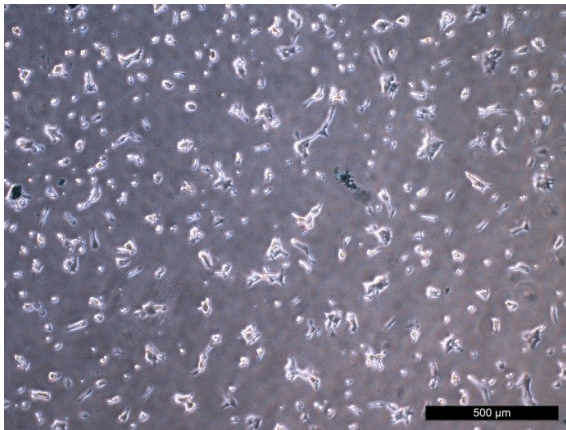
f



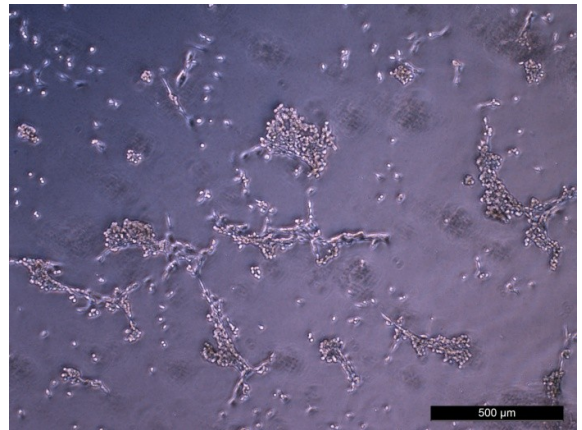
g



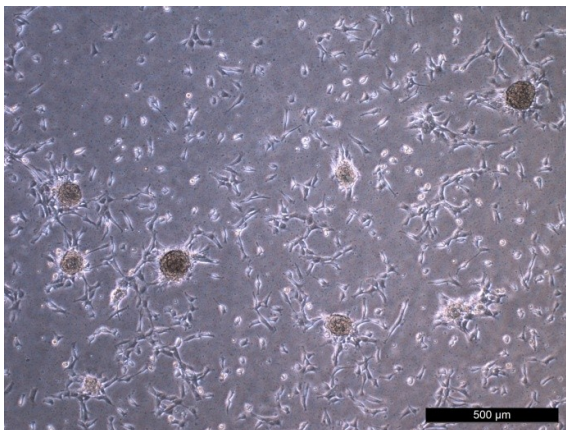
h



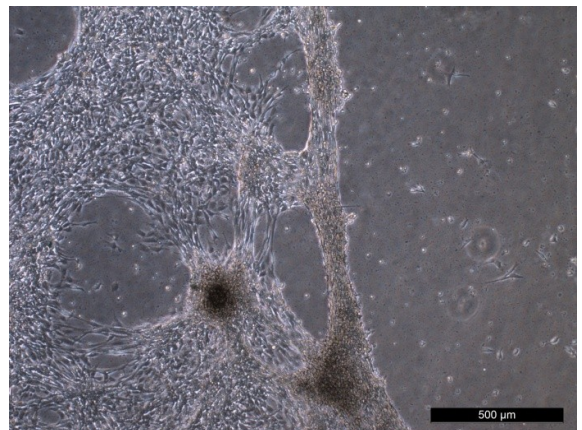
i



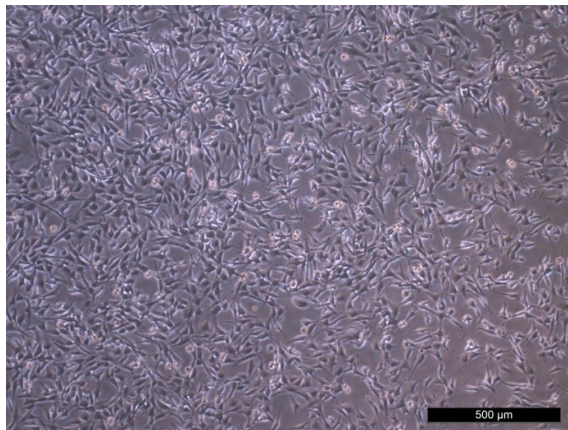
j



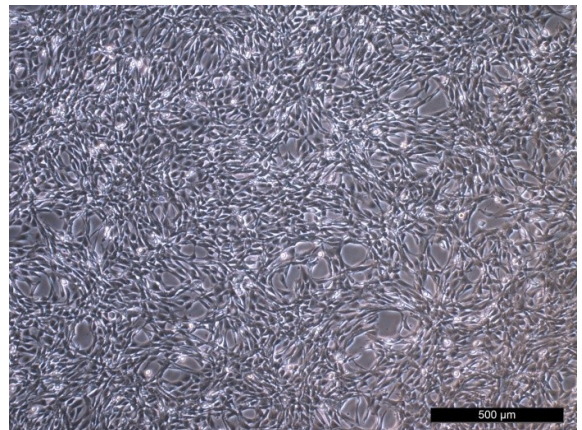
k



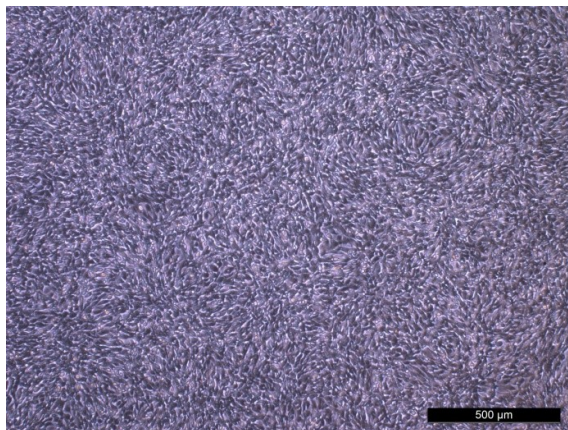
l



m



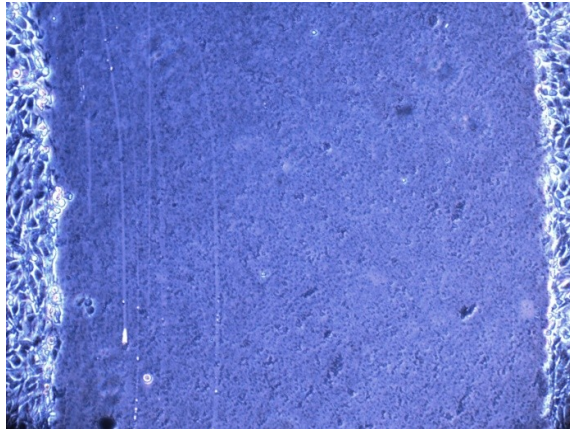
n



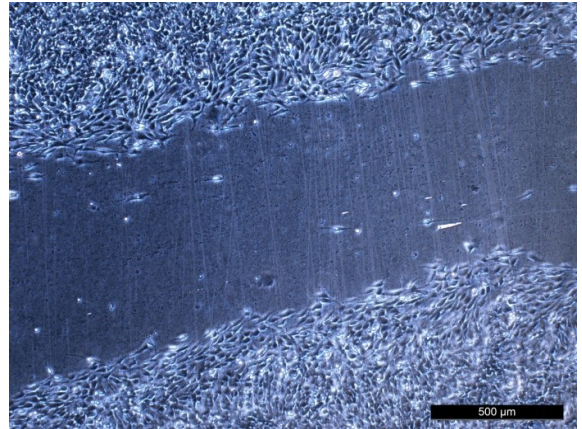
o

Obrázek 11: Proliferace

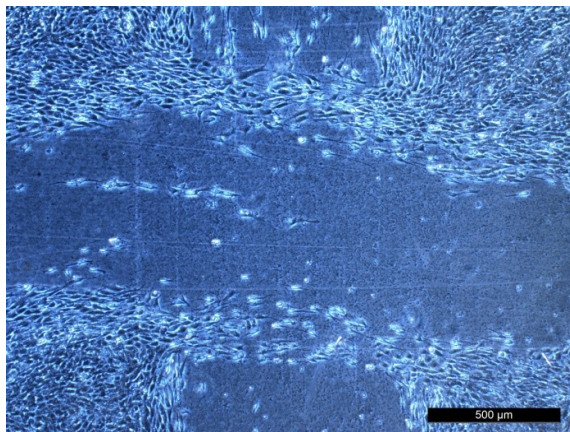
(a) PANI-B_24h (b) PANI-B_48h (c) PANI-S_24h (d) PANI-S_48h (e) PANI-PAMPSA-1:1_24h (f) PANI-PAMPSA-1:1_48h (g) PANI-PAMPSA-1:1_72h (h) PANI-PAMPSA-1:1_6d (i) PANI-PAMPSA-2:1_24h (j) PANI-PAMPSA-2:1_48h (k) PANI-PAMPSA-2:1_72h (l) PANI-PAMPSA-2:1_6d (m) ref_24h (n) ref_48h (o) ref_72h



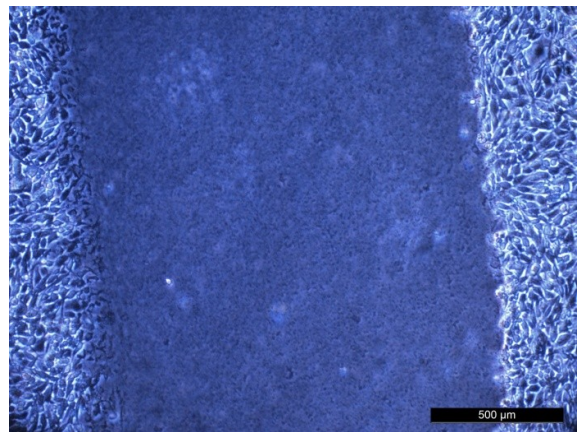
a



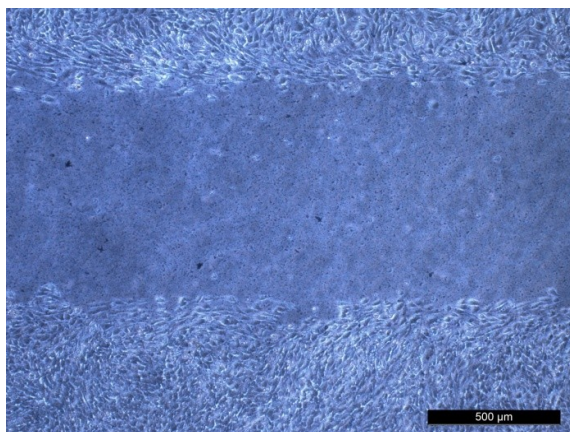
b



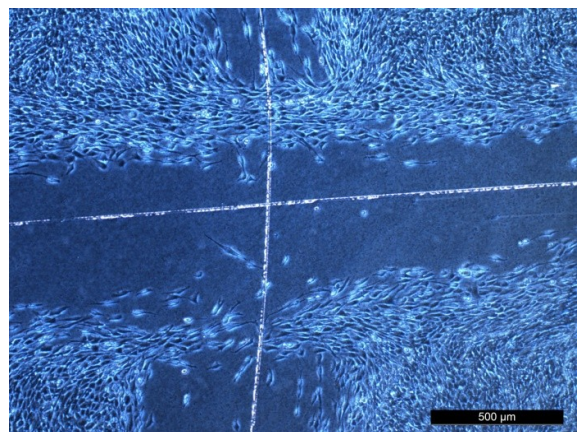
c



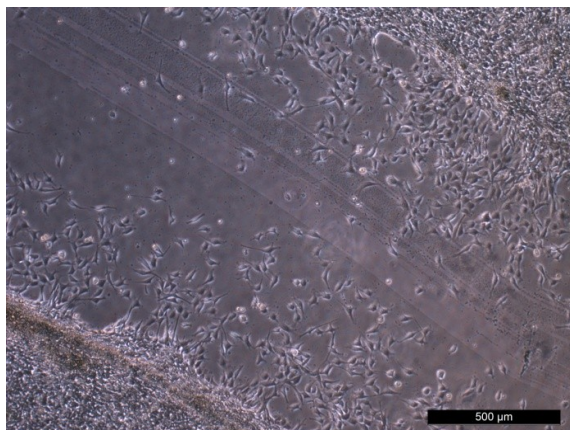
d



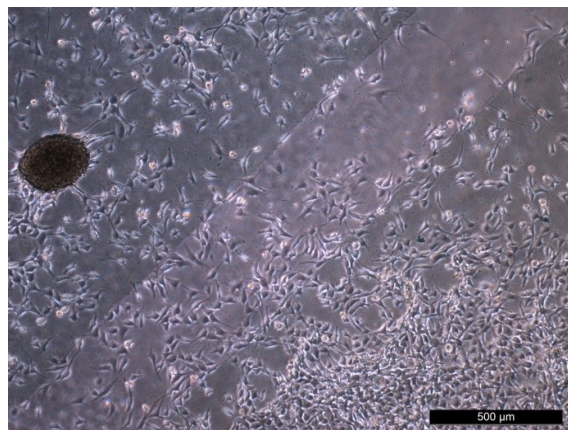
e



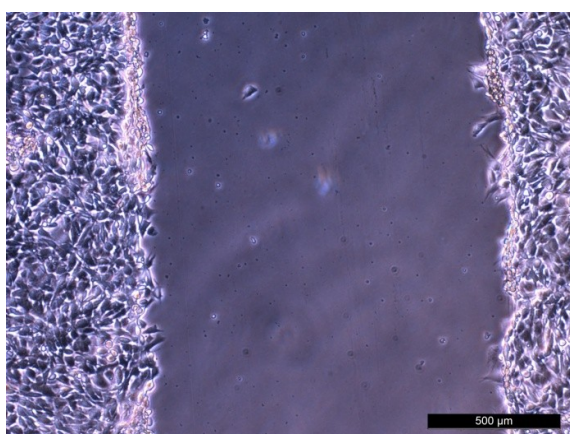
f



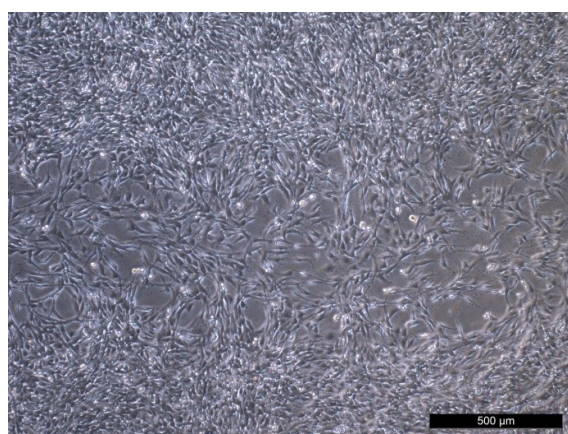
g



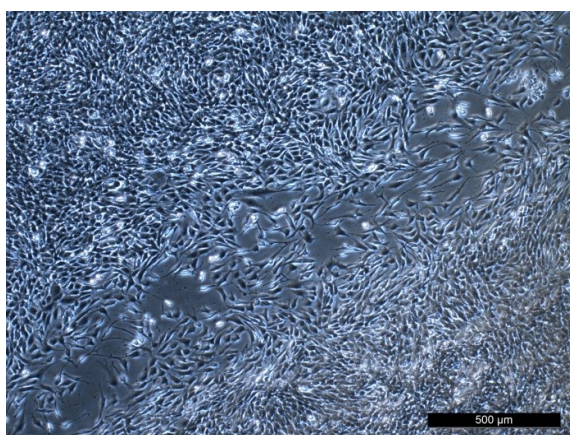
h



i



j



k

Obrázek 12: Migrace

(a) PANI-B_0h (b) PANI-B_24h (c) PANI-B_48h (d) PANI-S_0h (e) PANI-S_24h (f) PANI-S_48h (g) PANI-PAMPSA-1:1_24h (h) PANI-PAMPSA-2:1_24h (i) ref_0h (j) ref_24h (k) ref_48h

ZÁVĚR

Ze všech získaných výsledků je vidět, že zkoumané PANI materiály, ani čisté ani modifikované PAMPSA polymerem neovlivňují krevní koagulaci nijak výrazně odlišně než referenční vzorky, s výjimkou kopolymeru PANI-PAMPSA-D, na jehož povrchu dochází k výraznému snížení adheze krevních destiček. Zároveň má tento materiál antikoagulační vlastnosti, díky kterým na jeho povrchu vůbec nedochází ke krevní koagulaci. To je způsobeno jeho intenzivní interakcí s vybranými koagulačními faktory (II, V a X), u kterých je po kontaktu s PANI-PAMPSA-D vyblokována jejich fyziologická funkce, což je pravděpodobně možné vysvětlit podobností molekuly PAMPSA polymeru, který je navázaný na povrchu PANI filmu, s molekulou známého antikoagulantu heparinu.

Tyto vlastnosti dělají z kopolymeru PANI-PAMPSA-D materiál s možným použitím v medicínských aplikacích, ve kterých by se dostal do kontaktu s krví, jako například materiál pro výrobu umělých chlopní nebo cévních náhrad.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MURRAY, R. K. *Harperova biochemie*. 23. vydání (4. české vydání). Jinočany: H&H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [2] TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. 4. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [3] MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén, ©2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [4] ŘEZÁČOVÁ, M. a A. STOKLASOVÁ. *Základy biochemie lidského organismu*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1510-3.
- [5] HONG, J. et al. Contact between a polymer and whole blood: Sequence of events leading to thrombin generation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2001, roč. 138, č. 2, s. 139-145. DOI: 10.1067/mlc.2001.116486. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022214301698007>
- [6] RAN, F. et al. Synthesized negatively charged macromolecules (NCMs) for the surface modification of anticoagulant membrane biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, roč. 55, s. 269-275. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.01.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813013000214>
- [7] *Přehled fyziologie člověka II. díl*. 3. přepracované vydání. Redaktor POKORNÝ J. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0229-6.
- [8] MARTIN, D. M. A., M. T. WIIGER a H. PRYDZ. Tissue Factor and Biotechnology. *Thrombosis Research*. 1998, roč. 90, č. 1, s. 1-25. DOI: 10.1016/S0049-3848(98)00015-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384898000152>
- [9] 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 z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023303001771>
- [10] DE WILLIGE, S. U. et al. The pleiotropic role of the fibrinogen γ' chain in hemostasis. *Blood*. 2009, roč. 114, č. 19, s. 3994-4001. DOI: 10.1182/blood-2009-05-217968. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-05-217968>

- [11] BURNOUF, T. et al. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Reviews*. 2013, roč. 27, č. 2, s. 77-89. DOI: 10.1016/j.blre.2013.02.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X13000052>
- [12] HSU, Ch. et al. Highly flexible and stable aptamer-caged nanoparticles for control of thrombin activity. *RSC Advances*. 2012, roč. 2, č. 4, s. 1577-1584. DOI: 10.1039/c1ra00344e. Dostupné z: <ftp://lib.sumdu.edu.ua/ebooks/articles/Highly%20flexible.pdf>
- [13] 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. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693403000142>
- [14] BUTENAS, S. et al. Tissue factor in thrombosis and hemorrhage. *Surgery*. 2007, roč. 142, č. 4, s. S2-S14. DOI: 10.1016/j.surg.2007.06.032. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039606007004175>
- [15] OHKUBO, Y. Z. a E. TAJKHORSHID. Distinct Structural and Adhesive Roles of Ca²⁺ in Membrane Binding of Blood Coagulation Factors. *Structure*. 2008, roč. 16, č. 1, s. 72-81. DOI: 10.1016/j.str.2007.10.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212607004662>
- [16] RAO, Z. et al. The structure of a Ca²⁺-binding epidermal growth factor-like domain: Its role in protein-protein interactions. *Cell*. 1995, roč. 82, č. 1, s. 131-141. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90059-4. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867495900594>
- [17] HUANG, J. N. a M. A. KOERPER. Factor V deficiency: a concise review. *Haemophilia*. 2008, roč. 14, č. 6, s. 1164-1169. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01785.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2516.2008.01785.x>
- [18] JIN, J. et al. Four loops of the catalytic domain of factor VIIa: Mediate the effect of the first EGF-like domain substitution on factor VIIa catalytic activity. *Journal of Molecular Biology*. 2001, roč. 307, č. 5, s. 1503-1517. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4556. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283601945565>

- [19] FAY, P. J. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Reviews*. 2004, roč. 18, č. 1, s. 1-15. DOI: 10.1016/S0268-960X(03)00025-0. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X03000250>
- [20] FANG, H., L. WANG a H. WANG. The protein structure and effect of factor VIII. *Thrombosis Research*. 2007, roč. 119, č. 1, s. 1-13. DOI: 10.1016/j.thromres.2005.12.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384806000028>
- [21] WANG, W., Y. J. WANG a D. N. KELNER. Coagulation factor VIII: structure and stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, roč. 259, č. 1-2, s. 1-15. DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00227-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517303002278>
- [22] SCHMIDT, A. E. a S. P. BAJAJ. Structure–Function Relationships in Factor IX and Factor IXa. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2003, roč. 13, č. 1, s. 39-45. DOI: 10.1016/S1050-1738(02)00210-4. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050173802002104>
- [23] AUERSWALD, G. Prophylaxis in rare coagulation disorders—factor X deficiency. *Thrombosis Research*. 2006, roč. 118, s. S29-S31. DOI: 10.1016/j.thromres.2006.01.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384806000478>
- [24] VENKATESWARLU, D. et al. Structure and Dynamics of Zymogen Human Blood Coagulation Factor X. *Biophysical Journal*. 2002, roč. 82, č. 3, s. 1190-1206. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75476-3. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349502754763>
- [25] HE, R., D. CHEN a S. HE. Factor XI: Hemostasis, Thrombosis, and Antithrombosis. *Thrombosis Research*. 2012, roč. 129, č. 5, s. 541-550. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.051. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384811006475>
- [26] GIANNAKOPOULOS, B. et al. Factor XI is a substrate for oxidoreductases: Enhanced activation of reduced FXI and its role in antiphospholipid syndrome thrombosis. *Journal of Autoimmunity*. 2012, roč. 39, č. 3, s. 121-129. DOI: 10.1016/j.jaut.2012.05.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841112000625>

- [27] STAVROU, E. a A. H. SCHMAIER. Factor XII: What does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thrombosis Research*. 2010, roč. 125, č. 3, s. 210-215. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.11.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384809005416>
- [28] SCHOUSBOE, I. Pharmacological regulation of factor XII activation may be a new target to control pathological coagulation. *Biochemical Pharmacology*. 2008, roč. 75, č. 5, s. 1007-1013. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.10.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295207006776>
- [29] ARIENS, R. A. S. et al. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood*. 2002, roč. 100, č. 3, s. 743-754. DOI: 10.1182/blood.V100.3.743. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood.V100.3.743>
- [30] DODT, J., P. VOLKERS a R. SEITZ. Factor XIIIa generation assay: A tool for studying factor XIII function in plasma. *Analytical Biochemistry*. 2013, roč. 439, č. 2, s. 145-151. DOI: 10.1016/j.ab.2013.04.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269713001863>
- [31] BAGOLY, Z. et al. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thrombosis Research*. 2012, roč. 129, č. 3, s. 382-387. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.040. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384811006360>
- [32] HAYASHI, H. et al. Anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito has anti-thrombotic effects *in vivo* without compromising hemostasis. *Thrombosis Research*. 2012, roč. 129, č. 2, s. 169-175. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.09.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384811005020>
- [33] WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Reviews*. 2007, roč. 21, č. 3, s. 131-142. DOI: 10.1016/j.blre.2006.11.001. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X0600066X>
- [34] TURITTO, V. T. a C. L. HALL. Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis. *Thrombosis Research*. 1998, roč. 92, č. 6, S25-S31. DOI: 10.1016/S0049-3848(98)00157-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384898001571>

- [35] LORÍA, G. D. et al. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003, roč. 418, č. 1, s. 13-24. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00385-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986103003850>
- [36] BRAUD, S., C. BON a A. WISNER. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000, roč. 82, č. 9-10, s. 851-859. DOI: 10.1016/S0300-9084(00)01178-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908400011780>
- [37] VALSAMI, S. a L. M. ASMIS. A Brief Review of 50 Years of Perioperative Thrombosis and Hemostasis Management. *Seminars in Hematology*. 2013, roč. 50, č. 2, s. 79-87. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2013.04.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0037196313000681>
- [38] CAPPIELLO, M. et al. Hirunorms, Novel Hirudin-like Direct Thrombin Inhibitors. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1998, roč. 30, č. 4, s. 565-568. DOI: 10.1016/S0306-3623(97)00306-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306362397003066>
- [39] DOSTÁL, J. a P. KAPLAN. *Lékařská chemie II*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2003. ISBN 80-210-2731-2.
- [40] FUSE, I. Disorders of platelet function. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1996, roč. 22, č. 1, s. 1-25. DOI: 10.1016/1040-8428(94)00167-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1040842894001677>
- [41] WOLF, A. M. et al. Safety of perioperative aspirin therapy in pancreatic operations. *Surgery*. 2013, roč. 155, č. 1, s. 39-46. DOI: 10.1016/j.surg.2013.05.031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606013002766>
- [42] GREER, F. R. Vitamin K the basics—What's new?. *Early Human Development*. 2010, roč. 86, č. 1, s. S43-S47. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2010.01.015. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378210000174>
- [43] GREER, F. R. The importance of vitamin K as a nutrient during the first year of life. *Nutrition Research*. 1995, roč. 15, č. 2, s. 289-310. DOI: 10.1016/0271-

- 5317(95)92593-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0271531795925939>
- [44] LAKE, B. G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 1999, roč. 37, č. 4, s. 423-453. DOI: 10.1016/S0278-6915(99)00010-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691599000101>
- [45] BODACK, M. I. A warfarin-induced subconjunctival hemorrhage. *Optometry*. 2007, roč. 78, č. 3, s. 113-118. DOI: 10.1016/j.optm.2006.10.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1529183906008013>
- [46] MAAS, N. C. et al. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. *Carbohydrate Polymers*. 2012, roč. 89, č. 4, s. 1081-1087. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.070. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712002986>
- [47] ENJYOJI, K. et al. Effect of Heparin on the Inhibition of Factor Xa by Tissue Factor Pathway Inhibitor: A Segment, Gly²¹²-Phe²⁴³, of the Third Kunitz Domain Is a Heparin-Binding Site. *Biochemistry*. 1995, roč. 34, č. 17, s. 5725-5735. DOI: 10.1021/bi00017a004. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00017a004>
- [48] BATES, S. M. a J. I. WEITZ. Direct thrombin inhibitors for treatment of arterial thrombosis: potential differences between bivalirudin and hirudin. *The American Journal of Cardiology*. 1998, roč. 82, č. 8, 12P-18P. DOI: 10.1016/S0002-9149(98)00660-2. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002914998006602>
- [49] SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. Praha: SÚKL, ©2010 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/>
- [50] WEITZ, J. I. a M. CROWTHER. Direct thrombin inhibitors. *Thrombosis Research*. 2002, roč. 106, č. 3, s. V275-V284. DOI: 10.1016/S0049-3848(02)00093-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384802000932>
- [51] FRANCHINI, M. a P. M. MANNUCCI. A new era for anticoagulants. *European Journal of Internal Medicine*. 2009, roč. 20, č. 6, s. 562-568. DOI: 10.1016/j.ejim.2009.05.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953620509000892>

- [52] HIRSH, J. Current anticoagulant therapy—unmet clinical needs. *Thrombosis Research*. 2003, roč. 109, s. S1-S8. DOI: 10.1016/S0049-3848(03)00250-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384803002500>
- [53] DE MEL, A., B. G. COUSINS a A. M. SEIFALIAN. Surface Modification of Biomaterials: A Quest for Blood Compatibility. *International Journal of Biomaterials*. 2012, roč. 2012, s. 1-8. DOI: 10.1155/2012/707863. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijbm/2012/707863/>
- [54] BUTCHER, J. T., G. J. MAHLER a L. A. HOCKADAY. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, roč. 63, č. 4-5, s. 242-268. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11000123>
- [55] BINYAMIN, G., B. M. SHAFI a C. M. MERY. Biomaterials: A primer for surgeons. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2006, roč. 15, č. 4, s. 276-283. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2006.07.007. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055858606000552>
- [56] GROSSKINSKY, U. Biomaterial regulations for tissue engineering. *Desalination*. 2006, roč. 199, č. 1-3, s. 265-267. DOI: 10.1016/j.desal.2006.03.172. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011916406006060>
- [57] 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 z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208002676>
- [58] MILLER, R. et al. Plasma coagulation response to surfaces with nanoscale chemical heterogeneity. *Biomaterials*. 2006, roč. 27, č. 2, s. 208-215. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.087. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205004874>
- [59] 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 z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209010837>
- [60] VOGLER, E. A. a Ch. 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 z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208010260>
- [61] TANZI, M. C. Bioactive technologies for hemocompatibility. *Expert Review of Medical Devices*. 2005, roč. 2, č. 4, s. 473-492. DOI: 10.1586/17434440.2.4.473. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/17434440.2.4.473>
- [62] ŘÍHOVÁ, B. Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1996, roč. 21, č. 2, s. 157-176. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00404-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X96004048>
- [63] KOH, L. B., I. RODRIGUEZ a S. S. VENKATRAMAN. 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 z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209012502>
- [64] DENG, J. et al. Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations. *Progress in Polymer Science*. 2009, roč. 34, č. 2, s. 156-193. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2008.06.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670008000750>
- [65] KATO, K. et al. Polymer surface with graft chains. *Progress in Polymer Science*. 2003, roč. 28, č. 2, s. 209-259. DOI: 10.1016/S0079-6700(02)00032-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670002000321>
- [66] MAO, Ch. 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 z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868604000132>
- [67] QI, P., M. F. MAITZ a Nan HUANG. Surface modification of cardiovascular materials and implants. *Surface and Coatings Technology*. 2013, roč. 233, s. 80-90. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2013.02.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897213001631>
- [68] YOU, D. et al. Microwave-assisted functionalization of polyurethane surface for improving blood compatibility. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.

- 2013, roč. 19, č. 5, s. 1587-1592. DOI: 10.1016/j.jiec.2013.01.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1226086X13000324>
- [69] KIM, Y. J. et al. Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. *Biomaterials*. 2000, roč. 21, č. 2, s. 121-130. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00137-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961299001374>
- [70] CHEN, Q., S. LIANG a G. A. THOUAS. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. 2013, roč. 38, č. 3-4, s. 584-671. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2012.05.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967001200069X>
- [71] ZHU, A. a T. CHEN. Blood compatibility of surface-engineered poly(ethylene terephthalate) via o-carboxymethylchitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, roč. 50, č. 2, s. 120-125. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.04.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776506001536>
- [72] CHIPELLINI, F. et al. Perspectives on alternatives to phthalate plasticized poly(vinyl chloride) in medical devices applications. *Progress in Polymer Science*. 2013, roč. 38, č. 7, s. 1067-1088. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.03.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967001300018X>
- [73] LAMBA, N. M. K. et al. In vitro investigation of the blood response to medical grade PVC and the effect of heparin on the blood response. *Biomaterials*. 2000, roč. 21, č. 1, s. 89-96. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00145-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961299001453>
- [74] HAKKARAINEN, M. New PVC materials for medical applications—the release profile of PVC/polycaprolactone–polycarbonate aged in aqueous environments. *Polymer Degradation and Stability*. 2003, roč. 80, č. 3, s. 451-458. DOI: 10.1016/S0141-3910(03)00029-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391003000296>
- [75] LAURENT, A. Materials and biomaterials for interventional radiology. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1998, roč. 52, č. 2, s. 76-88. DOI: 10.1016/S0753-3322(98)80007-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332298800073>

- [76] VAN DEN KERCKHOVE, E. et al. Silicones in the rehabilitation of burns: a review and overview. *Burns*. 2001, roč. 27, č. 3, s. 205-214. DOI: 10.1016/S0305-4179(00)00102-9. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417900001029>
- [77] XU, W., Z. XIAO a T. ZHANG. Mechanical properties of silicone elastomer on temperature in biomaterial application. *Materials Letters*. 2005, roč. 59, č. 17, s. 2153-2155. DOI: 10.1016/j.matlet.2005.02.052. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167577X0500203X>
- [78] LURIA, L. W. The role of medical grade silicones in surgery and its topical applications. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*. 2003, roč. 9, č. 2, s. 67-74. DOI: 10.1016/S1071-0949(03)90012-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1071094903900126>
- [79] PU, F. R. et al. Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro. *Biomaterials*. 2002, roč. 23, č. 11, s. 2411-2428. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00377-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961201003775>
- [80] CHANDY, T. et al. Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance bloodcompatibility of Dacron and PTFE vascular prosthesis. *Biomaterials*. 2000, roč. 21, č. 7, s. 699-712. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00231-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961299002318>
- [81] KEBICHE, H. et al. Relationship between ammonia sensing properties of polyaniline nanostructures and their deposition and synthesis methods. *Analytica Chimica Acta*. 2012, roč. 737, s. 64-71. DOI: 10.1016/j.aca.2012.06.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267012008483>
- [82] 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 z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205010628>
- [83] CHEN, Y. et al. Chemical modification of polyaniline powders by surface graft copolymerization. *Polymer*. 2000, roč. 41, č. 9, s. 3279-3287. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00493-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386199004930>

- [84] ĆIRIĆ-MARJANOVIĆ, G. Recent advances in polyaniline research: Polymerization mechanisms, structural aspects, properties and applications. *Synthetic Metals*. 2013, roč. 177, s. 1-47. DOI: 10.1016/j.synthmet.2013.06.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677913002798>
- [85] POSUDIEVSKY, O. Y. et al. Structure–property relationship in mechanochemically prepared polyaniline. *Synthetic Metals*. 2010, roč. 160, č. 5-6, s. 462-467. DOI: 10.1016/j.synthmet.2009.11.032. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677909006237>
- [86] VALENTOVÁ, H. a J. STEJSKAL. Mechanical properties of polyaniline. *Synthetic Metals*. 2010, roč. 160, č. 7-8, s. 832-834. DOI: 10.1016/j.synthmet.2010.01.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677910000184>
- [87] TAHIR, Z. M., E. C. ALOCILJA a D. L. GROOMS. 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 z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566304003732>
- [88] SOWA, I. et al. Physicochemical properties of silica gel coated with a thin layer of polyaniline (PANI) and its application in non-suppressed ion chromatography. *Talanta*. 2013, roč. 115, s. 451-456. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.05.071. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914013004955>
- [89] LU, X. et al. One-dimensional conducting polymer nanocomposites: Synthesis, properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2011, roč. 36, č. 5, s. 671-712. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.07.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670010000754>
- [90] STEJSKAL, J., I. SAPURINA a M. TRCHOVÁ. Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation. *Progress in Polymer Science*. 2010, roč. 35, č. 12, s. 1420-1481. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.07.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670010000705>
- [91] BLÁHA, M. et al. Effects of the polymerization temperature on the structure, morphology and conductivity of polyaniline prepared with ammonium peroxodisulfate. *European Polymer Journal*. 2013, roč. 49, č. 12, s. 3904-3911. DOI:

- 10.1016/j.eurpolymj.2013.08.018. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001430571300431X>
- [92] MARINS, J. A. et al. Hybrid polyaniline-coated sepiolite nanofibers for electrorheological fluid applications. *Synthetic Metals*. 2013, roč. 185-186, s. 9-16. DOI: 10.1016/j.synthmet.2013.09.037. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677913004852>
- [93] XIE, H. a Q. XIANG. Surface-graft polymerization of doped polyaniline with hydrophilic monomers. *European Polymer Journal*. 2000, roč. 36, č. 3, s. 509-517. DOI: 10.1016/S0014-3057(99)00084-1. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305799000841>
- [94] FEDORKO, P. et al. Effect of structural anisotropy on electrical and magnetic properties of polyaniline conducting films. *Synthetic Metals*. 2013, roč. 166, s. 63-69. DOI: 10.1016/j.synthmet.2013.01.017. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037967791300043X>
- [95] Advex Instruments, s. r. o. Surface Free Energy. *Advex Instruments* [online]. Brno: Advex Instruments, s. r. o., ©2008 [cit. 2014-05-07]. Dostupné z:
http://www.advex-instruments.cz/index.php?option=com_content&task=view&id=29&Itemid=39
- [96] ACL Elite Pro; Operate. *Analytical Procedures* [online]. Aktualizace 2012 [cit. 2014-05-07]. Dostupné z: <http://webserver.pa-ucl.com/wwwdocs/analyticalproc/FrameA.htm>
- [97] MATĚJKOVÁ, S. a M. PILOUSKOVÁ. Sysmex CA 1500. In: *Oblastní nemocnice Příbram, a. s.* [online]. Středočeský kraj, ©2009 [cit. 2014-05-07]. Dostupné z: <http://www.nemocnicepribram.cz/doc/SLPOKH/HVEZDAAABG.htm>
- [98] Siemens AG. Sysmex CA-1500 System. *Siemens Global Website* [online]. Munich: Siemens AG, ©2010 - 2014 [cit. 2014-05-07]. Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/hemostasis/systems/sysmex-ca-1500>
- [99] VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. In: *NCBI: National Center for Biotechnology Information* [online]. Bethesda MD: 2005 [cit. 2014-05-07]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15901925>
- [100] VICHAI, V. a K. KIRTIKARA. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. 2006, roč. 1, č. 3, s. 1112-1116. DOI:

- 10.1038/nprot.2006.179. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406391>
- [101] STEJSKAL, J. a R. G. GILBERT. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry*. 2002, roč. 74, č. 5, s. 857-867. DOI: 10.1351/pac200274050857. Dostupné z: <http://iupac.org/publications/pac/74/5/0857/>
- [102] 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, s. 815-826. DOI: 10.1351/pac200577050815. Dostupné z: <http://pac.iupac.org/publications/pac/77/5/0815/>
- [103] McGill University. Blood Laboratory: Hemostasis: PT and PTT tests. *The McGill Physiology Virtual Laboratory* [online]. Montreal: McGill University, aktualizace 2014 [cit. 2014-05-07]. Dostupné z: http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/bloodlab/pt_ptt.htm
- [104] PERRY, D. a T. TODD. Thrombin Time. *Practical-Haemostasis.com: A Practical Guide to Laboratory Haemostasis* [online]. Aktualizace 2013 [cit. 2014-05-07]. Dostupné z: <http://www.practical-haemostasis.com/Screening%20Tests/tt.html>
- [105] GRIBKOVA, O. L. et al. Templating effect of polymeric sulfonic acids on electropolymerization of aniline. *Electrochimica Acta*. 2014, roč. 122, s. 150-158. DOI: 10.1016/j.electacta.2013.12.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468613024651>
- [106] RABENSTEIN, D. L. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Natural Product Reports*. 2002, roč. 19, č. 3, s. 312-331. DOI: 10.1039/b100916h. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b100916h>
- [107] ERDEMI, H., A. BOZKURT a W. H. MEYER. PAMPSA-IM based proton conducting polymer electrolytes. *Synthetic Metals*. 2004, roč. 143, č. 1, s. 133-138. DOI: 10.1016/j.synthmet.2003.10.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677903005083>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADP	Adenosindifosfát.
PTA	Plasmatický předchůdce tromboplastinu.
HMK	Vysokomolekulární kininogen.
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor.
EPCR	Endoteliální receptor proteinu C.
tPA	Tissue plasminogen activator.
TAFI	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor.
PEG	Polyetylenglykol.
PEO	Polyetylenoxid.
PVC	Polyvinylchlorid.
PET	Polyetylentereftalát.
PTFE	Polytetrafluoretylen.
ICP	Intrinsically conducting polymers.
PAC	Polyacetylen.
PT	Polythiofen.
PPy	Polypyrrol.
PPV	Polyparafenylenvinylen.
PANI	Polyanilin.
APS	Amonium peroxydisulfát.
H ₂ SO ₄	Kyselina sírová.
HCl	Kyselina chlorovodíková.
PT	Prothrombin time.
aPPT	Activated partial thromboplastin time.
TCT	Thrombin clotting time.

SRB	Sulforhodamine B.
PAMPSA	Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid).
CaCl ₂	Chlorid vápenatý.
NIH/3T3, ATCC CRL-1658	Označení buněčné linie.
γ^{tot}	Celková povrchová energie.
γ^{LW}	Disperzní komponenta povrchové energie.
γ^{AB}	Polární komponenta povrchové energie.
ref	Reference.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Hemokoagulační kaskáda [3].....	20
Obrázek 2: Vazebné místo pro antitrombin na molekule heparinu [106].....	26
Obrázek 3: Oxidační dopování leukoemeraldinové báze a protonizace emeraldinové báze [84].....	34
Obrázek 4: Morfologie PANI (a) granule, (b) nanovlákná připravená s APS a HCl, (c) nanotrubičky připravované v přítomnosti kyseliny octové, (d) koloidní částice [90]	36
Obrázek 5: Vliv PANI povrchů na vybrané parametry koagulace	49
Obrázek 6: Vzorec polymeru PAMPSA [107]	51
Obrázek 7: Vazebné místo pro antitrombin na molekule heparinu [106].....	51
Obrázek 8: Vliv PANI povrchů na koagulační faktory X, V a II	52
Obrázek 9: Vliv PANI povrchů na fibrinogen.....	52
Obrázek 10: Adheze krevních destiček na PANI povrchy	54
Obrázek 11: Proliferace	58
Obrázek 12: Migrace	60

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Výsledky měření povrchové energie	47
Tabulka 2: Vliv PANI povrchů na vybrané parametry koagulace.....	49
Tabulka 3: Vliv PANI povrchů na vybrané koagulační faktory	51
Tabulka 4: Adheze krevních destiček na PANI povrchy.....	54

