



Přírodovědecká fakulta
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE



Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Physical and Macromolecular Chemistry

Doktorský studijní program: Makromolekulární Chemie

Ph.D. study program: Macromolecular Chemistry

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis

**NOVEL AVENUES FOR THE PREPARATION OF
ANTIFOULING SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING**

Ing. Nina Kostina

Ústav Makromolekulární Chemie, AV ČR, v.v.i.

Institute of Macromolecular Chemistry, AS CR, v.v.i.

Supervisor: Ing. Jiří Michálek, CSc.

PRAGUE 2015

Abstract

Non-specific protein adsorption –protein fouling– is an adverse effect occurring at the surface of most artificial materials which come into contact with biological fluids, affecting various biomedical devices and tissue engineering scaffolds. In order to address this ubiquitous problem the preparation of scaffolds resistant to protein fouling (antifouling) was proposed.

The main goal of this Thesis was the development of strategies for the preparation of antifouling scaffolds for tissue engineering. The work consisted of three steps: (i) the selection of monomers leading to antifouling properties by utilizing model system based on polymer brushes; (ii) preparation of antifouling hydrogels of different properties and architecture by copolymerization with zwitterionic carboxybetaine monomers, selected from model experiment; and (iii) modification of the surface of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanofibers by growing four types of polymer brushes resistant to protein fouling.

The scaffolds presented in this work showed variety of unique properties, such as hydration (up to 30000%), elongation (up to 1800%), self-healing, biodegradation, availability of functional groups and complex pore structure. Importantly, all scaffolds showed significant reduction of protein fouling and non-specific cell adhesion and can be exploited as a platform for further functionalization with biological cues and signaling molecules for specific cell-matrix interaction. The methods applied for the preparation of antifouling scaffolds are universal and can be extended for different types of material in order to achieve specific property for the scaffold. The combination of these properties makes the presented scaffolds a highly promising material for tissue engineering applications.

Keywords: antifouling properties, hydrogels, nanofibers, polymer brushes, scaffold for tissue engineering.

Abstract

Nespecifická adsorpce proteinů (angl. protein fouling) je velmi nežádoucí efekt odehrávající se prakticky na každém umělém povrchu, který přichází do kontaktu s biologickými tekutinami, a má fatální vliv na aplikaci různých biomedicínských přípravků a nosičů určených pro tkáňové inženýrství (scaffold). Aby se předešlo tomuto všudypřítomnému problému, byly navrženy buněčné nosiče odolávající nespecifickým adsorpčním proteinů (tzv. „antifouling“ povrchy).

Hlavním cílem této disertační práce byl vývoj strategie přípravy povrchů pro tkáňové inženýrství odolávajících nespecifickým adsorpčním proteinů. Práce se skládala ze tří hlavních částí: (i) výběr monomerů vedoucích k „antifouling“ povrchům pro modelový systém založený na polymerních kartáčích; (ii) příprava „antifouling“ hydrogelů s různými vlastnostmi a architekturou pomocí kopolymerizace zwitterionových karboxybetainových monomerů vybraných z modelových experimentů; (iii) modifikace povrchu poly(ϵ -karpolaktonových) nanovláken čtyřmi typy „antifouling“ polymerních kartáčů.

Hydrogely připravené v této práci vykazují širokou škálu jedinečných vlastností, jako např. hydratace dosahující až 30000 %, tažnost až 1800 %, schopnost regenerace, biodegradovatelnost, struktura komunikujících pórů a přítomnost funkčních skupin. Navíc, všechny nosiče signifikantně potlačovaly nespecifickou adsorpce proteinů a nespecifickou adhezi buněk a zároveň mohly být využity jako platformy pro další funkcionalizaci biologickými elementy a signálními molekulami pro specifickou interakci buněk s nosičem. Metodika přípravy „antifouling“ nosičů je universální a může být rozšířena o různé typy materiálů za účelem dosažení specifických vlastností tkáňových nosičů. Kombinace těchto vlastností dělá z prezentovaných nosičů velmi slibné materiály pro aplikace ve tkáňovém inženýrství.

Klíčová slova: hydrogely, polymerní kartáče, „antifouling“ vlastnosti, nespecifická adsorpce, nanovlákná, nosiče pro tkáňové inženýrství.

Contents

1. Introduction	1
2. Goals of the thesis	2
3. Summary of results	3
3.1. Selection of monomers.....	3
3.2. Antifouling Poly(HEMA-co-CB(M)AA) hydrogels.....	4
3.3. Self-healing Poly(HEMA-co-CBMAA) nanocomposite hydrogels with superior mechanical properties.....	5
3.4. Biodegradable zwitterionic scaffolds with gyroid pore architecture.....	6
3.5. Modification of nanofibers with antifouling polymer brushes.....	7
4. Conclusions	10

Obsah

1. Úvod	12
2. Cíle disertace	13
3. Výsledky a diskuse	14
3.1. Výběr monomerů	14
3.2. Hydrogely poly(HEMA-co-CB(M)AA) odolávající nespecifickým adsorpčním protein	15
3.3. Nanokompozitní hydrogely poly(HEMA-co-CBMAA) se schopností regenerace a s výbornými mechanickými vlastnostmi.....	16
3.4. Biodegradovatelné zwitterionové nosiče s gyroidovou architekturou pórů.....	17
3.5. Modifikace nanovláken polymerními kartáči odolávajícími nespecifickým adsorpčním proteinů.....	18
4. Závěr	21

1. Introduction

Millions of patients with lost, damaged or malfunctioned organs and tissues suffer for week, months or even years while waiting for having available donor for transplantation. Transplantation of tissues and organs from cadaveric or living-related donor, although successful and saved countless lives, has severe constraints. The major problem of transplantation is an extreme deficiency in the donor storage.¹ Furthermore, even those patients who endure the organ transplantation are at high risk that the recipient's immune system will identify the organ as foreign and attempt to destroy it, causing rejection of the transplant.

Tissue engineering emerges as a potential solution for the increased need of tissues and organs for transplantation by promoting *de novo* tissue formation and recovery of function.²⁻⁵ Tissue engineering strategies typically involve the combination of three main components, namely: (i) cells, (ii) precisely designed scaffolds, and (iii) specific signals to promote tissue regeneration and integration of the construct onto functional and organized tissue. The logic of this approach is that if cells can attach to a scaffold which mimic the natural extracellular matrix (ECM) and guides the cell adhesion, larger tissues can be formed.

In vivo cell behavior is guided by a variety of external cues and signals including ions, soluble growth factors, ECM components and the physical properties of the environment. Depending on the type of these signals, cells may undergo either cell-specific attachment to the ECM, proliferation, differentiation, and final tissue regeneration, or cell apoptosis.⁶ Thus, the properties of the scaffold has to be engineered to elicit specific cellular responses upon signaling and direct new tissue formation mediated by specific interactions.⁸ Indeed, the structural design and surface decoration with signaling motifs are critical steps in the fabrication of a scaffold that can imitate native ECM. However, in general the contact between biological media and an artificial material commonly starts with protein adsorption.⁹⁻¹² Various amino acid residues on the peptide backbone can mediate adsorption of proteins via hydrogen bonds, ionic, and other polar or hydrophobic interactions. This non-specific protein adsorption —protein fouling— is a complex and dynamic process, which irreversibly affects the surface of most (bio)materials.¹³⁻¹⁵ This ubiquitous problem can mask the bioactive molecules previously immobilized on the material surface, thus promoting non-specific cell adhesion, which will lead to loss of control over the behavior and fate of the cells. Moreover, protein fouling induces a series of adverse effects, such as the inflammatory response, complement, and platelet activation, which may lead to thrombus formation and facilitates the attachment of nosocomial pathogens.¹⁶⁻¹⁸ Prevention of fouling of surfaces that come into contact with bodily fluids/tissues is of critical importance for

the development of biocompatible and fully functional scaffolds for tissue engineering in order to gain control over cell functions by eliminating of all unwanted, uncontrollable, non-specific interaction of material surface with surrounding milieu and deliver specific signals and biological cues to guide cell behavior in the direction to restoration of tissues. Thus it is imperative to develop new strategies to prepare scaffold that prevent fouling (Figure 1).

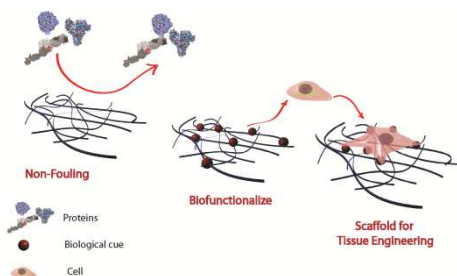


Figure 1. Fabrication of antifouling biofunctionalized scaffold for tissue engineering.

2. Goals of the thesis

In light of challenges for fabrication of functional scaffolds for tissue engineering, the main objective of my Thesis was to fabricate scaffold for tissue engineering resistant to protein fouling from complex biological media, *i.e.* antifouling. It is envisioned that such an antifouling scaffold will become a starting platform for further functionalization with bioactive compounds for specific interaction of the scaffold within the physiological milieu.

The work has three main foci:

- The selection of monomers suitable for the preparation of antifouling scaffolds utilizing model system based on polymer brushes
- Preparation of antifouling hydrogels with different properties and architecture synthesized by copolymerization with zwitterionic carboxybetane monomers
- Modification of nanofibers with selected antifouling polymer brushes

3. Summary of Results

3.1. Selection of monomers

In order to select the monomers suitable for the preparation of antifouling scaffolds for tissue engineering, a model system based on polymer brushes was utilized, which allowed the study of resistance to protein fouling by one of the most sensitive technique, SPR spectroscopy.

Polymer brushes based on hydrophilic electroneutral monomers, such as 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA), oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (MeOEGMA), and oligo(ethylene glycol) methacrylate (HOEGMA) as well as zwitterionic monomers, such as sulfobetaine methacrylate (SBMA), phosphorylcholine methacrylate (PCMA), carboxybetaine methacrylate (CBAA), and carboxybetaine methacrylamide (CBMAA) grown from self-assembled monolayers of initiator on gold or silicon surfaces were synthesized by surface initiated atom radical polymerization (SI-ATRP) (Figure 2, A) and fully characterized.

The resistance to protein fouling from buffered solution of human serum albumin (HSA) and fibrinogen (Fbg) and from undiluted blood plasma was evaluated (Figure 2, B). All the brushes tested, fully resisted the fouling from HSA, the most abundant plasma protein. Analogously, all brushes except for PCMA completely prevented Fbg adsorption. While most brushes readily resist the adsorption from model solution of buffered proteins, undiluted blood plasma (BP) posed a much higher challenge. The highly hydrophilic brushes based on poly(PCMA) and poly(SBMA) were not able to resist the fouling from undiluted BP, leading to protein deposits on poly(PCMA). Poly(MeOEGMA), poly(HOEGMA) and poly(HEMA) displayed very low fouling corresponding to a $18 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, $20 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, and $26 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectively. This correspond to a decrease in fouling of about 90 – 95% compared to bare gold. (Figure 2, B).

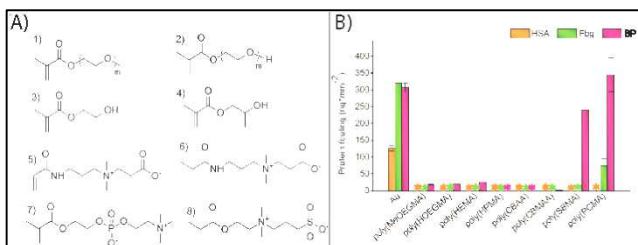


Figure 2. (A) Chemical structures of monomers utilized for synthesis of the polymer brushes, where (1) MeOEGMA; (2) HOEGMA; (3) HEMA; (4) HPMA; (5) CBAA; (6) CBMAA; (7) PCMA, and (8) SBMA.(B)

Fouling from undiluted BP, HSA- and Fbg-buffered solution. An asterisk represents a value of protein adsorption below the detection limit of SPR (0.2 ng/cm²).

Poly(CBMAA) brushes showed remarkable 99% reduction in protein fouling in comparison with bare gold (Figure 2). It is noteworthy, that only brushes based poly(CBAA) and poly(HPMA) brushes were able to reach undetectable levels of protein fouling from undiluted BP.

Based on the knowledge gained from these study, the monomers showing the best resistance to non-specific protein adsorption such as MeOEGMA, HOEGMA, HPMA, CBAA and CBMAA were selected for the further preparation and/or modification of the scaffold for tissue engineering presented in this thesis.

3.2. Non-fouling Poly(HEMA-co-CB(M)AA) Hydrogels

Poly(HEMA) hydrogels are very attractive for tissue engineering due to their hydrophilic character, excellent mechanical properties, and low level of immunogenicity.¹⁹⁻²¹ However, the use of poly(HEMA) hydrogels is limited by a moderate wettability, which is lower than that of most natural tissues.³ In order to improve hydration and resistance to protein fouling, hydrogels based on HEMA and different concentration of zwitterionic carboxybetaine comonomers (CBAA and CBMAA) were synthesized and characterized. Even small additions (1 – 5%) of carboxybetaine monomers led to a very high increase in the EWC without impairing the mechanical properties, while addition of 10 mol% led to hydrogels binding approximately 4 times more water than pure poly(HEMA) (Figure 3).

The protein fouling was evaluated by incubation of hydrogels in blood plasma and evaluated by FTIR-ATR (Figure 4). All hydrogels showed an unprecedented reduction of fouling from blood plasma; in particular, hydrogels with 5 mol% of CBAA or CBMAA reduced the fouling by 70% and 65% and remarkably, no fouling from blood plasma could be detected when the content of CBAA was 10 mol%(Figure 4).

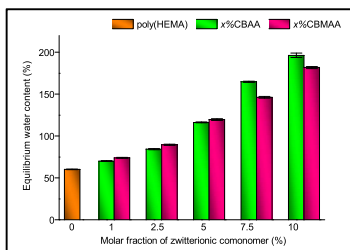


Figure 3 EWC of poly(HEMA), poly(HEMA-co-CBAA), and poly(HEMA-co-CBMAA) with different molar ratios of carboxybetaines.

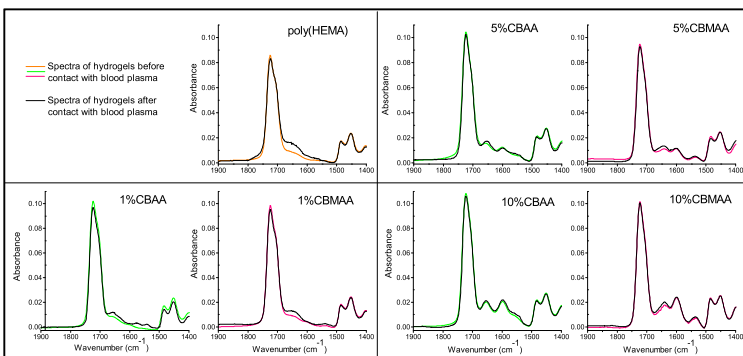


Figure 4. FTIR-ATR spectra (amide region) of poly(HEMA) (orange line), poly(HEMA-co-CBAA) (green line), and poly(HEMA-co-CBMAA) (pink line) before and after (black line) 3 h contact with BP

3.3. Self-healing Poly(HEMA-co-CBMAA) Nanocomposite Hydrogels with Superior Mechanical Properties

Hydrogel possessing the ability to self-heal and to withstand a high degree of deformations are very attractive for tissue engineering, because they can mimic tissues of living organisms which are able to heal and re-shape after external stimuli. In order to achieve this, physically crosslinked poly(HEMA-co-CBMAA) nanocomposite hydrogels were synthesized and characterized. The cross-linking via Laponite nanoparticles (LNs) endowed the hydrogels with self-healing properties (Figure 5, A), excellent mechanical resistance and very high elongation at break (Figure 5, B), and an extremely high water uptake capacity. A wide range of properties, such as a degree of swelling from 5 to 300, elongation at break from 150 to 1800%, and Young's modulus from 4 to 80 kPa, are accessible and can therefore be easily tuned by variation of concentration of CBMAA or LNs.

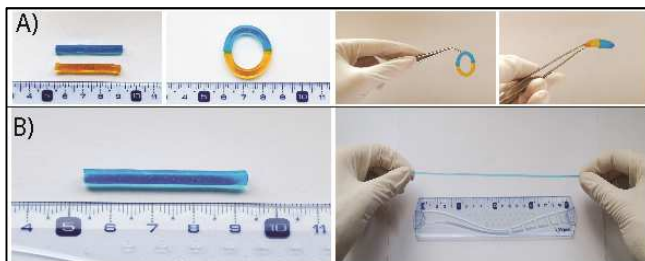


Figure 5. (A) Self-healing and (B) Elongation of hydrogels contained 10 mol% of CBMAA and 3 wt% of LNs.

The addition of CBMAA endowed to hydrogels antifouling character. The non-specific protein adsorption from a 10% fetal bovine serum (FBS) solution was evaluated by UV-Vis spectroscopy. The addition of only 5 mol% of CBMAA comonomer led to a dramatic reduction of protein fouling up to 70 %, while further increases in the ratio of CBMAA up to 20 mol% resulted in a 95% decrease of fouling.

3.4. Biodegradable Zwitterionic Scaffolds with Gyroid Pore Architecture

Architecture

All biological tissues and organs possess specific chemical and physical properties, as well as precise geometrical shape and microarchitecture of pores and topographical features. One of the most important and primary aspects of tissue engineering is to fabricate 3D scaffolds of various shapes and structures in order to mimic native tissues.

In this study I utilized one of the most developed computer-aided rapid prototyping technique for construction of complex three-dimensional scaffolds –stereolithography– for the preparation of scaffolds with precisely designed gyroid pore architecture. The hydrogels were prepared by a mixture of a biodegradable terpolymer MA-PDLLA-PEG-PDLLA-MA and CBMAA. The addition of CBMAA comonomer endowed to hydrogels a dramatically increase in EWC reaching unprecedented level of 700% for 20% of CBMAA (Figure 6).

To show the ability to functionalize the interior of the pores of the hydrogels we utilized a fluorescently labelled protein and visualize the immobilization with laser scanning confocal microscopy (LSCM).

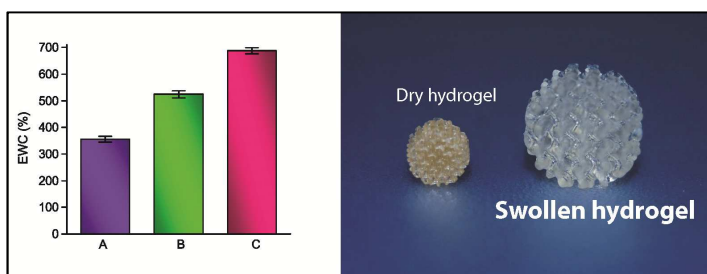


Figure 6. Equilibrium water content (EWC) of hydrogels (A) 0%CBMAA, (B) 10%CBMAA, and (C) 20%CBMAA, defined as the ratio between the mass of absorbed water after reaching the equilibrium and the mass of dried hydrogels (left). The photograph shows dry and swollen hydrogel of 10%CBMAA (right).

Bovine serum albumin labelled with fluorescein isothiocyanate (BSA-FITC) was chosen as a model protein for the biofunctionalization of the surface of hydrogels. To prove the absence of non-specific protein adsorption the prepared hydrogels were incubated in a solution of BSA-FITC for 14 h and subsequently analyzed by LSCM (Figure 7, A-C). No fluorescence was observed during the scanning of all hydrogels with 488 nm laser for excitation of FITC proving the absence of non-specific albumin adsorption on hydrogels.

The biofunctionalization of hydrogels containing CBMAA was performed by amidation of BSA-FITC on the carboxylic groups of CBMAA monomeric units previously activated with EDC/sulfoNHS (Figure 7, D-F). No BSA immobilization was observed on the hydrogel without CBMAA (Figure 7, D). Addition of CBMAA resulted in material possessing functionalizable carboxyl groups, which were utilized for BSA-FITC immobilization. Figure 7E and F demonstrate the successful immobilization on the hydrogels containing 10% and 20% of CBMAA. Figure 7G represents a three dimensional reconstruction of 20 confocal scans of 10%CBMAA hydrogel, proving the homogeneity of immobilized BSA-FITC within hydrogel pore surface.

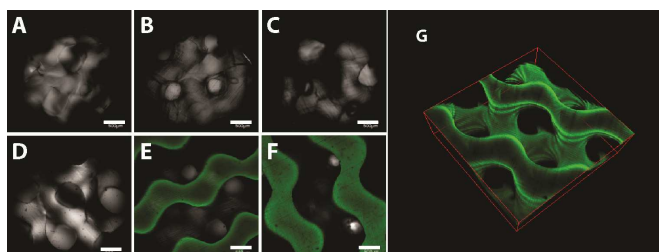


Figure 7. Confocal images D, E and F of the 0%CBMAA, 10%CBMAA and 20%CBMAA hydrogels, respectively, after immobilization of BSA-FITC via EDC/sulfoNHS chemistry. Confocal images A, B and C represent blank experiments for 0%CBMAA, 10%CBMAA and 20%CBMAA hydrogels, respectively, *i.e.* hydrogels were in contact with solution of BSA-FITC without functionalization by EDC/sulfoNHS. Image G represent 3D reconstruction of 20 confocal scans of 10%CBMAA hydrogels with immobilized BSA-FITC.

3.5. Modification of Nanofibers with Non-fouling Polymer Brushes

As mentioned in previous chapters, a highly interconnected porosity and (bio)degradability are very important characteristics for scaffolds for tissue engineering. Among them electrospun poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanofibers have gained wide recognition due to the combination of their intrinsic properties such as high porosity, large surface area, and presence of fibril structures enabling them to mimic the morphology of native extracellular matrix (ECM).²² However, their extensive use is limited. Upon

contact with biological fluids, the surface of PCL is rapidly coated by proteins, inducing a series of adverse effects.

A new route to modify the surface of the PCL nanofibers to prevent non-specific interactions by growing antifouling polymer brushes by SI-ATRP was introduced. To provide functional groups for immobilization of SI-ATRP initiator, a biomimetic PDA layer was deposited on surface of the PCL nanofibers. Selected antifouling polymer brushes based on MeOEGMA, HOEGMA, HPMA, and CBAA were grown from initiators covalently bonded to an ad-layer of poly(dopamine) (PDA). The PDA layer perfectly matched the morphology of the bare fibers and the polymerization was confined to the surface of the nanofibers, increasing their diameter however the morphology of the individual fibers and the highly interpenetrating porous structure of the mesh were preserved (Figure 8).

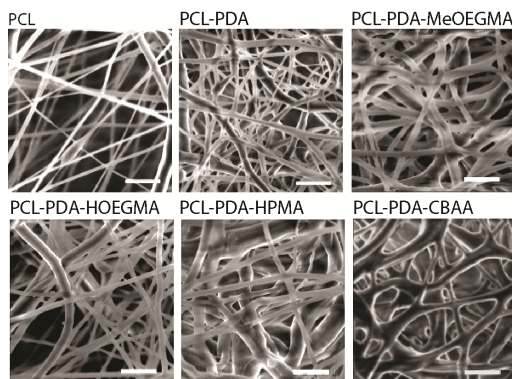


Figure 8. SEM images of nanofibers after each step of modification. Images were acquired at 20.0 kx magnification. Scale bar equals 2 μm .

The success of the passivation of the nanofiber by the brushes was assessed by seeding mouse embryonic fibroblasts (MEFs) on PCL, PCL-PDA, and the nanofibers bearing the selected polymer brushes. The nanofibers were incubated with MEF cells for 7 and 24 h at 37° C, cultivated in cell culture medium with 10% v/v FBS, to probe the cell adhesion behavior. Fibroblast rapidly adhered to pristine PCL and PDA-coated nanofibers, showing that adhered cells were well spread, elongated along the fibers, and connected to them via cell-matrix interactions (Figure 9 and 10). On the other hand, cell adhesion was greatly suppressed on all of the fibers modified with antifouling brushes. The behavior of MEFs on PCL nanofibers modified with polymer brushes was in sharp contrast to pristine PCL and PDA-PCL. Cells did not show any adhesion to the nanofibers modified with antifouling polymer brushes after 7 h, proving that the polymer brushes minimize the cell-surface interactions. Only after 24 h

some fibroblasts were detected among the modified nanofibers (Figure 9). However, closer examination (Figure 10) shows that the fibroblasts did not adhere to the nanofibers but rather stuck to each other. The fibroblasts acquired a roundish shape, organizing themselves in non-spread cell clusters that were only entrapped among the modified nanofibers.

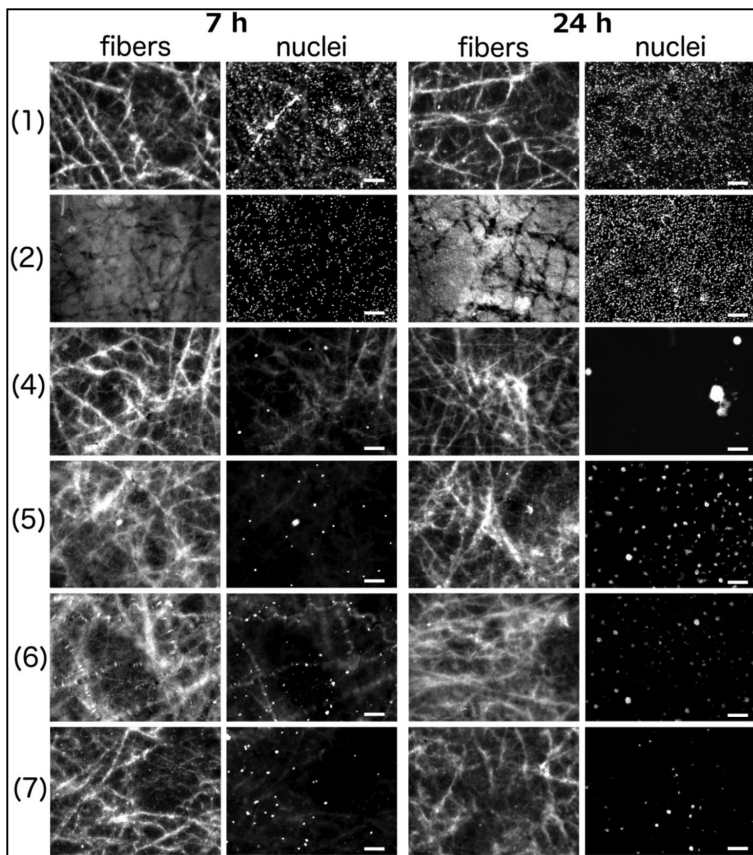


Figure 9. Cell adhesion on (1) PCL, (2) PCL-PDA, (4) PCL-PDA-poly(MeOEGMA), (5) PCL-PDA-poly(HOEGMA), (6) PCL-PDA-poly(HPMA), and (7) PCL-PDA-poly(CBAA) nanofibers after 7 and 24 h (scale bar 200 μ m). Fibers are visualized by their autofluorescence after excitation at 488 nm, cell nuclei by staining with DAPI and 405nm excitation. It should be noted that low number of cells on nanofibers with polymer brushes (4–7) required higher excitation energy to visualize them. Therefore, in some cases the autofluorescence of the fibers is visible in the 405nm channel.

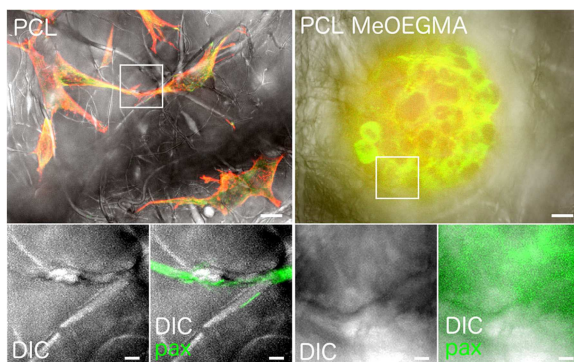


Figure 10. ApoTome optical sections of a 3D image stack at high magnification for cells on PCL and PCL-PDA-poly(MeOEGMA) nanofibers after 24 h. An overview (upper row) shows that the cells adapt their shape to PCL but not to PCL-PDA-MeOEGMA nanofibers. Actin (red) indicates cell shape, paxillin (green) cell–matrix adhesions (CMAs) while nanofibers are shown in grayscale. Zoom in of the white boxes (lower row) show clear colocalization for paxillin (green) and PCL (grayscale) but not for paxillin and PCL-PDA-MeOEGMA (grayscale). Scale bars equal 10mm in first upper row and 2mm—in lower row

4. Conclusions

The main objective of this Thesis was to develop the methods of fabrication of scaffolds for tissue engineering resistant to protein fouling. Prevention of fouling on the surface of the materials that come into contact with bodily fluids/tissues is of utmost importance in order to gain control over cell functions by eliminating all unwanted, uncontrolled, non-specific interactions of the material surface with the surrounding fluids and providing specific signals to the cells to guide their behavior in the direction of tissue regeneration. To achieve this, the work was developed in three steps, (i) the selection of monomers leading to antifouling properties; (ii) preparation of antifouling hydrogels by copolymerization with zwitterionic carboxybetaine monomers; and (iii) modification of nanofibers with selected polymer brushes resistant to protein fouling.

In order to tackle the first step, a model system based on polymer brushes was utilized. Polymer brushes based on eight different monomers were synthesized, fully characterized, and the fouling from solution of HSA, Fbg, as well as from undiluted blood plasma was assessed by SPR. The monomers MeOEGMA, HOEGMA, HPMA, CBAA and CBMAA showed the best resistance to protein fouling and were selected for the further preparation and/or modification of the scaffold for tissue engineering.

Striving to improve the resistance to protein fouling and hydration of the scaffolds based on poly(HEMA), hydrogels of different compositions were synthesized by copolymerization of HEMA with zwitterionic

carboxybetaine (meth)acrylamide (CBAA or CBMAA). These hydrogels showed unprecedented improvement of hydration (up to 30000%), mechanical properties (elongation up to 1800%), abilities to self-heal, and remarkable reduction of protein fouling from complex biological media, such as blood plasma and fetal bovine serum.

To provide control over the precise shape and internal porous architecture of the scaffold, stereolithography was utilized to prepare hydrogels with a finely designed gyroid pore structure based on a biodegradable macromer (MA-PDLLA-PEG-PDLLA-MA) and zwitterionic CBMAA. All hydrogels showed high hydration and antifouling character. The covalent immobilization of protein on the surface of the hydrogels utilizing the carboxylic groups of the CBMAA comonomer was successful and homogeneous across the pores of the hydrogels.

Finally, in order to prevent protein fouling from biological fluids and subsequent cell adhesion, a new approach to modify the surface of PCL nanofibers by growing antifouling polymer brushes by SI-ATRP was introduced. To provide functional groups for the immobilization of SI-ATRP initiator, a biomimetic PDA layer was deposited onto the surface of the PCL nanofibers. Four types of selected antifouling polymer brushes were grown from the surface of nanofibers without impairing the fibrous structure and interconnectivity of the pores. The resistance to non-specific cell adhesion was evaluated by challenging the fibers with fibroblasts. Cells rapidly adhered and spread on pristine PCL and PDA-coated nanofibers forming cell-matrix interactions mediated by a pre-adsorbed layer of proteins from culture media. However, all nanofibers modified with antifouling polymer brushes were able to prevent non-specific protein adsorption and thereby fully suppress cell adhesion.

The materials presented in this Thesis show significant improvements in terms of resistance to protein fouling and non-specific cell adhesion. These scaffolds have high potential to be used as a platform for further functionalization with bioactive compounds for specific cell-matrix communication. The methods applied for the preparation of antifouling scaffolds are universal and can be extended to different types of materials in order to achieve specific properties for the scaffolds.

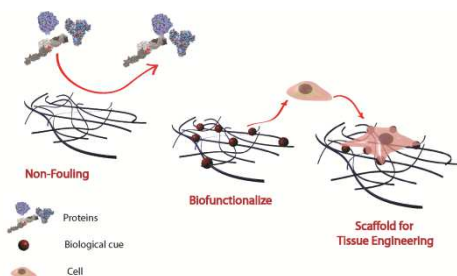
1. Úvod

Milióny pacientů se ztracenými, poraněnými nebo poškozenými orgány a tkáněmi trpí týdny, měsíce nebo dokonce roky při čekání na vhodného dárce pro transplantaci. Transplantace tkání a orgánů od dárce (mrtvého či živého), přestože jsou často úspěšné a zachraňují mnoho životů, mají vážná omezení. Hlavním problémem transplantací je nedostatek dárců v příslušných registrech.^[1] Kromě toho, i u těch pacientů, kteří se podrobili úspěšné transplantaci, existuje vysoké riziko, že jejich imunitní systém bude identifikovat orgán jako cizí a pokusí se jej zničit, s následkem odmítnutí transplantátu.

Tkáňové inženýrství představuje potenciální řešení zvýšené potřeby tkání a orgánů pro transplantaci, a to svým zaměřením na tvorbu nových tkání a obnovu jejich funkce.^[2-5] Strategie tkáňového inženýrství typicky spočívají ve vhodné kombinaci tří základních prvků, kterými jsou: (I) buňky, (II) scaffoldy připravené na míru, a (III) specifické signály podporující tkáňovou regeneraci a integraci konstruktů na funkční a organizované tkáni. Logika tohoto přístupu spočívá v tom, že pokud se buňky mohou připojit ke scaffoldu, který napodobuje přirozenou extracelulární matrix (ECM) a řídí adhezi buněk, může být vytvořena větší tkáň.

In vivo chování buňky je řízeno řadou vnějších podnětů a signálů, zahrnujících ionty, rozpustné růstové faktory, komponenty ECM a fyzikální vlastnosti okolí. V závislosti na typu signálu buňky mohou podstoupit buď buněčnou specifickou vazbu na ECM, proliferaci, diferenciaci, a regeneraci konečné tkáně, anebo buněčnou apoptózu.^[6, 7] To znamená, že vlastnosti scaffoldu, musí být navrženy tak, aby specifická buněčná odpověď na signalizaci a přímá tvorba nové tkáně byla zprostředkována specifickými interakcemi.^[8] Ve skutečnosti, struktura materiálu a jeho povrchová úprava včetně zavedení signálních motivů jsou kritické body při výrobě scaffoldů, které pak mohou imitovat nativní ECM. Avšak obecně, interakce mezi biologickými médii a syntetickými materiály je obvykle zprostředkována adsorpcí proteinu, kterou začíná.^[9-12] Různé aminokyselinové zbytky na řetězci peptidu mohou vést k sorpci proteinů pomocí vodíkových vazeb, elektrostatických a dalších polárních nebo hydrofobních interakcí. Tato nesespecifická absorpce bílkovin je komplexní a dynamický proces, který nevratně ovlivňuje povrchy většiny (bio) materiálů.^[13-15] Jedná se o všudypřítomný problém, nesespecifická sorpce proteinů může maskovat bioaktivní molekuly dříve cileně imobilizované na povrchu materiálu a vede tak k nesespecifické adhezi buněk, což znamená ztrátu kontroly nad chováním a osudem buněk. Navíc, proteinové znečištění vyvolává celou řadu nežádoucích účinků, jako jsou například zánětlivé reakce komplementu, a aktivace destiček, což může vést k tvorbě trombů, a usnadňuje ataku patogenů způsobujících nozokomiální nákazy.^[16-18] Prevence povrchů, které

přicházejí do kontaktu s tělesnými tekutinami a/nebo tkáněmi, před nespecifickou adsorpcí proteinů má rozhodující význam pro vývoj biokompatibilního a plně funkčního scaffoldu pro tkáňové inženýrství. Cílem je získat kontrolu nad buněčnými funkcemi tím, že se odstraní veškeré nežádoucí, nekontrolovatelné, nespecifické interakce povrchu materiálu a okolních tělesných prostředí. Tak nebudou maskovány specifické signály a biologické podněty ke směrování chování buněk směrem k obnově tkání. Proto je nezbytné vyvinout nové strategie pro přípravu scaffoldů, aby se zabránilo nespecifické interakci buněk (obrázek 1).



Obrázek 1. Příprava biofunkcionalizovaných scaffoldů pro tkáňové inženýrství odolných proti nespecifické sorpci proteinů

2. Cíle disertace

Z úhlu pohledu zadání přípravy funkčního scaffoldu pro tkáňové inženýrství, bylo hlavním cílem mé práce vyrobit scaffold odolný proti nespecifické sorpci bílkovin z komplexních biologických médií, tj. „antifouling“ scaffold. Předpokládá se, že takový „antifouling“ scaffold se stane výchozí základnou, na které bude probíhat další funkcionalizace bioaktivními látkami pro specifické interakce scaffoldu ve fyziologickém prostředí.

Práce je zaměřena na tři hlavní směry:

- Výběr monomerů vhodných pro přípravu „antifouling“ scaffoldů s využitím modelového systému, založeném na polymerních kartáčích (polymer brushes).

- Příprava „antifouling“ hydrogelů s různými vlastnostmi a architekturou syntetizovaných kopolymerů s zwiteriontovými monomery carboxybetainu

- Modifikace nanovláken vybranými „antifouling“ polymerními kartáči

3. Výsledky a diskuse

3.1. Výběr monomerů

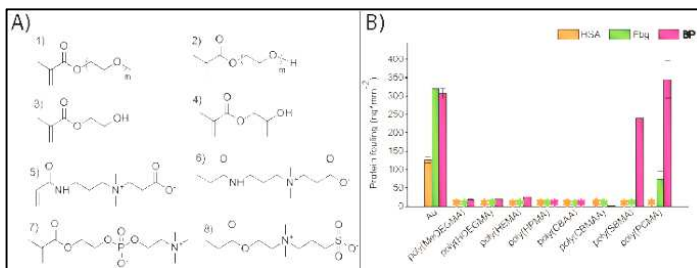
Pro výběr monomerů vhodných pro přípravu „antifouling“ scaffoldů pro tkáňové inženýrství, byl použit modelový systém založený na polymerních kartáčích, což umožnilo studium odolnosti vůči nespecifické sorpci proteinů jednou z nejcitlivějších technik, SPR spektroskopii.

Byly syntetizovány polymerní kartáče na bázi hydrofilních monomerů, elektroneutrálních, jako je například 2-hydroxyethylmethakrylát (HEMA), *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamid (HPMA), oligo (ethylenglykol) methylether methakrylát (MeOEGMA) a oligo (ethylenglykol) methakrylát (HOEGMA), stejně jako na bázi zwitteriontových monomerů, jako je například sulfobetain methakrylát (SBMA), fosforylcholin methakrylát (PCMA), karboxybetain methakrylát (CBMA), a karboxybetain methakrylamid (CBMAA) (obrázek 2, A). Syntéza kartáčů rostoucích z monovrstvy iniciátoru na zlatém nebo na křemíkovém povrchu byla zahájena povrchově iniciovanou atom-radikálovou polymerizací (SI-ATRP) a plně charakterizována.

Připravené vzorky byly hodnoceny z hlediska odolnosti proti nespecifické adsorpci proteinů z pufovaného roztoku lidského sérového albuminu (HSA) a fibrinogenu (FBG), a z neředěné krevní plazmy (obrázek 2, B). Všechny testované kartáče zcela bránily před adsorpcí z HSA, nejhojnější bílkoviny obsažené v plazmě. Analogicky, všechny kartáče, s výjimkou PCMA, zcela zabránily adsorpci FBG. Zatímco většina kartáčů snadno odolala adsorpci z modelových roztoků pufovaných bílkovin, neředěná krevní plazma (BP) představuje mnohem vyšší výzvu. Vysoce hydrofilní kartáče na bázi poly(PCMA) a poly(SBMA) nebyly schopny odolat adsorpci z neředěné BP, což vede k bílkovinným usazeninám na poly(PCMA). Poly (MeOEGMA), poly (HOEGMA) a poly (HEMA) vykazují velmi nízkou adsorpci, odpovídající $18 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, $20 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, respektive $26 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. To odpovídá poklesu v adsorpci asi 90-95% ve srovnání se zlatem (obrázek 2, B).

Poly(CBMAA) kartáče vykazovaly pozoruhodné snížení 99% v nespecifické adsorpci proteinů ve srovnání s čistým zlatem (obrázek 2, B). Je zajímavé, že pouze kartáče na bázi poly(CBAA) a poly(HPMA) byly schopné dosáhnout nedetekovatelné hladiny adsorpci z neředěné BP.

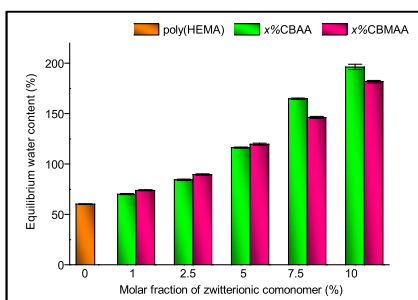
Na základě znalostí získaných z této studie byly vybrány pro další přípravu a/nebo modifikaci scaffoldů pro tkáňové inženýrství ty monomery, které vykazovaly nejlepší odolnost vůči nespecifické adsorpci proteinů, jako je MeOEGMA, HOEGMA, HPMA, CBAA a CBMAA a jsou dále prezentovány v této práci.



Obrázek 2. (A) Chemické struktury monomerů použitých pro syntézu polymerních kartáčů, kde (1) MeOEGMA; (2) HOEGMA; (3) HEMA; (4) HPMA; (5) CBAA; (6) CBMAA; (7) PCMA a (8) SBMA. (B) Absorpce z nefeděné krevní plazmy (BP), a puřovaných roztoků lidského sérového albuminu (HSA) a fibrinogenu (Fbg). Hvězdička představuje hodnoty proteinové adsorpce nižší než je hranice detekovatelnosti SPR (0.2 ng·cm⁻²).

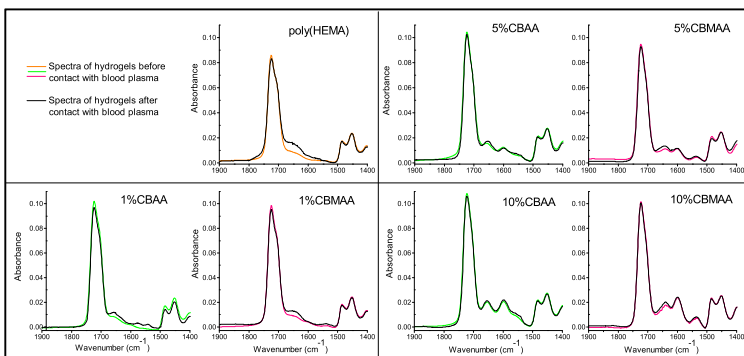
3.2. Hydrogely poly(HEMA-co-CB(M)AA) odolávající nespecifickým adsorcím protein

Poly(HEMA) hydrogely, jsou pro tkáňové inženýrství velmi atraktivní vzhledem k jejich hydrofilnímu charakteru, vynikajícím mechanickým vlastnostem, a nízké úrovni imunogenicity.^[19-21] Nicméně, použití poly(HEMA) hydrogelů je omezeno nízkými hodnotami smáčivosti, které jsou nižší než u většiny přírodních tkání.^[3] Aby se zlepšila hydratace a odolnost proti nespecifické adsorpci proteinů, byly syntetizovány a charakterizovány hydrogely na bázi HEMA s různou koncentrací zwitteriontových komonomerů karboxybetainu (CBAA a CBMAA). Dokonce i malé přídavky (1-5%) monomerů karboxybetainu vedly k velmi vysokému zvýšení rovnovážného obsahu vody bez zhoršení mechanických vlastností, zatímco přidání 10 mol%, vedlo k hydrogelům vázajícím přibližně 4 krát větší množství vody, než čistý poly(HEMA) (obrázek 3).



Obrázek 3. Rovnovážený obsah vody poly(HEMA), poly(HEMA-co-CBAA) a poly(HEMA-co-CBMAA) s různým molárním poměrem carboxybetainů.

Nespecifická adsorpce proteinů byla hodnocena inkubací hydrogelů v krevní plazmě a vyhodnocena pomocí FTIR-ATR (obrázek 4). Všechny hydrogely vykázaly bezprecedentní snížení adsorpce z krevní plazmy; zejména hydrogely s 5 mol% CBAA nebo CBMAA snížily adsorpci o 70% a 65% a pozoruhodně, žádné nečistoty z krevní plazmy nebyly detekovány, když obsah CBAA byl 10 mol% (obrázek 4).



Obrázek 4. FTIR-ATR spektra (amidická oblast) poly(HEMA) (oranžová čára), poly(HEMA-co-CBAA) (zelená čára) a poly(HEMA-co-CBMAA) (růžová čára) před a po (černá čára) kontaktu s krevní plazmou.

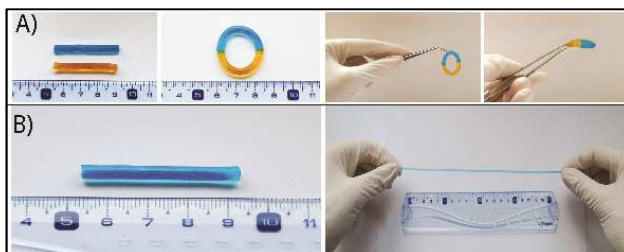
3.3. Nanokompozitní hydrogely poly(HEMA-co-CBMAA) se schopností regenerace a s výbornými mechanickými vlastnostmi

Hydrogely mající schopnost automaticky se regenerovat v případě poškození a zároveň vydržet vysoký stupeň deformace jsou pro tkáňové inženýrství velmi atraktivní, protože mohou napodobovat tkáň živých organismů, které jsou schopné regenerovat svůj tvar i integritu na základě vnějších podnětů.

Pro dosažení toho byly syntetizovány fyzikálními vazbami síťované nanokompozitní hydrogely poly(HEMA-co-CBMAA) a následně charakterizovány. Síťování pomocí Laponitových nanočástic (LNs) vneslo do těchto hydrogelů schopnost regenerace (obrázek 5, A) vynikající mechanickou odolnost a velmi vysoké hodnoty tažnosti (obrázek 5, B), při extrémně vysoké absorpční kapacitě pro vodu. Bylo dosaženo širokého rozsahu vlastností, jako je stupeň nabobtnání od 5 do 300, tažnost (prodloužení při přetržení) od 150 do 1800%, a Youngův modul od 4 do 80 kPa. Potřebné výsledné vlastnosti lze tedy naladit v relativně širokém rozsahu a i jejich vhodné kombinace lze dosáhnout změnou koncentrací CBMAA nebo LNS.

Přidání CBMAA vneslo do struktury hydrogelů „antifouling“ charakter. Nespecifická adsorpce proteinů z 10% roztoku fetálního hovězího

séra (FBS) byla hodnocena pomocí UV-Vis spektroskopie. Přidání pouhých 5 mol% CBMAA komonomeru vedlo k dramatickému snížení adsorpce proteinů, až k 70%. Další zvýšení poměru CBMAA až na 20 mol%, vedla k 95% snížení adsorbce.

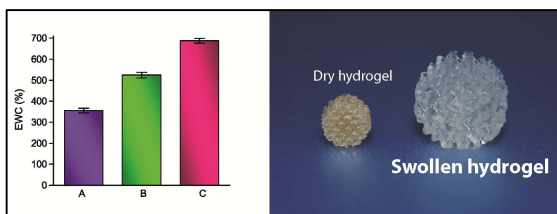


Obrázek 5. (A) Schopnost regenerace a (B) tažnost hydrogelů obsahujících 10 mol% CBMAA a 3 mol% LNs.

3.4. Biodegradovatelné zwitterionové nosiče s gyroidovou architekturou pórů

Všechny biologické tkáně a orgány mají konkrétní chemické a fyzikální vlastnosti, stejně jako přesný geometrický tvar, mikroarchitekturu pórů a jiné topografické rysy. Jedním z nejdůležitějších a primárních aspektů tkáňového inženýrství je vyrobit 3D scaffoldy různých tvarů a struktury k napodobení živých tkání.

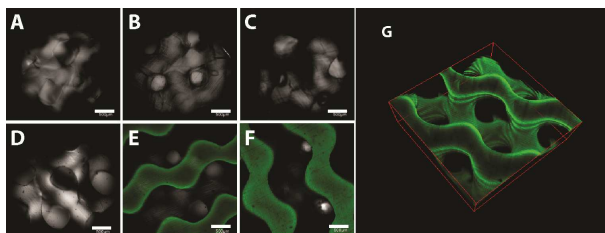
V této studii jsem použila stereolitografii, jednu z nejvyvinutějších počítačem podporovaných technik „rapid prototyping“ pro výstavbu složitých trojrozměrných scaffoldů. Pomocí ní jsem připravila scaffoldy s přesně navrženou gyroidovou architekturou pórů. Hydrogely byly připraveny ze směsi biologicky odbouratelného terpolymeru MA-PDLLA-PEG-PDLLA-MA a CBMAA. Přídavek CBMAA komonomeru do hydrogelů dramaticky zvyšuje rovnovážný obsah vody na bezprecedentní úroveň až 700% při 20% obsahu CBMAA (obrázek 6).



Obrázek 6. Rovnovážný obsah vody (EWC) hydrogelů (A) 0%CBMAA, (B) 10%CBMAA and (C) 20%CBMAA, definovaný jako poměr mezi hmotností absorbované vody po dosažení rovnováhy a hmotností vysušeného gelu. (Vlevo). Fotografie vpravo ukazuje suchý a nabobtnalý hydrogel s 10% CBMAA.

Pro zobrazení schopnosti funkcionalizace vnitřních stěn pórů hydrogelu byl použit fluorescenčně značený protein, přičemž vizualizace jeho imobilizace byla provedena pomocí laserové konfokální mikroskopie (LSCM). Hovězí sérový albumin značený fluorescein-isothiokyanátem (FITC-BSA) byl zvolen jako modelový protein pro biofunkcionalizaci povrchu hydrogelů. Abychom dokázali, že nedošlo k nespecifickému adsorpčním proteinů, byly připravené hydrogely inkubovány v roztoku BSA-FITC po dobu 14 hodin a následně analyzovány LSCM (obrázek 7, A-C). Žádná fluorescence nebyla v průběhu skenování hydrogelů pozorována (laser 488 nm).

Biofunkcionalizace hydrogelů obsahujících CBMAA byla provedena amidací BSA-FITC na karboxylových skupinách monomerních jednotek CBMAA aktivovaných s EDC/sulfoNHS (obrázek 7, D-F). Žádná imobilizace BSA nebyla sledována na hydrogelu bez CBMAA (obrázek 7, D). Přidání CBMAA poskytlo materiál, který ve struktuře svých řetězců nese karboxylové skupiny schopné funkcionalizace. Ty byly následně využity pro BSA-FITC imobilizaci. Obrázky 7E a F ukazují úspěšnou imobilizaci na hydrogelech s obsahem 10% a 20% CBMAA. Obrázek 7G znázorňuje trojrozměrnou rekonstrukci 20 konfokálních skenů hydrogelu s 10% CBMAA, prokazující homogenitu imobilizovaného BSA-FITC na povrchu stěn pórů uvnitř hydrogelu.

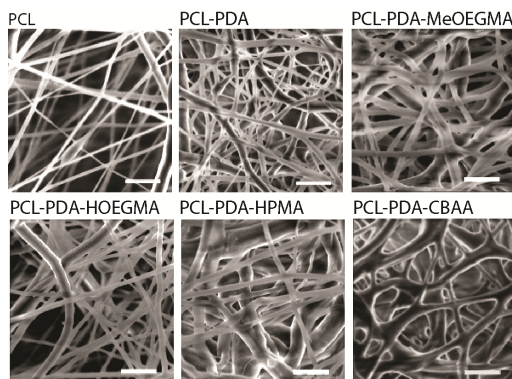


Obrázek 7. Vizualizace z konfokálního mikroskopu D, E, F znázorňují hydrogely s 0%, 10% a 20% CBMAA, a to po imobilizaci BSA-FITC pomocí EDC/sulfoNHS chemie. Konfokální zobrazení A, B, a C reprezentují srovnávací pokus opět pro hydrogely s 0%, 10% a 20% CBMAA, tj. hydrogely byly v kontaktu s roztokem BSA-FITC bez funkcionalizace pomocí EDC/sulfoNHS. Zobrazení G ukazuje 3D rekonstrukci 20 konfokálních skenů hydrogelů s 10% CBMAA s imobilizovaným BSA-FITC.

3.5. Modifikace nanovláken polymerními kartáči odolávajícími nespecifickým adsorpčním protein

Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, vysoký stupeň porozity, vzájemně propojené komunikující póry a biodegradovatelnost, jsou velmi důležité vlastnosti scaffoldů pro tkáňové inženýrství. V rámci těchto požadavků si získala široké uznání nanovlákná připravená elektrospinningem

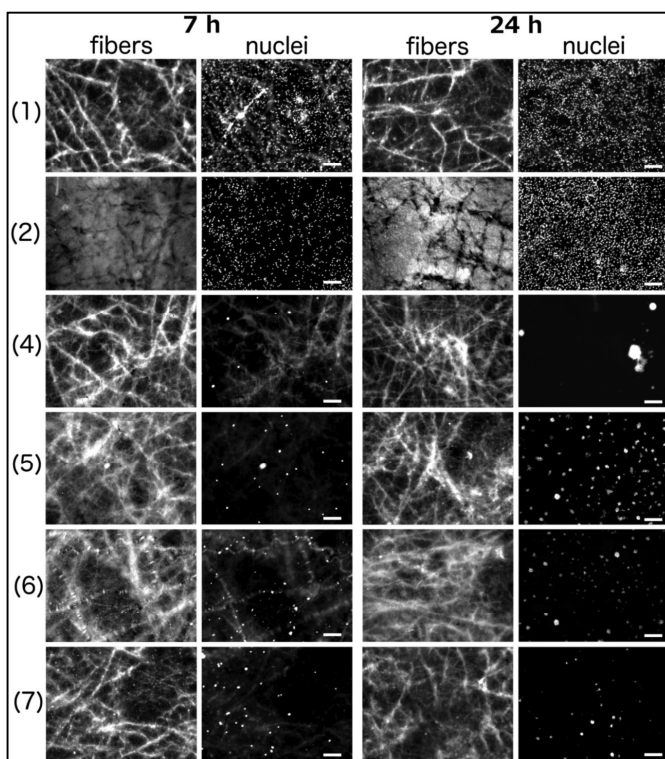
z poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL). Tato nanovláknna získala široké uznání v důsledku kombinace svých přirozených vlastností, jako je vysoká porozita, velký měrný povrch a přítomnost vláknenných struktur, které jim umožňují napodobovat morfologii nativní extracelulární matrix (ECM).^[22] Nicméně, rozšíření jejich použití je omezeno. Při styku s biologickými tekutinami, se povrch PCL rychle potáhne proteiny, navozujícími řadu nežádoucích účinků. Aby se zabránilo nespecifické interakci, byla navržena nová cesta k úpravě povrchu PCL nanovláken pomocí rostoucích „antifouling“ polymerních kartáčů, připravených SI-ATRP polymerizací. Pro zajištění funkční skupiny pro imobilizaci SI-ATRP iniciátoru, byla biomimetická PDA vrstva nanosená na povrch PCL nanovláken. Vybrané „antifouling“ polymerní kartáče na bázi MeOEGMA, HOEGMA, HPMA a CBAA vyrůstaly z iniciátorů kovalentně vázány k adhezivní vrstvě poly(dopaminu) (PDA). PDA vrstva dokonale přizpůsobí morfologii samotných vláken a polymerizace byla omezena pouze na jejich povrch, což zvyšuje jejich průměr, nicméně morfologie jednotlivých vláken a vysoký počet komunikujících pórů byly zachovány (obrázek 8).



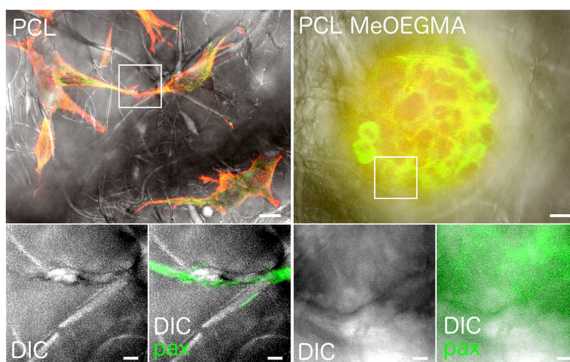
Obrázek 8. SEM zobrazení nanovláken po jednotlivých krocích modifikace. Obrázky jsou uvedeny ve dvacetinásobném zvětšení. Měřítka odpovídá 2 μ m.

Úspěch pasivace nanovláken pomocí polymerních kartáčů byl hodnocen naočkováním myších embryonálních fibroblastů (MEF), na samotná PCL nanovláknna, na PCL nanovláknna s nanosenou vrstvou PDA, a na nanovláknna nesoucí vybrané polymerní kartáče. Nanovláknna byla inkubována na 7 a 24 hodin s buňkami MEF při 37 ° C, pěstovaných v médiu pro buněčné kultury s 10% v/v FBS. Byla zkoumána buněčná adheze. Fibroblasty rychle adherovaly k nanovláknům z čistého PCL a PCL-PDA potaženým nanovláknům, což ukazuje, že adherované buňky jsou dobře rozprostřeny, protažené podél vláken, a jsou k nim připojeny interakcí buňka-matrix (obrázek 9 a 10). Na druhé straně, buněčné adheze byly velmi

potlačeny na všech vláken modifikovaných „antifouling“ kartáči. Interakce MEF s PCL nanovlákný modifikovanými polymerními kartáči byla v ostrém kontrastu s čistým PCL a PDA-PCL. Buňky neprokázaly žádnou přilnavost k nanovláknům modifikovaným „antifouling“ polymerními kartáči po 7 hodinách, což dokazuje, že se polymerní kartáče minimalizují povrchové buněčné interakce. Teprve po 24 hodinách byly některé fibroblasty zjištěny mezi modifikovanými nanovlákný (obrázek 9). Při bližším pohledu se však (obrázek 10) ukazuje, že se tyto fibroblasty nedrží nanovláken, ale spíše jsou přilepené k sobě navzájem. Fibroblasty získaly okrouhlý tvar, organizovaly se v ohraničených klastrech buněk, které byly zachycené pouze mezi modifikovanými nanovlákný.



Obrázek 9. Adheze buněk na (1) PCL, (2) PCL-PDA, (4) PCL-PDA-poly(MeOEGMA), (5) PCL-PDA-poly(HOEGMA), (6) PCL-PDA-poly(HPMA), a (7) PCL-PDA-poly(CBAA) nanovlákný, a to po 7 a 24 hodinách (měřítko 200 μm). Vlákný jsou zobrazena jejich autofluorescencí po excitaci při 488 nm, buněčná jádra barvením DAPI a po excitaci 405 nm. Je třeba poznamenat, že nízký počet buněk na nanovlákných s polymerními kartáči (4-7) vyžaduje vyšší excitaci energii na jejich vizualizaci. Z tohoto důvodu, je v některých případech vidět v 405 nm kanálu autofluorescence vláken.



Obrázek 10. ApoTome optické části 3D obraz při vysokém zvětšení pro buňky na PCL a PCL-PDA-poly(MeOEGMA) nanovláčkách po 24 hodinách. Přehled (horní řádek), ukazuje, že buňky přizpůsobí svůj tvar k PCL, ale ne k PCL-PDA-poly(MeOEGMA) nanovláčkám. Aktin (červená) indikuje tvar buňky, paxillin (zelená) interakce buňka-matrix (CMAs), zatímco nanovláčka jsou zobrazena ve stupních šedi. Přiblížení v bílých boxech (spodní řádek) ukazují jasnou ko-lokalizaci pro paxillin (zelená) a PCL (ve stupních šedi), ale ne pro paxillin a PCL-PDA-MeOEGMA (ve stupních šedi). Měřítka se rovná 10 μm v první horní řadě a 2 μm , v dolní řadě.

4. Závěr

Hlavním cílem této práce bylo vyvinout metody přípravy scaffoldů pro tkáňové inženýrství odolné proti nespecifické adsorpci proteinů. Prevence adsorpce na povrchu materiálů, které přicházejí do kontaktu s tělními tekutinami a/nebo tkáněmi, je nanejvýš důležitá, aby bylo možno získat kontrolu nad buněčnými funkcemi tím, že se odstraní veškeré nežádoucí, neřiditelné nespecifické interakce povrchu materiálu a okolních prostředí. Jedině tak lze nabídnout buňkám specifické signály a nasměrovat jejich chování ve směru k regeneraci tkání.

K dosažení tohoto cíle byly předem definovány tři základní postupy:

(I) výběr monomerů, které poskytují polymery odolné proti nespecifické sorpci proteinů, tj. mají „antifouling“ vlastnosti;

(II) příprava Antifouling hydrogelů kopolymerizací s zwitteriontovými karboxyethainovými monomery;

(III) modifikace nanovláken vybranými polymerními kartáči odolnými proti adhezi proteinů.

Pro řešení prvního bodu byl využit modelový systém založený na polymerních kartáčích.

Polymerní kartáče vycházející z osmi různých monomerů byly syntetizovány, zcela charakterizovány a adsorpce proteinů z roztoku HSA, FBG, jakož i z neředěné krevní plazmy byla hodnocena pomocí SPR. Monomery MeOEGMA, HOEGMA, HPMA, CBAA a CBMAA vykázaly

nejlepší odolnost vůči adsorpci proteinů zanášení a byly vybrány pro další přípravu a/nebo úpravu scaffoldů pro tkáňové inženýrství.

Ve snaze zlepšit odolnost proti adhezi proteinů a zvýšit hydrataci scaffoldů na bázi poly (HEMA), byly připraveny hydrogely o různém složení, připravené kopolymerizací HEMA s obojetnými (zwitterionic) ionty (meth)akrylamidu karboxybetainu (CBAA nebo CBMAA). Tyto hydrogely ukázaly bezprecedentní zlepšení hydratace (až 30000%), mechanických vlastností (tažnost až 1800%), schopnost regenerace a značného poklesu adsorpce proteinů z komplexních biologických médií, například krevní plazmy a fetálního hovězího séra.

Pro zajištění kontroly nad přesným tvarem a vnitřní architekturou porézních scaffoldů byla použita stereolithografie k přípravě hydrogelů s dokonalým designem gyroidové struktury pórů založené na biodegradovatelných makromonomerech (MA-PDLLA-PEG-PDLLA-MA) a zwitteriontovém CBMAA. Všechny hydrogely vykazovaly vysokou hydrataci a odolnost proti nespecifické sorpci proteinů. Kovalentní imobilizace proteinu na povrchu hydrogelů s využitím karboxylové skupiny CBMAA komonomeru byla úspěšná a homogenní napříč porézní strukturou hydrogelu.

Konečně, aby se zabránilo adsorpci proteinů z biologických tekutin a následné buněčné adhezi, byl zaveden nový přístup k úpravě povrchu PCL nanovláken zavedením „antifouling“ polymerních kartáčů pomocí techniky SI-ATRP. Pro zajištění funkční skupiny pro imobilizaci SI-ATRP iniciátoru byla na povrch PCL nanovláken uložena biomimetická PDA. Čtyři druhy vybraných „antifouling“ polymerních kartáčů byly pěstovány z povrchu nanovláken bez změny porézní nanovlákně struktury a zhoršení vzájemné komunikace těchto pórů. Odolnost proti nespecifické buněčné adhezi byla hodnocena tím, v kontaktu vláken s fibroblasty. Buňky se rychle adherovaly a rozprostřely na čistých PCL nanovlákněch i nanovlákněch potažených PDA, které vytvářely interakce buňka-matrice zprostředkované předem adsorbovanou vrstvou proteinů z kultivačního média. Za to všechna nanovlákně modifikovaná „antifouling“ polymerními kartáči byla schopná zcela potlačit nespecifické adsorpce proteinů, a tím i buněčnou adhezi.

Materiály prezentované v této práci ukázaly výrazné zlepšení odolnosti vůči nespecifické adhezi proteinů a s tím související nespecifické buněčné adhezi. Připravené scaffoldy mají vysoký potenciál pro použití jako základ pro další funkcionalizaci bioaktivními látkami pro specifické buněčné adheze a kultivace buněk, stejně jako pro vytváření vhodných interakcí mezi buňkami a extracelulární matrix. Metody používané pro přípravu „antifouling“ scaffoldů jsou do určité míry univerzální a mohou být rozšířeny pro různé typy materiálů tak, aby bylo dosaženo specifických interakcí se scaffoldem.

5. References

1. B. Ekser, D. K. Cooper and A. J. Tector, *Int. J. Surg.*, 2015.
2. N. Huebsch and D. J. Mooney, *Nature*, 2009, **462**, 426-432.
3. B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini and N. A. Peppas, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 3307-3329.
4. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Third Edition*, Elsevier, Oxford, 2013.
5. N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini and R. Langer, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 1345-1360.
6. A. de Mel, G. Jell, M. M. Stevens and A. M. Seifalian, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2969-2979.
7. E. S. Place, J. H. George, C. K. Williams and M. M. Stevens, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 1139-1151.
8. H. Shin, S. Jo and A. G. Mikos, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4353-4364.
9. D. F. Williams, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5897-5909.
10. I. Banerjee, R. C. Pangule and R. S. Kane, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, 690-718.
11. E. Brynda, J. Drobník, J. Vacík and J. Kálal, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1978, **12**, 55-65.
12. V. Erwin A, *Biomaterials*, 2012, **33**, 1201-1237.
13. C. Rodriguez-Emmenegger, E. Brynda, T. Riedel, M. Houska, V. Subr, A. B. Alles, E. Hasan, J. E. Gautrot and W. T. Huck, *Macromol. Rapid Commun.*, 2011, **32**, 952-957.
14. T. Tischer, C. Rodriguez-Emmenegger, V. Trouillet, A. Welle, V. Schueler, J. O. Mueller, A. S. Goldmann, E. Brynda and C. Barner-Kowollik, *Adv. Mater.*, 2014, **26**, 4087-4092.
15. E. Brynda, N. A. Cepalova and M. Štol, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1984, **18**, 685-693.
16. C. Rodriguez-Emmenegger, S. Janel, A. de los Santos Pereira, M. Bruns and F. Lafont, *Polym. Chem.*, 2015, **6**, 5740-5751.
17. F. Surman, T. Riedel, M. Bruns, N. Y. Kostina, Z. Sedláková and C. Rodriguez-Emmenegger, *Macromol. Biosci.*, 2015, **15**, 636-646.
18. C. Blaszykowski, S. Sheikh and M. Thompson, *Trends Biotechnol.*, 2014, **32**, 61-62.
19. O. Wichterle and D. Lim, *Nature*, 1960, **185**, 117-118.
20. P. Lesný, M. Příkladný, P. Jendelová, J. Michálek, J. Vacík and E. Syková, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2006, **17**, 829-833.
21. B. Rolando, *Hydrogels. Biological Properties And Applications*, Springer, 2009.
22. A. Arinstein and E. Zussman, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 2011, **49**, 691-707.

Nina Yurievna Kostina

Born: 22.05.1986, Puschino, Russian Federation.

Address: Heyrovskeho nam. 2, 16206, Prague, Czech Republic

Phone: (+420) 608236714

E-mail: kostina@imc.cas.cz, kostina.n2010@gmail.com

Education

10/2010 – to date **Ph.D. Studies**, Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. and Charles University, Faculty of Natural Sciences, Prague, Czech Republic.

10/2003-07/2009 **Chemical Engineer**, Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Department of Chemistry and Technology of Bioactive Compounds.

PROFESSIONAL EXPERIENCE

10/2010 – to date **Ph.D. student**, Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, under supervision of Dr. Jiří Michálek, *Thesis title: "Novel Avenues for the Preparation of Antifouling Scaffolds for Tissue Engineering"*.

04/2014 **Stay at Prof. Barner-Kowollik's group**, Karlsruhe Institute of Technology, Germany, *Photo-Triggered Functionalization of Hierarchically Structured Polymer Brushes*.

12/2013 **Stay at Prof. Grijpma's group**, University of Twente, Enschede, The Netherlands, *Non-fouling Biodegradable Scaffold with Gyroid Pore Architecture for Tissue Engineering*.

- 10/2011** - **Stay at Prof. Grijpma's group**, University of
11/2011 Twente, Enschede, The Netherlands, *Novel Antifouling Self-healing Poly(CBMAA-co-HEMA) Nanocomposite Hydrogels with Superior Mechanical Properties.*
- 10/2009** - **Postgraduate student**, in the frame of the
07/2010 UNESCO-IUPAC course in Polymer Science, Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Prague, Czech Republic.
- 01/2009** - **Diploma Student**, A.V. Topchiev Institute of
07/2009 Petrochemical Synthesis, Moscow, Russia, *Diploma thesis title "Synthesis and Properties of Modified Chitosan and its Complexes with DNA".*
- 07/2005** - **Research Assistant**, A.V. Topchiev Institute
02/2009 of Petrochemical Synthesis, Moscow, Russia in collaboration with chemical company "Corium Inc", Menlo Park, USA, *Transdermal Drug Delivery.*

LANGUAGES

Russian	Native
English	FCE, University of Cambridge
Spanish	Intermediate
Czech	Intermediate

PUBLICATION LIST OF NINA YURIEVNA KOSTINA

1. **Kostina, N. Yu.**; Blanquer S.; Pop-Georgievski, O., Höcherl, A.; Gripma, D. W.; Michálek, J.; Rodriguez-Emmenegger, C.: Non-fouling Biodegradable Scaffolds with Gyroid Pore Architecture for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2015, (under review).
2. Vorobii, M.; Pop-Georgievski, O.; de los Santos Pereira, A.; **Kostina, N. Yu.**; Jezorek, R.; Sedláková, Z.; Percec, V.; Rodriguez-Emmenegger, C.: Grafting of methacrylate polymers brushes by photoinduced SET-LRP. *Polymer Chemistry*, 2015, (under review).
3. **Kostina, N. Yu.**; Pop-Georgievski, O.; Bachmann, M.; Neykova, N.; Bruns, M.; Michálek, J.; Bastmeyer, M.; Rodriguez-Emmenegger, C.: Non-fouling biodegradable poly(caprolactone) nanofibers for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2015, (DOI: 10.1002/mabi.201500252)
4. Vorobii, M.; de los Santos Pereira, A.; Pop-Georgievski, O.; **Kostina, N. Yu.**; Rodriguez-Emmenegger, C.; Percec, V.: Synthesis of non-fouling poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] brushes by photoinduced SET-LRP. *Polymer Chemistry*, 2015, 6, 4210-4220. (Highlighted in the inner cover paper)
5. Abt, D.; Schmidt, B. V. K. J.; Pop-Georgievski, O.; Quick, A. S.; Danilov, D.; **Kostina, N. Yu.**; Bruns, M.; Wenzel, W.; Wegener, M.; Rodriguez-Emmenegger, C.; Barner-Kowollik, C.: Designing molecular printboards: A photolithographic platform for recodable surfaces. *Chemistry – A European Journal*, 2015, 21, 13186-13190.
6. de los Santos Pereira, A.; **Kostina, N. Yu.**; Bruns, M.; Rodriguez-Emmenegger, C.; Barner-Kowollik, C.: Photo-triggered functionalization of hierarchically structured brushes. *Langmuir*, 2015, 31(21), 5899-5907.

7. Surman, F.; Riedel, T.; Bruns, M.; **Kostina, N. Yu.**; Sedláková, Z.; Rodriguez-Emmenegger, C.: Polymer brushes interfacing blood as a route toward high performance blood contacting devices. *Macromolecular Biosciences*, 2015, 15(5), 636-646.
8. **Kostina, N. Yu.**; Sharifi, S.; de los Santos Pereira, A.; Michálek, J.; Grijpma, D. W.; Rodriguez-Emmenegger, C.: Novel antifouling self-healing poly(carboxybetaine methacrylamide-co-HEMA) nanocomposite hydrogels with superior mechanical properties. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1 (41), 5644-5650.
9. **Kostina, N. Yu.**; Rodriguez-Emmenegger, C.; Houska, M.; Brynda, E., Michalek, J.: Non-fouling hydrogels of 2-hydroxyethyl methacrylate and zwitterionic carboxybetaine (meth)acrylamides. *Biomacromolecules*, 2012, 13 (12), 4164-4170.
10. **Kostina, N.**; Gorshkova, M.; Izumrudov, V.: Water-soluble polyplexes of modified chitosan. *Polymer Science Series A*, 2011, 53, (10), 947-954.