

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Študijný program: Biologie

Študijný obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Júlia Pajorová**

**Adhézia, rast a diferenciácia kožných buniek na nanovláknenných  
polymérnych nosičoch**

**Adhesion, growth and differentiation of skin cells on nanofibrous  
polymer membranes**

**Diplomová práca**

**Školiteľ: Doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.**

**Praha 2015**

## ***Prohlášení***

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci „Adhézia, rast a diferenciácia kožných buniek na nanovlákných polymérnych nosičoch” zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14.8.2015

Bc. Júlia Pajorová .....

## *Pod'akovanie*

Rada by som poďakovala touto cestou svojej školiteľke Doc. MUDr. Lucii Bačákovej, CSc. z Fyziologického ústavu Akadémie vied ČR, bez ktorej by táto diplomová práca nemohla vzniknúť. Ďalej by som chcela menovite veľmi poďakovať Ing. Markéte Bačákovej, Mgr. Jane Musílkovej, CSc. a Mgr. Elene Fílovej, Ph.D. za ich odborné vedenie a ochotu pomôcť mi pri vypracovávaní tejto práce. Za prípravu nanovlákných membrán patrí veľká vďaka Ing. Denise Stránskej z firmy InStar Technologies a.s., Liberec, a ďalej za odbornú spoluprácu Ing. Margit Žaloudkovej, Ph.D. z Ústavu štruktúry a mechaniky hornín AV ČR. Za cenné rady, motiváciu a príjemnú spoluprácu patrí veľké poďakovanie celému vedeckému kolektívu Oddelenia biomateriálov a tkanivového inžinierstva Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i.

## ***Abstrakt***

Naša práca má prínos pre tkanivové inžinierstvo, a to hlavne v oblasti konštrukcie vhodnej náhrady pre regeneráciu kožných defektov. Zároveň prináša hodnotné poznatky pre základný výskum molekulárnych mechanizmov adhézie, proliferácie, fenotypovej maturácie buniek a kontroly správania buniek prostredníctvom extracelulárnej matrix (ECM), ktorú predstavuje synteticky vyrábaný nanovláknenný materiál. Nanovláknenná membrána z poly(laktid-koglykolidu) (PLGA) bola pripravovaná metódou zvlákňovania bez použitia injekčnej striekačky. Tieto membrány boli následne modifikované biomolekulami sprostredkujúcimi adhéziu buniek, ako je kolagén, fibronektín a fibrín, za účelom zvýšenia ich afinity pre bunky. Na týchto nanovláknenných membránach bola následne stanovená miera adhézie, rastu a diferenciácie keratinocytov línie HaCaT a ľudských dermálnych fibroblastov, tj. hlavných buniek nachádzajúcich sa v epidermis a dermis. Výsledky ukázali, že membrány modifikované fibrínovou vrstvou zlepšovali adhéziu a rast ľudských dermálnych fibroblastov, zatiaľ čo kolagén na povrchu materiálu stimuloval adhéziu a proliferáciu keratinocytov línie HaCaT. Fibrín navyše zlepšoval u fibroblastov produkciu kolagénu I, ktorý je hlavnou súčasťou ECM v prirodzenej koži. Fibronektín obecne zlepšoval adhéziu buniek na membránu. Na základe týchto výsledkov je možné považovať membránu z PLGA modifikovanú fibrínom alebo kolagénom za sľubné riešenie v oblasti konštrukcie trvalých kožných náhrad.

### **Kľúčové slová:**

nanovláknna, membrána z PLGA, fibrín, kolagén, modifikácia, fibroblasty, keratinocyty HaCaT

## ***Abstract***

Our study contributes to the tissue engineering, mainly to the construction of appropriate scaffolds for regeneration of damaged skin. Simultaneously, it brings valuable insights for basic research in the field of molecular mechanisms of adhesion, proliferation and phenotypic maturation of cells and the control of the cell behavior through the cell extracellular matrix (ECM), represented by synthetic nanofibrous material. Nanofibrous polylactic-co-glycolic acid (PLGA) membranes were prepared by needle-less electrospinning technology. These membranes were further modified with cell adhesion-mediating biomolecules, e.g. collagen, fibronectin and fibrin in order to increase their affinity to colonizing cells. Adhesion, growth and differentiation of keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts, i.e. major cell types of epidermis and dermis, were evaluated on these nanofibrous membranes. The results show that the membrane modification using fibrin structures improved adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts. The collagen structure on the surface of membranes improved the adhesion and proliferation of human HaCaT keratinocytes. Furthermore, fibrin structure stimulated fibroblasts to produce collagen, which is a major component of ECM in the natural skin dermis. Fibronectin enhanced cell attachment to the membranes. Therefore, we can conclude that nanofibrous PLGA membrane covered with protein layer, fibrin or collagen appear to be a promising solution for the construction of temporary skin tissue carriers.

### **Kay words:**

nanofibres, PLGA membrane, fibrin, collagen, modification, fibroblasts, keratinocytes HaCaT

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| <b>Zoznam skratiek</b> .....   | 8  |
| <b>1. Úvod</b> .....   | 10 |
| <i>Literárny prehľad</i> .....   | 11 |
| <b>2. Úvod do tkanivového inžinierstva</b> .....                                 | 11 |
| <b>3. Interakcie buniek s materiálom</b> .....                                   | 13 |
| <b>4. Fyzikálne a chemické povrchové vlastnosti materiálu</b> .....              | 15 |
| 4.1. Elektrický náboj a vodivosť.....  | 15 |
| 4.2. Zmäčavosť, rigidita a flexibilita.....                                      | 16 |
| 4.3. Drsnosť a topografia.....   | 18 |
| <b>5. Fyzikálne a chemické modifikácie materiálov</b> .....                      | 21 |
| 5.1. Fyzikálne modifikácie.....  | 21 |
| 5.2. Chemické modifikácie.....   | 22 |
| <b>6. Anatómia a fyziológia kože</b> .....                                       | 23 |
| 6.1. Keratinocyty.....   | 25 |
| 6.2. Fibroblasty.....  | 26 |
| 6.3. Kolagén.....  | 27 |
| <b>7. Kožné náhrady</b> .....  | 28 |
| 7.1. Biologické materiály.....   | 29 |
| 7.2. Syntetické materiály.....   | 29 |
| <b>8. Nanotechnológia</b> .....  | 30 |
| 8.1. Kopolymér polymliečnej a polyglykolovej kyseliny (PLGA).....                | 30 |
| <b>9. Ciele diplomovej práce</b> .....   | 32 |
| <i>Experimentálna časť</i> .....   | 33 |
| <b>10. Materiál a metódy</b> .....   | 33 |
| 10.1. Výroba nanovlákných membrán.....   | 33 |
| 10.2. Stanovenie vlastností nanovlákných membrán.....                            | 33 |
| 10.3. Príprava vzoriek z nanovláknenej membrány z PLGA.....                      | 34 |
| 10.4. Kolagénové vrstvy na PLGA.....   | 34 |
| 10.5. Fibrínové vrstvy na PLGA.....  | 35 |
| 10.6. Pridávanie fibronektínu k vrstvám.....                                     | 35 |
| 10.7. Kultivácia buniek na nanovláknenej membráne z PLGA.....                    | 35 |
| 10.8. Morfológia kolagénových a fibrínových vrstiev s fibronektínom na PLGA..... | 36 |
| 10.9. Proliferácia buniek na nanovlákných membránach z PLGA.....                 | 36 |
| 10.10. Adhézia a morfológia buniek na nanovlákných membránach z PLGA.....        | 37 |
| 10.11. Viabilita buniek na nanovlákných membránach z PLGA.....                   | 38 |

|   |           |
|---|-----------|
| 10.12. Stanovenie produkcie kolagénu I fibroblastami.....                         | 39        |
| 10.12.1. Imunofluorescenčné farbenie kolagénu I.....                              | 39        |
| 10.12.2. Stanovenie proteosyntézy kolagénu I.....                                 | 40        |
| 10.12.3. Stanovenie relatívnej expresie génu pre kolagén I.....                   | 41        |
| 10.13. Štatistika.....  | 42        |
| <b>11. Výsledky.....</b>  | <b>43</b> |
| 11.1. Štruktúra nanovlákennej membrány z PLGA.....                                | 43        |
| 11.2. Morfológia fibrínových a kolagénových vrstiev na membráne z PLGA.....       | 44        |
| 11.3. Morfológia fibroblastov na modifikovanej membráne z PLGA.....               | 45        |
| 11.4. Adhézia, proliferácia a metabolická aktivita fibroblastov na membráne.....  | 48        |
| 11.5. Viabilita fibroblastov na membráne z PLGA.....                              | 51        |
| 11.6. Adhézia, proliferácia a metabolická aktivita keratinocytov na membráne..... | 52        |
| 11.7. Viabilita keratinocytov línie HaCaT na membráne z PLGA.....                 | 56        |
| 11.8. Produkcia kolagénu I ľudskými dermálnymi fibroblastami.....                 | 57        |
| <b>12. Diskusia.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>13. Záver.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>14. Zoznam literatúry.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>15. Prílohy.....</b>   | <b>79</b> |

## Zoznam skratiek

|        |   |
|--------|---|
| AA     | Trisodná soľ 2-fosfo-L-kyseliny askorbovej (z angl. Ascorbic acid)                            |
| BFP    | Bifunkcionálne fúzne proteíny (Bifunctional fusion protein)                                   |
| COL1A1 | Ludský kolagén (z angl. Collagen1A1)  |
| Ct     | Prahový cyklus (z angl. Threshold cycle)  |
| DMEM   | Eaglovo médium modifikované Dalbeccom (Dulbecco's modified Eagle's medium)                    |
| ECM    | Extracelulárna matrix (Extracellular matrix)  |
| EGF    | Epidermálny rastový faktor (z angl. Epidermal growth factor)                                  |
| ETD    | Everhart-Thornleyov detektor (Everhart-Thornley detector)                                     |
| EthD-1 | Etídiá homodimer-1 (Ethidium homodimer-1)   |
| F      | Fibronektín   |
| FBS    | Fetálne hovädzie sérum (z angl. Fetal bovine serum)   |
| FGF    | Rastový faktor fibroblastov (z angl. Fibroblast growth factor)                                |
| GAPDH  | Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)               |
| HaCaT  | Línia ľudských keratinocytov (z angl. Human keratinocyte cell line)                           |
| HUVECs | Ľudské endotelové bunky z pupočníkových ciev (z angl. Human umbilical vein endothelial cells) |
| IFN    | Interferón  |
| IL     | Interleukín   |
| K      | Keratín   |
| KGF    | Rastový faktor keratinocytov (z angl. Keratinocyte Growth Factor)                             |
| MMPs   | Proteázy ECM (z angl. Matrix metalloproteinase)   |
| PBS    | Fosfátový tlmivý roztok (z angl. Fhosphate-buffered saline)                                   |
| PCL    | Poly( $\epsilon$ -kaprolaktón) (Poly( $\epsilon$ caprolactone))                               |
| PDLLA  | Poly(L,D-laktid) (z angl. Poly(L,D-lactic acid)   |
| PE     | Polyetylén  |



|          |   |
|----------|---|
| PEG      | Polyetylén glykol   |
| PEO      | Polyetylén oxid   |
| PET      | Polyetyléntereftalát  |
| PGA      | Polyglykolová kyselina / Poly(glykolid) (z angl. Polyglycolic acid)                                   |
| PLA      | Polymliečna kyselina / Poly(laktid) (z angl. Polylactic acid)   |
| PLGA     | Polymliečna a polyglyková kyseliny / Poly(laktid-ko-glykolid) (z angl. Poly(lactic-co-glycolic) acid) |
| PLGC     | Poly(laktid-ko-glykolid-kaprolakton) (Poly(lactic-co-glycolic-caprolactone))                          |
| PLLA     | Poly(L-mliečna) kyselina / poly(L-laktid) (z angl. Poly(L-lactic) acid)                               |
| PP       | Polypropylén  |
| PS       | Polystyrén  |
| PTFE     | Polytetrafluoretylén  |
| PU       | Polyuretán  |
| RT-PCR   | Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (z angl. Real-time polymerase chain reaction)             |
| S.E.M.   | Štandardná odchýlka priemeru (z angl. Standard error of the mean)                                     |
| SAMs     | Samovoľne sa tvoriace monovrstvy (z angl. Self-assembled monolayers)                                  |
| SD       | Smerodajná odchýlka (z angl. Standard deviation)  |
| SEM      | Skenovacia elektrónová mikroskopia (Scanning electron microscopy)                                     |
| TEABr    | Tetraetylamónium-boromid (Tetraethylammonium bromide)   |
| TGF      | Transformujúci rastový faktor (z angl. Transforming growth factor)                                    |
| TNF      | Tumor nekrotizujúci faktor (z angl. Tumor necrosis factor)  |
| TRIS-HCl | Ťmivý roztok Trizma® hydrochlorid (Trizma® hydrochloride buffer)                                      |
| TRITC    | Tetrametylrodamín (Tetramethylrhodamine)  |
| UDG      | Uracil-DNA glykoziláza (Uracil-DNA glycosylase)   |
| VC       | Vitamín C   |
| VSMC     | Bunky hladkého svalstva ciev (z angl. Vascular smooth muscle cells)                                   |

## 1. Úvod

Súčasný rýchly a nezdravý životný štýl prináša so sebou zvýšené riziko tvorby závažných ochorení, ako je napríklad rakovina, cukrovka, ateroskleróza, osteoporóza či rozsiahle poškodenia kože. Moderná medicína neustále vytvára nové lieky pre liečbu symptómov a pre zlepšovanie kvality života. Avšak v niektorých prípadoch je nevyhnutné ireverzibilne poškodené tkanivo nahradiť autológnymi alebo umelými náhradami. Na základe toho sa mnohé laboratória tkanivového inžinierstva po celom svete neustále snažia vyvíjať nové materiály, testovať ich a vyrábať z nich funkčné tkanivové náhrady.

Tkanivové inžinierstvo je multidisciplinárny odbor, ktorého hlavnou myšlienkou je, vytvorenie biokompatibilnej náhrady, ktorá by vo veľkej miere obnovovala, udržovala alebo zlepšovala funkcie poškodeného tkaniva alebo celého orgánu. Za účelom nahradenia poškodeného tkaniva sa v súčasnosti bežne robia transplantácie tkanív. Transplantované tkanivo môže pochádzať buď od samotného pacienta (autológne), alebo od ľudského (alógenne) či zvieracieho (xenogénne) darcu. Avšak v oboch prípadoch nastáva množstvo komplikácií, či už s nedostatkom vhodného tkaniva alebo s nežiaducimi imunitnými reakciami. Riešením týchto problémov je vytvorenie tkanivovej náhrady, ktorá by bola telu čo najviac prirodzená, tj. nepôsobila by cytotoxicky alebo genotoxicky, nespôsobovala by imunitné reakcie a zároveň by bola lacná a dostupná vo veľkom množstve.

V súčasnej dobe sa v rámci kožného tkanivového inžinierstva klinicky používajú takzvané dočasné krty kožných poranení, ktoré napomáhajú pri hojení a zaceľovaní rán, avšak po čase sa musia odstrániť (poly HEMA) (Dvorankova B a kol., 1996). Novým perspektívnym prístupom je však snaha o vytvorenie biodegradabilného nosiča, ktorý by mohol niesť autológne bunky pacienta. Nosič by bol vplyvom organizmu postupne resorbovaný a nahradený novým tkanivom. Pre tieto účely sa v poslednej dobe testujú hlavne nanovláknenné membrány vytvorené z degradabilných polymérov, ktoré svojou nanoštruktúrou dobre simulujú funkcie prirodzenej extracelulárnej matrix (ECM) a vytvára sa tak vhodné prostredie pre adhéziu, rast a diferenciáciu kožných buniek. Táto práca sa preto zameriava na vývoj novej kožnej náhrady z nanovláknenného kopolymérneho materiálu, ktorý je pre zvýšenie adhézie a proliferácie kožných buniek modifikovaný biomolekulami bežne prítomnými v organizme, tj. kolagénom, fibrínom a fibronektínom.

## ***Literárny prehľad***

### **2. Úvod do tkanivového inžinierstva**

V roku 1993, Langer a Vacanti definovali tkanivové inžinierstvo ako medziodborovú disciplínu, ktorá aplikuje princípy inžinierstva do biologických poznatkov za účelom vývoja biologických náhrad, ktoré obnovujú, udržujú alebo zlepšujú funkcie tkaniva (Langer R a Vacanti JP, 1993). Tkanivové inžinierstvo navrhuje nové materiály, ktoré môžu byť čisto biologické, čiastočne umelé alebo umelé a slúžia ako nosiče pre bunky s cieľom nahradiť poškodené tkanivá a orgány.

Množstvo úrazov a ochorení má za následok stratu časti tkaniva alebo zlyhanie celého orgánu. Riešením sú transplantácie, ktoré sa do klinickej praxe zaviedli už v 60-tych rokoch 20. storočia (BaoLin G a Ma PX, 2014). V súčasnej dobe sa bežne používajú tkanivá získané od samotného pacienta (autológne transplantácie), alebo tkanivá pochádzajúce od ľudského či zvieracieho darcu (alogénne a xenogénne transplantácie). V oboch prípadoch však nastáva množstvo problémov. U autológnych tkanív môže byť limitujúcim faktorom nedostatok vhodného tkaniva pre transplantáciu, zatiaľ čo tkanivá od darcov môžu spôsobovať nežiaduce imunitné reakcie, ktoré môžu viesť až k odhojeniu tkaniva či celého orgánu (Bacakova L a kol., 2004). Aby sa predišlo týmto komplikáciám, sú v súčasnosti zhotovované biokompatibilné umelé náhrady so špecifickými vlastnosťami vhodnými pre nahradenie funkcie pôvodného tkaniva. Biokompatibilita materiálu je schopnosť simulovať mechanické a iné vlastnosti pôvodného tkaniva bez toxických, imunogenných alebo mutagénnych účinkov na bunky a tkanivá, a preto je považovaná za rozhodujúcu vlastnosť umelých materiálov určených pre tkanivové náhrady (Bacakova L a Svorcik V, 2008).

V súčasnosti sú umelé materiály vo veľkej miere používané pre výrobu náhrad kostí, ciev, medzistavcových platničiek, kĺbov, šošoviek, zubov, kože atď. Často sa uplatňujú vo výrobe pomôcok v klinickej medicíne a základnom biologickom výskume (katétre, biosenzory a nádoby na kultiváciu buniek).

Biomateriály môžu byť navrhované ako bioinertné alebo bioaktívne. Bioinertné materiály z hľadiska interakcie bunka - materiál nepodporujú adsorpciu molekúl, hlavne proteínov, a adhéziu buniek. Tento typ materiálu sa používa v prípadoch, kedy je nevyhnutné predchádzať nežiaducim imunitným reakciám, tvorbám krvných zrazenín a iným interakciám medzi umelým

materiálom a okolitým prostredím (Bacakova L *a kol.*, 2004). V medicínskej praxi je bioinertný materiál bežne používaný pre zhotovenie umelých očných šošoviek (Kirchhof S *a kol.*, 2015), hlavíc a jamiek kĺbových protéz (Friesenbichler J *a kol.*, 2014), cievnych protéz (Thottappillil N a Nair PD, 2015), srdcových chlopní (Vaesken A *a kol.*, 2015), katétrov pre hemodialýzu (Johansson K *a kol.*, 2013) alebo nosičov pre cieleň transport liečiv (Guo L *a kol.*, 2015; Dwivedi P *a kol.*, 2015). Bioaktívne materiály na rozdiel od bioinertných nie sú iba pasívne tolerované bunkami. Naopak podporujú kolonizáciu materiálu bunkami, tj. aktívne regulujú adhéziu, migráciu, proliferáciu a diferenciáciu buniek (Larranaga A *a kol.*, 2015), sekréciu molekúl bunkami a tiež viabilitu a programovanú smrť buniek. Vďaka týmto vlastnostiam môžu bioaktívne materiály napodobňovať funkcie ECM v tkanive a tým kontrolovať správanie buniek (Bacakova L a Svorcik V, 2008).

Bioaktívne materiály môžu byť konštruované ako dvojrozmerné štruktúry (2D), tj. povrchy osídlené bunkami, napr. kožné náhrady vytvorené z polymérnych nosičov, ktoré sú následne osídlené vrstvou fibroblastov alebo keratinocytov (Revi D *a kol.*, 2014), alebo cievne náhrady kolonizované endotelovými bunkami (Al Kayal T *a kol.*, 2015). V súčasnosti je však bežnejšia výroba trojrozmerných nosičov (3D), ktoré môžu byť v podmienkach *in vitro* kolonizované bunkami pacienta na povrchu i vo vnútri a následne implantované do pacienta za účelom nahradenia poškodeného tkaniva kostí, ciev, chrupaviek alebo dokonca celého orgánu, ako sú obličky, črevo alebo pečeň (Loh QL a Choong C, 2013; Dorati R *a kol.*, 2014). Najnovšia veľmi sľubná metóda pre výrobu náhrad je tzv. bioprinting. Jeho cieľom je vytvorenie plnofunkčnej trojrozmernej náhrady pozostávajúcej čisto z biologického materiálu, tj. buniek a biomolekúl ECM (fibrín, kolagén) ideálne v podmienkach *in vivo*. Aj keď tato metóda prináša nové možnosti pre tkanivové inžinierstvo, jej výskumu je ešte na začiatku (Michael S *a kol.*, 2013; Zhang X a Zhang Y, 2015).

Najčastejšie používané materiály sú niektoré kovy, uhlíkové kompozity, keramika a polymérne materiály, ako napríklad polystyrén (PS) (Sun T *a kol.*, 2005), polypropylén (PP) (Liu L *a kol.*, 2012), polyuretán (PU) (Kucinska-Lipka J *a kol.*, 2013), polyetylén (PE) (Ahn HH *a kol.*, 2014), polyetyléntereftalát (PET) (Jiang J *a kol.*, 2014) a polytetrafluoretylén (PTFE) (Siegel J *a kol.*, 2013). V poslednej dobe sa stali veľmi atraktívne pre tkanivové inžinierstvo tzv. biodegradabilné polyméry a to síce polymliečna kyselina (PLA), polyglykolová kyselina (PGA), poly( $\epsilon$ -kaprolaktón) (PCL), a ich vzájomne kopolyméry. Ich hlavnou výhodou je práve

biodegradabilita, ktorá umožňuje postupné odbúravanie polyméru z organizmu a jeho nahradzovanie plnohodnotným tkanivom. Ďalším trendom pre medicínske aplikácie sú nanovláknenné materiály, ktoré simulujú stavbu prirodzenej ECM, a preto sa perspektívne môžu používať na uľahčenie hojenia kožných defektov (BaoLin G a Ma PX, 2014).

### 3. Interakcie buniek s materiálom

Adhézia buniek na umelý materiál je sprostredkovaná proteínmi ECM, ktoré sú spontánne adsorbované na povrch materiálu z média v *in vitro* podmienkach a v podmienkach *in vivo* z krvi a iných tekutín v tele. Molekuly ECM sú tiež syntetizované a deponované na povrch materiálu samotnými bunkami. Medzi najdôležitejšie molekuly pomáhajúce bunkám prichytiť sa k povrchu patria kolagén, laminín, elastín, fibronektín, vitronektín, fibrinogén a vláknitý fibrín. Tieto adhézne molekuly navyše významne ovplyvňujú správanie jednotlivých buniek, ako je napríklad rozprestretie, migrácia, proliferácia, viabilita, metabolická aktivita a diferenciácia. Proteíny ECM sa na povrch materiálu viažu slabými chemickými väzbami, ako sú Van der Waalsové sily, elektrostatické interakcie a vodíkové mostíky (Bacakova L a kol., 2004; Bacakova L a Svorcik V, 2008).

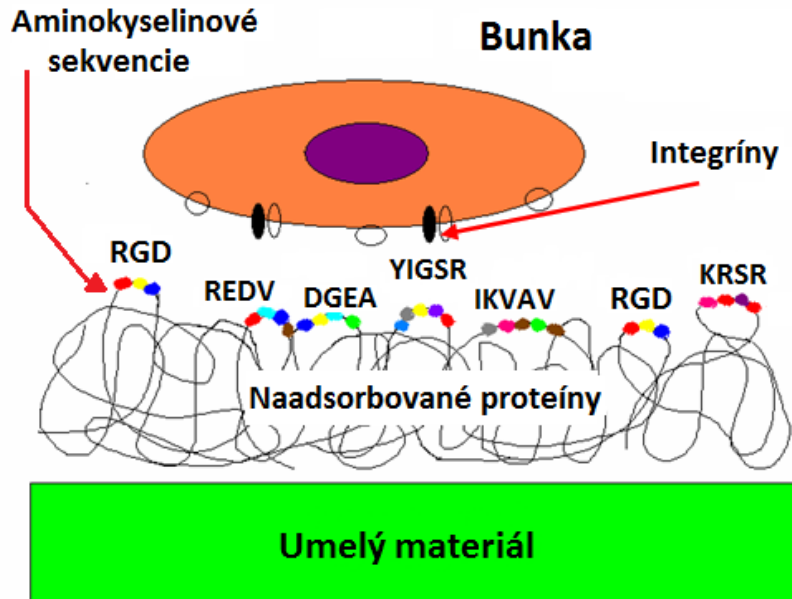
Pre adhéziu buniek na povrch s naviazanými molekulami ECM sú dôležité špecifické aminokyselinové sekvencie, ktoré bunky rozpoznávajú pomocou svojich adhézných receptorov. Tieto sekvencie sú väčšinou typické pre určité molekuly ECM alebo sú rozpoznávané špecifickými bunkami. Najobecnejšie oligopeptidy Arg-Gly-Asp (RGD) nachádzajúce sa na fibronektíne a Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA) prítomné na kolagéne nie sú špecifické pre konkrétne typy buniek (Ruoslahti E a Pierschbacher MD, 1987; Staatz WD a kol., 1991). Sekvencia Arg-Glu-Asp-Val (REDV), ktorá je tiež prítomná na fibronektíne, je preferovaná prevažne endotelovými bunkami (Humphries MJ a kol., 1986; Wang W a kol., 2014). Sekvencia Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV) je typická pre vitronektín a Val-Ala-Pro-Gly (VAPG) pre elastín a obe sú rozpoznávané prevažne bunkami hladkej svaloviny ciev (Mann BK a West JL, 2002; Gobin AS a West JL, 2003). Pre laminín sú typické sekvencie Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) a Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV), ktoré rozpoznávajú neuróny (Ranieri JP a kol., 1994) (Obr. 1).

Bunky sa viažu na molekuly ECM pomocou adhézných receptorov umiestených na membráne. Najlepšie popísaný adhézný receptor je integrínový receptor, transmembránový glykoproteín, ktorý v membráne vytvára heterodiméry pozostávajúce z jedného  $\alpha$  a jedného  $\beta$

reťazca. V súčasnej dobe je známych 18 typov  $\alpha$  reťazcov a 8 typov  $\beta$  reťazcov, avšak tento počet nie je konečný, pretože neustále dochádza k objavom nových typov týchto reťazcov. Kombináciou  $\alpha$  a  $\beta$  reťazca vzniká množstvo variácií integrínových receptorov, ktoré majú rôznu afinitu k proteínom ECM, resp. špecifickým aminokyselinovým sekvenciám (Campbell ID a Humphries MJ, 2011). Napríklad, pre väzbu bunky na RGD sekvenciu fibronektínu je potrebný  $\alpha_v\beta_3$  integrínový receptor (Xiong JP *a kol.*, 2002). Funkcia integrínových receptorov je závislá na iónoch vápnika, ktoré sa viažu na  $\alpha$  reťazec (Oxvig C a Springer TA, 1998). Adhézia buniek môže byť sprostredkovaná tiež receptormi proteoglykanovej povahy, tj. neintegrínovými receptormi viažucimi sa na aminokyselinové sekvencie proteínov ECM, alebo na ich sacharidové súčasti (Shin H *a kol.*, 2003; Bacakova L a Svorcik V, 2008). Práve dermálne keratinocyty sú bunky, ktoré tento spôsob väzby využívajú. Jeden z popisovaných typov neintegrínových receptorov keratinocytov je tzv. galektínový receptor patriaci do rodiny lektínov, ktoré viažu galaktozidy (Reno F *a kol.*, 2008).

Väzba ligandu na integrínový receptor spôsobí spojenie týchto receptorov a vytvorenie takzvaných fokálnych adhéznych plakov na špecifickom mieste bunečnej membrány (Grinnell F, 1986). V tomto mieste sa integrínové receptory viažu s množstvom štruktúrnych a signalizačných molekúl, ako sú paxilín, talín, vinkulín a fokálne adhézne kinázy. Tieto proteíny sú funkčne spojené s aktínom v bunke, ktorý prechádza celým vnútrom bunky a je asociovaný s bunečným jadrom a organelami v bunke. A preto signalizačná dráha založená na väzbe ligandu na integrínový receptor buniek môže ovplyvňovať expresiu génov a proteosyntézu, a tým cielene meniť správanie buniek, ako je rozprestretie, migrácia, viabilita, apoptóza, diferenciácia, proliferácia, transport a sekrécia molekúl (Truong T *a kol.*, 2015).

Zistilo sa že pre dobrú adhéziu buniek je potrebná adsorpcia molekúl ECM v dostatočnom množstve a v správnej konformácii. Správna konformácia umožňuje dobrú prístupnosť aktívnych väzbových miest molekúl ECM, na ktoré sa môžu bunky následne viazať s vyššou afinitou. Špecifická konformácia proteínov ECM je vo vysokej miere ovplyvňovaná fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami povrchu materiálu (Bacakova L a Svorcik V, 2008).



*Obr. 1: Mechanizmus adhézie buniek na umelý materiál (Bacakova L a Svorcik V, 2008).*

## 4. Fyzikálne a chemické povrchové vlastnosti materiálu

Adsorpcia proteínov a chovanie buniek sú vo veľkej miere ovplyvňované chemickými a fyzikálnymi povrchovými vlastnosťami materiálu. Najdôležitejšie povrchové chemické a fyzikálne vlastnosti materiálu sú: polarita a zmäčavosť, náboj a vodivosť, drsnosť, topografia, rigidita, schopnosť deformácie a prítomnosť určitých chemických skupín na povrchu materiálu (napríklad aminoskupiny, kyslíkových skupiny, uhlíku, atď.) (Shin H *a kol.*, 2003; Bacakova L *a kol.*, 2011) (Obr. 2).

### 4.1. Elektrický náboj a vodivosť

Vzhľadom na veľký význam elektrostatických interakcií vo fyziológii buniek je práve povrchový elektrický náboj jednou z hlavných vlastností materiálu, ktorá ovplyvňuje ako adsorpciu proteínov, tak samotnú kolonizáciu materiálu bunkami. Obecne je známe, že nabité materiály sú vhodnejšie pre adsorpciu proteínov a adhéziu buniek než materiály nenabité. Je množstvo štúdií, ktoré ukazujú, že pozitívne nabité materiály podporujú bunečnú adhéziu, zatiaľ čo negatívne nabité materiály bunky skôr odpudzujú (Sackmann E a Smith AS, 2014). Dôvodom je to, že bunečná membrána je skôr negatívne nabitá, a preto sú bunky priťahované materiálom

s opačným nábojom. Navyše bolo zistené, že pozitívny povrchový náboj umožňuje adsorpciu molekúl ECM vo vhodnejších konformáciach (Cao J *a kol.*, 2013; Bacakova L *a kol.*, 2011). Liu a kol. vo svojej štúdií preukázal rozdielny efekt samovoľne sa tvoriacich monovrstiev (z angl. self-assembled monolayers, SAMs) alkánthiolov s naviazanými pozitívne nabitými  $-NH_2$  skupinami a negatívne nabitými  $-COOH$  skupinami na správanie endotelových buniek. Pozitívne nabitý povrch s  $-NH_2$  skupinami umožňuje osteopontínu, molekule ECM sprostredkujúcej adhéziu, adsorbovať sa vo vhodnej konformácii a tým podporovať adhéziu buniek (Liu L *a kol.*, 2005). V inej štúdií bolo zistené, že albumín sa adsorbuje na pozitívne nabité oxidované kovy, tj.  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$  a  $Al_2O_3$  v závislosti na hustote povrchového náboja (Fukuzaki S *a kol.*, 1996; Anselme K, 2000). Toto zistenie potvrdil i Trescher a kol. o niekoľko rokov neskôr v práci, v ktorej porovnával adhéziu a viabilitu ľudských dermálnych fibroblastov a keratinocytov na kopolymérnom nosiči z akrylonitrátu s rôznou koncentráciou pozitívne nabitých skupín na povrchu. Ukázalo sa, že so zvyšujúcou sa koncentráciou pozitívneho povrchového náboja rastie tendencia keratinocytov adherovať k povrchu (Trescher K *a kol.*, 2012).

Negatívne nabité kyslíkové skupiny (aldehydové, ketónové a karboxylové skupiny) zvyšujú zmáčavosť povrchu a zlepšujú adsorpciu niektorých adhézných molekúl, ktoré umožňujú bunkám lepšie sa prichytiť a rásť na materiále (Bacakova L *a kol.*, 2011). Nedávne štúdie našej výskumnej skupiny ukázali, že negatívne nabité skupiny, ktoré sa vytvárajú na titáne počas termálnej oxidácie, podporujú diferenciáciu ľudských buniek podobných osteoblastom (Saos-2 alebo MG-63), zatiaľ čo pozitívne nabité skupiny termálne oxidovaného TiNb stimulujú tieto bunky k proliferácii (Jirka I *a kol.*, 2013; Vandrovцова M *a kol.*, 2014).

Elektrická vodivosť rôznych materiálov taktiež podporuje adhéziu, rast a diferenciáciu buniek (Jeong SI *a kol.*, 2008). Zdá sa, že vodivosť materiálu pôsobí na bunky pozitívne aj bez aktívnej stimulácie buniek elektrickým prúdom prechádzajúcim cez materiál (Kromka A *a kol.*, 2010).

#### **4.2. Zmäčavosť, rigidita a flexibilita**

Jednou z ďalších dôležitých vlastností materiálu je jeho povrchová zmáčavosť. Pri implantácii materiálu do tela je veľmi dôležitá prvotná schopnosť materiálu zmáčať sa tekutinami v tele. Táto schopnosť materiálu následne ovplyvňuje množstvo ďalších dejov odohrávajúcich sa bežne vo fyziologickom prostredí tela, ako je napríklad adsorpcia proteínov



podporujúcich adhéziu buniek. Dobrá povrchová zmáčavosť je preto predpokladom a kritériom biokompatibility implantovaného materiálu (Paital SR a Dahotre NB, 2009). Na meranie zmáčavosti povrchu sa najčastejšie používa meranie kontaktného uhlu. Napríklad kontaktný uhol titánového implantátu sa môže pohybovať v rozmedzí od 0° (hydrofilný) až po 140° (hydrofóbny) (Le Guehennec L *a kol.*, 2007), pričom pre maximálnu adhéziu fibroblastov je potrebné rozmedzie kontaktného uhlu 60° až 80° (Tamada Y a Ikada Y, 1993). Miera zmáčavosti materiálu je závislá na troch základných faktoroch, ktoré sú chemické zloženie, topografia a povrchový náboj materiálu (Meiron TS *a kol.*, 2004).

V mnohých štúdiách sa hovorí, že rozdielna zmáčavosť materiálu ovplyvňuje správanie buniek vďaka odlišnej schopnosti adsorpcie proteínov. Väzba adhézných molekúl na zmáčavý (hydrofilný) materiál sa zdá byť viac flexibilná a ochotná sa reorganizovať pod vplyvom buniek do vhodnejšej konformácie, zatiaľ čo proteíny adsorbované na nezmáčavom (hydrofóbnom) povrchu sú skôr rigidné a denaturované. V literatúre sa popisuje, že materiály s nízkou hodnotou povrchovej energie (hydrofóbne) potenciujú adsorpciu proteínov vo vyššej miere ako materiály hydrofilné (Rabe M *a kol.*, 2011; Xu LC a Siedlecki CA, 2007), pričom presný dôvod nie je známy. Pravdepodobným vysvetlením môže byť, že proteíny pri adsorpcii denaturujú a tým odhaľujú svoje hydrofóbne domény, ktoré majú vysokú afinitu k hydrofóbnym povrchom. Tieto molekuly sú však viazané nešpecificky, a preto poväčšine nemajú správnu konformáciu pre väzbu buniek. Na druhej strane hydrofilné materiály interagujú s nabitými a polárnymi funkčnými skupinami proteínov, čo podporuje správnu orientáciu týchto molekúl a tým aj adhéziu buniek. Dá sa teda povedať, že viac ako na množstve adsorbovaných proteínov, záleží na ich správnej orientácii (Sit PS, 2013).

Hydrofilné povrchy sú teda na rozdiel od hydrofóbných v mnohých štúdiách považované za povrchy zvyšujúce príľnavosť a rozprestretie buniek, ich rast a diferenciáciu (Altankov G a Groth T, 1994; Protivinsky J *a kol.*, 2007) Keselowsky a kol. zistil, že diferenciácia osteoblastov na hydrofilnom povrchu SAMs s -OH a -NH<sub>2</sub> skupinami je vyššia, v porovnaní s hydrofóbnym povrchom SAMs s -COOH a -CH<sub>3</sub> skupinami (Keselowsky BG *a kol.*, 2005). Lepšiu adhéziu a rast vykazovali bunky tiež na PTFE a PE, u ktorých bola hydrofilicita zvýšená pomocou UV žiarenia a plazmového vývoja (Heitz J *a kol.*, 2003; Rimpelova S *a kol.*, 2013).

Pre optimálnu adhéziu buniek je však nutné, aby povrch materiálu nebol príliš hydrofilný. Zistilo sa, že na príliš hydrofilných materiáloch molekuly sprostredkujúce adhéziu buniek nie

sú adsorbované v dostatočnom množstve, alebo ich väzba je príliš slabá na to, aby mohla odolávať trakčným silám, ktoré sa vytvárajú pri naviazaní bunky (Bacakova L a kol., 2011). Napríklad, v našich predchádzajúcich štúdiách bolo zistené, že na veľmi hydrofilný polymér z poly(L,D-laktidu) (PDLLA) a polyetylén oxidu (PEO) bunky hladkej svaloviny z aorty potkana neadherujú. Navyše PEO reťazec vykazoval veľkú pohyblivosť, čo znemožňovalo molekulám sprostredkujúcim adhéziu buniek naviazať sa na povrch stabilne a tým sa znižovala samotná schopnosť buniek uchýtiť sa na daný materiál (Bacakova L a kol., 2007).

Podobná situácia nastáva aj pri príliš flexibilných, elastických a deformovateľných materiáloch, napríklad géloch. Aj keď tieto materiály poväčšine podporujú väzbu molekúl potrebných pre adhéziu buniek, dokonca aj vo vhodnej konformácii, ich štruktúra však kolabuje pod vplyvom trakčných síl adherovaných buniek. To znamená, že adhézne receptory sa síce naviažu na ligandy (napríklad na nezosieťovaný kolagénový gél), ale tieto receptory nie sú schopné vytvoriť zoskupenia fokálnych adhézných plakov, a tým nemôžu asociovať so štruktúrnymi a signálnymi molekulami tak, ako to prebieha pri správnej adhézii buniek. Nedochádza k preneseniu signálu do jadra cez aktínový cytoskelet a bunka nemôže ďalej proliferovať (Engler A a kol., 2004; Bacakova L a kol., 2011).

### **4.3. Drsnosť a topografia**

Topografia implantátu sa považuje za kľúčový faktor ovplyvňujúci morfológiu buniek, orientáciu, proliferáciu a diferenciáciu a významne sa podieľa na signalizácii medzi bunkami. Topografické modifikácie biomateriálov sa zameriavajú hlavne na výrobu trojrozmerných mikroporéznych, nanoporéznych, mriežkových, stĺpcových, ryhovaných, bodkovaných, jamkovitých a inak náhodne usporiadaných štruktúr. Povrchová topografia je bežne charakterizovaná tvarom za sebou nasledujúcich vrcholov a priehlbín (tj. zvlňenia). Toto komplexné topografické usporiadanie je preto nesmierne dôležité pre bioaktívne implantáty (Davies JE, 2007). V závislosti na veľkosti povrchových nerovností sa materiály rozdeľujú do troch hlavných skupín: makrodrsne (100  $\mu\text{m}$  - milimetre), mikrodrsne (100 nm - 100  $\mu\text{m}$ ) a nanodrsne (< 100 nm), pričom každý z nich má unikátne vlastnosti vhodné pre iný typ buniek (Chang HI a Wang Y, 2011).

Zdrsnená textúra a porozita povrchu v mnohých prípadoch napomáha bunkám adherovať a formovať ECM, pretože povrch na ktorý sa môžu adhézne proteíny uchýtiť je zväčšený

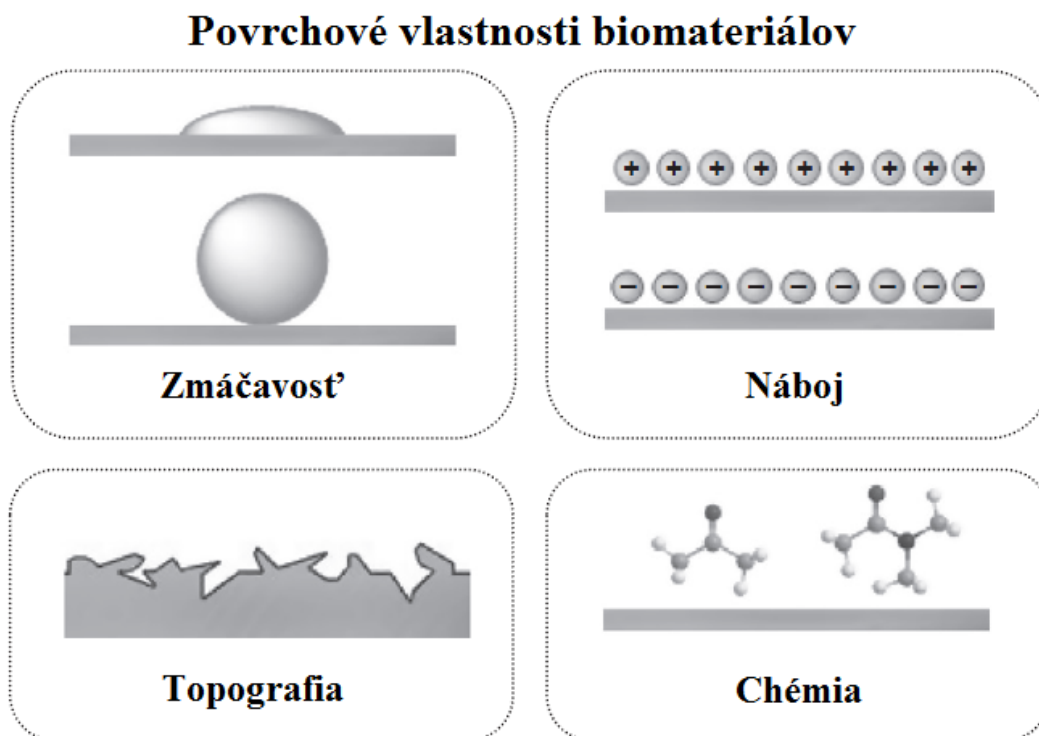
v porovnaní s povrchom hladkým (Boyan BD *a kol.*, 1996). Napríklad sa bežne používajú endoprotézy, ktoré sú zavádzané do kosti pacienta, pričom ich povrch je pre lepšiu fixáciu a interakciu s kostnými bunkami upravený makrozdrsnením (Narayanan R *a kol.*, 2008). Na druhej strane pre aplikácie biomateriálov do miest, v ktorých je požadovaný hladký prietok krvi (tj. materiály napodobňujúce endotel) je nevyhnutný veľmi hladký povrch, aby nedochádzalo k usadzovaniu rôznych proteínov a adhézii krvných doštičiek, a tak k tvorbe trombov (Chlupac J *a kol.*, 2009). Le Guehennec *a kol.* zistil, že viabilita buniek na kontrolnom polystyréne je nižšia v porovnaní s hladkým titanom, hoci oba materiály majú porovnateľnú drsnosť a zmáčavosť. V tomto prípade sa znížená viabilita buniek vysvetľovala rozdielnym zložením materiálov (Le Guehennec L *a kol.*, 2008).

Zdá sa, že pre adhéziu a rast buniek je nanodrsnosť vhodnejšou povrchovou úpravou než mikrodrsnosť. Odlišné reakcie buniek na rôzne povrchové úpravy materiálov sú však určované prevažne veľkosťou buniek a ich typom. Pre väčšie bunky, ako sú napríklad osteoblasty a neuróny je makroskopické zdrsnenie povrchu vhodnejšie, pretože vzdialenosti medzi nerovnosťami na povrchu sú v takom rozmedzí, že bunka sa môže prichytiť bez toho, aby musela nerovnosti premostňovať alebo sa dostať medzi ne. Aby teda nedochádzalo k neprirodzenej deformácii bunečného skeletu, je nutné zvoliť správnu veľkosť povrchového zdrsnenia (Donoso M.G. *a kol.*, 2007).

V poslednom čase je snaha konštruovať náhrady s povrchovou úpravou v nanorozmeroch. Nanomateriály vzhľadom na svoju veľkosť dobre simulujú štruktúru a mechanické vlastnosti prirodzenej ECM v tele. Nanoštruktúra podporuje adsorpciu určitých adhézných molekúl ECM, predovšetkým fibronektínu a vitronektínu vo vhodnej geometrickej konformácii, čo následne zvyšuje samotnú adhéziu buniek určitých bunkových typov, napr. endotelových (Chung TW *a kol.*, 2003). Z tohto pohľadu má nanodrsnosť podobný efekt ako ma zmáčavosť, pričom vo viacerých prípadoch bolo zistené, že vhodná nanoštrukturovanosť materiálu môže dobre kompenzovať jeho malú zmáčavosť (Planell J. A. *a kol.*, 2010). Napríklad sa ukázalo, že osteoblasty výrazne menia svoju morfológiu v závislosti na povrchovej úprave materiálu. Na titane s hladkým povrchom boli osteoblasty guľaté a nevytvárali žiadne extenzie, pričom na titane upravenom nanotubami s nezmenenou zmáčavosťou sa bunky správali oveľa prirodzenejšie, vytvárali filopódie a boli viac predĺžené (Goldman M *a kol.*, 2014; Kubo K *a kol.*, 2009). Povrchový profil nanozdrsnení hrá dôležitú rolu v adsorpcii proteínov, adhézii buniek, ich raste a

diferenciácii. Napríklad na základe štúdie Anselma a kol. sa zistilo, že ľudské mezenchymálne kmeňové bunky sa lepšie diferencujú na povrchu upravenom nanopriehlbinkami s priemernou veľkosťou 120 nm, ktoré sú čiastočne neusporiadané v porovnaní s presným hexagonálnym a štvorcovým usporiadaním alebo úplne náhodným usporiadaním (Anselme K a kol., 2010).

Nanoštrukturované materiály sú vhodné aj na aplikácie v tkanivovom inžinierstve kože. Nanovláknenné membrány majú veľký potenciál v konštrukcii dvojvrstiev kožných buniek (fibroblastov a keratinocytov). Výhodou je, že membrána môže oddeľovať tieto dva buncčné typy, pričom jej porézny charakter umožňuje fyzickú a humorálnu komunikáciu medzi nimi. Vrstva napestovaných fibroblastov na nanovláknennom materiále preto predstavuje nutričný podklad pre keratinocyty, tak ako to funguje prirodzene v koži (Al Kayal T a kol., 2015). Nanovláknenné alebo nanoporézne materiály sú v neposlednom rade vhodné aj pre konštrukciu tubulárnych 3D cievných náhrad (Xu H a kol., 2012).



**Obr. 2: Povrchové vlastnosti materiálov ovplyvňujúce biologickú odpoveď na implantovaný materiál** (Nouri A a Wen C, 2015).

## 5. Fyzikálne a chemické modifikácie materiálov

Modifikácie povrchu materiálov vedú k zmene ich fyzikálnych a chemických vlastností, ako je polarita, zmäčavosť, chemické zloženie (zvýšená prezentácia kyslíkových skupín), povrchová drsnosť, topografia, elektrický náboj a vodivosť. Tieto vlastnosti, ako už bolo spomínané vyššie, sú veľmi dôležité pre adsorpciu proteínov ECM v dostatočnom množstve a vo vhodnej orientácii, čo výrazne ovplyvňuje adhéziu a rast buniek. Modifikácie sú potrebná v prípadoch, keď povrchové vlastnosti materiálu nespĺňajú požiadavky pre správnu kolonizáciu bunkami. Pod fyzikálnymi modifikáciami sa rozumie vystavenie povrchu materiálu pôsobeniu vysoko energetických častíc, ako sú napríklad ióny, elektróny a radikály. Za chemické modifikácie sa považujú zmeny chemického zloženia povrchu spôsobené reakciami s kyslými alebo zásaditými roztokmi alebo vytváranie kovalentných väzieb medzi povrchom a vhodnou chemickou skupinou či molekulou (Bacakova L a Svorcik V, 2008).

### 5.1. Fyzikálne modifikácie

Medzi najviac používané techniky fyzikálnych modifikácií patria modifikácie pomocou plazmy, ultrafialového žiarenia a iónová implantácia. Tieto techniky sú obecné založené na princípe štiepenia molekúl na povrchu materiálu, čo má za následok vytváranie voľných radikálov, dvojných väzieb a nových funkčných skupín (hlavne kyslíkových skupín) na jeho povrchu. Kyslíkové skupiny zvyšujú povrchovú zmäčavosť, čo umožňuje proteínom adsorbovať sa v správnej konformácii. Voľné radikály a nenasýtené väzby sú využívané pre naviazanie rôznych funkčných biomolekúl, ak sú napríklad aminokyseliny, oligopeptidy alebo celé proteíny, ktoré následne zvyšuje kolonizáciu materiálu bunkami. Konjugované nenasýtené dvojnité väzby sú zodpovedné za zvýšenie povrchovej elektrickej vodivosti materiálu, a tým dochádza i k zmene chovania buniek (Bacakova L a Svorcik V, 2008; Bacakova L *a kol.*, 2011).

Modifikácia materiálu UV žiarením obzvlášť často používa u syntetických polymérov, ako sú PTFE a PET. Takto upravené polyméry sa klinicky osvedčili hlavne pri konštrukcii cievnych náhrad (Chlupac J *a kol.*, 2009). Iónová implantácia je založená na interakcii vysoko energetických iónov s materiálom, pričom ióny sú vytvárané iónovým implantérom a urýchľované elektrickým poľom. Modifikácia plazmou prebieha vo vákuu, kde za pomoci inertného (argón, hélium, neón) alebo reaktívneho (kyslík, fluór, dusík, vodík a tetrafluórmetán) plynu, dochádza k rozštiepeniu väzieb makromolekúl na povrchu materiálu. Tento dej má za

následok vznik voľný radikálov, ktoré majú schopnosť vytvárať nové funkčné skupiny, hlavne polárne kyslíkové skupiny (karboxylové, karbonylové a esterové), ktoré robia materiál viac hydrofilným a tým zlepšujú jeho bioaktivitu (Bacakova L a Svorcik V, 2008; Bacakova L *a kol.*, 2011).

## 5.2. Chemické modifikácie

Najnovšie techniky v oblasti chemických modifikácií materiálu sú založené na naviazaní bioaktívnych molekúl a nanočastíc na povrch, za účelom zlepšenia povrchových vlastností materiálu. Medzi molekuly a nanočastice, ktoré sa bežne používajú ako ligandy pre adhézne receptory buniek patria aminokyseliny (napríklad glycín, alanín a leucín) (Svorcik V, 2004), častice zlata (Svorcik V *a kol.*, 2009), uhlíkové častice (Parizek M *a kol.*, 2013) a oligopeptidy.

Efektivita pokrývania povrchu biomolekulami môže byť zlepšená za pomoci fyzikálnych modifikácií, ako sú iónové implantácie, UV žiarenie alebo pomocou plazmy. Použitím týchto fyzikálnych techník je možné zmeniť chemické povrchové vlastnosti materiálu. Na jeho povrchu sa objavia voľné radikály, dvojné väzby a iné funkčné chemické skupiny, ktoré môžu dobre reagovať s mnohými bioaktívnymi molekulami, a vytvárať tak povrch vhodnejší pre bunky. Pri pokusoch s polyetylénom, ktorého povrch bol upravený pomocou plazmy a následne pokrytý glycínom, polyetylénglykolom, albumínom z hovädzieho séra a koloidnými uhlíkovými nanočasticami, sa zistilo, že tieto povrchové úpravy značne podporujú adhéziu a rast buniek hladkého svalstva ciev (VSMC) (Parizek M *a kol.*, 2013). V podobnej štúdii sa tento pozitívny efekt úpravy povrchu pomocou plazmy podarilo potvrdiť v prípade použitia adhéznej molekuly fibronektínu, avšak v prípade albumínu, tj. neadhéznej molekuly, sa tento účinok nepotvrdil (Novotna K *a kol.*, 2013). V práci Švorčička a kol. sa ukázalo, že pre adhéziu a proliferáciu embryonálnych fibroblastov 3T3 z myši a buniek hladkých svalov potkana je vhodné upraviť  $Ar^+$  plazmou aktivovaný povrch pridaním zlatých nanočastíc (Svorcik V *a kol.*, 2009).

Ďalšou možnosťou, ako upraviť bioaktivitu materiálu, je pokryť jeho povrch trvalou alebo degradabilnou vrstvou. Pre tvorbu kožných náhrad sa často používajú biodegradabilné vrstvy pozostávajúce s rôznych molekúl ECM, ako sú napríklad kolagén, fibrín a fibronektín. Tieto molekuly sa bežne vyskytujú v organizme alebo sa podieľajú na regenerácii tkaniva a hojení rán, a preto sú pre telo prirodzené. Poskytujú dôležité sekvencie, ktoré bunka rozpoznáva svojimi receptormi na membráne a tým priamo ovplyvňujú správanie buniek. Navyše môžu bioaktívne

molekuly obsahovať rastové faktory a vyplavovať iné látky za účelom kontroly. Pre zlepšenie povrchových vlastností kožných náhrad sa používajú prírodné bioaktívne molekuly ako je kolagén (Shen Y *a kol.*, 2014), kyselina hyalurónová (Nyman E *a kol.*, 2013), fibronektín (Bonvallet PP *a kol.*, 2015; Ghosh K *a kol.*, 2006) alebo fibrín (Taghiabadi E *a kol.*, 2015; Janmey PA *a kol.*, 2009). Kolagén I, fibronektín a kyselina hyalurónová sú molekuly bežne prítomné v koži, zatiaľ čo fibrín, molekula zodpovedná za hojenie rán, sa v koži vyskytuje iba občas (Seet WT *a kol.*, 2012; Taghiabadi E *a kol.*, 2015). Predchádzajúce štúdie však ukázali že fibrínové konštrukty podporujú proliferáciu fibroblastov a stimulujú ich k produkcii kolagénu I a III, a tiež dobre stimulujú diferenciáciu keratinocytov. Fibrín, kolagén a kyselina hyalurónová sú navyše používané ako hlavné komponenty klinicky používaných kožných náhrad (Helmedag MJ *a kol.*, 2015; Reinertsen E *a kol.*, 2014; Wang HM *a kol.*, 2013; Seet WT *a kol.*, 2012; He W *a kol.*, 2005).

Najnovším trendom v tkanivovom inžinierstve je však pokrývanie povrchu materiálov nie celými molekulami ECM, tak ako to bolo popisované vyššie, ale iba ich aktívnymi časťami, tj. aminokyselinovými sekvenciami dôležitými pre väzbu adhézných receptorov bunky. Napríklad, Santiago a kol. vo svojej štúdii modifikoval PCL naviazaním troch domén pochádzajúcich z proteínu ECM laminínu: RGD, YIGSR a IKVAV a zistil, že sekvencia IKVAV signifikantne podporuje adhéziu ľudských kmeňových buniek pochádzajúcich z tuku (Santiago LY *a kol.*, 2006). V inej štúdii Gauvreau a Laroche zistili, že pre lepšiu väzbu, rozprestretie a proliferáciu ľudských endotelových buniek z pupočníkových ciev (HUVECs) na aminovanom PTFE je vhodné povrch tohto materiálu upraviť kombináciou sekvencií pochádzajúcich z fibronektínu: CGRGDS a CWQPPRARI. Väzba sekvencií na povrch materiálu je sprostredkovaná cysteínom na N-terminálnom konci, ktorý sa spája s povrchovým maleimidom (Gauvreau V a Laroche G, 2005). Meinhart a kol. v podobnej štúdii pozoroval, že endotelové bunky ciev adherujú na povrch PTFE v závislosti na hustote RGD sekvencií na povrchu. V budúcnosti by preto mohla optimálna koncentrácia RGD sekvencií zaistiť lepšiu adhéziu endotelových buniek na povrchu cievnych implantátov, ktoré sú bežne vystavované veľkým tlakom a prúdom krvi (Meinhart JG *a kol.*, 2005). Wang a kol. zistil, že ľudské dermálne fibroblasty a keratinocyty dobre reagujú na bifunkcionálne fúzne proteíny obsahujúce RGD sekvenciu (BFP). BFP podporujú nie len adhéziu ale aj proliferáciu buniek, a preto by sa potenciálne mohli v budúcnosti využívať v tkanivovom inžinierstve na modifikáciu povrchov (Wang TW *a kol.*, 2006).

Oligopeptidové ligandy sú na povrch materiálu viazané pomocou flexibilných polymérnych reťazcov PEO alebo polyetylénglykolu (PEG) v definovanej koncentrácii, za účelom zlepšenia adhézie, rozprestrenia a rastu buniek. Flexibilné PEO a PEG reťazce zaisťujú vhodnú orientáciu molekúl sprostredkujúcich adhéziu, tým sa tieto ligandy stavajú dostupnejšími pre receptory, čo umožňuje pevnejšie prichytenie bunky na materiál. Tento nový spôsob modifikácie povrchov prináša veľa výhod, ako sú vysoká špecificita väzby a nižšia imunogenicita v porovnaní s modifikáciami pomocou ECM molekúl (Bacakova L *a kol.*, 2007).

## 6. Anatómia a fyziológia kože

Vytvorenie tkanivovej náhrady kože je veľká výzva, pretože koža je funkčne a štruktúrne komplexný orgán. Pre telo predstavuje ochrannú bariéru pred nepriaznivými vplyvmi z okolia. Hrá tiež významnú úlohu v termoregulácii a výžive. Ľudská koža sa skladá z viacerých buniek pochádzajúcich z troch rôznych zárodočných vrstiev: neuroektoderm, mezoderm a neurálna lišta. Je štruktúrovaná do troch vrstiev (Obr. 3): pokožka (epidermis), zamša (dermis) a podkožné väzivo (hypodermis) (Eungdamrong NJ *a kol.*, 2014; Wong DJ a Chang HY, 2009).

Epidermis, najvrchnejšia vrstva kože neuroektodermálneho pôvodu, je primárne zložená z keratinocytov, ktoré tvoria až 90% buniek a ich funkcia spočíva v ochrane tela a udržiavaní pokožky v kompaktnom stave. Ďalej sa tu nachádza subpopulácia buniek z neurálnej lišty, melanocyty, ktoré tvoria pigment pokožky a tlakové senzory (Merkelové bunky). Langerhansové bunky pochádzajúce z mezodermy zabezpečujú imunitnú ochranu kože. Epidermálne bunky sú rozdelené do piatich základných vrstiev: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*. Integrita týchto vrstiev je udržiavaná pomocou desmozómov. Desmozómy sú spojené povrchovými adhéznymi proteínmi s intracelulárnymi keratínovými filamentami, a tým sprostredkujú väzbu medzi bunkami. Dôležité adhézne proteíny keratinocytov sú kadheríny, desmoglíny a desmokolíny (Wong DJ a Chang HY, 2009; Eungdamrong NJ *a kol.*, 2014).

Dermis je spojivové tkanivo nachádzajúce sa pod epidermis. Hlavné funkcie zamše sú udržiavanie elastickej a mechanickej integrity kože, ďalej podkožná výživa, termoregulácia a sensorická a imunologická funkcia. Pozostáva hlavne z fibroblastov, tj. buniek mezodermálneho pôvodu a vláken ECM, kolagénu, elastínu, proteoglykanov a fibronektínu, ktoré prechádzajú naprieč celou vrstvou v rôznych smeroch. V dermis sa ďalej nachádzajú endotelové bunky,



bunky hladkého svalstva a bunky zodpovedné za imunitné reakcie (dendritické bunky, monocyty a lymfocyty). Je vaskularizovaná, inervovaná a obsahuje potné žľazy a vlasové folikuly. Medzi epidermis a dermis sa nachádza bazálna membrána, ktorá tieto dve vrstvy spája. Je zložená z rôznych molekúl, ako sú integríny, laminíny, kolagén a iné proteíny, ktoré sa podieľajú na komunikácii medzi epitelom a mezenchymálnou vrstvou (Eungdamrong NJ *a kol.*, 2014; Wong DJ a Chang HY, 2009).

Hypodermálna vrstva je najspodnejšia vrstva a skladá sa prevažne z tukového tkaniva, mezodermálneho pôvodu. Oddeluje dermis od svalstva, ktoré je pod a predstavuje tukovú a energetickú zásobáreň tela (Wong DJ a Chang HY, 2009).

### **6.1. Keratinocyty**

Ako už bolo spomínané, keratinocyty zohrávajú významnú úlohu v ochrane organizmu a tiež sa podieľajú na hojení kožných poranení. Vyplavené cytokíny pri poranení stimulujú proliferáciu keratinocytov a ich migráciu na povrch pokožky, čo napomáha k reepitelizácii a revaskularizácii poškodeného kožného tkaniva (Pastar I *a kol.*, 2014). Nové bunky, vynikajú v bazálnej vrstve z kmeňových buniek a postupne sa diferencujú a dozrievajú na dospelé keratinocyty, ktoré migrujú smerom na povrch kože, kde nakoniec odumierajú a tvoria bariéru. Bunky v bazálnej vrstve postupne proliferujú a ich štruktúra pozostáva z typických intermediálnych filament zvaných keratíny (K), K5 a K14. Nezrelé keratinocyty postupujú smerom na povrch cez jednotlivé tranzverzálné roviny a súčasne sa diferencujú na bunky exprimujúce K1 a K10, ktoré sú charakteristické pre vyššiu suprabazálnu vrstvu (Steinert PM *a kol.*, 1993). Bazálne bunky sú prichytené na bazálnu membránu pomocou hemidesmózomov a fokálnych adhézii a bunky sú navzájom spojené desmózomami. Počas konečnej diferenciácie keratinocytov dochádza k ich dehydratácii, splošťovaniu do mnohostenov a tvorbe takzvaných šupín (korneocytov). V týchto neskorších fázach sú pre keratinocyty typické polymérne proteíny involucin a filagrín, ktoré sú súčasťou ich zrohovateného obalu (Pastar I *a kol.*, 2014).

Na keratinizácii sa podieľa množstvo regulačných rastových faktorov, cytokínov a chemokínov, ďalej integríny, keratíny, proteázy ECM (MMPs) a ďalšie extracelulárne molekuly (Barrientos S *a kol.*, 2014). Tieto molekuly zahŕňajú predovšetkým rastové faktory fibroblastov (FGF-2, FGF-7, FGF-10 a FGF-22), ktoré stimulujú epitelizáciu prostredníctvom parakrinnej signalizácie. Napríklad, FGF-2, známy tiež ako rastový faktor keratinocytov (KGF) je

produkovaný fibroblastami a pôsobí prostredníctvom receptoru KGF2IIIb, ktorý bol nájdený iba u keratinocytov (Werner S *a kol.*, 1994). Ďalej sú tu dôležité interleukíny (IL-1 a IL-6), tumor nekrotizujúci faktor (TNF- $\alpha$ ) a interferóny (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), ktoré zohrávajú významnú úlohu pri hojení rán (Tang A a Gilchrest BA, 1996). Zistilo sa, že IL-1 zvyšuje sekréciu FGF-7, zatiaľ čo IL-6 pôsobí prostredníctvom signalizačnej dráhy závislej na STAT3 molekule sprostredkujúcej migráciu keratinocytov (Gallucci RM *a kol.*, 2004). U transformujúceho rastového faktoru (TGF- $\beta$ 1) prebieha stimulácia migrácie pravdepodobne za pomoci MMPs (Zambruno G *a kol.*, 1995).

Ľudské primárne keratinocyty, sú v súčasnosti v tkanivovom inžinierstve stále viac využívané na výrobu kožných náhrad. Napríklad firma Modex Ltd. (Lausanne, Švajčiarsko) konštruuje autológne kožné náhrady EpiDex® pozostávajúce z keratinocytov, ktoré vykazujú veľkú účinnosť pri hojení rán (Tausche AK *a kol.*, 2003). V rámci iných projektov je snaha skonštruovať kožnú náhradu, ktorá by pozostávala z alogénnych alebo autológnych keratinocytov a jej podkladom by boli ľudské primárne fibroblasty, tak ako to je prirodzene v koži. Pre lepšie uchytenie buniek na materiál sa používajú molekuly bežne prítomné v tele alebo molekuly podieľajúce sa na hojení rán, ako je napríklad fibrín (Idrus RB *a kol.*, 2014; Auxenfans C *a kol.*, 2015).

## 6.2. Fibroblasty

Ako už bolo spomínané fibroblasty sú súčasťou dermis a ich hlavnou funkciou je produkovať molekuly ECM, hlavne kolagén a fibronektín, a tým podporovať štruktúru epidermis. V predchádzajúcich prácach sa na základe génovej expresie ukázalo, že fibroblasty z rôznych častí tela sú heterogénne a dokonca i v rovnakej anatomickej časti tela vykazujú istú rôznorodosť. Fibroblasty v spodných vrstvách sa odlišujú od fibroblastov v hornej papilárnej vrstve dermis a špecifickú skupinu tvoria tiež fibroblasty, ktoré sa nachádzajú okolo vlasových folikulov. Vzhľadom na to je aj organizácia a zloženie ECM v rôznych úrovniach rôzne (Rinn JL *a kol.*, 2006).

V kožnom tkanivovom inžinierstve sú fibroblasty kultivované na rôznych materiáloch za účelom vytvorenia dermálnej alebo dermo-epidermálnej náhrady. Biodegradabilný nosič Dermagraft® používa napríklad neonatálne fibroblasty, ktorých úlohou je naprodukovať čo najviac rastových faktorov a molekúl ECM pre podporu hojenia rán v oblasti dermis

(Hansbrough JF *a kol.*, 1992). Avšak za účelom vytvorenia presnejšej náhrady prirodzenej kože sa používajú fibroblasty spolu s keratinocytami. Príkladom takejto dermo-epidermálnej náhrady je hovädzí kolagénovo-elastínový nosič Matriderm® (Haslik W *a kol.*, 2007; Killat J *a kol.*, 2013).

### 6.3. Kolagén

Kolagén je proteín vytvárajúci štruktúru trojzávitnice, ktorý môžeme nájsť vo všetkých spojivových tkanivách, ako hlavnú súčasť ECM. Jeho hlavná funkcia v tkanive je udržovanie integrity. Kolagén, ktorý sa nachádza v koži je syntetizovaný hlavne fibroblastami a myofibroblastami (Babraj JA *a kol.*, 2005; Zhou S *a kol.*, 2013). V tkanivách, ako je koža, šľacha alebo kosť je kolagén vystavovaný veľkému tlakovému a ťahovému stresu, a preto je jeho štruktúra organizovaná do vláken. V súčasnosti je známych 28 typov kolagénu, pričom tento počet nemusí byť konečný. Kolagén typu I je prítomný predovšetkým v koži a šľachách a tiež v tkanive jaziev. Spolu s typmi II, III, V a XI patrí do skupiny kolagénov, ktoré sa formujú do vláken. Iné kolagény vytvárajú skôr sieť. Príkladom je kolagén typu IV, ktorý sa majoritne nachádza v bazálnej membráne (Jain S *a kol.*, 2009).

Klasická štruktúra trojzávitnice kolagénu vzniká vďaka prítomnosti troch netradičných aminokyselín: glycín (Gly), prolín (Pro) a hydroxyprolín (Hyp). Tieto aminokyseliny vytvárajú typický sekvenčný motív (Gly-X-Pro/Hyp)<sub>n</sub>, v ktorom X predstavuje ľubovoľnú aminokyselinu. Každá aminokyselina má v reťazci svoje presné umiestenie. V strede trojzávitnice sa nachádzajú postranné reťazce glycínu, tj. atómy vodíku, ktoré štruktúru stabilizujú. Vodíkové väzby udržujú tieto tri reťazce pri sebe, pričom pre vytvorenie presnej trojzávitnice je potrebná väzba medzi uhlíkom a dusíkom peptidyl - prolínu alebo peptidyl - hydroxyprolínu, ktoré umožňujú polypeptidovému reťazcu zbaliť sa do samotných helixov. Zaujímavosťou je, že pri prerušení peptidyl - prolínovej väzby v samotnom helixe sa rigidná štruktúra trojzávitnice zachová (Jain S *a kol.*, 2009).

Syntéza kolagénu prebieha klasickou cestou cez endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát, ako u ostatných proteínov. Pre vytvorenie maturovanej molekuly kolagénu je nutná však postranslačná modifikácia prokolagénu, ktorá umožní vytvoriť konečnú vláknitú štruktúru. Hydroxylácia prolínu na 4-hydroxyprolín za pomoci prolylhydroxylázy je jeden zo zásadných krokov; pri jeho narušení vznikajú deformované vlákna kolagénu a choroba známa ako skorbut.

Za esenciálny kofaktor tvorby kolagénu sa považuje kyselina askorbová (vitamín C) (Murad S *a kol.*, 1981; Du J *a kol.*, 2012) alebo tiež jej stabilnejší derivát disodium isostearyl 2-*O*-L-ascorbyl phosphate (Shibayama H *a kol.*, 2008). Hinek a kol. v nedávnej štúdií zaznamenal, že pri pravidelnom podávaní L-askorbanu sodného dochádza k zvýšenému ukladaniu elastických vlákien (kolagénu a elastínu) fibroblastami. Ďalej preukázal, že L-askorban sodný by v kombinácii s inhibítormi kolagenogenézie mohol regulovať regeneráciu poškodeného tkaniva bez vzniku jaziev a keloidov (Hinek A *a kol.*, 2014).

V súčasnosti sa kolagén používa na výrobu samotných biodegradabilných náhrad. Kolagén je vzhľadom na svoju povahu často kombinovaný s inými syntetickými alebo biologickými molekulami (elastín, kyselina hyalurónová) a do podoby nosiča sa upravuje pomocou metódy zvlákňovania (elektrospiningu). Niiyama a Kuroyanagi vo svojej štúdií používali kompozit kolagénu a kyseliny hyalurónovej spolu s epidermálnym rastovým faktorom (EGF) a vitamínom C (VC). Kompozit spolu s pridaným EGF a VC významne podporoval hojenie kožných poranení (Niiyama H a Kuroyanagi Y, 2014). Butler a Orgill vo svojej práci popisujú vytvorenie náhrady pozostávajúcej s kolagénu a glykosaminoglykanov, ktorú osadili autológnyimi keratinocytami (Butler CE a Orgill DP, 2005). V inej štúdií Rnjak-Kovacina a jej kolegovia používali kolagén v kombinácii s tropoelastínom a zistili, že kolagén s tropoelastínom v pomere 2:8 je vhodný nosič pre dermálne fibroblasty, podporuje ich infiltráciu, proliferáciu, migráciu, produkciu kolagénu *de novo* a angiogénu (Rnjak-Kovacina J *a kol.*, 2012). Pozitívny vplyv kolagénu na tvorbu nových kapilár bol popisný už v predchádzajúcich prácach (Lugo LM *a kol.*, 2011; Cooper TP a Sefton MV, 2011).

## **7. Kožné náhrady**

Kožné kompozity sú rozdeľované podľa ich vlastností do viacerých skupín. Prvé hlavné delenie je delenie podľa toho akú vrstvu kože majú nahradzovať alebo pomáhať regenerovať na epidermálne, dermálne a dvojvrstvové (dermo-epidermálne) náhrady (Príloha 4). Ďalším parametrom podľa, ktorého je možné materiály rozdeliť, je ich trvácnosť. Materiál môže byť v tele implantovaný permanentne, dlhodobu alebo iba krátkodobu. Kožné náhrady môžu byť ďalej rôzneho chemického zloženia. Za biologické náhrady sa označujú náhrady konštruované z autológneho, alogénneho alebo xenogénneho materiálu. Syntetické materiály sú rozdeľované na degradabilné a nedegradabilné (Obr. 3).

## 7.1. Biologické materiály

Existuje mnoho prírodných materiálov, ktoré vďaka svojim dobrým vlastnostiam spĺňajú požiadavky tkanivového inžinierstva kože. Biologické materiály sa svojimi vlastnosťami a štruktúrou nápadne podobajú prirodzenému tkanivu, čím podporujú adhéziu buniek. Biokompatibilita týchto materiálov je vzhľadom na ich prírodný charakter obvykle veľmi vysoká; vo väčšine prípadov nevyvolávajú imunologické reakcie alebo ich prejavy sú miernejšie.

Medzi najpoužívanejšie prírodné materiály sa radia kolagén, laminín, chitosan, kyselina hyalurónová, fibronektín a želatína (Mohamed A a Xing MM, 2012). Na vytvorenie vhodného nosiča pre kožné bunky je často používaná technika elektrospiningu (Wang X *a kol.*, 2013). Membrány vytvorené z nanovláken chitosanu boli testované na kožných defektoch u potkanov. Zistilo sa však, že vzhľadom na zlé mechanické vlastnosti chitosanu sú aplikácie tejto membrány v tkanivovom inžinierstve značne obmedzené (Liu CB *a kol.*, 2010). Na druhej strane je kolagén, najviac študovaný prírodný materiál, ktorý má v tkanivovom inžinierstve veľký potenciál. Biomateriály, ako je kolagén sú charakteristické svojimi unikátnymi vlastnosťami, ako je slabá mechanická odolnosť, ale dobrá biokompatibilita a nízka imunogenita. Pre zvýšenie pevnosti a odolnosti sa však kolagén často kombinuje s inými chemikáliami (Schuetz T *a kol.*, 2013; Killat J *a kol.*, 2013). Výroba prírodných materiálov je však veľmi náročná jak finančne, tak technologicky a samotné materiály majú viacero nevýhod, ako napríklad ich nehomogenita a prítomnosť nedefinovaných faktorov a patogénov. Vzhľadom na uvedené komplikácie je snaha vyvinúť syntetický materiál, ktorý by čo najviac imitoval uvedené biomateriály.

## 7.2. Syntetické materiály

Najčastejšie používané synteticky vyrábané materiály sú polyméry. Oproti biologickým náhradám majú niekoľko výhod. Ich zloženie je presne definované a vďaka možnosti kombinovať jednotlivé polyméry je možné vytvoriť veľa variant kopolymérov s odlišnými vlastnosťami, pričom práve ich vlastnosti určujú mieru ich biokompatibility a biokompatibility (Mohamed A a Xing MM, 2012).

V každom tkanivovom inžinierstve sa najviac používajú takzvané biodegradabilné polyméry. Ich dostupnosť je pomerne jednoduchá a lacná, a preto sa do nich vkladá veľká nádej. Najviac testované sú polyméry vyrábané z PLA (Hosseinkhani B *a kol.*, 2015), PGA (Sekiya N *a kol.*, 2013) a PCL (Duan HC *a kol.*, 2013). Nair *a kol.* testovali kopolymér pozostávajúci zo

všetkých troch polymérov, tj. poly(laktid-ko-glykolid-kaprolakton) (PLGC) a zistili, že jeho štruktúra je vhodná pre adsorpciu molekúl, ako je napríklad fibrín a tým podporuje adhéziu a proliferáciu fibroblastov a stimuluje ich k produkcii kolagénu (Nair RP *a kol.*, 2014).

Pre výrobu kožných tkanivových krytov sú ďalej testované synteticky vyrábané hydrogély. Jedná sa o nerozpustné hydrofilné polyméry obsahujúce veľké množstvo vody, ktoré svojimi mechanickými vlastnosťami dobre napodobňujú bežné tkanivo (Parente ME *a kol.*, 2015). Hydrogély predstavujú pre tkanivové inžinierstvo veľký potenciál. Testujú sa tiež napríklad v súvislosti s poraneniami miechy, kde po ich aplikácii injekčne do miesta lézie dochádza k zlepšeniu vzájomných interakcií medzi bunkami a ich lepšej proliferácii (Carballo-Molina OA a Velasco I, 2015).

## **8. Nanotechnológia**

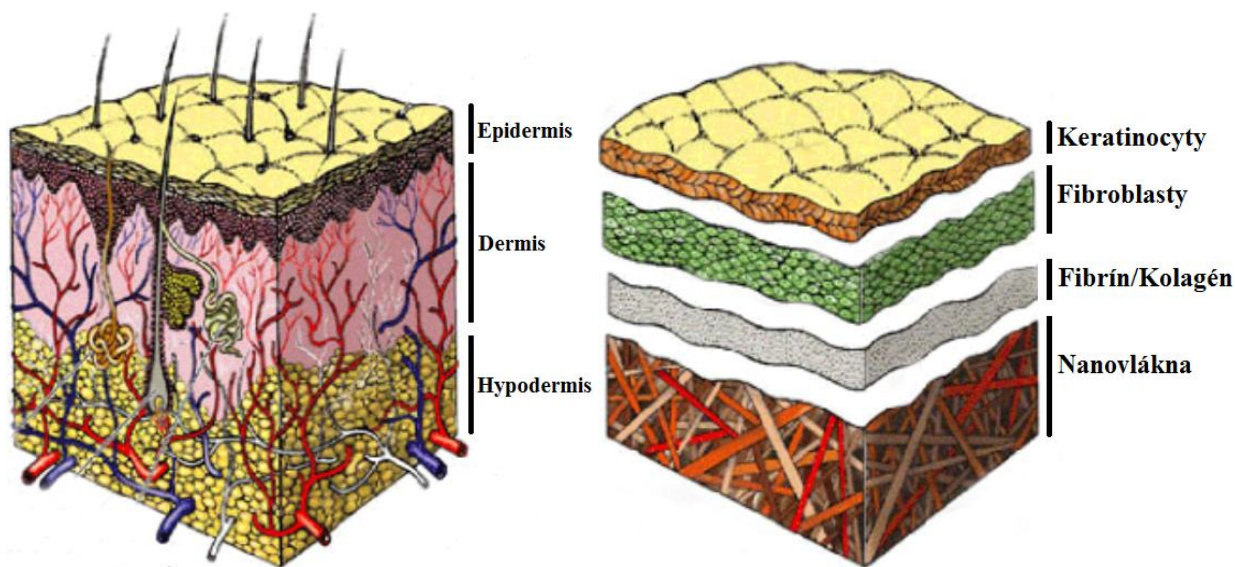
Nanotechnológia je mladá interdisciplinárna technológia, ktorej aplikácie za posledný čas expandovali do množstva odvetví, ako je napríklad tkanivové a biomedicínske inžinierstvo. Hlavnou myšlienkou nanotechnológie je vytvoriť materiál, ktorého povrchová štruktúra sa bude čo najviac približovať prirodzenej molekulárnej štruktúre tkanív. V medicíne sa nanotechnológie používajú na diagnostiku, tkanivové inžinierstvo a prenos liečiv v tele. V tkanivovom inžinierstve sú vyrábané nanoštrukturované materiály, ktoré signifikantne zlepšujú hojenie rán alebo sú aplikované ako implantáty do tela, za účelom nahradenia poškodeného tkaniva. Nanoštruktúra na povrchu materiálu výborne napodobňuje štruktúru medzibunkovej hmoty, čím významne napomáha bunkám pacienta adherovať na daný materiál, čo urýchľuje hojenie po poraneniach alebo chirurgických zákrokoch. Nanotechnológia je preto sľubný obor, ktorý je nutné ďalej rozvíjať a hľadať nové možnosti aplikácie (Mohamed A a Xing MM, 2012).

### **8.1. Kopolymér polymliečnej a polyglykolovej kyseliny (PLGA)**

PLGA je kopolymér zložený z dvoch poly( $\alpha$ -hydroxyesterov), PLA a PGA. Chemické vlastnosti týchto polymérov umožňujú ich hydrolytickú degradáciu pomocou de-esterifikácie. PGA je hydrofilný a veľmi kryštalický polymér s relatívne krátkou dobou degradácie (6 – 12 týždňov), zatiaľ čo štruktúrne podobný polymér PLA s odlišnými fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami má už dobu degradácie dlhšiu (11 – 18 týždňov). Toto predĺženie pravdepodobne spôsobujú metylové postranné skupiny na alfa uhlíku PLA (Lu L *a kol.*, 2000; You Y *a kol.*,

2005). Vzhľadom na tieto vlastnosti je možné získať kombináciou PLA a PGA kopolymér PLGA s veľkým rozsahom doby degradácie od 1 až do 6 týždňov, v závislosti na kompozícii kopolyméru, tj. hydrofilnej a hydrofóbnej rovnováhe materiálu (Holy CE *a kol.*, 1999; Hua N a Sun J, 2008; Wu L a Ding J, 2005; Pan Z a Ding J, 2012).

PLGA degraduje pomocou hydrolýzy jej esterových väzieb vo vodnom prostredí. Samotnú degradáciu je možné popísať v štyroch krokoch. V prvom kroku prebieha hydratácia PLGA, kedy dochádza k penetrácii vody do amfoterných oblastí a k rozbitiu Van der Walsových síl a vodíkových mostíkov. V druhom kroku dochádza k zahájeniu degradácie, kedy sa rozbiehajú kovalentné väzby vplyvom zníženia molekulovej hmotnosti. Ďalej nastáva takzvaná konštantná degradácia, pri ktorej karboxylové koncové skupiny autokatalyticky spúšťajú rozkladný proces a dochádza k odštepovaniu postranných kovalentných väzieb, čo vedie k strate integrity celej hmoty. V konečnej rozpustnej fáze sú fragmenty rozštiepené na jednotlivé molekuly, ktoré sú bežne rozpustné vo vode (Gentile P *a kol.*, 2014).



**Obr. 3: Anatómia kože a schéma kožnej náhrady, upravené z: (Sobajo C *a kol.*, 2008).**

## 9. Ciele diplomovej práce

1. Chemicky modifikovať nanovláknú membránu z PLGA molekulami ECM (kolagénom a fibronektínom) a fibrínom, molekulou vyskytujúcou sa v organizme pri zaceľovaní rán.
2. Sledovať morfológiu modifikovaných vrstiev a porovnať ich z hľadiska miery adhézie a proliferácie kožných buniek (ľudských dermálnych fibroblastov a keratinocytov línie HaCaT).
3. Porovnať produkciu kolagénu I fibroblastami na materiále modifikovanom a nemodifikovanom a sledovať účinky kyseliny askorbovej (vitamínu C).



## *Experimentálna časť*

### **10. Materiál a metódy**

#### **10.1. Výroba nanovlákných membrán**

Na experimenty boli používané nanovlákné membrány vyrábané z kopolyméru kyseliny poly(L-mliečnej) (PLLA) a kyseliny poly(glykolovej) (v pomere 85:15, PLGA), zakúpeného od firmy Purasorb PLG 8531 (Purac Biomaterials, Frankfurt, Nemecko). Polymér bol rozpustený v chloroforme s prídavkom 0,18 g tetraetylamónium-boromidu (TEABr) na výslednú koncentráciu 4 hmotnostné %.

Nanovlákné membrány boli pripravované v rámci externej spolupráce s firmou InStar Technologies a.s. (Liberec, Česká Republika) metódou elektrostatického zvlákňovania na Nanospidery (NS Lab 500) bez použitia injekčnej striekačky (tzv. metódou needleless electrospining). Presná štruktúra nanovlákných membrán bola dosiahnutá na základe nastavenia podmienok pri zvlákňovaní: teplota: 22°C; vlhkosť RH: 23%; napätie: 50 – 55 kV; vzdialenosť elektródy: 145 mm; posun textílie: 15 mm/min. Vlákna sa nanášali na textíliu z polypropylénu vyrábanú technológiou Spunbond. Membrány boli vyrábané v rôznych hustotách, t.j. plošná hmotnosť vlákien bola 7,8; 10,5 a 19,6 g/m<sup>2</sup>.

#### **10.2. Stanovenie vlastností nanovlákných membrán**

Morfológia nanovlákných membrán bola hodnotená zo snímok zhotovených na skenovanom elektrónovom mikroskope (SEM) na Ústave štruktúry a mechaniky hornín AV ČR (Praha, Česká Republika). Vzorky nanovlákného materiálu boli pozlátené a snímame na Quanta 450 skenovanom elektrónovom mikroskope (FEI, USA). Pre snímanie bolo použité vysoké vákuum (10<sup>-4</sup> Pa) a obrázky boli detegované na Everhart-Thornleyov detektor (ETD) v režime sekundárnych elektrónov pri urýchľovacom napätí 30 kV a zväčšení 1000x - 25 000x.

Priemer vlákien nanovlákných materiálov bolo vyhodnocovaný zo snímok SEM pomocou programu Atlas (Tescan Ltd., Brno, Česká Republika) a jeho hodnoty boli vyjadrované v nm.

### 10.3. Príprava vzoriek z nanovlákennej membrány z PLGA

Nanovláknenná membrána bola nastrihaná na štvorce o veľkosti 1 x 1 cm a upevnená do insertov CellCrown (Scaffdex Ltd., Fínsko) (Obr. 4). Požívane inserty boli rôznych priemerov (1; 1,4 a 2,5 cm) podľa požadovanej plochy materiálu pri jednotlivých pokusoch. Vzorky boli sterilizované v 70% etanole po dobu 30 minút. Po sterilizácii boli namočené v destilovanej vode po dobu 4-5 dní, aby sa z nich vyprali zbytky rozpúšťadla používaného pri príprave nanovláken. Voda sa menila každý deň.

Sterilné vzorky v kvetináčoch boli v laminárnom boxe vsadené do polystytenových kultivačných dosiek (TPP, Švajčiarsko). Podľa priemeru kvetináčov boli používané 24, 12 a 6 - jamkové dosky.



*Obr. 4: Inert CellCrown (Scaffdex Ltd., Fínsko) na uchytenie membrány a kultiváciu buniek.*

### 10.4. Kolagénové vrstvy na PLGA

Komerčne dostupný roztok kolagén I (BD biosciences, potkaní) bol nariedený v roztoku 0,02 M kyseliny octovej na výslednú koncentráciu 200 µg/ml. Roztok bol aplikovaný na vzorky (0,4 ml/vzorka, inserty o priemere 1 cm). Kolagén bol na vzorkách vyzrážaný v parách 25% amoniaku po dobu 3 minút. Roztok sa hneď po vyzrážaní odsal a vzorky sa 2x prepláchli deionizovanou vodou. Pred nasadením buniek sa vrstvy ponechali odpočívať v chladničke do druhého dňa.

### **10.5. Fibrínové vrstvy na PLGA**

Príprava fibrínových vrstiev je založená na rovnakom princípe, aký sa vyskytuje prirodzene v organizme pri zastavení krvácania. Na vzorky bol ako prvé aplikovaný vodný roztok fibrinogénu (Sigma-Aldrich, z ľudskej plazmy) nariadený v tlmivom roztoku TRIS-HCl (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl a 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> v destilovanej vode) na výslednú koncentráciu 10 µg/ml. Na každú vzorku bolo vždy aplikované 0,4 ml. Roztok bol po 1 hodine opatrne odsatý a vzorky boli dvakrát premývané tlmivým roztokom TRIS-HCl. Polymerizácia adsorbovaného fibrinogénu bola zahájená pridaním trombínu (Sigma-Aldrich, z ľudskej plazmy) riedeného v TRIS-HCl na výslednú aktivitu 2,5 U/ml. Po 15 minútovej inkubácii boli vzorky znovu oplachované v TRIS-HCl. Formovanie fibrínovej vrstvy bolo dokončené pridaním roztoku fibrinogénu o koncentrácii 200 µg/ml riedeného v TRIS-HCl a antitrombínu III (Biogenix s.r.o., Chromogenix, ľudský) o koncentrácii 0,5 U/ml riedeného v destilovanej vode na 1 hodinu. Fibrínová sieť bola vytvorená na základe katalytickej reakcie medzi trombínom zachyteným na povrchu a fibrinogénom rozptýleným v pridanom roztoku. Antitrombín III ukončil polymerizáciu zablokovaním nadbytočného trombínu.

### **10.6. Pridávanie fibronektínu k vrstvám**

V poslednom štádiu prípravy vrstiev bol na vybrané vzorky aplikovaný vodný roztok fibronektínu (Roche, ľudský) riedeného v fosfátovom tlmivom roztoku (PBS, Sigma-Aldrich) na výslednú koncentráciu 50 µg/ml. Vrstvy boli pred pridaním fibronektínu opláchnuté v PBS a na každú vzorku sa aplikovalo 0,4 ml roztoku, ktorý sa nechal pôsobiť cez noc. Fibronektín bol následne 2x opláchnutý PBS.

### **10.7. Kultivácia buniek na nanovlákennej membráne z PLGA**

Na vzorkách boli kultivované primárne ľudské dermálne fibroblasty (Lonza Ltd., Švajčiarsko) a ľudské dermálne keratinocyty línie HaCaT (CLS Cell Lines Service, Nemecko) (Boukamp *P a kol.*, 1988). Hustota nasadených buniek bola 10 000 buniek/cm<sup>2</sup>. Na počítanie buniek bol používaný Vi-CELL XR Analyser (Beckman Coulter), ktorý po pridaní trypanovej modrej na základe analýzy obrazu počíta množstvo živých a mŕtvych buniek v 1 ml suspenzie. Bunky boli kultivované v DMEM (z angl. Dulbecco's modified Eagle's Medium; Sigma-Aldrich, U.S.A.) s pridaným 10% fetálnym hovädzím sérom (FBS alebo FS; Sebak GmbH,

Nemecko) a gentamicínom o koncentrácii 40 µg/ml (LEK, Slovinsko). Pre 24-jamkove kultivačné dosky bol používaný objem média 1,5 ml/vzorka a pre 6-jamkove 6 ml/vzorka. Kultivácia prebiehala v inkubátore pri 37°C a vlhkej atmosfére s 5% CO<sub>2</sub> vo vzduchu. Experimenty boli robené 1., 3., 7., 10. a 14. deň a ako kontrola bola používaná polystyrénová kultivačná doštička alebo krycie sklo.

### **10.8. Morfológia kolagénových a fibrínových vrstiev s fibronektínom na PLGA**

Štruktúra vrstiev na membránach z PLGA bola hodnotená na základe imunofluorescenčného farbenia. Modifikované vzorky a nemodifikovaná membrána z PLGA boli ponorené na 20 minút do roztoku 1% hovädzieho albumínu v PBS, a následne na 20 minút do 1% Tweenu (Sigma-Aldrich) v PBS pri izbovej teplote, za účelom zablokovania nešpecifických väzbových miest. Vzorky boli vzápätí opláchnuté PBS a inkubované cez noc pri teplote 4°C s primárnou polyklonálnou protilátkou proti fibrinogénu (kráľičia, Dako, riedenie 1:200 v PBS), proti kolagénu I (myšia, Sigma-Aldrich, riedenie 1:200 v PBS) a proti fibronektínu (myšia, Sigma-Aldrich, riedenie 1:200 v PBS). Na druhý deň boli vzorky 2x opláchnuté PBS a inkubované po dobu 1 hodiny v tme a izbovej teplote so sekundárnou protilátkou z kozy (F(ab')<sub>2</sub> fragmenty z IgG, H + L) proti králičej protilátke v prípade fibrinogénu a proti myšej protilátke v prípade kolagénu I a fibronektínu. Sekundárna protilátka bola konjugovaná so zelenou fluorescenčnou farbičkou Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Life technologies) a bola nariedená v PBS v pomere 1:400. Vrstvy boli 2x opláchnuté PBS a následne fotené na vertikálnom konfokálnom mikroskope Leica TCS SPE DM2500 (objektív 40x/1.15 NA olej). Nemodifikované membrány boli používané ako kontroly nešpecifickej väzby primárnej alebo sekundárnej protilátky.

### **10.9. Proliferácia buniek na nanovlákných membránach z PLGA**

Rast buniek bol hodnotený na základe mitochondriálnej aktivity buniek, ktorá bola meraná v troch intervaloch kultivácie (1., 3. a 7. deň po nasadení buniek) pomocou Cell Proliferation Reagent WST-1 Assay (Roche). Na vyhodnotenie proliferácie buniek po 14. dňoch kultivácie bola používaná CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, Promega). Princíp týchto kvantitatívnych analýz je podobný a zakladá sa na enzymatickom mitochondriálnom rozštiepení tetrazoliových soli (WST-1 je slabo červená, MTS je žltá) na

formazan za súčasnej zmeny sfarbenie roztoku (WST-1 zmena na žltú, MTS na hnedú). Miera zmeny sfarbenia roztoku bola kvantifikovaná meraním absorbancie spektrofotometrom.

Z každej experimentálnej skupiny boli vždy tri vzorky s bunkami a jedna bez buniek (kontrola pozadia) premiestnené do čistej 24-jamkovej kultivačnej dosky, aby bunky adherované na dne jamky nemohli ovplyvňovať výsledky. Dno polystyrénovej kultivačnej dosky bolo používané ako kontrolný materiál, na ktorom bunky dobre rastú. Pri samotnej kvantitatívnej analýze sa postupovalo podľa protokolu od výrobcu. Doba inkubácie buniek v roztoku WST-1 (MTS) bola rôzna (max. 4 hodiny) v závislosti na množstve buniek odvíjajúceho sa od doby kultivácie a na type buniek. Rast buniek HaCaT nebol v 1. deň kultivácie vôbec meraný, pretože metabolická aktivita bola pod hladinou detekcie. Absorbancia bola meraná pomocou VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) v 96-jamkovej kultivačnej doske (F 96 Maxisorp, NUNC-Imunoplate) pri vlnovej dĺžke 440 nm (WST-1) a 490 nm (MTS).

#### **10.10. Adhézia a morfológia buniek na nanovlákných membránach z PLGA**

Rast a rozprestretie buniek na modifikovanej alebo čistej membráne z PLGA boli hodnotené pomocou fluorescenčného farbenia a vizualizácie buniek v troch vybraných časových intervaloch kultivácie (1., 3. a 7. deň po nasadení buniek). Červená fluorescenčná farbička (Texas Red C2-maleimide, Molecular Probes, Invitrogen) bola používaná pre znázornenie proteínov v bunke a modrá farbička (Hoechst #33258, Sigma-Aldrich) pre vizualizáciu bunečného jadra. Polystyrénová jamka 24-jamkovej kultivačnej dosky bola používaná ako kontrola proliferácie buniek.

Bunky boli opláchnuté v PBS a fixované v etanole vychladenom na  $-20^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minút. Fluorescenčné farbičky riedené v PBS boli aplikované na bunky v koncentrácii 5  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst #33258 a 20  $\text{ng/ml}$  Texas Red C2-maleimide na 1 hodinu, pri izbovej teplote a tme. Fotky boli zhotovené pomocou epifluorescenčného mikroskopu (Olympus IX 51, Japonsko, obj. 10x) vybaveným digitálnym fotoaparátom (DP 70, Japonsko).

Morfológia buniek na membráne z PLGA modifikovanej fibrínovými alebo kolagénovými vrstvami s fibronektínom bola imunofluorescenčne vizualizovaná v dvoch intervaloch kultivácie (3. a 7. deň po nasadení buniek).

Bunky boli fixované v etanole vychladenom na  $-20^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minút a následne opláchnuté PBS. Blokácia nešpecifických väzieb sa robila pomocou 1% hovädzieho albumínu s 0,1% Tritonom v PBS a následne pomocou 1% Tweenu. Pre farbenie vrstiev s bunkami bol používaný postup založený na aplikácii primárnych a sekundárnych protilátok (viď. kapitola 10.8.). Bunky na vrstvách boli farbené po dobu 1 hodiny Phalloidinom konjugovaným s tetrametylrodamiénom (TRITC, Sigma-Aldrich) riedeným v PBS 1:1000 na výslednú koncentráciu  $5\ \mu\text{g/ml}$ , ktorý farbí aktínový cytoskelet na červeno a Hoechstom #33258 riedeným v PBS 1:100 na koncentráciu  $10\ \mu\text{g/ml}$ . Vzorky boli opláchnuté PBS a fotené pomocou konfokálneho mikroskopu Leica TCS SPE DM2500 (objektív 40x/1.15 NA olej).

Adhézia keratinocytov línie HaCaT na modifikovanom a nemodifikovanom materiále bola hodnotená pomocou programu Atlas z fotiek zhotovených 1. deň kultivácie (Tescan Ltd., Brno, Česká Republika). Meraná bola plocha ostrovčekov (zhlukov buniek), ktoré keratinocyty línie HaCaT v kultúre bežne vytvárajú. Priemerná veľkosť ostrovčekov preto udáva mieru adhézie buniek na jednotlivých typoch vzoriek. Dáta sú prezentované vo forme aritmetický priemer  $\pm$  štandardná odchýlka priemeru (S.E.M.) zo 16 fotiek (230 – 780 meraní).

### **10.11. Viabilita buniek na nanovlákných membránach z PLGA**

Živé a mŕtve bunky boli vizualizované pomocou LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes<sup>®</sup> Life Technologies), ktorého princíp spočíva v schopnosti calceinu AM prestupovať semipermeabilnou membránou živých buniek a farbiť ich na zeleno a schopnosti etídiu homodimeru-1 (EthD-1) prestupovať cez zničenú membránu mŕtvych buniek a zafarbovať ich na červeno.

Vzorky boli postupne opatrne oplachované v PBS a farbené pripraveným roztokom calceinu AM o koncentrácii  $2 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}$  a EthD-1 o koncentrácii  $6 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}$ . Po 10 minútach v inkubátore boli bunky opláchnuté v PBS a fotené pomocou epifluorescenčného mikroskopu (Olympus IX 51, Japonsko, obj. 10x).

## 10.12. Stanovenie produkcie kolagénu I fibroblastami

Extracelulárna a intracelulárna produkcia kolagénu I fibroblastami bola vizualizovaná imunofluorescenčným farbením v troch časových intervaloch (7., 10. a 14. deň po nasadení buniek). Siedmy deň bol vybraný ako prvý interval merania na základe predchádzajúcich experimentov, v ktorých fibroblasty začali produkovať kolagén I až po dosiahnutí konfluencie. Ďalej bola stanovovaná relatívna expresia mRNA kolagénu I pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (RT-PCR) a celková proteosyntéza kolagénu I pomocou Sircol™ Soluble Collagen Assay (Biocolor Life Science Assays) 14. deň kultivácie buniek. Na základe imunofluorescenčného farbenia bol 14. deň kultivácie zvolený za najvhodnejší pre porovnanie produkcie kolagénu I fibroblastami na rôznych typoch vzoriek.

Na stimuláciu buniek k produkcii kolagénu typu I bola do polovice vzoriek 3., 7. a 10. deň kultivácie pridávaná trisodná soľ 2-fosfo-L-kyseliny askorbovej (AA) v koncentrácii 50 µg/ml. Produkcia kolagénu I bola sledovaná na nasledujúcich typoch vzoriek:

1. Nemodifikovaná membrána z PLGA
2. Nemodifikovaná membrána z PLGA kultivovaná v médiu s AA
3. Membrána z PLGA modifikovaná fibrínovou vrstvou
4. Membrána z PLGA modifikovaná fibrínovou vrstvou kultivovaná v médiu s AA
5. Jamka polystyrénovej kultivačnej dosky (pre RT-PCR a Sircol™ test) a krycie sklíčko (pre imunofluorescenčné farbenie)
6. Jamka polystyrénovej kultivačnej dosky (pre RT-PCR a Sircol™ test) a krycie sklíčko (pre imunofluorescenčné farbenie) kultivované v médiu s AA

### 10.12.1. Imunofluorescenčné farbenie kolagénu I

Imunofluorescenčné farbenie kolagénu I v bunke i mimo nej bolo robené na fixovaných vzorkách. Extracelulárny kolagén I, ktorý bunka vyprodukovala na povrch svojej membrány bol farbený na živých bunkách. Bunky boli kultivované na membráne z PLGA v 24-jamkovej kultivačnej doske. Krycie sklíčko bolo používané ako kontrolný materiál.

Pre vizualizáciu intracelulárneho aj extracelulárneho kolagénu I boli bunky premyté v PBS a fixované v etanole vychladenom na -20°C po dobu 10 minút. Nešpecifická väzba bola blokována inkubáciou vzoriek v roztoku 1% hovädzieho albumínu v PBS na 20 minút a následne v roztoku 1% Tweenu v PBS tiež na 20 minút. Po opláchnutí PBS boli vzorky inkubované cez

noc pri teplote 4°C v primárnej monoklonálnej protilátke proti kolagénu I (myšia, Sigma-Aldrich) riedenej v pomere 1:200 v PBS. Na druhý deň boli vzorky 2x premyté PBS a inkubované po dobu 1 hodiny v tme a izbovej teplote so sekundárnou protilátkou z kozy (F(ab')<sub>2</sub> fragmenty z IgG, H + L) proti myšej protilátke. Sekundárna protilátka bola konjugovaná so zelenou fluorescenčnou farbičkou Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Life technologies) a riedila sa PBS v pomere 1:400. Po oplachu boli vzorky fotené pomocou epifluorescenčného mikroskopu (Olympus IX 51, Japonsko, obj. 10x).

Pre farbenie extracelulárneho kolagénu I boli vzorky opatrne opláchnuté PBS s pridaným 5% FBS a následne na 30 minút inkubované v primárnej monoklonálnej protilátke proti kolagénu I (myšia, Sigma-Aldrich) riedenej v PBS 1:200. Celá inkubácia bola robená na ľade. Po oplachu 5% FBS v PBS boli bunky fixované roztokom 2% paraformaldehydu v PBS po dobu 20 minút. Vzorky boli opláchnuté PBS a na blokovanie nešpecifickej väzby bolo použité 1% FBS v PBS. Po premytí v PBS boli vzorky 2 hodiny v tme inkubované v sekundárnej protilátke z kozy (F(ab')<sub>2</sub> fragmenty z IgG, H + L) proti myšej protilátke. Sekundárna protilátka bola konjugovaná so zelenou fluorescenčnou farbičkou Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Life technologies) a riedila sa roztokom 1% FBS v PBS v pomere 1:1000. Bunky boli opláchnuté a jadra buniek boli nafarbené farbičkou Hoechst #33342, ktorý prechádza aj cez neporušenú bunecnú membránu. Produkcia kolagénu I bola snímaná pomocou konfokálneho mikroskopu Leica TCS SPE DM2500 (obj. 40x/1.15 NA olej).

### **10.12.2. Stanovenie proteosyntézy kolagénu I**

Celkové množstvo naprodukovaného kolagénu I bunkou, extracelulárneho aj intracelulárneho, bolo stanovované Sircol<sup>™</sup> Soluble Collagen Assay ( Biocolor Life Science Assays) 14. deň po nasadení buniek. Kvantifikácia kolagénu I pomocou Sircolu<sup>™</sup> testu bola robená iba na vzorkách kultivovaných v médiu s pridanou AA. Bunky kultivované v médiu bez pridávania AA neprodukovali kolagén ako extracelulárnu matrix von z bunky v dostatočnom množstve potrebnom pre detekciu pomocou Sircolu<sup>™</sup> testu. Kultivácia bola robená v 6-jamkových kultivačných doskách. Princípom Sircolu<sup>™</sup> testu je väzba farbiva na kolagén rozpustený v pepsíne s kyselinou octovou. Sircol<sup>™</sup> reakčné činidlo sa viaže na [Gly-X-Y] helikálnu štruktúru, ktorú môžeme nájsť vo všetkých typoch kolagénov.



Membrána z PLGA s bunkami bola vybraná z insertov a premiestnená do čistej kultivačnej dosky. Polystyrénová jamka kultivačnej dosky bola používaná ako kontrolný materiál. Vzorky bez buniek boli potrebné pre kontrolu pozadia. Na pokus boli používané štyri nezávislé vzorky z každej skupiny. Kolagén bol rozštiepený enzymatickým natrávením pomocou pepsínu v kyslom prostredí. Bunky na membráne a na polystyréne boli opláchnuté v PBS a v 1 ml roztoku pepsínu (1 mg/ml riedený v 0,5 M kyseline octovej) a následne zoškriabané pomocou škrabky na bunky. Lyzácia prebiehala cez noc pri 4°C. Lyzát bol centrifugovaný a supernatant zakoncentrovaný podľa postupu od výrobcu. Na koniec bola farbička Sircolu™ naviazaná na izolovaný kolagén I a rozsuspendovaná v rovnakom objeme roztoku. Absorbancia bola meraná na pomocou spektrofotometra VersaMax ELISA Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) v 96-jamkovej kultivačnej doske (F 96 Maxisorp, NUNC-Imunoplate) pri vlnovej dĺžke 555 nm. Množstvo kolagénu I bolo vyjadrené v  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Celková produkcia kolagénu I bola vzťahovaná na mitochondriálnu metabolickú aktivitu buniek meranú v 14. deň inkubácie pomocou MTS testu. Dáta sú prezentované vo forme aritmetický priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD) z 3 experimentálnych meraní v 1 biologickom experimente.

### **10.12.3. Stanovenie relatívnej expresie génu pre kolagén I**

Bunky boli lyzované 14. deň kultivácie a celkové množstvom mRNA bolo izolované pomocou Total RNA Purification Micro Kitu (Norgen Biotek) podľa protokolu od výrobcu. Bunky boli opláchnuté v PBS a následne bola celá PLGA membrána premiestnená do 1,5 ml ependorfky. Pre izoláciu RNA bol používaný lyzačný roztok obohatený o 1% 2-merkaptóetanol. Bunky na polystyréne boli lyzované priamo na kultivačnej doske. Dve sady vzoriek (biologické duplikáty) boli izolované zvlášť pre časovú náročnosť izolácie.

Pre reverznú transkripciu bol používaný Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen) a random hexaméry (New England Biolabs, Inc) podľa návodu od výrobcu.

Množstvo mRNA bolo kvantifikované pomocou Real-time 5xHOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (ROX, Solis BioDyne) a TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies) značeným FAM reportérovou farbičkou špecifickou pre ľudský kolagén (COL1A1 - Hs00164004\_m1) označovaný ako cieľový gén. Ako referenčný gén bol používaný glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH - Hs02758991\_g1). Finálny reakčný objem bol

20 µl na jednu jamku. Reakcia prebiehala v 96-jamkovej reakčnej doske pomocou iQ5 Multicolor RT-PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Amplifikácia prebiehala pri nasledujúcich podmienkach: uracil-DNA glykozilázová (UDG) inkubácia 2 minúty pri 50°C, iniciálna aktivácia enzýmu DNA polymerázy 10 minút pri 95°C, 50 cyklov denaturácie po dobu 15 sekúnd pri 95°C a na koniec chladenie - predlžovanie pri teplote 60°C po dobu 1 minúty.

Dáta sú prezentované vo forme aritmetický priemer  $\pm$  SD z 8 experimentálnych meraní v 2 biologicky nezávislých experimentoch. Expresia génu bolo vypočítaná zo získaných hodnou prahových cyklov ( $C_t$ ). Expresia cieľového génu COL1A1 je relatívna v pomere k expresii génu referenčného GAPDH. Relatívna expresia génu bola teda vyčíslená ako  $2^{-\Delta C_t}$ , kde  $\Delta C_t$  predstavuje rozdiel medzi hodnotami  $C_t$  cieľového génu a génu GAPDH pre každú vzorku zvlášť.

### **10.13. Štatistika**

Pokiaľ nie je v texte uvedené inak, tak sú kvantitatívne dáta prezentované vo forme aritmetický priemer  $\pm$  SD pre štyri nezávislé vzorky z každej experimentálnej skupiny a časového intervalu. Štatistická významnosť bola hodnotená na základe výsledkov z analýzy rozptylu (ANOVA), použitím Student-Newman-Keulsovej metódy. Za štatisticky významný výsledok bol považovaný výsledok s hodnotou  $p \leq 0,05$ .

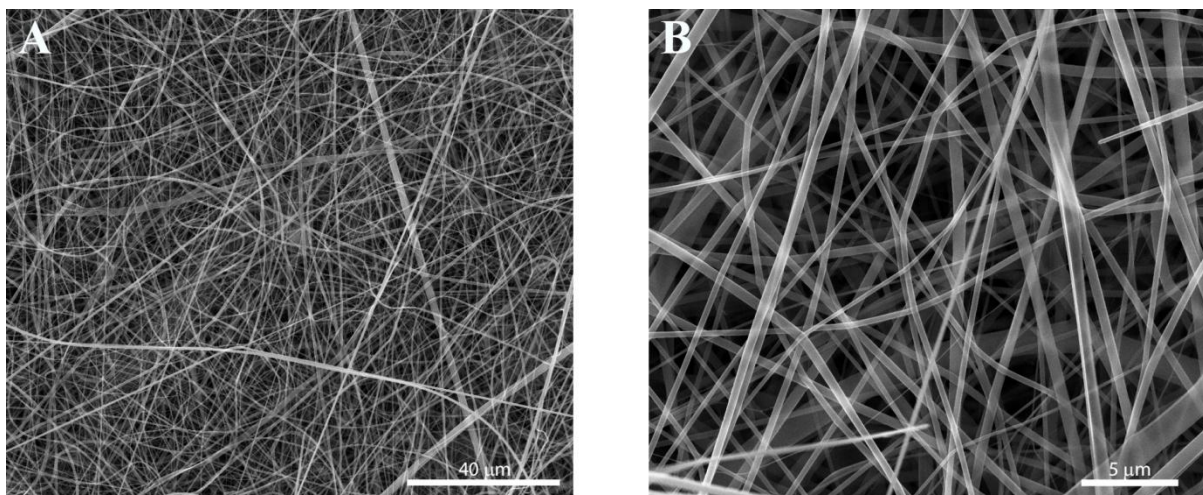
## 11. Výsledky

### 11.12. Štruktúra nanovlákennej membrány z PLGA

Morfológiu nemodifikovanej nanovlákennej membrány z PLGA stanovenej pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM) je možné vidieť na Obr. 5. Nanovlákenné membrány pozostávali prevažne s rovných a náhodne usporiadaných vláken. Povrch jednotlivých vláken bol hladký a ich priemer sa pohyboval vo veľkom rozmedzí od desiatok nm až do 2  $\mu\text{m}$ . Priemerná šírka vláken bola okolo  $341 \pm 203$  nm (Tab. 1). Znamená to, že povrchová drsnosť materiálov bola skôr v submikrórovej mierke, než v nanomierke, pretože za nanoštruktúru sa považuje veľkosť štruktúry do 100 nm.

*Tabuľka 1: Morfológické parametre membrán z PLGA. Priemer  $\pm$  SD z 12 SEM fotiek (1 851 meraní).*

|  |               |
|--|---------------|
| Hustota vláken ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) | 10,5 – 19,6   |
| Priemer vláken, priemer $\pm$ SD (nm)    | $341 \pm 203$ |
| Rozmedzie šírky vláken (nm)              | 28 – 2 054    |

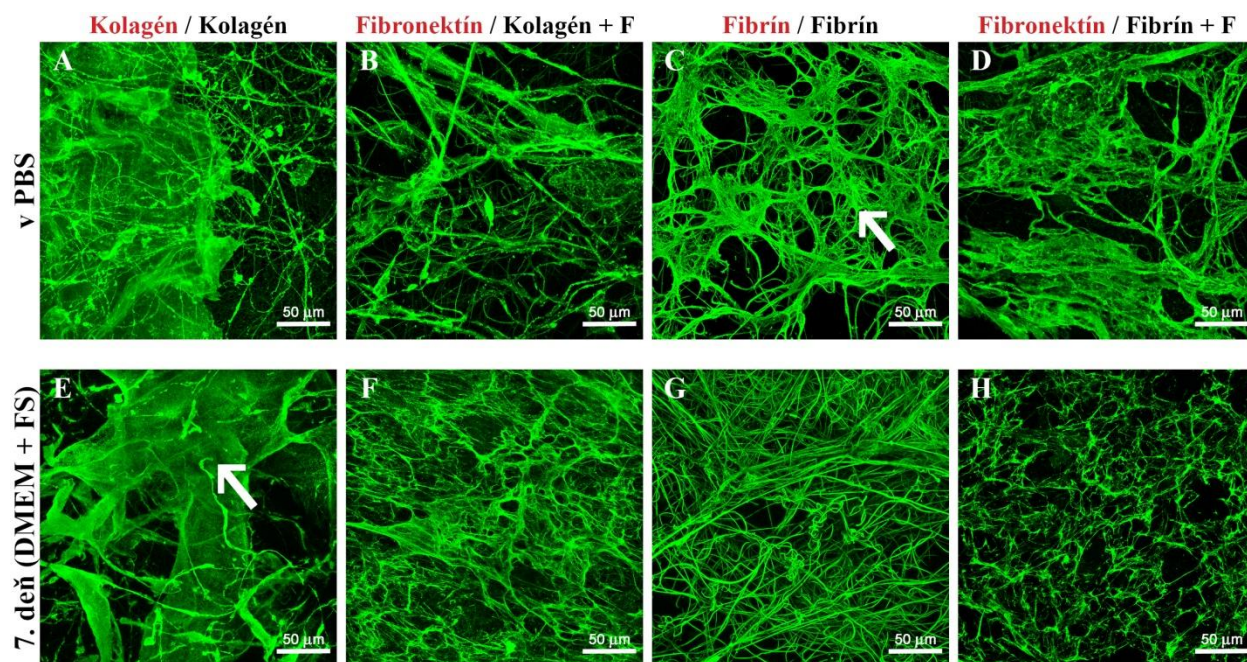


*Obr. 5: SEM fotky nemodifikovanej membrány z PLGA. Zväčšenie 2 000x, mierka 40  $\mu\text{m}$  (A); zväčšenie 10 000x, mierka 5  $\mu\text{m}$  (B). Quanta 450 skenovací elektrónový mikroskop (FEI, USA).*

### 11.13. Morfológia fibrínových a kolagénových vrstiev na membráne z PLGA

Nanovláknena membrána z PLGA bola modifikovaná vrstvou kolagénu a fibrínu a u niektorých vzoriek bol aplikovaný aj fibronektín. Morfológia vrstiev bola vizualizovaná imunofluorescenčným farbením. Kolagén obaloval jednotlivé vlákna z PLGA alebo vo vyšších vrstvách membrány vytváral gélovú štruktúru (Obr. 6; A a E), zatiaľ čo fibrín po obalení jednotlivých vlákien (Obr. 6; G) vytváral vo vrchných vrstvách štruktúru podobnú sieti (Obr. 6; C). Fibronektín sa pravdepodobne adsorboval na povrch jednotlivých vrstiev, a preto jeho morfológia často kopírovala morfológiu samotných vrstiev (Obr. 6; B, F a D, H).

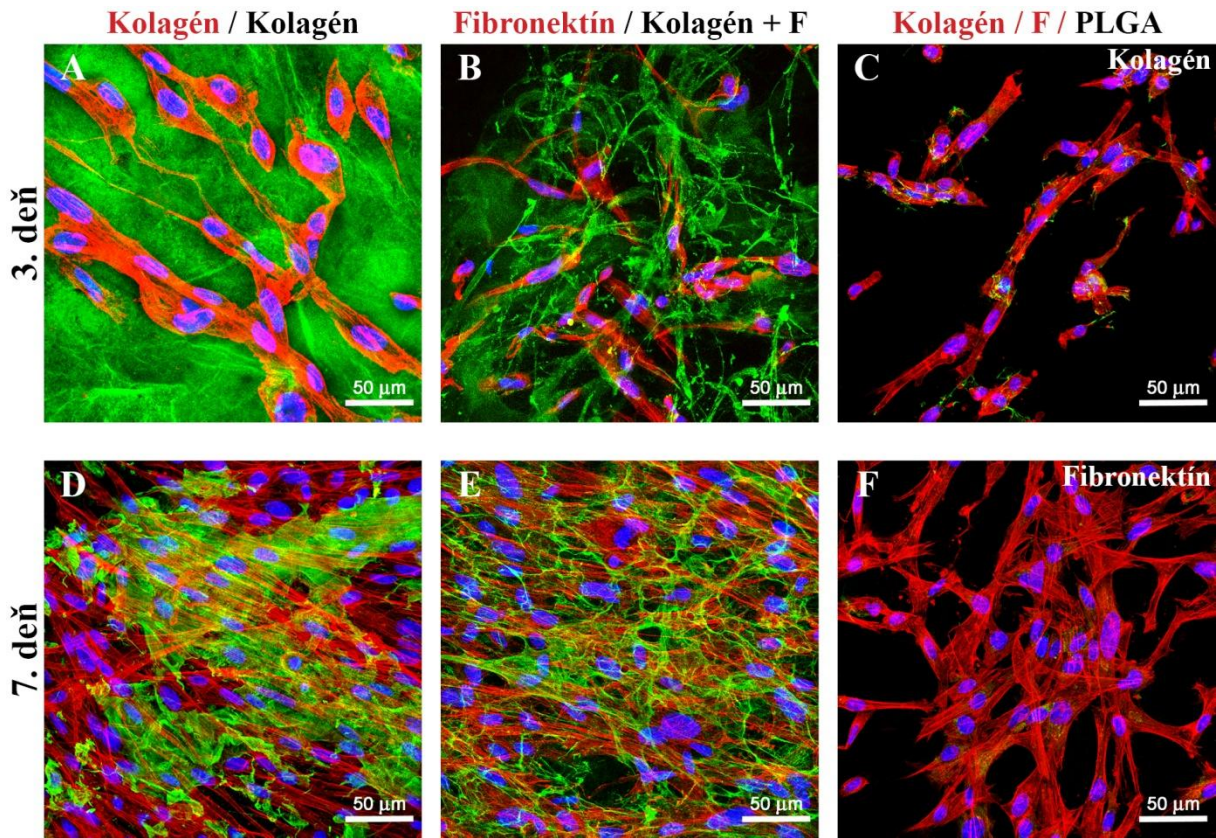
Stabilita vrstiev v čase bola sledovaná po dobu 7 dní na vzorkách inkubovaných v kultivačnom médiu DMEM, umiestených v termostate s teplotou 37°C. Výsledky imunofluorescenčného farbenia ukázali, že kolagénové ani fibrínové vrstvy nepodliehajú svojvoľnej degradácii (Obr. 6; E – H).



**Obr. 6: Morfológia kolagénových a fibrínových vrstiev bez/s fibronektínom na membránach z PLGA. Pridávanie fibronektínu (F). Imunofluorescenčné farbenie vrstiev pomocou primárnej a sekundárnej protilátky. Vrstvy inkubované v PBS (A - D); vrstvy inkubované 7 dní v DMEM s FS (E - H). Červené označenia pred lomítkom predstavujú použité primárne protilátky (proteín, ktorý je nafarbený na fotke); tmavé označenie za lomítkom predstavuje typ modifikácie. Šípky označujú kolagénový gél (E); fibrínovú sieť (C). Leica TCS SPE DM2500 konfokálny mikroskop; obj. 40x/1.15 NA, mierka 50 µm.**

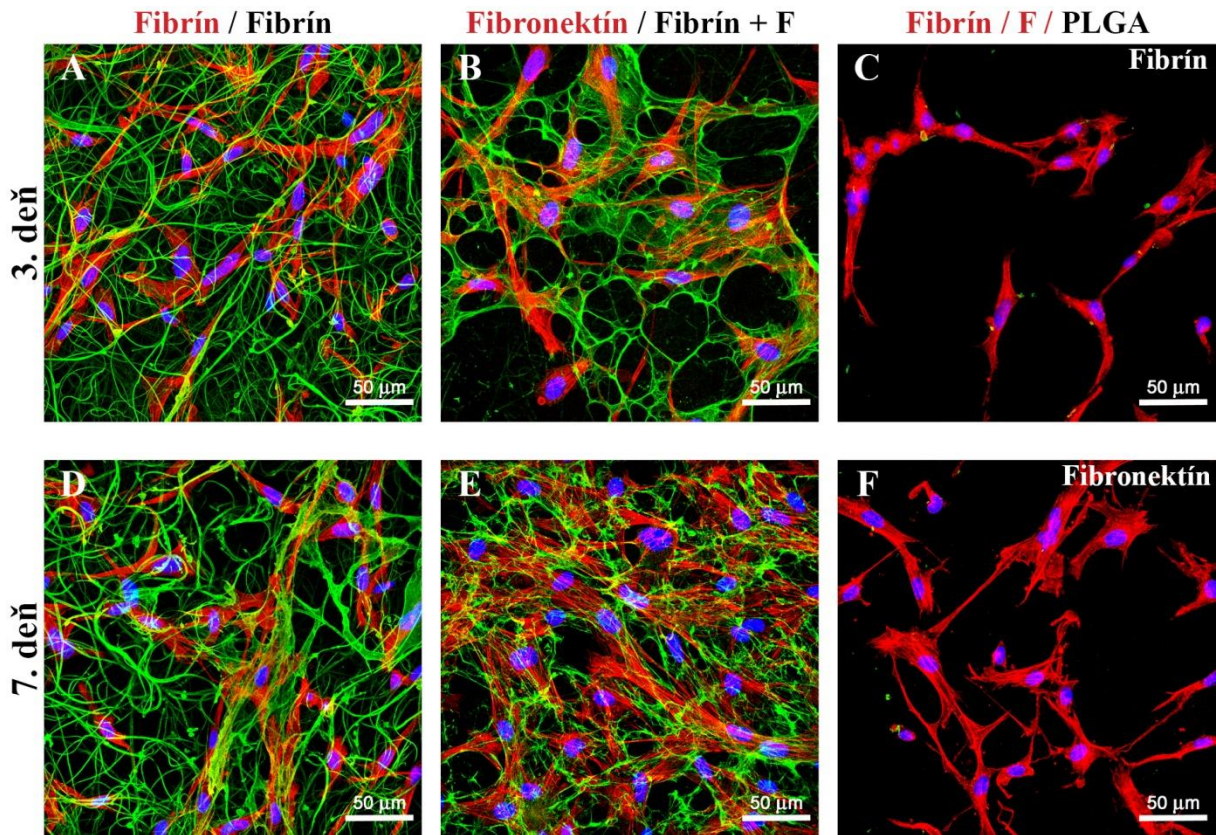
### 11.14. Morfológia fibroblastov na modifikovanej membráne z PLGA

Adhézia, proliferácia a hlavne morfológia ľudských dermálnych fibroblastov na modifikovanej membráne z PLGA bola sledovaná v dvoch časových intervaloch (3. a 7. deň po nasadení buniek) pomocou imunofluorescenčného farbenia. Pre kontrolu nešpecifickej väzby primárnej protilátky boli používané nemoifikované vzorky a vzorky inak modifikované. Žiadna nešpecifická väzba nebola preukázaná (Obr. 7).



**Obr. 7:** Fibroblasty na kolagénom modifikovanej (A, B a D, E) a nemoifikovanej (C a F) membráne z PLGA. Kultivácia buniek v DMEM s FBS, pridávanie fibronektínu (F), vizualizácia v 2 intervaloch (3. a 7. deň). Imunofluorescenčné farbenie vrstiev pomocou primárnej a sekundárnej protilátky (zelená). Červené označenia pred lomítkom predstavujú použité primárne protilátky (protein, ktorý je nafarbený na fotke); tmavé označenie za lomítkom predstavuje typ modifikácie. Bunky farbené Phalloidinom (cytoskelet - červená) a Hoechstom #33258 (jadra - modrá). Leica TCS SPE DM2500 konfokálny mikroskop; obj. 40x/1.15 NA, mierka 50 µm.

Adhúzia buniek na nanovláknennú membránu z PLGA modifikovanú kolagénom bola vyššia (Obr. 7; A) v porovnaní s nemodifikovaným materiálom (Obr. 7; C). Rozdiel bol hlavne v morfológii fibroblastov. Na kolagéne boli bunky viac rozprestreté (Obr. 7; A), čo bolo vidieť na obrázkoch už 3. deň po nasadení buniek. Medzi morfológiou buniek na kolagéne a na kolagéne s pridaným fibronektínom nebol pozorovaný veľký rozdiel (Obr. 7; D vz. E). Proliferácia buniek na kolagéne a tiež na kolagéne s fibronektínom (Obr. 7; D a E) bola vyššia v porovnaní s materiálom nemodifikovaným (Obr. 7; F) čo je možné sledovať 7. deň kultivácie.



**Obr. 8:** Fibroblasty na fibrínom modifikovanej (A, B a D, E) a nemodifikovanej (C a F) membráne z PLGA. Kultivácia buniek v DMEM s FBS, pridávanie fibronektínu (F) vizualizácia v 2 intervaloch (3. a 7. deň). Imunofluorescenčné farbenie vrstiev pomocou primárnej a sekundárnej protilátky (zelená). Červené označenia pred lomítkom predstavujú použité primárne protilátky (protein, ktorý je nafarbený na fotke); Tmavé označenie za lomítkom predstavuje typ modifikácie. Bunky farbené Phalloidinom (cytoskelet - červená) a Hoechstom #33258 (jadra - modrá). Leica TCS SPE DM2500 konfokálny mikroskop; obj. 40x/1.15 NA, mierka 50 µm.

Iniciálna adhézia fibroblastov bola na membráne z PLGA pokrytej fibrínovou sieťou lepšia než na nemodifikovanej membráne (Obr. 8; A vz. C). Na membránach bez fibrínu boli bunky menej rozprestrené a ich proliferácia bola výrazne spomalená, čo je možné vidieť už na fotkách z 3. dňa kultivácie (Obr. 8; C). Siedmy deň po nasadení boli fibroblasty na nemodifikovanom materiále už viac rozprestrené (Obr. 8; F), ale ich počet výrazne zaostával za počtom buniek na membráne z PLGA modifikovanej fibrínom (Obr. 8; D). Fibronektín sa špecificky viaže na fibrín a obsahuje ligandy pre integrínové receptory buniek. Na fibrínový povrch poťahovaný fibronektínom bunky dobre adherovali (Obr. 8; B) a už na prvý pohľad boli viac rozprestrené jak do dĺžky tak do šírky. Po 7 dňoch kultivácie rástli bunky na modifikovanej membráne v prítomnosti fibronektínu (Obr. 8; E) lepšie ako na membráne modifikovanej samotným fibrínom, na ktorom boli bunky tiež rozprestreté, ale skôr do dĺžky (Obr. 8; D).

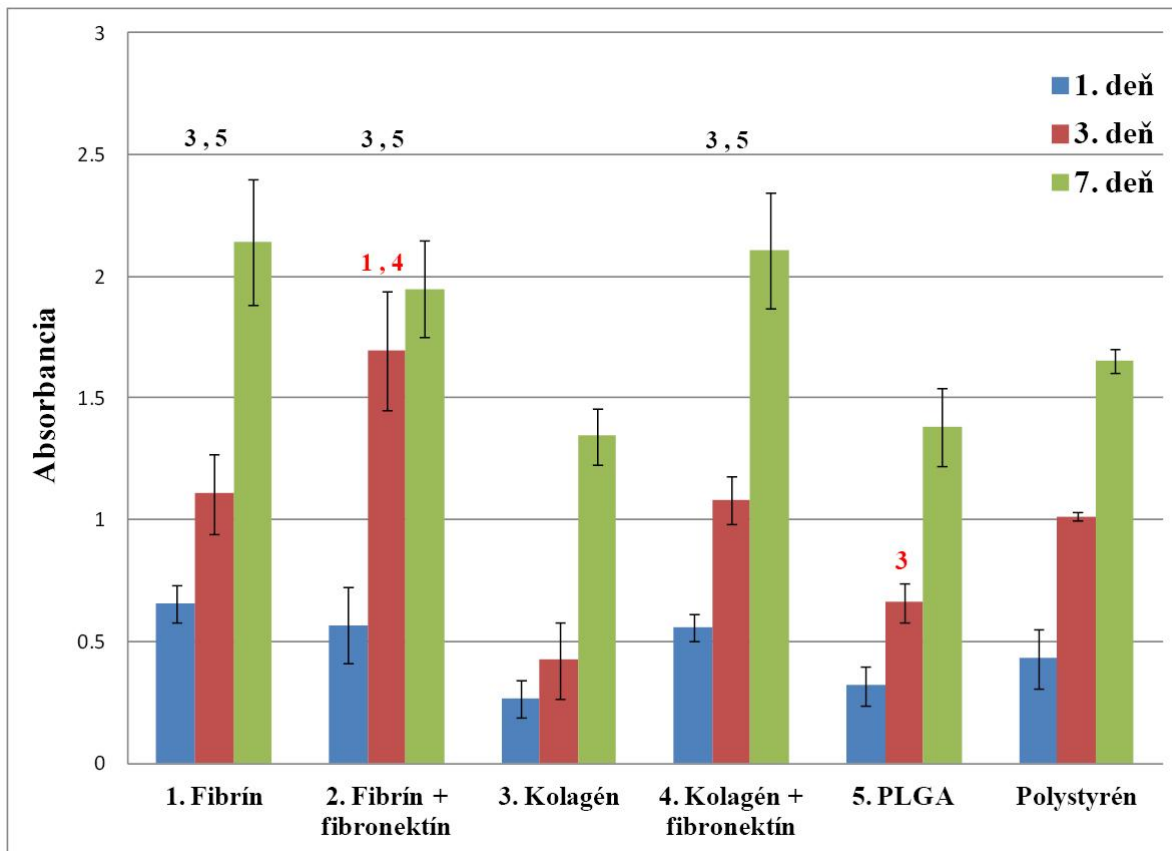
Správanie fibroblastov na fibrínovej vrstve v porovnaní s kolagénom bolo odlišné. Bunky viac migrovali do fibrínovej siete a prerastali smerom do vnútra membrány (Obr. 8; A a D), zatiaľ čo u kolagénu ležali skôr na povrchu gélovej kolagénovej štruktúry (Obr. 7; A a D).

V prílohe 1 je možné pozorovať morfológiu buniek na materiále modifikovanom kolagénom s fibronektínom, pričom kolagén na fotkách bol farbený protilátkami na zeleno. Kolagénový gél sa na niektorých miestach membrány odlupoval (Príloha 1; C a D), čo malo za následok stratu adherovaných buniek (Príloha 1; D). Gélová štruktúra kolagénu navyše zhoršovala samotnú adhéziu buniek.

V prílohe 2 je možné vidieť bunky na materiále modifikovanom fibrínom s fibronektínom, pričom imunofluorescenčne nafarbený bol fibrín (zelená). Rozprestretie buniek tu podporoval fibronektín, tak ako to bolo popisované už vyššie (Príloha 2; C a D).

### 11.15. Adhézia, proliferácia a metabolická aktivita fibroblastov na membráne

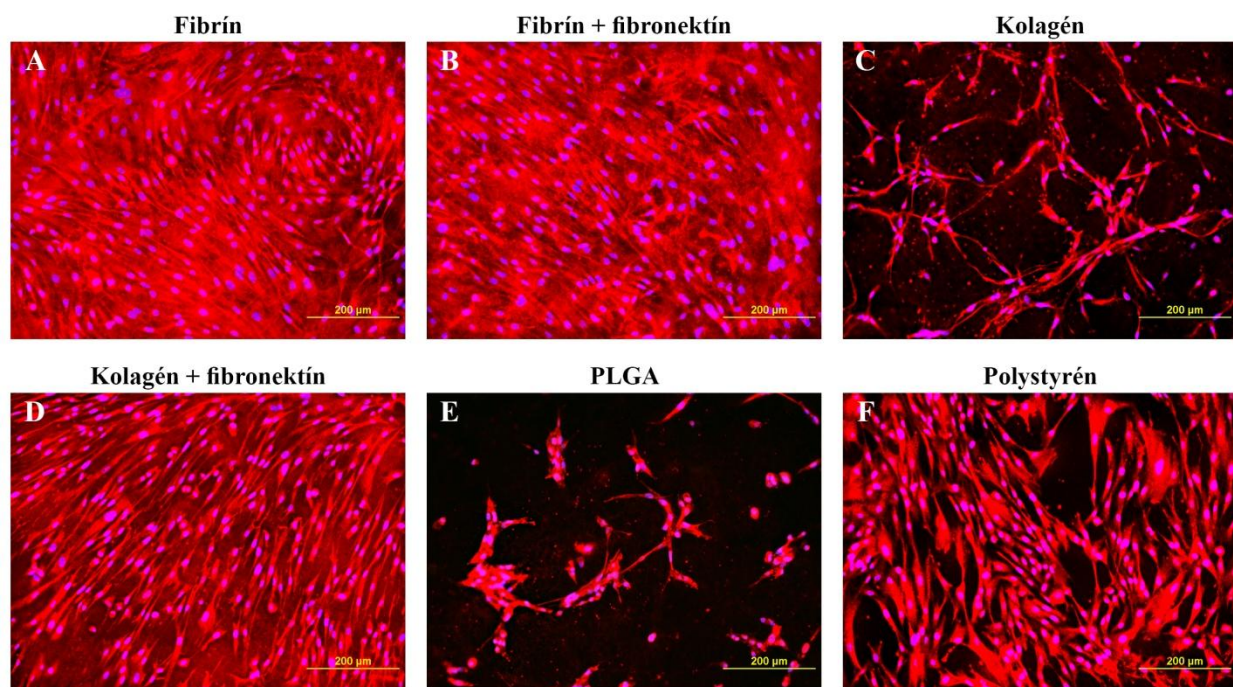
Metabolická mitochondriálna aktivita ľudských dermálnych fibroblastov bola kvantitatívne stanovovaná pomocou WST-1 testu v troch časových intervaloch (1., 3. a 7. deň po nasadení buniek). Na základe výsledkov metabolického testu bola hodnotená proliferácia fibroblastov na modifikovanom a nemodifikovanom materiále z PLGA (Graf 1).



**Graf 1: Mitochondriálna aktivita ľudských dermálnych fibroblastov na membráne z PLGA stanovená pomocou WST-1 testu.** Kultivácia buniek v DMEM s FBS, meranie v 3 intervaloch (1., 3. a 7. deň). Na modifikovanej membráne (1. - 4.); nemodifikovanej membráne (5.) a na polystyréne (dno jamky kultivačnej doštičky) ako kontrolný materiál. Absorbancia (440 nm). Aritmetický priemer  $\pm$  SD z 9 meraní na 3 nezávislých vzorkách pre každú experimentálnu skupinu a časový interval; ANOVA, Student-Newman-Keuls metóda, štatistická významnosť ( $p \leq 0.05$ ): v porovnaní s danou experimentálnou skupinou označenou číslom skupiny nad stĺpcom grafu vo všetkých časových intervaloch (čierne označenie), v určitom časovom intervale (červené označenie).



Z grafu je možné vidieť, že u modifikácií fibrínom, fibrínom s fibronektínom a kolagénom s fibronektínom bola metabolická aktivita buniek signifikantne vyššia vo všetkých troch intervaloch (Graf 1; stĺpec 1, 2 a 4) v porovnaní s nemodifikovaným materiálom z PLGA (Graf 1, stĺpec 5). Metabolická aktivita na kolagénom upravených membránach (Graf 1; stĺpec 3) bola signifikantne nižšia od ostatných modifikácií (Graf 1; stĺpec 1, 2 a 4) a zároveň porovnateľná s nemodifikovaným materiálom (Graf 1; stĺpec 5). Tretí deň po nasadení buniek bola metabolická aktivita na membráne s kolagénom dokonca signifikantne nižšia v porovnaní s membránou nemodifikovanou (Graf 1; stĺpec 3 vz. 5). Ďalej výsledky metabolického testu ukazujú, že metabolická aktivita fibroblastov na membráne modifikovanej fibrínom s fibronektínom (Graf 1; stĺpec 2) bola v 3. deň inkubácie signifikantne vyššia v porovnaní s membránou modifikovanou fibrínom alebo kolagénom s fibronektínom (Graf 1; stĺpec 1 a 4). V ostatných časových intervaloch bola na týchto troch typoch modifikovaných membrán metabolická aktivita buniek porovnateľná.

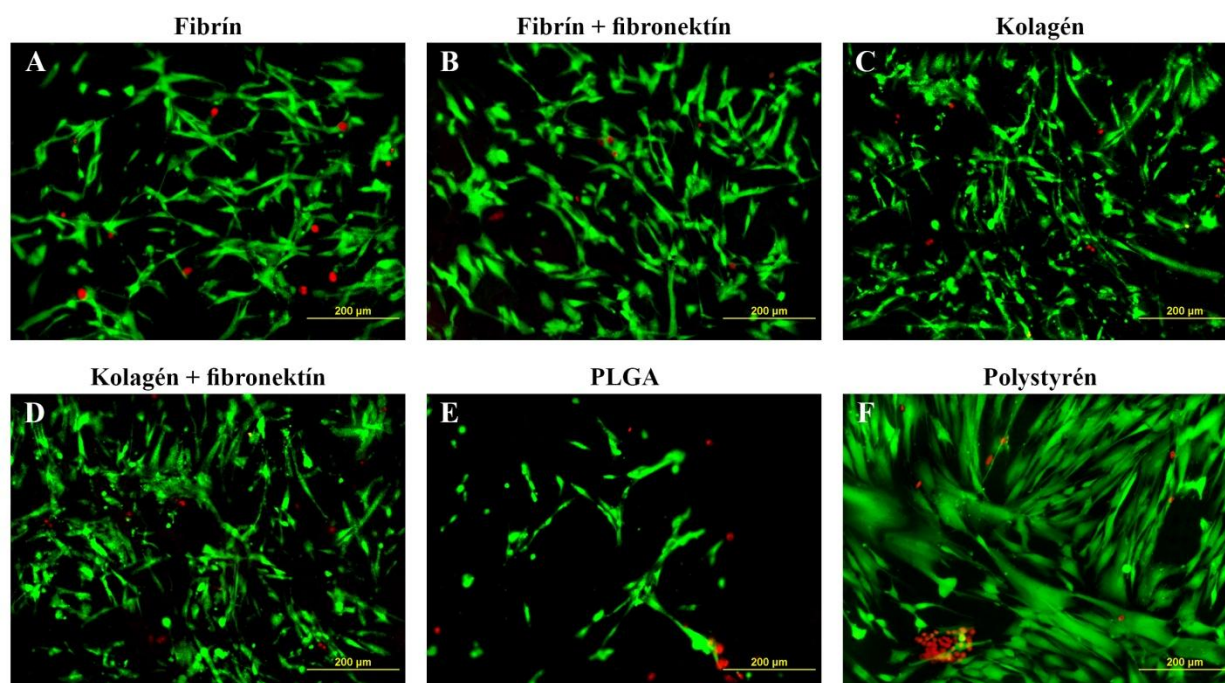


**Obr. 9:** Adhézia, morfológia a proliferácia ľudských dermálnych fibroblastov na membráne z PLGA. Kultivácia buniek v DMEM s FBS, vizualizácia 3. deň po nasadení na modifikovanej membráne (A - D); nemodifikovanej membráne (E) a na polystyréne (dno jamky kultivačnej doštičky) ako kontrolný materiál (F). Bunky farbené s Texas Red C2-Maleimide (proteíny v bunke - červená) a Hoechstom #33342 (jadra - modrá). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10 x, digitálna kamera DP 70, mierka 200 µm.

Adhézia, morfológia a hlavne rozdiely v proliferácii buniek boli zároveň sledované pomocou fluorescenčného farbenia vo všetkých troch intervaloch (1., 3. a 7. deň po nasadení buniek) (Príloha 3; A). Avšak tretí deň po nasadení buniek je možné pozorovať rozdiely v proliferácii fibroblastov medzi jednotlivými modifikáciami najlepšie (Obr. 9). Bunky sú už dobre adherované a sú vo fázy proliferácie, ale nie sú ešte úplne konfluentné tak, ako to je 7. deň kultivácie (Príloha 3; A). Z fotiek je možné vidieť, že materiál modifikovaný fibrínom s fibronektínom najvýraznejšie podporoval proliferáciu buniek (Obr. 9; B), zatiaľ čo na kolagéne bol rast buniek výrazne spomalený (Obr. 9; C). Rovnako ako v metabolickom teste (Graf 1) je aj na fotkách vidieť veľký rozdiel medzi materiálom nemodifikovaným (Obr. 9; E) a modifikovaným (Obr. 9; A - D). Okrem modifikácie samotným kolagénom bola u ostatných modifikácii zaznamenaná zvýšená proliferácia buniek hneď po adhézii. Ich morfológia bola viac fyziologická, tj. bunky boli oveľa viac rozprestreté a vytvárali väčšie množstvo kontaktov medzi sebou. Fibronektín obecné zlepšoval adhéziu a tiež proliferáciu, čo je možné vidieť hlavne pri porovnávaní vzoriek modifikovaných samotným kolagénom (Obr. 9; C) a kolagénom s fibronektínom (Obr. 9; D).

### 11.16. Viabilita fibroblastov na membráne z PLGA

Viabilita ľudských dermálnych fibroblastov bola sledovaná pomocou testu LIVE/DEAD® vo všetkých troch intervaloch (1., 3. a 7. deň po nasadení buniek) (fotky nie sú zobrazené). Na fotkách je možné vidieť, že väčšina buniek na všetkých vzorkách bola živá, tj. viabilita bola takmer 100% (Obr. 10).



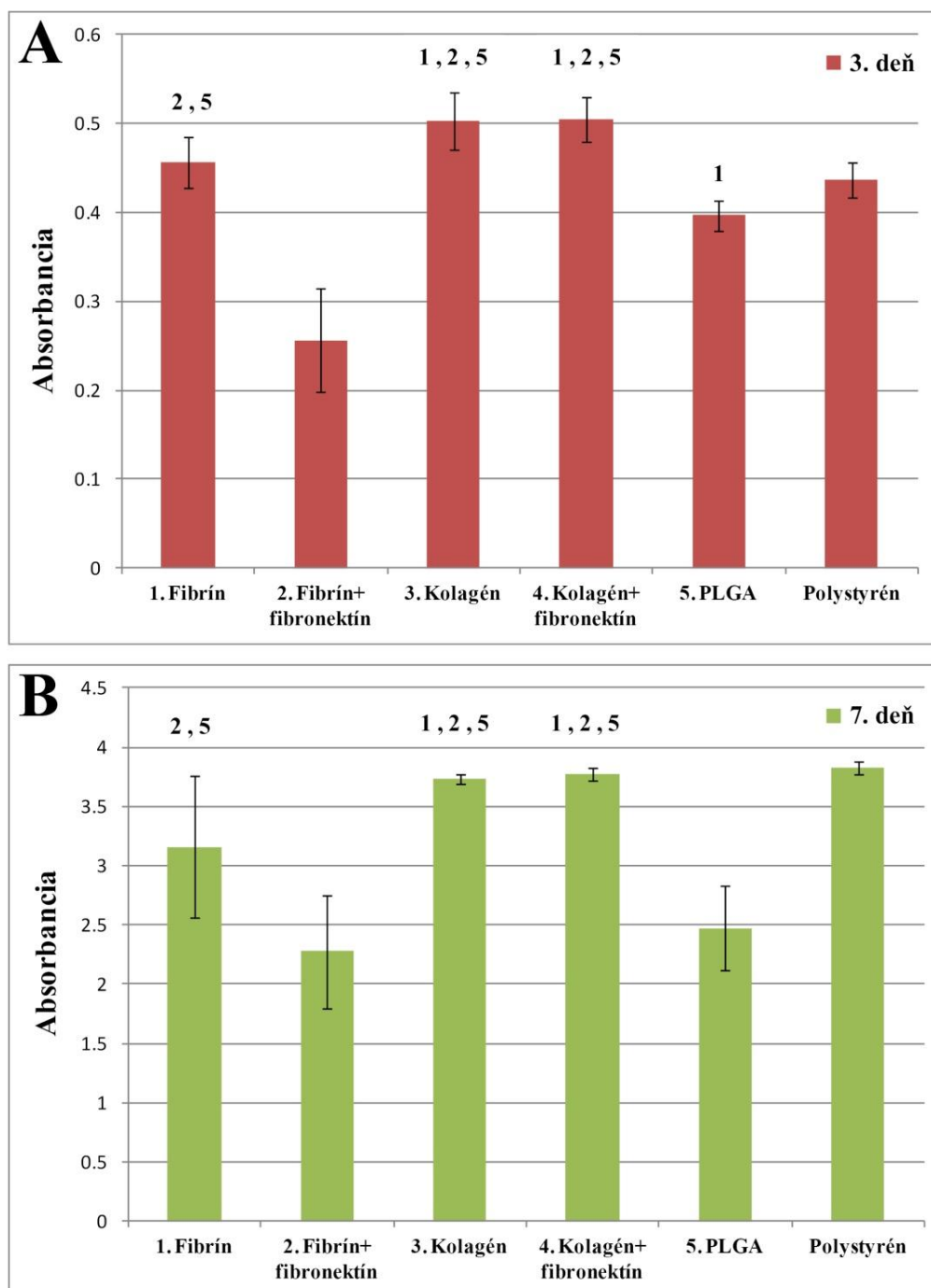
*Obr. 10: Viabilita ľudských dermálnych fibroblastov na membráne z PLGA stanovená pomocou LIVE/DEAD® testu. Kultivácia buniek v DMEM s FBS, vizualizácia 3. deň po nasadení na modifikovanej membráne (A - D); nemoďikovanej membráne (E) a na polystyréne (dno jamky kultivačnej doštičky) ako kontrolný materiál (F). Bunky farbené pomocou calceinu AM (zelená - živé bunky) a EthD-1 (červená - mŕtve bunky). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10 x, digitálna kamera DP 70, mierka 200 µm.*

### 11.17. Adhézia, proliferácia a metabolická aktivita keratinocytov na membráne

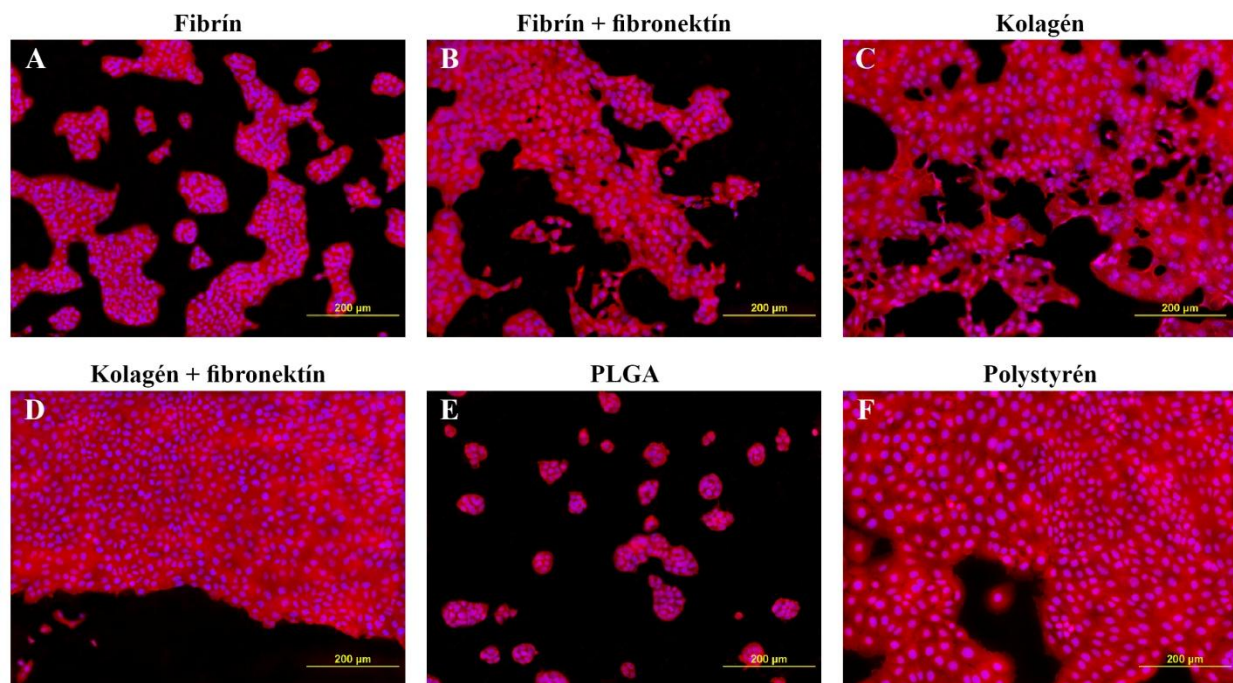
Rovnako ako pri fibroblastoch aj pri keratinocytoch línie HaCaT bola metabolická aktivita stanovovaná pomocou WST-1 testu, avšak iba v dvoch časových intervaloch (3. a 7. deň po nasadení buniek) (Graf 2). Naše predchádzajúce experimenty ukázali, že 1. deň po nasadení keratinocytov línie HaCaT je metabolická aktivita adherovaných buniek pod hranicou detekcie.

Na rozdiel od fibroblastov (Graf 1) bola u keratinocytov línie HaCaT metabolická aktivita v oboch intervaloch na vzorkách modifikovaných kolagénom (Graf 2; stĺpec 3) signifikantne vyššia od modifikácii fibrínom a fibrínom s fibronektínom (Graf 2; stĺpce 1, 2) a zároveň porovnateľná s materiálom modifikovaným kolagénom s fibronektínom (Graf 2; stĺpec 4). Ďalej výsledky metabolického testu ukazujú, že metabolická aktivita keratinocytov na membráne z PLGA modifikovanej fibrínom s fibronektínom (Graf 2; stĺpec 2) bola v oboch intervaloch signifikantne nižšia od ostatných modifikácii (Graf 2; stĺpec 1, 3 a 4) a dokonca v 3. deň inkubácie bola signifikantne nižšia aj od nemoifikovaného materiálu (Graf 2; A; stĺpec 5). Tento rozdiel sa však v 7. deň merania už neobjavil, tj. metabolická aktivita buniek na nemoifikovanom materiále (Graf 2; B; stĺpec 5) bola porovnateľná s aktivitou buniek na membráne z PLGA modifikovanej fibrínom s fibronektínom (Graf 2; B; stĺpec 2). Fibronektín v prípade keratinocytov línie HaCaT nepôsobil tak stimulačne na proliferáciu buniek, ako to bolo u ľudských dermálnych fibroblastov (Graf 1), čo je možné vidieť hlavne na vzorkách modifikovaných fibrínom (Graf 2; stĺpec 1), na ktorých bol rast buniek signifikantne vyšší v oboch intervaloch v porovnaní s modifikáciou fibrínom s fibronektínom (Graf 2; stĺpec 2).

Adhézia, morfológia a proliferácia ľudských dermálnych keratinocytov línie HaCaT bola sledovaná tiež pomocou fluorescenčného farbenia vo všetkých troch intervaloch (1., 3. a 7. deň po nasadení buniek) (Príloha 3; B). Rovnako ako u fibroblastov je aj u keratinocytov možné pozorovať najviac rozdielov v 3. deň inkubácie (Obr. 11). Na fotkách je možné vidieť, že proliferácia buniek bola najväčšia u modifikovaného materiálu kolagénom (Obr. 11; C) a kolagénom s fibronektínom (Obr. 11; D). Obecné je však možné pozorovať, že modifikovaný materiál výrazne zlepšuje adhéziu a rast buniek. Morfológia keratinocytov je na modifikovanom materiále viac fyziologická, tj. bunky vytvárajú viac spojov medzi sebou a formujú sa zhlukov (ostrovčekov) (Obr. 11; A - D).

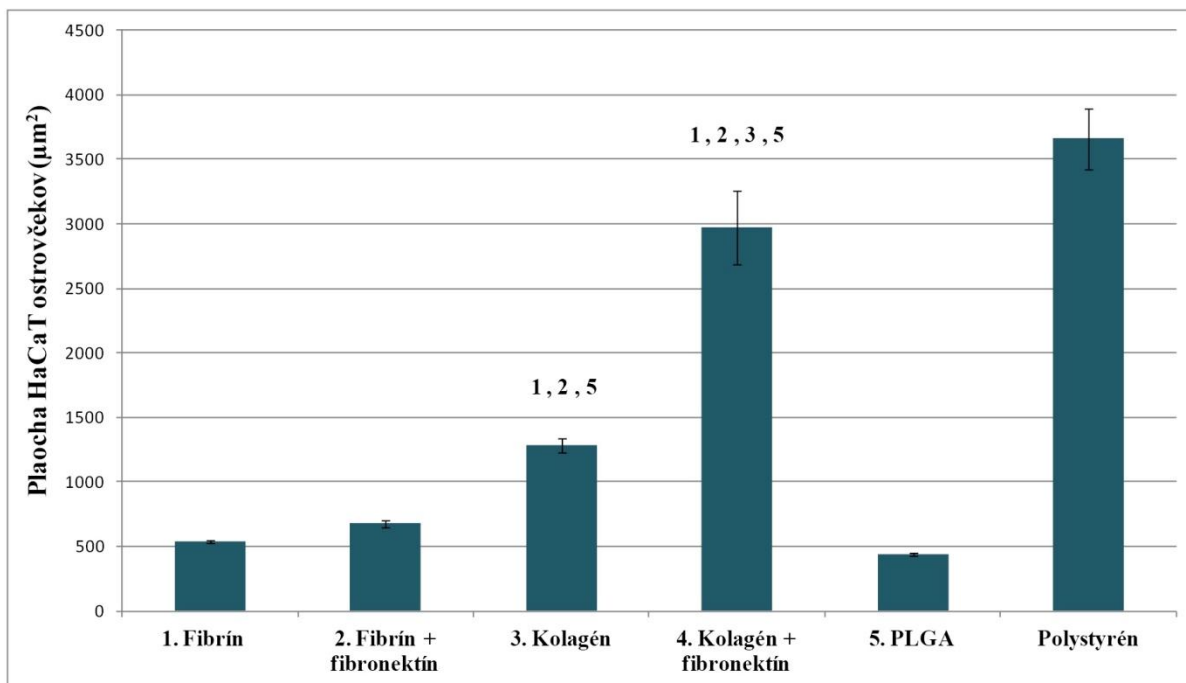


**Graf 2:** Mitochondriálna aktivita ľudských dermálnych keratinocytov línie HaCaT na membráne z PLGA stanovená pomocou WST-1 testu. Kultivácia buniek v DMEM s FBS, meranie v 2 intervaloch (3. a 7. deň). Na modifikovanej membráne (1. - 4.); nemodifikovanej membráne (5.) a na polystyréne (dno jamky kultivačnej doštičky) ako kontrolný materiál. Absorbancia (440 nm). Aritmetický priemer  $\pm$  SD z 9 meraní na 3 nezávislých vzorkách pre každú experimentálnu skupinu a časový interval; ANOVA, Student-Newman-Keuls metóda, štatistická významnosť ( $p \leq 0.05$ ): v porovnaní s danou experimentálnou skupinou označenou číslom skupiny nad stĺpcom grafu.



**Obr. 11:** Adhézia, morfológia a proliferácia ľudských dermálnych keratinocytov línie HaCaT na membráne z PLGA. Kultivácia buniek v DMEM s FBS, vizualizácia 3. deň po nasadení na modifikovanej membráne (A - D); nedomodifikovanej membráne (E) a na polystyréne (dno jamky kultivačnej doštičky) ako kontrolný materiál (F). Bunky farbené s Texas Red C2-Maleimide (proteíny v bunke – červená) a Hoechst #33342 (jadra – modrá). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10 x, digitálna kamera DP 70, mierka 200 μm.

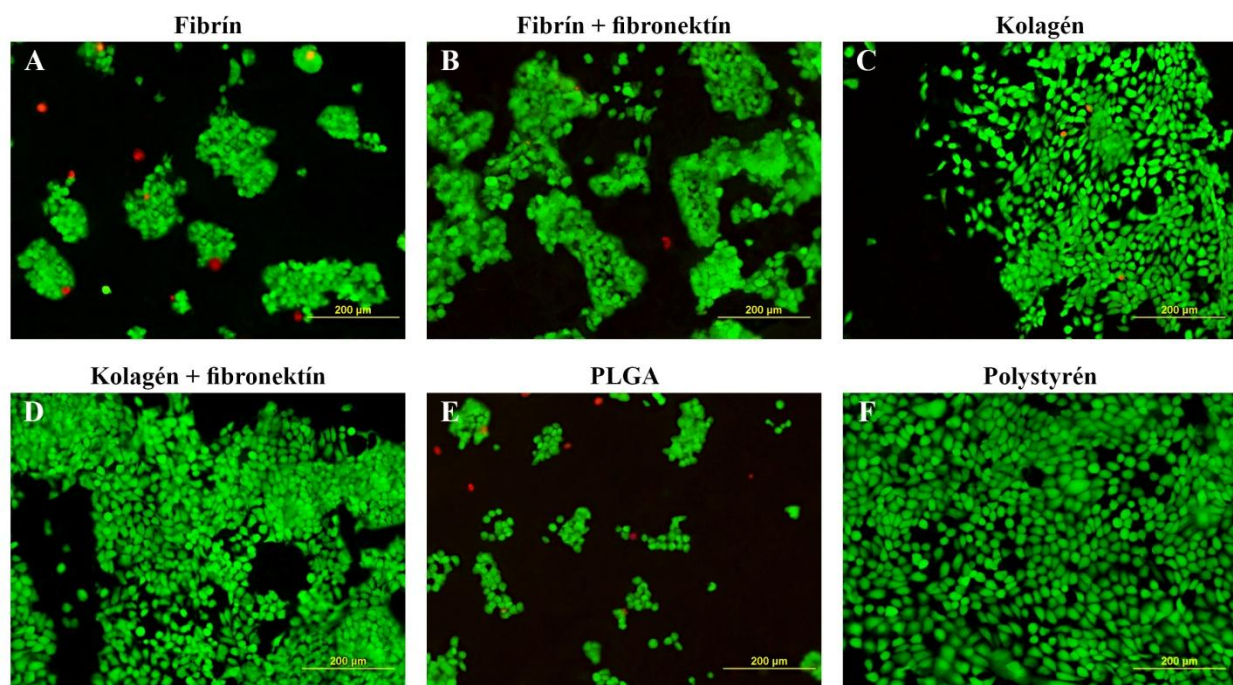
Adhézia ľudských keratinocytov línie HaCaT bola ďalej sledovaná 1. deň po nasadení na základe merania plôch ostrovčekov, ktoré bunky fyziologicky vytvárajú (Graf 3). Z grafu je možné vidieť, že bunky vytvárali signifikantne väčšie ostrovčeky na kolagéne s fibronektínom a na kolagéne samotnom (Graf 3; stĺpec 4 a 3) v porovnaní s membránou nedomodifikovanou a modifikovanou fibrínom alebo fibrínom s fibronektínom (Graf 3; stĺpec 5, 1 a 2). Fibronektín obecné podporoval adhéziu a rozprestretie buniek, čo je možné vidieť na vzorkách modifikovaných kolagénom s fibronektínom, na ktorom boli namerané najväčšie hodnoty plôch bunčných ostrovčekov (Graf 3; stĺpec 4). Adhézia keratinocytov línie HaCaT na membrány modifikované fibrínom alebo fibrínom s fibronektínom bola zhoršená, bunky sa držali prevažne jednotlivito a na niektorých miestach vytvárali menšie zoskupenia, čo je možné vidieť na fotkách v prílohe (Príloha 3; B; 1. deň). Adhézia buniek na nedomodifikovaný materiál bola najhoršia, bunky neboli rozprestreté, bolo ich menej a ostrovčeky nevytvárali vôbec (Príloha 3; B; 1. deň).



**Graf 3: Stanovenie plôch ostrovčekov tvorených ľudskými keratinocytami línie HaCaT.** Kultivácia buniek v DMEM s FBS, meranie pomocou programu Atlas 1. deň po nasadení buniek. Na modifikovanej membráne (1. - 4.); nemoďikovanej membráne (5.) a na polystyréne (dno jamky kultivačnej doštičky) ako kontrolný materiál. Aritmetický priemer  $\pm$  S.E.M. zo 16 fotiek (230 – 780 meraní) pre každú experimentálnu skupinu; ANOVA, Student-Newman-Keuls metóda, štatistická významnosť ( $p \leq 0.05$ ): v porovnaní s danou experimentálnou skupinou označenou číslom skupiny nad stĺpcom grafu.

### 11.18. Viabilita keratinocytov línie HaCaT na membráne z PLGA

Viabilita ľudských keratinocytov línie HaCaT bola vizualizovaná pomocou testu LIVE/DEAD® vo všetkých troch intervaloch (1., 3. a 7. deň po nasadení buniek) (fotky nie sú zobrazené). Na fotkách je možné vidieť, že na všetkých vzorkách bola viabilita buniek takmer 100% (Obr. 12).



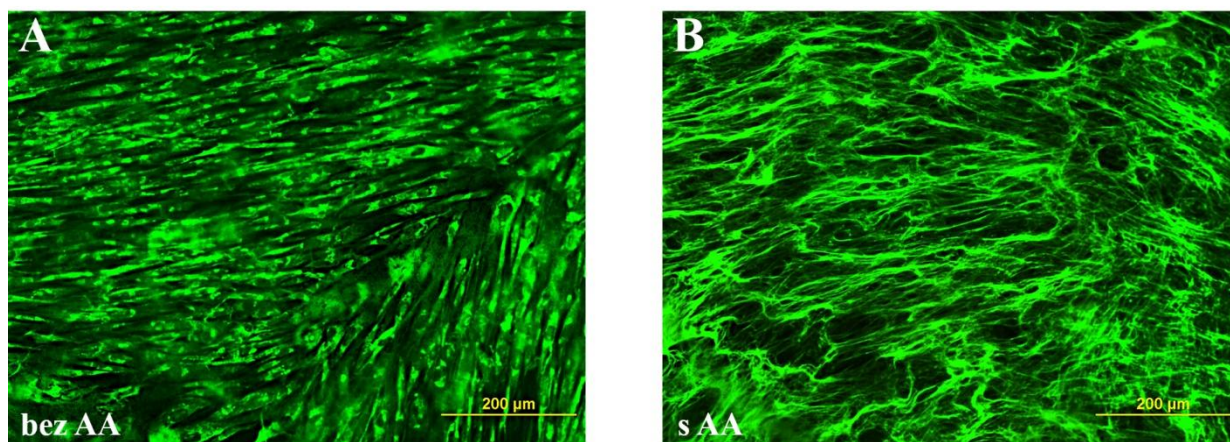
**Obr. 12:** Viabilita ľudských dermálnych keratinocytov línie HaCaT na membráne z PLGA stanovená pomocou LIVE/DEAD® testu. Kultivácia buniek v DMEM s FBS, vizualizácia 3. deň po nasadení na modifikovanej membráne (A - D); nemodifikovanej membráne (E) a na polystyréne (dno jamky kultivačnej doštičky) ako kontrolný materiál (F). Bunky farbené pomocou calceinu AM (zelená - živé bunky) a EthD-1 (červená - mŕtve bunky). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10 x, digitálna kamera DP 70, mierka 200 µm.



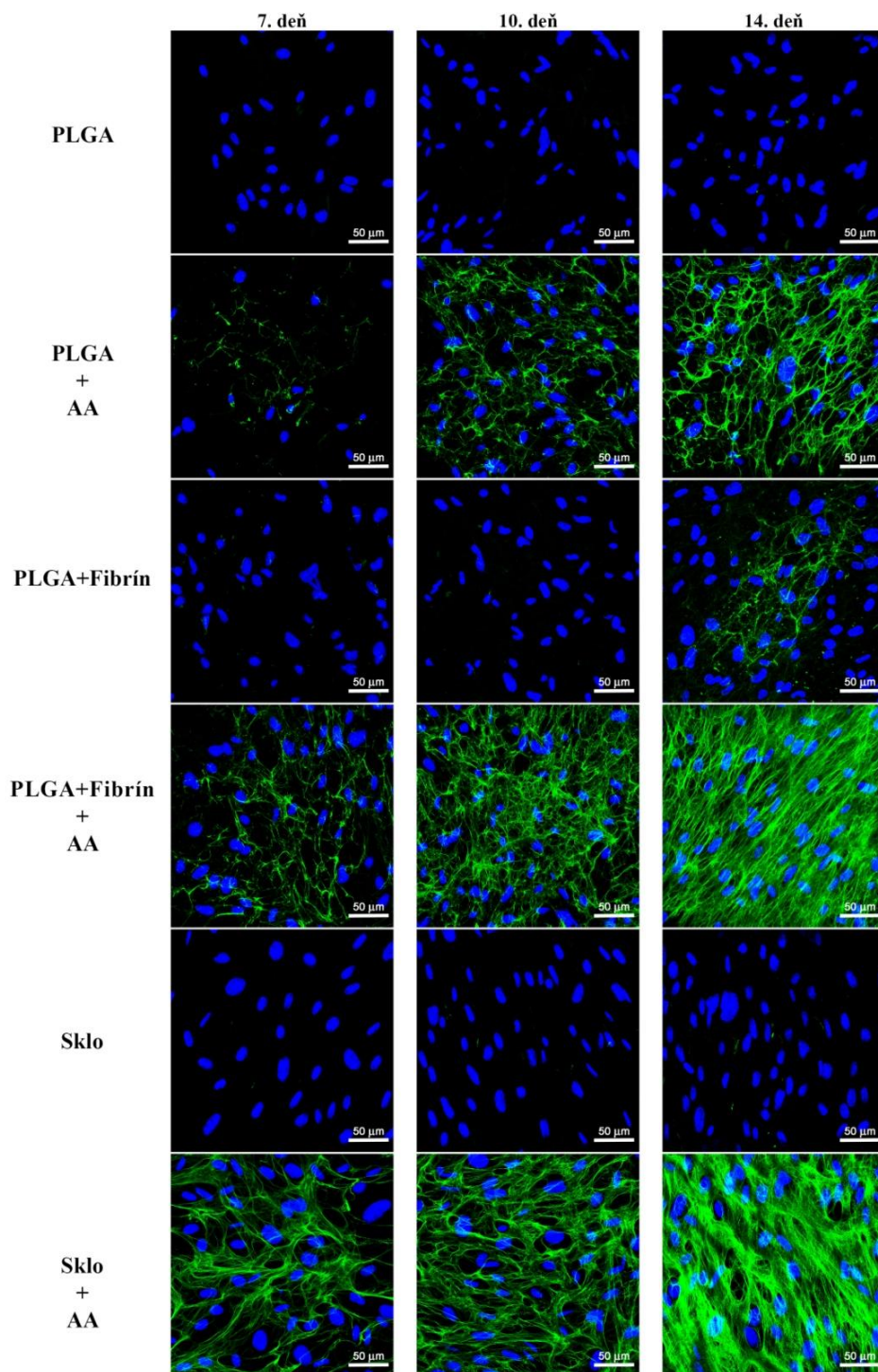
### 11.19. Produkcia kolagénu I ľudskými dermálnymi fibroblastami

Extracelulárny kolagén I bol farbený na natívnych preparátoch. Na fixovaných preparátoch bol farbený celkový (extracelulárny aj intracelulárny) kolagén I. Za pomoci imunofluorescenčného farbenia extracelulárneho kolagénu I bolo zistené, že už po jednom týždni kultivácie bola AA schopná stimulovať fibroblasty k tvorbe kolagénu a k ukladaniu jeho vlákien v podobe ECM na povrch materiálu (Obr. 14). Bunky kultivované v štandardnom kultivačnom médiu bez pridávania AA kolagén I syntetizovali, ale neprodukovali ho von z bunky v podobe vlákien ECM (Obr. 13; A), tak ako to bolo na vzorkách kultivovaných v médiu s AA (Obr. 13; B). Avšak po 14 dňoch kultivácie fibroblastov sa na vzorkách modifikovaných fibrínovou vrstvou začali objavovať vlákna kolagénu I v podobe ECM aj bez pridávania AA (Obr. 14).

Na membránach pokrytých fibrínovou vrstvou sa po pridaní AA zreteľne formovali vlákna v podobe ECM už 7. deň po nasadení buniek, zatiaľ čo u nemodifikovaného materiálu sa vlákna objavovali iba na niektorých miestach v oveľa menšej hustote (Obr. 14). Rozdiel v produkcii kolagénu I medzi nemodifikovaným materiálom a materiálom modifikovaným fibrínom sa pri kontinuálnom pridávaní AA i naďalej prejavoval, ako je možné vidieť na obrázkoch farbených 10. a 14. deň kultivácie (Obr. 14).

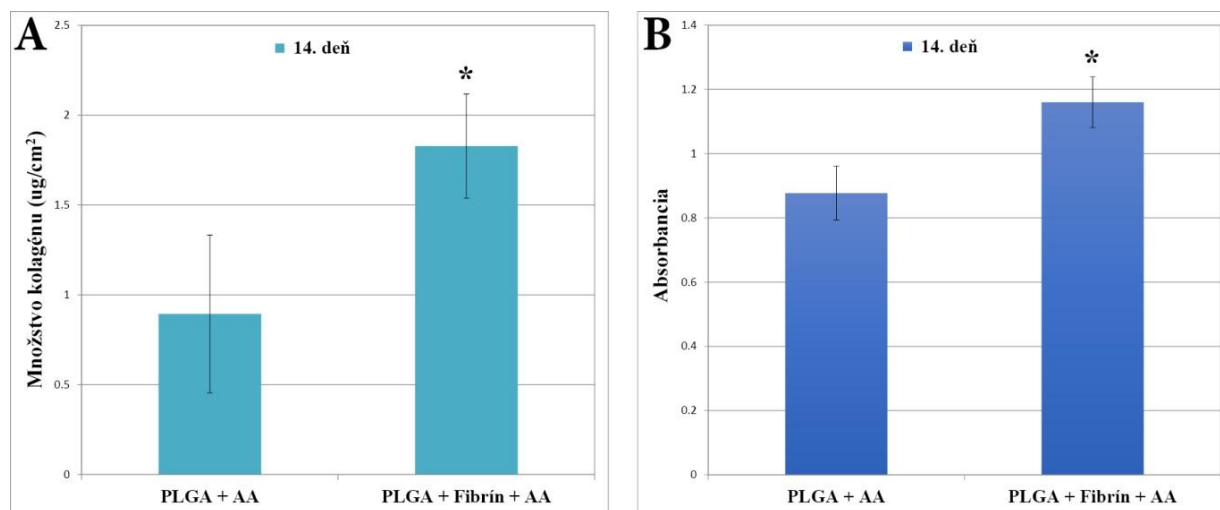


**Obr. 13: Imunofluorescenčné farbenie celkového (extracelulárneho aj intracelulárneho) kolagénu I produkovaného ľudskými dermálnymi fibroblastami.** Kultivácia buniek na skle v štandardnom kultivačnom médiu (A) alebo v médiu s pridaním AA (B), vizualizácia 10. deň po nasadení buniek. Farbenie kolagénu I pomocou primárnej a sekundárnej protilátky (zelená). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10 x, digitálna kamera DP 70, mierka 200 µm.



**Obr. 14:** *Imunofluorescenčné farbenie vlákien extracelulárneho kolagénu I produkovaného ľudskými dermálnymi fibroblastami. Kultivácia buniek v štandardnom kultivačnom médiu alebo v médiu s pridaním AA, na nemoďifikovanom materiále alebo na materiále moďifikovanom fibrínovou vrstvou, vizualizácia 7., 10. a 14. deň po nasadení buniek. Krycie sklíčko ako kontrola. Jadrá buniek farbené Hoechstom #33258 (modrá). Leica TCS SPE DM2500 konfokálny mikroskop; obj. 40x/1.15 NA, mierka 50  $\mu$ m.*

Celková produkcia kolagénu I ľudskými dermálnymi fibroblastami kultivovanými v médiu s kontinuálnym pridávaním AA po dobu 14 dní bola stanovená pomocou Sircol™ testu. Namerané množstvo vyprodukovaného kolagénu I bunkami bolo vzťahnuté na metabolickú aktivitu buniek stanovenú pomocou MTS testu (Graf 4; A). Metabolická aktivita fibroblastov bola na materiále s fibrínovou vrstvou signifikantne vyššia v porovnaní s materiálom nemodifikovaným, čo naznačuje, že na modifikovanom materiále bolo buniek viac (Graf 4; B). Produkcia kolagénu I bola signifikantne vyššia na membránach s fibrínovou vrstvou v porovnaní s nemodifikovanými membránami z PLGA (Graf 4; A).

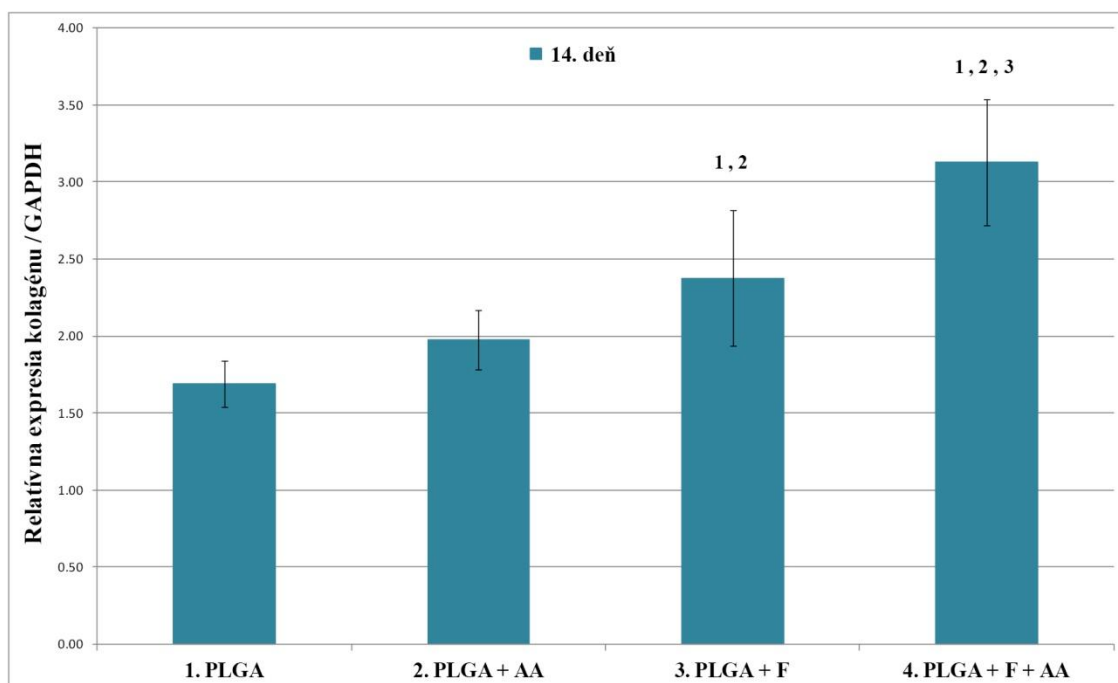


**Graf 4:** Celkové množstvo naprodukovaného kolagénu I ľudskými dermálnymi fibroblastami stanovené pomocou Sircol™ testu 14. deň po nasadení buniek. Kultivácia buniek v štandardnom kultivačnom médiu s pridaním AA, na nemodifikovanom materiále alebo na materiále modifikovanom fibrínovou vrstvou. Množstvo kolagénu I vzťahnuté na metabolickú aktivitu buniek (A); mitochondriálna metabolická aktivita buniek stanovená pomocou MTS testu (B). Aritmetický priemer  $\pm$  SD z 3 meraní na 1 vzorku pre každú experimentálnu skupinu; ANOVA, Student-Newman-Keuls metóda, štatistická významnosť ( $p \leq 0.05$ ):\* v porovnaní s nemodifikovaným materiálom z PLGA.

Relatívna expresia mRNA kolagénu I ľudských dermálnych fibroblastov kultivovaných 14 dní v štandardnom kultivačnom médiu s AA bola stanovená pomocou RT-PCR (Graf 5). Výsledky ukázali, že rozdiely v produkcii kolagénu I namerané pomocou Sircol™ testu (Graf 4) korelujú s rozdielmi v relatívnej expresii mRNA kolagénu I (Graf 5). Na membráne s fibrínom bola relatívna expresia kolagénu I signifikantne vyššia (Graf 5, stĺpec 3 a 4) v porovnaní

s membránou nemodifikovanou (Graf 5, stĺpec 1 a 2). Pridávanie AA signifikantne zvýšilo expresiu mRNA kolagénu I na vzorkách pokrytých fibrínom (Graf 5, stĺpec 4).

Hoci bola relatívna expresia mRNA kolagénu I po 14 dňoch kultivácie buniek v štandardnom kultivačnom médiu (bez AA) na vzorkách pokrytých fibrínovou vrstvou signifikantne vyššia (Graf 5, stĺpec 3) v porovnaní s bunkami kultivovanými na nemodifikovanom materiáli v médiu s AA (Graf 5, stĺpec 2), bunky však nevytvárali kolagénové vlákna ECM na povrchu membrány tak dobre, ako to bolo na vzorkách s pridanou AA (Obr. 14).



**Graf 5: Relatívna expresia mRNA kolagénu I ľudských dermálnych fibroblastov stanovená pomocou RT-PCR 14. deň po nasadení buniek.** Kultivácia buniek v štandardnom kultivačnom médiu alebo v médiu s pridaním AA, na nemodifikovanom materiáli alebo na materiáli modifikovanom fibrínovou vrstvou (F). Referenčný gén GAPDH. Aritmetický priemer  $\pm$  SD z 8 meraní na 2 biologicky nezávislých vzorkách pre každú experimentálnu skupinu; ANOVA, Student-Newman-Keuls metóda, štatistická významnosť ( $p \leq 0.05$ ): v porovnaní s danou experimentálnou skupinou označenou číslom skupiny nad jednotlivými stĺpcami v grafe.

## 12. Diskusia

Pri konštruovaní nových funkčných kožných náhrad je kladený dôraz na vytvorenie funkčnej dvojvrstvy pozostávajúcej jak z dermálnej zložky tvorenej fibroblastami, tak z epidermálnej zložky tvorenej keratinocytami (Idrus RB *a kol.*, 2014). Predchádzajúce práce ukázali, že pre zhotovenie kožnej náhrady je nutné zvoliť správny nosič, tj. materiál, ktorý bude bunky oddeľovať, ale zároveň im umožňovať komunikovať medzi sebou prostredníctvom produkcie rôznych molekúl, ako sú rastové faktory, živiny a iné biologicky aktívne látky. Pre tieto účely sa zdajú byť najvhodnejšie synteticky vyrábané biodegradabilné polyméry vo forme nanovlákennej membrány, ktoré vďaka svojej poréznej nanoštruktúre veľmi dobre simulujú prirodzenú medzibunkovú hmotu (ECM) (McMillan JR *a kol.*, 2007). Avšak väčšina polymérov používaných v tkanivovom inžinierstve kože nepodporuje adhéziu, rast a diferenciáciu buniek v nemodifikovanom stave (Hoveizi E *a kol.*, 2014), a preto sa povrch materiálu fyzikálne alebo chemicky modifikuje za účelom zlepšenia jeho povrchových vlastností. Mnoho štúdií v oblasti kožných náhrad popisuje využitie biomolekúl bežne prítomných v organizme v podobe proteínov ECM, ako je napríklad kolagén I (Garric X *a kol.*, 2005), fibronektín (Altankov G *a kol.*, 2005) alebo fibrín, ktorý hrá dôležitú rolu v hojení rán a regenerácii (Mutsaers SE *a kol.*, 1997). Preto sme sa v našej práci upriamili na modifikovanie nanovlákenného materiálu z PLGA týmito biomolekulami za účelom zlepšenia adhézie a proliferácie kožných buniek.

Fibrín je často používaný vo forme hydrogélů, mikroguličiek alebo lepidiel (Gorodetsky R *a kol.*, 1999; Ahmed TA *a kol.*, 2008; Taghiabadi E *a kol.*, 2015) ako nosič fibroblastov, keratinocytov alebo kmeňových buniek implantovaných experimentálne *in vivo* do poraneného miesta (Braziulis E *a kol.*, 2011; Idrus RB *a kol.*, 2014; Nam SY *a kol.*, 2015). Fibrín sa tiež využíva v *in vitro* štúdiách na vývoj kožných náhrad (Mazzone L *a kol.*, 2014; Monteiro IP *a kol.*, 2014). Na zlepšenie regenerácie tkaniva je fibrín často kombinovaný s inými biologickými alebo syntetickými molekulami, ako je kolagén (Braziulis E *a kol.*, 2011; Mazzone L *a kol.*, 2014), agaróza (Carriel V *a kol.*, 2012), kyselina hyalurónová a peptidy sprostredkujúce adhéziu (Monteiro IP *a kol.*, 2014), ďalej PEG (Nam SY *a kol.*, 2015), rastové faktory fibroblastov (de la Puente P *a kol.*, 2011) alebo epiteliálne rastové faktory (Sivan U *a kol.*, 2014). V oblasti tkanivového inžinierstva mäkkých tkanív je fibrín často používaný na výrobu nosičov pre bunky aj napriek jeho slabým mechanickým vlastnostiam a náročnej manipulácii. Naopak, na povrchovú modifikáciu podkladu pre bunky je fibrín používaný

relatívne málo. Han a kol. popísal pozitívny efekt fibrínu aplikovaného na poréznu membránu z kolagénu a chitosanu na rast a viabilitu ľudských dermálnych fibroblastov a keratinocytov línie HaCaT (Han CM *a kol.*, 2010). V inej práci Nair a kol. sledoval zlepšenie adhézie a proliferácie ľudských fibroblastov na nanovláknennom kopolymére z poly(laktid-ko-glykolid-kaprolaktónu) modifikovanom fibrínom (Nair RP *a kol.*, 2014).

Na základe vyššie spomínaných prác sme sa v prvej časti nášho výskumu rozhodli modifikovať nanovláknennú membránu z PLGA fibrínovou vrstvou a pozorovať vplyv tejto povrchovej úpravy na správanie kožných buniek (ľudských dermálnych fibroblastov a keratinocytov línie HaCaT). Naše výsledky ukázali, že fibrín na mnohých miestach membrány vytváral sieťovitú štruktúru, ktorá svojím charakterom veľmi dobre napodobňovala štruktúru prirodzenej ECM, čo výrazne zlepšovalo adhéziu a rozprestretie ľudských dermálnych fibroblastov v porovnaní s materiálom nemodifikovaným. Na membráne s fibrínom boli bunky dobre rozprestreté a mali normálnu morfológiu, kým na membráne z PLGA bez povrchovej úpravy fibrínom boli bunky až do tretieho dňa kultivácie stále guľaté. Ako už bolo spomínané, fibrín podporuje adhéziu fibroblastov pomocou integrínových receptorov a to konkrétne  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_3$  a  $\alpha_5\beta_1$ , ktoré dobre rozpoznávajú RGD motív prítomný v molekule fibrínu (Gailit J *a kol.*, 1997; Laurens N *a kol.*, 2006). Fibrín navyše prostredníctvom  $\alpha C$  domény priťahuje molekuly ECM z kultivačného média, ako je fibronektín a vitronektín, čím sa ešte viac stimuluje adhézia buniek (Laurens N *a kol.*, 2006). Na nemodifikovanom materiáli je väzba buniek sprostredkovaná hlavne molekulami ECM spontánne naadsorbovanými na povrch membrány z kultivačného média alebo vyprodukovanými bunkami. Väčšinou je však molekúl ECM naadsorbovaných príliš málo alebo sú v nevhodnej priestorovej konformácii, čo priamo zhoršuje adhéziu buniek pomocou adhézných receptorov.

Naše výsledky ukázali, že fibrín výrazne stimuluje nie len adhéziu ale aj proliferáciu fibroblastov, čo je v súlade s viacerými predchádzajúcimi prácami (Mazlyzam AL *a kol.*, 2007; Nair RP *a kol.*, 2014). V literatúre je popisovaných viacero možných mechanizmov, ako by mohol fibrín podporovať proliferáciu fibroblastov. Už v roku 1993 Gray a kol. popísal významnú úlohu A alfa a B beta reťazcov prítomných v molekulách fibrinogénu a fibrínu v mechanizme stimulácie proliferácie fibroblastov (Gray AJ *a kol.*, 1993). Ďalej Dawes a kol. vo svojej práci kládol doraz na trombín prítomný vo fibríne, ktorý je potenciálne mitogénny pre

fibroblasty (Dawes KE *a kol.*, 1993) a taktiež fibrín pravdepodobne stimuluje autokrinnú produkciu rastových faktorov bunkami.

U keratinocytov bol popísaný pozitívny efekt fibrínu na autokrinnú produkciu transformujúceho rastového faktoru-alfa prostredníctvom receptora pre epidermálny rastový faktor (Yamamoto M *a kol.*, 2005). Avšak z výsledkov našej práce je možné vidieť, že proliferácia keratinocytov línie HaCaT na rozdiel od fibroblastov na fibrínom modifikovaných membránach bola výrazne znížená. Sese a kol. vo svojej práci popísal vzťah medzi proliferáciou ľudských keratinocytov a koncentráciou trombínu. Zistil, že pre dobrú proliferáciu keratinocytov je optimálna koncentrácia trombínu 1 U/ml (Sese N *a kol.*, 2011). Zatiaľ čo v inej práci Cox a kol. zistil, že dobrá proliferácia fibroblastov nie je podmienená presnou koncentráciou trombínu tak, ako je to u keratinocytov, tj. môže sa pohybovať v rozmedzí od 1 – 167 U/ml (Cox S *a kol.*, 2004). V našej práci sme však používali na zhotovenie fibrínovej vrstvy koncentráciu trombínu 2,5 U/ml, čo na jednej strane vytváralo vhodnú fibrínovú sieť pre fibroblasty, ale na druhej strane to pravdepodobne mohlo spôsobiť apoptózu u keratinocytov línie HaCaT (Kubo M *a kol.*, 2001; Gugerell A *a kol.*, 2012).

V ďalšej časti našej práce sme sa zaoberali modifikovaním membrány z PLGA kolagénom typu I a sledovali sme správanie kožných buniek (ľudských dermálnych fibroblastov a keratinocytov línie HaCaT) na upravenom materiále. Kolagén typu I je hlavnou súčasťou ECM v koži, a preto sa v súčasnosti hojne používa na výrobu samonosných kožných náhrad, avšak vzhľadom na svoju povahu je často kombinovaný s inými syntetickými alebo biologickými molekulami, ako napríklad kyselina hyalurónová (Niiyama H a Kuroyanagi Y, 2014), genipin (Mekhail M *a kol.*, 2010), elastín (Killat J *a kol.*, 2013), alebo želatína (Hiwatashi N *a kol.*, 2015). Na základe našich výsledkov je možné konštatovať, že pri aplikácii kolagénu I na membránu často dochádza k vytvoreniu gélovej štruktúry, ktorá obecné nie je pre bunky dobrým podkladom. Kolagénový gél na rozdiel od fibrínovej siete vytvára jednoliatu plochu, ktorá jednak nedrží na podklade dostatočne silno a zároveň neposkytuje bunkám vhodnú oporu v podobe prirodzenej ECM. Fibroblasty sa držali prevažne na povrchu a nemigrovali do vnútra kolagénovej vrstvy, tak ako to bolo u modifikácie fibrínovou sieťou.

Aj napriek nie úplne vhodnej gélovej štruktúre, ktorú kolagén I vytváral, je možné pozorovať, že výrazne zlepšoval adhéziu a tiež proliferáciu keratinocytov línie HaCaT. Kolagén ako základná zložka ECM podporuje adhéziu väčšiny buniek prostredníctvom aminokyselínovej

sekvencie DGEA, na ktorú sa bunky špecifický viažu prostredníctvom svojich  $\alpha 2\beta 1$  alebo  $\alpha 3\beta 1$  integrínových receptorov (Staatz WD *a kol.*, 1991; Fujisaki H *a kol.*, 2008). Prítomnosť  $\alpha 2\beta 1$  a  $\alpha 3\beta 1$  integrínových receptorov u keratinocytov bola popísaná Marchisiom a kol. už v roku 1990, a preto sa dalo predpokladať, že modifikácia membrány kolagénom bude výrazne podporovať adhéziu keratinocytov, čo sa aj potvrdilo (Marchisio PC *a kol.*, 1990).

Fujisaki a kol. zistil, že pre proliferáciu a diferenciáciu ľudských keratinocytov je zásadná interakcia integrínových receptorov s trojrozmernou štruktúrou kolagénu IV (Fujisaki H *a kol.*, 2008). Ako už bolo spomínané vyššie, keratinocyty sú bunky, ktoré proliferujú a diferencujú počas migrácie smerom k povrchu pokožky, pričom pre samotnú migráciu sú veľmi dôležité interakcie ich integrínových receptorov s molekulami ECM, tj. hlavne s kolagénom (Dumin JA *a kol.*, 2001; Fu XL *a kol.*, 2014). Na základe týchto poznatkov je v poslednej dobe snaha nielen modifikovať rôzne materiály kolagénom (Fu XL *a kol.*, 2014), ale dokonca vytvoriť samonosný nanovláknenný nosič pozostávajúci čisto z kolagénových vlákien. Zhouovi a kol. sa nedávno podarilo vytvoriť nanovláknennú membránu z kolagénu africkej ryby *Tilapia*, ktorá veľmi dobre podporovala viabilitu, proliferáciu a diferenciáciu keratinocytov línie HaCaT a ľudských dermálnych fibroblastov; nanovláknenná štruktúra membrány navyše stimulovala fibroblasty k produkcii ďalšieho kolagénu v podobe ECM (Zhou T *a kol.*, 2015).

Ľudské dermálne fibroblasty v porovnaní s keratinocytami línie HaCaT adherovali a rástli na membráne modifikovanej kolagénom menej, čo mohlo byť spôsobené jednoliatou gélovou štruktúrou, ktorú kolagén na membráne vytváral. Eastwood a kol. popísal vo svojej práci pôsobenie fibroblastov na kolagénový gél. Zistil, že rôzne typy fibroblastov generujú rôzne kontraktilné sily pôsobiace na okolité prostredie, ktorého sa bunka drží svojimi integrínovými receptormi (Eastwood M *a kol.*, 1996). Vzhľadom na to sa dá predpokladať, že pre dobré uchytenie a rozprestretie buniek je nutný dostatočne stabilný nosič, ktorý by sa vplyvom kontrakčných síl generovaných bunkou nezdeformoval. Prirodzene v organizme si pre tieto účely bunky samé vytvárajú ECM s dostatočnou tuhosťou a to hlavne z kolagénu a iných molekúl ako napríklad kyselina hyalurónová a elastín. Avšak v našej práci sa nám nepodarilo na povrchu membrány vytvoriť dostatočne pevné kolagénové vlákna, ktoré by umožnili bunkám dobre sa uchýtiť a rozprestrieť sa. Kolagénový gél bol pravdepodobne príliš mäkký, a preto nebol vhodný pre adhéziu a proliferáciu fibroblastov. Agis a kol. porovnával gélovú štruktúru kolagénu s poréznou a zistil, že proliferácia a migrácia fibroblastov je signifikantne nižšia na gélovom



podklade, ako na poréznom kolagéne, čo je v súlade s našimi výsledkami (Agis H *a kol.*, 2014). Rozdielne správanie keratinocytov a fibroblastov na gélovom kolagénovom podklade bolo spôsobené pravdepodobne tým, že rôzne bunčné typy generujú rozdielne kontrakčné sily, ktorými pôsobia na podklad (Eastwood M *a kol.*, 1996). Ako už bolo spomínané vyššie, pre vytvorenie stabilnejšej vláknitej štruktúry sa kolagén často zmiešava s inými proteínmi (elastín) (Rnjak-Kovacina J *a kol.*, 2012; Killat J *a kol.*, 2013), alebo sa pridáva do synteticky vyrábaných polymérov (poly( $\epsilon$ -kaprolaktón)) v rôznych pomeroch a za pomoci metódy zvlákňovania sa z neho vytvára vhodný nosič pre oba typy kožných buniek (Bonvallet PP *a kol.*, 2015).

Fibronektín, ako jeden z hlavných adhézných proteínov obsahujúci univerzálnu RGD sekvenciu aminokyselín rozpoznávanú väčšinou buniek (Ruoslahti E a Pierschbacher MD, 1987), bol pridávaný na modifikované membrány za účelom lepšieho a pevnejšieho uchytenia buniek. Z výsledkov merania plôch bunčných zoskupení (ostrovčekov) u keratinocytov línie HaCaT je možné vidieť, že medzi membránami modifikovanými kolagénom a fibronektínom a membránami so samotným kolagénom je signifikantný rozdiel v adhézii. Na druhej strane z výsledkov metabolického testu u keratinocytov línie HaCaT je možné pozorovať, že na proliferáciu buniek už fibronektín vplyv nemal. U fibroblastov sa prítomnosť fibronektínu prejavila aj na proliferácii, čo je možné vidieť na výsledkoch metabolickej aktivity, ktorá bola u fibroblastov na membráne s kolagénom a fibronektínom signifikantne vyššia v porovnaní s fibroblastami na samotnom kolagéne (Graf 1). Zlepšenie proliferácie fibroblastov na membránach s fibronektínom by mohlo byť vysvetlené tým, že hneď po nasadení bunky vďaka prítomnosti fibronektínu lepšie adherovali, čo pravdepodobne mohlo zvýšiť aj následnú proliferáciu.

V záverečnej časti našej práce sme sa zamerali na produkciu kolagénu ľudskými dermálnymi fibroblastami kultivovanými na membráne z PLGA modifikovanej fibrínom a sledovali sme vplyv pridávania vitamínu C (AA). Zistili sme, že fibrín na nanovlákennej membráne zvyšuje relatívnu expresiu a syntézu kolagénu I a stimuluje fibroblasty k produkcii kolagénu I v podobe ECM na povrch materiálu. Už po jednom týždni kultivácie buniek je možné pozorovať formovanie vlákien extracelulárneho kolagénu I na vzorkách s fibrínom a s AA, zatiaľ čo na nemodifikovaných vzorkách s AA sa vlákna zreteľne formujú až po 10 dňoch. Sclafani a McCormick zistili, že pri injekčnom podaní fibrínu bohatého na krvné doštičky dochádza k produkcii nového kolagénu dermálnymi fibroblastami (Sclafani AP a McCormick SA, 2012).

V inej práci Mazlyzam a kol. skonštruovali fibrínový nosič pre kožné bunky a zistili, že dermálne fibroblasty na tomto podklade dobre produkujú nové kolagénové vlákna a navyše vykazujú zvýšenú expresiu mRNA pre kolagén I (Mazlyzam AL *a kol.*, 2007). Existujú ešte ďalšie práce, ktoré potvrdzujú pozitívny efekt fibrínu na produkciu kolagénu fibroblastami (Tuan TL *a kol.*, 1996; Nair RP *a kol.*, 2014).

Dôležitá úloha kyseliny askorbovej vo formovaní kolagénových vlákien bunkou je v literatúre neustále opakovaná. Kyselina askorbová pomáha katalyzovať hydroxyláciu lyzínu a prolínu, tj dôležitých aminokyselín zohrávajúcich významnú úlohu vo formovaní maturovaného kolagénu do štruktúry triple-helixu (de Clerck YA a Jones PA, 1980; Tajima S a Pinnell SR, 1996). Ako už bolo spomínané hydroxyprolín stabilizuje triple-helixovú štruktúru kolagénu, a preto v prípade jeho neprítomnosti dochádza k tvorbe nestabilného kolagénu, ktorý bunka nemôže sekretovať v požadovanej miere. Hydroxylyzín je nevyhnutný pre proces zosieťovania kolagénu (Murad S *a kol.*, 1981).

V našich experimentoch sa ukázalo, že AA zvyšuje expresiu kolagénu I a tiež podporuje bunky v ukladaní kolagénových vlákien na povrch materiálu v podobe ECM. Bunky kultivované v štandardnom kultivačnom médiu (bez pridávania AA) neprodukovali kolagén v podobe ECM na povrch materiálu vôbec. Z výsledkov je však možné vidieť, že relatívna expresia kolagénu I v bunkách kultivovaných na membráne s fibrínom v štandardnom kultivačnom médiu bez AA je signifikantne vyššia v porovnaní s expresiou buniek kultivovaných v médiu s AA na membráne bez fibrínu, avšak bunky netvorili na povrchu materiálu žiadané vlákna. Tieto výsledky sú v súlade s dávnejšou prácou Murada a kol., ktorý zistil, že bunky kultivované bez kyseliny askorbovej nie sú schopné formovať stabilné vlákna kolagénu a produkovať ich na povrch materiálu. Naopak kolagén kumulujú vo vnútri v nestabilnej forme (Murad S *a kol.*, 1981). Na druhej strane, na membráne pokrytej fibrínovou vrstvou je možné pozorovať tvorbu menších vlákien kolagénu v podobe ECM už po dvoch týždňoch kultivácie buniek v štandardnom kultivačnom médiu aj bez pridávania AA (Obr. 14), čo je spôsobené pravdepodobne tým, že bunky na fibríne oveľa lepšie rastú a ich morfológia je viac fyziologická v porovnaní s bunkami na materiále nemodifikovanom.

Vlákna nerozpustného extracelulárneho kolagénu neboli na povrchu membrány formované hneď po pridaní AA do kultivačného média, ale až po uplynutí približne jedného týždňa kultivácie buniek, tj. po 4 dňoch od pridávania AA do média. Vysvetlením by mohlo byť, že pre

vytvorenie nerozpustných vlákien kolagénu z novo nasyntetyzovaného prokolagénu je nutná dlhšia doba (Murad S *a kol.*, 1981).

Pozitívny efekt AA na expresiu kolagénu I bol 14 deň kultivácie buniek pozorovaný na membráne modifikovanej fibrínom, zatiaľ čo na nemodifikovanej membráne sa rozdiel signifikantne neprejavil. Vysvetlením by mohlo byť, že na membráne modifikovanej fibrínom bola proliferácia buniek signifikantne vyššia (Graf 1), čo pravdepodobne spôsobilo, že po 14 dňoch kultivácie boli bunky na modifikovanej membráne oveľa schopnejšie syntézy kolagénu v porovnaní s bunkami na membráne nemodifikovanej (Obr. 14). Účinky kyseliny askorbovej sa preto na membráne modifikovanej prejavovali viac ako na nemodifikovanej. Tieto výsledky sú v súlade s predošlými prácami, v ktorých sa píše, že kyselina askorbová zvyšuje množstvo mRNA prokolagénu v bunke (Tajima S a Pinnell SR, 1996) a zároveň sa jej pozitívne účinky na expresiu kolagénu prejavujú viac s dobou kultivácie buniek (de Clerck YA a Jones PA, 1980).

### 13. Záver

V prvej časti tejto práce bola nanovláknenná membrána z PLGA modifikovaná proteínmi ECM (kolagénom a fibronektínom) a fibrínom, tj. molekulou bežne prítomnou v organizme pri hojení rán. Na základe vizualizovania modifikovaných membrán a sledovania morfológie buniek na nich sa zistilo, že fibrínová vrstva vytvára na povrchu membrány z PLGA sieťovú štruktúru, ktorá napomáha bunkám migrovať do vnútra materiálu, a tým dobre simuluje prirodzenú štruktúru ECM. Na druhej strane kolagénová gélová štruktúra tvorí na povrchu membrány jednoliatu vrstvu, ktorá nepredstavuje pre bunky dostatočne silnú oporu, a preto sa z nej hlavne fibroblasty často odlupovali.

V ďalšej časti našej práce sme sledovali adhéziu a proliferáciu ľudských dermálnych fibroblastov a keratinocytov línie HaCaT na modifikovaných membránach. Zistili sme, že proliferácia dermálnych fibroblastov je výrazne podporovaná fibrínom, zatiaľ čo rast keratinocytov línie HaCaT je stimulovaný skôr kolagénom. Pridávanie fibronektínu v oboch prípadoch zlepšovalo adhéziu buniek. Na základe výsledkov je však možné obecné tvrdiť, že modifikovaný materiál je pre kožné bunky oveľa vhodnejší než nemoifikovaný.

V poslednej časti nášho výskumu sme sa zamerali na produkciu kolagénu I fibroblastami. Ukázalo sa, že pre zvýšenie syntézy kolagénu I je vhodné kultivovať bunky na membráne modifikovanej fibrínovou vrstvou. Ďalej sme potvrdili, že pre zlepšenie produkcie kolagénových vlákien je dobre bunky stimulovať pridávaním AA (vitamínu C).

Na základe pozitívnych výsledkov je možné povedať, že synteticky vyrábaná nanovláknenná membrána z PLGA je sľubným materiálom pre konštrukciu kožných tkanivových náhrad a doposiaľ získané poznatky budú použité pre ďalšie pokusy o skonštruovanie kompletnej 3D náhrady simulujúcej prirodzenú kožu v celkovej jej hrúbke.

## 14. Zoznam literatúry

**Agis H**, Collins A, Taut AD, Jin QM, Kruger L, Gorlach C a Giannobile WV (2014). Cell Population Kinetics of Collagen Scaffolds in Ex Vivo Oral Wound Repair. *PLoS One*; 9 (11).

**Ahmed TA**, Dare EV a Hincke M (2008). Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*; 14 (2): 199-215.

**Ahn HH**, Lee IW, Lee HB a Kim MS (2014). Cellular behavior of human adipose-derived stem cells on wettable gradient polyethylene surfaces. *Int J Mol Sci*; 15 (2): 2075-2086.

**Al Kayal T**, Maniglio D, Bonani W, Losi P, Migliaresi C a Soldani G (2015). A combined method for bilayered vascular graft fabrication. *J Mater Sci Mater Med*; 26 (2): 96.

**Altankov G**, Albrecht W, Richau K, Groth T a Lendlein A (2005). On the tissue compatibility of poly(ether imide) membranes: an in vitro study on their interaction with human dermal fibroblasts and keratinocytes. *J Biomater Sci Polym Ed*; 16 (1): 23-42.

**Altankov G** a Groth T (1994). Reorganization of Substratum-Bound Fibronectin on Hydrophilic and Hydrophobic Materials Is Related to Biocompatibility. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*; 5 (9-10): 732-737.

**Anselme K** (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*; 21 (7): 667-681.

**Anselme K**, Ponche A a Bigerelle M (2010). Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, *Journal of engineering in medicine*; 224 (12): 1487-1507.

**Auxenfans C**, Menet V, Catherine Z, Shipkov H, Lacroix P, Bertin-Maghit M, Damour O a Braye F (2015). Cultured autologous keratinocytes in the treatment of large and deep burns: a retrospective study over 15 years. *Burns*; 41 (1): 71-79.

**Babraj JA**, Cuthbertson DJ, Smith K, Langberg H, Miller B, Krogsgaard MR, Kjaer M a Rennie MJ (2005). Collagen synthesis in human musculoskeletal tissues and skin. American journal of physiology. *Endocrinology and metabolism*; 289 (5): E864-869.

**Bacakova L**, Filova E, Kubies D, Machova L, Proks V, Malinova V, Lisa V a Rypacek F (2007). Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on bioactive RGD peptide-carrying polylactides. *J Mater Sci Mater Med*; 18 (7): 1317-1323.

**Bacakova L**, Filova E, Parizek M, Ruml T a Svorcik V (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv*; 29 (6): 739-767.

**Bacakova L**, Filova E, Rypacek F, Svorcik V a Stary V (2004). Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res*; 53 Suppl 1: S35-45.

**Bacakova L** a Svorcik V (2008). Cell colonization control by physical and chemical modification of materials. In Cell Growth Processes: New Research, edited by D. Kimura. USA: *Nova Science Publishers, Inc.*, 5-56.

**BaoLin G** a Ma PX (2014). Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Sci China Chem*; 57 (4): 490-500.

**Barrientos S**, Brem H, Stojadinovic O a Tomic-Canic M (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*; 22 (5): 569-578.

**Bonvallet PP**, Schultz MJ, Mitchell EH, Bain JL, Culpepper BK, Thomas SJ a Bellis SL (2015). Microporous dermal-mimetic electrospun scaffolds pre-seeded with fibroblasts promote tissue regeneration in full-thickness skin wounds. *PLoS One*; 10 (3): e0122359.

- Boukamp P**, Petrussevska RT, Breitskreutz D, Hornung J, Markham A a Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*; 106 (3): 761-771.
- Boyan BD**, Hummert TW, Dean DD a Schwartz Z (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*; 17 (2): 137-146.
- Braziulis E**, Biedermann T, Hartmann-Fritsch F, Schiestl C, Pontiggia L, Bottcher-Haberzeth S, Reichmann E a Meuli M (2011). Skingeneering I: engineering porcine dermo-epidermal skin analogues for autologous transplantation in a large animal model. *Pediatr Surg Int*; 27 (3): 241-247.
- Butler CE** a Orgill DP (2005). Simultaneous in vivo regeneration of neodermis, epidermis, and basement membrane. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*; 94: 23-41.
- Campbell ID** a Humphries MJ (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 3 (3).
- Cao J**, Wu Z, Li S, Tang H a Mei Q (2013). Site-selective adsorption of protein induced by a metal pattern on a poly(ethylene terephthalate) surface. *Colloids Surf B Biointerfaces*; 111: 418-422.
- Carballo-Molina OA** a Velasco I (2015). Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Frontiers in Cellular Neuroscience*; 9.
- Carriel V**, Garzon I, Jimenez JM, Oliveira AC, Arias-Santiago S, Campos A, Sanchez-Quevedo MC a Alaminos M (2012). Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs*; 196 (1): 1-12.
- Cooper TP** a Sefton MV (2011). Fibronectin coating of collagen modules increases in vivo HUVEC survival and vessel formation in SCID mice. *Acta Biomater*; 7 (3): 1072-1083.
- Cox S**, Cole M a Tawil B (2004). Behavior of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue engineering*; 10 (5-6): 942-954.
- Davies JE** (2007). Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials*; 28 (34): 5058-5067.
- Dawes KE**, Gray AJ a Laurent GJ (1993). Thrombin stimulates fibroblast chemotaxis and replication. *Eur J Cell Biol*; 61 (1): 126-130.
- de Clerck YA** a Jones PA (1980). The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen and elastin by rat smooth-muscle cells. *Biochem J*; 186 (1): 217-225.
- de la Puente P**, Ludena D, Fernandez A, Aranda JL, Varela G a Iglesias J (2011). Autologous fibrin scaffolds cultured dermal fibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*; 99 (4): 648-654.
- Donoso M.G.**, Méndez-Vilas A., Bruque J.M a M.L. G-M (2007). On the relationship between common amplitude surface roughness parameters and surface area: Implications for the study of cell-material interactions. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 59 (3): 245-251.
- Dorati R**, Colonna C, Tomasi C, Genta I, Bruni G a Conti B (2014). Design of 3D scaffolds for tissue engineering testing a tough polylactide-based graft copolymer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*; 34: 130-139.
- Du J**, Cullen JJ a Buettner GR (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et biophysica acta*; 1826 (2): 443-457.
- Duan HC**, Feng B, Guo XK, Wang JM, Zhao L, Zhou GD, Liu W, Cao YL a Zhang WJ (2013). Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/polycaprolactone membranes. *Int J Nanomedicine*; 8: 2077-2084.
- Dumin JA**, Dickeson SK, Stricker TP, Bhattacharyya-Pakrasi M, Roby JD, Santoro SA a Parks WC (2001). Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*; 276 (31): 29368-29374.

- Dvorankova B**, Smetana K, Jr., Vacik J a Jelinkova M (1996). Cultivation of keratinocytes on poly HEMA and their migration after inversion. *Folia Biol*; 42 (3): 83-86.
- Dwivedi P**, Nayak V a Kowshik M (2015). Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. *Biotechnol Prog*.
- Eastwood M**, Porter R, Khan U, McGrouther G a Brown R (1996). Quantitative analysis of collagen gel contractile forces generated by dermal fibroblasts and the relationship to cell morphology. *Journal of Cellular Physiology*; 166 (1): 33-42.
- Engler A**, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M a Discher D (2004). Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J*; 86 (1 Pt 1): 617-628.
- Eungdamrong NJ**, Higgins C, Guo Z, Lee WH, Gillette B, Sia S a Christiano AM (2014). Challenges and promises in modeling dermatologic disorders with bioengineered skin. *Experimental biology and medicine*; 239 (9): 1215-1224.
- Friesenbichler J**, Sadoghi P, Maurer-Ertl W, Szkandera J, Glehr M, Ogris K, Wolf M, Weger C a Leithner A (2014). Serum metal ion concentrations in paediatric patients following total knee arthroplasty using megaprotheses. *Biomed Res Int*; 2014: 817257.
- Fu XL**, Xu M, Liu J, Qi YM, Li SH a Wang HJ (2014). Regulation of migratory activity of human keratinocytes by topography of multiscale collagen-containing nanofibrous matrices. *Biomaterials*; 35 (5): 1496-1506.
- Fujisaki H**, Adachi E a Hattori S (2008). Keratinocyte differentiation and proliferation are regulated by adhesion to the three-dimensional meshwork structure of type IV collagen. *Connective tissue research*; 49 (6): 426-436.
- Fukuzaki S**, Urano H a Nagata K (1996). Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces. *Journal of Fermentation and Bioengineering*; 81 (2): 163-167.
- Gailit J**, Clarke C, Newman D, Tonnesen MG, Mosesson MW a Clark RA (1997). Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha(v)beta3. *Exp Cell Res*; 232 (1): 118-126.
- Gallucci RM**, Sloan DK, Heck JM, Murray AR a O'Dell SJ (2004). Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*; 122 (3): 764-772.
- Garric X**, Moles JP, Garreau H, Guilhou JJ a Vert M (2005). Human skin cell cultures onto PLA50 (PDLA) bioresorbable polymers: influence of chemical and morphological surface modifications. *J Biomed Mater Res A*; 72 (2): 180-189.
- Gauvreau V** a Laroche G (2005). Micropattern printing of adhesion, spreading, and migration peptides on poly(tetrafluoroethylene) films to promote endothelialization. *Bioconjugate Chemistry*; 16 (5): 1088-1097.
- Gentile P**, Chiono V, Carmagnola I a Hatton PV (2014). An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*; 15 (3): 3640-3659.
- Ghosh K**, Ren XD, Shu XZ, Prestwich GD a Clark RAF (2006). Fibronectin functional domains coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing. *Tissue Engineering*; 12 (3): 601-613.
- Gobin AS** a West JL (2003). Val-ala-pro-gly, an elastin-derived non-integrin ligand: smooth muscle cell adhesion and specificity. *J Biomed Mater Res A*; 67 (1): 255-259.
- Goldman M**, Juodzbaly G a Vilkinis V (2014). Titanium surfaces with nanostructures influence on osteoblasts proliferation: a systematic review. *Journal of oral & maxillofacial research*; 5 (3): e1.
- Gorodetsky R**, Clark RA, An J, Gailit J, Levinsky L, Vexler A, Berman E a Marx G (1999). Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing. *J Invest Dermatol*; 112 (6): 866-872.

- Gray AJ**, Bishop JE, Reeves JT a Laurent GJ (1993). A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *J Cell Sci*; 104 (Pt 2): 409-413.
- Grinnell F** (1986). Focal adhesion sites and the removal of substratum-bound fibronectin. *J Cell Biol*; 103 (6 Pt 2): 2697-2706.
- Gugerell A**, Schossleitner K, Wolbank S, Nurnberger S, Redl H, Gulle H, Goppelt A, Bittner M a Pastener W (2012). High thrombin concentrations in fibrin sealants induce apoptosis in human keratinocytes. *J Biomed Mater Res A*; 100 (5): 1239-1247.
- Guo L**, Zhang H, Wang F, Liu P, Wang Y, Xia G, Liu R, Li X, Yin H, Jiang H a Chen B (2015). Targeted multidrug-resistance reversal in tumor based on PEG-PLL-PLGA polymer nano drug delivery system. *Int J Nanomedicine*; 10: 4535-4547.
- Han CM**, Zhang LP, Sun JZ, Shi HF, Zhou J a Gao CY (2010). Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. *J Zhejiang Univ Sci B*; 11 (7): 524-530.
- Hansbrough JF**, Dore C a Hansbrough WB (1992). Clinical trials of a living dermal tissue replacement placed beneath meshed, split-thickness skin grafts on excised burn wounds. *The Journal of burn care & rehabilitation*; 13 (5): 519-529.
- Haslik W**, Kamolz LP, Nathschlager G, Andel H, Meissl G a Frey M (2007). First experiences with the collagen-elastin matrix Matriderm as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand. *Burns*; 33 (3): 364-368.
- He W**, Ma ZW, Yong T, Teo WE a Ramakrishna S (2005). Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials*; 26 (36): 7606-7615.
- Heitz J**, Svorcik V, Bacakova L, Rockova K, Ratajova E, Gumpenberger T, Bauerle D, Dvorankova B, Kahr H, Graz I a Romanin C (2003). Cell adhesion on polytetrafluoroethylene modified by UV-irradiation in an ammonia atmosphere. *J Biomed Mater Res A*; 67 (1): 130-137.
- Helmedag MJ**, Weinandy S, Marquardt Y, Baron JM, Pallua N, Suschek CV a Jockenhoevel S (2015). The effects of constant flow bioreactor cultivation and keratinocyte seeding densities on prevascularized organotypic skin grafts based on a fibrin scaffold. *Tissue Eng Part A*; 21 (1-2): 343-352.
- Hinek A**, Kim HJ, Wang Y, Wang A a Mitts TF (2014). Sodium L-ascorbate enhances elastic fibers deposition by fibroblasts from normal and pathologic human skin. *Journal of dermatological science*; 75 (3): 173-182.
- Hiwatashi N**, Hirano S, Mizuta M, Kobayashi T, Kawai Y, Kanemaru SI, Nakamura T, Ito J, Kawai K a Suzuki S (2015). The efficacy of a novel collagen-gelatin scaffold with basic fibroblast growth factor for the treatment of vocal fold scar. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.
- Holy CE**, Dang SM, Davies JE a Shoichet MS (1999). In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials*; 20 (13): 1177-1185.
- Hosseinkhani B**, Callewaert C, Vanbeveren N a Boon N (2015). Novel biocompatible nanocapsules for slow release of fragrances on the human skin. *New biotechnology*; 32 (1): 40-46.
- Hoveizi E**, Nabuini M, Parivar K, Rajabi-Zeleti S a Tavakol S (2014). Functionalisation and surface modification of electrospun polylactic acid scaffold for tissue engineering. *Cell Biol Int*; 38 (1): 41-49.
- Hua N** a Sun J (2008). Body distribution of poly(D,L-lactide-co-glycolide) copolymer degradation products in rats. *J Mater Sci Mater Med*; 19 (10): 3243-3248.
- Humphries MJ**, Akiyama SK, Komoriya A, Olden K a Yamada KM (1986). Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell type-specific adhesion. *J Cell Biol*; 103 (6 Pt 2): 2637-2647.
- Chang HI** a Wang Y (2011). Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. In Regenerative medicine and tissue engineering - cells and biomaterials, edited by P. D. Eberli: *InTech*, 569-588.



- Chlupac J**, Filova E a Bacakova L (2009). Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res*; 58 Suppl 2: S119-139.
- Chung TW**, Liu DZ, Wang SY a Wang SS (2003). Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials*; 24 (25): 4655-4661.
- Idrus RB**, Rameli MA, Low KC, Law JX, Chua KH, Latiff MB a Saim AB (2014). Full-thickness skin wound healing using autologous keratinocytes and dermal fibroblasts with fibrin: bilayered versus single-layered substitute. *Adv Skin Wound Care*; 27 (4): 171-180.
- Jain S**, Kaur H, Pandav G, Dewan A a Saxena D (2009). Collagen: Basis of Life. *Univ Res J Dent*; 4 (1-9).
- Janmey PA**, Winer JP a Weisel JW (2009). Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*; 6 (30): 1-10.
- Jeong SI**, Jun ID, Choi MJ, Nho YC, Lee YM a Shin H (2008). Development of electroactive and elastic nanofibers that contain polyaniline and poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) for the control of cell adhesion. *Macromol Biosci*; 8 (7): 627-637.
- Jiang J**, Wan F, Yang J, Hao W, Wang Y, Yao J, Shao Z, Zhang P, Chen J, Zhou L a Chen S (2014). Enhancement of osseointegration of polyethylene terephthalate artificial ligament by coating of silk fibroin and depositing of hydroxyapatite. *Int J Nanomedicine*; 9: 4569-4580.
- Jirka I**, Vandrovцова M, Frank O, Tolde Z, Plsek J, Luxbacher T, Bacakova L a Stary V (2013). On the role of Nb-related sites of an oxidized beta-TiNb alloy surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*; 33 (3): 1636-1645.
- Johansson K**, Greis G, Johansson B, Grundtmann A, Pahlby Y, Torn S, Axelberg H a Carlsson P (2013). Evaluation of a new PVC-free catheter material for intermittent catheterization: a prospective, randomized, crossover study. *Scand J Urol*; 47 (1): 33-37.
- Keselowsky BG**, Collard DM a Garcia AJ (2005). Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 102 (17): 5953-5957.
- Killat J**, Reimers K, Choi CY, Jahn S, Vogt PM a Radtke C (2013). Cultivation of keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional bovine collagen-elastin matrix (Matriderm®) and application for full thickness wound coverage in vivo. *International journal of molecular sciences*; 14 (7): 14460-14474.
- Kirchhof S**, Goepferich AM a Brandl FP (2015). Hydrogels in ophthalmic applications. *Eur J Pharm Biopharm*.
- Kromka A**, Grausova L, Bacakova L, Vacik J, Rezek B, Vanecek M, Williams OA a Haenen K (2010). Semiconducting to metallic-like boron doping of nanocrystalline diamond films and its effect on osteoblastic cells. *Diamond and Related Materials*; 19 (2-3): 190-195.
- Kubo K**, Tsukimura N, Iwasa F, Ueno T, Saruwatari L, Aita H, Chiou WA a Ogawa T (2009). Cellular behavior on TiO<sub>2</sub> nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. *Biomaterials*; 30 (29): 5319-5329.
- Kubo M**, Van de Water L, Plantefaber LC, Mosesson MW, Simon M, Tonnesen MG, Taichman L a Clark RA (2001). Fibrinogen and fibrin are anti-adhesive for keratinocytes: a mechanism for fibrin eschar slough during wound repair. *J Invest Dermatol*; 117 (6): 1369-1381.
- Kucinska-Lipka J**, Gubanska I a Janik H (2013). Gelatin-modified polyurethanes for soft tissue scaffold. *ScientificWorldJournal*; 2013: 450132.
- Langer R** a Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science*; 260 (5110): 920-926.
- Larranaga A**, Alonso-Varona A, Palomares T, Rubio-Azpeitia E, Aldazabal P, Martin FJ a Sarasua JR (2015). Effect of bioactive glass particles on osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on lactide and caprolactone based scaffolds. *J Biomed Mater Res A*.

- Laurens N**, Koolwijk P a de Maat MP (2006). Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost*; 4 (5): 932-939.
- Le Guehenec L**, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y a Layrolle P (2008). Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater*; 4 (3): 535-543.
- Le Guehenec L**, Soueidan A, Layrolle P a Amouriq Y (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*; 23 (7): 844-854.
- Liu CB**, Wang XJ, Liu RH, Wu YL a Luo SL (2010). A new multifunctional polymer Synthesis and characterization of mPEG-b-PAA-grafted chitosan copolymer. *Journal of Central South University of Technology*; 17 (5): 936-942.
- Liu L**, Deng L, Wang Y, Ge L, Chen Y a Liang Z (2012). Porcine urinary bladder matrix-polypropylene mesh: a novel scaffold material reduces immunorejection in rat pelvic surgery. *Int Urogynecol J*; 23 (9): 1271-1278.
- Liu L**, Chen S, Giachelli CM, Ratner BD a Jiang S (2005). Controlling osteopontin orientation on surfaces to modulate endothelial cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*; 74 (1): 23-31.
- Loh QL** a Choong C (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*; 19 (6): 485-502.
- Lu L**, Peter SJ, Lyman MD, Lai HL, Leite SM, Tamada JA, Uyama S, Vacanti JP, Langer R a Mikos AG (2000). In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*; 21 (18): 1837-1845.
- Lugo LM**, Lei P a Andreadis ST (2011). Vascularization of the dermal support enhances wound re-epithelialization by in situ delivery of epidermal keratinocytes. *Tissue engineering. Part A*; 17 (5-6): 665-675.
- Mann BK** a West JL (2002). Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*; 60 (1): 86-93.
- Marchisio PC**, Cancedda R a Deluca M (1990). Structural and Functional-Studies of Integrin Receptors in Cultured Human Keratinocytes. *Cell Differentiation and Development*; 32 (3): 355-360.
- Mazlyzam AL**, Aminuddin BS, Fuzina NH, Norhayati MM, Fauziah O, Isa MR, Saim L a Ruszymah BH (2007). Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns*; 33 (3): 355-363.
- Mazzone L**, Pontiggia L, Reichmann E, Ochsenein-Kolble N, Moehrlen U a Meuli M (2014). Experimental tissue engineering of fetal skin. *Pediatr Surg Int*; 30 (12): 1241-1247.
- McMillan JR**, Akiyama M, Tanaka M, Yamamoto S, Goto M, Abe R, Sawamura D, Shimomura M a Shimizu H (2007). Small-diameter porous poly (epsilon-caprolactone) films enhance adhesion and growth of human cultured epidermal keratinocyte and dermal fibroblast cells. *Tissue Eng*; 13 (4): 789-798.
- Meinhart JG**, Schense JC, Schima H, Gorlitzer M, Hubbell JA, Deutsch M a Zilla P (2005). Enhanced endothelial cell retention on shear-stressed synthetic vascular grafts precoated with RGD-cross-linked fibrin. *Tissue Engineering*; 11 (5-6): 887-895.
- Meiron TS**, Marmur A a Saguy IS (2004). Contact angle measurement on rough surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*; 274 (2): 637-644.
- Mekhail M**, Wong KK, Padavan DT, Wu Y, O'Gorman DB a Wan W (2010). Genipin-Cross-linked Electrospun Collagen Fibers. *J Biomater Sci Polym Ed*.
- Michael S**, Sorg H, Peck CT, Koch L, Deiwick A, Chichkov B, Vogt PM a Reimers K (2013). Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS One*; 8 (3): e57741.

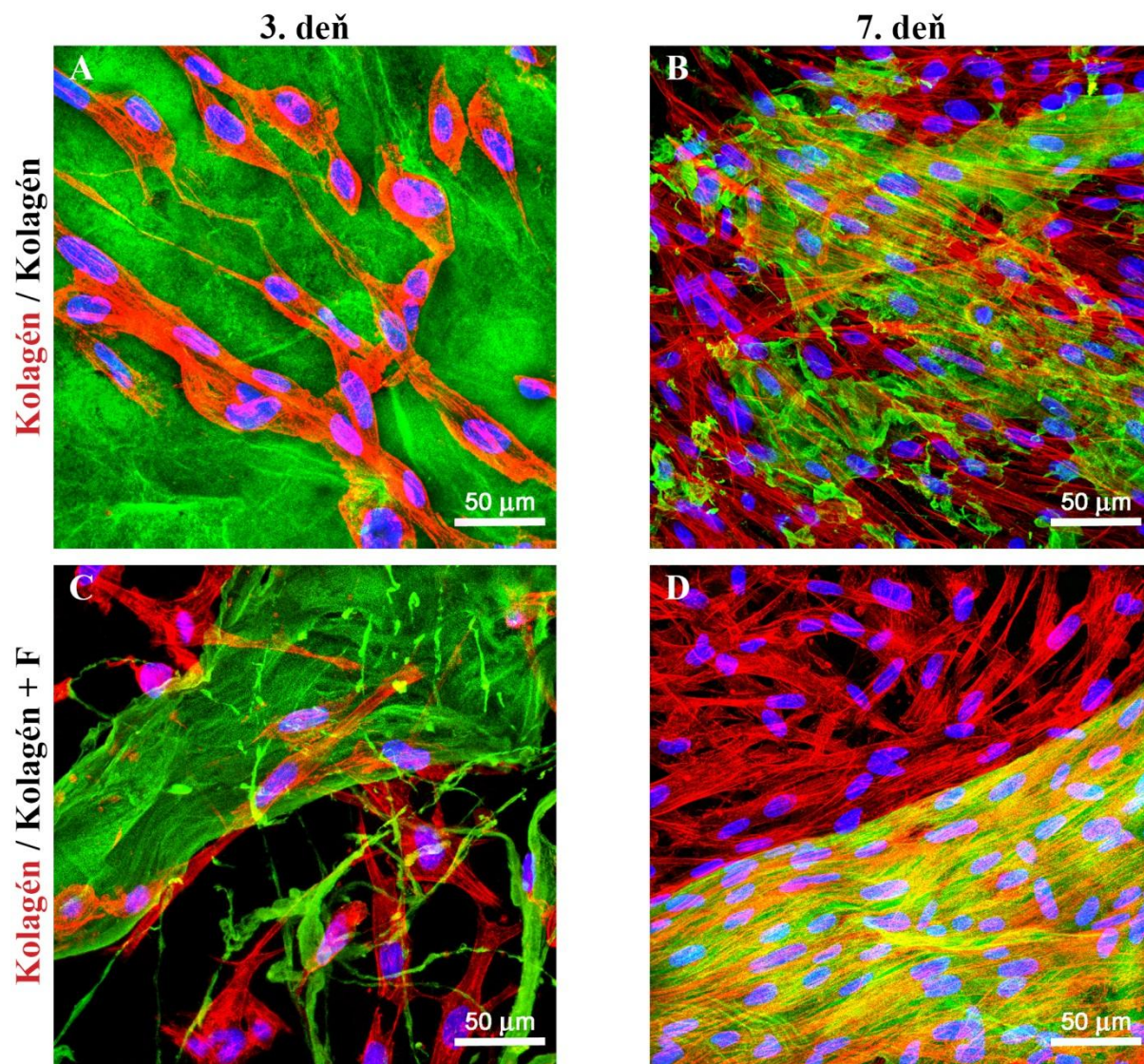
- Mohamed A** a Xing MM (2012). Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *International journal of burns and trauma*; 2 (1): 29-41.
- Monteiro IP**, Gabriel D, Timko BP, Hashimoto M, Karajanagi S, Tong R, Marques AP, Reis RL a Kohane DS (2014). A two-component pre-seeded dermal-epidermal scaffold. *Acta Biomater*; 10 (12): 4928-4938.
- Murad S**, Grove D, Lindberg KA, Reynolds G, Sivarajah A a Pinnell SR (1981). Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 78 (5): 2879-2882.
- Mutsaers SE**, Bishop JE, McGrouther G a Laurent GJ (1997). Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*; 29 (1): 5-17.
- Nair RP**, Joseph J, Harikrishnan VS, Krishnan VK a Krishnan L (2014). Contribution of fibroblasts to the mechanical stability of in vitro engineered dermal-like tissue through extracellular matrix deposition. *Biores Open Access*; 3 (5): 217-225.
- Nam SY**, Chung E, Suggs LJ a Emelianov SY (2015). Combined ultrasound and photoacoustic imaging to noninvasively assess burn injury and selectively monitor a regenerative tissue-engineered construct. *Tissue Eng Part C Methods*; 21 (6): 557-566.
- Narayanan R**, Seshadri SK, Kwon TY a Kim KH (2008). Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. Journal of biomedical materials research. Part B, *Applied biomaterials*; 85 (1): 279-299.
- Niiyama H** a Kuroyanagi Y (2014). Development of novel wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor and vitamin C derivative. *Journal of artificial organs: the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs*; 17 (1): 81-87.
- Nouri A** a Wen C (2015). Introduction to surface coating and modification for metallic biomaterials. In Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials, edited by C. Wen: *Woodhead Publishing*, 3-60.
- Novotna K**, Bacakova M, Kasalkova N, Slepicka P, Lisa V, Svorcik V a Bacakova L (2013). Adhesion and Growth of Vascular Smooth Muscle Cells on Nanostructured and Biofunctionalized Polyethylene. *Materials*; 6 (5): 1632-1655.
- Nyman E**, Huss F, Nyman T, Junker J a Kratz G (2013). Hyaluronic acid, an important factor in the wound healing properties of amniotic fluid: in vitro studies of re-epithelialisation in human skin wounds. *Journal of plastic surgery and hand surgery*; 47 (2): 89-92.
- Oxvig C** a Springer TA (1998). Experimental support for a beta-propeller domain in integrin alpha-subunits and a calcium binding site on its lower surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95 (9): 4870-4875.
- Paital SR** a Dahotre NB (2009). Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science & Engineering R-Reports*; 66 (1-3): 1-70.
- Pan Z** a Ding J (2012). Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface focus*; 2 (3): 366-377.
- Parente ME**, Ochoa Andrade A, Ares G, Russo F a Jimenez-Kairuz A (2015). Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. *International journal of cosmetic science*.
- Parizek M**, Slepickova Kasalkova N, Bacakova L, Svindrych Z, Slepicka P, Bacakova M, Lisa V a Svorcik V (2013). Adhesion, growth, and maturation of vascular smooth muscle cells on low-density polyethylene grafted with bioactive substances. *Biomed Res Int*; 2013: 371430.
- Pastar I**, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR a Tomic-Canic M (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in wound care*; 3 (7): 445-464.
- Planell JA**, Navarro M, Altankov G, Aparicio C, Engel E, Gil J, Ginebra MP a DL (2010). Materials surface effects on biological interactions. In Advances in regenerative medicine: role of nanotechnology, and engineering principles, edited by Shastri V. P., Altankov G. a L. A.: *Springer* 233-252.

- Protivinsky J**, Appleford M, Strnad J, Helebrant A a Ong JL (2007). Effect of chemically modified titanium surfaces on protein adsorption and osteoblast precursor cell Behavior. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*; 22 (4): 542-550.
- Rabe M**, Verdes D a Seeger S (2011). Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*; 162 (1-2): 87-106.
- Ranieri JP**, Bellamkonda R, Bekos EJ, Gardella JA, Jr., Mathieu HJ, Ruiz L a Aebischer P (1994). Spatial control of neuronal cell attachment and differentiation on covalently patterned laminin oligopeptide substrates. *Int J Dev Neurosci*; 12 (8): 725-735.
- Reinertsen E**, Skinner M, Wu B a Tawil B (2014). Concentration of Fibrin and Presence of Plasminogen Affect Proliferation, Fibrinolytic Activity, and Morphology of Human Fibroblasts and Keratinocytes in 3D Fibrin Constructs. *Tissue Engineering Part A*; 20 (21-22): 2860-2869.
- Reno F**, Traina V, Gatti S, Battistella E a Cannas M (2008). Functionalization of a poly(D,L)lactic acid surface with galactose to improve human keratinocyte behavior for artificial epidermis. *Biotechnol Bioeng*; 100 (1): 195-202.
- Revi D**, Paul W, Anilkumar TV a Sharma CP (2014). Chitosan scaffold co-cultured with keratinocyte and fibroblast heals full thickness skin wounds in rabbit. *J Biomed Mater Res A*; 102 (9): 3273-3281.
- Rimpelova S**, Kasalkova NS, Slepicka P, Lemerova H, Svorcik V a Ruml T (2013). Plasma treated polyethylene grafted with adhesive molecules for enhanced adhesion and growth of fibroblasts. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*; 33 (3): 1116-1124.
- Rinn JL**, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO a Chang HY (2006). Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS genetics*; 2 (7): e119.
- Rnjak-Kovacina J**, Wise SG, Li Z, Maitz PK, Young CJ, Wang Y a Weiss AS (2012). Electrospun synthetic human elastin:collagen composite scaffolds for dermal tissue engineering. *Acta Biomater*; 8 (10): 3714-3722.
- Ruoslahti E** a Pierschbacher MD (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*; 238 (4826): 491-497.
- Sackmann E** a Smith AS (2014). Physics of cell adhesion: some lessons from cell-mimetic systems. *Soft Matter*; 10 (11): 1644-1659.
- Santiago LY**, Nowak RW, Rubin JP a Marra KG (2006). Peptide-surface modification of poly(caprolactone) with laminin-derived sequences for adipose-derived stem cell applications. *Biomaterials*; 27 (15): 2962-2969.
- Sclafani AP** a McCormick SA (2012). Induction of dermal collagenesis, angiogenesis, and adipogenesis in human skin by injection of platelet-rich fibrin matrix. *Arch Facial Plast Surg*; 14 (2): 132-136.
- Seet WT**, Manira M, Khairul Anuar K, Chua KH, Ahmad Irfan AW, Ng MH, Aminuddin BS a Ruszymah BH (2012). Shelf-life evaluation of bilayered human skin equivalent, MyDerm. *PLoS One*; 7 (8): e40978.
- Sekiya N**, Ichioka S, Terada D, Tsuchiya S a Kobayashi H (2013). Efficacy of a poly glycolic acid (PGA)/collagen composite nanofibre scaffold on cell migration and neovascularisation in vivo skin defect model. *Journal of plastic surgery and hand surgery*; 47 (6): 498-502.
- Sese N**, Cole M a Tawil B (2011). Proliferation of human keratinocytes and cocultured human keratinocytes and fibroblasts in three-dimensional fibrin constructs. *Tissue engineering. Part A*; 17 (3-4): 429-437.
- Shen Y**, Dai L, Li X, Liang R, Guan G, Zhang Z, Cao W, Liu Z, Mei S, Liang W, Qin S, Xu J a Chen H (2014). Epidermal stem cells cultured on collagen-modified chitin membrane induce in situ tissue regeneration of full-thickness skin defects in mice. *PLoS One*; 9 (2): e87557.
- Shevchenko RV**, James SL a James SE (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*; 7 (43): 229-258.

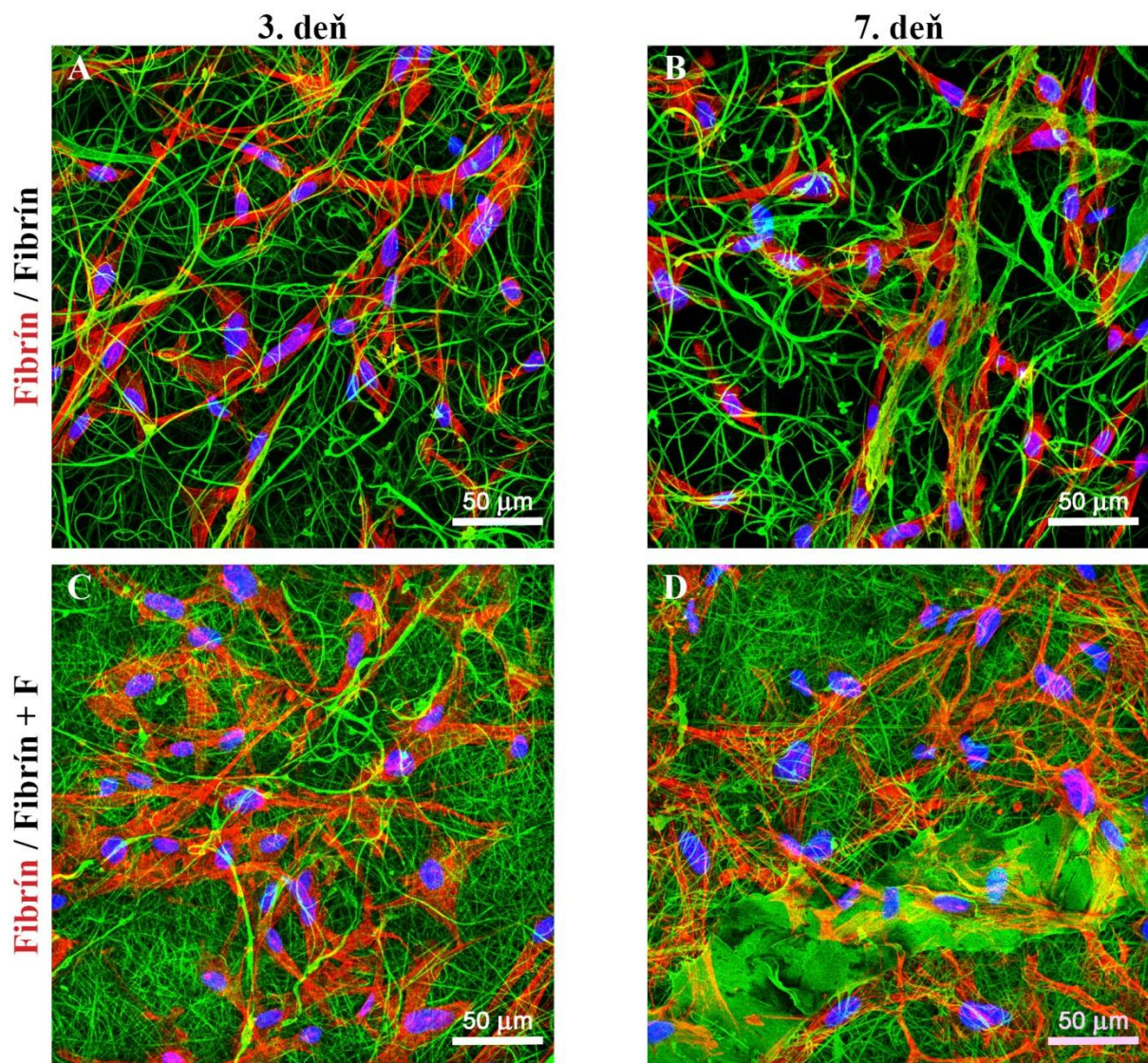
- Shibayama H**, Hisama M, Matsuda S, Ohtsuki M a Iwaki M (2008). Effect of a novel ascorbic derivative, disodium isostearyl 2-O-L-ascorbyl phosphate on human dermal fibroblasts: increased collagen synthesis and inhibition of MMP-1. *Biological & pharmaceutical bulletin*; 31 (4): 563-568.
- Shin H**, Jo S a kol. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*; 24 (24): 4353-4364.
- Schuetz T**, Richmond N, Harmon ME, Schuetz J, Castaneda L a Slowinska K (2013). The microstructure of collagen type I gel cross-linked with gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*; 101: 118-125.
- Siegel J**, Polivkova M, Kasalkova NS, Kolska Z a Svorcik V (2013). Properties of silver nanostructure-coated PTFE and its biocompatibility. *Nanoscale Res Lett*; 8 (1): 388.
- Sit PS** (2013). Studying molecular-scale protein-surface interactions in biomaterials. *Characterization of Biomaterials*; (64): 182-223.
- Sivan U**, Jayakumar K a Krishnan LK (2014). Constitution of fibrin-based niche for in vitro differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells to keratinocytes. *Biores Open Access*; 3 (6): 339-347.
- Sobajo C**, Behzad F a kol. (2008). Silk: a potential medium for tissue engineering. *Eplasty*; 8: 47.
- Staatz WD**, Fok KF, Zutter MM, Adams SP a kol. (1991). Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen. *J Biol Chem*; 266 (12): 7363-7367.
- Steinert PM**, Marekov LN a Parry DA (1993). Conservation of the structure of keratin intermediate filaments: molecular mechanism by which different keratin molecules integrate into preexisting keratin intermediate filaments during differentiation. *Biochemistry*; 32 (38): 10046-10056.
- Sun T**, Mai S, Norton D, Haycock JW, Ryan AJ a MacNeil S (2005). Self-organization of skin cells in three-dimensional electrospun polystyrene scaffolds. *Tissue Eng*; 11 (7-8): 1023-1033.
- Svorcik V** (2004). Cell proliferation on UV-excimer lamp modified and grafted polytetrafluoroethylene. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*; 217 (2): 307-313.
- Svorcik V**, Kasalkova N, Slepicka P, Zaruba K, Kral V, Bacakova L, Parizek M, Lisa V, Ruml T, Gbelcova H, Rimpelova S a Mackova A (2009). Cytocompatibility of Ar+ plasma treated and Au nanoparticle-grafted PE. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*; 267 (11): 1904-1910.
- Taghiabadi E**, Mohammadi P, Aghdami N, Falah N, Orouji Z, Nazari A a Shafieyan S (2015). Treatment of Hypertrophic Scar in Human with Autologous Transplantation of Cultured Keratinocytes and Fibroblasts along with Fibrin Glue. *Cell J*; 17 (1): 49-58.
- Tajima S** a Pinnell SR (1996). Ascorbic acid preferentially enhances type I and III collagen gene transcription in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci*; 11 (3): 250-253.
- Tamada Y** a Ikada Y (1993). Effect of Preadsorbed Proteins on Cell-Adhesion to Polymer Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*; 155 (2): 334-339.
- Tang A** a Gilchrist BA (1996). Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *Journal of dermatological science*; 11 (1): 41-50.
- Tausche AK**, Skaria M, Bohlen L, Liebold K, Hafner J, Friedlein H, Meurer M a kol. (2003). An autologous epidermal equivalent tissue-engineered from follicular outer root sheath keratinocytes is as effective as split-thickness skin autograft in recalcitrant vascular leg ulcers. *Wound Repair Regen*; 11 (4): 248-252.
- Thottappillil N** a Nair PD (2015). Scaffolds in vascular regeneration: current status. *Vasc Health Risk Manag*; 11: 79-91.
- Trescher K**, Scharnagl N, Kratz K, Roch T, Lendlein A a Jung F (2012). Adherence and viability of primary human keratinocytes and primary human dermal fibroblasts on acrylonitrile-based copolymers with different concentrations of positively charged functional groups. *Clin Hemorheol Microcirc*; 52 (2-4): 391-401.
- Truong T**, Shams H a Mofrad MR (2015). Mechanisms of integrin and filamin binding and their interplay with talin during early focal adhesion formation. *Integr Biol (Camb)*.

- Tuan TL**, Song A, Chang S, Younai S a Nimni ME (1996). In vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Exp Cell Res*; 223 (1): 127-134.
- Vaesken A**, Khoffi F, Heim F, Dieval F a Chakfe N (2015). Fiber heart valve prosthesis: Early in vitro fatigue results. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.
- Vandrovcova M**, Jirka I, Novotna K, Lisa V, Frank O, Kolska Z, Stary V a Bacakova L (2014). Interaction of human osteoblast-like Saos-2 and MG-63 cells with thermally oxidized surfaces of a titanium-niobium alloy. *PLoS One*; 9 (6): e100475.
- Wang HM**, Chou YT, Wen ZH, Wang ZR, Chen CH a Ho ML (2013). Novel Biodegradable Porous Scaffold Applied to Skin Regeneration. *PLoS One*; 8 (6).
- Wang TW**, Wu HC, Huang YC, Sun JS a Lin FH (2006). The effect of self-designed bifunctional RGD-containing fusion protein on the behavior of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*; 79B (2): 379-387.
- Wang W**, Guo L, Yu Y, Chen Z, Zhou R a Yuan Z (2014). Peptide REDV-modified polysaccharide hydrogel with endothelial cell selectivity for the promotion of angiogenesis. *J Biomed Mater Res A*.
- Wang X**, Ding B a Li B (2013). Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. *Materials today*; 16 (6): 229-241.
- Werner S**, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH a Williams LT (1994). The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*; 266 (5186): 819-822.
- Wong DJ** a Chang HY (2009). Skin tissue engineering In StemBook, edited by Bhatia S. a P. J. Cambridge: *Harvard Stem Cell Institute*.
- Wu L** a Ding J (2005). Effects of porosity and pore size on in vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*; 75 (4): 767-777.
- Xiong JP**, Stehle T, Zhang RG, Joachimiak A a kol. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*; 296 (5565): 151-155.
- Xu H**, Su J, Sun J a Ren T (2012). Preparation and characterization of new nano-composite scaffolds loaded with vascular stents. *International journal of molecular sciences*; 13 (3): 3366-3381.
- Xu LC** a Siedlecki CA (2007). Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*; 28 (22): 3273-3283.
- Yamamoto M**, Yanaga H, Nishina H, Watabe S a Mamba K (2005). Fibrin stimulates the proliferation of human keratinocytes through the autocrine mechanism of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor. *Tohoku J Exp Med*; 207 (1): 33-40.
- You Y**, Lee SJ, Min B a Park WH (2005). Effect of solution properties on nanofibrous structure of electrospun poly(lactic-co-glycolic acid). *Journal of Applied Polymer Science*; 99 (3): 1214-1221.
- Zambruno G**, Marchisio PC, Marconi A a kol. (1995). Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol*; 129 (3): 853-865.
- Zhang X** a Zhang Y (2015). Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting. *Cell Biochem Biophys*.
- Zhou S**, Salisbury J, Preedy VR a Emery PW (2013). Increased collagen synthesis rate during wound healing in muscle. *PLoS One*; 8 (3): e58324.
- Zhou T**, Wang NP, Xue Y, Ding TT, Liu X, Mo XM a Sun J (2015). Development of Biomimetic Tilapia Collagen Nanofibers for Skin Regeneration through Inducing Keratinocytes Differentiation and Collagen Synthesis of Dermal Fibroblasts. *Acs Applied Materials & Interfaces*; 7 (5): 3253-3262.

## 15. Prílohy

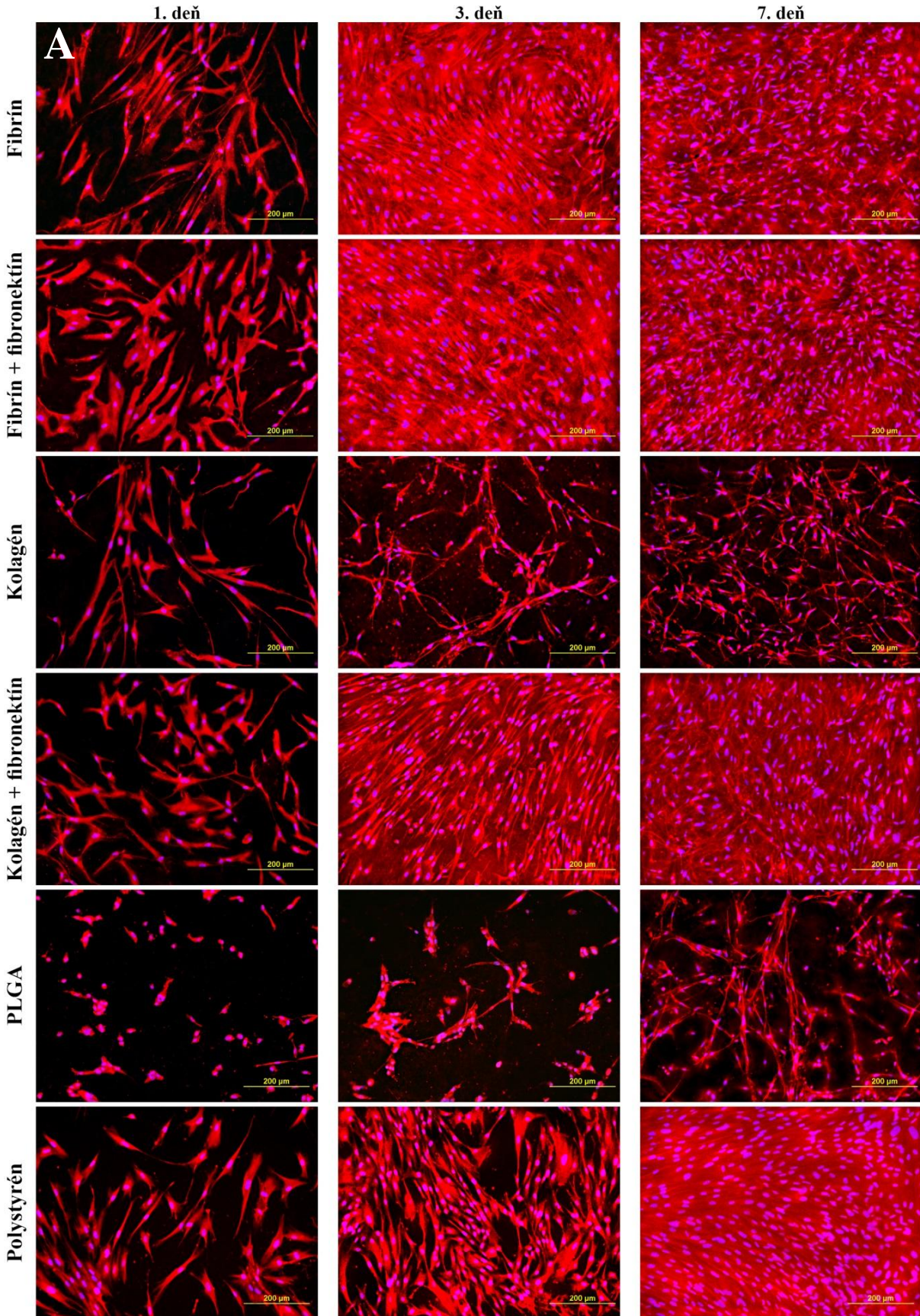


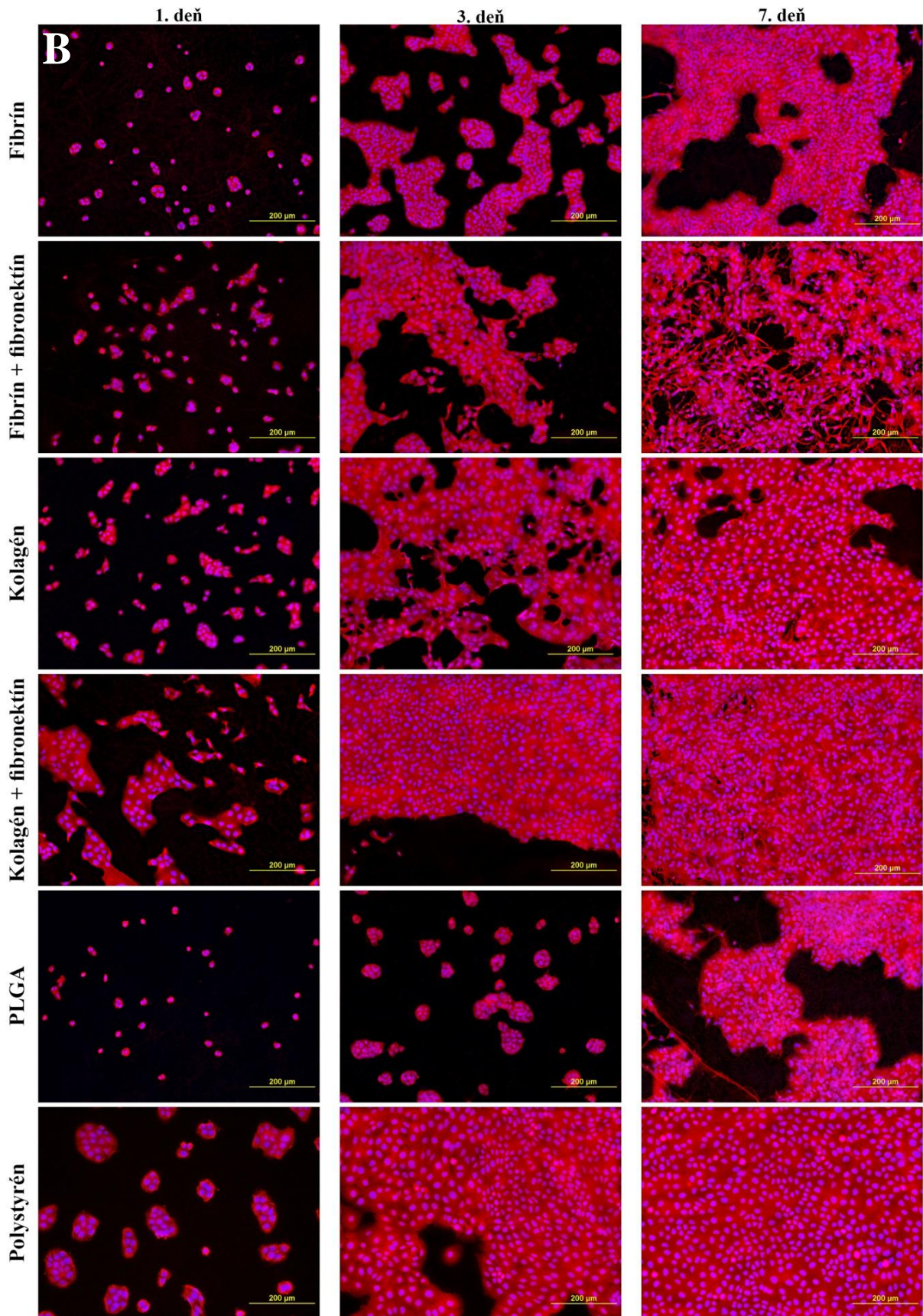
**Príloha 1: Fibroblasty na membráne z PLGA modifikovanej kolagénom a kolagénom s fibronektínom.** Kultivácia buniek v DMEM s FBS, pridávanie fibronektínu (F), vizualizácia v 2 intervaloch (3. a 7. deň). Imunofluorescenčné farbenie vrstiev pomocou primárnej a sekundárnej protilátky (zelená). Červené označenia pred lomítkom predstavujú použité primárne protilátky (proteín, ktorý je nafarbený na fotke); tmavé označenie za lomítkom predstavuje typ modifikácie. Bunky farbené Phalloidinom (cytoskelet - červená) a Hoechstom #33258 (jadra - modrá). Leica TCS SPE DM2500 konfokálny mikroskop; obj. 40x/1.15 NA, mierka 50 μm.



**Príloha 2: Fibroblasty na membráne z PLGA modifikovanej fibrínom a fibrínom s fibronektínom.** Kultivácia buniek v DMEM s FBS, pridávanie fibronektínu (F), vizualizácia v 2 intervaloch (3. a 7. deň). Imunofluorescenčné farbenie vrstiev pomocou primárnej a sekundárnej protilátky (zelená). Červené označenia pred lomítkom predstavujú použité primárne protilátky (proteín, ktorý je nafarbený na fotke); tmavé označenie za lomítkom predstavuje typ modifikácie. Bunky farbené Phalloidinom (cytoskelet - červená) a Hoechstom #33258 (jadra - modrá). Leica TCS SPE DM2500 konfokálny mikroskop; obj. 40x/1.15 NA, mierka 50 µm.







**Príloha 3: Adhézia, morfológia a proliferácia kožných buniek na membráne z PLGA - ľudské dermálne fibroblasty (A), keratinocyty línie HaCaT (B).** Kultivácia buniek v DMEM s FBS; vizualizácia 1., 3. a 7. deň po nasadení na modifikovanej membráne, nemodifikovanej membráne a na polystyréne (dno jamky kultivačnej doštičky) ako kontrolný materiál. Bunky farbené s Texas Red C2-Maleimide (proteíny v bunke - červená) a Hoechstom #33342 (jadra - modrá). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10 x, digitálna kamera DP 70, mierka 200 µm.

| <i>Produkt</i>             | <i>Výrobca</i>  | <i>Vlastnosti</i>   |
|----------------------------|---|---|
| <b>Epidermálne</b>         | <i>Bioseed-S, Celaderm, CellSpray, Epicel, MySkin, VivoDerm, EpiDex, a.i.</i>   |   |
| Epicel                     | <i>Genzyme Corp., Cambridge. Mass.</i>  | Autológne keratinocyty, kultivácia 3 týždne, podklad: gáza  |
| MySkin                     | <i>Altrika. Sheffield. UK</i>   | Autológne keratinocyty, podklad: modifikovaný silikón, iba v UK   |
| <b>Dermálne</b>            | <i>Dermagraft, EZ Derm GraftJacket, Hyalomatrix, Hyalograft 3D, Integra, Oasis, TransCyte, AlloDerm, Matriderm, a. i.</i> |   |
| Dermagraft                 | <i>Advanced BioHealing. Inc., LaJolla. Calif.</i>   | Alogénne fibroblasty, podklad: polyglaktínová membrána, produkcia ECM a rastových faktorov (GF)                             |
| Integra                    | <i>Integra LifeScience Corp., Plainsboro. N.J.</i>  | Bez buniek, podklad: kolagén, chondroitín-6-sulgát, silikón, dvojrivrstva, dobrá bariéra                                    |
| Hyalograft 3D              | <i>Fidia Advanced Biopolymers Padova. Italy</i>   | Autológne fibroblasty, podklad: esterifikovaná kys. hyalurónová,  |
| <b>Derma - epidermálne</b> | <i>Aligraft, OrCel, The allograft, PolyActive, Karoskin, a.i.</i>   |   |
| Aligraft                   | <i>Organogenesis. Inc., Canton. Mass.</i>   | Alogénne keratinocyty a fibroblasty, podklad: hovädzí kolagén, produkcia proteínov ECM a GF                                 |
| OrCel                      | <i>Ortec International, N.Y.</i>  | Alogénne neonatálne fibroblasty a keratinocyty, podklad: hovädzí zosieťovaný kolagén, bunky na oboch stranách, produkciu GF |

**Príloha 4: Komerčne dostupné kožné náhrady, upravené z:** (Shevchenko RV a kol., 2010; Mohamed A a Xing MM, 2012).