

In-vitro povrchové interakce medicínských materiálů

Adéla Vystavělová

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Adéla VYSTAVĚLOVÁ**
Osobní číslo: **T10870**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **In-vitro povrchové interakce medicínských materiálů**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na zadané téma.
2. Porovnejte rozdílné druhy interakcí medicínských materiálů se živými systémy.
3. V praktické části stanovte proliferaci a cytotoxicitu připravených materiálů.
4. Citujte použitou literaturu.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. López García J., Pacherník J., Lehocký M., Junkar I., Humpolíček P., and Sába P.: Enhanced Keratinocyte Cell Attachment to Atelocollagen Thin Films Through Air and Nitrogen Plasma Treatment, *Progress in Colloid and Polymer Science* 138 (2011) 89–94.
2. Popelka A., Novák I., Lehocký M., Junkar I., Mozetič M., Kleinová A., Janigová I., Šlouf M., Bílek F. and Chodák I.: A New Route for Chitosan Immobilization onto Polyethylene Surface, *Carbohydrate Polymers* 90 (2012) 1501–1508.
3. López García J., Asadinezhad A., Pacherník J., Lehocký M., Junkar I., Humpolíček P., Sába P., and Valášek P.: Cell Proliferation of HaCaT Keratinocytes on Collagen Films Modified by Argon Plasma Treatment, *Molecules*, 15 (2010) 2845–2856.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**
Institut zdravotnických studií

Datum zadání bakalářské práce: **11. února 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Vystavělová Adéla

Obor: Polymerní materiály a technologie

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 23.5.2013

Vystavělová
.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Jedna z nejvýznamnějších charakteristik biomateriálů je jejich interakce se živými tkáněmi. Prvotní kontakt v tomto případě nastává prostřednictvím uchycení buňky a následné proliferace a nabývá nejvyšší důležitosti pro adekvátní a uspokojivou interakci. V důsledku toho by materiály použité při kontaktu s živými tkáněmi měly mít schopnost podporovat buněčnou proliferaci, přičemž by hodnota cytotoxicity měla být akceptovatelná. Tudíž, tenká vrstva polysacharidu je často uchycena na povrch pro podporu buněčné proliferace.

Klíčová slova: cytotoxicita, kyselina hyaluronová, proliferace, interakce buňka povrch

ABSTRACT

One of the most important biological characteristic of biomaterials is their interaction to the living tissues. The initial contact related to cell attachment and consequent proliferation is of a paramount importance for adequate and satisfactory interaction. Due to this fact, the materials used in contact with living tissues should have ability to promote the cell proliferation while the cytotoxicity value should be acceptable. Therefore, to promote the cell proliferation, the thin polysaccharide layer is often anchored to the surface.

Keywords: cytotoxicity, hyaluronic acid, proliferation, cell surface interaction

Především bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Mariánu Lehockému, Ph.D. za odborné vedení v průběhu celé práce, obětavost při řešení problémů a poskytnutí literatury. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zdence Kucekové za pomoc a cenné rady v experimentální části.

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

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 KYSELINA HYALURONOVÁ	10
1.1 ÚVOD	10
1.2 HISTORIE	10
1.3 CHEMICKÁ STRUKTURA.....	11
1.4 VLASTNOSTI.....	12
1.5 BIOSYNTÉZA	13
1.5.1 Syntéza HA u bakterií	14
1.6 DEGRADACE.....	15
1.7 RECEPTORY	16
1.8 MEDICÍNSKÉ APLIKACE	17
1.9 CHEMICKÁ MODIFIKACE.....	19
2 KŮŽE	20
2.1 KERATINOCYTY	20
2.1.1 Keratinocyty v imunitních reakcích	22
2.1.2 Kmenové buňky a tranzitní zesilovače buněk.....	22
2.1.3 Vliv uměle připravené kůže v procesu hojení.....	23
3 FIBROBLASTY	24
3.1 ORGANIZACE KOLAGENNÍCH VLÁKEN POMOCÍ FIBROBLASTŮ	25
4 CYTOTOXICITA	26
4.1 TESTOVÁNÍ BUNĚK <i>IN VITRO</i>	26
5 POLYETHYLEN	27
5.1 ZÁKLADNÍ TYPY	27
5.2 FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
6 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI RŮZNĚ MODIFIKOVANÉHO PE	30
6.1 KULTIVACE KERATINOCYTŮ.....	30
6.2 TEST CYTOTOXICITY	30
6.3 MTT TEST	31
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
7.1 KULTIVACE KERATINOCYTŮ.....	32
7.2 TEST CYTOTOXICITY	36
ZÁVĚR	48
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	53
SEZNAM OBRÁZKŮ	55
SEZNAM TABULEK	57

ÚVOD

Pro aplikace v oblasti medicíny a farmacie jsou často požadovány pro každý typ materiálu velmi specifické charakteristiky. Tyto požadavky jsou často označovány pod pojmem biokompatibilita. Biokompatibilitu lze definovat jako schopnost biomateriálu vyvolávat příslušnou odezvu v dané konkrétní aplikaci. Tato definice je však do značné míry neostrá a jen stěží pochopitelná, protože biokompatibilita musí být vždy definována s ohledem na danou aplikaci. V některých případech lze biokompatibilitu definovat tak, že materiál vhodný pro implantáty musí být přiměřeně buňkami akceptován. V jiných případech se materiál považuje za biokompatibilní, když naopak růstu buněk brání. Kupříkladu při kontaktu krví biokompatibilita znamená, že nenastává žádná koagulace, případně je velmi omezená. Z těchto důvodů je nezbytné provádět poměrně široké množství testů biokompatibility, které se v zásadě musí doplňovat fyzikálně-chemickými analýzami s ohledem na předpokládanou aplikaci v daném biologickém systému. Interakce syntetického polymerního materiálu začíná adsorpcí komponentů z biotekutin na jeho povrch. Při této adsorpci dojde nejprve k interakci proteinů s povrchem. Z těchto důvodů se jeví jako nezbytné vytvořit na povrchu syntetického polymerního materiálu vrstvu polysacharidu, který je způsobilí zaručit příznivé biokompatibilní vlastnosti systému.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KYSELINA HYALURONOVÁ

1.1 Úvod

Kyselina hyaluronová (HA) je polysacharid, patřící do skupiny mukopolysacharidů, který se přirozeně vyskytuje ve všech živých organismech. Molekula kyseliny hyaluronové je tvořena lineárním řetězcem sestávajícím z disacharidických jednotek N-acetylglukosaminu (GlcNAc) a kyseliny D-glukuronové (GlcA) [1]. Řetězce tohoto polysacharidu mohou být tvořeny až 25 000 disacharidovými jednotkami v závislosti na místě výskytu v organismu. Typická HA v kloubech má v řetězci přibližně 10 000 disacharidických jednotek, což představuje molekulovou hmotnost řetězců kolem 4 milionů g/mol o délce 10 μm . HA je hlavní složkou extracelulární hmoty, která obklopuje migrující a proliferující buňky, zejména v embryonálních tkáních [2]. HA má mnoho biologických funkcí, z nichž u některých působí v relativně velmi malém množství, v jiných je naopak hlavní složkou a tvoří strukturální objekty. Funkce se liší také na základě toho, zda jsou její interakce s terciálními a kvartérními bílkoviny nebo s vodou a ionty. HA je zejména významná ve fyziologii, v klinických a diagnostických oborech a má poměrně významný evoluční význam [3]. Jako signální molekula se HA aktivně účastní imunologických procesů a ovlivňuje mobilitu a adhezi buněk v rámci jejich proliferace a diferenciaci [4].

1.2 Historie

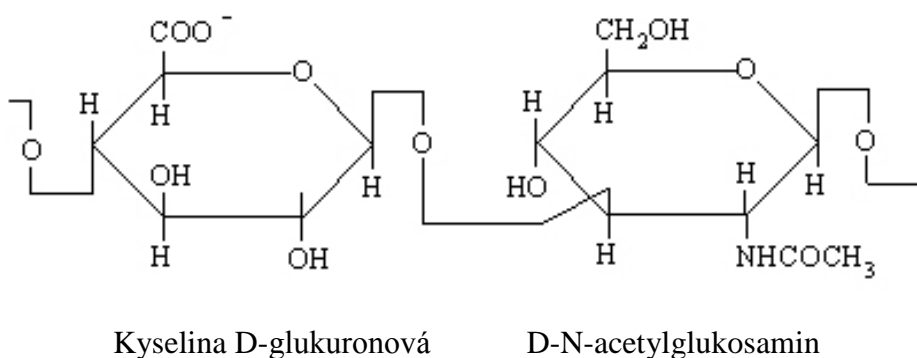
Karl Meyer a jeho kolega John Palmer izolovali v roce 1934 neznámou substanci z očního sklivce skotu. Zjistili, že neznámá substance obsahovala dva sacharidy, přičemž u jednoho se jedná o kyselinu uronovou. Název kyselina hyaluronová odvodili z řeckého slova „hyalos“ (skelný) a kyseliny uronové. V této době prokázali, že se jedná o přírodní makromolekuly [5]. Až po 20 letech však byla zjištěna skutečná struktura disacharidu [6].

První lékařská aplikace HA u lidí byla zaznamenána v roce 1950, kdy se jednalo o náhradu očního sklivce. HA byla zpočátku izolována z lidské pupeční šňůry, brzy poté i z kohoutího hřebene. Posledním uvedeným způsobem došlo k izolaci HA v poměrně vysoké čistotě a relativně velké molekulární hmotnosti. Chemická struktura HA byla v podstatě vyřešena podle Karla Meyera v roce 1950. HA byla první izolovanou kyselinou, ale za fyziologických podmínek se chovala jako sůl (hyaluronan sodný). Název „hyaluronan“ byl zaveden v roce 1986 tak, aby odpovídal mezinárodní nomenklatuře polysacharidů. HA byl následně izolován z mnoha dalších zdrojů a fyzikálně-chemické vlastnosti, struktu-

ra a biologická role tohoto polysacharidu byly studovány v mnoha laboratořích [5]. Ovšem z počátku byl značný problém HA charakterizovat. Aby mohly být zkoumány vlastnosti HA u klasických biofyzikálních metod, které byly vytvořeny pro analýzu proteinů, musely se tyto vlastnosti podobat dokonalému Newtonovskému chování. Jenže HA se ani při nízkých koncentracích k tomuto ideálnímu chování neblíží. Tímto problémem se v minulosti zabývalo mnoho výzkumníků [3].

1.3 Chemická struktura

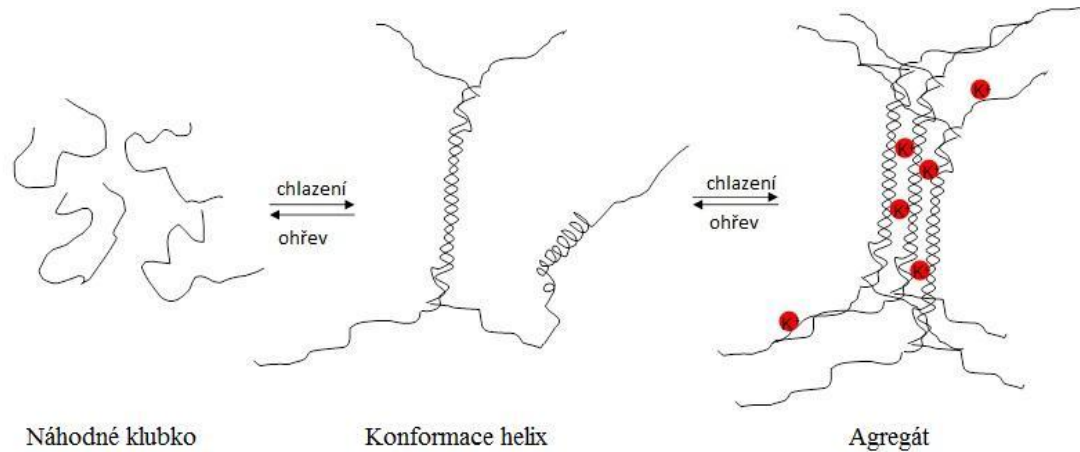
Kyselina uronová a aminosacharid v disacharidické jednotce jsou kyselina D-glukuronová a D-N-acetylglukosamin, a jsou propojeny střídavě β -1,4 a β -1,3 inter-glykosidickou vazbou (viz obrázek 1) [5]. Díky neobvyklým vazbám β -1,3 mají molekuly HA konformaci šroubovice [7]. Oba sacharidy prostorově souvisí s glukózou, která v beta konfiguraci umožňuje všem svým objemným skupinám, aby se nacházely v prostorově příznivých ekvatoriálních polohách, zatímco všechny malé atomy vodíku zabíraly méně stericky příznivé axiální polohy. To znamená, že struktura disacharidu je energeticky poměrně velmi stabilní [5].



Obr. 1: Chemická struktura HA [5]

Ve fyziologickém roztoku je řetězec molekuly hyaluronanu vyztužen kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s rozpouštědlem. Axiální atomy vodíku tvoří nepolární, relativně hydrofobní povrch, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární, hydrofilní povrch, čímž se vytvoří dvoj-šroubovicová struktura. Roztok hyaluronanu v řetězci polymeru je ve tvaru náhodného klubka. Tyto řetězce mohou

při velmi nízkých koncentracích vytvářet zapleteniny, a tím přispět k neobvyklým reologickým vlastnostem [5].



Obr. 2: Různé struktury hyaluronanu [8]

1.4 Vlastnosti

HA má vlastnosti elastických pevných těles a zároveň viskózních tekutin, je tedy viskoelastická. Když se řetězce HA náhle statisticky zatíží, působí v globulární konformaci na chrupavčité kloubní ploše jako bariéra. Při pohybu pod vlivem smykových sil se svinutá struktura molekul rozvíjí do lineární formy. Tím klesá viskozita HA a může se optimalizovat jeho lubrikační efekt. Když přestanou působit smykové síly, viskozita HA opět narůstá a začne vykazovat vlastnosti elastické [1]. Při zvyšování koncentrace HA se dlouhé řetězce začnou zamotávat za tvorby viskózního gelu. I při poměrně nízkých koncentracích tvoří HA hydratovaný gel [2]. Roztok HA o hmotnostní koncentraci 1 % vykazuje vlastnosti jako rosol, ale je-li vystaven tlaku, dojde vlivem deformace ke snadnějšímu toku a roztok na bázi HA může být aplikován přes injekční jehlu. Proto je HA charakterizován jako „pseudoplastický“ materiál [5].

Při fyziologickém pH a iontové síle jsou karboxylové skupiny kyseliny glukuronové záporně nabitě, což dává hyaluronanu polyaniontový charakter, který je primárně zodpovědný za vznik náhodného klubka [6]. Na karboxylové skupiny se mohou vázat ionty Ca^{2+} . Tyto skupiny jsou schopné na sebe navázat až 10 000krát více vody, než je jejich vlastní objem [7]. Když se vloží do malého prostoru, např. do extracelulární hmoty mezi dvě buň-

ky, zabírá skoro všechno rozpouštědlo. Díky tomu vzniká selektivní bariéra, ve které se mohou volně pohybovat malé molekuly, zatímco velké molekuly buď málo, nebo vůbec. Dlouhé molekuly HA v malém extracelulárním prostoru mají přirozenou tendenci tlačit se z něj ven. Tím způsobí otok v extracelulárním prostoru. Tyto otoky dávají pojivovým tkáním jejich schopnost odolávat namáhání v tlaku. Vztaheno na lidský organismus, k těmto situacím dochází v očním sklivci a obdobně i v kloubech [2, 6].

Mnoho funkčních vlastností hyaluronanu závisí na vazebných proteinech na povrchu buněk. Proteiny vážící se selektivně k hyaluronanu se nazývají modulem rodu, který je v literatuře označován jako hyaladherins. Proteoglykany byly objeveny v chrupavce, kde se extrahovaly pomocí denaturačního rozpouštědla. Po obnově původních podmínek vznikly opět agregáty. Bylo prokázáno, že pro stabilizaci agregátů proteoglykanu jsou důležité proteiny [6].

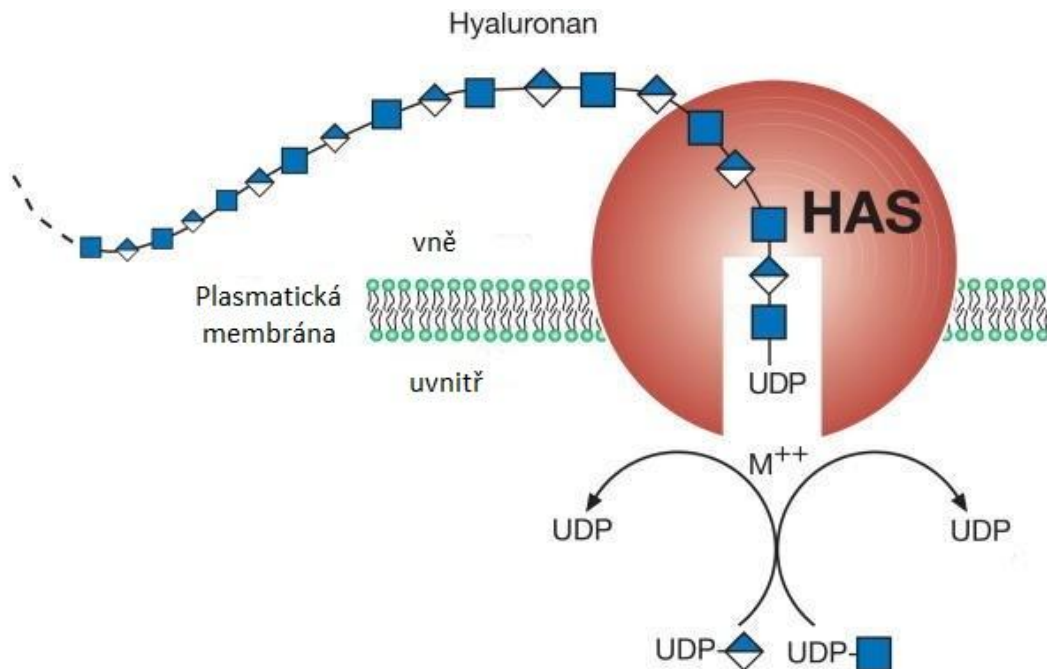
Rozlišujeme čtyři proteoglykany s homologní doménou G1: versican, neurocan, brevican a aggrecan. Versican se nachází v mnoha měkkých tkáních, neurocan a brevican v mozkové tkáni. Všechny tyto proteoglykany mají podobný mechanismus ukotvení k hyaluronanu [6].

1.5 Biosyntéza

Buněčná syntéza HA je poměrně unikátní a vysoce řízený proces [5]. Na jeho syntéze se nejvýznamněji podílejí fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty [4]. HA je přirozeně syntetizován integrálními membránovými proteiny, které se nazývají hyaluronan syntázy. U obratlovců rozeznáváme tři typy: HAS1, HAS2, a HAS3. Integrální membránový protein je protein (nebo shluk proteinů), který prostupuje jednou nebo vícekrát celou biologickou membránu nebo který je dostatečně zakotven v membráně [5].

Enzymy hyaluronan syntázy syntetizují velké, lineární polymery hyaluronanu s opakující se disacharidovou strukturou přidáním kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu na rostoucí řetězec použitím svých aktivovaných nukleotidových sacharidů jako substrátů [5] (jedná se o aktivované monosacharidy, které slouží jako donor glykosyltransferáz). Jako substráty se používají uridindifosfát kyseliny D-glukuronové (UDP-GlcA) a uridindifosfát N-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc). Syntéza HA probíhá většinou na vnitřním povrchu plasmatické membrány u eukaryotických buněk, u bakterií pak na cytoplasmatické mem-

bráně [6]. Na jednu interglykosidickou vazbu je použit vždy jeden enzym. Biosyntéza glukosaminoglykanů (GAG) probíhá s poměrně velkou přesností [9].



Obr. 3: Biosyntéza HA [6]

Hyaluronan syntázy produkují HA o různé velikosti, a to od 10^5 až 10^7 g/mol. Konečná velikost je závislá na tom, jakou rychlostí je HA enzymem uvolňován a po jeho uvolnění se už tato velikost nemůže změnit. Každý enzym je schopen syntetizovat vždy jen jeden řetězec HA. Jeho hmotnost může dosáhnout až 8 miliónů g/mol, čemuž odpovídá zhruba 40 000 monosacharidů v řetězci. Jak už bylo řečeno, HA syntázy jsou tři a všechny katalyzují stejnou reakci. Rozdíl mezi nimi je ten, že každý z nich může syntetizovat HA o různé distribuční velikosti řetězce. HAS3 syntetizuje mnohem kratší řetězce než HAS1 a HAS2. Na velikosti HA mohou záviset některé biologické reakce [10].

1.5.1 Syntéza HA u bakterií

Některé bakterie mohou vytvořit stejný polymer HA jako savci a tím se pro ně stávají patogenní. Bakterie se obklopí tlustou vrstvou HA a imunitní systém hostitele je nerozpozná, protože jejich HA má stejnou strukturu jako HA v hostitelské tkáni. Nemůžou být tudíž napadeny fagocyty. Mezi bakterie produkující HA patří: *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus pyogenes* a *Pasteurella multocida* [10].

1.6 Degradace

Jako u většiny biomolekul, i u HA probíhá syntéza a odbourávání současně. Pochopení procesů degradace u GAG napomohly objevy deficitu specifických enzymů a dědičných poruch metabolismu. Mukopolysacharidosy a mukolipidosy patří mezi dvě onemocnění, které k tomuto pochopení nejvíce pomohly. U mukolipidosy se předpokládalo, že zasahují jen do metabolismu GAG nebo glykosfingolipidů. Zjistilo se ale, že mohou zasáhnout i do degradací oligosacharidových řetězců glykoproteinů [9].

Enzymatická degradace HA u savců probíhá působením několika typů enzymů: hyaluronidasou, která patří mezi endoglykosidas (štěpí hexosaminidovou vazbu), β -D-glukuronidasou, která patří mezi exoglykosidas a β -N-acetylhexosaminidasou, která je také řazena mezi exoglykosidas. Obecně lze říci, že hyaluronidasa štěpí HA s vysokou molekulární hmotností na menší oligosacharidy pomocí Hyal-1 a Hyal-2 [5, 9].

- Hyaluronidasa Hyal-1 štěpí intracelulární HA na tetrasacharidy, které mohou být dále štěpeny β -D-glukuronidasou a β -N-acetylhexosaminidasou. Konečnými produkty jsou GlcNAc a GlcA, které se recyklují, nebo degradují na pentózový cyklus. Hyal-1 se vyskytuje hlavně v lysozomech [4].
- Hyaluronidasa Hyal-2 štěpí extracelulární HA, který se poté transportuje lymfatickým systémem do krve a vylučuje se buď v játrech, nebo v ledvinách [4].

Existují 3 druhy hyaluronidas: savčí (která se dělí na Hyal-1 až Hyal-4 a PH-20), z pijavic a parazitů a nakonec bakteriální.

- Hyal-1: vykytuje se ve většině tkání, v plazmě a moči. Aby mohla být aktivní, potřebuje přítomnost transmembránového glykoproteinu CD44.
- Hyal-2: vyskytuje se také ve většině tkání (krom mozku) a ke své aktivitě potřebuje rovněž CD44. Je to extracelulární enzym důležitý při migraci buněk a remodelaci tkání.
- Hyal-3: vyskytuje se v mozku.
- Hyal-4: je specifický pro chondroitin sulfát.
- PH-20: Nachází se ve spermatu. Spermie je schopna proniknout do zralého oocyty díky tomuto enzymu, který se nachází na jeho povrchu a který je schopen narušit ochranný obal oocyty [4].

β -D-glukuronidasa degraduje oligosacharidové fragmenty odstraněním nezredukovaného konce sacharidů. Jestliže tento enzym u lidí chybí, tak jsou substráty dermatasulfát, chondroitinsulfát a heparasulfát vylučovány močí, na rozdíl od HA. To znamená, že existují i jiné metabolické dráhy odbourávání oligosacharidů uvolňovaných z HA.

β -N-acetylhexosaminidasa také degraduje oligosacharidové fragmenty odstraněním nezredukovaného konce sacharidů [5, 9].

Produkty degradace hyaluronanu, oligosacharidy a hyaluronany s velmi nízkou molekulovou hmotností vykazují vlastnosti podporující angiogenezi. Katalytickou hydrolyzou hyaluronanu (hlavní složka intersticiální bariéry) hyaluronidázou se sníží viskozita kyseliny hyaluronové, čímž se zvýší tkáňová permeabilita. Toho se využívá v lékařství za účelem rychlejšího rozptýlení a šíření léčiv. Nejčastější použití je v oční chirurgii, ve kterém se používá v kombinaci s lokálními anestetiky. Některé bakterie, jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *pneumoniae* a *Clostridium perfringens*, produkují hyaluronidázu, která zvýší pohyblivost skrz tělesné tkáně, a skrytý antigen, který brání jejich poznání fagocyty imunitního systému [5].

Koloběh HA se liší podle místa jeho uložení. Ve většině tkání, např. v epidermálních, je rychlá, zatímco v jiných může trvat poměrně dlouho (např. chrupavka). Degradace může probíhat lokálně, v lymfatických uzlinách, kam se dopravuje lymfou, či v játrech dopravou pomocí krve. Endoteliální buňky lymfatických uzlin a jaterní sinusoidy mají specifické receptory, kterými HA odstraňují. Mezi tyto receptory patří LYVE-1, který je homologem CD44, a HARE, který je receptorem pro endocytózu a nejspíš také hlavním receptorem pro odstranění HA dodávaným systémem lymfy a krve [6].

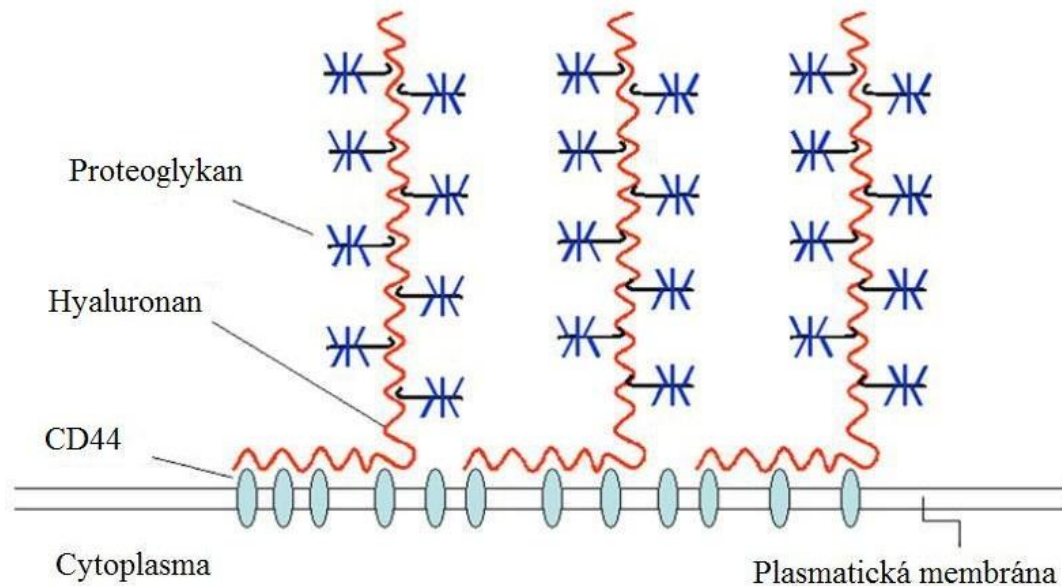
1.7 Receptory

HA je vázán řadou adhezivních receptorů na povrch mnoha migrujících buněk. Bylo identifikováno 6 receptorů: CD44, RHAMM, LYVE-1, HARE, Layilin, Toll-like receptor 4 (TLR4). Mezi nejvíce prostudované receptory patří CD44 a RHAMM, protože je usuzováno, že jsou zapojeny do procesu migrace nádorových buněk [2, 4].

- **CD44**

Patří mezi nejvíce charakterizovaný transmembránový glykoprotein, který má nejméně 17 dalších různých izoform. Je strukturálně variabilní, multifunkční a vzhledem k jeho široké distribuci je považován za hlavní receptor HA. Nachází se např. na povrchu parenchymových a epiteliálních buněk, leukocytech a endotelu. Mnohé funkce CD44 jsou zprostředkovány interakcí s jeho ligandem HA. Neslouží však jen jako receptor pro HA, ale i jako mediátor vyzrávání, adheze a přestupu aktivovaných T-lymfocytů z krevního řečiště do místa zánětu a koordinuje signály pro buněčné přežívání a denaturaci. V místě poranění,

infekce nebo zánětu se uvolňují cytokiny vyvolávající zánět, které indukují expresi HA na povrchu endoteliálních buněk přilehlých cév, ke kterým je HA přichycen pomocí CD44 [4, 5]. CD44 obsahuje ektodoménu, která je schopna vázat hyaluronan, dále obsahuje cytoplasmatické domény a transmembránový segment [6].



Obr. 4: Přichycení HA s přidruženými proteoglykany k povrchu buňky pomocí receptoru CD44 [11]

- **RHAMM**

RHAMM nepatří mezi transmembránové proteiny. Na buněčnou membránu je napojen zvenčí a tím může lehce interagovat s glykosaminoglykany. Byl nalezen jak na povrchu buněk, tak v cytosolu a jádru. Hraje roli v buněčné migraci, zejména u fibroblastů a hladkých buněk, urychluje buněčný cyklus v G2 a M fázi a podporuje novotvorbu cév [4, 5].

1.8 Medicínské aplikace

Odhadnuté množství HA v lidském těle vážící 70 kg je 15 g, přičemž dochází k jeho neustálé obnově a zániku [4]. Ve vysokých koncentracích se nachází v měkkých pojivových tkáních, včetně kůže, pupeční šňůry, synoviální tekutině a ve sklivci. Dalším nalezištěm jsou plíce, ledviny, mozek a svalová tkáň [5]. (Nejvýznamnější lokalizace HA je znázorněna v tabulce 1) [4].

Tab. 1: HA v lidském těle [4]

Lokalizace	Množství HA	Biologický poločas	Molekulová hmotnost
Mezibuněčná hmota	> 2,5 g/l	hodiny až týdny	vysoká
Pupečník	2-4 g/l	-	-
Synoviální tekutina	2-4 g/l	hodiny	vysoká
Lymfa	< 10 mg/l	minuty	různá
Sérum	0,01-0,10 mg/l	minuty	nízká

Jeho viskoelastické vlastnosti se využívají pro léčbu osteoartrózy. Do synoviálního prostoru kloubu, který je touto nemocí postižen, se aplikuje HA o vysoké molekulové hmotnosti. Potlačuje degeneraci chrupavčité tkáně, chrání její povrch lubrikačními vlastnostmi a snižuje vnímání bolesti. Další využití HA je v oftalmologii. Při operaci šedého zákalu hrozí vysoká pravděpodobnost poranění endoteliální vrstvy rohovky. Proto se do operačního prostoru aplikuje HA o vysoké molekulové hmotnosti a tím chrání endoteliální vrstvy před mechanickým poškozením [6].

HA je také důležitý v otolaryngologii. Ovlivňuje funkce důležité pro správnou činnost hlasivek, jako je viskozita tkání, tkáňový tok, osmóza, tlumení nárazů a vyplňování prostoru. Jeho osmotické, viskoelastické a vyplňovací vlastnosti mají vliv na tloušťku a viskozitu hlasivek. HA deriváty se využívají k léčbě poraněných, zjizvených či paralyzovaných hlasivek. Ovšem použití HA jako bioimplantátu slizničního vaziva je nevhodné kvůli jeho krátké době působení v hlasivkách. Zjistilo se, že u králičích hlasivek je doba působení HA přibližně 3 až 5 dní. Tento problém se vyřešil použitím modifikovaného HA, konkrétně hylanu, kdy se jeho doba setrvání a působení v hlasivkách prodloužila nejméně o rok [12].

V kůži HA odstraňuje volné radikály, které vznikají působením ultrafialového záření ze slunce. Ultrafialové světlo může poškodit genetický materiál v buňkách a způsobit tak jejich degeneraci a denaturaci [12].

HA je vhodný pro kontrolované dávkování léků a pro hybridní implantáty, protože je uvnitř těla zcela biologicky rozložitelný. Používá se také jako materiál nanesený na obvazech, které nejsou adhezivní [13]. Viskoelastické gely se používají u měkkých tkání k náhradě nebo rozšíření mezibuněčné hmoty. Povlaky, které jsou síťované nebo roubované, se pou-

žívají na kontaktní čočky ke zvýšení smáčivosti a na protetické materiály (např. umělé chlopně, nitrooční čočky, cévní náhrady, kardiostimulátory) ke zlepšení jejich biokompatibility [14].

1.9 Chemická modifikace

Přirozeně se vyskytující HA má poměrně vysokou rozpustnost, rychlou degradaci a krátký čas setrvání ve vodě. Tím se omezují biomedicínské aplikace HA, a to zejména v tkáňovém inženýrství [14]. Chemickou modifikací HA získáme polymery s lepšími fyzikálními a chemickými vlastnostmi, které pak můžeme použít na výrobu závitů, filmů, tkanin atd. Využití modifikovaných HA je např. v plastické chirurgii a ortopedii. Mezi nejznámější modifikované HA patří hylan a HYAFF [15].

- **Hylan**

Hylan se získá zesíťováním HA, ke kterému dochází na hydroxylových skupinách. Nastavením reakčních podmínek lze připravit hylan ve formě gelu, tekutiny nebo pevné látky a to pro konkrétní medicínské aplikace. Hylan má stejnou biokompatibilitu jako nativní HA, avšak lepší reologické vlastnosti a delší dobu setrvání ve tkáni [14].

- **HYAFF**

HYAFF se získá esterifikací karboxylových skupin. Při vyšších procentech esterifikace je nerozpustný ve vodě. V suchém stavu má dobrou mechanickou pevnost. Stabilita a náchylnost k degradaci je závislá na stupni esterifikace. HYAFF se používá k výrobě membrán a vláken vytlačováním do organických rozpouštědel. Zpracovává se extrakcí a odpařováním, čehož se využívá k výrobě mikrokuliček apod. [16].

Estery HA rozlišujeme podle toho, jaký je při esterifikaci použit alkohol. Mezi nejznámější estery HA patří HYAFF 7, který je znám jako ethyl ester HA a HYAFF 11 známí jako benzyl ester HA. Na benzyl estery byla použita rentgenová difrakční studie a následným molekulárním modelováním se zjistilo, že mají stejnou flexibilitu a shodu jako nemodifikovaný HA [16].

Z vláken a membrán se dá vyrábět velké množství biomateriálů, které jsou biologicky odbouratelné. Implantát může vydržet týdny i měsíce, závisí to i na konformaci produktu a místě implantace. Při degradaci dochází k hydrolýze esterové vazby za uvolnění alkoholu. HYAFF 7 se odbourává snadněji než HYAFF 11 [16].

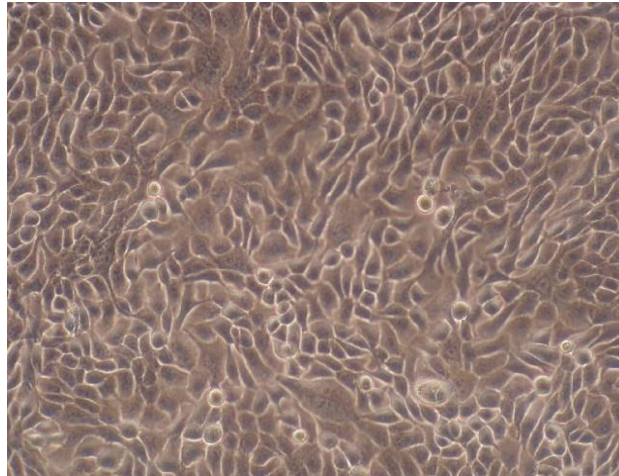
2 KŮŽE

Kůže se řadí mezi největší orgány lidského těla a její tloušťka se v různých částech těla liší. Kůže plní poměrně důležité funkce. Chrání organismus před řadou škodlivých vlivů ze-
vního prostředí (bakteriemi, chemikáliemi, teplem, chladem) a před ztrátou tekutin. Obsahuje smyslové receptory, které nám umožňují vnímat teplotu, tlak, bolest atd. Kožní kapiláry a potní žlázy se podílejí na řízení tělesné teploty. Kůže nás také chrání před škodlivým ultrafialovým zářením a zároveň ho dokáže využít k tvorbě vitamínu D [17, 18].

Kůže je tvořena epitelovou složkou nazývanou epidermis a vazivovou pojivovou tkání, zvanou dermis. Tuková tkáň nacházející se těsně pod kůží je nazývána hypodermis (též subcutis, podkoží). Jako kožní adnexa se označují vlasy, nehty a kožní žlázy, které se vyvíjejí jako deriváty epidermis [17, 18].

2.1 Keratinocyty

Keratinocyty se řadí mezi hlavní a nejpočetnější buňky epidermis. Produkují vláknitý protein keratin, který plní ochrannou funkci epidermis. Keratinocyty se spojují pomocí mezi-
buněčných můstků, tzv. desmozomů. Epidermis tvoří u tlustého typu kůže pět vrstev, u tenkého typu kůže čtyři vrstvy. Keratinocyty vznikají v bazální vrstvě. Z bazální vrstvy se tak postupně dostávají až do poslední vrstvy, vrstvy rohovinové. Mezi těmito vrstvami jsou uloženy vrstvy zrnité, trnité a ostnité. V závěrečné fázi diferenciaci přestanou být keratinocyty metabolicky aktivní a nastane u nich programovaná buněčná smrt. Poté jsou již odumřelé a obsahují jen keratin. Zrohovělé buňky se postupně odlupují a nahrazují buňkami uloženými pod nimi. Celý tento proces, vznik keratinocytů až po jejich odloupnutí, trvá průměrně 40 dní [17, 18].



Obr. 5: Lidské keratinocyty [19]

Jednotlivé vrstvy epidermis:

- **Stratum basale**

Obsahuje pouze jednu vrstvu kuželovitých nebo kvádrových buněk, které spočívají na bazální membráně. Hemidesmozomy pomáhají tyto buňky vázat k bazální membráně, která obsahuje kmenové buňky. V stratum basale jsou keratinocyty mitoticky aktivní a díky tomu postupují do další vrstvy. Všechny buňky v této vrstvě obsahují keratinová vlákna [20].

- **Stratum spinosum**

V této vrstvě se nachází buňky ve tvaru kvádrů, které mohou být i mírně zploštělé. Obsahují centrální jádro, cytoplazmu a svazky keratinových vláken. Tyto svazky se spojují a rozšiřují mezi buňkami. Na koncích jsou zpevněny desmozomy, které způsobují, že tato vrstva vypadá, jako by byla hustě pokrytá výstupky. Keratinové svazky jsou viditelné pod mikroskopem a nazývají se tonofilamenta. Tonofilamenta jsou poměrně důležitá v udržování soudržnosti mezi buňkami a odolávání jejich opotřebení [20].

- **Stratum granulosum**

Tato vrstva se skládá ze tří až pěti vrstev vyrovnaných oploštělých buněk. V cytoplazmě obsahují granula dvojího typu: bazofilní keratohyalinová a lamelózní. Keratohyalinová granula obsahují proteiny a četné fosfátové skupiny, které jsou zodpovědné za bazofilní charakter granul. Pomáhají ve vyšších vrstvách vytvářet keratin, navíc tato granula neobsahují membránu. Lamelózní granula viditelná elektronovým mikroskopem mají vejcovi-

tu strukturu a obsahují lamelózní disky tvořené lipidovou dvojvrstvou. Granula se slučují s buněčnou membránou, čímž se jejich obsah uvolňuje do mezibuněčných prostor stratum granulosum a působí tak jako „tmelová“ substance. Ta má funkci bariéry, která brání pronikání cizích látek z vnějšího prostředí do této vrstvy [20].

- **Stratum lucidum**

Tato vrstva se vyskytuje jen u tlustého typu kůže. Tvoří tenkou průsvítkou slupku značně zploštělých již odumřelých keratinocytů. Elektronová mikroskopie odhalila, že jsou tyto buňky stejné jako buňky ve vrstvě stratum corneum [18].

- **Stratum corneum**

Jedná se o mnohvrstevnou část epidermis, kterou tvoří odumřelé buňky keratinocytů ve formě plochých váčků obsahujících keratin. Jádro i buněčné orgány se rozpadly. Tonofilamenta jsou uložena v „tmelu“ z keratohyalinových granul. Keratin chrání tuto vrstvu před proražením. Glykolipidy nacházející se mezi buňkami zabraňují vniknutí vody do této vrstvy [18].

2.1.1 Keratinocyty v imunitních reakcích

Pokud se keratinocyty dostanou do kontaktu s membránou bakteriálních buněk, začnou tvořit protizánětlivé cytokiny, např. interleukin IL-8. Tento cytokin má schopnost přitahovat do infikovaného místa fagocyty, a to hlavně neutrofilní leukocyty. Neutrofilové pronikají do epidermis poměrně snadno a mohou se tak účastnit v řadě zánětlivých procesů, při kterých napadají cizorodé částice, nikoliv okolní keratinocyty. Tím pomáhají zajistit integritu epidermis [21].

2.1.2 Kmenové buňky a tranzitní zesilovače buněk

Keratinocyty lze z bazální vrstvy neporušené epidermis oddělit a nechat kultivovat. V populaci kultivovaných bazálních keratinocytů mohou však být velké rozdíly v proliferaci. Při testování jejich schopnosti založit nové kolonie se zjistilo, že některé nejsou vůbec schopné tvořit kolonie, jiné málo a některé naopak tvoří kolonie velké. Tento proliferační potenciál přímo souvisí s expresí $\beta 1$ podjednotky integrinu [22] (jedná se o skupinu molekul, které pomáhají adhezi buněk na povrch jiných buněk nebo na extracelulární hmotu) [23]. Shluky buněk s vysokým obsahem integrinu jsou považovány za kmenové buňky [22].

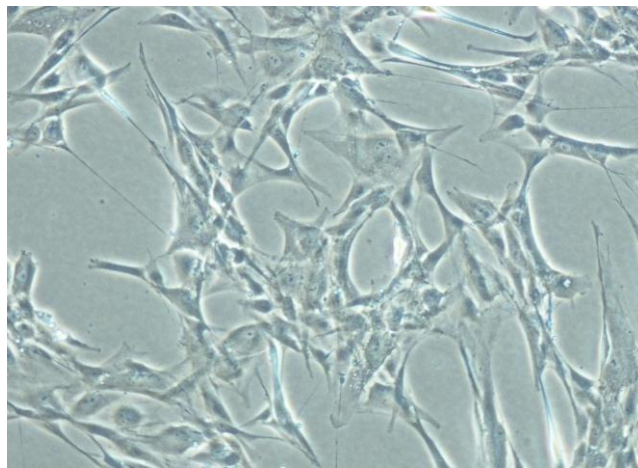
Bazální buňky, které exprimují nízký obsah integrinu, se dělí jen omezený počet cyklů, po kterém opustí bazální vrstvu a začnou se diferencovat. Buňky, které začnou proces diferenciace, se nazývají tranzitní zesilovací buňky. Tranzitní se nazývají proto, že z kmenových buněk diferencují na jiný charakter buněk. A „zesilovací“ se jim říká proto, že prochází dělicím cyklem a dochází tak k nárůstu diferencovaných buněk pocházejících z jedné kmenové buňky. Některé buňky, které se přestaly dělit a začaly diferencovat, mohou být stále spojeny s bazální vrstvou. To znamená, že kontakt s bazální vrstvou není jediným faktorem pro ovládní vývoje epidermálních bazálních buněk. Avšak pokud nejsou kultury bazálních keratinocytů osídleny a připevněny na dně kultivační nádoby, ale jsou přechovávány v suspenzi, přestávají se všechny množit a diferencovat [22].

2.1.3 Vliv uměle připravené kůže v procesu hojení

Hluboké a rozsáhlé poranění kůže způsobené např. popáleninami by se měly ošetřovat obvazy nebo kožní vrstvou uměle připravenou v laboratořích ve formě hydrogelu, filmu a pórovitých materiálů. Yannas et al. ve snaze napodobit skutečnou strukturu kůže vytvořil umělou kůži tvořenou dvojvrstvou hustého silikonového filmu a pórovitého kolagenu obsahující chondroitin sulfát. Silikonová vrstva chrání kůži před bakteriální infekcí a kontroluje odvod tělních tekutin. Vrstva kolagenu s chondroitin sulfátem byla biodegradabilní a umožnila kožním fibroblastům vrůstat do rány. Díky dvojvrstvé uměle připravené kůži měli epidermální buňky energii se přesunout a růst pod silikonovým filmem a pokrýt tak právě vytvořené kožní fibroblasty [24].

3 FIBROBLASTY

Fibroblasty jsou významné buňky, které se nejčastěji vyskytují ve vazivové tkáni. Mají protáhlé vřetenovité až hvězdicovité buňky, jejichž tvar se mění podle aktuálního funkčního stavu. Produkují mezibuněčnou hmotu, tropokolagen a proteoglykany (jedná se o bílkovinné podjednotky vláken) a také elastin. Díky své poměrně vysoké regenerační schopnosti jsou zdrojem materiálu, který vyplňuje tkáňové defekty neboli jizvy. Proto přítomnost fibroblastů a jejich funkční aktivita ovlivňuje obnovu vazivových struktur. Aktivita fibroblastů se může zvýšit steroidními hormony [25].



Obr. 6: Fibroblasty [26]

Fibroblasty vznikly z buněk mezenchymu, s nimiž mají velice podobný tvar. Nemají ostře ohraničenou endoplazmu [27]. Obsahují jádro, drsná endoplazmatická retikula, Golgiho aparát [18] a drobná granula, která se barví metylenovou modří. Mají schopnost fagocytovat cizorodé částice. V tkáňových kulturách se snadno množí a rostou, zejména vlivem různých druhů dráždiv. Aby dobře rostly, potřebují také přívod živin krví. Nejprve se pěstovaly fibroblasty získané z embryonálních tkání, poté i z dalších druhů poživ (synoviálních membrán a synoviálních tkání). V médiu těchto tkání byla chemickými nebo biologickými metodami prokázána přítomnost hyaluronanu, proto jsou fibroblasty považovány za místo vzniku mukopolysacharidů [27].

Fibroblasty jsou v různých částech těla odlišné, rozdíl mezi nimi je dokonce i v kůži [22]. V kůži dospělého člověka se nachází tři odlišné populace fibroblastů: papilární, retikulární a folikulární. Liší se v produkci mezibuněčné hmoty, v organizaci a v účasti zánětlivých

reakcí [28]. Za stejných kultivačních podmínek nevykazují stejnou přizpůsobivost. Přesto můžou za určitých podmínek změnit svůj charakter. Například v procesu hojení rány mohou změnou své genové exprese získat některé vlastnosti kontraktálních svalových buněk a tím pomáhat zacelení rány. Takové buňky se nazývají myofibroblasty [22].

3.1 Organizace kolagenních vláken pomocí fibroblastů

Fibroblasty produkující tropokolageny pomáhají v mezibuněčné hmotě s jejich organizací do kompaktních celků. Pokud jsou fibroblasty v kultivační nádobě ve směsi se sítí náhodně orientovaných kolagenních vláken, které tvoří gel, tak podle svého okolního prostředí přitahují kolagen, čímž se objem gelu zmenšuje na menší části. Podobná činnost fibroblastů je, že sami sebe obklopí do těsného shluku a po obvodu zůstanou orientovaná kolagenní vlákna [22].

Umístíme-li dvě malé embryonální tkáně obsahující fibroblasty do kolagenního gelu tak, aby byla každá tkáň na jiném konci, tak se z kolagenu stane uspořádané pevné vlákno, které tyto dvě tkáně spojí. Fibroblasty následně migrují z tkání podél uspořádaných kolagenních vláken. Takže fibroblasty neovlivňují jen zarovnání kolagenních vláken, ale i pohyb kolagenních vláken může ovlivnit rozdělení fibroblastů. Fibroblasty mají v lidském těle pravděpodobně podobné funkce [22].

4 CYTOTOXICITA

4.1 Testování buněk *in vitro*

Materiály, které chceme implantovat do lidského těla, nesmí být pro buňky a tkáně toxické, karcinogenní, nesmí vyvolávat nežádoucí imunitní reakci ani zhoubné bujení. Proto se na buňkách pěstovaných *in vitro* provádí mimo jiné i testování cytotoxicity. Látka, kterou chceme testovat, může u buňky ovlivnit viabilitu, proliferaci a metabolickou aktivitu [29].

Testováním viability buněk zjišťujeme, kolik se jich nachází životaschopných a kolik ne. Testy jsou založeny na působení barviv (např. trypanová modř), která jsou pro buněčné membrány viabilních buněk nepropustná, nebo na barvivech, která se dostanou skrz buněčnou membránu. Mezi tato barviva se řadí např. diacetyl fluorescein, který je u viabilních buněk hydrolyzován na fluorescein. Ten je pro buňky nepropustný a životaschopné buňky fluoreskují [29].

Měřením proliferace se zjišťuje počet nárůstu buněk. To se obvykle provádí měřením celkového buněčného proteinu, DNA nebo ATP. V dnešní době je ale upřednostňováno měření poměru ATP/ADP a to z toho důvodu, že u viabilních buněk je tento poměr konstantní a výsledky jsou spolehlivější než výsledky měření samotného ATP [29].

Testy na metabolickou aktivitu se uskutečňují na 96 jamkových destičkách. Zaměřují se na biologické funkce uvnitř neporušených buněk. Jedná se o přeměnu tetrazoliových solí na formazanové soli účinkem dehydrogenáz převážně v mitochondriích [29].

5 POLYETHYLEN

Polyethylen (PE) se řadí mezi nejznámější polyolefiny. Patří do skupiny termoplastů, což jsou polymery, které působením tepla mění tvar, ale chemicky se přitom nemění. Vyrábí se různými postupy, díky nimž získáváme PE s rozdílnými vlastnostmi a velkou škálou použití. Jako monomer se používá ethylen [30].

5.1 Základní typy

Mezi základní typy patří PE: nízkohustotní (LDPE), vysokohustotní (HDPE), lineární nízkohustotní (LLDPE) a s ultra vysokou molekulovou hmotností (UHMWPE). Získávají se rozdílnou výrobou a liší se mezi sebou molekulovou hmotností, rozvětvením řetězců, obsahem krystalické fáze a s ní spojenou hustotou. Jak už napovídá název, nejnižší hustotu má LDPE ($0,910 - 0,955 \text{ g/cm}^3$). Je také často nazýván podle způsobu výroby jako vysokotlaký, nebo též rozvětvený PE. LLDPE a HDPE jsou lineární polyetyleny. Hustota HDPE je $0,941 - 0,954 \text{ g/cm}^3$. UHMWPE patří mezi PE s největší hustotou i molekulovou hmotností [31].

5.2 Fyzikální a chemické vlastnosti

PE je tuhý, částečně krystalický, má mléčné zakalení a je v podstatě bez chuti a zápachu. Relativní molekulová hmotnost se u PE pohybuje v rozmezí 18 000 až 55 000. Vlastnosti PE jsou závislé na teplotě. Za pokojové teploty má dobré mechanické vlastnosti, rázovou houževnatost a poměrně vysokou ohebnost. Je odolný vůči vodě a poměrně stálý proti účinkům většiny chemikálií. Vodní páru propouští poměrně málo. V závislosti na druhu PE může být hořlavý i nehořlavý. Má výborné elektroizolační vlastnosti, což je způsobeno jeho nepolárním charakterem. PE je negativně ovlivňován napětím, tepelnou oxidací a slunečním zářením. Působením povětrnostním vlivům ztrácí PE své mechanické vlastnosti, poměrně rychle tvrdne a křehne [30]. Fotooxidační odbourávání probíhá hlavně v amorfní oblasti, takže čím větší je krystalinita PE, čím menší bude fotooxidační odbourávání. HDPE je oxidačně stabilnější než LDPE. Většinou se k PE přidávají saze, případně jiné pigmenty, které mají funkci stabilizátoru [31].

Nízkohustotní PE je díky amorfnímu podílu ohebný i při nízkých teplotách, zatímco krystalické podíly zabezpečují jeho pevnost. Kolem $60 \text{ }^\circ\text{C}$ se začíná krystalická část rozpadat a PE měkne. Nad teplotou 110 až $115 \text{ }^\circ\text{C}$ je PE v tekuté-viskózním stavě. Ochlazováním taveniny se opět začne tvořit krystalická část, přičemž při rychlém ochlazení vznikne větší

počet krystalických částí a při pomalém poměrně velké krystaly. Pod teplotou $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ se stává PE tvrdým a křehkým [30].

Vysokohustotní PE má větší bílý zákal způsobený poměrně vysokou krystalinitou. Ta zvyšuje modul pružnosti a tvrdost a zároveň snižuje propustnost pro plyny, páry a odolnost proti korozi za napětí. HDPE je oproti rozvětveným PE odolnější vůči organickým rozpouštědlům a na krátkou dobu použitelný do $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ [31].

PE za normální teploty odolává účinkům kyseliny sírové, chlorovodíkové, dusičné a fluorovodíkové. Do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ je nerozpustný ve všech rozpouštědlech, nad touto teplotou se začíná rozpouštět v aromatických nebo chlorovaných uhlovodících. Při teplotě nad $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ se LDPE rozpouští i v p-xylenu, ve kterém se HDPE rozpouští až při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ [31].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI RŮZNĚ MODIFIKOVANÉHO PE

Pro svou experimentální práci jsem jako zkoumaný materiál použila fólii PE (5×5 cm). K dispozici jsem měla 6 vzorků: neupravený PE (PE virgin), upravený PE v reaktoru (PE treated) a 4 upravené PE s následným navázáním daných monomerů a hyaluronanu. Použité monomery byly následující: allylalkohol (PE treated + AAL + HYA), allylamin (PE treated + AAM + HYA), N-methylallylamin (PE treated + MAAM + HYA) a N-N-dimethylallylamin (PE treated + MMAAM + HYA). U všech těchto vzorků jsem stanovila jejich proliferační schopnost a cytotoxicitu.

6.1 Kultivace keratinocytů

Kultivační médium pro buněčnou linii lidských keratinocytů (HaCaT, CLS) bylo: Dulbecco's Modified Eagle Medium – s vysokým obsahem glukózy (4.5 g/l) s přidanými antibiotiky (penicilin/streptomycin) a fetálním hovězím sérem od firmy PAA.

Na začátku testu musely být buňky odděleny ode dna kultivační nádoby následujícím postupem. Z kultivační nádoby bylo odsáto kultivační médium. Buňky byly opláchnuty PBS (Phosphate Buffered Saline 10 \times) od firmy GIBCO. Následně se buňky inkubovaly při 37 °C do jejich oddělení po dobu max. 20 minut s přidaným trypsinem-EDTA (1 \times) od firmy PAA (0,1 ml/cm²). Poté se k buňkám přidalo kultivační médium stejného množství jako trypsinu. Pomocí centrifugace při teplotě 37 °C po dobu 3 minut a 1,1 \cdot 10³ RPM se buňky oddělily od kultivačního média. Buňky byly naředěny na koncentraci 10⁵ /ml. Vzorky byly před kultivací dezinfikovány pomocí UV-záření (258 nm), jehož zdrojem byla nízkotlaká Hg lampa. Poté byly nastříhány o průměrech 3,5 cm a vloženy do Petriho misky stejného průměru. Buňky byly napipetovány o objemu 2 ml na vzorek a nechaly se kultivovat v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 h. Morfologie a schopnost proliferace buněk byly posouzeny pomocí mikroskopu (OlympusS, IX51) a pomocí fotoaparátu (Olympus, E450) vyfoceny.

6.2 Test cytotoxicity

Vzorky byly před vlastní zkouškou cytotoxicity dezinfikovány pomocí UV-záření (258 nm). Jako zdroj UV-záření byla použita nízkotlaká Hg lampa. Testy byly prováděny pomocí buněčné linie z myších embryonálních fibroblastů (NIH/3T3) z ATCC ® (číslo: CRL-1658TM). Jako kultivační médium bylo použito: Dulbecco's Modified Eagle Medium

– s vysokým obsahem glukózy, ke které bylo přidáno 10 % telecího séra a antibiotikum (penicilin/streptomycin, 100 mg/ml), PAA laboratoře GmbH, Rakousko.

Vzorky byly extrahovány v poměru 6 cm²/ml podle normy EN ISO 10993-12 (Biologické hodnocení zdravotnických prostředků) v uzavřených nádobách. Použitím aseptických technik se zajistila chemická inertnost nádob. Nádoby s extrakty se inkubovaly při 37 °C za stálého míchání po dobu 24 h. Prvotní extrakty, označovány jako 100 %, se v kultivačním médiu naředily na koncentrace 75, 50, 25, 10 a 1 %.

Testování cytotoxicity probíhalo podle normy EN ISO 10993-5. Buňky byly prekulturnovány 24 h. Kultivační médium bylo následně nahrazeno extrakty vzorků. Pro kontrolu bylo použito čisté médium s buňkami bez vzorku. Ke zjištění cytotoxických účinků byl proveden MTT test. Pro každý vzorek byla provedena čtyři opakování. Absorbance se měřila při vlnové délce 570 nm. Množství životaschopných buněk je vyjádřeno v procentech z průměrných hodnot ze čtyř měření podílem průměrné hodnoty čistých buněk bez vzorku (ty se vyznačují 100% životaschopností). Buňky byly sledovány v mikroskopu (Olympus, IX81) a vyfoceny pomocí kamery (Leica DFC480).

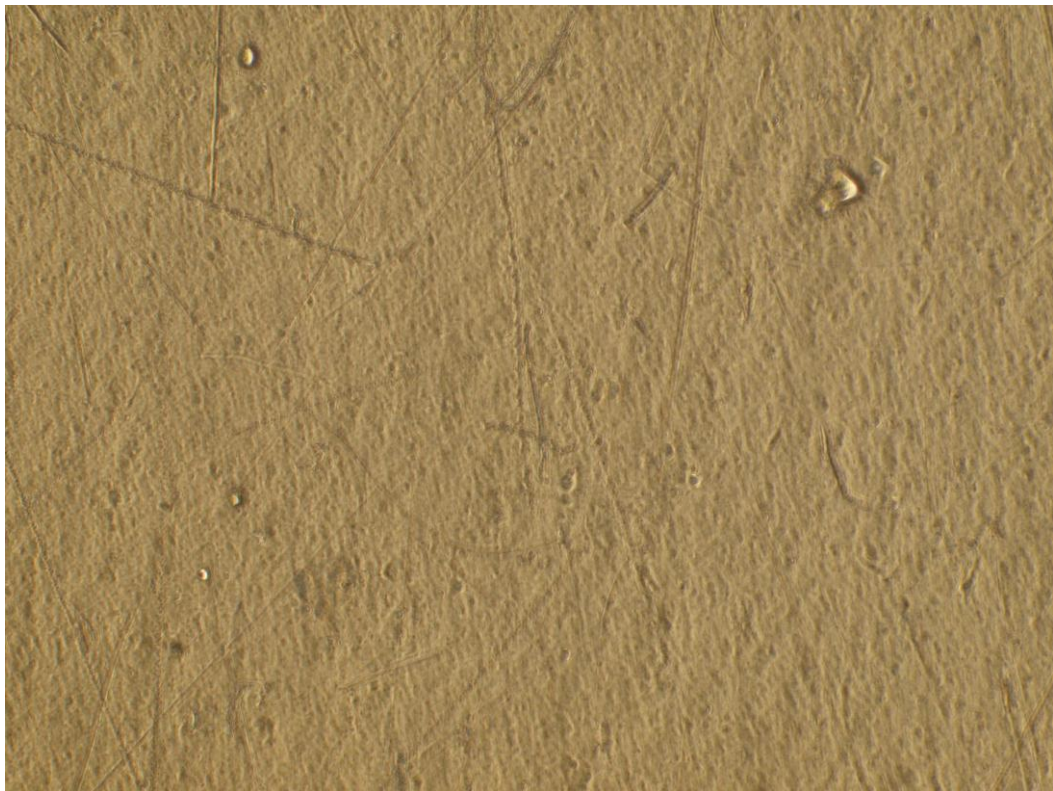
6.3 MTT test

Před vlastním MTT testem se musí vyměnit kultivační médium buněk. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) bylo přidáno ke vzorku v množství 0,5 µl/ml a nechalo se 4 h kultivovat v inkubátoru při teplotě 37 °C. Po této době byla většina média odsáta a nahrazena 1,6 ml DMSO. Po 20 minutách se vzorky vyhodnocovaly pomocí mikrotitračního spektrofotometru Sunrise (Tecan, Švýcarsko).

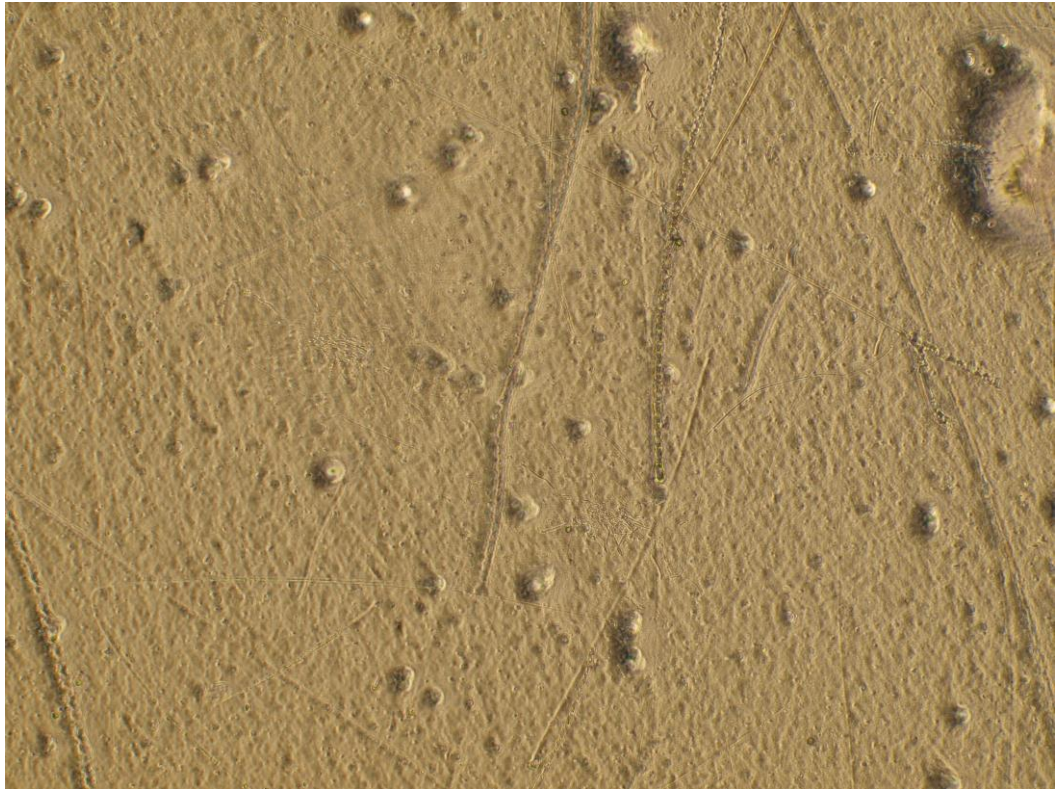
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Kultivace keratinocytů

Z kultivace buněk na vzorky byly pořízeny fotografie (zvětšení fotografií je 100×). Jako kontrola se použila čistá Petriho miska z PS. Žádný ze vzorků nevykazoval příliš velkou schopnost udržet si živé buňky v porovnání s referencí (obr. 13), kde jsou vidět jasné životaschopné buňky. Na obr. 7-10 nejsou vidět téměř žádné buňky a když už, tak se jedná o buňky bez životaschopnosti. Na obr. 11 (PE treated + MAAM + HYA) jsou už buňky v lepším stavu než v předchozích případech. Sice nevykazují extra velkou ochotu proliferovat, ale zvládly se uchytit a přežít. Na obr. 12 (PE treated + MMAAM + HYA) je vidět také více buněk, ale nejsou v tak dobrém stavu jako u vzorku PE treated + MAAM + HYA.



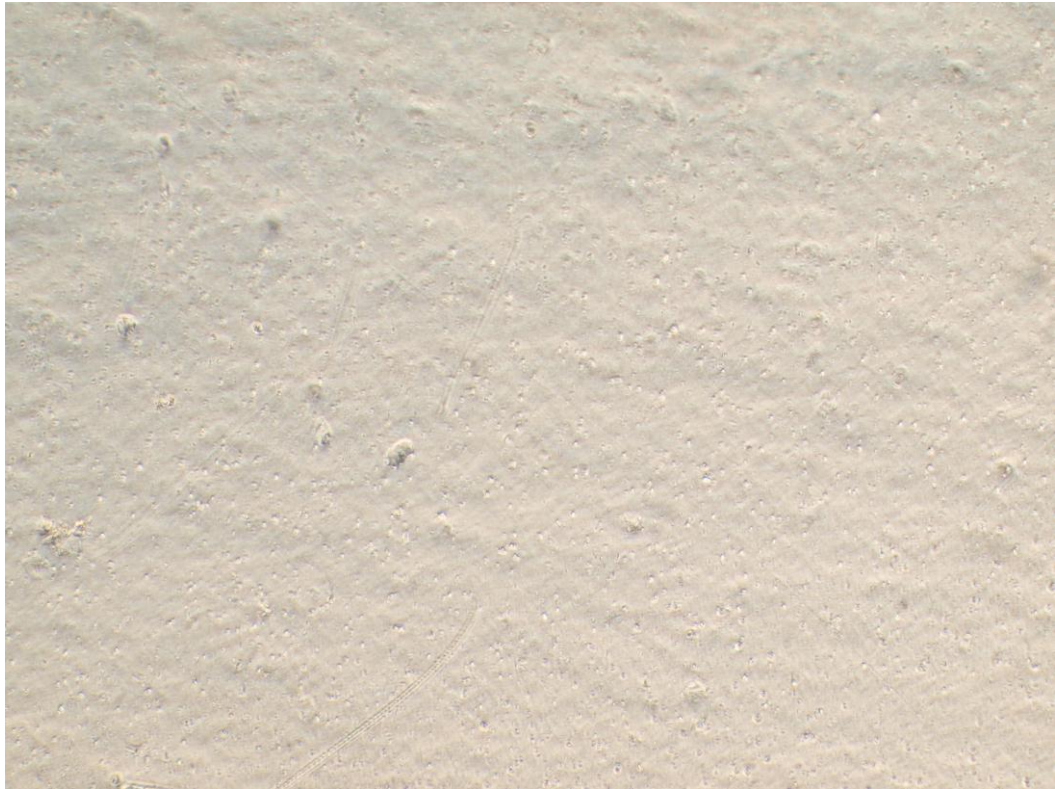
Obr. 7: HaCaT, PE neupravený (10×)



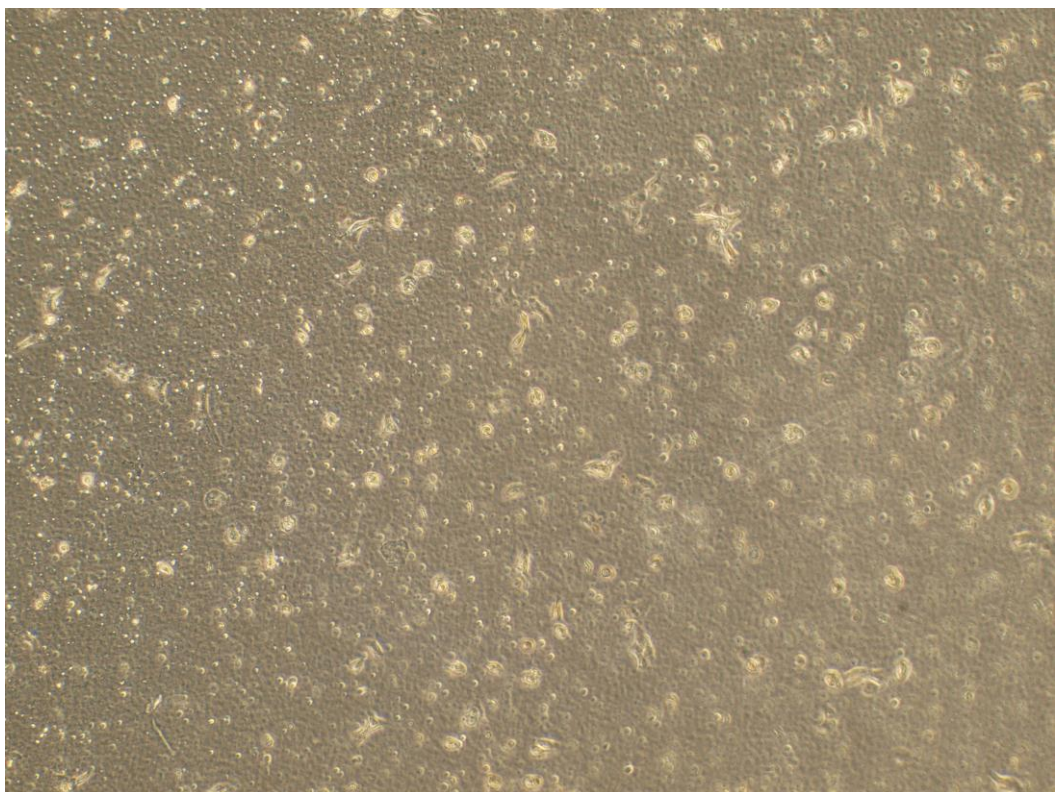
Obr. 8: HaCaT, PE upravený (10×)



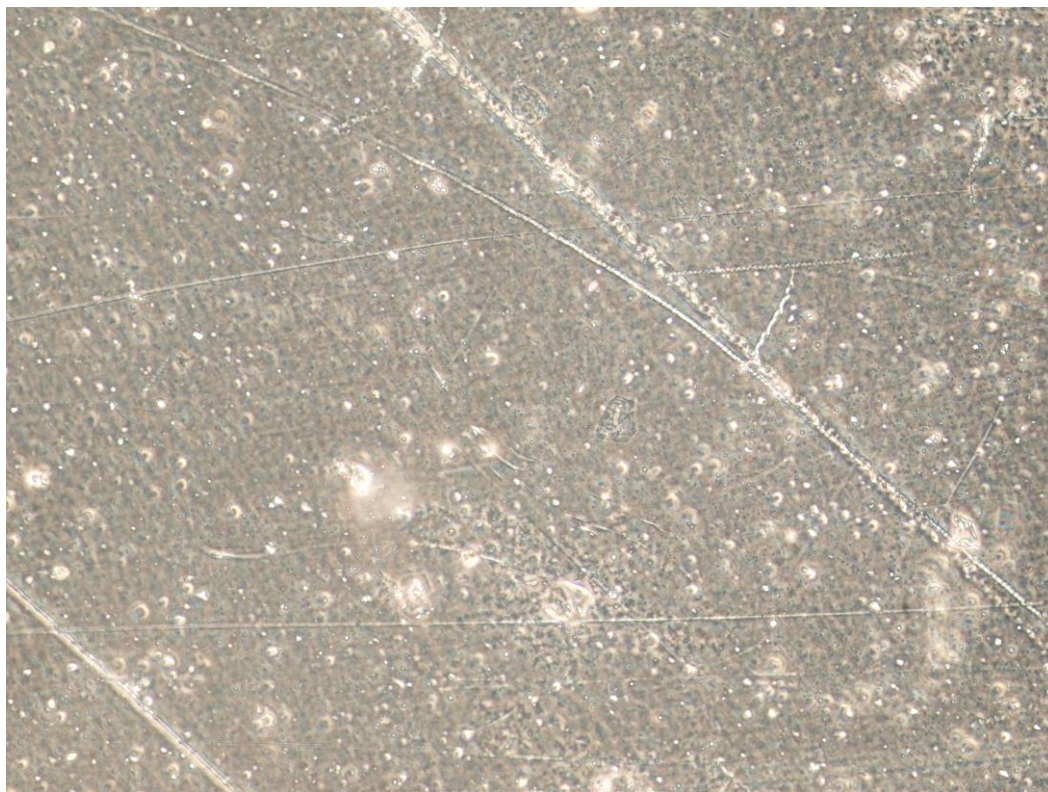
Obr. 9: HaCaT, PE upravený + AAL + HYA (10×)



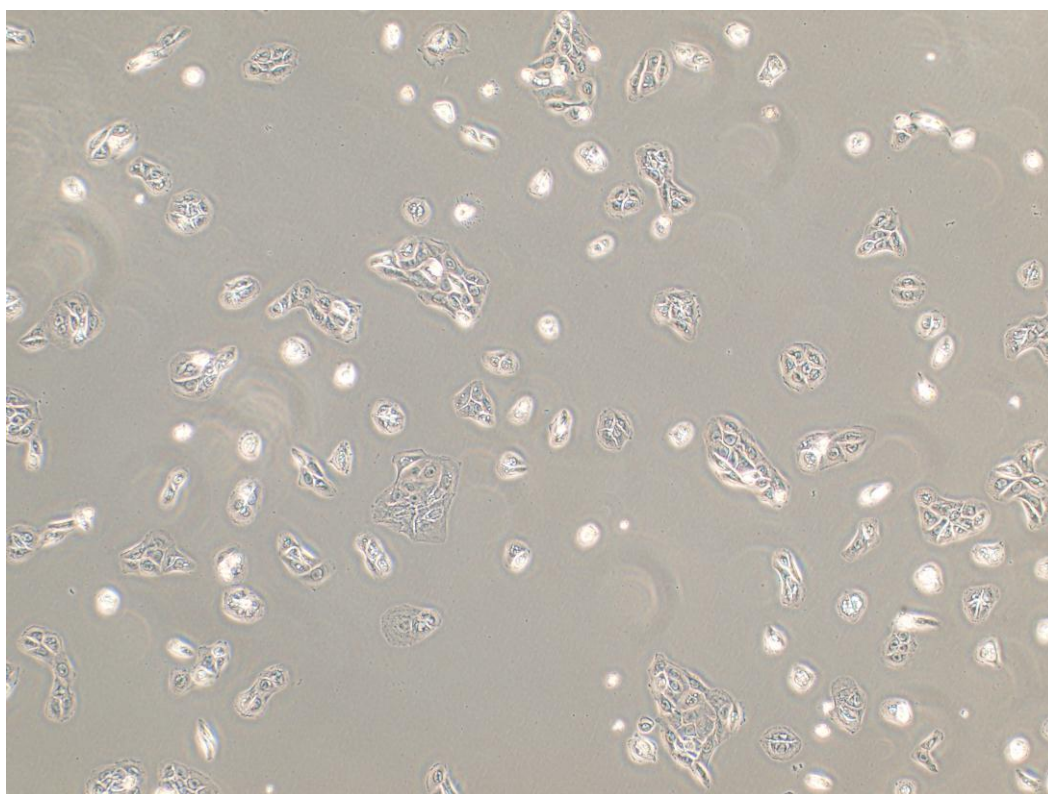
Obr. 10: HaCaT, PE upravený + AAM + HYA (10×)



Obr. 11: HaCaT, PE upravený + MAAM + HYA (10×)



Obr. 12: HaCaT, PE upravený + MMAAM + HYA (10×)



Obr. 13: HaCaT – kontrola (10×)

7.2 Test cytotoxicity

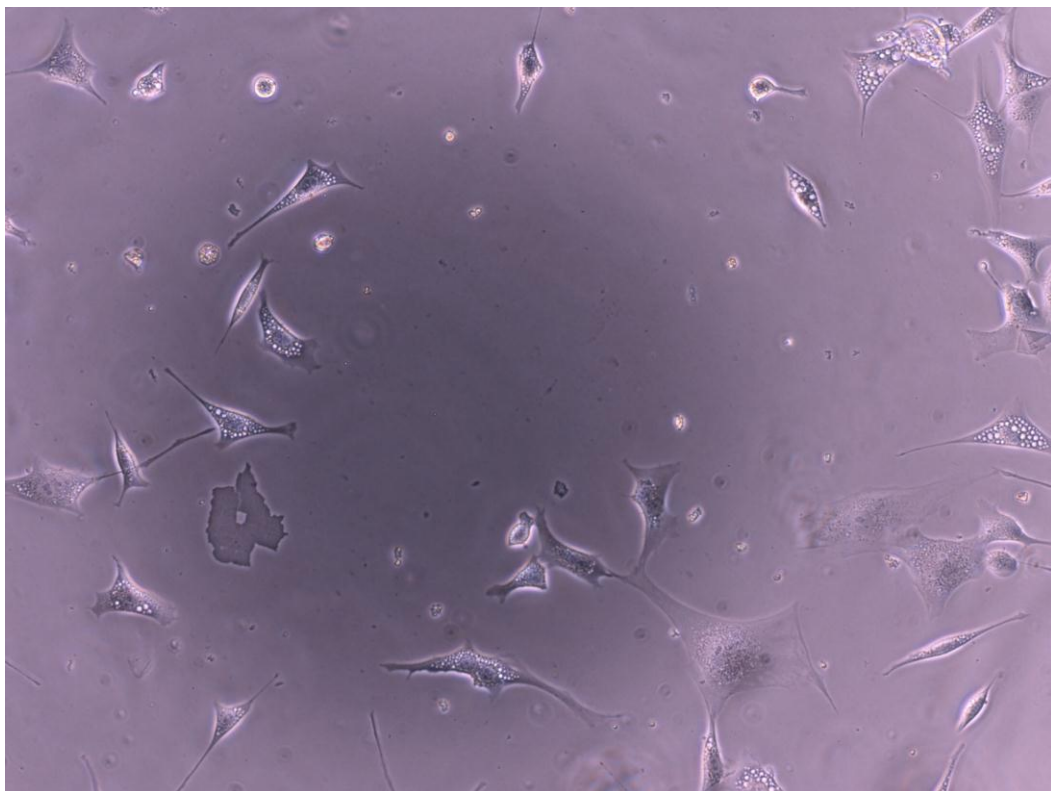
Cytotoxicita byla vyhodnocena podle normy EN ISO, kde se čistý vzorek bere jako 100% životaschopnost buněk. Životaschopnost nad 80 % znamená, že vzorek není pro buňky cytotoxický, mezi 80–60 % je slabě cytotoxický, mezi 60–40 % je středně cytotoxický a pod 40 % je silně cytotoxický. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky. Je vidět, že s nižší koncentrací extraktu cytotoxicita klesá. Nejlépe dopadl vzorek PE treated + AAM + HYA, který není pro dvě největší zředění pro buňky cytotoxický. Necytotoxický je také při největším zředění PE virgin a PE treated + AAL + HYA. Ostatní vykazují slabou nebo střední cytotoxicitu. Silnou cytotoxicitu nevykazuje žádný vzorek. Nejvíce cytotoxický je při nejmenším zředění PE treated, dále pak PE virgin a PE treated + AAM + HYA. Celkově lze shrnout, že vzorky PE virgin, PE treated + AAL + HYA a PE treated + AAM + HYA nevykazují při největším zředění cytotoxicitu. Naopak vzorky PE treated, PE treated + MAAM + HYA a PE treated + MMAAM + HYA vykazují při každém zředění alespoň slabou cytotoxicitu. U vzorku PE treated + AAL + HYA nebylo provedeno zředění na 100 a 75 %, protože tohoto vzorku už bylo málo.

Tab. 2: Výsledky měření cytotoxicity u různých vzorků PE

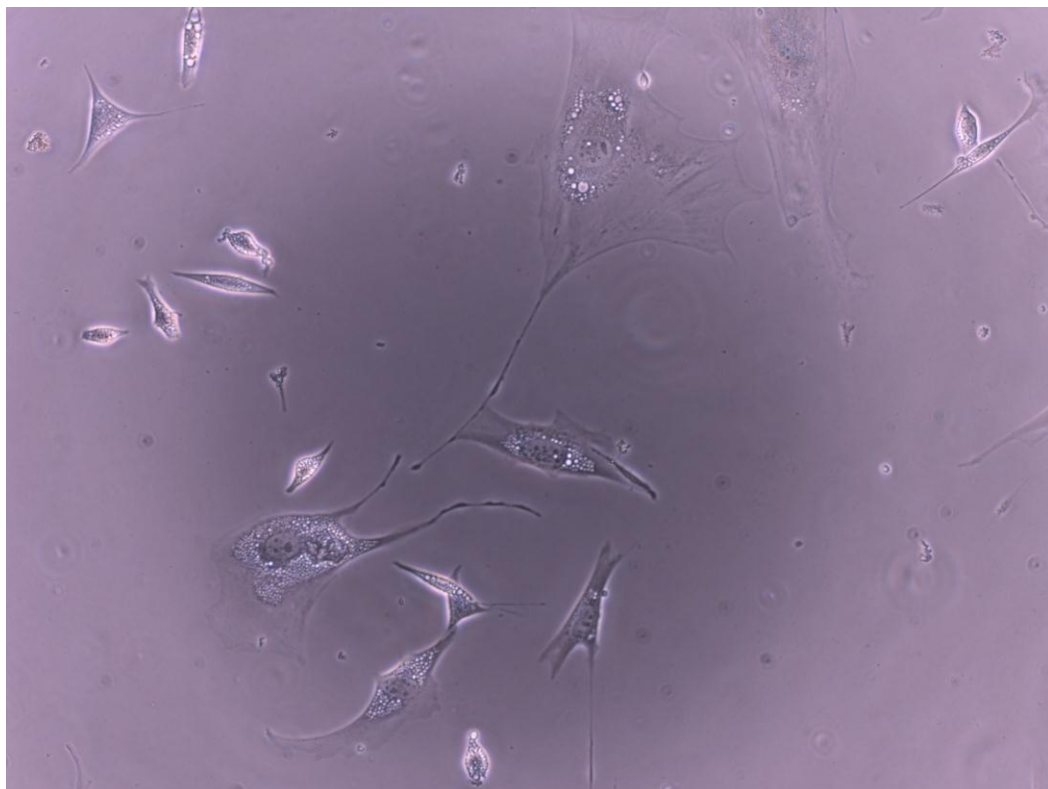
Extrakt [%]	Vzorek					
	PE virgin	PE treated	PE treated AAL HYA	PE treated AAM HYA	PE treated MAAM HYA	PE treated MMAAM HYA
100	52	48	----	53	59	56
75	61	62	----	59	57	62
50	65	61	63	61	59	64
25	65	62	76	63	67	62
10	78	64	76	89	68	70
1	80	75	80	84	73	75

Při měření cytotoxicity byly pořízeny fotografie buněk, jejichž zvětšení je 100×. Referenci (obr. 34) je překvapivě nejvíce podobný vzorek PE treated + AAL + HYA 50 % (obr. 20), u kterého vyšla cytotoxicita 63 %, ale na snímku můžeme vidět větší množství života-

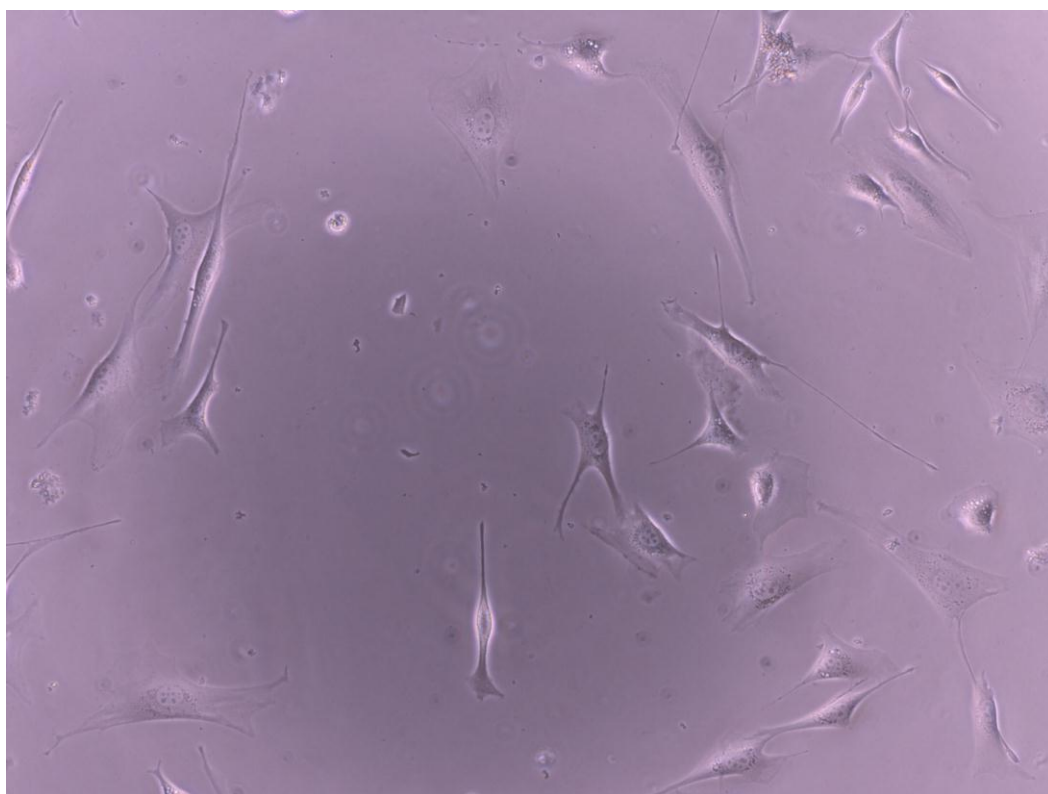
schopných buněk. Naopak u vzorku PE treated + AAM + HYA 1 % (obr. 25), u něhož vyšla cytotoxicita 84 %, tedy jedna z nejvyšších hodnot, lze spatřit menší množství mrtvých buněk. Přitom by se dalo předpokládat, že právě na tomto vzorku budou nalezeny jen životaschopné buňky. Při koncentraci extraktů 25 % (obr. 24), 75 % (obr. 23) a 100 % (obr. 22) tohoto vzorku můžeme vidět snižující se počet buněk, přičemž většina z nich není v životaschopném stavu. Obecně lze tedy říci, že počet životaschopných buněk roste se snižující se koncentrací extraktů. Vzorky s větším počtem životaschopných buněk jsou: PE virgin 25 % (obr. 16), PE treated + AAL + HYA 25 % (obr. 21), PE treated + MAAM + HYA 1 % (obr. 29). Asi nejvíce mrtvých buněk bylo zaznamenáno na vzorku PE treated 100 % (obr. 17), čemuž odpovídá jeho středně silná cytotoxicita – 48 %. Ani u koncentrací extraktů 75 % (obr. 18) a 50 % (obr. 19) nelze najít mnoho životaschopných buněk. U vzorku PE treated + MMAAM + HYA s koncentrací extraktů 100, 75 a 25 % (obr. 30, 31, 32), jejichž cytotoxicita je středně až slabě silná (56, 62 a 62 %), byl zaznamenán nízký počet buněk a z toho jen velmi málo životaschopných.



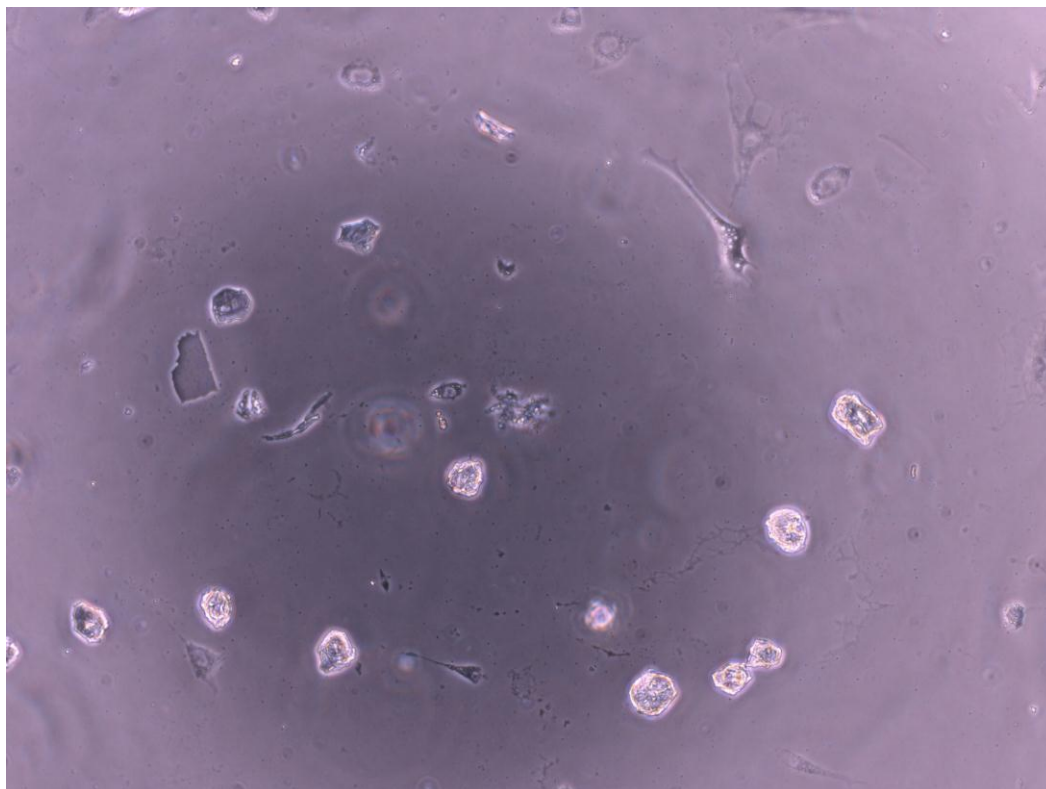
Obr. 14: NIH/3T3, PE neupravený 100 % (10×)



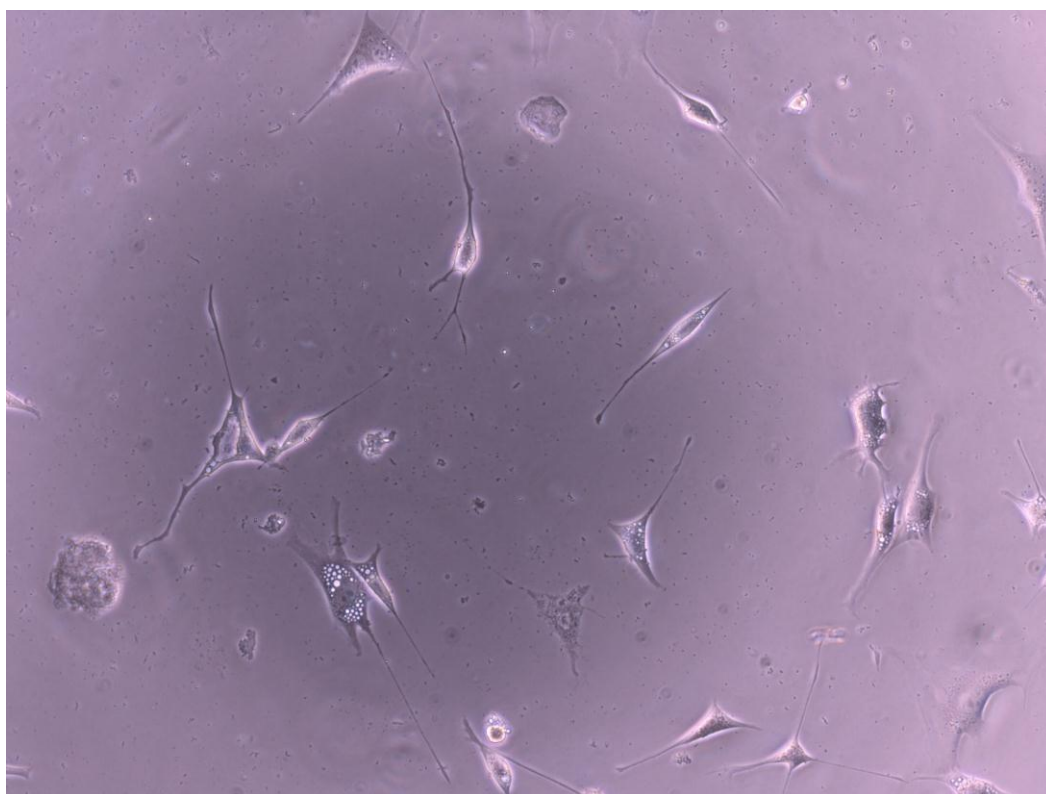
Obr. 15: NIH/3T3, PE neupravený 75 % (10×)



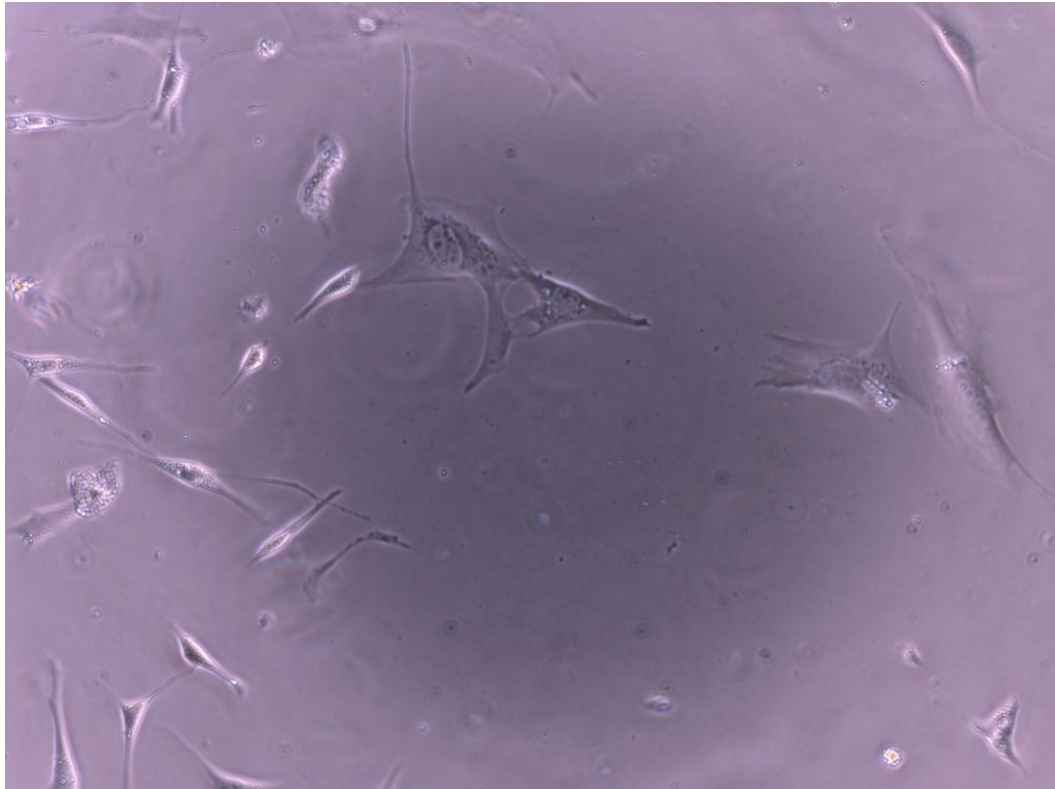
Obr. 16: NIH/3T3, PE neupravený 25 % (10×)



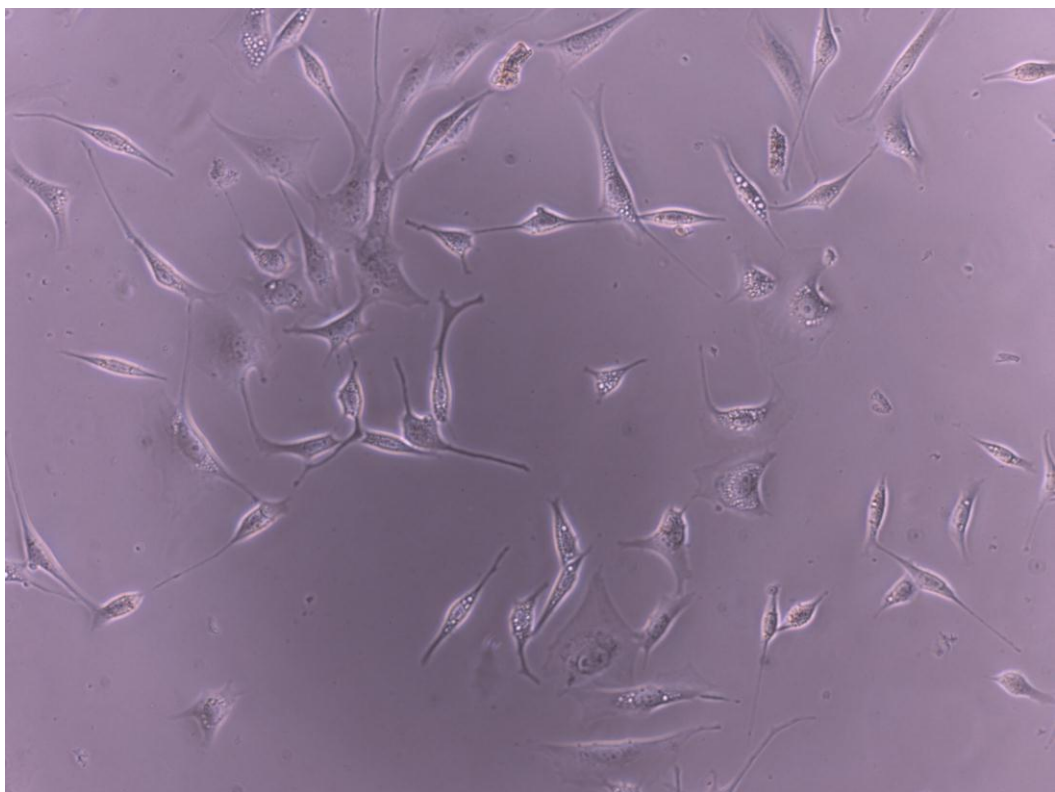
Obr. 17: NIH/3T3, PE upravený 100 % (10×)



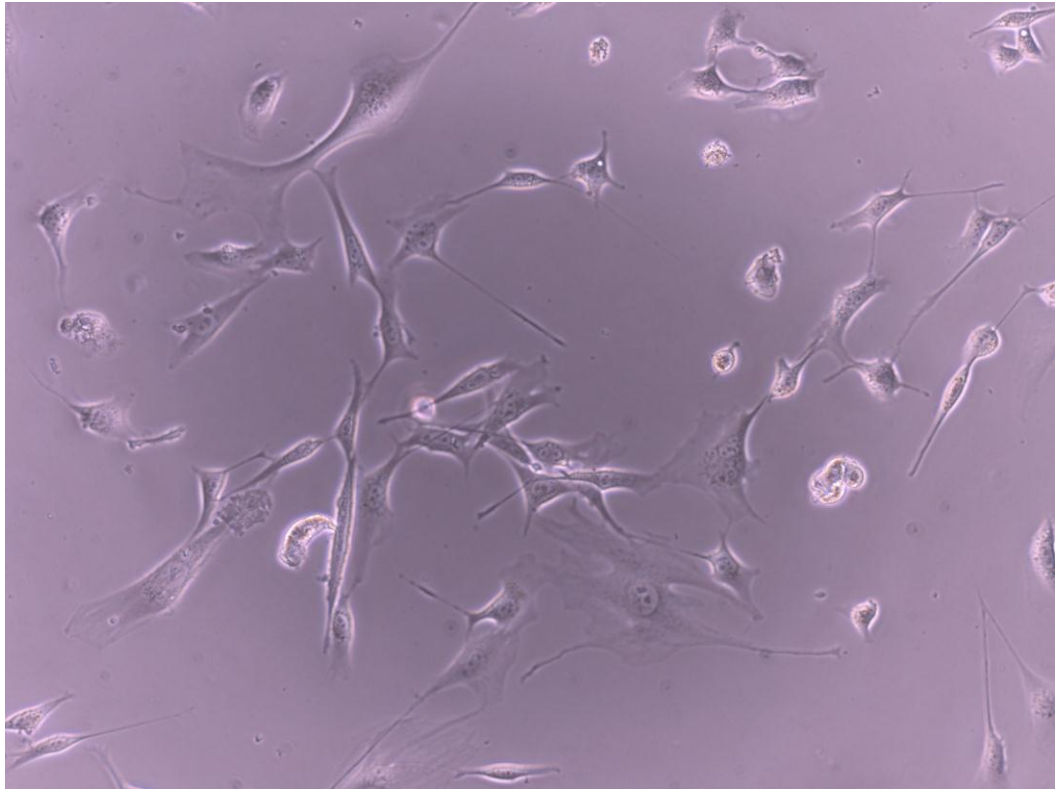
Obr. 18: NIH/3T3, PE upravený 75 % (10×)



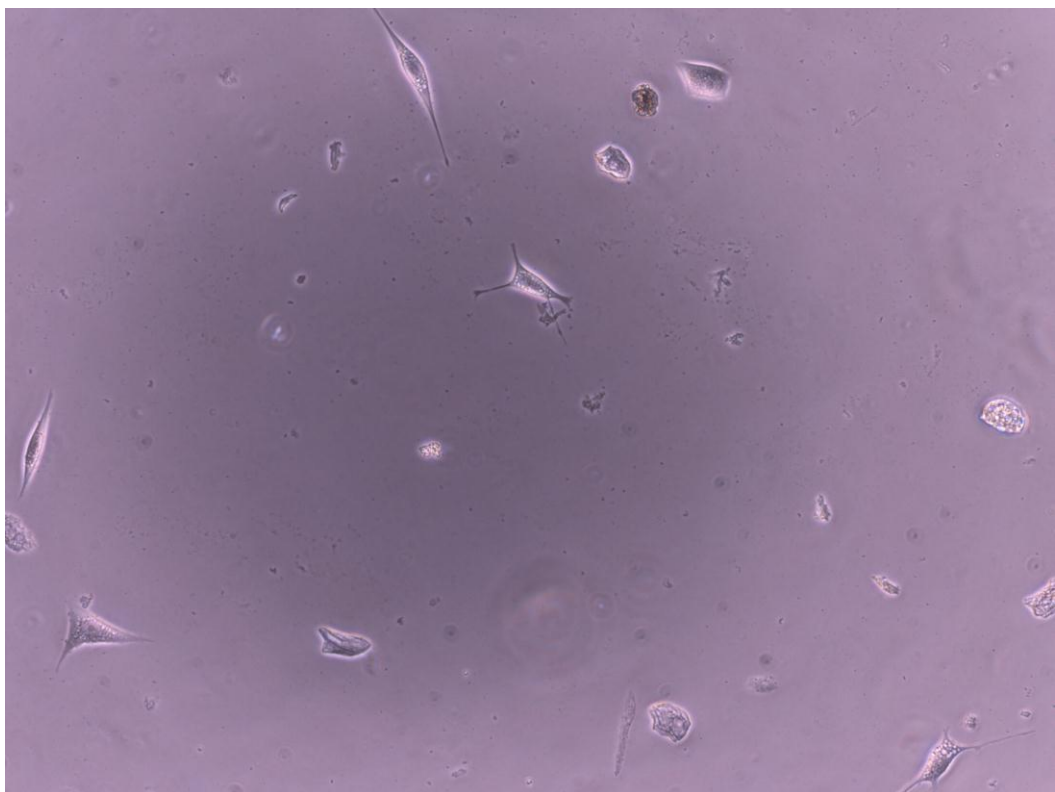
Obr. 19: NIH/3T3, PE upravený 50 % (10×)



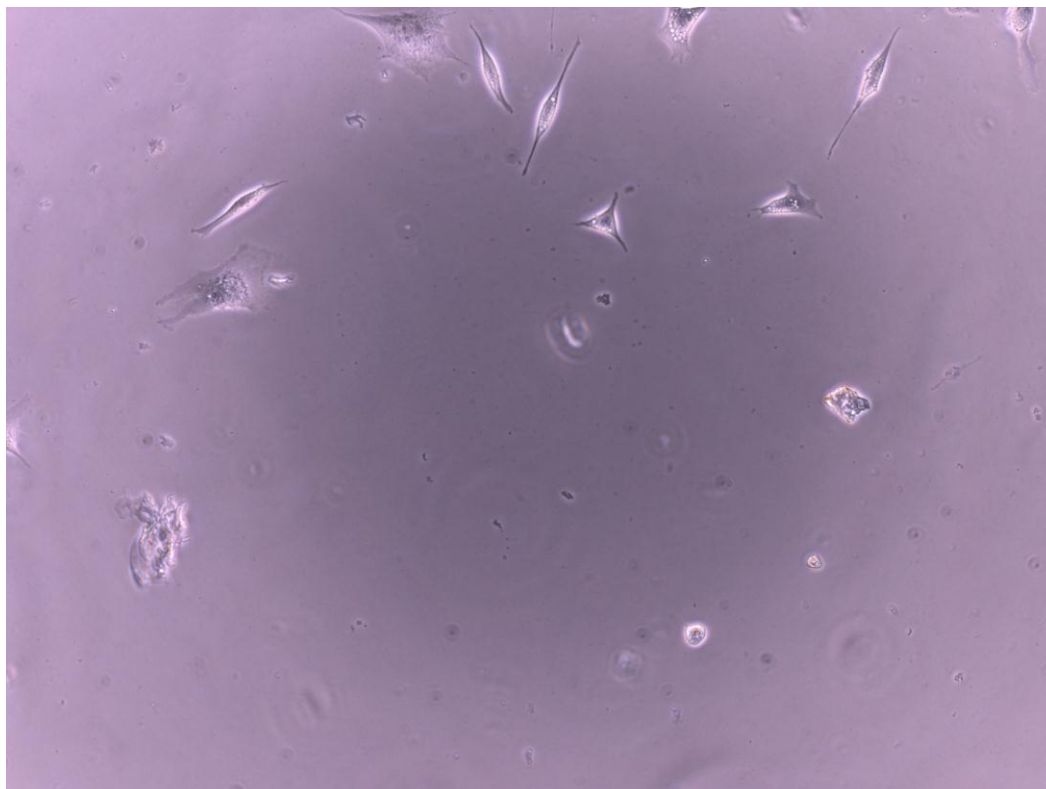
Obr. 20: NIH/3T3, PE upravený + AAL + HYA 50 % (10×)



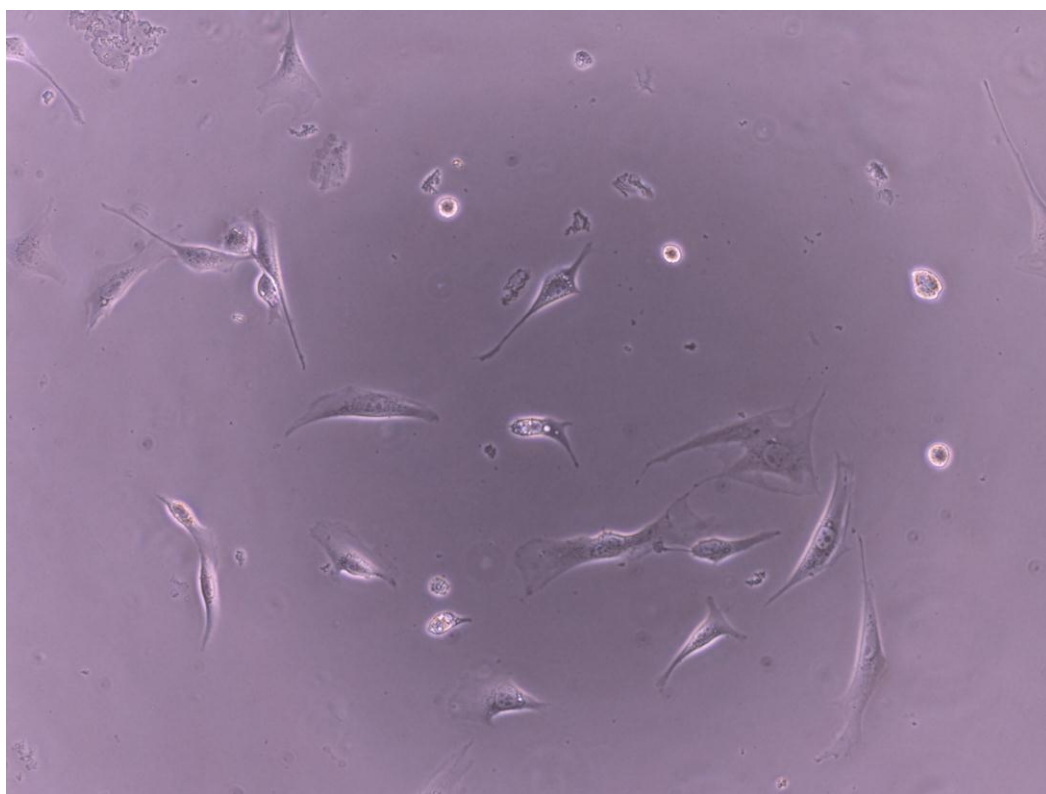
Obr. 21: NIH/3T3, PE upravený + AAL + HYA 25 % (10×)



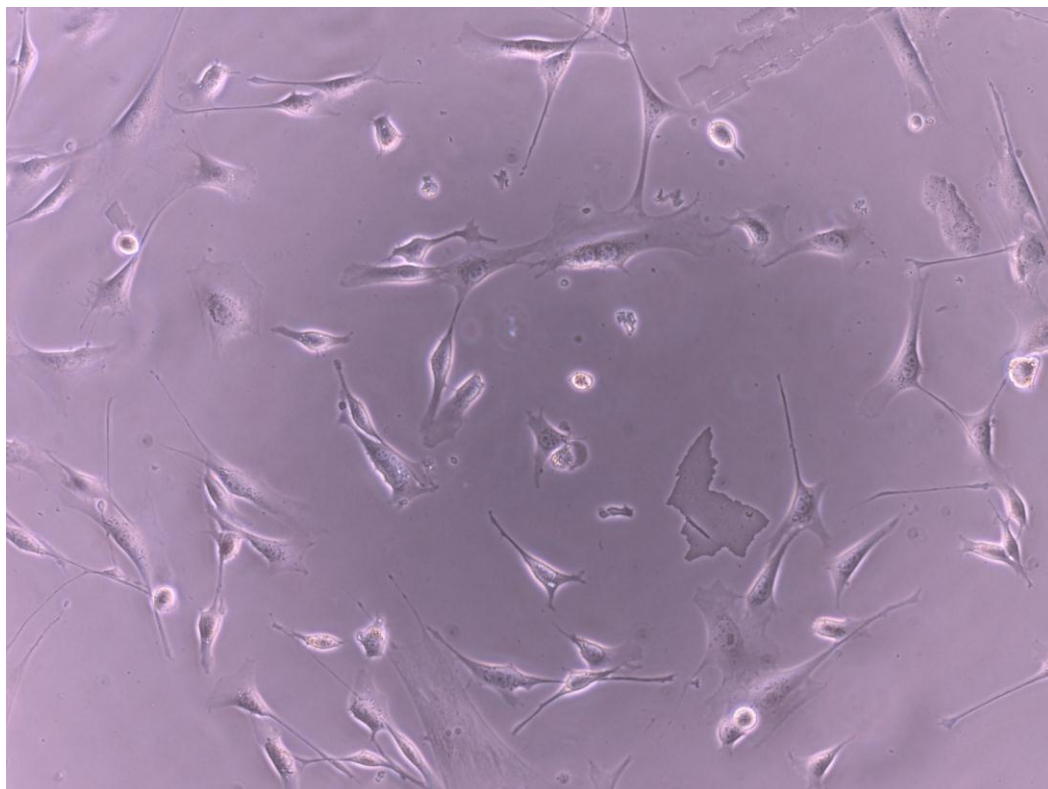
Obr. 22: NIH/3T3, PE upravený + AAM + HYA 100 % (10×)



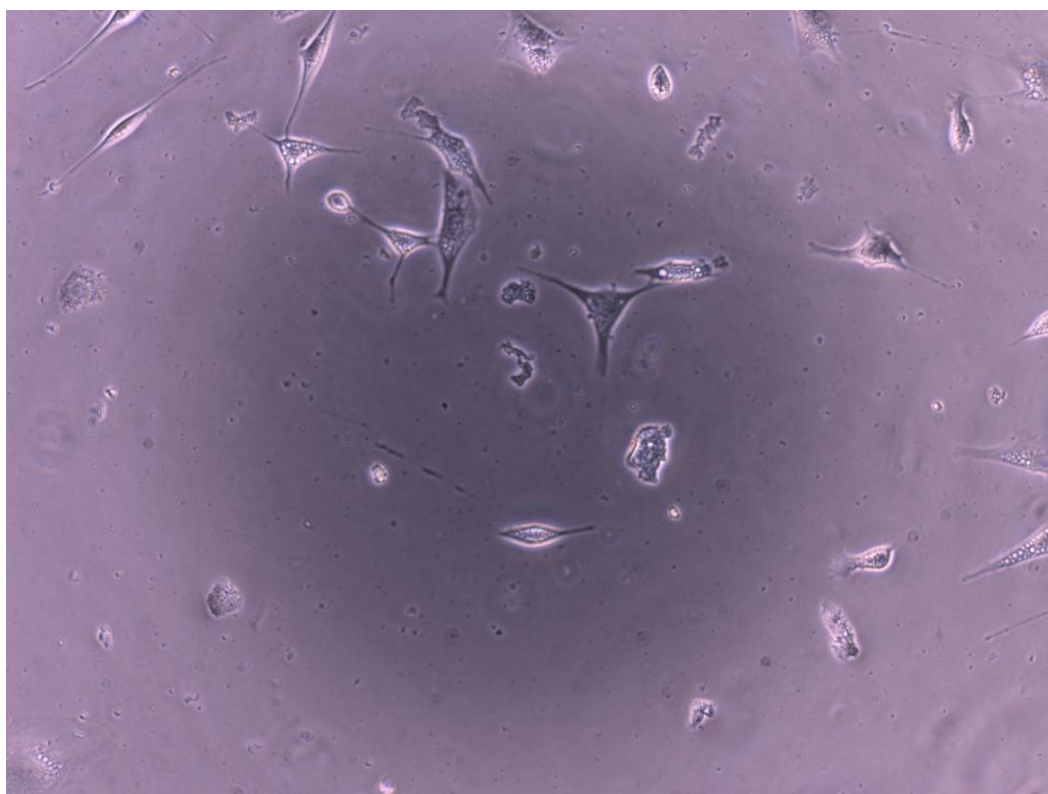
Obr. 23: NIH/3T3, PE upravený + AAM + HYA 75 % (10×)



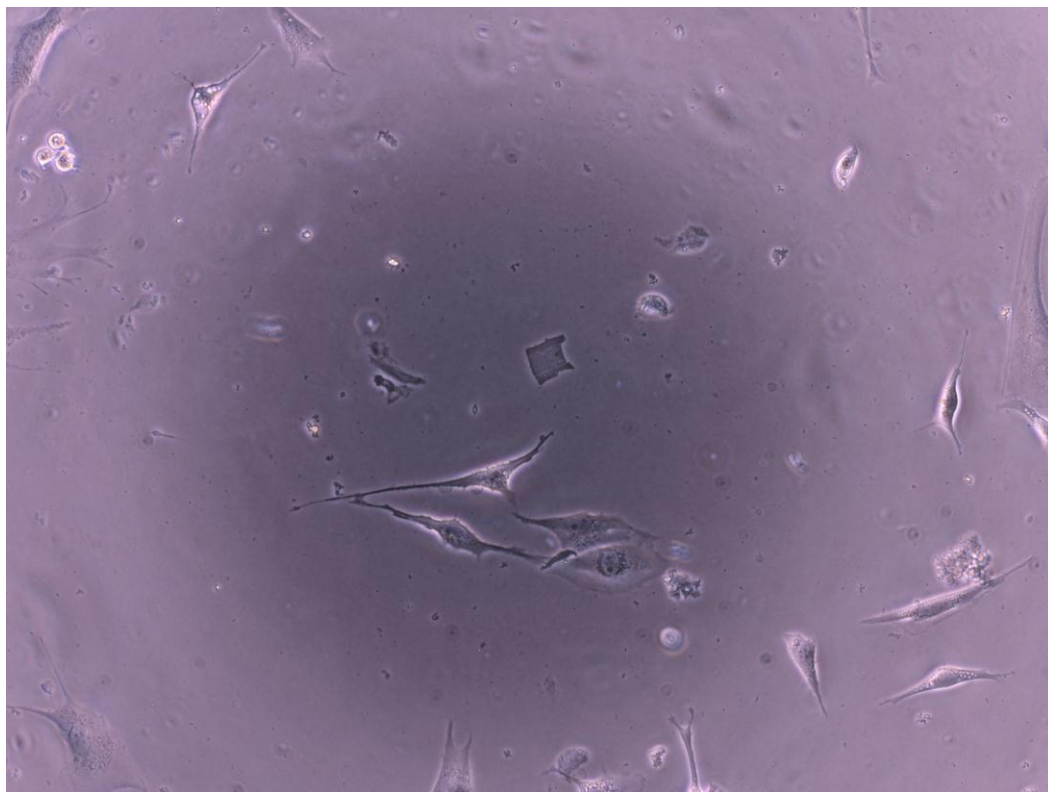
Obr. 24: NIH/3T3, PE upravený + AAM + HYA 25 % (10×)



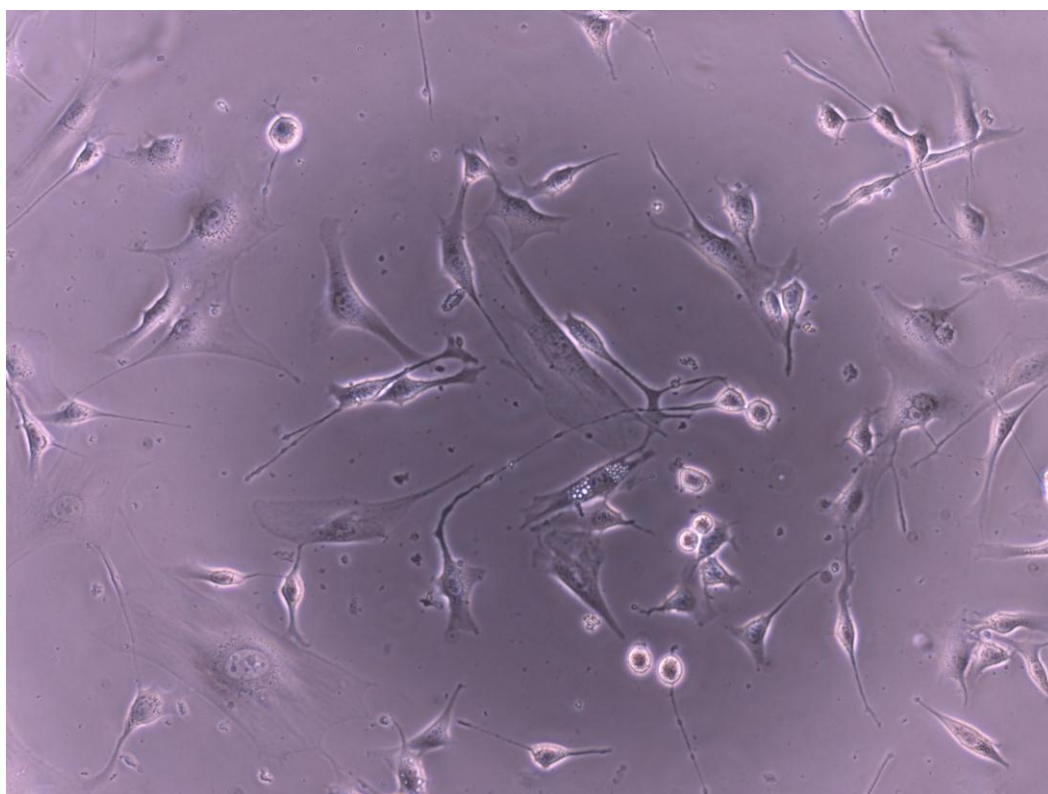
Obr. 25: NIH/3T3, PE upravený + AAM + HYA 1 % (10×)



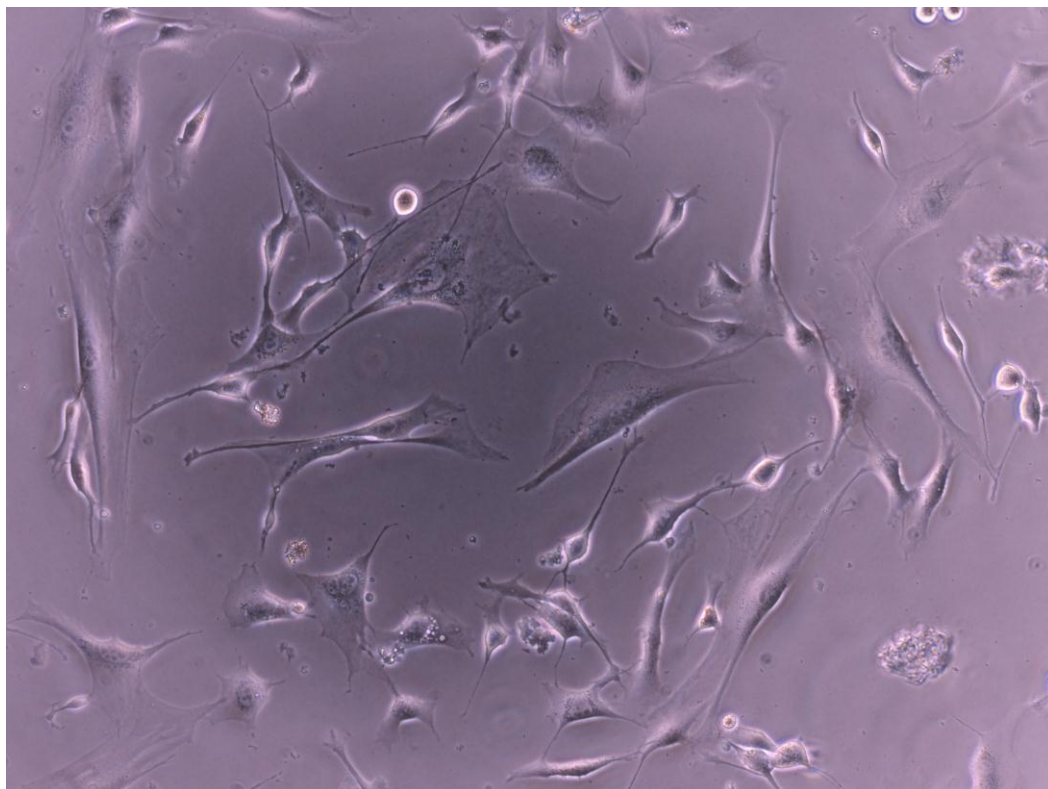
Obr. 26: NIH/3T3, PE upravený + MAAM + HYA 100 % (10×)



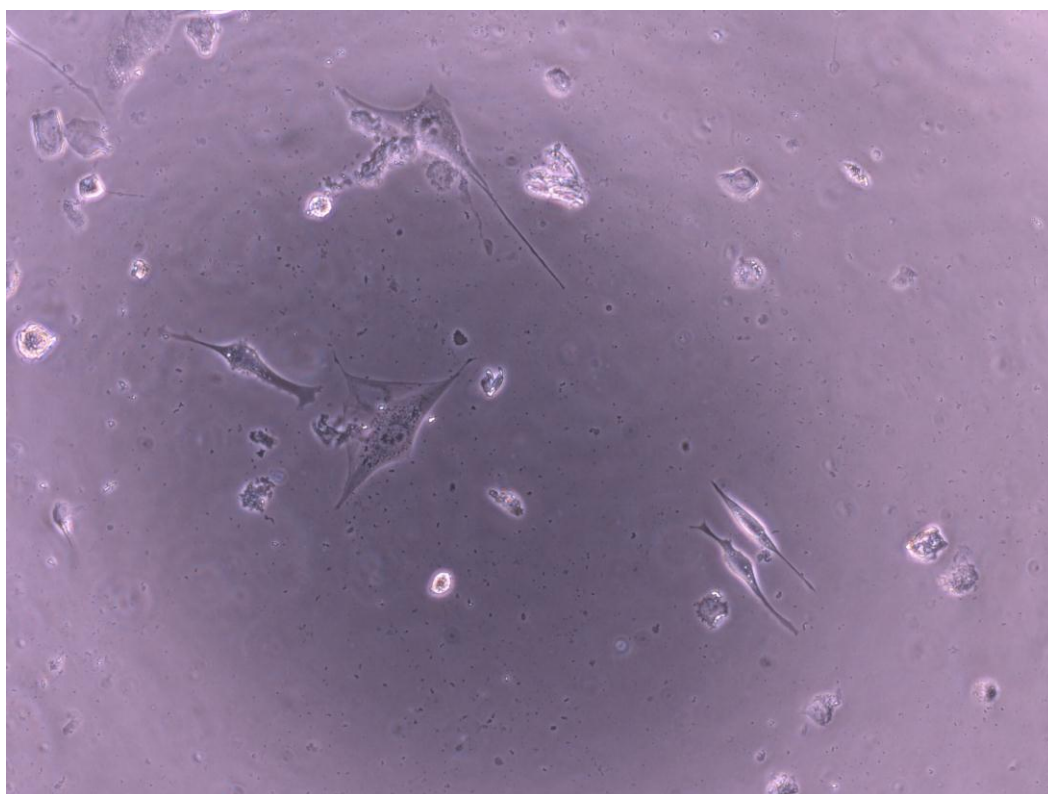
Obr. 27: NIH/3T3, PE upravený + MAAM + HYA 75 % (10×)



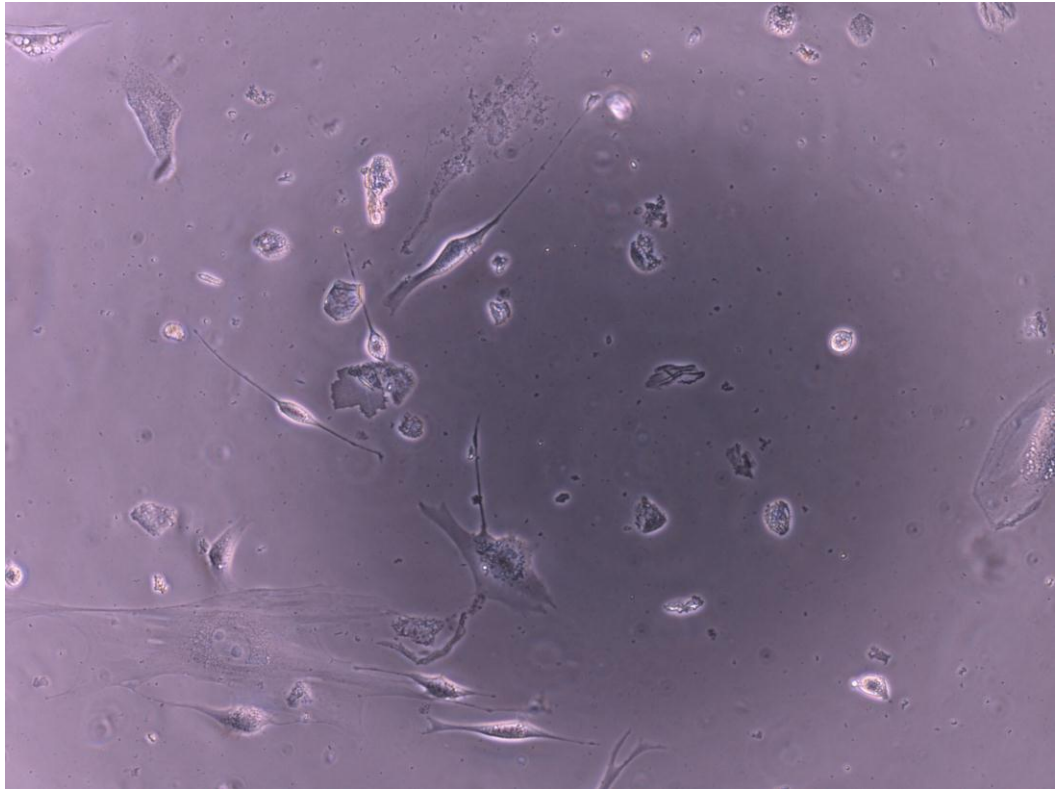
Obr. 28: NIH/3T3, PE upravený + MAAM + HYA 10 % (10×)



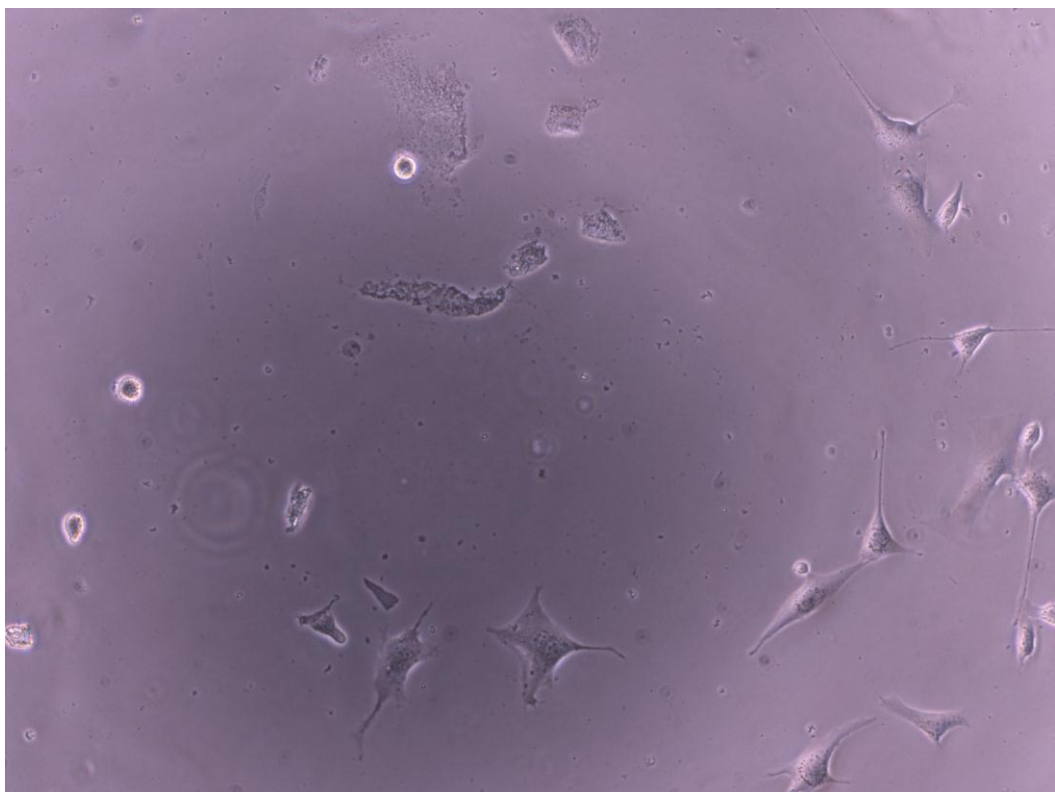
Obr. 29: NIH/3T3, PE upravený + MAAM + HYA 1 % (10×)



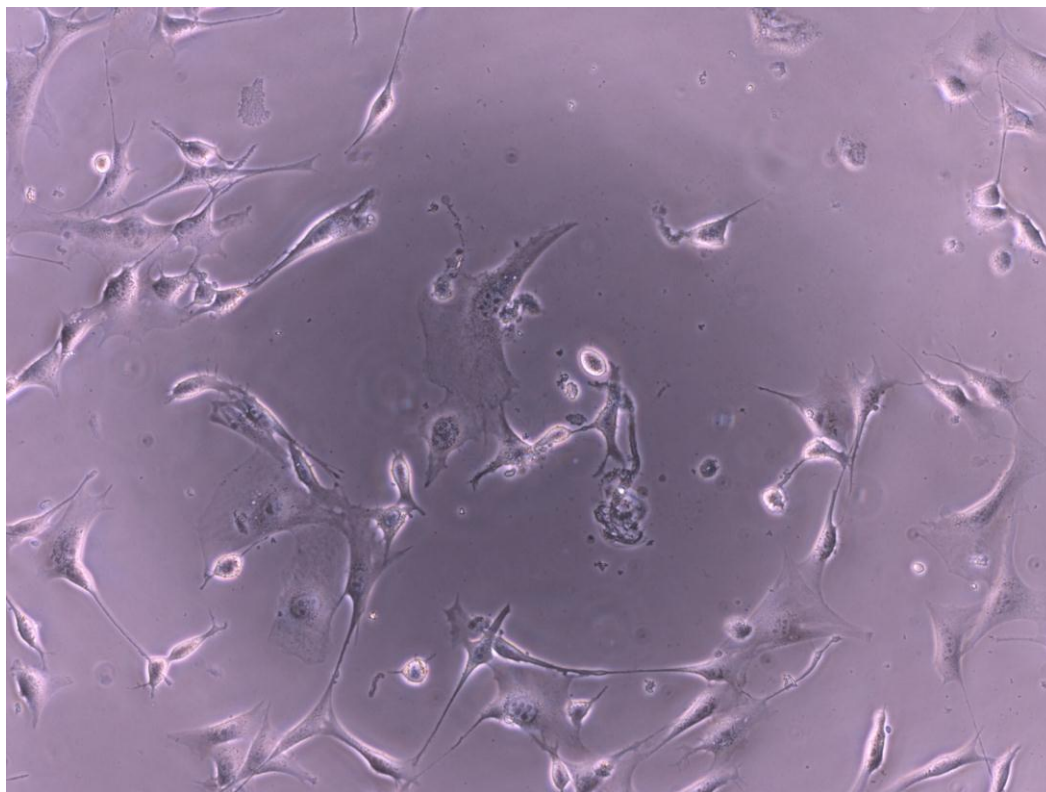
Obr. 30: NIH/3T3, PE upravený + MMAAM + HYA 100 % (10×)



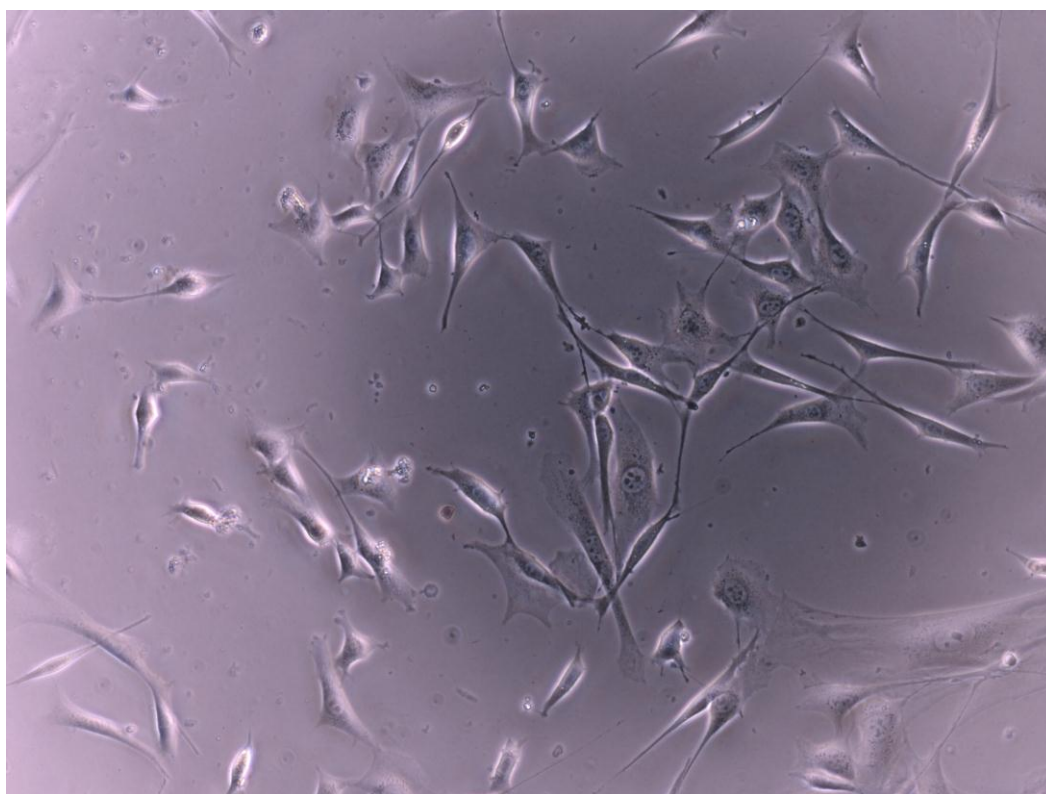
Obr. 31: NIH/3T3, PE upravený + MMAAM + HYA 75 % (10×)



Obr. 32: NIH/3T3, PE upravený + MMAAM + HYA 25 % (10×)



Obr. 33: NIH/3T3, PE upravený + MMAAM + HYA 1 % (10×)



Obr. 34: NIH/3T3 – kontrola (10×)

ZÁVĚR

V této bakalářské práci bylo za úkol zjistit povrchové interakce čistého a různě modifikovaného PE. Na kultivaci byly použity buňky HaCaT, na test cytotoxicity jen buňky NIH/3T3.

Při kultivaci HaCaT se tyto buňky uchytily pouze na dvou vzorcích, a to na modifikovaném PE s MAAM a MMAAM (u tohoto vzorku byla ale životaschopnost buněk velmi malá). Na ostatních vzorcích bylo nalezeno jen velice málo buněk, k tomu bez životaschopnosti. Je zajímavé, že při testu cytotoxicity dopadl nejlépe vzorek PE s navázaným AAM (při dvou nejnižších koncentracích extraktů, 10 a 1 % vykazoval cytotoxicitu 89 a 84 %), ale buňky HaCaT se na něj neuchytily. Zato PE s navázaným MAAM vykazoval při každé koncentraci alespoň slabou cytotoxicitu, tedy menší jak 80 %. Celkově v testu cytotoxicity dopadl lépe PE neupravený než PE upravený v reaktoru. Další vzorky s větším počtem životaschopných buněk jsou: neupravený PE 25 % (s cytotoxicitou 65 %), PE s AAL 25 % (s cytotoxicitou 76 %) a PE s MAAM 1 % (s cytotoxicitou 73 %). Nejhůře dopadl vzorek PE treated 100 % se středně silnou cytotoxicitou (48 %), na kterém je vidět větší množství buněk bez životaschopnosti. Ani u vzorků PE s AAM s koncentrací extraktů 100, 75, 25 % (s cytotoxicitou 53, 59 a 63 %) a PE s MMAAM s koncentrací extraktů 100, 75, 25 % a s cytotoxicitou 56, 62 a 62 % nebyl zaznamenán vysoký počet životaschopných buněk.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VACULÍK, Jan a Aleš PODŠKUBKA. SYSADOA, chondroprotektiva, DMARD. In: DUNGL, Pavel et al. *Ortopedie*. Vydání první. Praha: Grada, 2005. Sv. 4.3, s. 131-136. ISBN 80-247-0550-8.
- [2] LODISH, Harvey et al. *Molecular cell biology*. First printing. New York: W. H. Freeman & Company, 2013, s. 956. ISBN 978-1-4292-3413-9.
- [3] BILEROVÁ, Helena. *Rheology of Hyaluronan Solutions*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2012. Dizertační práce.
- [4] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU MAGAZINE of MEDICINE (NEUMM)* [online]. 2009, roč. 4, č. 1-2, s. 75-79 [cit. 2013-01-06]. Dostupné z: http://www.neumm.cz/public/img/neumm_09_1-2/pdf/sliva_minarik_hyaluronat.pdf
- [5] NECAS, J. et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicína (VETMED)* [online]. 2008, vol. 53, no. 8, s. 397-411 [cit. 2013-02-12]. ISSN 0375-8427. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/02029.pdf>
- [6] HASCALL, Vince a Jeffrey D ESKO. Hyaluronan. In: VARKI, Ajit et al. *Essentials of Glycobiology: Second edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Chap. 15, s. 219-229. ISBN 978-0-87969-770-9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1953/>
- [7] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vydání. Praha: Grada, 2012, s. 34. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [8] GULREZ, Syed K. H., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O PHILLIPS. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In: CAPRI, Angelo (ed.). *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering* [online]. August 01, 2011 [cit. 2013-03-22]. Chap 5. DOI 10.5772/24553. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>

- [9] MURRAY, Robert K. a Frederick W. KEELEY. Extracelulární matrix. In: MURRAY, Robert K. et al. *Harperova biochemie*. Vyd. v ČR 4. Praha: H & H, 2002. Sv. 57, s. 668-682. ISBN 80-7319-013-3.
- [10] WEIGEL, Paul H. Hyaluronan Synthase. In: *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* [online databáze]. Wiley, c2002, Sep 4, 2003 [cit. 2013-03-25]. ISBN 978-1-59124-524-7. Dostupné z:
http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=738&VerticalID=0
- [11] EVANSKO, Stephen P. et al. *Hyaluronan-dependent pericellular matrix* [online databáze]. 2007, [cit. 2013-03-30]. Vol. 59, is. 13, s. 1351-1365. Dostupné z:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.008>
- [12] KOGAN, Grigorij et al. *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications* [online]. Springer Science, 2006, Sep 25, 2006 [cit. 2013-03-26]. Dostupné z:
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10529-006-9219-z/fulltext.html>
- [13] HENCH, Larry L. a Julian R. JONES. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering* [online databáze]. Woodhead Publishing, c2005, Jun 18, 2012 [cit. 2013-03-26]. Chap. 10, s. 105. ISBN 978-1-61344-404-7. Dostupné z:
http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=4392&VerticalID=0
- [14] KURTZ, Steven M. *UHMWPE Biomaterials Handbook* [online databáze]. Elsevier, c2009, Apr 28, 2010 [cit. 2013-03-26]. Chap. 18, s. 262. ISBN 978-0-08-088444-8. Dostupné z:
http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=2770&VerticalID=0
- [15] BARBUCCI, R. et al. Physico-chemical surface characterization of hyaluronic acid derivatives as a new class of biomaterials. In: COOPER, S. L., C. H. BAMFORD a T. TSURUTA. *Polymer Biomaterials in Solutions, as Interfaces and as Solids* [online databáze]. VSP – An imprint of BRILL, c1995, Jun 7, 2007 [cit. 2013-03-07]. Chap. 37, s. 583-584. ISBN 978-1-60119-292-9. Dostupné z:
http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1576&VerticalID=0

- [16] BURD, Andrew. Hyaluronan and Scarring. In: GARG, Hari G. a Charles A. HALES. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. First edition. Netherlands: Elsevier, 2004. Chap. 18, s. 367-395. ISBN 0-08-044382-6. Dostupné také z: http://books.google.cz/books?id=WCjv3-_q2ggC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false
- [17] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 1. české vydání. Praha: Grada, 2012. S. 457. ISBN 978-80-247-3729-4. Dostupné také z: <http://books.google.cz/books?id=iMPSLaDsGyYC&printsec=frontcover&dq=isbn:8024737299&hl=cs&sa=X&ei=gamTUeb9BMLAtQbMg4CADQ&ved=0CDAQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>
- [18] MARIEB, Elaine a Jon MALLATT. *Anatomie lidského těla*. Vydání první. Brno: CP Books, 2005. S. 113-115, 90. ISBN 80-251-0066-9.
- [19] Admincz. Laboratoř buněčných kultur. In: *Ústav lékařské chemie a biochemie* [online]. Listopad 13, 2010 [cit. 2013-04-01]. Obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z: <http://medchemrs.upol.cz/profil/wp-content/uploads/2010/11/keratJPG1.jpg>
- [20] JUNQUEIRA, Carlos Luiz a José CARNEIRO. *Basic Histology: Text and Atlas* [HTML]. 11th edition. McGraw-Hill, 2005. Chap. 18. ISBN 9780071440912.
- [21] Úloha keratinocytů v přirozené imunitě kůže. *Medicína* [online]. 2001, roč. 8, č. 3, s. 8 [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: http://www.zdravardina.cz/medicina/?page_id=2544
- [22] ALBERTS, Bruce et al. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, c2002. Chap. 19, 22, s. 1101-1102, 1263-1264, 1301. ISBN 0-8153-3218-1.
- [23] VOKURKA, Martin a Jan HUGO. *Velký lékařský slovník*. 5. aktualiz. vydání. Praha: Maxdorf, c2005. S. 418. ISBN 80-7345-058-5.
- [24] MA, Jianbiao et al. *A preliminary in vitro study on the fabrication ...* [online data-báze]. 2001, [cit. 2013-04-01]. Vol. 22, is. 4, s. 331-336. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00188-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00188-5)
- [25] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1. vydání. Praha: Grada, 2009. S. 46-47. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [26] *Biology Pictures* [online]. 2011 [cit. 2013-04-05]. Obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z: <http://biology-pictures.blogspot.cz/2011/10/fibroblasts-image.html>

- [27] MUSIL, Jan, Milan ADAM a Václav HOUBA. *Vysokomolekulární složky pojiva*. Vydání 1. Praha: Academia, 1966. S. 281-283.
- [28] DAYAN, Nava. *Skin Aging Handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development* [online databáze]. William Andrew, c2008, Feb 5, 2009 [cit. 2013-04-14]. Chap. 7, s. 133-134 .ISBN 978-0-8155-1979-9. Dostupné z:
http://www.knovel.com/web/portal/basic_search/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=2291&_EXT_KNOVEL_DISPLAY_fromSearch=true&_EXT_KNOVEL_DISPLAY_Page=1&_EXT_KNOVEL_DISPLAY_sistring=0;;;0;;;0;;;0;;;0;;;0;;;103429;;;-2;;;0;;;0;;;0;;;0;;;0;;;0;;;0&_EXT_KNOVEL_DISPLAY_ststring=dayan,%20nava; ;;;;0;;;0;;;0;;;0&_EXT_KNOVEL_DISPLAY_searchType=basic
- [29] *Biologie v kostce* [online]. [cit. 2013-04-13]. Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/246-testy-cytotoxicity-na-bunkach.html>
- [30] KOVAČIČ, Ľudomír a Jaroslav BÍNA. *Plasty: vlastnosti, spracovanie, využitie*. 1. vydanie. Bratislava: Alfa, 1974. S. 15-20.
- [31] MLEZIVA, Josef a Jaromír ŠŇUPÁREK. *Polymery: výroba, struktura, vlastnosti a použití*. Vydání druhé, přeprac. Praha: Sobotáles, 2000. S. 20-37. ISBN 80-85920-72-7.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAL	Allylalkohol
AAM	Allylamin
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
CD44	Transmembránový glykoprotein, receptor hyaluronanu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GAG	Glykosaminoglykan
GlcA	Kyselina D-glukuronová
GlcNAc	N-acetylglukosamin
HA (HYA)	Kyselina hyaluronová, hyaluronan
HaCaT	Buněčná linie lidských keratinocytů
HARE	Receptor hyaluronanu
HAS1-3	Hyaluronan syntázy
HDPE	Vysokohustotní polyethylen
HYAFF 7	Ethyl ester kyseliny hyaluronové
HYAFF 11	Benzyl ester kyseliny hyaluronové
Hyal-1 až Hyal-4	Savčí hyaluronidázy
Layilin	Receptor hyaluronanu
LDPE	Nízkohustotní polyethylen
LLDPE	Lineární nízkohustotní polyethylen
LYVE-1	Receptor hyaluronanu
MAAM	N-methylallylamin
MMAAM	N-N-dimethylallylamin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NIH/3T3	Myší embryonální fibroblasty
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polyethylen
PH-20	Savčí hyaluronidáza
RHAMM	Receptor hyaluronanu
TLR4	Toll-like receptor 4
UDP-GlcA	Uridindifosfát kyseliny D-glukuronové
UDP-GlcNAc	Uridindifosfát N-acetylglukosaminu
UHMWPE	Polyethylen s ultra vysokou molekulovou hmotností

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Chemická struktura HA [5]	11
Obr. 2: Různé struktury hyaluronanu [8].....	12
Obr. 3: Biosyntéza HA [6].....	14
Obr. 4: Přichycení HA s přidruženými proteoglykany k povrchu buňky pomocí receptoru CD44 [11].....	17
Obr. 5: Lidské keratinocyty [19].....	21
Obr. 6: Fibroblasty [26]	24
Obr. 7: HaCaT, PE neupravený (10×)	32
Obr. 8: HaCaT, PE upravený (10×)	33
Obr. 9: HaCaT, PE upravený + AAL + HYA (10×).....	33
Obr. 10: HaCaT, PE upravený + AAM + HYA (10×).....	34
Obr. 11: HaCaT, PE upravený + MAAM + HYA (10×)	34
Obr. 12: HaCaT, PE upravený + MMAAM + HYA (10×)	35
Obr. 13: HaCaT – kontrola (10×)	35
Obr. 14: NIH/3T3, PE neupravený 100 % (10×).....	37
Obr. 15: NIH/3T3, PE neupravený 75 % (10×).....	38
Obr. 16: NIH/3T3, PE neupravený 25 % (10×).....	38
Obr. 17: NIH/3T3, PE upravený 100 % (10×).....	39
Obr. 18: NIH/3T3, PE upravený 75 % (10×).....	39
Obr. 19: NIH/3T3, PE upravený 50 % (10×).....	40
Obr. 20: NIH/3T3, PE upravený + AAL + HYA 50 % (10×)	40
Obr. 21: NIH/3T3, PE upravený + AAL + HYA 25 % (10×)	41
Obr. 22: NIH/3T3, PE upravený + AAM + HYA 100 % (10×).....	41
Obr. 23: NIH/3T3, PE upravený + AAM + HYA 75 % (10×)	42
Obr. 24: NIH/3T3, PE upravený + AAM + HYA 25 % (10×)	42
Obr. 25: NIH/3T3, PE upravený + AAM + HYA 1 % (10×).....	43
Obr. 26: NIH/3T3, PE upravený + MAAM + HYA 100 % (10×).....	43
Obr. 27: NIH/3T3, PE upravený + MAAM + HYA 75 % (10×).....	44
Obr. 28: NIH/3T3, PE upravený + MAAM + HYA 10 % (10×).....	44
Obr. 29: NIH/3T3, PE upravený + MAAM + HYA 1 % (10×).....	45
Obr. 30: NIH/3T3, PE upravený + MMAAM + HYA 100 % (10×)	45
Obr. 31: NIH/3T3, PE upravený + MMAAM + HYA 75 % (10×).....	46

Obr. 32: NIH/3T3, PE upravený + MMAAM + HYA 25 % (10×).....	46
Obr. 33: NIH/3T3, PE upravený + MMAAM + HYA 1 % (10×).....	47
Obr. 34: NIH/3T3 – kontrola (10×)	47

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: HA v lidském těle [4]	18
Tab. 2: Výsledky měření cytotoxicity u různých vzorků PE	36