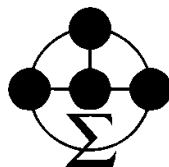




Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych Problemów Techniki



mgr inż. **Przemysław Sareło**

**Immunofunkcjonalizacja powierzchni stentów
kardiowaskularnych poprzez wprowadzenie
interleukin przeciwzapalnych**

Opiekun naukowy

dr hab. **Marta Kopaczyńska**, prof. uczelni

Katedra Inżynierii Biomedycznej

Wydział Podstawowych Problemów Techniki

Politechnika Wroclawska



Wrocław, 2023

Spis treści

Spis treści	3
Streszczenie	7
Summary	10
Wykaz skrótów.....	13
Wstęp.....	20
1.1 Patomechanizm miażdżycy.....	20
1.2 Stenty wieńcowe – jedna ze strategii terapeutycznych w przebiegu miażdżycy	37
1.3 Efekty biologiczne indukowane implantacją stentu.....	43
1.3.1 Patomechanizm restenozy w stencie	43
1.3.2 Wybrane efekty molekularne i komórkowe zależne od interleukiny 4 w okresie przed- i poimplantacyjnym.....	49
1.3.3 Wybrane efekty molekularne i komórkowe zależne od interleukiny 10 w okresie przed- i poimplantacyjnym.....	53
1.4 Chemia proponowanej powłoki.....	56
1.4.1 Polidopamina – wysoce adhezyjny i reaktywny chemicznie materiał bazowy	56
1.4.2 Teoria wiązania interleukin na powierzchni materiału bazowego.....	63
1.4.3 Pożądane właściwości i grupy funkcyjne chitozanu.....	64
1.4.4 Technika sieciowania a immobilizacja interleukin	67
Motywacja	70
Cel pracy.....	73
Graficzny abstrakt	74
Tezy pracy.....	76
Materiały i metody.....	77
6.1 Procedury przygotowania powłok.....	77
6.1.1 Procedura przygotowania powłok na bazie polidopaminy funkcjonalizowanych interleukiną	77

6.1.2	Wzbogacenie powłoki o chitozan. Funkcjonalizacja powłoki interleukinami za pośrednictwem techniki sieciowania	78
6.2	Fizyko-chemiczne metody charakteryzacji powłoki	79
6.2.1	Ocena struktury chemicznej powłoki za pomocą spektroskopii w podczerwieni.....	79
6.2.2	Charakterystyka nanostrukturalna powłoki za pomocą mikroskopii sił atomowych	80
6.2.3	Ocena kinetyki uwalniania interleukin z powierzchni powłoki z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego	81
6.3	Metody badań na modelu komórkowym.....	82
6.3.1	Hodowle komórkowe	82
6.3.1.1	Hodowla ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej stanowiących model komórek śródbłonna.....	82
6.3.1.2	Hodowla ludzkich komórek ostrej białaczki monocytowej stanowiących model monocytów/makrofagów	83
6.3.2	Metody biologii komórkowej i molekularnej.....	84
6.3.2.1	Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonna hodowanych na otrzymanych powłokach.....	84
6.3.2.2	Ocena morfologii komórek śródbłonna hodowanych na otrzymanych powłokach.....	86
6.3.2.3	Oznaczenie stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki śródbłonna hodowanych na otrzymanych powłokach	88
6.3.2.4	Ocena adhezji makrofagów do otrzymanych powłok	88
6.3.2.5	Ocena interakcji między komórkami śródbłonna hodowanymi na otrzymanych powłokach a komórkowym modelem monocytów.....	89
6.3.2.6	Ocena aktywności biologicznej interleukin po związaniu na powłoce bazowej – polaryzacja makrofagów wskutek kontaktu z proponowaną powłoką.....	90
6.3.2.7	Ocena ekspresji cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłonna.....	91
6.3.2.8	Oznaczenie stężenia tlenu azotu w komórkach śródbłonna	91
6.3.2.9	Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłonna	93
6.4	Analiza statystyczna uzyskanych danych	94
	Wyniki i dyskusja	95
7.1	Fizyko-chemiczne właściwości otrzymanej powłoki.....	95
7.1.1	Ocena struktury chemicznej powłoki za pomocą spektroskopii w podczerwieni.....	95
7.1.2	Charakterystyka nanostrukturalna powłoki za pomocą mikroskopii sił atomowych	98
7.1.3	Kinetyka uwalniania interleukin z powierzchni otrzymanej powłoki.....	99

7.2	Aktywność biologiczna otrzymanych powłoki.....	101
7.2.1	Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach	101
7.2.2	Ocena morfologii komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach 104	
7.2.3	Ocena stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki śródbłonka – odpowiedź zapalna komórek.....	111
7.2.4	Ocena adhezji makrofagów do otrzymanych powłok	114
7.2.5	Określenie poziomu adhezji monocytów do monowarstwy utworzonej z komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach.....	116
7.2.6	Ocena polaryzacji makrofagów wskutek kontaktu z powłoką – ocena aktywności biologicznej związanych z powłoką cytokin	119
7.3	Modelowanie stanu zapalnego – oddziaływanie komórek śródbłonka z niezwiązanymi z powłoką cytokinami – perspektywy rozwoju badań nad patomechanizmem miażdżycy i restenozy w stencie	121
7.3.1	Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonka po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi.....	121
7.3.1	Ocena morfologii komórek śródbłonka po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi	122
7.3.2	Ocena ekspresji cząsteczek adhezyjnych przez komórki śródbłonka po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi	126
7.3.3	Oznaczenie stężenia tlenu azotu w komórkach śródbłonka po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi.....	130
7.3.4	Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłonka po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi.....	131
	Dowiedzenie tez pracy.....	133
	Oryginalny wkład w tematykę pracy.....	138
	Dorobek naukowy autora.....	140
10.1	Tytuły zawodowe	140
10.2	Publikacje naukowe.....	140
10.3	Inne prace	141
10.4	Konferencje naukowe.....	141
10.5	Udział w grantach i projektach	142
10.6	Stypendia.....	142

10.7	Współpraca naukowa.....	142
10.8	Działalność dydaktyczna.....	143
10.9	Działalność dodatkowa	143
10.10	Doświadczenie naukowe	143
10.11	Działalność promująca naukę.....	144
	Spis ilustracji.....	145
	Bibliografia.....	151

Streszczenie

Miażdżycą określane jest stan przewlekłe utrzymującego się aktywnego procesu zapalnego w obrębie ścian tętnic, prowadzący do ich pogrubienia i utraty elastyczności. Stan ten jest szczególnie niebezpieczny, gdy obejmuje tętnice wieńcowe, prowadząc do rozwoju choroby wieńcowej. Wynikająca z progresji choroby niewydolność krążenia wieńcowego może skutkować niedokrwieniem mięśnia sercowego, co w rezultacie może doprowadzić do ostrej choroby niedokrwiennej i zgonu.

Spośród wielu metod i technik terapeutycznych, na które składa się intensywna farmakoterapia oraz pomostowanie aortalno-wieńcowe, przezskórna interwencja wieńcowa stanowi złoty standard w rewaskularyzacji zwężonej tętnicy wieńcowej. Szacuje się, że około 80% spośród wszystkich wykonanych interwencji kończy się wprowadzeniem do tętnicy wieńcowej stentu kardiowaskularnego. Corocznie na świecie zabiegów tego typu wykonuje się aż około 4 milionów. Przytoczone dane podkreślają powagę problemu.

Przezskórna interwencja wieńcowa z jednoczasową implantacją stentu prowadzi do poprawy jakości życia i przeżycia milionów pacjentów rocznie, niemniej jednak może wiązać się z ewentualnym niepowodzeniem, decydującym o ograniczeniu długoterminowej skuteczności tego zabiegu. Spośród najczęstszych, wskazać należy restenozę w stencie, rozumianą jako nawrót zwężenia w miejscu uprzednio poddanym rewaskularyzacji.

Mechanizmy leżące u podstaw restenozy w stencie nie zostały w pełni poznane. Szczególną rolę w tym procesie wydają się odgrywać obnażony i dysfunkcyjny śródbłonek, związana z zabiegiem indukcja ostrego stanu zapalnego na tle przewlekających się procesów zapalnych, będących wynikiem progresującej miażdżycy, podśródbłonkowe gromadzenie się makrofagów modyfikujących lokalne środowisko naczyń oraz transformacje fenotypowe komórek mięśni gładkich naczyń. Wskazane zjawiska przyczyniają się do przerostu neointymy, stanowiącej pointerwencyjny, patologiczny proces, podczas którego dokonuje się przebudowa błony wewnętrznej ściany naczynia wieńcowego. Prowadzi to stopniowo do restenozy w stencie oraz nawrotu klinicznych cech niewydolności krążenia wieńcowego. Proces ten pozostaje wciąż poważnym problemem

w kardiologii interwencyjnej. Stanowi również jedną z ważniejszych przyczyn zgonu wśród pacjentów z chorobą wieńcową.

Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad rozwojem coraz to nowszych koncepcji stentów. Strategie te obejmują poszukiwanie nowego materiału, z którego stent zostanie wykonany bądź projektowanie zupełnie odmiennych konstrukcji implantu.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej podjęto się przeprowadzenia badań z zakresu modyfikacji powierzchni powszechnie stosowanych stentów, która wykaże aktywność biologiczną wobec komórek naczyniowych, przez co pozwoli zredukować prawdopodobieństwo wystąpienia restenozy do minimum. Badania skoncentrowano wokół cząsteczek naturalnie syntezowanych przez organizm i charakteryzujących się plejotropowym działaniem – interleukin. Te — służące jako środki komunikacji dla komórek układu odpornościowego, jak również dla komórek nienależących do tego systemu — zdolne są do wywołania korzystnych reakcji komórek naczyniowych, ograniczając progresję zmian miażdżycowych oraz zmniejszając prawdopodobieństwo rozwoju restenozy w stencie.

Na wstępie przedstawiono procedurę otrzymywania powłok na bazie polidopaminy i polidopaminy wzbogaconej chitozanem. Wykorzystane biomateriały cechują się silnymi właściwościami adhezyjnymi oraz obecnością licznych grup funkcyjnych. Możliwe zatem jest pokrycie struktury stentu powłoką bazową oraz związanie na powierzchni wybranych cząsteczek biologicznych. Immobilizację wybranych interleukin w obrębie materiałów bazowych przeprowadzono wskutek reakcji bezpośredniej lub za pośrednictwem techniki sieciowania.

Właściwości fizyko-chemiczne otrzymanych powłok zostały scharakteryzowane z wykorzystaniem spektroskopii osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera, mikroskopii sił atomowych i testów immunoenzymatycznych. Za pośrednictwem wspomnianych technik udało się potwierdzić skuteczność funkcjonalizacji powierzchni i obecność interleukin w strukturze proponowanej powłoki. Nie tylko wykazano, że powłoka jest nośnikiem interleukin, ale równocześnie, że pozwala na kontrolowane uwalnianie biomolekuł.

Zdefiniowanie właściwości biologicznych otrzymanych powłok możliwe było wskutek przeprowadzenia eksperymentów *in vitro* z wykorzystaniem modelowych komórek śródbłonka oraz modelowych monocytów/makrofagów. Ocenie poddano żywotność i proliferację komórek śródbłonka, scharakteryzowano ich morfologię, a także dokonano oceny ich prozapalnej odpowiedzi. Otrzymane powłoki indukowały wzrost komórek śródbłonka, a z upływem czasu, sprzyjały wyhamowaniu procesów zapalnych w tych komórkach. Udowodniono również, że obecność powłoki na powierzchni materiału znacząco hamuje adhezję monocytów/makrofagów do materiału, jak i do komórek śródbłonka hodowanych na tak zmodyfikowanej powierzchni. Zdolność powłok do

indukowania zmian fenotypowych makrofagów zgromadzonych w ścianie tętnicy potwierdziła, że zaproponowana procedura immobilizacji interleukin nie upośledza ich aktywności biologicznej. Ostatecznie, powłoka wspiera procesy gojenia i regeneracji tkanek, ogranicza produkcję cytokin prozapalnych i dostarcza cytokiny przeciwzapalne, co w rezultacie poprawia rokowanie pacjentów w chorobie naczyniowej.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdzają, że nadrzędny cel rozprawy doktorskiej został zrealizowany. Immunofunkcjonalizowane powłoki zostały otrzymane, kompleksowo scharakteryzowane pod względem parametrów fizyko-chemicznych i aktywności biologicznej. Co więcej, przedstawione w niniejszej pracy badania rzutują nowe światło na patomechanizm choroby naczyniowej, proponując dalsze kierunki rozwoju dziedziny.

Summary

Atherosclerosis is defined as a state of chronically active inflammation within the vessel walls, leading to their thickening and loss of elasticity. This condition is especially dangerous when it involves the coronary arteries, leading to the development of coronary artery disease. The insufficiency of coronary blood circulation, that developed based on disease progression, may result in myocardial ischemia, which may cause myocardial infarction and death.

Among the many therapeutic methods and techniques, which include intensive pharmacotherapy and coronary artery bypass grafting, percutaneous coronary intervention is the gold standard in revascularization of a narrowed coronary artery. It is estimated that approximately 80% of all performed interventions end with insertion of a cardiovascular stent into the coronary artery. Approximately 4.0 million such procedures are performed annually in the world. The quoted numbers underline the seriousness of the problem.

Percutaneous coronary intervention with simultaneous stent implantation undoubtedly leads to an improvement the quality of life and survival of millions of patients annually. However, it may be associated with a possible failure, limiting the long-term effectiveness of the procedure. Among the most common, in-stent restenosis should be indicated, defined as a stenosis recurrence of a previously revascularized vessel.

The mechanisms underlying in-stent restenosis are not fully understood. A special role in this process seems to be played by the denudated and dysfunctional endothelium, the procedure-associated development of acute inflammation, which overlaps the progressive-atherosclerosis-associated chronic inflammation, subendothelial accumulation of macrophages modifying the local vascular environment and phenotypic transformations of vascular smooth muscle cells. The indicated phenomena contribute to the hypertrophy of the neointima, which is a postinterventional, pathological process during which the remodeling of the intimal wall of the coronary vessel takes place. This gradually leads to in-stent restenosis and recurrence of clinical signs of coronary insufficiency. This process remains a serious problem in

interventional cardiology. It is also one of the most important causes of death among patients with coronary artery disease.

Currently, a lot of research is being conducted on the development of newer and newer stents concepts. These strategies include the search for a new material from which the stent will be made or the design of completely new implant structures.

As part of this doctoral dissertation, research was undertaken in the field of surface modification of commonly used stents, which will show biological activity against vascular cells, thus reducing the probability of in-stent restenosis to a minimum. The research focused on molecules naturally synthesized by the body and characterized by a pleiotropic effect – interleukins. These — serving as a means of communication for immune system cells as well as cells not belonging to this system — are able to induce beneficial reactions of vascular cells, limiting the progression of atherosclerotic lesions and reducing the likelihood of in-stent restenosis developing.

At the beginning, the step-by-step procedure of polydopamine and chitosan-enriched polydopamine based coating synthesis have been reported. These biomaterials are characterized by strong adhesive properties and the presence of numerous functional groups. Therefore, it is possible to cover the stent structure with a coating and to bind selected biological molecules on the surface. Immobilization of selected interleukins within the applied base materials have been performed by direct reaction or via cross-linking chemistry.

The physico-chemical properties of the obtained coatings have been characterized by means of attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, atomic force microscopy and enzyme-linked immunosorbent assays. By means of application these techniques, it has been possible to confirm the effectiveness of surface functionalization and the presence of interleukins in the structure of the proposed coating. Not only the coating has exhibited interleukin-carrier property, but at the same time it has allowed controlled release of biomolecules.

Defining the biological properties of the proposed coatings has been possible because of *in vitro* studies, where model endothelial cells and model monocytes/macrophages have been engaged. The viability and proliferation of endothelial cells have been examined, their morphology has been characterized, and their pro-inflammatory response has been assessed. The synthesized coatings have supported the growth of endothelial cells, and over time, they have contributed to the inhibition of inflammatory processes in these cells. It has also been proven that the presence of a coating on the surface of the material has significantly inhibited the adhesion of monocytes/macrophages to the material as well as to endothelial cells cultured on

such modified surface. The ability of the coatings to induce phenotypic changes of macrophages accumulated in the arterial wall has confirmed that the proposed procedure of interleukin immobilization has not impaired the biological activity of the cytokines, that have been used. Ultimately, the coatings have exhibited ability to promote tissue healing and regeneration, reduce the production of pro-inflammatory cytokines and deliver anti-inflammatory cytokines, what could improve the prognosis of patients with vascular disease.

The results of the conducted experiments have confirmed that the overriding goal of the doctoral dissertation has been achieved. The immunofunctionalized coatings have been obtained, comprehensively characterized in terms of physico-chemical properties and their biological activities. Moreover, the presented results shed new light on the pathomechanism of vascular disease, proposing further directions for the development of this field of science.

Wykaz skrótów

A	AFM	(z ang. <i>atomic force microscopy</i>) mikroskopia sił atomowych
	ADCC	(z ang. <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>) cytotoksyczność zależna od przeciwciał
	ADP	(z ang. <i>adenosine-5'-diphosphate</i>) adenozy-no-5'-difosforan
	AJs	(z ang. <i>adherens junctions</i>) połączenia przylegające
	ALDH	(z ang. <i>aldehyde dehydrogenase</i>) dehydrogenaza aldehydowa
	ALK1	(z ang. <i>activin receptor-like kinase 1</i>) kinaza typu 1 podobna do receptora aktywiny
	AMP	(z ang. <i>adenosine-5'-monophosphate</i>) adenozy-no-5'-monofosforan
	Ang II	(z ang. <i>angiotensin II</i>) angiotensyna II
	APC	(z ang. <i>antigen-presenting cells</i>) komórki prezentujące antygen
	ATP	(z ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>) adenozy-no-5'-trifosforan
	ATR-FTR	(z ang. <i>attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy</i>) spektroskopia osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera
	α -SMA	(z ang. <i>smooth muscle α actin</i>) α -aktyna mięśni gładkich
B	bFGF	(z ang. <i>basic fibroblast growth factor</i>) podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów
	BMS	(z ang. <i>bare metal stent</i>) stent metalowy
	BH ₂	(z ang. <i>dihydrobiopterin</i>) dihydrobiopteryna
	BH ₄	(z ang. <i>tetrahydrobiopterin</i>) tetrahydrobiopteryna
	BRS	(z ang. <i>bioresorbable stents</i>) stenty bioresorbowalne
	BSA	(z ang. <i>bovine serum albumin</i>) albumina surowicy bydlęcej
C	CA/s	(z ang. <i>coronary artery/-ies</i>) tętnica/-e wieńcowe

CABG	(z ang. <i>coronary artery bypass grafting</i>) pomostowanie aortalno-wieńcowe
CaM	(z ang. <i>calmodulin</i>) kalmodulina
cAMP	(z ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>) cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
cGMP	(z ang. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>) cykliczny guanozyny-3',5'-monofosforan
CH	(z ang. <i>chitosan</i>) chitozan
CHD	(z ang. <i>coronary heart disease</i>) choroba wieńcowa
CLSM	(z ang. <i>confocal laser scanning microscopy</i>) skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna
COMT	(z ang. <i>catechol-O-methyltransferase</i>) katecholo-O-metylotransferaza
D DA	(z ang. <i>dopamine</i>) dopamina
DAF-FM	(z ang. <i>4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein</i>) dioctan 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluororesceiny
DCF	(z ang. <i>2',7'-dichlorofluorescein</i>) 2',7'-dichlorofluoresceina
DES	(z ang. <i>drug eluting stents</i>) stent uwalniający leki
DHI	(z ang. <i>dihydroxyindole</i>) 5,6-dihydroksyindol
DOPA	(z ang. <i>3,4-dihydroxysphenyloalanine</i>) 3,4-dihydroksyfenyloalanina
E ECs	(z ang. <i>endothelial cells</i>) komórki śródbłonna
ECM	(z ang. <i>extracellular matrix</i>) macierz zewnątrzkomórkowa
EDC	(z ang. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i>) 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid lub chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
EDCFs	(z ang. <i>endothelium-derived contracting factors</i>) śródbłonkowe czynniki konstrykcyjne
EDHF	(z ang. <i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>) śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący
EDRFs	(z ang. <i>endothelium-derived relaxing factors</i>) śródbłonkowe czynniki relaksacyjne
EEL	(z ang. <i>external elastic lamina</i>) blaszka zewnętrzna
EndoMT	(z ang. <i>endothelial-mesenchymal transition</i>) przejście śródbłonkowo-mezenchymalne

eNOS	(z ang. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>) śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
EPCR	(z ang. <i>endothelial cell protein C receptor</i>) śródbłonkowy receptor białka C
EPCs	(z ang. <i>endothelial progenitor cells</i>) progenitorowe komórki śródbłonka
ET-1	(z ang. <i>endothelin 1</i>) endotelina 1
F FA	(z ang. <i>focal adhesions</i>) ogniska adhezyjne
FBS	(z ang. <i>fetal bovine serum</i>) bydlęca surowica płodowa
FCs	(z ang. <i>foam cells</i>) komórki piankowate
FGF	(z ang. <i>fibroblast growth factor</i>) czynnik wzrostu fibroblastów
FOXO	(z ang. <i>forkhead box O proteins</i>) białka należące do rodziny <i>forkhead box O</i>
G GM-CSF	(z ang. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>) czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
H H ₂ DCFDA	(z ang. <i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>) dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
H hEGF	(z ang. <i>human epidermal growth factor</i>) ludzki naskórkowy czynnik wzrostu
HUVECs	(z ang. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>) ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej
HVA	(z ang. <i>homovanillic acid</i>) kwas homowanilinowy
I ICAM-1	(z ang. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>) cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (CD54)
IDO	(z ang. <i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>) 2,3-dioksygenaza indoloaminy
IEL	(z ang. <i>internal elastic lamina</i>) blaszka wewnętrzna
IFN- γ	(z ang. <i>interferon γ</i>) interferon γ
IL-1 β	(z ang. <i>interleukin 1β</i>) interleukina 1 β
IL-1R	(z ang. <i>interleukin 1 receptor</i>) receptor interleukiny 1
IL-1RA	(z ang. <i>interleukin 1 receptor antagonist</i>) antagonist receptor interleukiny 1
IL-4	(z ang. <i>interleukin 4</i>) interleukina 4
IL-4R	(z ang. <i>interleukin 4 receptor</i>) receptor interleukiny 4
IL-6	(z ang. <i>interleukin 6</i>) interleukina 6
IL-10	(z ang. <i>interleukin 10</i>) interleukina 10

IL-10R	(z ang. <i>interleukin 10 receptor</i>) receptor interleukiny 10
IL-12	(z ang. <i>interleukin 12</i>) interleukina 12
IL-13	(z ang. <i>interleukin 13</i>) interleukina 13
IL-23	(z ang. <i>interleukin 23</i>) interleukina 23
IP ₃	(z ang. <i>inositol triphosphate</i>) 1,4,5-trifosforan inozytoli
ISR	(z ang. <i>in-stent restenosis</i>) restenoza w stencie
L LDL	(z ang. <i>low density lipoprotein</i>) lipoproteiny o małej gęstości
LDL-R	(z ang. <i>low-density lipoprotein receptor</i>) receptor lipoprotein o małej gęstości
LFA-1	(z ang. <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>) antygen związany z funkcją limfocytów 1
LOX	(z ang. <i>lipooxygenase</i>) lipoksygenaza
LOX-1	(z ang. <i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>) lektynopodobny receptor utlenionej lipoproteiny o małej gęstości 1
LPS	(z ang. <i>lipopolysaccharide</i>) lipopolisacharyd
M Mac-1	(z ang. <i>macrophage-1 antigen</i>) antygen makrofaga-1
MAO-B	(z ang. <i>monoamine oxidase B</i>) monoaminooksydaza B
MCP-1	(z ang. <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>) białko chemotaktyczne monocytów 1
MCs	(z ang. <i>macrophages</i>) makrofagi
MES	(z ang. <i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>) bufor kwasu 2-(N-morfolino)etanosulfonowego
MHC	(z ang. <i>major histocompatibility complex</i>) układ zgodności tkankowej
MI	(z ang. <i>myocardial infarction</i>) zawał mięśnia sercowego
MLCK	(z ang. <i>myosin light-chain kinase</i>) kinaza lekkich łańcuchów miozyny
MLCP	(z ang. <i>myosin light-chain phosphatase</i>) fosfataza lekkich łańcuchów miozyny
MMP-8	(z ang. <i>matrix metalloproteinase 8</i>) metaloproteinaza macierzy 8
MPO	(z ang. <i>myeloperoxidase</i>) mieloperoksydaza
MSCs	(z ang. <i>mesenchymal stem cells</i>) mezenchymalne komórki macierzyste
MTT	(z ang. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide</i>) bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazolu
N NC	(z ang. <i>negative control</i>) kontrola negatywna

NF- κ B	(z ang. <i>nuclear factor kappa B</i>) jądrowy czynnik transkrypcyjny <i>kappa B</i>
NGS	(z ang. <i>normal goat serum</i>) surowica kozia
NHS	(z ang. <i>N-hydroxysuccinimide</i>) N-hydroksysukcynoimid
NIH	(z ang. <i>neointimal hyperplasia</i>) przerost neointymy
NO	(z ang. <i>nitric oxide</i>) tlenek azotu
NOS-3	(z ang. <i>nitric oxide synthetase 3</i>) syntetaza tlenku azotu 3
NK	(z ang. <i>natural killers</i>) naturalni zabójcy
NKT	(z ang. <i>natural killers</i>) limfocyty T naturalni zabójcy
O OT	(z ang. <i>optical tweezers</i>) pęseta optyczna
oxLDL	(z ang. <i>oxidized low-density lipoprotein</i>) utlenione lipoproteiny o małej gęstości
P PAF	(z ang. <i>platelet-activating factor</i>) czynnik aktywujący płytki
PAI-1	(z ang. <i>plasminogen activator inhibitor 1</i>) inhibitor aktywatora plazminogenu 1
PCI	(z ang. <i>percutaneous coronary intervention</i>) przezskórna interwencja wieńcowa
PDGF	(z ang. <i>platelet-derived growth factor</i>) płytkopochodny czynnik wzrostu
PECAM-1	(z ang. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>) cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonna 1
PBS	(z ang. <i>phosphate-buffered saline</i>) sól fizjologiczna buforowana fosforanem
pDA	(z ang. <i>polydopamine</i>) polidopamina lub powłoka na bazie polidopaminy
pDA_CH	(z ang. <i>polydopamine-and-chitosan-based coating</i>) powłoka na bazie polidopaminy, wzbogacona o chitozan
pDA_IL-4	(z ang. <i>interleukin 4 functionalized polydopamine-based coating</i>) powłoka na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowana interleukiną 4
pDA_IL-10	(z ang. <i>interleukin 10 functionalized polydopamine-based coating</i>) powłoka na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowana interleukiną 10
pDA_CH_IL-4	(z ang. <i>interleukin 4 functionalized polydopamine-and-chitosan-based coating</i>) powłoka na bazie polidopaminy, wzbogacona o chitozan i sfunkcjonalizowana interleukiną 4

pDA_CH_IL-10	(z ang. <i>interleukin 10 functionalized polydopamine-and-chitosan-based coating</i>) powłoka na bazie polidopaminy, wzbogacona o chitozan i sfunkcjonalizowana interleukiną 10
PGI ₂	(z ang. <i>prostaglandin I₂</i>) prostaglandyna I ₂
PLTs	(z ang. <i>platelets</i>) płytki krwi
PTCA	(z ang. <i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i>) przezskórna śród-naczyniowa angioplastyka wieńcowa
PVAT	(z ang. <i>perivascular adipose tissue</i>) okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa
R RBCs	(z ang. <i>red blood cells</i>) czerwone krwinki (erytrocyty)
RCF	(z ang. <i>relative centrifugal force</i>) względna siła odśrodkowa
ROCK	(z ang. <i>Rho-associated protein kinase</i>) kinaza Rho
ROS	(z ang. <i>reactive oxygen species</i>) reaktywne formy tlenu
S SaRe	(z ang. <i>sarcoplasmic reticulum</i>) siateczka sarkoplazmatyczna
SDF-1	(z ang. <i>stromal cell-derived factor-1</i>) czynnik pochodzenia stromalnego 1
SR	(z ang. <i>scavenger receptors</i>) receptory zmiatacze
SR-AI	(z ang. <i>scavenger receptors, class B type I</i>) receptory zmiatacze, klasy A typu I
SR-AII	(z ang. <i>scavenger receptors, class B type I</i>) receptory zmiatacze, klasy A typu II
SR-BI	(z ang. <i>scavenger receptors, class B type I</i>) receptory zmiatacze, klasy B typu I
SS	(z ang. <i>stainless steel</i>) stal nierdzewna
STAT	(z ang. <i>signal transducer and activator of transcription</i>) przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji
sulfo-NHS	(z ang. <i>N-hydroxysulfosuccinimide</i>) N-hydroksysulfosukcynoimid lub sól sodowa N-hydroksysulfosukcynoimidu
T Tc	(z ang. <i>lymphocytes T cytotoxic</i>) limfocyty T cytotoksyczne
TF	(z ang. <i>tissue factor</i>) czynnik tkankowy
TFPI	(z ang. <i>tissue factor pathway inhibitor</i>) inhibitor szlaku czynnika tkankowego
TGF-β	(z ang. <i>transforming growth factor β</i>) transformujący czynnik wzrostu β
Th	(z ang. <i>lymphocytes T helper</i>) limfocyty T pomocnicze

THP-1	(z ang. <i>human acute monocytic leukemia cell line</i>) linia ludzkich komórek ostrej białaczki monocytowej
TJs	(z ang. <i>tight junctions</i>) połączenia zamykające
TLO	(z ang. <i>tertiary lymphatic organs</i>) trzeciorzędowe narządy limfatyczne
TLR	(z ang. <i>toll-like receptor</i>) receptory <i>toll</i> -podobne
TNF- α	(z ang. <i>tumor necrosis factor α</i>) czynnik martwicy nowotworów α
t-PA	(z ang. <i>tissue plasminogen activator</i>) tkankowy aktywator plazminogenu
Treg	(z ang. <i>lymphocytes T regulatory</i>) limfocyty T regulatorowe
TXA ₂	(z ang. <i>thromboxane A₂</i>) tromboksan A ₂
U u-PA	(z ang. <i>urokinase-type plasmin activator</i>) aktywator plazminy typu urokinazy
Up ₄ A	(z ang. <i>uridine adenosine tetraphosphate</i>) tetrafosforan urydynoadenozyny
V VCAM-1	(z ang. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>) cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1 (CD106)
VEGF	(z ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego
VEGFR2	(z ang. <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>) receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu 2
VE-kadheryna	(z ang. <i>vascular endothelial cadherin</i>) kadheryna śródbłonka naczyniowego
VLA-4	(z ang. <i>very late antigen 4</i>) bardzo późny antygen 4
VSMCs	(z ang. <i>vascular smooth muscle cells</i>) komórki mięśni gładkich naczyń
vWF	(z ang. <i>von Willebrand factor</i>) czynnik von Willebranda
W WBCs	(z ang. <i>white blood cells</i>) leukocyty
WSS	(z ang. <i>wall shear stress</i>) naprężenia ścinające
X XO	(z ang. <i>xanthine oxidase</i>) oksydaza ksantynowa

Rozdział 1

Wstęp

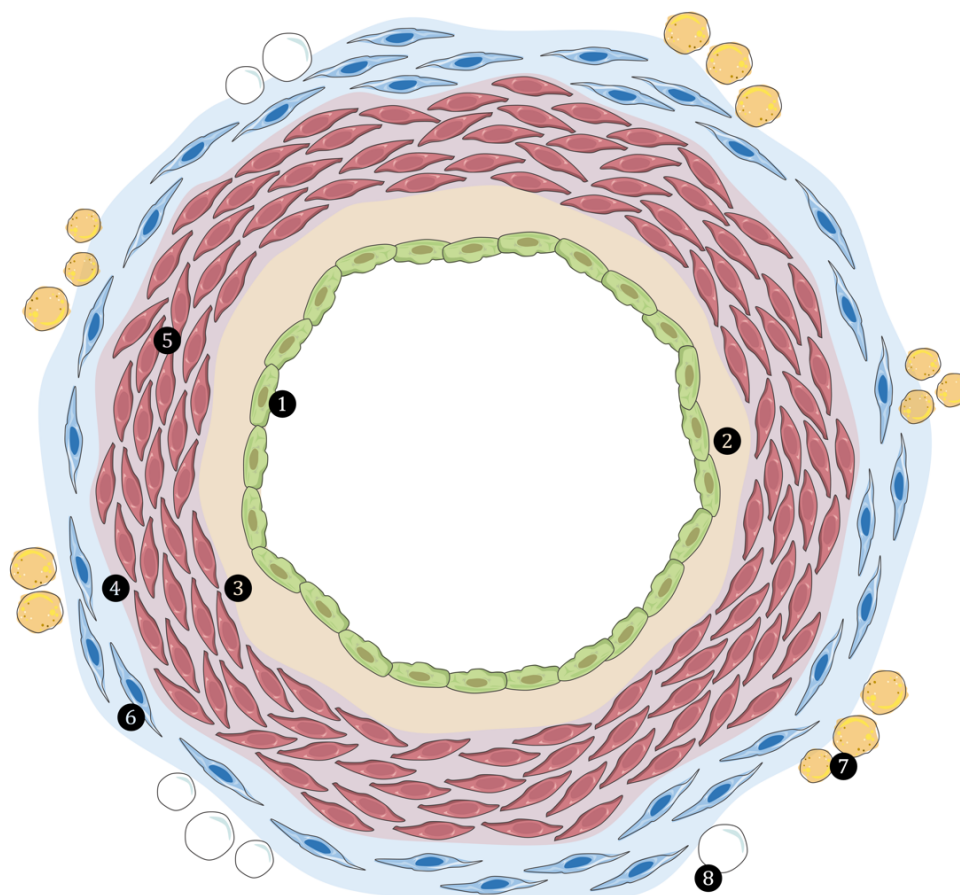
1.1 Patomechanizm miażdżycy

Miażdżycą (z ang. *atherosclerosis*) określamy stan przewlekłe utrzymującego się aktywnego procesu zapalnego w obrębie ścian tętnic, co prowadzi do ich pogrubienia i utraty elastyczności. Szczególnie niebezpieczny jest stan, w którym proces ten obejmuje tętnice wieńcowe (CAs, z ang. *coronary arteries*), a określane jest mianem choroby wieńcowej (CHD, z ang. *coronary heart disease*). Zmiany miażdżycowe przyczyniają się do zaburzenia zarówno struktury, jak i funkcji każdej, z trzech warstw budujących ścianę CA. Wynikająca z progresji choroby niewydolność krążenia wieńcowego może powodować niedokrwienie mięśnia sercowego, co w rezultacie może doprowadzić do ostrej choroby niedokrwiennej i zgonu (Looser, Kim, and Feldman 2016; Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020).

Ściana CA składa się z trzech warstw: położonej od światła naczynia błony wewnętrznej (tzw. *tunica intima*), błony środkowej (tzw. *tunica media*) oraz błony zewnętrznej, in. przydanki (tzw. *tunica externa*, in. *adventitia*) – patrz Rys. 1. Całość otacza okolonaczyniowa tkanka tłuszczowa (PVAT, z ang. *perivascular adipose tissue*) (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020). Każda z wymienionych trzech warstw odgrywa szczególną rolę w utrzymaniu prawidłowej funkcji CA, a zaburzenie na poziomie molekularnym czy komórkowym któregośkolwiek elementu strukturalnego naczynia stanowi czynnik sprzyjający rozwojowi i progresji zmian chorobowych w obrębie tętnicy.

Błonę wewnętrzną naczynia stanowi warstwa podłużnie zorientowanych komórek śródbłonka (ECs, z ang. *endothelial cells*). Pokrywają one ubogokomórkową warstwę tkanki łącznej. Z kolei blaszka wewnętrzna (IEL, z ang. *internal elastic lamina*), zbudowana z włókien elastycznych, stanowi strukturę graniczną, oddzielając *tunica interna* od *tunica media* (Milutinović,

Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020). Występujące w błonie wewnętrznej ECs odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu właściwej funkcji CA.



Rys. 1 Schematyczne przedstawienie warstwowej budowy tętnicy wieńcowej (CA, z ang. *coronary artery*). Błonę wewnętrzną naczynia (tzw. *tunica intima*) tworzą komórki śródbłonka (ECs, z ang. *endothelial cells*) 1, które pokrywają podśródbłonkową macierz pozakomórkową (ECM, z ang. *extracellular matrix*) 2. Błona środkowa (tzw. *tunica media*) rozciąga się między blaszką wewnętrzną (IEL, z ang. *internal elastic lamina*) 3, a blaszką zewnętrzną (EEL, z ang. *external elastic lamina*) 4. Występują tu licznie komórki mięśni gładkich naczyń (VSMCs, z ang. *vascular smooth muscle cells*) 5. Głównymi komórkami błony zewnętrznej, in. przydanki (tzw. *tunica externa*, in. *adventitia*) są fibroblasty 6. Najbardziej zewnętrzną warstwą naczynia jest okolonaczyniowa tkanka tłuszczowa (PVAT, z ang. *perivascular adipose tissue*), utworzona z nieodróżnicowanych ostatecznie adipocytów 7. Rezydują tutaj również leukocyty (WBCs, z ang. *white blood cells*) 8. Schemat autorski.

ECs wydzielają liczne substancje bioaktywne, które modulują napięcie naczyń – ich relaksację (in. rozluźnienie) lub konstrykcję (in. skurcz). Tlenek azotu (NO, z ang. *nitric oxide*), prostaglandyna I₂ (PGI₂, z ang. *prostaglandin I₂*) czy śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF, z ang. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) uznaje się za jedne z ważniejszych śródbłonkowych czynników relaksacyjnych (EDRFs, z ang. *endothelium-derived relaxing factors*). Endotelinę 1 (ET-1, z ang. *endothelin 1*), tromboksan A2 (TXA2, z ang. *thromboxane A2*), angiotensynę II (Ang II, z ang. *angiotensin II*) czy tetrafosforan urydynoadenozyny (Up₄A, z ang. *uridine adenosine tetraphosphate*) należy z kolei wymienić w kontekście śródbłonkowych czynników konstrykcyjnych (EDCFs, z ang. *endothelium-derived contracting factors*). Właściwa produkcja przez ECs, odpowiednich do sytuacji cząsteczek wazoaktywnych, zapewnia regulację

ogólnoustrojowego przepływu krwi i perfuzji tkanek poprzez zmianę średnicy i napięcia naczyń (Matsumoto, Tostes, and Webb 2011; D. Wang et al. 2017).

ECs stanowią naturalną barierę. Funkcja barierowa śródbłonka ściśle powiązana jest z integralnością jego struktury, która to podlega nieustannym zmianom w odpowiedzi na działające siły fizyczne lub sygnały biologiczne. Zmiany te zachodzą zarówno w:

- (1) połączeniach komórka-komórka, w tym w połączeniach zamykających (TJs, z ang. *tight junctions*) (okludyny, kładyny), w połączeniach przylegających (AJs, z ang. *adherens junctions*) (kadheryny, nektyny), w pozostałych białkach peryferyjnych (białka strefy zamykającej, kateniny), a także w cząsteczce adhezji komórkowej płytek i śródbłonka 1 (PECAM-1, z ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule*) (Cerutti and Ridley 2017),
- (2) połączeniach komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, z ang. *extracellular matrix*) i błony podstawnej – w tym głównie w integrinach (Pulous and Petrich 2019),
- (3) obrębie samego cytoszkieletu komórek (Dugina et al. 2021).

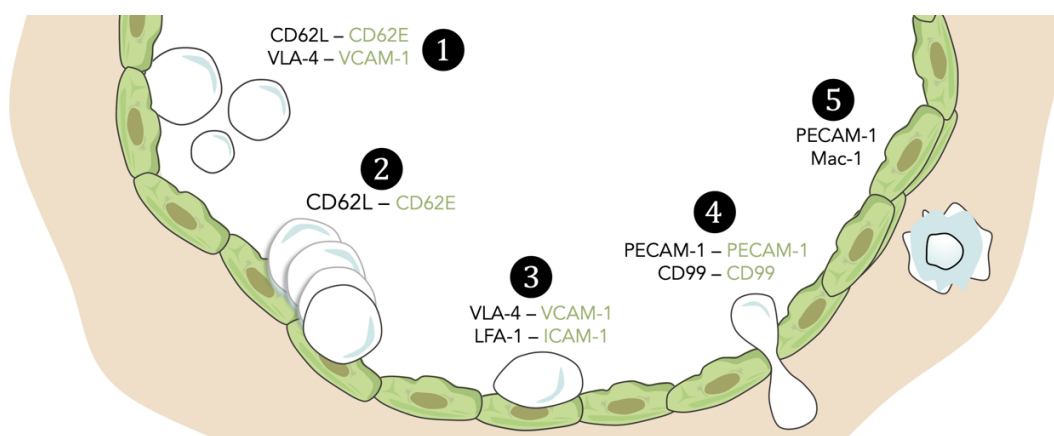
Są to złożone interakcje, mediowane sygnałami biologicznymi. Odpowiednie funkcjonowanie i regulacja tych struktur selektywnie kontroluje ruch płynu, jonów i innych makrocząsteczek między krwią a otaczającymi tkankami, jednocześnie zapobiegając przedostawaniu się substancji szkodliwych (S. Y. Yuan and Rigor 2010). Znaczną rolę w powstawaniu i progresji wielu chorób upatruje się we wzroście przepuszczalności naczyń mikrokrążenia (Khire et al. 2020; Wautier and Wautier 2022).

Przepływająca krew działa na CA siłą styczną do jej ściany, generując naprężenia ściągające (WSS, z ang. *wall shear stress*) (Fernandes et al. 2018; Paszkowiak and Dardik 2003). Wzorzec przepływu krwi w CA ściśle uzależniony jest od jej anatomicznego zróżnicowania, a wyścielające naczynie ECs odbierają zależne od przepływu krwi zmiany WSS, generując do nich adekwatną odpowiedź. ECs rozwinęły liczne cząsteczki czujnikowe (in. mechanosensory, mechanoreceptory), pośredniczące w przekazywaniu (in. mechanotransdukcji) sygnałów fizycznych (Fernandes et al. 2018). Za odbiór zmian WSS odpowiadają (D. A. Chistiakov, Orekhov, and Bobryshev 2017):

- (1) okludyny, wchodzące w skład TJs,
- (2) kompleks mechanosensoryczny, zbudowany z PECAM-1, kadheryny śródbłonka naczyniowego (VE-kadheryna, z ang. *vascular endothelial cadherin*) oraz receptora naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu 2 (VEGFR2, z ang. *vascular endothelial growth factor receptor 2*),
- (3) integryny, wchodzące w skład ognisk adhezyjnych (FA, z ang. *focal adhesions*),
- (4) glikokaliks,

(5) kanały jonowe.

Sily hemodynamiczne istotnie wpływają na ekspresję genów ECs, co z kolei indukuje w nich zmiany funkcjonalne. Właściwy dla zdrowych naczyń jednokierunkowy przepływ laminarny o wysokich wartościach WSS aktywuje mechanosensoryczne sieci sygnalizacyjne, które wspierają spoczynkowy fenotyp ECs. Natomiast zaburzony przepływ krwi o niskich WSS stymuluje stan zapalny i stres oksydacyjny w ECs, utratę ich przeciwzakrzepowych właściwości, nadmierną i niekontrolowaną proliferację, migrację, autofagię oraz apoptozę, zwiększoną adhezję komórek układu odpornościowego, a także destabilizację funkcji barierowej. Cechy te, nabywane przez ECs w obszarach zaburzonego przepływu, sprzyjają powstawaniu zmian miażdżycowych i sprzyjają aterogenezie (D. A. Chistiakov, Orekhov, and Bobryshev 2017). Odpowiedniej, zależnej od WSS, modyfikacji podlegają także mechanizmy epigenetyczne (Dunn et al. 2015; Karthika et al. 2021).



Rys. 2 Przedstawienie interakcji międzykomórkowych ECs i WBCs, skutkujących wynaczynieniem WBCs i ich migracją do tkanek sąsiadujących. Uwzględniono molekuly pośredniczące w każdym z etapów tej interaktywności międzykomórkowej – odpowiednio selektyna L (CD62L) oraz selektyna E (CD62E), integryna bardzo późny antygen 4 (VLA-4, z ang. *very late antigen 4*) oraz cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1 (VCAM-1, z ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) (CD106), antygen związany z funkcją limfocytów 1 (LFA-1 z ang. *lymphocyte function-associated antigen 1*) oraz cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1, z ang. *intercellular adhesion molecule 1*) (CD54), a także cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonna 1 (PECAM-1, z ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule*), CD99 oraz antygen makrofaga-1 (Mac-1, z ang. *macrophage-1 antigen*). Przedstawiony proces rozpoczyna się od przylegania ❶, z następczym rolowaniem WBCs po aktywowanej powierzchni ECs ❷. Następnie dochodzi do stabilnej adhezji ❸ i diapedezy parakomórkowej ❹. Migracja WBCs w obrębie ECM ❺ stanowi ostatni etap, w którym to WBCs osiągają docelowe miejsce w obrębie aktywowanych zapalnie tkanek. Schemat autorski.

Należy wspomnieć również, że śródbłonkową barierę charakteryzują złożone interakcje z komórkami układu odpornościowego w odpowiedzi na uszkodzenia i infekcje (Yau, Teoh, and Verma 2015). Leukocyty (WBCs, z ang. *white blood cells*) oddziałują z ECs wieloetapowo – patrz Rys. 2. Początkowo obserwowane jest rolowanie, podczas którego WBCs przetaczają się po aktywowanej powierzchni ECs do momentu osiągnięcia stadium stabilnej adhezji. Wynaczynienie, czyli właściwe przejście komórek z łożyska naczyniowego do tkanek sąsiadujących (in. diapedeza), jest ostatnim etapem tej interaktywności. W opisanej, złożonej

migracji WBCs pośredniczą różne cytokiny, takie jak interleukina 1β (IL- 1β , z ang. *interleukin 1\beta*), czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α , z ang. *tumor necrosis factor α*) czy interferon γ (IFN- γ , z ang. *interferon γ*). Lokalny wzrost wskazanych, wolnych mediatorów stanu zapalnego stymuluje ECs. Aktywowane zapalnie ECs nasilają ekspresją wybranych, powierzchniowo bądź przezblonowo związanych molekuł, w tym cząsteczek adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1, z ang. *intercellular adhesion molecule 1*) (CD54), cząsteczek adhezji komórkowej naczyń 1 (VCAM-1, z ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) (CD106) czy selektyn E (CD62E). ICAM-1 wiąże się z integryną zwaną antygenem związanym z funkcją limfocytów 1 (LFA-1 z ang. *lymphocyte function-associated antigen 1*). Integryna bardzo późny antygen 4 (VLA-4, z ang. *very late antigen 4*) jest z kolei ligandem dla VCAM-1. Selektyna E śródbłonka ma powinowactwo do selektyny L (CD62L). Wspomniane molekuly obecne są na WBCs, a odpowiednie ich zmiany konformacyjne indukowane przez czynniki chemotaktyczne, zapewniają wiązanie leukocytów z aktywowanym śródbłonkiem. Diapedeza parakomórkowa obejmuje sekwencyjne, homofilne oddziaływania z udziałem kolejnych cząsteczek, w tym PECAM-1 oraz CD99. Niezbędnym etapem jest rozluźnienie AJs za pośrednictwem VE-kadheryny. Ostatecznie WBCs przechodzą przez substancję pozakomórkową w sposób zależny od PECAM-1 oraz antygeny makrofaga-1 (Mac-1, z ang. *macrophage-1 antigen*), co kończy proces ich migracji do miejsc zapalnych (Filippi 2016; Muller 2002).

Z uwagi na fakt, że ECs znajdują się na styku krwi z otaczającymi tkankami, śródbłonek pełni także znamienne rolę w układzie hemostatycznym poprzez koordynowanie zdarzeń pro- i przeciwzakrzepowych, zależnie od specyficznych potrzeb tkanek. Nienaruszone i zdrowe komórki śródbłonka wydzielają liczne środki przeciwplatetkowe i przeciwzakrzepowe, mające zapobiegać odpowiednio agregacji płytek krwi i tworzeniu fibryny. Są to wspomniane już NO oraz PGI₂, jak i inhibitor szlaku czynnika tkankowego (TFPI, z ang. *tissue factor pathway inhibitor*), trombomodulina, śródbłonkowy receptor białka C (EPCR, z ang. *endothelial cell protein C receptor*), heparyna bądź cząsteczki heparynopodobne. Dodatkowo ECs wydzielają ektonukleotydazę NTPDazę1/CD39, rozkładającą adenozyno-5'-trifosforan (ATP, z ang. *adenosine-5'-triphosphate*) do adenozyno-5'-monofosforanu (AMP, z ang. *adenosine-5'-monophosphate*), czyli rozkładającą czynnik aktywujący płytki (Morello et al. 2021). Uszkodzone ECs z kolei wydzielają czynniki sprzyjające tworzeniu włókniaka oraz promujące adhezję i agregację płytek krwi (PLTs, z ang. *platelets*). Wskazać tu należy czynnik tkankowy (TF, z ang. *tissue factor*), czynnik von Willebranda (vWF, z ang. *von Willebrand factor*), selektynę P, angiopoetynę 2, tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA, z ang. *tissue plasminogen activator*) czy wyżej wspomniana ET-1. Dodatkowo, śródbłonek może uwalniać czynniki profibrynolityczne inicjujące fibrynolizę — t-PA,

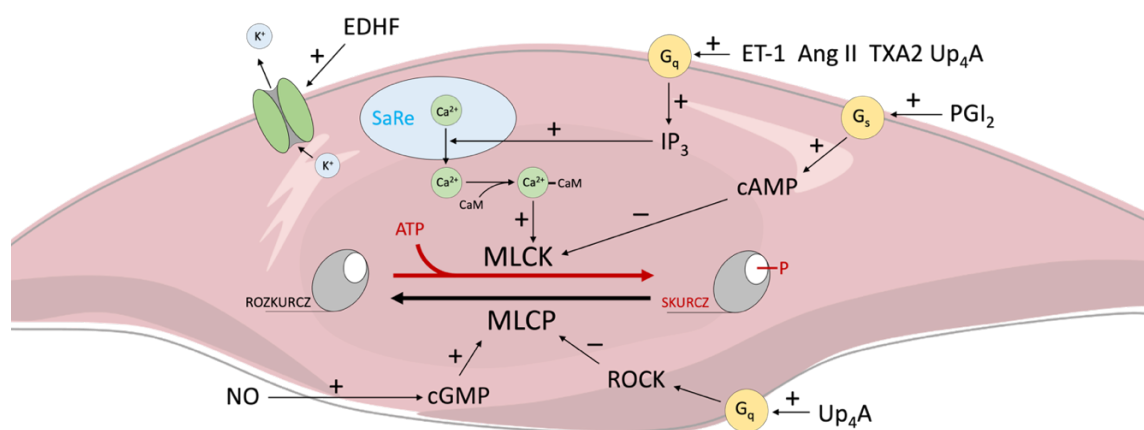
aktywator plazminy typu urokinazy (u-PA, z ang. *urokinase-type plasmin activator*) czy metaloproteinaza ADAMTS13 — degradując powstały uprzednio skrzep (Yau, Teoh, and Verma 2015). Zatem funkcjonalny śródbłonek jest elementem niezbędnym, aby utrzymać hemostazę i zapobiegać zakrzepicy.

Na koniec nie sposób nie wspomnieć o procesie tworzenia naczyń, w którym to, dzięki zachodzącym zmianom fenotypowym ECs, komórki te pełnią kluczowe role w fizjologicznych (m.in. gojenie ran) jak i patofizjologicznych (m.in. nowotwory) zjawiskach. Ten złożony sekwencyjnie proces mediują liczne sygnały genetyczne i molekularne, z których jednym z silniej napędzających inicjację angiogenezy jest czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF, z ang. *vascular endothelial growth factor*), oddziałujący z receptorem obecnym na ECs – VEGFR-2. To właśnie komórka śródbłonka najbardziej wrażliwa na VEGF, charakteryzująca się zatem wyższą ekspresją VEGFR-2, w porównaniu z komórkami sąsiadującymi, staje się wektorem angiogenezy. Następuje rozszerzenie dotychczas istniejącego naczynia, degradacja błony podstawnej, migracja ECs, ich chemotaksja i ostateczna proliferacja. Kończąc proces angiogenezy, ECs dostosowują się do niemigrującego i spoczynkowego fenotypu, organizując się w ciągłą monowarstwę i dojrzewają do właściwego naczyniom włosowatym śródbłonka (Krüger-Genge et al. 2019).

Pod warstwą utworzoną z ECs znajduje się ubogokomórkowa warstwa tkanki łącznej, bogata we włókna elastyczne i proteoglikany – patrz Rys. 1. Elementem komórkowym tej warstwy są nieliczne komórki mięśni gładkich naczyń (VSMCs, z ang. *vascular smooth muscle cells*). VSMCs są zorientowane wzdłużnie do osi naczynia w kilku warstwach. Cechuje je stabilny fenotyp i niski wskaźnik proliferacji (M. Liu and Gomez 2019; Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020).

W błonie środkowej CA, w przeciwieństwie do błony wewnętrznej, VSMCs występują licznie, ułożone są obwodowo lub spiralnie w wielu warstwach – patrz Rys. 1. Komórki te osadzone są w ECM, złożonej z włókien elastycznych, kolagenu i proteoglikanów, jednocześnie są zdolne do syntezy tych elementów budulcowych ECM (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020). Z reguły są one jedynymi komórkami obecnymi w błonie środkowej, które charakteryzuje stabilny fenotyp kurczliwy, z silną ekspresją białek kurczliwych – α -aktyna mięśni gładkich (α -SMA, z ang. *smooth muscle a actin*), białko SM-22 α , łańcuch ciężki miozyny SM-1 i SM-2, kalponina, smoothelina (Durham et al. 2018). VSMCs są komórkami wykonawczymi, zmieniającymi średnicę i napięcie naczynia (poprzez skurcz i rozkurcz), w odpowiedzi na czynniki wazoaktywne produkowane przez ECs (patrz wyżej). Dochodzi do tego na drodze licznych, zróżnicowanych mechanizmów.

NO wywołuje rozkurcz VSMCs CA poprzez aktywację cyklicznej guanylowej w VSMCs i nasilenie produkcji cyklicznego guanozyno-3',5'-monofosforanu (cGMP, z ang. *cyclic guanosine monophosphate*) – czynnika obniżającego wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia i aktywującego fosfatazę lekkich łańcuchów miozyny (MLCP, z ang. *myosin light-chain phosphatase*). Defosforylacja miozyny uniemożliwia formowanie mostków z aktyną, zapobiegając skurczowi VSMCs (Golshiri et al. 2020; Gorabi et al. 2019). PGI₂ z kolei poprzez pobudzenie receptora sprzężonego z białkiem G podnosi wewnątrzkomórkowe stężenie cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP, z ang. *cyclic adenosine monophosphate*) w VSMCs, który następnie hamuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny (MLCK, z ang. *myosin light-chain kinase*), kluczowego enzymu zapewniającego funkcjonalny skurcz mięśni gładkich (Golshiri et al. 2020; Jia, Durante, and Sowers 2016). Natomiast EDHF poprzez aktywację odpowiednich kanałów jonowych, inicjuje hiperpolaryzację VSMCs, co skutkuje relaksacją mięśni gładkich (Jia, Durante, and Sowers 2016) – patrz Rys. 3.



Rys. 3 Molekularne mechanizmy skurczu i rozkurczu (omówione w tekście) VSMCs w odpowiedzi na czynniki wazoaktywne produkowane przez ECs – tlenek azotu (NO, z ang. *nitric oxide*), prostaglandyna I₂ (PGI₂, z ang. *prostaglandin I₂*), śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF, z ang. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*), endotelina 1 (ET-1, z ang. *endothelin 1*), tromboksan A2 (TXA2, z ang. *thromboxane A2*), angiotensyna II (Ang II, z ang. *angiotensin II*), tetrafosforan urydynoadenozy (Up₄A, z ang. *uridine adenosine tetraphosphate*). Dodatkowe oznaczenia: kalmodulina (CaM, z ang. *calmodulin*), cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan (cAMP, z ang. *cyclic adenosine monophosphate*), cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan (cGMP, z ang. *cyclic guanosine monophosphate*), 1,4,5-trifosforan inozytolu (IP₃, z ang. *inositol triphosphate*), fosfataza lekkich łańcuchów miozyny (MLCP, z ang. *myosin light-chain phosphatase*), kinaza lekkich łańcuchów miozyny (MLCK, z ang. *myosin light-chain kinase*), kinaza Rho (ROCK, z ang. *Rho-associated protein kinase*), siateczka sarkoplazmatyczna (SaRe, z ang. *sarcoplasmic reticulum*). Schemat autorski.

Skurcz VSMCs możliwy jest poprzez wzrost stężenia jonów wapnia we wnętrzu komórki na skutek jego napływu z zewnątrz bądź uwolnienia z siateczki sarkoplazmatycznej. Jony wapnia po związaniu z kalmoduliną (CaM, z ang. *calmodulin*) aktywują MLCK, która umożliwia interakcję miozyny z filamentami aktynowymi, a w rezultacie skurcz. ET-1 mediuje uwalnianie wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej (SaRe, z ang. *sarcoplasmic reticulum*) za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkiem G i 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP₃, z ang. *inositol*

triphosphate) (Calderón-Sánchez et al. 2020; Genovesi et al. 2022; Kostov and Kim 2021), podobnie do Ang II (St. Paul et al. 2020). TXA₂, poza opisaną powyżej aktywnością poprzez receptor związany z białkiem G wobec VSMCs, wykazuje działania na PLTs – odpowiada za ich aktywację, degranulację, zmianę kształtu i agregację. Wymieniony powyżej Up₄A poza wwoływaniem skurczu VSMCs zależnego od wapnia, wykazuje działanie od wapnia niezależne – aktywuje kinazę Rho (ROCK, z ang. *Rho-associated protein kinase*), która hamuje MLCP, co jak zostało już omówione, skutkuje skurczem (Matsumoto et al. 2015; Z. Zhou et al. 2019) – patrz Rys. 3.

VSMCs w normalnych warunkach mają niski wskaźnik proliferacji. W pewnych okolicznościach obserwowana jest utrata fenotypu kurczliwego VSMCs, skutkująca regulacją w dół białek kurczliwych, zwiększeniem proliferacji oraz udziałem w przebudowie ECM celem ułatwienia swojej migracji. Po ustąpieniu miejscowego bodźca stymulującego przemianę fenotypową VSMCs, komórki te mogą powrócić do swojego stacjonarnego stanu kurczliwego (M. Liu and Gomez 2019; Milutinović, Šuput, and Zorc-Plesković 2020).

VSMCs obecne w *tunica media* zdolne są do silnych odpowiedzi na bodźce pro- jak i przeciwzapalne, kształtując przy tym odpowiedź immunologiczną naczyń. Ewentualna reakcja zapalna zachodząca w CA, obejmuje błonę wewnętrzną oraz zewnętrzną, oszczędzając jednocześnie przed swoimi konsekwencjami błonę środkową. Toteż, nacieki z komórek jednojądrzastych (takich jak makrofagi lub limfocyty T) preferencyjnie gromadzą się w *tunica intima* i *adventita*. Brak ich jest w *tunica media*. Stanowi to podłoże uprzywilejowaniu immunologicznemu, realizowanemu w czynnych i biernych mechanizmach. Do mechanizmów biernych zaliczyć można obecność IEL i blaszki zewnętrznej (EEL, z ang. *external elastic lamina*), stanowiących barierę mechaniczną dla napływających WBCs oraz brak naczyń limfatycznych i krwionośnych, co z kolei zapobiega aferentnym i eferentnym zjawiskom immunologicznym. Aktywne mechanizmy obejmują indukcję syntezy 2,3-dioksygenazy indoloaminy (IDO, z ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*) czy transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β , z ang. *transforming growth factor β*) w odpowiedzi na INF- γ wydzielany przez komórki zapalne w błonie wewnętrznej i przydancer, co moduluje funkcję limfocytów T. W tym procesie może nastąpić generowanie miażdżycowo-ochronnych regulatorowych limfocytów T (Treg, z ang. *lymphocytes T regulatory*). VSMCs cechuje również niska ekspresję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC, z ang. *major histocompatibility complex*) klasy II. Niepowodzenie w realizacji uprzywilejowania immunologicznego błony środkowej objawia się intensywnym naciekiem WBCs, uszkodzeniem i utratą VSMCs oraz zniszczeniem architektury ECM, co może być

obserwowane w zaawansowanych zmianach miażdżycowych (Tellides and Pober 2015; Zorc-Pleskovič et al. 2018).

Granicę *tunica media* stanowi EEL, oddzielająca ją od przydanki. Błona ta jest znacznie cieńsza od IEL, a zbudowana jest z przerywanych warstw elastyny. Fenestracje EEL umożliwiają przenikanie neuroprzekaźników uwalnianych z przylegających do blaszki niezmielinizowanych aksonów. Zapewnia to inicjację depolaryzacji VSMCs, która propaguje przez niskooporowe połączenia szczelinowe. W ten sposób dokonuje się neurogenna regulacja średnicy naczynia i przepływu krwi (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020).

Przydanka jako najbardziej zewnętrzna warstwa budująca CA, zbudowana jest z tkanki łącznej, w tym z włókien kolagenowych i elastycznych. Obecne są również naczynia naczyń (tzw. *vasa vasorum*), nerwy adrenergiczne i naczynia limfatyczne. Głównymi komórkami tkanki łącznej przydanki są fibroblasty, które w odpowiedzi na uraz lub stres, proliferują, różnicują się w miofibroblasty, a następnie migrują do *tunica intima*. Tam wydzielają czynniki stymulujące ECs i VSMCs do wzrostu, jednocześnie koordynują rekrutację do ściany naczynia komórek zapalnych i progenitorowych (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020).

Ostatnią, ważną strukturą współtworzącą CA jest okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa. PVAT tworzą niezróżnicowane ostatecznie adipocyty, pełniące wiele znamienych funkcji lub współuczestniczące w różnych procesach biologicznych (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020). Co ciekawe, wykazano, że powstające w czasie chorób naczyniowych nacieki z komórek zapalnych w obrębie *adventita*, tworzą możliwe do klasyfikacji trzeciorzędowe narządy limfatyczne (TLO, z ang. *tertiary lymphatic organs*), a te — w przypadku miażdżycy — ściśle korelują z wielkością blaszki miażdżycowej, a także z jej niestabilnością i podatnością na pęknięcie (Akhavanpoor et al. 2018). Dodatkowo można powiązać typ komórek zapalnych w przydancie z prawdopodobieństwem rozwoju i dynamiką progresji miażdżycy. Obecność limfocytów T pomocniczych (Th, z ang. *lymphocytes T helper*) 1, komórek naturalnych zabójców (NK, z ang. *natural killers*) i limfocytów B wykazuje działanie promiażdżycowe, natomiast Th2, Th17, Treg i B1 przeciwmiażdżycowe (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020) – patrz dalej. Zauważyć zatem należy, że nawet najbardziej zewnętrzne warstwy CA zawierają i przekazują informację o lokalnym statusie chorobowym naczynia.

Inicjacja progresji miażdżycy CA ściśle wiąże się z uszkodzonym śródbłonkiem, który to — jak udowodniono powyżej — pełni wiele kluczowych ról, zapewniając prawidłową funkcję naczynia. Dysfunkcjonalność ECs może być wynikiem odpowiedzi na uraz oraz odpowiedzi na retencję. Są to dwie hipotezy, aktualnie rozpatrywane, celem wyjaśnienia patomechanizmu choroby naczyniowej. Pierwsza hipoteza zakłada, że uszkodzenie mechaniczne lub

toksyczne prowadzi do dysfunkcji ECs. Hipoteza ta zostanie rozwinięta w dalszej części niniejszej rozprawy (patrz 1.3.1 Patomechanizm restenozy w stencie). W drugiej, za pierwotne zdarzenie prowadzące do niewydolności ECs jest wiązanie, retencja i odkładanie lipoprotein o małej gęstości (LDL, z ang. *low-density lipoprotein*) w podśródbłonkowej ECM, co zachodzi w odpowiedzi na bodźce predysponujące (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020).

Teoria urazu lub retencji może jednak nie dotyczyć śródbłonka CA *sensu stricto* – może obejmować ECs wyściełające *vasa vasorum* CA. Naczynia te powstają w procesie neowaskularyzacji ściany CA. Posiadają one ECs o dużej przepuszczalności dla lipoprotein i komórek zapalnych, które mogą wnikać, a następnie gromadzić się w głębszych regionach błony wewnętrznej. W przypadku ich przerwania lub zamknięcia może nastąpić niedokrwienie ściany naczyń macierzystego. Takie podejście sugeruje, że miażdżycza może być chorobą mikrokrążenia, a nie dużych naczyń (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020).

LDL stanowią jedne z kluczowych cząsteczek przenoszących cholesterol we krwi (Catar et al. 2022). Krążące LDL są wychwytywane klasycznie w endocytozie mediowanej receptorem lipoprotein o małej gęstości (LDL-R, z ang. *low-density lipoprotein receptor*) oraz zależnie od innych, niekonwencjonalnych receptorów (Abumrad et al. 2021; Mineo 2020). Uzyskany za pośrednictwem endocytozy LDL następnie jest transportowany do układu endolizosomalnego, gdzie po degradacji wykorzystywany jest w procesach metabolicznych, w tym też do utrzymania integralności błony komórkowej (Catar et al. 2022). Niemniej jednak internalizacja LDL zależna od LDL-R nie wyjaśnia, obserwowanej na wczesnym etapie aterogenezy, retencji i sekwestracji LDL w błonie wewnętrznej. W proces ten zaangażowana jest przezśródbłonkowa transcytoza, niezależna od LDL-R, wymagająca obecności kaweoli. Kaweole stanowią wyspecjalizowane subdomeny wierzchołkowej błony komórkowej, które odrywają się jako pęcherzyki, przenosząc swoją zawartość do błony podstawno-bocznej, łącząc się z nią, jednocześnie uwalniając swoją zawartość. Pokrywają one znaczną część luminalnej części błony plazmatycznej ECs, a ponadto wyposażone są w kompletny zestaw białek — od zewnątrzkomórkowych receptorów do wewnątrzkomórkowych przekaźników sygnału — zaangażowanych w liczne procesy komórkowe. Wypełnienie pęcherzyków zależne jest od receptorów zmiataczy, klasy B typu I (SR-BI, z ang. *scavenger receptors, class B type I*) oraz kinazy typu 1 podobnej do receptora aktywiny (ALK1, z ang. *activin receptor-like kinase 1*). Transcytoza stanowi zatem kluczowy proces, który umożliwia infiltrację LDL do przestrzeni podśródbłonkowej (Ghaffari et al. 2021; Luchetti et al. 2021; Y. Zhang et al. 2014).

Co więcej, krążące we krwi cząsteczki LDL przechodzą szereg następujących po sobie modyfikacji, w tym za pierwotną uznawana jest desialilacja. Skutkuje ona zmianą w składzie

LDL, zmniejszeniem wielkości cząsteczki, wzrostem jej gęstości, nabyciem ładunku ujemnego, zmniejszeniem zawartości α -tokoferolu oraz zyskaniem cech wysoce immunogennych. Tak zmienione cząsteczki LDL dodatkowo cechują się mniejszym powinowactwem do swoistego receptora, co wydłuża czas ich krążenia we krwi, a zatem zwiększa się prawdopodobieństwo zajścia dodatkowych, aterogennych modyfikacji (w tym glikacji). Poddany licznym modyfikacją LDL jest skłonny do spontanicznej agregacji i tworzenia kompleksów (in. samoasocjatyw). Zwiększa się podatność LDL na procesy utleniania. Do opisanych powyżej nieenzymatycznych modyfikacji LDL, dochodzą te, zachodzące przy udziale enzymów (jak esteraza cholesterolowa, sfingomielinaza, wydzielnicza fosfolipaza A2, metaloproteiny macierzy, katepsyny i in.), których na późniejszych etapach rozwoju blaszki miażdżycowej, obserwowana jest hiperaktywność. Głównym aterogennym efektem nieenzymatycznych i enzymatycznych modyfikacji jest wywołanie agregacji i fuzji LDL, co sprzyja retencji podśródbłonkowej tej cząsteczki (Alboaklah and Leake 2020; Summerhill et al. 2019).

Jednocześnie z dyslipidemią współwystępowanie innych czynników ryzyka (w tym hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze, otyłość, palenie tytoniu, insulinooporność i in.) pozytywnie koreluje z transcytozą LDL (Jiang et al. 2022; Mundi et al. 2018; X. Zhang and Fernández-Hernando 2020) oraz z omówionymi nieenzymatycznymi i enzymatycznymi modyfikacjami cząsteczek LDL (Summerhill et al. 2019). Gromadzeniu i zatrzymywaniu LDL w błonie wewnętrznej również sprzyjają silne oddziaływania między zmodyfikowanymi cząsteczkami LDL a składnikami ECM (takimi jak kolagen, elastyna, proteoglikany) (H. Kang et al. 2019; Summerhill et al. 2019). Zwiększony obrót komórkowy powoduje pogrubienie błony podstawnej ECs, nasilając to zjawisko (Sesorova et al. 2022).

Uwięzione w podśródbłonkowej przestrzeni cząsteczki LDL ulegają modyfikacji oksydacyjnej za pośrednictwem licznych mechanizmów – powstają utlenione lipoproteiny o małej gęstości (oxLDL, z ang. *oxidized low-density lipoprotein*). Proces utleniania LDL mediuje reaktywne formy tlenu (ROS, z ang. *reactive oxygen species*) powstające przy udziale wewnątrzkomórkowych enzymów — takich jak oksydaza zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, lipoksygenaza (LOX, z ang. *lipooxygenase*), oksydaza ksantynowa (XO, z ang. *xanthine oxidase*), mieloperoksydaza (MPO, z ang. *myeloperoxidase*), niesprzężona śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (eNOS, z ang. *endothelial nitric oxide synthase*) — bądź wytwarzane przez pozakomórkowe katalizatory metalowe (Higashi 2022; Jiang et al. 2022; Luchetti et al. 2021). Cząsteczki oxLDL są wychwytywane przez ECs za pośrednictwem lektynopodobnego receptora utlenionej lipoproteiny o małej gęstości 1 (LOX-1, z ang. *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*), które wywołują liczne procesy komórkowe promujące proces aterogenny.

Spośród ważniejszych należy wskazać wyrażenie na powierzchni ECs cząsteczek adhezyjnych (m.in. ICAM-1, VCAM-1, białko chemotaktyczne monocytów 1 – MCP-1, z ang. *monocyte chemoattractant protein 1* czy selektyna E). LOX-1 po przyłączeniu oxLDL dodatkowo wywołuje dysfunkcję eNOS z obniżeniem stężenia NO, przejście ECs w komórki mezenchymalne, co wiąże się z nadmierną ich proliferacją, migracją i syntezą macierzy pozakomórkowej, ich starzenie (z ang. *senescence*), indukcję procesów prowadzących do śmierci komórkowej, utratę integralności bariery śródbłonka czy modyfikacje epigenetyczne (Catar et al. 2022; Poznyak et al. 2021). Nieszczelne połączenia międzykomórkowe wynikające z obumierania lub nadmiernej proliferacji stanowią kolejną drogę, którą LDL wnika w strukturę ściany naczynia (Cancel and Tarbell 2010) – patrz Rys. 4.

Opisane powyżej procesy definiują dysfunkcjonalność ECs zgodnie z hipotezą odpowiedzi na retencję. Proces podśródbłonkowej akumulacji i sekwestracji LDL w błonie wewnętrznej napędza się samoistnie, w typie błędnego koła, generując postępujące, paralelne procesy molekularne i komórkowe. Warto jeszcze wspomnieć, że wskazane pierwotne zmiany najczęściej lokalizują się w obrębie rejonów podatnych na miażdżycę (głównie krzywizn naczyń i ich rozgałęzień), o nierównomiernym i nieregularnym przepływie krwi i wynikających z tego niskich wartościach WSS, implikujących dodatkowe, omówione już wyżej procesy proaterogenne (D. A. Chistiakov, Orekhov, and Bobryshev 2017).

Ekspresja cząsteczek adhezyjnych oraz chemokin przez ECs skutkuje rekrutacją monocytów i ich migracją do przestrzeni podśródbłonkowej. W błonie wewnętrznej monocyty nabywają cechy prozapalnych makrofagów (MCs, z ang. *macrophages*) z ekspresją receptorów zmiatających (SR, z ang. *scavenger receptor*), w tym receptorów zmiataczy, klasy A typu I i typu II (SR-AI/II, z ang. *scavenger receptor, class A type I/II*), SR-BI, CD36, LOX-1 czy receptorów *toll*-podobnych (TLR, z ang. *toll-like receptor*) (M. Y. Wu et al. 2017). Za pośrednictwem wspomnianych receptorów, MCs intensywnie fagocytują cząsteczki LDL. Wewnątrzkomórkowe szlaki wytwarzają zestryfikowany oraz wolny cholesterol, który nie może zostać uwolniony z prozapalnych MCs, u których ekspresja transporterów cholesterolu jest zmniejszona. Związki te odkładają się. Powstają komórki piankowate (FCs, z ang. *foam cells*) (Dimitry A. Chistiakov et al. 2017) – patrz Rys. 5. Co więcej, MCs indukują stan zapalny w obrębie ściany naczynia poprzez wydzielanie czynników prozapalnych, w tym IL-1 β , interleukiny 6 (IL-6, z ang. *interleukin 6*) i TNF- α , a także w wyniku zwiększonej produkcji ROS i enzymów proteolitycznych. Przyczynia się to do dalszej aktywacji komórek naczyniowych, a także do degradacji macierzy i destabilizacji — powstałej wskutek dalszej progresji miażdżycy — blaszki miażdżycowej (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020; M. Y. Wu et al. 2017). Mediatorzy zapalne wydzielane

przez MCs przyczyniają się do dalszej infiltracji ściany naczynia przez kolejne MCs oraz inne WBCs (limfocyty T, limfocyty B i in.). Powstające nieprzerwanie FCs ulegają apoptozie, a zwiększona apoptoza sprzyja powstawaniu martwiczego rdzenia w ścianie naczynia (Milutinović, Šuput, and Zorc-Plesković 2020) – patrz Rys. 6.

Zgromadzone w przestrzeni podśródbłonkowej MCs ulegają heterogenizacji. Komórki te różnicują się (in. polaryzują) w odrębne funkcjonalnie fenotypy w odpowiedzi na zaistniałe środowiskowe bodźce predysponujące. Zasadniczo, definiuje się dwa główne fenotypy MCs – aktywowane klasycznie M1 oraz aktywowane alternatywnie M2 (Bobryshev et al. 2016; Farahi, Sinha, and Lusic 2021).

Cytokiny produkowane przez komórki Th1 (m.in. IFN- γ , TNF- α , czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów – GM-CSF, z ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), bodźce endogenne (m.in. ox-LDL) oraz bodźce bakteryjne (m.in. lipopolisacharyd – LPS, z ang. *lipopolysaccharide*) polaryzują MCs w kierunku fenotypu M1. Markerami identyfikującymi tę subpopulację MCs są CD68, CD80, receptor interleukiny 1 (IL-1R, z ang. *interleukin 1 receptor*), TLR oraz MHC klasy II. Wydzielają one znaczne ilości czynników prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6, interleukina 12 (IL-12, z ang. *interleukin 12*), interleukina 23 (IL-23, z ang. *interleukin 23*), TNF- α , CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL2, CCL3 czy CCL5, a także ROS i NO. Stąd MCs fenotypu M1 odpowiadają za inicjację i podtrzymanie stanu zapalnego w ścianie CA, skutkującego w rezultacie progresją oraz destabilizacją zmian miażdżycowych, co zagraża wystąpieniem incydentu zakrzepowo-zatorowego (Bobryshev et al. 2016; Farahi, Sinha, and Lusic 2021).

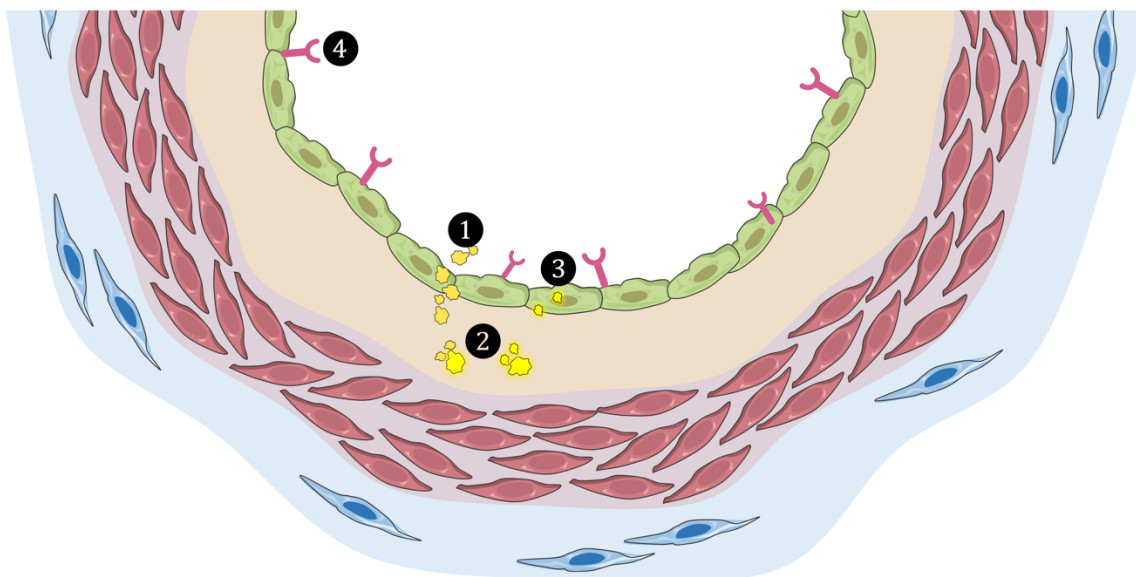
Fenotyp M2, a dokładniej ich podtyp M2a, powstaje w odpowiedzi na cytokiny produkowane przez komórki Th2 (m.in. interleukina 4 – IL-4, z ang. *interleukin 4* i interleukina 13 – IL-13, z ang. *interleukin 13*). Identyfikowane są na podstawie obecności markerów CD36, LOX-1, MHC klasy II, CD163, CD206 oraz CD209. Wydzielane przez M2a cytokiny i chemokiny (m.in. IL-1R, interleukina 10 – IL-10, z ang. *interleukin 10*, TGF- β , CCL17, CCL18, CCL22, CCL24) mają właściwości przeciwzapalne. Komórki te modulują także wydzielanie cytokin prozapalnych oraz odpowiadają za rekrutację komórek promujących naprawę uszkodzeń i odbudowę objętych chorobą naczyniową tkanek. IL-1 β , LPS, antagonisty IL-1R (IL-1RA, z ang. *interleukin 1 receptor antagonist*) oraz kompleksy immunologiczne indukują podtyp M2b, wykazujący ekspresję markerów CD86 oraz MHC klasy II. Komórki te wydzielają IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α i CCL1 oraz biorą udział w szeroko rozumianej immunoregulacji. Kolejnym podtypem powstałym w wyniku zadziałania IL-10 oraz TGF- β są M2c, cechujące się obecnością na powierzchni markerów TLR, CD163 oraz CD206. Wydzielają one TGF- β , IL-

10, CCL13, CCL16 oraz CXCL18. Zdolne są do usuwania komórek apoptotycznych w procesie eferocytozy. Obecność różnych podtypów alternatywnie aktywowanych MCs sprzyja regresji zmian miażdżycowych poprzez hamowanie stanu zapalnego, tłumienie prozapalnej sygnalizacji, usuwanie martwych komórek oraz naprawę zniszczonych tkanek. Zapewnia to także stabilizację blaszek miażdżycowych (Bobryshev et al. 2016; Farahi, Sinha, and Lusic 2021).

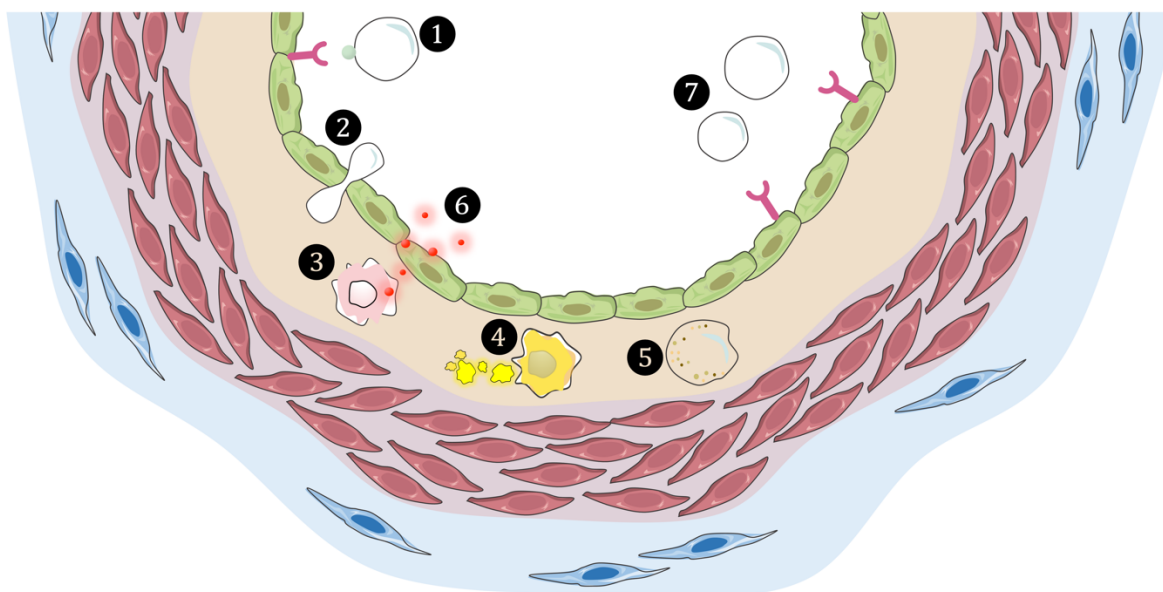
Poza klasycznie i alternatywnie aktywowanymi MCs, wyróżnia się wiele innych podtypów MCs, o właściwościach zarówno pro- jak i przeciwzapalnych (Farahi, Sinha, and Lusic 2021). Warte wyróżnienia są M(hem) lub M(Hb), indukowane przez hem lub kompleks hemoglobina-haptoglobina. Komórki te są w stanie eliminować cholesterol, co zapobiega akumulacji lipidów i powstawaniu FCs. Ta cecha decyduje o ich ateroprotekcyjnych właściwościach (Skuratovskaia et al. 2020). Zatem właściwa regulacja polaryzacji MCs do odpowiedniego ich fenotypu może stanowić strategią terapeutyczną, zapobiegającą postępowi zmian chorobowych, a nawet umożliwić ich wycofanie.

Oprócz MCs w zmianach miażdżycowych występują różne podzbiory komórek T, które odpowiednio wykazują właściwości pro- i przeciwzapalne. Komórki te zostały już kilkakrotnie wspomniane (patrz wyżej). Th moduluje środowisko zmian miażdżycowych. Th1, Th9 czy Th22 pełnią funkcję proaterogenną, podczas gdy Th2, Th17 i limfocyty Treg pełnią funkcję ateroprotekcyjną (Hedrick 2015). Limfocyty T cytotoksyczne (Tc, z ang. *lymphocytes T cytotoxic*) oraz NK gromadzą się w powstających zmianach miażdżycowych, na ich wczesnym etapie, jak i w stadiach zaawansowanych. Towarzyszą zmianom wrażliwym, podatnym na pęknięcie. Komórki te działają lokalnie w obrębie zmian, wytwarzając cytokiny prozapalne, chemokiny i cytotoksyny (Kyaw et al. 2017). Obecność limfocytów B także kształtuje przebieg miażdżycy. Limfocyty B (podzbiór B1) działają przeciwmiażdżycowo, głównie dzięki wytwarzaniu immunoglobulin, które wiążąc się z oxLDL, zmniejszają jego wychwyt przez MCs. Wpływają także na stabilizację blaszki miażdżycowej poprzez zwiększenie liczby MCs fenotypu M2, które to przesuwać równowagę w kierunku obniżonych poziomów cytokin prozapalnych oraz usuwają komórki apoptotyczne. Funkcje i reaktywność podzbioru B2 limfocytów B ściśle zależy od środowiska i stadium zaawansowania zmian miażdżycowych, indukując ich przeciwmiażdżycowy lub aterogenny fenotyp (Ma, Mussbacher, and Galkina 2021).

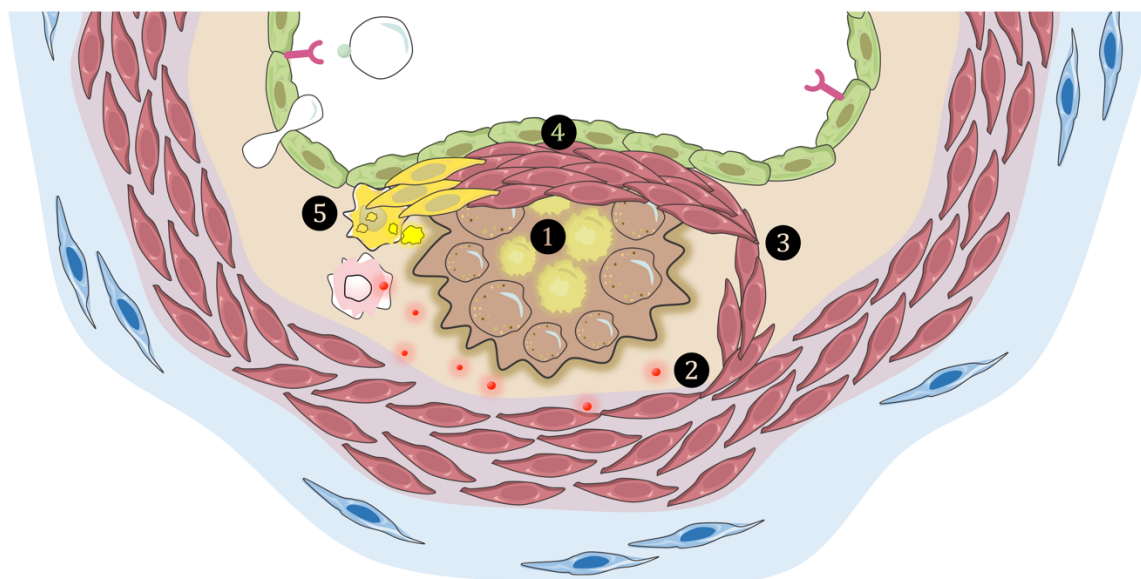
VSMCs zlokalizowane głównie w błonie środkowej (oraz nielicznie w błonie wewnętrznej) nie są ostatecznie zróżnicowane. Również i one odgrywają szczególną rolę w progresji choroby naczyniowej. W odpowiedzi na cytokiny prozapalne wytwarzane przez MCs, limfocyty T i B oraz komórki dendrytyczne, VSMCs przechodzą zmiany fenotypowe (Milutinović, Šuput, and Zorc-Plesković 2020; M. Y. Wu et al. 2017).



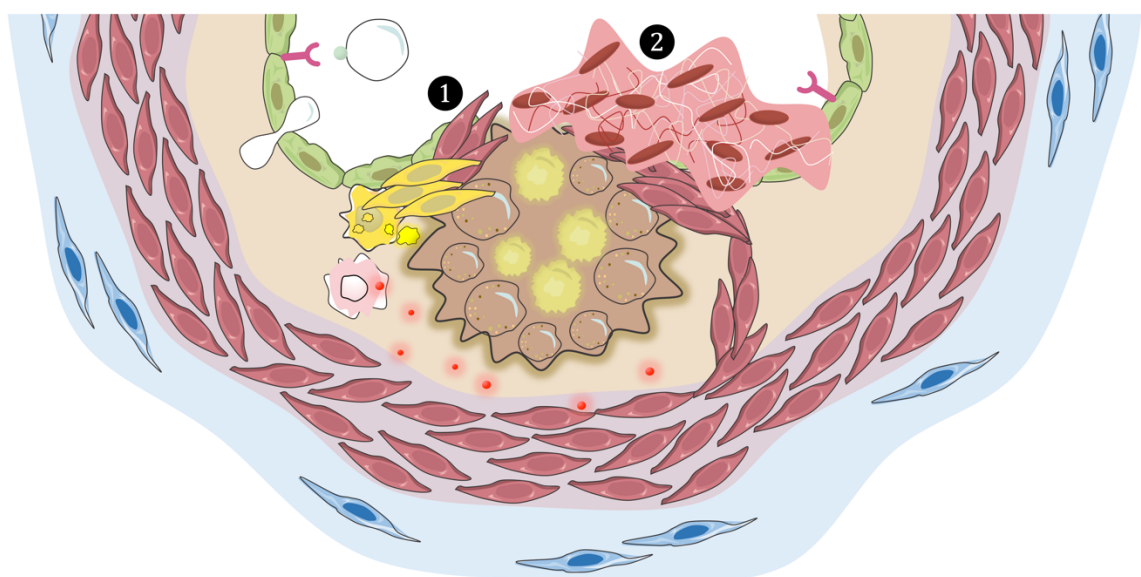
Rys. 4 Na wczesnym etapie aterogenezy dochodzi retencji i sekwestracji lipoprotein o małej gęstości (LDL, z ang. *low-density lipoprotein*) w błonie wewnętrznej ❶. W proces ten zaangażowana jest przęśródbłonkowa transcytoza, zależna od receptorów zmiataaczy, klasy B typu 1 (SR-BI, z ang. *scavenger receptor, class B type I*) oraz kinazy typu 1 podobnej do receptora aktywiny (ALK1, z ang. *activin receptor-like kinase 1*) oraz wymagająca obecności kaweoli. Uwężone w podśródbłonkowej przestrzeni cząsteczki LDL ulegają modyfikacji oksydacyjnej (oxLDL, z ang. *oxidized low-density lipoprotein*) ❷. Cząsteczki oxLDL są wychwytywane przez ECs za pośrednictwem lektynopodobnego receptora utlenionej lipoproteiny o małej gęstości 1 (LOX-1, z ang. *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*) ❸, co wywołuje wzrost ekspresji na powierzchni ECs cząsteczek adhezyjnych ❹. Schemat autorski.



Rys. 5 Ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni ECs skutkuje rekrutacją monocytów ❶ i ich migracją do przestrzeni podśródbłonkowej ❷, gdzie nabywają cechy prozapalnych makrofagów (MCs, z ang. *macrophages*) ❸. Za pośrednictwem receptorów zmiatających (SR, z ang. *scavenger receptor*) MCs intensywnie fagocytują cząsteczki LDL ❹, przekształcając się w komórki piankowe (FCs, z ang. *foam cells*) ❺. Jednocześnie MCs indukują stan zapalny poprzez wydzielanie czynników prozapalnych ❻, które przyczyniają się do dalszej infiltracji ściany naczynia przez kolejne WBCs ❼. Schemat autorski.



Rys. 6 Powstające nieprzerwanie FCs ulegają apoptozie, a zwiększona apoptoza sprzyja powstawaniu martwiczego rdzenia w ścianie naczynia **1**. W odpowiedzi na mediatory stanu zapalnego wytwarzane przez MCs, VSMCs przechodzą zmiany fenotypowe **2**. Komórki te proliferują, przebudowują ECM, migrują **3**, współuczestnicząc w progresji blaszki miażdżycowej **4**. Różnicując się także w komórki podobne do MCs, intensywnie fagocytując cząsteczki LDL **5**. Blaszkę miażdżycową nacieczone są również przez inne podzbiory WBCs, które kształtują mikrośrodowisko zmiany. Schemat autorski.



Rys. 7 Powstała blaszka miażdżycowa zbudowana jest z martwiczego rdzenia, otoczonego przez MCs i komórki podobne do MCs, które nieustannie fagocytują cząsteczki LDL. Blaszcze towarzyszy populacja WBCs, wytwarzających cytokiny prozapalne. W skład blaszki również wchodzi zmodyfikowana ECM, która względnie stabilizuje wrażliwą blaszkę miażdżycową. Zaawansowane blaszki miażdżycowe wykazują również neowaskularyzację, co przyczynia się do dalszej ekspansji martwiczego rdzenia przez lokalne wynacznienie płytek krwi (PLT, z ang. *platelets*) i czerwonych krwinek (RBCs, z ang. *red blood cells*). Po erozji lub pęknięciu blaszki miażdżycowej **1** uszkodzone ECs wydzielają zwiększone ilości czynników prozakrzepowych i zmniejszone ilości czynników przeciwzakrzepowych, co skutkuje powikłaniem zakrzepowo-zatorowym **2**. Schemat autorski.

VSMCs proliferują, przebudowują ECM, migrują. Wykazują markery i cechy różnych typów komórek, w tym osteoblastów, chondrocytów, adipocytów czy FCs pochodzących z MCs. Różnicując się w komórki podobne do MCs, intensywnie fagocytują cząsteczki LDL, co prowadzi do odkładania zestryfikowanego oraz wolnego cholesterolu, i następnie ich apoptozy, przez co współuczestniczą w tworzeniu martwiczego rdzenia. Przekształcenie VSMCs w fenotyp osteo- czy chondrogeny z kolei prowadzi do zwapnienia ściany naczynia (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020; M. Y. Wu et al. 2017).

W wyniku intensyfikacji powyżej opisanych procesów w ścianie naczynia tworzy się — i następnie powiększa — blaszka miażdżycowa (patrz Rys. 7). Zbudowana jest z martwiczego rdzenia, otoczonego przez MCs i komórki podobne do MCs (pochodzące z VSMCs), które nieustannie fagocytują zdeponowane cząsteczki LDL. Blaszcze towarzyszy populacja WBCs, obecne w tym regionie w dużych ilościach, wytwarzających cytokiny prozapalne i chemokiny, które aktywują komórki naczyniowe (ECs, VSMCs, fibroblasty). W skład blaszki również wchodzi zmodyfikowana ECM, która względnie stabilizuje wrażliwą blaszkę miażdżycową (Libby, Ridker, and Hansson 2011; Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020). Zaawansowane blaszki miażdżycowe wykazują również neowaskularyzację. Lokalne wynaczynienie PLT's i czerwonych krwinek (RBCs, z ang. *red blood cells*) przyczynia się do dalszej ekspansji martwiczego rdzenia (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020). Narastające zmiany miażdżycowe przyczyniają się do zaburzenia przepływu krwi przez naczynie. Niewydolność krążenia w rezultacie może doprowadzić do niedokrwienia mięśnia sercowego, ostrej choroby niedokrwiennej i zgonu (Looser, Kim, and Feldman 2016). Po erozji lub pęknięciu blaszki miażdżycowej uszkodzone ECs wydzielają zwiększone ilości czynników prozakrzepowych (m.in. vWF, selektyne P, TXA2 i in.) oraz zmniejszone ilości czynników przeciwzakrzepowych, co skutkować może dodatkowymi powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020; M. Y. Wu et al. 2017).

Pomimo prowadzonych w ostatnich latach licznych badań, złożona patogeneza choroby naczyniowej nadal pozostaje niejasna. Niemniej jednak pojawiające się nowe techniki pomiarowe i metody badawcze z zakresu inżynierii biomedycznej dostarczają istotnych wskazówek dotyczących rozwoju miażdżycy, rzucając wyzwanie tradycyjnym założeniom. Stanowi to podłoże nowatorskich metod terapeutycznych, celowanych na molekularny i komórkowy patomechanizm choroby.

1.2 Stenty wieńcowe – jedna ze strategii terapeutycznych w przebiegu miażdżycy

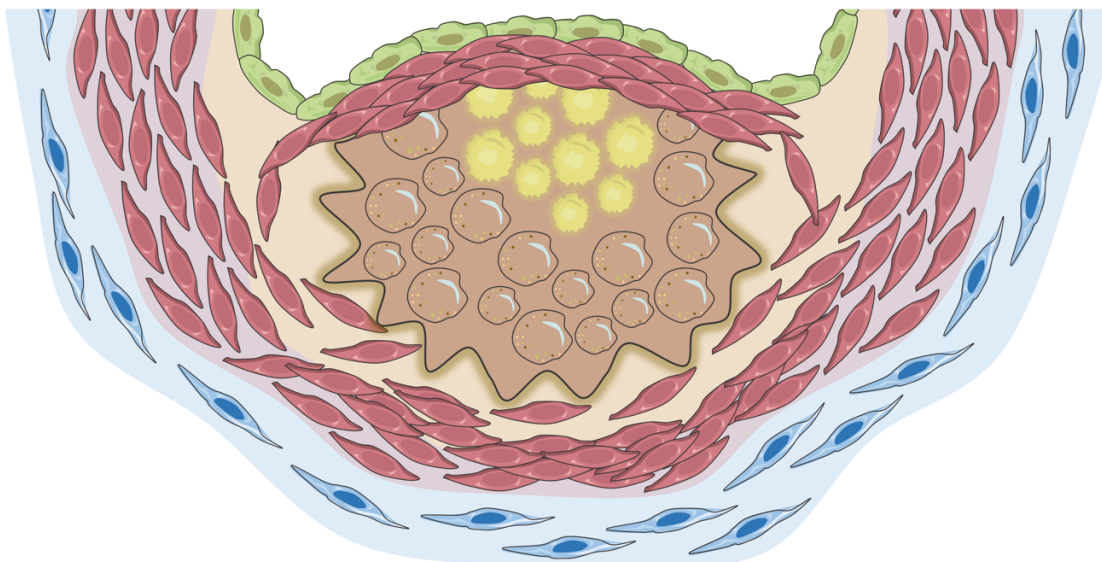
Spośród strategii terapeutycznych, stosowanych w przebiegu miażdżycy należy wymienić intensywną farmakoterapię, przezskórną interwencję wieńcową (PCI, z ang. *percutaneous coronary intervention*), inaczej określaną mianem przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej (PTCA, z ang. *percutaneous transluminal coronary angioplasty*) oraz pomostowanie aortalno-wieńcowe (CABG, z ang. *coronary artery bypass grafting*). We wczesnych stadiach miażdżycy, u pacjentów z nieznacznym zwężeniem CA podejmuje się próby leczenia farmakologicznego. PCI stosowana jest w momencie, gdy zwężenie CA jest umiarkowane lub zaawansowane (in. klinicznie istotne), z kolei CABG — będące techniką chirurgiczną — stanowi metodę ostatniej szansy w przypadku poważnych już niedrożności w układzie CAs (Korei et al. 2022).

Spośród wyżej wymienionych metod leczniczych, to PCI jest obecnie najczęściej podejmowana. Stanowi ona niechirurgiczną, minimalnie inwazyjną procedurę, mającą na celu poszerzenie — powstałego w przebiegu miażdżycy (patrz Rys. 8) — zwężenia światła CA lub przywrócenie drożności po całkowitym jej zamknięciu. Obejmuje ona różne techniki, z których najczęściej stosowane są balonowanie zwężonego odcinka czy umieszczenie wewnątrznaczyniowo stentu – patrz Rys. 9. Nadrzędnym celem podjętego działania terapeutycznego jest zapewnienie niezakłóconego przepływu krwi i poprawa perfuzji mięśnia sercowego, a w rezultacie niedoprowadzenie do martwicy wybranych jego obszarów (Ahmad et al. 2022; Malik and Tivakaran 2023). Procedura ta cechuje się względnie niskim odsetkiem powikłań i różnorodnymi korzyściami, w tym zapewnia długotrwałą drożność naczynia. Towarzysząca PCI implantacja stentu wiąże się z mniejszym ryzykiem restenozy (patrz dalej) w porównaniu z PCI polegającej na samym balonowaniu zwężonego naczynia. Dodatkowo, PCI jest łatwiejsza technicznie i mniej inwazyjna w porównaniu z CABG (Korei et al. 2022).

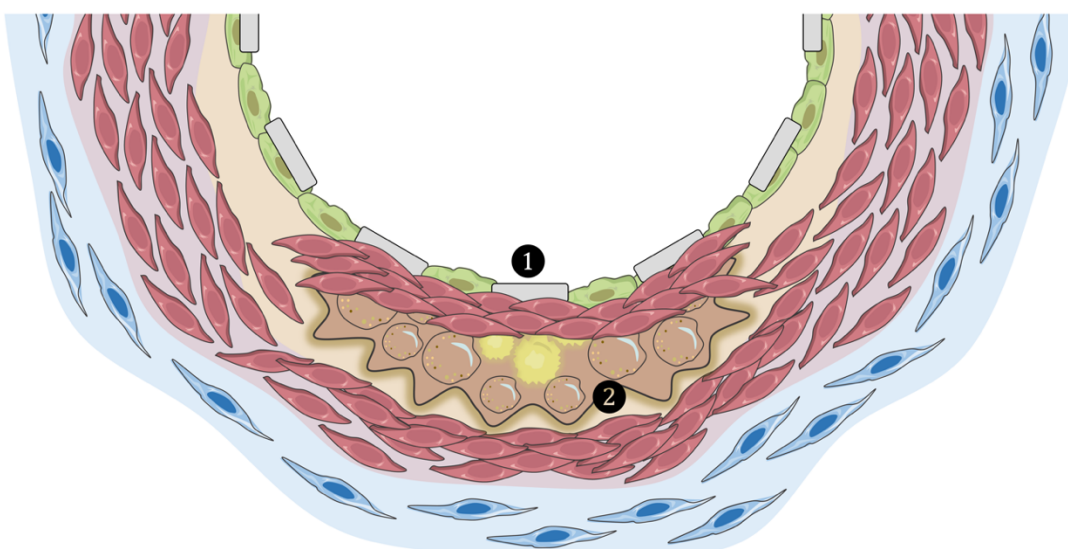
Wszczepiane podczas PCI stenty sercowo-naczyniowe (z ang. *cardiovascular stents*) stanowią rozprężalne (samorozprężalne lub rozprężalne balonem), rurkowate struktury, które przypominają siatkę. Wyróżnia się różne ich rodzaje. Do ważniejszych, często wykorzystywanych, należą stenty metalowe (BMS, z ang. *bare metal stent*), stenty uwalniające leki (DES, z ang. *drug eluting stents*) oraz stenty bioresorbowalne (BRS, z ang. *bioresorbable stents*), które systematycznie zaczęły się pojawiać wraz z rozwojem inżynierii biomedycznej (Korei et al. 2022).

BMS są pierwszym rodzajem stentów wprowadzonych do leczenia zwężeń CA. Wykonane zwykle ze stopu kobaltu i chromu (stop Co-Cr), stali nierdzewnej 316L (316L SS, z ang. *316L stainless steel*), stopu platyny i irydu (stop Pt-Ir) czy stopu niklu i tytanu (stop Ni-Ti, in. nitinol). Wykazują doskonałe właściwości mechaniczne i z powodzeniem są w stanie utrzymać

drożność naczynia. Jednak, jedną z głównych wad w ich stosowaniu to towarzyszący nadmierny rozrost neointymy (NIH, z ang. *neointimal hyperplasia* – patrz dalej), prowadzący do ponownego, stopniowego zwężenia światła naczynia. Związana z tym zwiększona potrzeba powtórnych rewaskularyzacji okazała się czynnikiem ograniczającym stosowanie BMS w latach 90. XX wieku (Korei et al. 2022).



Rys. 8 Choroba wieńcowa (CHD, z ang. *coronary heart disease*) obejmuje stany niedokrwienia mięśnia sercowego, które związane są z postępującymi zmianami miażdżycowymi w CA. Zaawansowane zmiany naczyniowe mogą skutkować znacznym ograniczeniem przepływu krwi w CA lub jego całkowitym ustaniem. W takim przypadku, niezbędne jest podjęcie odpowiednich działań terapeutycznych mających na celu przywrócenie niezakłóconego przepływu krwi przez mięsień sercowy i niedoprowadzenie do martwicy wybranych jego obszarów funkcjonalnych. Schemat autorski.



Rys. 9 Schematyczne przedstawienie idei przezskórnej interwencji wieńcowej (PCI, z ang. *percutaneous coronary intervention*) z implantacją stentu kardiowaskularnego, którego element strukturalny oznaczono na schemacie ❶. W wyniku podjętego działania terapeutycznego, poprzez wywołanie odpowiedniej zmiany geometrii ❷ objętego chorobą miażdżycową odcinka naczynia, następuje poszerzenie zwężonego światła CA lub przywrócenie jej drożności po całkowitym zamknięciu. Zapewnia to właściwy przepływ krwi i poprawia perfuzję mięśnia sercowego. Schemat autorski.

DES stanowią następną generację stentów, uznaną za trzecią rewolucję w kardiologii interwencyjnej (odpowiednio po — pierwszej — balonowaniu naczynia w procedurze PCI i po — drugiej — wprowadzeniu BMS). Nadrzędnym ich zadaniem było ograniczenie stanu zapalnego w naczyniu oraz zmniejszenie prawdopodobieństwa restenozy w stencie (ISR, z ang. *in-stent restenosis*) – patrz dalej. Stenty te składają się z platformy, na którą została naniesiona powłoka polimerowa i związany z nią związek immunosupresyjny (w tym deksametazon i in.) lub antyproliferacyjny (w tym sirolimus, zotarolimus, ewerolimus i in.). DES umożliwia specyficzne dla miejsca, kontrolowane uwalnianie wprowadzonego leku, co zapobiega NIH (Korei et al. 2022). Niemniej jednak związki te miejscowo hamują również podziały ECs oraz komórek odpowiedzialnych za gojenie się pozabiegowej rany (Meraj, Jauhar, and Singh 2015). To zjawisko, pomimo że pożądane w odniesieniu do komórek neointimy, w stosunku do ECs uznaje się za główną wadę DES.

Kolejno wprowadzono do użycia BRS, wykonane na bazie polimerów lub metali. Spośród polimerów stosowane są m.in.: poli(kwas mlekowy) czy kopolimer kwasu mlekowego i kwasu glikolowego. Do biodegradowalnych materiałów na bazie metali zaliczyć należy stopy magnezu i żelaza. Idea BRS polega na zapewnieniu czasowego wsparcia naczynia podczas gojenia, po czym struktura implantu ulega degradacji i stopniowej resorpcji przez organizm, sprzyjając jednocześnie przywróceniu właściwych funkcji wazomotorycznych naczynia. Obecnie, to właśnie na magnezie i jego stopach opierają się najnowsze innowacje w technologii stentów BRS. Charakteryzują się one zarówno doskonałą biodegradowalnością, bezpieczeństwem biologicznym i obiecującymi właściwościami mechanicznymi, przy zmniejszonym ryzyku ISR (Ang et al. 2017; Korei et al. 2022; Tsakiris, Tardei, and Clicinschi 2021). Niemniej jednak i dla BRS przeprowadzone badania randomizowane wskazały działania niepożądane. Szczególnym analizom poddawano poziom powrotu fizjologicznych funkcji wybranego odcinka naczynia po zabiegu (ruchliwość, geometria i WSS). Opisano, że poziomy te nie odbiegały znacząco dla tych, scharakteryzowanych u pacjentów, u których zastosowano DES. Co więcej zaobserwowano również znaczny wzrost częstości podejmowanych rewaskularyzacji czy zwiększone ryzyko zakrzepicy (S. Buccheri and Capodanno 2019). Zatem i dla czwartej rewolucji w kardiologii interwencyjnej wykazano ułomności, które ciągle ograniczają możliwość wprowadzenia BRS do powszechnego użycia.

Nadal prowadzi się wiele badań nad rozwojem coraz to nowszych koncepcji stentów, celem opracowania tego względnie idealnego. Strategie te jednak nie ograniczają się do poszukiwania materiału, z którego stent zostanie wykonany bądź przeprojektowania jego geometrii. Podejmowane są próby opracowania powłoki, modyfikującej powierzchnię obecnie

stosowanych w klinice stentów, która wykaże aktywność biologiczną wobec komórek naczyniowych. Za tym trendem podąża tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej.

Roboczo strategię modyfikacji powierzchni stentów warto podzielić na następujące kategorie:

- (1) modyfikację mikrostruktury powierzchni stentu lub jej właściwości fizyko-chemicznych,
- (2) wprowadzenie na powierzchnię stentu cząsteczek bionicznych (inspirowanych związkami naturalnie występującymi),
- (3) interwencja w funkcje biologiczne komórek naczyniowych i modyfikacja ich odpowiedzi (co poniekąd wiąże się z punktem wcześniejszym) za pośrednictwem cząsteczek bioaktywnych.

Niniejsze działania mają na celu promowanie rozwoju warstwy śródbłonka na powierzchni implantu (in. re-endoetelializację), poprzez indukcję migracji, adhezji i proliferacji okolicznych, nieuszkodzonych ECs bądź stworzeniu warunków sprzyjających zasiedlaniu materiału przez komórki progenitorowe śródbłonka (EPCs, z ang. *endothelial progenitor cells*) czy mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs, z ang. *mesenchymal stem cells*). EPCs i MSCs to typy komórek wykazujących potencjał do kierunkowego różnicowania się w dojrzałe ECs. Szybka re-endoetelializacja powierzchni implantu i miejsca, gdzie został wszczepiony stanowi obecnie jedną z ważniejszych strategii zapobiegania NIH oraz ISR. Powstająca kompetentna warstwa śródbłonka naczyniowego ponadto ma za zadanie osłonić VSMCs przed kontaktem ze stymulującymi je czynnikami wzrostu i bodźcami odpowiadającymi za ich patologiczne transformacje fenotypowe. Przywrócenie tych — i innych, licznych (patrz 1.1 Patomechanizm miażdżycy) — zdolności ECs pozwoli przywrócić homeostazę mikrośrodowiska ściany naczynia (Bian et al. 2022).

Komórki naczyniowe są wrażliwe na zmiany właściwości fizyko-chemicznych powierzchni materiału, z którym są w bezpośrednim kontakcie, co znacząco wpływa na ich funkcjonowanie. W fizjologicznym środowisku, oddziałują one z ECM, którą cechuje odpowiednia mikro- i nanostruktura. Prowadzone testy ujawniły znaczne różnice w zdolność adaptacji komórek do zmiennej chropowatości materiału (badanej w zakresie 0.1–2.0 μm). Wzrost chropowatości — od wartości nano- do mikrometrowych — znacząco sprzyja proliferacji, adhezji i migracji ECs, jednocześnie hamując wzrost i rozprzestrzenianie się VSMCs (K. Zhou et al. 2021). Co więcej, powierzchnia o odpowiedniej mikrostrukturze i wielkości (w przytoczonym doniesieniu literaturowym – 15 μm) może sprzyjać tworzeniu przez ECs monowarstwy, co prowadzi do uporządkowanego rozmieszczenia komórek na powierzchni materiału (wartość z zakresu 20–25 μm uznana została za krytyczną, do której komórki nie mogą się już

zaadaptować) (M. L. Wu, Panduranga, and Carman 2018). Topografia powierzchni dodatkowo reguluje wydzielanie składników ECM przez komórki naczyniowe, co wpływa korzystnie na późniejszą biokompatybilność zastosowanych implantów (C. Han et al. 2019). Poza strukturą materiału, wpływ na funkcje komórek ma wzór wytworzony w obrębie modyfikowanej powierzchni. Periodyczna — i nie tylko — mikrostruktura materiału promuje migrację i adhezję ECs, a co więcej decyduje o ich przestrzennym rozkładzie na powierzchni implantu, wzdłużnie do wprowadzonego wzoru (Bian et al. 2022; I. G. Kang et al. 2020). Zachodzą procesy analogiczne, jak te wynikające z przepływu krwi, gdzie komórki układają się wzdłuż kierunku przepływającej krwi, tworząc swoistego rodzaju żłobienia. Do modyfikacji topografii powierzchni materiału, z których wykonuje się stenty, stosuje się różne metody, jak fizyczne lub chemiczne osadzanie z fazy gazowej, kontrolowane wytrawianie w kwasach, fotolitografię, bezpośrednie laserowe modelowanie interferencyjne i wiele innych technik (Bian et al. 2022).

Spośród pozostałych parametrów fizyko-chemicznych materiału, wymienić należy hydrofilowość powierzchni zastosowanego metalu, która, dla przykładu, znacznie wzrasta po obróbce plazmowej. Wiąże się to z kolei z nasileniem rekrutacji ECs przez opracowaną powierzchnię (Shim et al. 2018). Modyfikacja ładunku powierzchniowego materiału może odpowiadać za korzystną adsorpcję białek ECM, co może regulować funkcje komórek naczyniowych (T. Liu et al. 2014). Prowadzono badania oceniające wpływ sztywności materiału na stopień adhezji i proliferacji ECs, która była ograniczona na materiałach o obniżonej sztywności, a promowana na tych o większej. Niemniej jednak komórki hodowane na powierzchni o mniejszej sztywności zachowywały w większym stopniu swoiste funkcje śródbłonna niż hodowane na twardej powierzchni (Chang et al. 2017). Właściwości magnetyczne materiałów również znacząco wpływają na zachowanie komórek. Namagnesowana powierzchnia materiału może zapewnić wysoką adsorpcję magnetycznie znakowanych EPCs, a pole magnetyczne o niskiej częstotliwości skutecznie promować ich wzrost (J. Chen et al. 2019; L. Zhang et al. 2020).

Podsumowując, metody modyfikujące zarówno nano- jak i mikrostrukturę implantu oraz inne właściwości fizyko-chemiczne powierzchni mają znaczny wpływ na interakcje między zastosowanym materiałem a komórkami naczyniowymi. Nie sposób ich wszystkich scharakteryzować. Przyczynia się to do promowania wzrostu, migracji i adhezji ECs. W efekcie, komórki te mogą wytworzyć funkcjonalną warstwę śródbłonna na powierzchni materiału, co jest podstawą właściwej re-endotelializacji stentu i wynikowej, długotrwałej stabilności implantu naczyniowego po zabiegu PCI.

Inną, wymienioną powyżej strategią modyfikacji materiału jest unieruchomienie na jego powierzchni naturalnych lub syntetycznych cząsteczek biologicznych, które zapewnią

właściwe mikrośrodowisko dla rozwoju ECs. Spośród tych cząsteczek wyróżnić należy heparynę, kwas hialuronowy, pozostałe białka ECM (w tym fibronektyna, laminina, wybrane typy kolagenu) czy specyficzne sekwencje aminokwasowe, które mogą pośredniczyć w adhezji, proliferacji i różnicowaniu ECs, poprzez związanie się z śródbłonkowymi integrynami lub innymi komórkowymi receptorami. Funkcjonalizacja stentów z udziałem tych związków odbywa się poprzez wytworzenie wiązań kowalencyjnych (w tym w reakcji sieciowania – patrz dalej) oraz za pośrednictwem oddziaływań niekowalencyjnych (w tym poprzez oddziaływania elektrostatyczne). Nierzadko molekuly te łączą się także z innymi związkami, co poprawia stabilność otrzymanej powłoki (w tym zastosowanie chitozanu czy poli-L-lizyny) lub zapewnia jej właściwe zakotwiczenie na powierzchni materiału (w tym wprowadzenie polidopaminy) (Bian et al. 2022). Ważnym warunkiem jest właściwe związanie powłoki z powierzchnią stentu, aby zapobiec jej wymyciu w miejscu docelowego zastosowania. Jest to temat często pomijany w dyskusji prowadzonej w literaturze naukowej.

Re-endoetelializacja powierzchni stentu opiera się na zjawiskach zależnych od dwóch rodzajów komórek. W przypadku ECs polega na zapewnieniu właściwych warunków do migracji komórek z obszarów przyległych do implantu i proliferacji w miejscach z uszkodzoną i dysfunkcyjną warstwą śródbłonka. W przypadku EPCs strategia oparta jest na ich wstępnym wychwycie z krążenia i indukcji ich różnicowania w dojrzałe ECs. Stąd podejmowano się metod wpływania zarówno na sygnalizację w obrębie ECs jak i EPCs oraz ich wychwyty (patrz dalej). W tym celu powłoki wzbogacano w VEGF, który jest kluczowym czynnikiem angiogenezy (patrz 1.1 Patomechanizm miażdżycy), sprzyjający migracji i proliferacji omówionych wyżej dwóch rodzajów komórek (S. J. Lee et al. 2019; Tan et al. 2020). Inny czynnik – czynnik pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1, z ang. *stromal cell-derived factor-1*) związane z powierzchnią stentu, aby zmobilizować endogenne EPCs (wchodzące w interakcje z SDF-1 za pośrednictwem receptora CXCR4) i naprowadzić je na materiały implantacyjne (W. Wang et al. 2019). Spośród wielu innych cząsteczek bioaktywnych, do produkcji biofunkcjonalizowanych powłok zaangażowano czynniki wzrostu fibroblastów (FGF, z ang. *fibroblast growth factor*), selenocystaminę, kwas siarkowodorowy, kwas cytrynowy, aptamery kwasów nukleinowych, egzosomy, kwas galusowy i wiele innych (Bian et al. 2022).

Jako że zarówno dojrzałe ECs, jak i EPCs wyrażają pewne specyficzne markery powierzchniowe, takie jak CD31, CD34, CD133 czy VEGFR-2, aby zwiększyć adhezję tych komórek na powierzchni implantu podjęto próby wzbogacenia powłok w swoiste przeciwciała. Takie podejście umożliwia wychwyt krążących we krwi EPCs. Immobilizacja przeciwciał na powierzchni powłoki bazowej możliwa jest za pośrednictwem techniki sieciowania (patrz

dalej), tworzenia mostków disulfidowych z eksponowanymi na powierzchni grupami tiolowymi czy za pośrednictwem utlenionego łańcucha glikanowego, reagującego z wolnymi grupami aminowymi powierzchni, a także innych metod (Foerster et al. 2016; Sarelo et al. 2020; Wawrzyńska et al. 2019; West-Livingston et al. 2020). Rozpoznanie odpowiedniego białka błonowego docelowych komórek naczyniowych przez powierzchniowo związane, właściwe zorientowane przeciwciała, skutkuje rekrutacją ECs lub EPCs, ich zasiedleniem i następczą proliferacją w obrębie wybranego odcinka naczynia (Bian et al. 2022).

Do modyfikacji powierzchni również wykorzystywane są związki, zwiększające lokalne stężenie NO. Ta gazowa cząsteczka sygnalizacyjna stanowi ważny czynnik promujący wzrost ECs, jednocześnie hamując PLTs, adhezję WBCs i proliferację VSMCs, zmniejszając zatem NIH i prawdopodobieństwo ISR (Bian et al. 2022).

Zaproponowany na początku podział metod modyfikacji powierzchni rzeczywiście wydaje się tylko roboczym. Podejmowane strategie rzadko bywają aplikowane pojedynczo. W większości są łączone dla lepszego efektu biologicznego proponowanej powłoki. Wstępnie modyfikuje się strukturę stentu, aby zapewnić właściwe pokrycie powierzchni implantu materiałem bazowym. On zapewnia właściwe lokalne środowisko dla komórek. Do materiału bazowego, z pomocą różnych metod, wiąże się cząsteczki bioaktywne, aby wywołać właściwą odpowiedź komórek nowo formowanej warstwy śródbłonna. Takie kompleksowe podejście ma szansę zadziałać na złożony patomechanizm ISR. Spośród tak wielu koncepcji nie podjęto jeszcze tematu wprowadzenia na powierzchnię stentu wybranych interleukin (in. cytokin) – co być może okaże się przełomowym rozwiązaniem.

1.3 Efekty biologiczne indukowane implantacją stentu

1.3.1 Patomechanizm restenozы w stencie

Pomimo, iż scharakteryzowana powyżej PCI z implantacją stentu kardiovaskularnego (patrz 1.2 Stenty wieńcowe – jedna ze strategii terapeutycznych w przebiegu miażdżycy) stanowi złoty standard w rewaskularyzacji zwężonej CA i niewątpliwie prowadzi do poprawy jakości życia i przeżycia milionów pacjentów rocznie, wiąże się z ewentualnym niepowodzeniem, decydującym o ograniczeniu długoterminowej skuteczności zabiegu. Spośród najczęstszych, wskazać należy wspomnianą powyżej ISR. Tą — rozumianą jako nawrót zwężenia w miejscu uprzednio poddanym PCI — zdefiniować można na dwa sposoby: klinicznie – jako nawrót objawów dusznicy bolesnej u pacjenta, co wymaga ponownego PCI lub CABG, bądź angiograficznie – jako zwężenie światła o więcej jak 50%, w okresie obserwacji 3–6 miesięcy po przebytym zabiegu (Clare et al. 2022; Cornelissen and Vogt 2019; Jung et al. 2022).

Mechanizmy leżące u podstaw ISR nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione. Niemniej jednak, cztery ściśle powiązane ze sobą czynniki wydają się odgrywać szczególną rolę w tym procesie – uszkodzenie i obnażenie śródbłonna, jako skutek uboczny zabiegu, nasilenie procesów zapalnych z dalszym gromadzeniem się monocytów w przestrzeni podśródbłonkowej, transformacja VSMCs oraz migracja fibroblastów. Wskazane zjawiska przyczyniają się do NIH, stanowiącej pointerwencyjny, patologiczny proces, podczas którego dokonuje się przebudowa błony wewnętrznej ściany CA (D. Buccheri et al. 2016; Clare et al. 2022). Prowadzi to do stopniowego jej pogrubienia, ponownej utraty drożności CA, a więc ISR oraz nawrotu klinicznych cech niewydolności krążenia wieńcowego (Rekhi et al. 2022).

Podczas PCI stosowane są wysokie ciśnienia wypełnienia balonu (rzędu kilku- lub kilkunastu atmosfer) (Dirschinger et al. 1999), służące właściwemu rozprężeniu i wprasowaniu struktury stentu w ścianę CA oraz wywołujące odpowiednią zmianę geometrii wybranego odcinka naczynia. Jednocześnie generuje to duże siły, które działając na ścianę naczynia wywołują uraz ciśnieniowy (in. barotraume). Przyczynia się to do krótko- i długoterminowych zmian, których następstwa odgrywają znamienne rolę w patomechanizmie powikłań po interwencji naczyniowej – patrz dalej (Cornelissen and Vogt 2019). Reakcja komórek ściany CA na mechaniczne uszkodzenie naczynia definiuje, czy procesy naprawcze spowodują wytworzenie ochronnej, cienkiej błony wewnętrznej, czy przerośniętej, pogrubionej neointimy (Jung et al. 2022). Stąd patomechanizm ISR warto rozważyć w kontekście zaistniałych dysfunkcyjności poszczególnych grup komórek budujących CA czy procesów zależnych od komórek, nieobecnych w jej ścianie w stanie zdrowia, a wchodzących w skład zmian charakterystycznych dla choroby naczyniowej.

Pierwszymi komórkami wartymi uwagi są ECs, które realizują złożone procesy zapewniające właściwe funkcjonowanie naczynia (patrz 1.1 Patomechanizm miażdżycy). Niemniej jednak, efektywność tych procesów jest znacznie ograniczona, co jest wynikiem przewlekającego się, aktywnego procesu zapalnego będącego istotną determinantą progresującej miażdżycy. Na przewlekły stan zapalny nakłada się ostra reakcja zapalna wynikająca z zaistniałego urazu (Clare et al. 2022).

Jako wynik, obserwowana jest nierównowaga w produkowanych przez ECs substancjach bioaktywnych. Spośród przedstawicieli EDRFs, wyróżnić należy NO, którego poziom nie wystarcza do właściwej kontroli napięcia naczynia, a niskie jego stężenia sprzyjają niekontrolowanej migracji i proliferacji VSMCs (Napoli et al. 2013). Inną, fizjologicznie ważną funkcją tej cząsteczki — upośledzoną w związku z jej nieadekwatnym wytwarzaniem przez śródbłonek — jest ograniczanie agregacji i adhezji PLTs (Cornelissen and Vogt 2019; Yu et al.

2019). Synergistycznie z NO działa inny przedstawiciel EDRFs, jakim jest PGI₂, która poza swoimi właściwościami rozkurczającymi naczyń krwionośnych, oddziałuje także z PLTs, będąc inhibitorem ich agregacji (Cornelissen and Vogt 2019). Zaistniała podczas zabiegu barotrauma wpływa także na poziom EDCFs (w tym ET-1, TXA2, Ang II). Zwiększeniu ulega ich uwalnianie z ECs, co prowadzi do wazokonstrykcji, która przeciwstawia się mechanicznej próbie rozszerzenia naczyń (Cornelissen and Vogt 2019). Jednym z istotniejszych przedstawicieli mediatorów zwężenia CA jest TXA2, będący czynnikiem kluczowym w procesie aktywacji PLTs (Niccoli et al. 2008). Zatem, ograniczona liczba ECs, zmniejszona ilość wytwarzanych EDRFs (w tym NO i PGI₂) oraz zwiększenie udziału EDCFs (w tym TXA2) znacząco ogranicza aktywność przeciwpłytkową pozostałych ECs. Prowadzi to do odkładania się PLTs w miejscu urazu z jednoczesną ich degranulacją, co sprzyja tworzeniu zakrzepów oraz przyczynia się do progresji, już istniejącego w obrębie naczyń, stanu zapalnego (Clare et al. 2022).

Nagle mechaniczne manipulacje w obrębie naczyń, niszczą śródbłonkowe połączenia międzykomórkowe a także te, które zapewniają kontakt ze składnikami ECM. Pełniona przez ECs rola wybiórczej bariery zostaje upośledzona. Sprzyja to dalszemu, nadmiernemu wychytowi krążących LDL, zapoczątkowanemu już wcześniej. Indukowana wszczepieniem stentu odpowiedź zapalna dodatkowo sprzyja rekrutacji monocytów do miejsca umieszczenia implantu. Komórki te różnicują się w MCs, a po wchłonięciu LDL w FCs, co wtórnie nasila rozwój zmian miażdżycowych w nowo powstającej, pogrubionej błonie wewnętrznej, z późniejszym wytworzeniem nekrotycznego rdzenia. Stanowi to podłoże opisywanej obecnie neo-miażdżycy (z ang. *neoatherosclerosis*) (Wassif and Welt 2023), która może rozwinąć się już w rok po PCI. Dla porównania NIH jest powikłaniem typowo obserwowanym w okresie 6–12 miesięcy po PCI (Jung et al. 2022).

Realizacja właściwych dla ECs funkcji uzależniona jest od WSS (patrz 1.1 Patomechanizm miażdżycy). Wynikają one z aktualnego wzorca przepływu krwi, który modyfikowany jest przez obecność wewnątrznacyniowych asymetrii lub przeszkód. Proces wszczepienia sztywnych ram stentu prowadzi do zmian geometrii tętnicy i powstania ogniskowych nieregularności WSS. Lokalne niskie wartości WSS nasilają w ECs ekspresję genów prozapalnych (w tym cząsteczek adhezyjnych i cytokin chemotaktycznych), wzmacniając w ten sposób stan zapalny wywołany urazem. Obserwowane jest przejście śródbłonkowo-mezenchymalne (EndoMT, z ang. *endothelial-mesenchymal transition*), modulowane przez WSS i uwalniany TGF- β . W wyniku EndoMT, ECs nabywają cech komórek mezenchymalnych i stają się źródłem komórek podobnych do VSMCs, przez co kontrybuują w rozwoju NIH. Poprzez zwiększenie ekspresji płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF, z ang. *platelet-derived growth factor*), ET-1, VEGF

oraz przez osłabienie śródbłonkowej ekspresji inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1, z ang. *plasminogen activator inhibitor 1*) promowana jest proliferacja i migracja VSMCs. VSMCs również — w sposób niezależny od ECs — odpowiadają na zaburzony, dotychczas chroniący naczynie, przepływ laminarny. Odpowiadają regulacją w górę ekspresji PDGF i osłabieniem odpowiedzi na TGF- β – silny supresor ich proliferacji. W rezultacie skutkuje to przejściem neointimalnych VSMCs od spoczynkowego, kurczliwego fenotypu do fenotypu syntetycznego, wytwarzającego większe ilości cząsteczek ECM, a tym samym przyspieszając progresję NIH (Cao et al. 2022; Jenei et al. 2016; Koskinas et al. 2012).

Warto nadmienić, że oprócz nagłych zmian, wywołanych przez stent, zaawansowany NIH również indukuje zmiany w strukturze naczynia, tym samym obserwowane są długoterminowe transformacje parametrów hemodynamicznych środowiska, które dodatkowo sprzyjają progresji uprzednio powstałych, natywnych zmian chorobowych (Jenei et al. 2016; Koskinas et al. 2012).

Ekspozycja na powierzchni ECs cząsteczek adhezyjnych (w tym ICAM-1, VCAM-1 czy selektyna E) sprzyja dalszej rekrutacji monocytów, które w przestrzeni pod błoną wewnętrzną różnicują się w MCs, uwalniają cytokiny, takie jak IL-1 β , IL-6 czy IL-8 i wywierają dalsze działanie zapalne na ECs. Skutkuje to modyfikacją lokalnego środowiska naczynia, pociągając za sobą konsekwencje omówione już w przypadku patogenezy miażdżycy (patrz 1.1 Patomechanizm miażdżycy). Czynniki uwalnianie przez MCs sprzyjają także proliferacji i migracji VSMCs. Za przykład może posłużyć metaloproteinaza macierzy 8 (MMP-8, z ang. *matrix metalloproteinase 8*), która została uznana za regulator różnicowania komórek zasiedlających przydanke w VSMCs, co sprzyja tworzeniu neointimy (Jung et al. 2022; F. Yang et al. 2020).

Uszkodzenie ECs wiąże się ze zmniejszeniem aktywności ektonukleotydyazy NTPDazy1/CD39, co prowadzi do zwiększonej lokalnej biodostępności adenosyno-5'-difosforanu (ADP, z ang. *adenosine-5'-diphosphate*). ADP z kolei wyzwała rekrutację i agregację PLTs, z jednoczesną ich degranulacją. Ponadto, w wyniku uszkodzenia ECs, mechanizmy antykoagulacyjne oparte na antytrombinie III (normalnie wiążącej się z siarczanem heparanu w glikokaliksie ECs) i trombomodulinie (poprzez wiązanie trombiny, stanowiącej jej inhibitor) ulegają wyczerpaniu. Aktywność dwóch silnych inhibitorów aktywacji PLTs zostaje istotnie ograniczona. Jednocześnie obserwowana jest nasilona ekspresja w ECs czynników sprzyjających tworzeniu włókniaka oraz promujących adhezję i agregację PLTs (w tym TF – przekształcająca fibrynogen w fibrynę, vWF – patrz dalej czy selektyna P – przemieszczana z ciałek Weibela-Palade'a do błony komórkowej ECs, rekrutująca PLTs). Dodatkowo, prowadzone manipulacje

w obrębie zmienionego patologicznie naczynia nieuchronnie prowadzą do fizycznego obnażenia warstwy śródblodka i ekspozycji prozakrzepowych składników błony wewnętrznej. Stąd wynika, że deregulacja mechanizmów koordynujących przeciwzakrzepową rolę ECs, prowadzi do następczych powikłań zakrzepowo-zatorowych w obrębie odcinka CA po PCI (Jung et al. 2022; Neubauer and Zieger 2022).

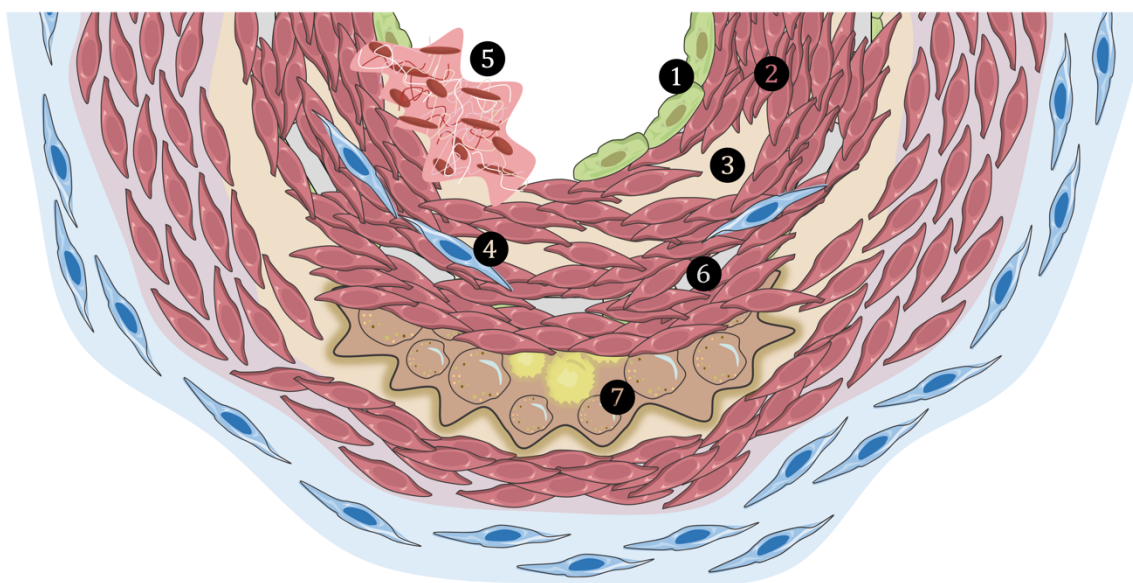
Kolejnymi elementami komórkowymi partycypującymi w rozwoju ISR są PLTs, niejednokrotnie wspomniane już wyżej.

Po uszkodzeniu CA PLTs adherują do odsłoniętych białek ECM. Następnie, w wyniku zadziałania agonistów — do których należą ADP, TXA₂, trombina, a także czynnik aktywujący płytki (PAF, z ang. *platelet-activating factor*) — dochodzi do ich aktywacji. Następuje uwolnienie (in. degranulacja) ziarnistości bogatych w białka adhezyjne (w tym fibrynogen, vWF, selektynę P), czynniki wzrostu (w tym PDGF, TGF- β , VEGF), czynniki krzepnięcia i fibrynolizy (w tym PAI-1, TFPI) oraz agonistów receptorów. W wyniku interakcji PLTs z uwolnionym vWF, nasila się proces wzajemnego ich zlepiania oraz przylegania do ściany uszkodzonej CA. W innym mechanizmie, agregacja PLTs zachodzi w warunkach zaburzonego rozkładu WSS, stymulującego ECs do produkcji vWF. Czynnik ten, wobec zwiększonych wartości WSS, wykazuje tendencję do agregacji, tworząc formy multimeryczne. Wychwytują one krążące PLTs i prowadzą do ich przylegania do powierzchni śródblodka (Okhota et al. 2020). Ekspozowane na powierzchni PLTs cząsteczki adhezyjne (w tym ICAM-1, VCAM-1, selektyna E czy selektyna P), rekrutują WBCs do miejsca, w którym doszło do ich aktywacji. Produkowane przez PLTs czynniki, takie jak PAI-1 czy PDGF wywierają działanie mitogenne i chemotaktyczne, stymulujące VSMCs do proliferacji i migracji. Nasileniu ulega proces zapalny mediowany pochodzącymi z PLTs cytokinami prozapalnymi, odpowiednio IL-1 β , IL-6 czy IL-8. Wkrótce po aktywacji, PLTs ulegają agregacji, wskutek zmian konformacyjnych integryny α IIB β 3 (in. glikoproteiny IIB/IIIa). Ostatecznie proces ten skutkuje ich usieciowieniem, a co za tym idzie, zakończeniem procesu wykrzepiania na stencie i w miejscu uszkodzenia naczynia (Clare et al. 2022; Jung et al. 2022; Neubauer and Zieger 2022).

Za główne komórki uczestniczące w formowaniu patologicznej neointymy uważa się VSMCs oraz komórki w typie VSMCs. Zatem jest to kolejna grupa warta omówienia w kontekście ISR.

Liczne, wskazane wyżej sygnały biologiczne, pochodzące z ECs, PLTs oraz MCs, oddziałują na VSMCs. W rezultacie tracą one swój spoczynkowy fenotyp kurczliwy, radykalnie zwiększając tempo proliferacji. Uczestniczą w przebudowie ECM, syntezując znaczne ilości jej składników, takich jak kolagen czy fibronektyna. Jednocześnie nabyta zdolność modyfikacji

ECM ułatwia im migrację z błony środkowej do tworzącej się neointimy. Aktywowane VSMCs samodzielnie wytwarzają znaczne ilości czynników wzrostu, takich jak TGF- β , które zwiększają proliferację i migrację rezydujących w przydanie fibroblastów. Te z kolei ulegają przekształceniu, tworząc populację komórek w typie VSMCs – miofibroblastów, które współtworzą z VSMCs przerośniętą, pogrubiałą, patologiczną błonę wewnętrzną. Ustąpienie stanu zapalnego, a także przywrócenie właściwej funkcji śródbłonna staje się warunkiem koniecznym, aby po podjętych przez VSMCs swoistych próbach odbudowy uszkodzeń, możliwe było wyhamowanie tempa ich proliferacji i ich powrót do stanu spoczynkowego (Clare et al. 2022).



Rys. 10 Odcinek CA, uprzednio poddany PCI, w którym rozwinęła się restenoza w stencie (ISR, z ang. *in-stent restenosis*), skutkująca nawrotem zwężenia. Widoczna jest dysfunkcyjna, obnażona warstwa śródbłonna ①, pod którą widoczne są intensywnie dzielące się VSMCs ②, jednocześnie produkujące zmodyfikowaną ECM ③. Migrujące VSMCs stanowią główne komórki odpowiedzialne za przerost neointimy (NIH, z ang. *neointimal hyperplasia*). Towarzyszą im miofibroblasty ④, pochodzące z fibroblastów przydanki. Miejscami, eksponowane są prozakrzepowe składniki błony wewnętrznej, które sprzyjają adhezji i agregacji PLTs, co skutkuje uformowaniem zakrzepu ⑤. Wśród komórek neointimy widoczny jest element strukturalny stentu ⑥, a poniżej natywna blaszka miażdżycowa ⑦. Schemat autorski.

Podsumowując, rozwój ISR jest złożony i wieloetapowy. Obejmuje on początkowo obnażenie i utratę ECs, do czego dochodzi podczas PCI i implantacji stentu kardiovaskularnego. Zapoczątkowana przez proces miażdżycowy dysfunkcja ECs pogłębia się. Obejmuje ona nieadekwatne wytwarzanie substancji bioaktywnych, utratę właściwości przeciwpłytkowych i przeciwwakrzepowych, upośledzenie funkcji barierowej, nasilenie ekspresji genów prozapalnych, wzrost produkcji cząsteczek adhezyjnych i cytokin prozapalnych, zwiększoną rekrutację komórek układu odpornościowego, nadmierną i niekontrolowaną proliferację z przejściem EndoMT, stres oksydacyjny oraz stres redukcyjny. Tym zaburzeniom towarzyszy proces adhezji, aktywacji i agregacji PLTs, z jednoczesną ich degranulacją. Produkowane i uwalniane

przez ECs, WBCs oraz PLTs czynniki wzrostu i mitogeny promują proliferację i migrację VSMCs, które to jednocześnie intensywnie syntezują składniki ECM. Towarzyszą im inne komórki, które na skutek przemian fenotypowych nabywają cech VSMCs (w tym miofibroblasty, komórki mezenchymalne). Wszystkie omówione procesy prowadzą w rezultacie do pogrubienia błony wewnętrznej, NIH i neomiażdżycy – patrz Rys. 10.

Kombinacja wyżej wskazanych procesów i ich współzależności wskazuje na złożoność mechanizmu ISR, który w dalszym ciągu nie został w pełni poznany. ISR pozostaje istotnym powikłaniem interwencji naczyniowej.

1.3.2 Wybrane efekty molekularne i komórkowe zależne od interleukiny 4 w okresie przed- i poimplantacyjnym

IL-4 wydzielana jest głównie przez wybrane subpopulacje limfocytów T (w tym Th2 oraz naturalnych zabójców – NKT, z ang. *natural killer T cells*), bazofile i komórki tuczne (in. mastocyty). Spośród typowych czynników indukujących produkcję IL-4 wskazać należy kostymulację wynikającą z oddziaływania CD40L/CD40. Z kolei czynniki, takie jak IFN- γ czy IL-12, hamują wytwarzanie omawianej cytokiny (Chandramohan et al. 2017; Mak and Saunders 2006; Shoenfeld 2017).

Wyróżnia się dwa typy receptorów IL-4 (IL-4R, z ang. *interleukin 4 receptor*) – typ I, charakteryzujący się wysokim powinowactwem, obecny na komórkach hematopoetycznych oraz typ II o niskim powinowactwie, wykazany na innych typach komórek. Za pośrednictwem IL-4R typu I, aktywowane są trzy możliwe szlaki sygnałowe, w tym szlak związany z immunoregulacją i dwie ścieżki odpowiedzialne za regulację proliferacji i przeżycia komórek. Co ciekawe, w szlaku sygnalizacyjnym związanym z immunoregulacją pośredniczy przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji (STAT, z ang. *signal transducer and activator of transcription*) 6, który rozpoznaje sekwencję różniącą się o jeden nukleotyd od tej, rozpoznawanej przez STAT1. Jako że STAT1 jest czynnikiem transkrypcyjnym zależnym od IFN- γ , wspomniane podobieństwo w rozpoznanych motywach DNA może tłumaczyć antagonizm działania IL-4 i IFN- γ (patrz dalej). Z pobudzenia IL-4R wynika również aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego *kappa B* (NF- κ B, z ang. *nuclear factor kappa B*), białek należących do rodziny *forkhead box O* (FOXO, z ang. *forkhead box O proteins*) czy białek c-myc i c-fos, co w ogólnym rozrachunku wpływa na procesy komórkowe związane z wyżej wspomnianą proliferacją, różnicowaniem, apoptozą, cyklem komórkowym i naprawą DNA (Chandramohan et al. 2017; Mak and Saunders 2006; Shoenfeld 2017).

Spośród wielu biologicznych efektów zależnych od IL-4 wymienić należy (Chandramohan et al. 2017; Mak and Saunders 2006; Shoenfeld 2017):

- (1) wpływ na różnicowanie i wzrost podzbioru komórek Th2,
- (2) stymulację wzrostu i różnicowania komórek B, z jednoczesną indukcją MHC klasy II i regulacją procesu przełączania klas przeciwciał,
- (3) wpływ na wzrost mastocytów i regulację odpowiedzi alergicznej,
- (4) hamowanie wydzielania prozapalnych chemokin i cytokin (w tym TNF- α i IL-1 β) przez MCs, upośledzenie ich zdolność do wytwarzania reaktywnych pośrednich produktów tlenu i azotu oraz blokada indukowanej przez IFN- γ ekspresji cząsteczek adhezyjnych, takich jak ICAM-1 i selektyna E.

Przedstawione powyżej fakty decydują o tym, że IL-4 z pewnością można uznać za jedną z najsilniejszych i plejotropowo działających cytokin w organizmie, tym bardziej że ekspresja IL-4R obserwowana jest w wielu, różnorodnych typach komórek, a której rola skupia się na antagonizowaniu efektów indukowanych przez IFN- γ .

Przeprowadzone badania, oceniające stężenie wybranych cytokin w surowicy pacjentów, którzy przeszli PCI z zastosowaniem DES dostarczyło ciekawych wyników w kwestii wybranych cytokin, w tym też IL-4. Otóż, przedoperacyjny poziom IL-4 był obniżony u tych pacjentów, u których rozwinęła się ISR w przeciągu 12 miesięcy od interwencji. Stężenie tej cytokiny w surowicy porównano z jej stężeniem określonym w grupie pacjentów, u których zmiany charakterystyczne dla ISR nie były obserwowane. Stąd wyciągnięto wniosek, że właściwy poziom IL-4 może negatywnie korelować z wystąpieniem powikłań po PCI. Co więcej, w tej samej pracy wykazano, że przedoperacyjny zwiększony poziom cytokin prozapalnych (w tym TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17A i IL-23) może służyć predykcji wystąpienia ISR. Pogarsza to rokowanie pacjenta z CHD poddawanych PCI z DES poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych w ECs, aktywację MCs, zwiększoną ekspresję metaloproteinaz czy poprzez pośredniczenie w negatywnych skutkach Ang II na naczyniu (Sun et al. 2020).

Liczne badania z wykorzystaniem IL-4 opierają się na próbach modulowania procesów immunologicznych w kierunku wygaszenia stanu zapalnego powstałego w miejscu wprowadzenia implantu. Dokonuje się tego poprzez zmianę polaryzacji makrofagów (patrz 1.1 Patomechanizm miażdżycy).

Nadmierny stan zapalny w miejscu wszczepienia implantu jest często przyczyną zaburzeń integracji biomateriału z okoliczną tkanką. MCs odgrywają tu szczególną rolę, a pożądane procesy gojenia rany i regeneracji tkanek wymagają specyficznych profili ich aktywacji. We wczesnym stadium po implantacji pojawia się ostry stan zapalny, któremu towarzyszą komórki fenotypu M1. Jednak pojawienie się komórek fenotypu M2 może załagodzić ten stan, jednocześnie sprzyjając naprawie uszkodzonych tkanek. W przytoczonym badaniu wytworzono

nanorurki z ditlenku tytanu. Nanorurki wypełniono przeciwzapalną IL-4, a następnie pokryto hydrożelem z karboksymetylochitozanu usieciowanego genipin, który z kolei zawierał prozapalną cytokinę – INF- γ . Uzyskano w ten sposób nośniki, które były w stanie aktywować prozapalny fenotyp M1 poprzez uwalnianie IFN- γ w ciągu pierwszych kilku dni, a następnie indukować przeciwzapalny fenotyp M2 przez dostarczanie IL-4 w późniejszym okresie. Biomateriał zawierający jedynie IL-4 również był zdolny do modulowania transformacji M1 do M2, chociaż ze słabszym efektem niż ten zawierający zarówno IL-4 i IFN- γ . Ta obserwacja wynikała z mniejszej liczby MCs w miejscu działania biomateriału. Omówiony biomateriał został zaproponowany w kontekście osteoimplantów. Co ciekawe, obecność IL-4 uwalnianej z nanorurek (w porównaniu do nanorurek bez IL-4) pozwoliła obserwować zwiększoną ekspresję przeciwzapalnej Arg-1 oraz IL-10, co potwierdziło skuteczność nanorurek w kontekście modulowania procesów immunologicznych w kierunku wygaszenia stanu zapalnego także i w późniejszym okresie po implantacji. Chociaż wpływ modulacji IL-4 na przełączanie komórek M1 na M2 w protokole przedstawionym w artykule był nieco słabszy niż wpływ nanorurek z IL-4 i INF- γ , to można oczekiwać, że nośnik z samą IL-4 wykaże dobrą zdolność immunomodulacyjną wskutek obecnej stymulacji zapalnej zainicjowanej przez początkowy uraz lub implantację. Taka sytuacja występuje niewątpliwie w przypadku postępującej miażdżycy oraz implantacji stentu (Gao et al. 2018; M. Li et al. 2018).

Podobne podejście zaprezentowano w kolejnej przytoczonej pracy. Opracowano powłokę na bazie chitozanu i siarczanu dermatanu, którą naniesiono warstwowo na polipropylenową siatkę. W kolejnym kroku nałożono warstwy na bazie siarczanu dermatanu z którym związane były cząsteczki IL-4. W ten sposób na powierzchni materiału uzyskano jednolitą powłokę z eksperymentalnie potwierdzonym równomiernym rozłożeniem IL-4. Testy wykazały, że ilość i czas uwalniania IL-4 z powlekanych implantów mogą być modyfikowane w oparciu o liczbę warstw powlekających implant. Badania *in vitro* wykazały, że implanty pokryte IL-4 promowały polaryzację MCs do fenotypu M2. Co więcej, po obróbce i sterylizacji implantu, bioaktywność IL-4 została utrzymana. Przeprowadzone badania *in vivo* pozwoliły stwierdzić, że myszy z wszczepionymi implantami pokrytymi IL-4 wykazywały zwiększony odsetek komórek M2 i zmniejszony odsetek M1 w miejscu styku tkanki z implantem. Zmiany te były skorelowane ze zmniejszonym tworzeniem torebki włóknistej otaczającej implant i lepszą jego integracją w dalszym etapie (Hachim et al. 2017).

IL-4 wprowadzoną do nanorurek tytanowych również naprzemiennie pokrywano alginianem sodu i chitozanem, sieciując z wykorzystaniem genipin i chlorku wapnia. Zbadano profil uwalniania IL-4 i odpowiedź komórkową MCs, wskutek oddziaływania z tak otrzymaną

strukturą. W modelowym roztworze biologicznym, tylko 20% IL-4 wykryto w ciągu pierwszych 3 dni. Uwalnianie cytokiny było wydłużone na kolejne 10 dni. Ocena ekspresji genów i sekrecji określonych białek w MCs wykazały, że otrzymana powłoka zawierająca IL-4 znacząco osłabiła ich aktywność prozapalną poprzez obniżenie poziomu mRNA i białek markerów stanu zapalnego. IL-4 była uwalniana w kontrolowany sposób z usieciowanych warstw biopolimerów, osadzonych na nanorurkach, co prowadziło do zależnej od czasu konwersji fenotypu MCs (Yiting Li et al. 2019).

Na koniec warto przytoczyć pracę, która powiązała zmiany fenotypowe MCs z obecnością cząsteczek microRNA, stanowiących endogenne, konserwatywne, niekodujące fragmenty RNA o długości 20–23 nukleotydów. Cząsteczki te uznawane są za negatywne regulatory ekspresji wybranych genów, co związane jest z ich zdolnością do swoistego blokowania translacji mRNA. Udokumentowano dodatkowo istotny ich wpływ na rozwój i progresję NIH, stanowiącej podłoże ISR. W celu zgłębienia zagadnienia, przeprowadzono badania na wyizolowanych mysich MCs otrzewnowych i szpikowych. Stymulowano je LPS, w celu osiągnięcia klasycznie aktywowanych MCs fenotypu M1, wykazujących charakterystyczne markery (w tym TNF- α , IL-6 oraz COX-2). Z kolei traktowanie komórek IL-4 pozwoliło uzyskać alternatywnie aktywowany fenotyp M2 o markerach IL-10, PPAR γ oraz Mrc1. Na tym etapie stwierdzono, że ekspresja miR-150 — prekursora microRNA — była znacząco obniżona w komórkach fenotypu M1, a podwyższona w komórkach fenotypu M2. Co więcej, niedobór miR-150 sprzyjał znacznej regulacji w górę ekspresji markerów M1, a osłabiał ekspresję markerów M2. Niedobór miR-150 znacząco promował także zmiany fenotypowe, migrację i proliferację VSMCs, które także partycypują w NIH (patrz 1.1 Patomechanizm restenozy w stencie), a są stymulowane przez czynniki produkowane przez MCs fenotypu M1. Wykazano, że zachowanie VSMCs może być niezależne od typu polaryzacji MCs. W kolejnych eksperymentach w ramach przywołanej pracy, z udziałem myszy z nokautem miR-150, u których przeprowadzono zabieg chirurgiczny celowo uszkodzający tętnicę szyjną zaobserwowano, że niedobór miR-150 dramatycznie zaostriął przerost neointymy w 7. i 14. dniu po zabiegu, w porównaniu z myszami kontrolnymi (bez nokautu miR-150). Poziomy ekspresji markerów fenotypu M1 były znacząco podwyższone w pobranych tętnicach szyjnych u myszy z deficytem miR-150, w porównaniu z tymi, określonymi u myszy kontrolnych. Stąd wyciągnięto wniosek, że deficyt miR-150 osłabia alternatywną aktywację MCs, a także wpływa na VSMCs, co w rezultacie może sprzyjać NIH i ISR (Qiu et al. 2020).

Podsumowując, funkcjonalizacja implantów poprzez wprowadzenie IL-4 może sprzyjać lepszemu integracji implantu poprzez wygaszenie stanu zapalnego, kluczowego procesu

przyczyniającego się do rozwoju miażdżycy i ISR. W głównej mierze bazuje to na indukcji w zgromadzonych w zmianach chorobowych MCs przeciwzapalnego ich fenotypu M2. Pociąga to szereg innych efektów biologicznych, w tym także modyfikację lokalnego środowiska CA. Zatem, motywuje to do podjęcia prób opracowania stentów wzbogaconych o IL-4, przez co implanty naczyniowe mogą zyskać ciekawą właściwość, zdolną do wpływania bezpośrednio na komórkowy i pośrednio na molekularny patomechanizm CHD.

1.3.3 Wybrane efekty molekularne i komórkowe zależne od interleukiny 10 w okresie przed- i poimplantacyjnym

Produkcja i wydzielanie IL-10 indukowane jest obecnością cytokin prozapalnych (w tym TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12), które w tym celu aktywują monocyty, MCs, limfocyty Th2, ale również i limfocyty B, eozynofile, mastocyty, keratynocyty, hepatocyty i kilka innych typów komórek ustroju. Do nasilenia produkcji IL-10 przyczynić się mogą również — poza cytokinami prozapalnymi — inne bodźce, takie jak inwazja wewnątrzkomórkowych patogenów, niedotlenienie czy nawet promieniowanie UV (Kubo et al. 2017; Mak and Saunders 2006; Markey et al. 2019; Shouval et al. 2014).

Heterodimerski receptor dla IL-10 (IL-10R, z ang. *interleukin 10 receptor*), złożony z łańcucha IL-10R1 oraz IL-10R2, ulega ekspresji w komórkach hematopoetycznych, niemniej jednak jego ekspresja obserwowana jest również w obrębie innych typów komórek. W przypadku szlaku sygnalizacyjnego zależnego od IL-10 — podobnie jak dla IL-4 — obserwuje się swoistego rodzaju powiązania z prozapalną cytokiną, dokładniej z IFN- γ . W tym przypadku to domena zewnątrzkomórkowa łańcucha IL-10R1 przypomina tę, która występuje w receptorach swoistych dla IFN- γ . Białka, które pośredniczą w transdukcji sygnału zależnego od IL-10R są fosforylowane w różnym stopniu, w różnych typach komórek, z czego wynikają zróżnicowane efekty biologiczne tej cytokiny (Kubo et al. 2017; Mak and Saunders 2006; Markey et al. 2019; Shouval et al. 2014).

Spośród ważniejszych bioaktywności IL-10 można przytoczyć następujące, IL-10 odpowiednio (Kubo et al. 2017; Mak and Saunders 2006; Markey et al. 2019; Shouval et al. 2014):

- (1) hamuje aktywowaną przez NF- κ B transkrypcję genów kodujących cytokiny prozapalne (w tym TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12), ukierunkowując swój wpływ na MCs, neutrofile, eozynofile i mastocyty. Skutkuje to wyhamowaniem reakcji zapalnych. Istnieją również dowody na to, że IL-10 może destabilizować mRNA tych cytokin, w tym nawet i własne mRNA,
- (2) hamuje zdolność MCs do wybuchu tlenowego bądź analogicznych reakcji zależnych od związków azotu,

- (3) promuje reakcje zależne od limfocytów Th2 poprzez wpływ na ich różnicowanie i hamowanie wydzielania IL-2 i IFN- γ przez subpopulację Th1,
- (4) obniża ekspresję MHC klasy II i B7 na komórkach prezentujących antygen (APC, z ang. *antigen-presenting cells*), tym samym jeszcze bardziej osłabiając odpowiedź limfocytów Th1,
- (5) wspomaga proliferację i aktywność cytotoksyczną limfocytów Tc oraz NK,
- (6) promuje wzrost limfocytów B, zwiększając w nich ekspresję MHC klasy II i nasilając produkcję swoistych immunoglobulin,
- (7) poprzez regulację w górę ilości receptorów dla fragmentu Fc przeciwciał w MCs, nasila zdolności tych komórek do zależnej od przeciwciał cytotoksyczności (ADCC, z ang. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*).

W związku z powyższym można stwierdzić, że IL-10 modyfikuje zarówno mechanizmy odporności wrodzonej, jak i nabytej. Stanowi to o jej działaniu immunosupresyjnym i immunostymulującym, które uzależnione jest od typu komórek z nią oddziałujących. Co więcej, pomimo iż domena zewnątrzkomórkowa IL-10 strukturalnie przypomina IFN- γ , te dwie cytokiny cechuje kompletnie odmienną rolę w organizmie (patrz wyżej).

Analiza ekspresji IL-10R wykazała, że w ECs w stanie spoczynku oznaczalna jest niewielka ilość mRNA IL-10R. Niemniej jednak ekspozycja tych komórek na działanie cytokin prozapalnych — takich jak TNF- α , IL-1 β czy IFN- γ — skutkuje wyraźnym wzrostem poziomu mRNA IL-10R. Efekt ten staje się wyraźniejszy, gdy wskazane powyżej czynniki prozapalne stymulują ECs jednocześnie. Na poziomie białka, czynniki te także wywołują wzrost ekspresji IL-10R. Co ciekawe, zaobserwowano również, że inkubacja z witaminą D3 także skutkuje przejściowym wzrostem zarówno mRNA, jak i białka badanego receptora (Cattaruzza et al. 2003).

Komórki kondycjonowane czynnikami wywołującymi ekspresję IL-10R poddano działaniu IL-10. Spowodowało to zależny od czasu wzrost zarówno mRNA syntetazy tlenu azotu 3 (NOS-3, z ang. *nitric oxide synthetase 3*), jak i białka NOS-3. Wykazano również, że IL-10 jest zdolna do przeciwdziałania zmianom w ECs wywołanym przez kondycjonujące je cytokiny prozapalne w odniesieniu do NOS-3. Po 12-godzinnej inkubacji ECs z mieszaniną cytokin prozapalnych (czyli IL-1 β , TNF- α i IFN- γ) — celem wzrostu ekspresji IL-10R — oraz następczej 48-godzinnej inkubacji ECs odpowiednio z IL-10, IL-10 z mieszaniną cytokin prozapalnych i samą mieszaniną cytokin prozapalnych, wykazano, że nastąpił wyraźny wzrost aktywności NOS-3 po stymulacji komórek IL-10. Wzrost aktywności NOS-3 nastąpił również w komórkach stymulowanych jednocześnie IL-10 i mieszaniną cytokin prozapalnych.

Najniższą aktywnością NOS-3 charakteryzowały się komórki ciągle ekspozowane na czynniki prozapalne (bez dodatku IL-10). W tym eksperymencie aktywność NOS-3 była oceniana pośrednio, poprzez oznaczenie stężenia azotynów w medium hodowlanym. W przytoczonej pracy potwierdzono również, że IL-10 wywiera wpływ na genom głównie poprzez STAT3. Blokada funkcji STAT3 praktycznie zniosła indukowaną przez IL-10 ekspresję NOS-3 (Cattaruzza et al. 2003).

Istotne wyniki, uzasadniające wprowadzenie IL-10 na powierzchnie stentu przedstawiono także w innej pracy. W eksperymencie na zwierzęcym modelu denudacji tętnicy szyjnej, u myszy z genetycznym nokautem IL-10, obserwowano znacznie opóźniony wzrost śródbłonna i zwiększony NIH, w porównaniu do myszy bez nokautu genu tej cytokiny. Stąd wyciągnięto wniosek, że IL-10 może negatywnie korelować z wystąpieniem ISR po uszkodzeniu ściany naczynia. W następnym kroku myszy traktowano rekombinowaną IL-10. Myszy z uszkodzonym naczyniem, traktowane rekombinowaną IL-10, w porównaniu do grupy kontrolnej, zareagowały zmniejszeniem grubości neointymy z jednoczesnym przyspieszeniem regeneracji uszkodzonego śródbłonna (Verma et al. 2016).

Na kolejnym etapie badań wykazano, że TNF- α ujemnie reguluje proliferację ECs, a traktowanie ECs rekombinowaną IL-10 odwraca działanie tego czynnika prozapalnego, nasilając ich proliferację. Analogiczną analizę przeprowadzono w stosunku do VSMCs. Jako że TNF- α wykazuje właściwości mitogenne dla komórek VSMCs, indukując ich proliferację, inkubacja tych komórek z rekombinowaną IL-10 pozwala ograniczyć nasilone tym czynnikiem ich podziały. Obecność TNF- α wpłynęła również na intensywniejsze wiązanie monocytów z ECs, gdzie wprowadzenie do środowiska IL-10 znacząco ograniczyło obserwowaną interakcję monocytów ze śródbłonkiem. ECs traktowane TNF- α miały także zahamowany cykl komórkowy. Obserwowano wzrost komórek w fazie G0/G1 i redukcję ich liczby w fazie S. Jednoczesne traktowanie tych komórek IL-10 odwróciło wskazane stosunki sugerując, że tak wywołane zatrzymanie cyklu komórkowego może zostać odwrócone dzięki obecności IL-10. Także ekspresja cykliny A — pośredniczącej w postępie cyklu komórkowego — po traktowaniu IL-10 wzrosła (a była zahamowana działaniem TNF- α) (Verma et al. 2016).

Z powyżej omówionych prac wynika, że ekspresja genu IL-10R w ludzkich ECs jest indukowana przez cytokiny prozapalne, co nasuwa dalsze wnioski – ekspresja tego receptora, a także odpowiedź na IL-10, będzie zwiększona w stanach chorobowych, cechujących się przewlekłym stanem zapalnym. Za przykład takiego stanu może posłużyć miażdżycy, a także poimplantacyjne zdarzenia niepożądane. Ostatecznie, cytokina ta zdolna jest do pozytywnej regulacji proliferacji ECs, z jednoczesnym ograniczeniem ekspansji VSMCs, które partycypują

w NIH i ISR. Za jej pośrednictwem ograniczeniu ulega rekrutacja MCs do miejsc, gdzie warstwa śródbłonka została uszkodzona, a także możliwy jest do zaobserwowania korzystny wpływ na cykl komórkowy ECs. Obserwacje te przemawiają za tym, aby oprócz strategii terapeutyczne miażdżycy oraz działania zapobiegające ISR o niezwykle ciekawe właściwości IL-10.

1.4 Chemia proponowanej powłoki

1.4.1 Polidopamina – wysoce adhezyjny i reaktywny chemicznie materiał bazowy

Jak udowodniono powyżej (patrz 1.2 Stenty wieńcowe – jedna ze strategii terapeutycznych w przebiegu miażdżycy), w kontekście projektowania powłoki służącej modyfikacji powierzchni stentów kardiowaskularnych, niezwykle ważny jest dobór właściwego materiału bazowego do jej otrzymania. Dla potencjalnego materiału postawiono dwa zasadnicze wymagania technologiczne:

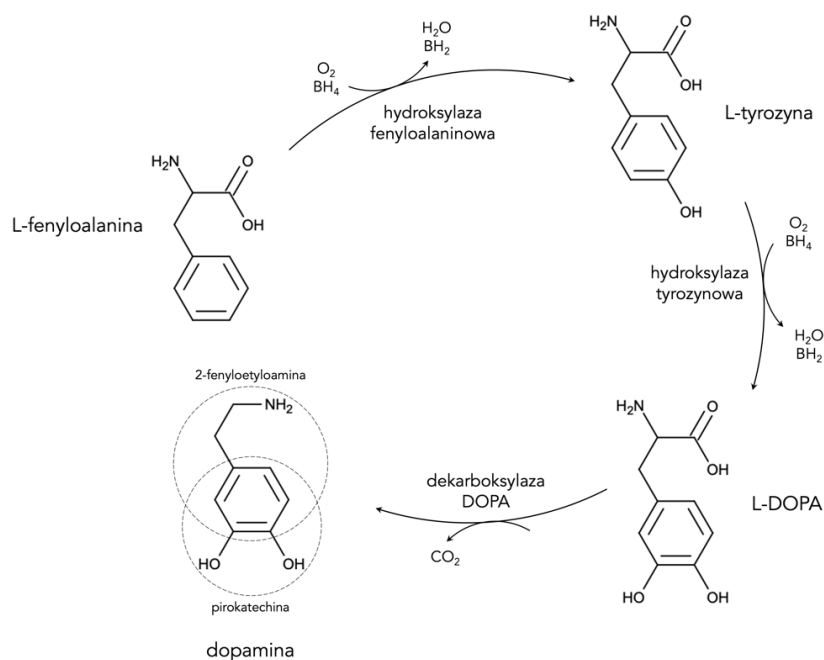
- (1) materiał powinien pokryć powierzchnię stentu, wysoce do niej przylegać, nie wymywać się zarówno w procesie funkcjonalizacji, jak i — w przyszłości — w miejscu docelowego zastosowania (gdzie będzie podatny na ciągły przepływ krwi),
- (2) wprowadzać na powierzchnię stentu odpowiednie grupy funkcyjne za pośrednictwem których możliwe będzie związanie wybranych cząsteczek przeciwzapalnych (bezpośrednio bądź za pomocą techniki sieciowania, z ang. *chemistry of crosslinking*).

Dodatkowym atutem będzie łatwość pracy ze związkiem, co może zapewnić optymalność przyszłych procesów technologicznych. W kontekście właściwości biologicznych, stanowiącym kryterium konieczne, jest jego biokompatybilność, rozumiana jako zdolność do wywierania korzystnego — ewentualnie neutralnego — wpływu na żywy system, bez wywoływania patologicznych odpowiedzi z tego układu (nie indukować reakcji toksycznej ani immunologicznej w kontakcie z tkanką oraz nie wywoływać hemolizy, gdy oddziałuje z płynami ustrojowymi).

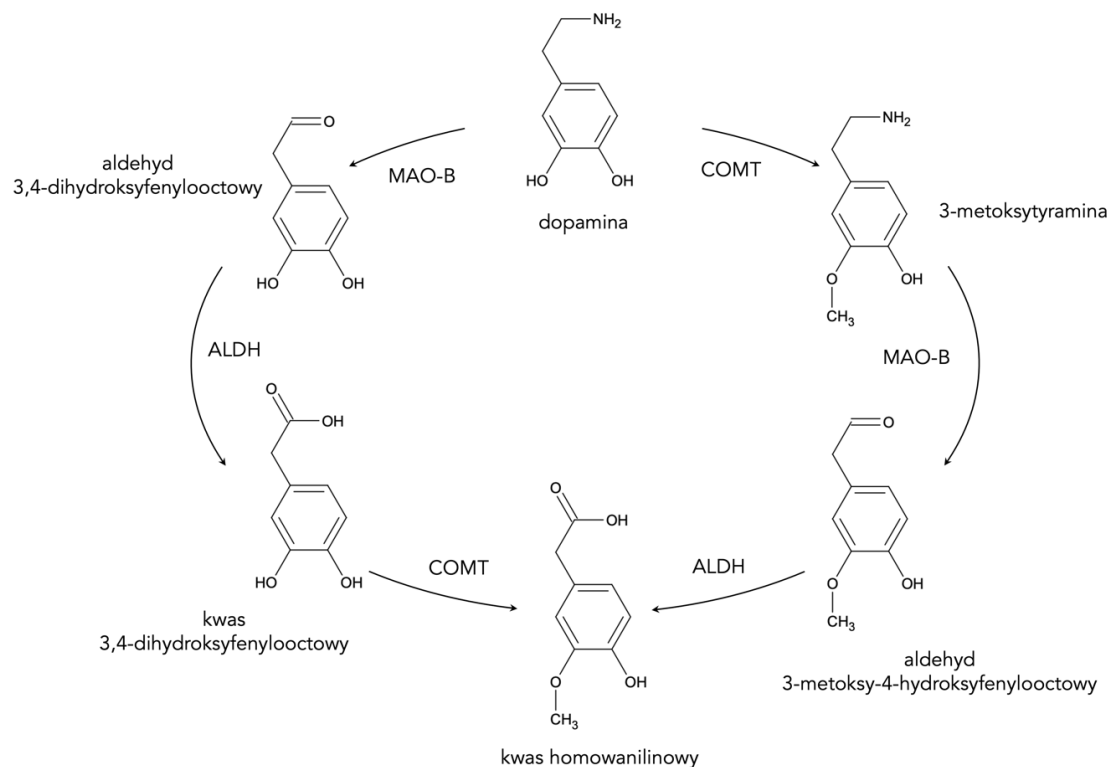
Uwzględniając powyżej postawione kryteria, wytypowano materiał, otrzymywany w wyniku polimeryzacji dopaminy (DA, z ang. *dopamine*) – polidopaminę (pDA, z ang. *polydopamine*). Związek ten wykazuje interesujące z punktu widzenia postawionych wyżej wymagań, właściwości fizykochemiczne i biologiczne (patrz dalej).

DA (in. 3,4-dihydroksyfenyloetyloamina) pod względem struktury chemicznej stanowi najprostszą przedstawicielką spośród katecholamin. Przemawia za tym obecność pirokatechiny (pierścienia benzenowego z przyłączonymi dwiema grupami hydroksylowymi w pozycji *orto*). Do pirokatechiny przyłączona jest, poprzez łańcuch etylowy, grupa aminowa. Obecność

pierścienia benzenowego z przyłączoną grupą aminową pozwala zaklasyfikować DA także do pochodnych 2-fenyletyloaminy (Liebscher 2019) – patrz Rys. 11.



Rys. 11 Szlak wewnątrzustrojowej syntezy dopaminy (DA, z ang. *dopamine*) z aminokwasów (bezpośrednio z L-tyrozyny oraz pośrednio z L-feniloalaniny) przy udziale odpowiednich enzymów i kofaktorów (gdzie BH_4 oznacza tetrahydrobiopterinę, przekształcaną w BH_2 , czyli w dihydrobiopterinę). Zwrócić należy uwagę na strukturę chemiczną DA (in. 3,4-dihydroksyfenyletyloaminy). Wskazano elementy strukturalne pozwalające zaklasyfikować DA odpowiednio do katecholamin bądź pochodnych 2-fenyletyloaminy. Opracowanie własne.



Rys. 12 Wewnątrzustrojowy metabolizm dopaminy do kwasu homowanilinowego (HVA, z ang. *homovanillic acid*), filtrowanego i wydalanego wraz z moczem. Oznaczenia: dehydrogenaza aldehydowa (ALDH, z ang. *aldehyde dehydrogenase*), katecholo-O-metylotransferaza (COMT, z ang. *catechol-O-methyltransferase*), monoaminoooksydaza B (MAO-B, z ang. *monoamine oxidase B*). Opracowanie własne.

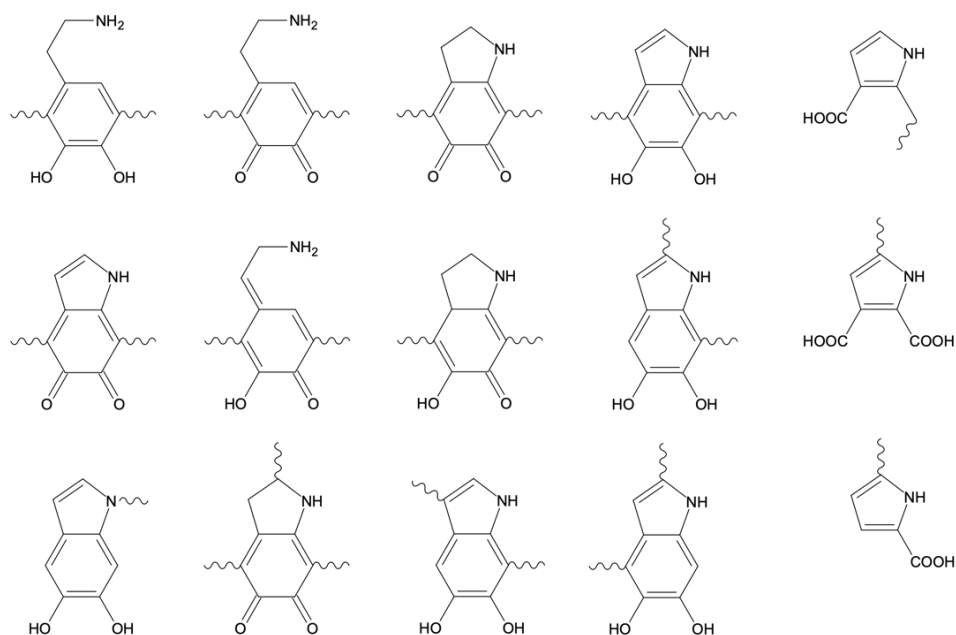
DA naturalnie występuje w organizmie człowieka. Wytwarzana jest bezpośrednio z aminokwasu tyrozyny (pośrednio również z fenyloalaniny) za pośrednictwem hydroksylazy tyrozynowej, a następnie dekarboksylazy 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA, z ang. *3,4-dihydroksyphenyloalanine*) oraz odpowiednich kofaktorów (patrz Rys. 11). Reakcje te zachodzą w neuronach dopaminergicznych, gdzie DA przechowywana jest w dedykowanych pęcherzykach synaptycznych. Kwasowe środowisko tych pęcherzyków zapewnia stabilność DA oraz zapobiega jej oksydacji (Klein et al. 2019). Brak sekwestracji DA w pęcherzykach skutkuje następczym jej metabolizmem z udziałem monoaminooksydazy B (MAO-B, z ang. *monoamine oxidase B*) i dehydrogenazy aldehydowej (ALDH, z ang. *aldehyde dehydrogenase*). Dalsza degradacja DA zachodzi dzięki katecholo-O-metylotransferazie (COMT, z ang. *catechol-O-methyltransferase*). Końcowym produktem tych przemian jest kwas homowanilinowy (HVA, z ang. *homovanillic acid*), który jest filtrowany przez nerki i wydalany wraz z moczem (Klein et al. 2019) – patrz Rys. 12.

Warto podkreślić, że DA w dużych ilościach z łatwością może być otrzymywana za pośrednictwem prostych metod laboratoryjnych (takich jak redukcja nitroetanów czy acetonitryli aryłu), co zapewnia stały dostęp do związku wyjściowego do otrzymania powłoki (Liebscher 2019).

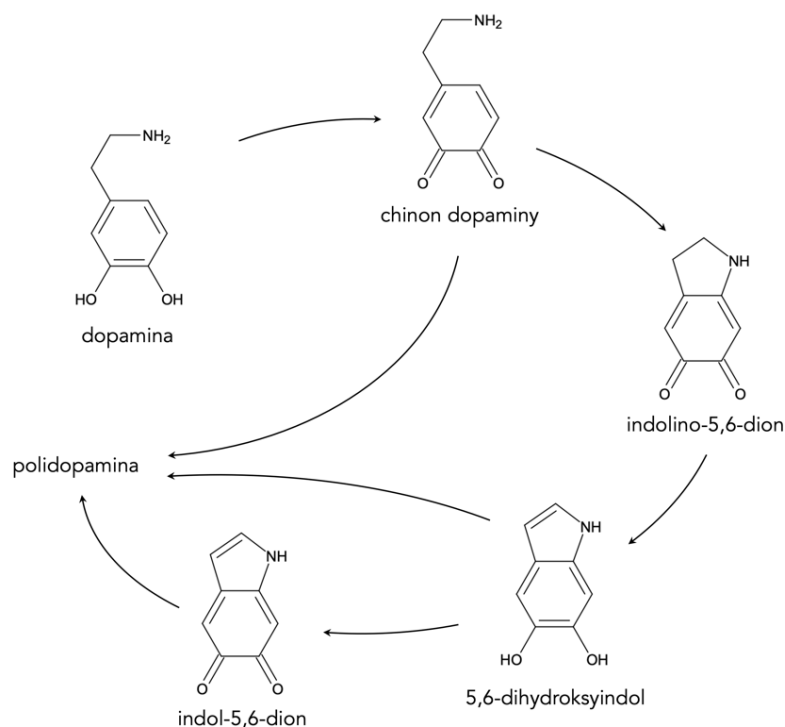
Dopamina w organizmie pełni funkcję neurotransmitera i neuromodulatora. Poprzez pobudzenie swoistych receptorów metabotropowych sprzężonych z białkiem G, wywołuje wzrost lub spadek poziomu drugiego przekaźnika, a zarazem wyzwala lub blokadę określonych szlaków sygnałowych w komórce (Klein et al. 2019). W rezultacie, bazujący na dopaminie układ dopaminergiczny, odgrywa szczególną rolę w licznych, złożonych funkcjach ustroju, w tym kontroli motorycznej, zdolności uczenia się, zachowania uwagi i motywacji, ekspresji emocji, regulacji snu, zdolnościach poznawczych, instynktach matczyńskich i reprodukcyjnych, a także we właściwym funkcjonowaniu różnych narządów i układów (narządy zmysłów, układ pokarmowy, układ sercowo-naczyniowy, układ wydalniczy, układ odpornościowy, układ hormonalny i in.) (Alm 2021; Klein et al. 2019).

Jak już wspomniano, DA podatna jest na spontaniczne utlenianie. Produkty tego procesu zwykle się nazywają polidopaminami, mimo występowania znacznych różnic strukturalnych w zależności od sposobu syntezy (Liebscher 2019) – patrz dalej.

Struktura pDA nie została w pełni poznana i scharakteryzowana. Liczne metody analityczne sugerują, że pDA ma naturę polimeru, przy czym dodatkowo stanowi mieszaninę oligomerów różniących się nie tylko długością łańcucha, ale także składem różnych jednostek monomerycznych (Liebscher 2019) – patrz Rys. 13.



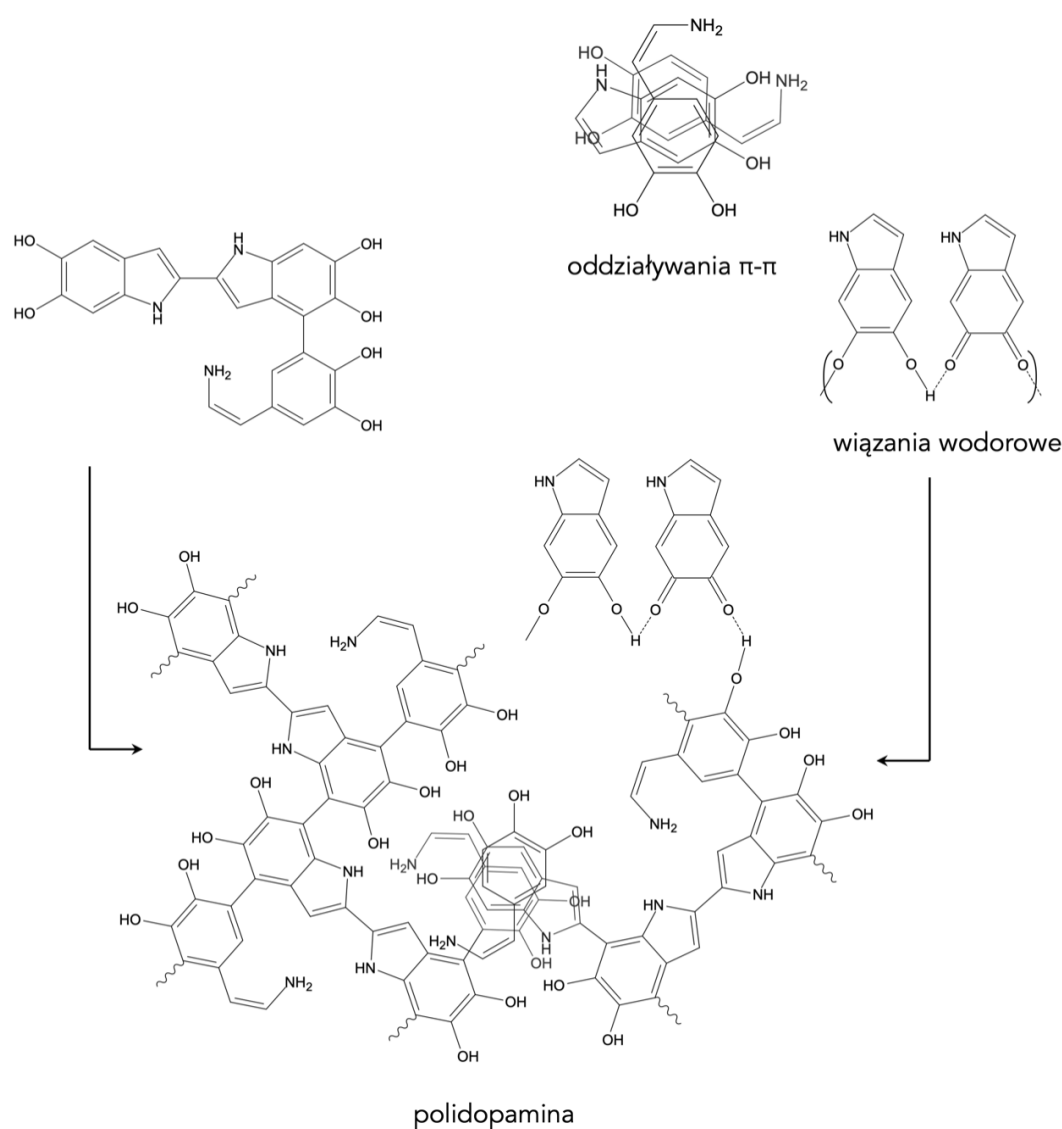
Rys. 13 Jednostki monomeryczne tworzące pDA wraz z wskazanymi prawdopodobnymi miejscami wiązania między nimi. Związki te łączą się ze sobą poprzez wiązania C–C między pierścieniami benzenu. Możliwe są dodatkowo połączenia między jednostkami za pośrednictwem wiązania w pozycji 2 lub 3 indolu, połączenia potrójne C–C indolin oraz wiązania C–N. W mniejszym stopniu możliwe jest wytworzenie grupy karboksylowej jako skutek zniszczenia pierścienia benzenowego indolu. Opracowanie własne.



Rys. 14 Uproszczony szlak tworzenia polidopaminy (pDA, z ang. *polydopamine*) poprzez utlenianie DA. W początkowych etapach polimeryzacji powstaje chinon dopaminy, który może tworzyć kilka tautomerycznych struktur (w tym indolino-5,6-dion). Dalsza dehydrogenacja prowadzi do tworzenia 5,6-dihydroksyindolu (DHI, z ang. *dihydroxyindole*) oraz indol-5,6-dionu. Opracowanie własne.

Spośród zaprezentowanych jednostek monomerycznych, w początkowych etapach polimeryzacji powstaje chinon dopaminy, który może tworzyć kilka tautomerycznych struktur

(w tym indolino-5,6-dion). Dalsza dehydrogenacja prowadzi do tworzenia 5,6-dihydroksyindolu (DHI, z ang. *dihydroxyindole*) oraz indol-5,6-dionu – patrz Rys. 14. Te wszystkie pośrednie związki zaangażowane są w tworzenie form oligomerowych, łącząc się ze sobą poprzez wiązania C–C między pierścieniami benzenu. W strukturze pDA często powtarza się motyw trimeru złożonego z dwóch cząsteczek DHI i jednej DA. Możliwa wydają się też połączenia między jednostkami za pośrednictwem wiązania w pozycji 3 indolu (rzadziej w pozycji 2), połączenia potrójne C–C indolin, czy nawet wiązania C–N (Alfieri et al. 2018; Liebscher 2019). Ponadto zniszczenie pierścienia benzenowego struktur indolowych, zachodzące podczas procesów utleniania DA, może prowadzić do powstania reszt karboksylowych. Takie modyfikacje zachodzą jednak w mniejszym stopniu (Liebscher 2019).



Rys. 15 Schemat tworzenia struktur supramolekularnych. Na wstępnym etapie powstają wiązania kowalencyjne pomiędzy jednostkami monomerycznymi (patrz wyżej). W strukturze pDA często powtarza się motyw trimeru złożonego z dwóch cząsteczek DHI i jednej DA. Na dalszych etapach główną rolę odgrywają oddziaływania fizyczne (w tym wiązania wodorowe, oddziaływania π - π czy kation- π). Polidopamina zatem jest strukturą, którą tworzą jednostki monomeryczne (patrz wyżej) połączone wiązaniami kowalencyjnymi w różnych konfiguracjach, a w procesie agregacji powstają coraz większe formy, stabilizowane oddziaływaniami fizycznymi. Opracowanie własne.

Próba wyjaśnienia struktury pDA bierze również pod uwagę zjawisko tworzenia struktur supramolekularnych za pośrednictwem wiązań wodorowych, oddziaływań π - π czy kation- π (Cîrcu and Filip 2018; Jin et al. 2020; Liebscher 2019). Wykazano, że po wytworzeniu wiązań C–C na wczesnym etapie polimeryzacji DA, dochodzi do niekowalencyjnej agregacji pierwotnie utworzonych struktur (w tym trimerów opisanych wyżej) (Liebscher 2019).

Na koniec warto wspomnieć, że ze względu na występowanie grup zasadowych (grupa aminowa) i kwasowych (grupa hydroksylowa katecholu) niektóre jednostki monomeryczne mogą tworzyć jony obojnacze, co również sprzyja tworzeniu większych agregatów pDA (Liebscher 2019).

Spośród metod otrzymywania pDA, najpowszechniejszą i najprostszą jest autoutlenianie DA (zwykle chlorowodoru dopaminy) w wodnym roztworze tris(hydroksymetylo)aminoetanu i kwasu solnego (in. bufor Tris-HCl). W takich warunkach pDA tworzy ciemnobrązowy osad. Celem pokrycia ciała stałego warstwą pDA, autoutlenianie DA prowadzi się w obecności tego ciała. Niemniej jednak, duża część tworzącego się pDA będzie tworzyła agregaty w roztworze, które nie wiążą się z powierzchnią, z czego wynikają względnie duże straty związku bazowego (Liebscher 2019). Aby zwiększyć efektywność tego procesu polimeryzacji DA należy od samego początku prowadzić w obecności obiektu przeznaczonego do pokrycia. Wynika to z faktu, że efektywne zakotwiczenie pDA na powierzchni zachodzi na wczesnym etapie tworzenia pDA, kiedy jeszcze grupy aminoetylowe nie uległy cyklizacji. W przeciwieństwie, dojrzałe cząsteczki pDA stają się niechętne do zakotwiczenia na powierzchni. Takie działanie zapewnia większą efektywność procedury (Alfieri et al. 2018; della Vecchia et al. 2013).

Autoutlenianie DA zachodzi w przeciągu kilku godzin. Proces otrzymywania pDA można jednak przyspieszyć poprzez sonifikację, dodatek środków powierzchniowo czynnych (w tym dodecylosiarczan sodu, bromek heksadecylotrimetyloamoniowy), dodatek odczynników utleniających (w tym nadtlenek wodoru, nadmanganian potasu, nadjodan sodu, nadsiarczan amonu, siarczan miedzi (II) i in.), napromieniowanie mikrofalami lub UV czy światłem dziennym w obecności czynników uczulających, a także wprowadzeniem enzymów (w tym peroksydazy chrzanowej z nadtlenkiem wodoru). Modyfikacje sposobu otrzymywania pDA prowadzą do zwiększenia kinetyki reakcji, możliwości prowadzenia reakcji w środowisku obojętnym lub nawet kwasowym, w którym nie występuje proste utlenianie tlenem z powietrza, a także w rozpuszczalnikach organicznych, przez co można pokryć warstwą pDA materiały, które są nierozpuszczalne w wodzie lub wrażliwe na jej działanie. Zmiana warunków syntezy pDA często skutkuje otrzymaniem powłoki o zmienionych właściwościach fizycznych (w tym

gładkość, jednorodność, grubość, morfologia i in.). Niemniej jednak, głównym problemem procedur, w których dodawane są związki wspomagające zajście reakcji, jest zanieczyszczenie otrzymanej powłoki stosowanymi związkami lub ich pochodnymi (Liebscher 2019).

Charakteryzując pDA, warto pokrótce omówić właściwości fizyczne tego materiału. Jak zostało już wspomniane wyżej, pDA jest ciemnoczarnym ciałem stałym, nierozpuszczalnym w większości rozpuszczalnikach, wykazującym absorpcję promieniowania elektromagnetycznego w zakresie od UV do podczerwieni, z czego zaabsorbowana energia jest prawie całkowicie uwalniana bezpromieniście, wskutek odpowiedniej syntezy wykazuje fluorescencję, jest paramagnetykiem i jest hydrofilna. Zdolność do pokrywania większości rodzajów powierzchni jest najważniejszą cechą pDA. Cecha ta przypisywana jest grupom katecholowym i aminoetylowym występującym w strukturze pDA. Zmniejszenie liczby tych grup zmniejsza siłę adhezji polimeru do powierzchni. Niekowalencyjne oddziaływanie (patrz wyżej) również odgrywają rolę w wiązaniu pDA z powierzchnią. Ostatnią, szczególnie atrakcyjną w kontekście projektowania powłoki cechą pDA — obok jej zdolności do pokrywania materiałów — jest posiadane różnorodnych reaktywnych grup funkcyjnych, co umożliwia wprowadzanie w obrębie jej struktury dodatkowych jednostek (Liebscher 2019; Ye, Zhou, and Liu 2011).

Liczne prace podejmują temat wykorzystania pDA do funkcjonalizacji powierzchni powszechnie stosowanych implantów naczyniowych. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że pokrycie stentów warstwą pDA może promować proliferację ECs przy jednoczesnym ograniczeniu wzrostu VSMCs. W badaniach *in vivo* na modelu szczurzym wykazano jednocześnie, że tak opracowany stent istotnie zmniejsza prawdopodobieństwo ISR w porównaniu do zastosowanych BMS, stanowiących kontrolę (Hertault et al. 2021). W innym doniesieniu, silne adhezyjne właściwości pDA wykorzystano celem skutecznego związania cyklodekstryny, pełniącej funkcję rezerwuaru leków antyproliferacyjnych, co pozwalało opracować nową koncepcję DES. Zatem pDA stanowiła materiał, z jednej strony pokrywający powierzchnię stentu, z drugiej strony umożliwiający związane kolejnego, pożądanego składnika powłoki (Sobocinski et al. 2014). Wprowadzając siarczanu miedzi (II) podczas otrzymywania powłoki na bazie pDA, opracowano kolejną, jednoetapową strategię funkcjonalizacji stentów. Zaproponowana powłoka była zdolna generować NO *in situ* w wyniku katalitycznego rozkładu endogennych S-nitrozotioili nawet przez 30 dni, na poziomie zbliżonym do fizjologicznego. W pracy tej potwierdzono, opisane już powyżej zależności, jakoby powłoka na bazie pDA wykazywała selektywność wobec komórek naczyniowych, znacząco wzmacniając proliferację ECs, jednocześnie hamując wzrost i migrację VSMCs (F. Zhang et al. 2019). Dodatek pDA zwiększa znacząco hemokompatybilność tworzonych implantów lub urządzeń medycznych (F. Wu et al. 2016;

Xue et al. 2017). Powłoki na bazie pDA również znalazły zastosowanie w innej gałęzi implantologii. Wykorzystuje się korzystne właściwości pDA celem opracowania implantów kostnych (Tsai et al. 2014) lub lepszej ich osteointegracji (Xu et al. 2018).

Zatem, od czasów, gdy po raz pierwszy opisano powłokę otrzymywaną w wyniku polimeryzacji DA, zainteresowanie środowiska naukowego tym biomateriałem, inspirowanym bisiosem omulków, stale rośnie. Przyczyniają się do tego jej niezwykle interesujące w dziedzinie materiałów właściwości adhezyjne, bogactwo łatwo modyfikowalnych grup funkcyjnych oraz unikatowa aktywność biologiczna w stosunku do wybranych komórek. Podsumowując, pDA można z całą pewnością uznać za jeden z najbardziej wszechstronnych związków do powlekania niemal wszystkich typów materiałów. W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, powłokę na bazie pDA zdecydowano się wykorzystać jako materiał bazowy do wprowadzenia wybranych interleukin przeciwzapalnych na powierzchnię stentów kardiowaskularnych.

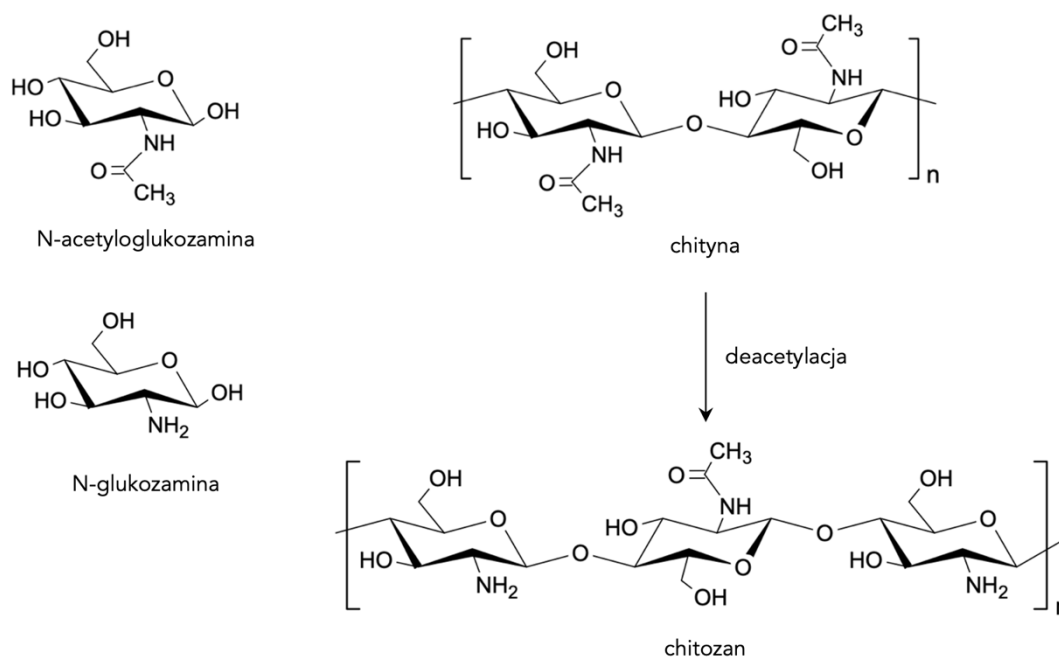
1.4.2 Teoria wiązania interleukin na powierzchni materiału bazowego

Jak zostało już wspomniane (patrz wyżej), uzyskana w wyniku autooksydacji DA powłoka pDA składa się z różnych jednostek monomerycznych – patrz Rys. 13. Wśród nich wyróżnić można oryginalnie zachowaną strukturę DA, ugrupowania chinonu dopaminy, indolino-5,6-dionu, DHI i in. Można zatem spodziewać się, że pDA będzie uczestniczyć w podobnych reakcjach jak jej bazowe jednostki (Liebscher 2019).

Najczęściej wykorzystywaną cechą w funkcjonalizacji powłoki na bazie pDA jest reaktywność ugrupowania chinonu dopaminy. Reagenty posiadające grupy funkcyjne, takie jak wolne grupy aminowe ($-NH_2$) lub wolne grupy tiolowe ($-SH$) mogą oddziaływać ze wspomnianym ugrupowaniem. Poprzez zmieszanie składników, w zasadowym środowisku, w temperaturze pokojowej, może zajść reakcja addycji Michaela i/lub reakcja z wytworzeniem zasady Schiffa, które skutkują utworzeniem kowalencyjnego wiązania między wykorzystanymi reagentami. Pozycja wiązania zależy od grupy funkcyjnej biorącej udział w wytworzeniu wiązania. Reakcja z udziałem grupy aminowej zachodzi preferencyjnie w pozycji 6 chinonu dopaminy jako wynik addycji Michaela lub w pozycji 6 indol-5,6-dionu, co możliwe jest dzięki wytworzeniu zasady Schiffa. Reakcja z udziałem grupy tiolowej zachodzi w pozycji 6 chinonu dopaminy lub w pozycji 7' indol-5,6-dionu, jako efekt reakcji addycji Michaela (S. Chen, Cao, and Feng 2014; Liebscher 2019). Omówione reakcje przedstawiono schematycznie (patrz Rys. 16).

W niniejszej rozprawie doktorskiej szczególne zainteresowanie wzbudziła właśnie ta zdolność pDA do reagowania z wolnymi grupami aminowymi i tiolowymi, których źródłem są aminokwasy składające się na cząsteczkę wybranej interleukiny.

polimerowe poprzez tworzenie wiązań β -1,4-glikozydowych (patrz Rys. 17) (Aranaz et al. 2021).



Rys. 17 Struktura chemiczna meru chityny – N-acetylglukozaminy oraz struktura chemiczna chityny. Chitozan powstaje w procesie deacetyljacji chityny, w wyniku którego część grup acetylowych zostaje usunięta. Skutkuje to znacznym zwiększeniem udziału wolnych grup aminowych w strukturze powstałego biopolimeru. Zatem można uznać, że chitozan jest kopolimerem złożonym z podstawowych dla chityny merów – N-acetylglukozaminy oraz z merów będących zdeacetylowaną formą N-acetylglukozaminy – N-glukozaminy. Opracowanie własne.

Obecność atomów azotu w strukturze chityny przyczynia się do powstania silnych międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, co skutkuje jej znaczną wytrzymałością mechaniczną. To dzięki tej właściwości, naturalnie wchodzi w skład egzoszkieletu skorupiaków, który mają zapewniać im oparcie, stanowić miejsce przyczepu mięśni, umożliwiając przez to poruszanie, a także pełnić funkcję ochronną. Chitozan powstaje z chityny w wyniku procesu jej deacetyljacji (patrz Rys. 17). Proces ten polega na usunięciu grup acetylowych poprzez traktowanie chityny stężonym wodorotlenkiem sodu. W wyniku tej reakcji, w łańcuchu polisacharydu pozostają wolne grupy aminowe. To właśnie obecność licznych, chemicznie reaktywnych grup aminowych decyduje o uniwersalności i wszechstronności zastosowań chitozanu. Te grupy również stały się istotnym obiektem zainteresowań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej (patrz dalej). Opisano wiele metod alkalicznej deacetyljacji chityny w których wykazano, że poziom deacetyljacji jest ściśle zależny od parametrów, w których zachodzi reakcja, a więc temperatury, ciśnienia bądź stężenia wodorotlenku sodu. W związku z tym poziom deacetyljacji może być ściśle kontrolowany (Aranaz et al. 2021; Beldowski et al. 2022; Rasweefali et al. 2021).

Podsumowując, można stwierdzić, że chitozan jest kopolimerem złożonym z podstawowych dla chityny merów – N-acetyloglukozaminy oraz z merów będących zdeacetylowaną formą N-acetyloglukozaminy – N-glukozaminy (patrz Rys. 17). Struktura chemiczna polimeru może charakteryzować się losowym bądź blokowym rozkładem N-acetyloglukozaminy i N-glukozaminy w obrębie cząsteczki (Aranaz et al. 2021; Beldowski et al. 2022; Rasweefali et al. 2021).

Chitozan jest słabą zasadą i nie jest rozpuszczalny w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych. Jednak jest rozpuszczalny w rozcieńczonych wodnych roztworach kwasów o $\text{pH} < 6.5$. Obecność jonów wodorowych w środowisku przekształca wolne grupy aminowe merów chitozanu w formę zjonizowaną. W celu neutralizacji tego ładunku niezbędne jest podanie chitozanu działaniu silnej zasady (Aranaz et al. 2021).

W niniejszej rozprawie doktorskiej, to właśnie obfitość grup aminowych w strukturze chitozanu zadecydowała o uwzględnieniu tego związku w procesie opracowywania koncepcji powłoki. Niemniej jednak chitozan, pochodne chitozanu i oligosacharydy chitozanu wykazały inne, bardzo ciekawe właściwości, równie korzystne z punktu widzenia miążdżycy, powikłań po PCI czy ogólnie implantologii. Pierwszą ciekawą cechą chitozanu i jego pochodnych jest działanie przeciwbakteryjne na różne mikroorganizmy (w tym bakterie czy grzyby), znacznie ograniczając ich wzrost po wprowadzeniu biopolimeru do pożywki. Sposób, w jaki wywierane jest wspomniane działanie przeciwdrobnoustrojowe, jest nadal przedmiotem dyskusji. Pojawiają się teorie, jakoby wpływa on na zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej, blokując dostęp komórek do składników odżywczych, poprzez tworzenie swoistej powłoki na powierzchni mikroorganizmów. Proces ten zachodzi dzięki oddziaływaniu grup aminowych chitozanu z grupami karboksylowymi wchodzących w skład zewnętrznych błon komórkowych mikroorganizmów. Stąd stopień acetylacji będzie miał istotny wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową biomateriału powstałego na bazie chitozanu (Aranaz et al. 2021; Ke et al. 2021). Posiadane przez chitozan grupy aminowe i grupy hydroksylowe reagują także z wolnymi rodnikami, wykazując zdolność do ich wychwytu. Stąd chitozan można wykorzystać jako potencjalny przeciwutleniacz (Aranaz et al. 2021; J. Zhou et al. 2021). Ciekawe obserwacje również prowadzono, celem oceny właściwości przeciwzapalnej oligosacharydów chitozanu. Wykazano, że w MCs mogą one osłabić indukowane czynnikami prozapalnymi wydzielanie $\text{TNF-}\alpha$ i IL-6. Odpowiedni spadek obserwowano dla tych cytokin także na poziomie ich transkrypcji. Stwierdzono również, że ekspozycja komórek na oligosacharydy chitozanu zmniejsza indukowane przez LPS wydzielanie NO. Wyhamowanie stanu zapalnego zaobserwowano także w ECs. Wykazano, że związek ten jest w stanie tłumić indukowany przez LPS czynnik

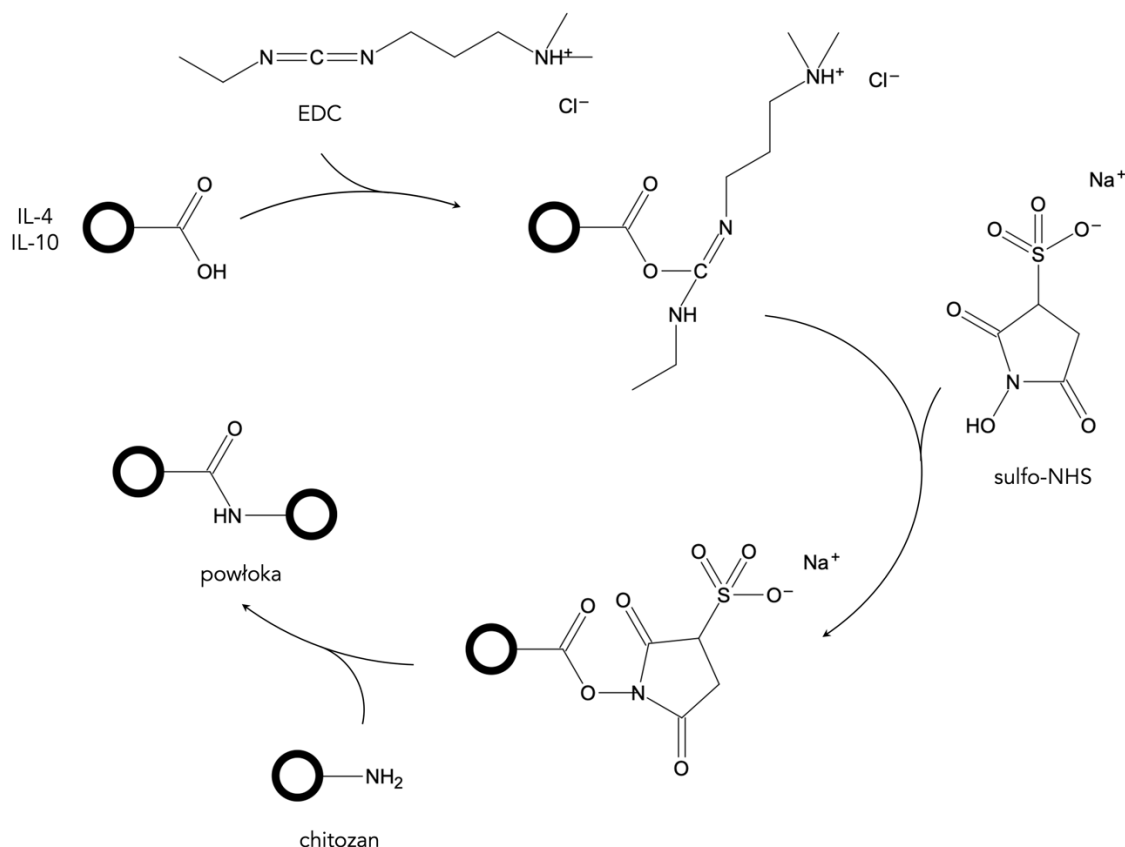
transkrypcyjny NF- κ B, od którego zależna jest ekspresja genów zapalnych. W eksperymencie na ECs tętnicy biodrowej świni, które traktowano oligosacharydami chitozanu zaobserwowano zmniejszenie ekspresji mRNA dla ICAM-1 i selektyny E, która była indukowana przez LPS (Azuma et al. 2015). Przeciwwzapalne działanie związków chitozanu może być szczególnie interesujące w kontekście miażdżycy i ISR. Tym bardziej, że w literaturze niejednokrotnie też podejmowano próby tworzenia biomateriałów na bazie pDA i chitozanu, udowadniając ich ciekawe właściwości i potencjał do zastosowań w inżynierii biomedycznej (Bock et al. 2020; Trinh, Le, and Lee 2020; Y. Wang et al. 2016; S. Yuan et al. 2014).

1.4.4 Technika sieciowania a immobilizacja interleukin

Korzystając z silnych właściwości adhezyjnych warstwy pDA oraz jej reaktywności w stosunku do wolnych grup aminowych (patrz 1.4.1 Polidopamina – wysoce adhezyjny i reaktywny chemicznie materiał bazowy oraz 1.4.2 Teoria wiązania interleukin na powierzchni materiału bazowego), powłokę na bazie pDA wzbogacono o chitozan. Skutkowało to zwiększeniem liczby dostępnych grup aminowych w tak otrzymanym biomateriale, które wykorzystano w kolejnym kroku, dokonując immobilizacji cząsteczek wybranych interleukin. Reakcja pDA z chitozaniem zachodziła analogicznie do przedstawionej w 1.4.2 Teoria wiązania interleukin na powierzchni materiału bazowego, z tą różnicą, że źródłem grup aminowych do wytworzenia wiązania, nie była cząsteczka interleukiny, lecz chitozan (patrz wyżej).

Immobilizacja wybranych interleukin poprzez wytworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupami karboksylowymi obecnymi w ich strukturze, a grupami aminowymi zapewnionymi przez obecny chitozan możliwa była poprzez przeprowadzenie reakcji sieciowania (patrz Rys. 18). W sekwencji aminokwasowej wybranych cząsteczek interleukin, a więc w IL-4 i IL-10, można wykazać odpowiednio 10 i 13 reszt kwasu asparaginowego (D) oraz 4 i 8 reszt kwasu glutaminowego (E) (IL4 – Interleukin-4 – Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt n.d.; IL10 – Interleukin-10 – Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt n.d.). Te aminokwasy zawierają wolne grupy karboksylowe zdolne do reakcji w niżej opisany sposób. Wolną grupę karboksylową również można znaleźć na C-końcu białka.

Podczas reakcji, grupa karboksylowa obecna w obrębie cząsteczki interleukiny zostaje aktywowana za pomocą 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC, z ang. *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*), co skutkuje utworzeniem reaktywnego produktu pośredniego – estru acylozomocznika. Tak powstały związek następnie zdolny jest do wejścia w reakcję z nukleofilem, czyli cząsteczką posiadającą wolną grupę aminową. W ten sposób powstaje wiązanie amidowe pomiędzy związkiem posiadającym grupy karboksylowe z jednej strony, ze związkiem prezentującym grupy aminowe, z drugiej (Fischer 2010).



Rys. 18 Reakcja tworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy wolną grupą karboksylową znajdującą się w obrębie cząsteczki interleukiny (odpowiednio IL-4 lub IL-10) i grupą aminową, wprowadzaną licznie na modyfikowaną powierzchnię wraz z chitozaniem. W tym celu cząsteczki wybranych interleukin zostały aktywowane w reakcji z 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidem (EDC, z ang. *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide*) oraz z hydroksylsulfosukcynoimidem (sulfo-NHS, z ang. *N-hydroxysulfosuccinimide*), przez co stały się one zdolne do reagowania z odpowiednimi grupami funkcyjnymi chitozanu. Wskutek zachodzących reakcji, powstało wiązanie amidowe pomiędzy reagentami (interleukiną i chitozaniem). Opracowanie własne.

W opisanym wyżej zastosowaniu, EDC jako reagent wykazuje szereg korzystnych cech, do przeprowadzenia tego typu reakcji, w tym jest związkiem zdolnym do tworzenia różnych połączeń chemicznych oraz jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, przez co możliwe jest bezpośrednie jego zastosowanie, bez konieczności wstępnego jego rozpuszczania w związkach organicznych. Jako że powstały w wyniku zadziałania EDC na wolną grupę karboksylową produkt pośredni jest związkiem niestabilnym, stosuje się N-hydroksylsukcynoimid (NHS, z ang. *N-hydroxysuccinimide*) lub N-hydroksylsulfosukcynoimid (sulfo-NHS, z ang. *N-hydroxysulfosuccinimide*), celem poprawy wydajności biokoniugacji oraz do stabilizacji związku pośredniego. Ponadto zastosowanie NHS lub sulfo-NHS umożliwia przeprowadzenie reakcji dwuetapowo (Fischer 2010; Yan et al. 2015).

NHS oraz sulfo-NHS są rozpuszczalne zarówno w rozpuszczalnikach wodnych, jak i organicznych. Niemniej jednak aktywacja za pomocą NHS zmniejsza rozpuszczalność w wodzie zmodyfikowanej cząsteczki. Taki efekt nie występuje, gdy zastosuje się sulfo-NHS.

Przeprowadzona aktywacja z jego udziałem skutkuje zachowaniem lub nawet zwiększeniem rozpuszczalności w wodzie zmodyfikowanej cząsteczki dzięki obecnej grupie sulfonianowej (Fischer 2010; Yan et al. 2015).

Przygotowane estry NHS lub sulfo-NHS są wystarczająco stabilne, aby można je było przetwarzać w dwuetapowym schemacie reakcji. Niemniej jednak w przeciągu godzin lub nawet minut — zależnie od pH roztworu, w który zachodzi reakcja — powstałe związki pośrednie ulegają hydrolizie, stąd aktywowane cząsteczki powinny szybko zostać wprowadzone do roztworu zawierającego docelowe grupy aminowe (Fischer 2010; Yan et al. 2015).

Kończąc rozważania, reakcja aktywacji z EDC jest najbardziej wydajna przy pH w granicach 4,5–7,2, stąd tę reakcję często przeprowadza się w buforze kwasu 2-(N-morfolino)etanosulfonowego (MES, z ang. *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*). Z kolei reakcja cząsteczek aktywowanych sulfo-NHS z grupami aminowymi jest najbardziej wydajna przy pH w zakresie 7–8, a więc tę reakcję warto przeprowadzać w środowisku soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, z ang. *phosphate-buffered saline*) (Fischer 2010).

Podsumowując, właściwe przeprowadzenie powyżej scharakteryzowanych reakcji sieciowania może z powodzeniem zostać wykorzystane w procesie immunofunkcjonalizacji powłoki opartej na związkach pDA i chitozanie. Otrzymania powłoki tą metodą podjęto się w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Rozdział 2

Motywacja

Szacuje się, że około 80% spośród wszystkich wykonanych PCI kończy się wprowadzeniem do tętnicy wieńcowej stentu. Corocznie wykonuje się około 4 milionów takich zabiegów na świecie (Pleva, Kukla, and Hlinomaz 2018). Niestety, pomimo postępów w technologii stentów, ISR ciągle pozostaje najczęstszą przyczyną niepowodzenia PCI. W erze przed wprowadzeniem do użytku stentów, częstość nawrotów zwężenia wahała się w zakresie 32–55% wszystkich angioplastyk. Liczba ta spadła do 17–41% po wprowadzeniu BMS (D. Buccheri et al. 2016), a pojawienie się DES doprowadziło do zmniejszenia częstości nawrotów zwężenia do liczby poniżej 10% (Pleva, Kukla, and Hlinomaz 2018). Niemniej jednak należy wskazać wady tych rozwiązań. W przypadku BMS, liczba ISR ciągle pozostaje wysoka, co wynika z nadmiernego rozwoju neointymy. Z kolei w przypadku DES, unieruchomione w stencie różnego rodzaju czynniki przeciwproliferacyjne (takie jak sirolimus, paklitaksel, zotarolimus i ewerolimus), mające na celu znaczne zmniejszenie lub całkowite zahamowanie proliferacji komórek neointymy, hamują niestety również proces gojenia się rany i re-endothelializację (Meraj, Jauhar, and Singh 2015). Natomiast BSR — stanowiące obecnie jedne z nowszych koncepcji stentów — nie wykazały, wbrew oczekiwaniom, znaczącej poprawy funkcji wazomotorycznych poddanego PCI odcinka CA. Co więcej, częściej wymagały podjęcia działań rewaskularyzacyjnych i wykazały zwiększone ryzyko zakrzepicy (S. Buccheri and Capodanno 2019). Zatem to motywuje do dalszych poszukiwań optymalnego rozwiązania.

ISR objawia się szerokim spektrum objawów klinicznych, które w znacznym stopniu uwarunkowane są poziomem niedokrwienia mięśnia sercowego. Kliniczne cechy ISR zależą od cech osobniczych pacjenta oraz charakterystyki zmiany, a także od jej umiejscowienia anatomicznego. Mogą prezentować się jako stabilna dławica piersiowa, niestabilna dławica piersiowa (26–53% dla BMS, 16–66% dla DES) lub ostry zawał mięśnia sercowego (MI, z ang. *myocardial infarction*) (3–20% dla BMS, 1–20% dla DES) mogący prowadzić do zgonu (Looser, Kim, and Feldman 2016).

W świetle przytoczonych danych statystycznych można stwierdzić, że powikłania związane z restenozą, definiowaną jako niepożądane zdarzenie po implantacji stentu kardiovaskularnego, pozostaje wciąż poważnym problemem kardiologii interwencyjnej. Stanowi to również jedną z ważniejszych przyczyn zgonu wśród pacjentów z CHD. Stąd uzasadnione jest prowadzenie badań z zakresu takiej modyfikacji powierzchni powszechnie stosowanych stentów, aby zredukować prawdopodobieństwo ISR do minimum.

Początkowo, rezultatem prowadzonych przeze mnie badań było zaproponowanie powłoki biofunkcjonalizowanej przeciwciałem anti-CD133, uzyskiwanej w wielostopniowej syntezie. Do syntezy powłoki wykorzystano kopolimer złożony z akryloilodimetylotaurynianu amonu i winylopirolidononu. Kolejny etap syntezy — merkaptosilanizacja — umożliwił wprowadzenie na powierzchni kopolimeru licznych grup tiolowych ($-SH$), które ostatecznie posłużyły immobilizacji cząsteczki przeciwciała (Sarelo et al. 2020). Obecność przeciwciała anti-CD133 umożliwiła wychwytywanie krążących we krwi EPCs. Sprzyjało to szybszej re-endoetelializacji powierzchni wprowadzonego stentu i w rezultacie zapobiegało jego restenozie (Wawrzyńska et al. 2019). Co więcej, zaproponowana powłoka nie wykazywała zwiększonych właściwości hemolitycznych oraz cytotoksycznych względem naniesionych na nią komórek (Sarelo et al. 2020). Niemniej jednak, wspomniana powłoka charakteryzuje się bierną rekrutacją EPCs, nie wpływając na ich wzrost, proliferację i funkcjonowanie. Dlatego też, zdobyte doświadczenie oraz dokonane obserwacje zachęciły do podjęcia kolejnych badań nad powłoką, charakteryzującą się wielokierunkowym działaniem na wybrane komórki ściany naczyń. To właśnie dysfunkcja ECs, nadmierna proliferacja VSMCs oraz prozapalna aktywacja MCs sprzyja wystąpieniu niepożądanych, postimplantacyjnych zdarzeń (Milutinović, Šuput, and Zorc-Pleskovič 2020). Zatem to motywuje, aby podjąć się prób modulacji metabolizmu i funkcjonowania wybranych komórek *in situ*, wprowadzając do chorobowo zmienionego naczynia odpowiednio zmodyfikowany stent. Z tego punktu widzenia, korzystne właściwości wykazują cząsteczki naturalnie syntezowane przez ustrój i charakteryzujące się plejotropowym (in. wielokierunkowym) działaniem – cytokiny. Cytokiny i związane z nimi interleukiny służą jako środki komunikacji dla komórek układu odpornościowego, jak również dla komórek nienależących do tego systemu (Briukhovetska et al. 2021). To motywuje do działania mającego na celu opracowanie powłoki służącej jako nośnik, do którego związana zostanie interleukina wywołująca odpowiedni efekt biologiczny w miejscu wprowadzenia sfunkcjonalizowanego stentu. Być może wpływ cząsteczek wybranej interleukiny na funkcjonowanie uszkodzonych komórek ściany naczynia umożliwi zahamowanie progresji zmian miażdżycowych oraz zmniejszy prawdopodobieństwo ISR. Intrygujące jest uzyskanie odpowiedzi na tak postawione pytanie badawcze.

Podsumowując, omówione we wstępie działanie wybranych interleukin na aktywowane zapalnie komórki ściany naczyń stanowią ciekawy punkt uchwytu profilaktyki wystąpienia ISR. Idąc dalej, liczę, że korzystny wpływ interleukin *in situ* umożliwi szybsze zagojenie się miejsca implantacji i wyhamowanie procesów charakterystycznych dla miażdżycy. Warto wspomnieć, że stosowanie stentów nie leczy przyczyny postępujących zmian miażdżycowych, lecz stanowi doraźne rozwiązanie, przywracające drożność naczyń i zapobiegające MI. Chciałbym podjąć się tematu, który być może będzie dodatkowo wpływał na przyczynę choroby miażdżycowej oraz powikłań po angioplastyce. Co więcej udowodniono, że powikłania obserwowane w przebiegu wielu chorób naczyń wieńcowych serca wynikają właśnie z niskiego poziomu czynników sygnalizacyjnych, których lokalne stężenie jest niewystarczające, aby antagonizować prozapalny wpływ różnych czynników patologicznych (Ren, Liu, and Zhao 2016). Obecnie nie raportuje się w kardiologii interwencyjnej powłoki, która byłaby nośnikiem interleukin, stąd chęć praktycznej weryfikacji postawionych pytań badawczych. Przeprowadzenie badań podstawowych, omówionych w niniejszej rozprawie doktorskiej umożliwi opracowanie i scharakteryzowanie powłoki według omówionej wcześniej koncepcji. Liczę także, że przedstawiony projekt badawczy zakończy się sukcesem i pozwoli pójść o krok dalej – pozwoli wprowadzić w niedalekiej przyszłości powłokę do użytku w kardiologii interwencyjnej. Ubocznym efektem realizacji badań będzie pogłębienie wiedzy dotyczącej molekularnych mechanizmów oddziaływania wybranych interleukin na ECs, VSMCs oraz komórki układu odpornościowego, co będzie miało istotny wkład w poznanie skomplikowanych mechanizmów funkcjonowania tak złożonego układu jakim jest komórka.

Na końcu, warto podkreślić, że grupa badawcza w której realizuję niniejszą pracę doktorską posiada udokumentowane doświadczenie w zastosowaniu wybranych technik pomiarowych, które umożliwiają kompleksową charakteryzację zaproponowanej powłoki oraz w prowadzeniu badań *in vitro* z wykorzystaniem wybranych linii komórkowych (Cyboran - Mikołajczyk et al. 2021; Danielewska et al. 2022; Sareło et al. 2020, 2023; Zaręba et al. 2019).

Rozdział 3

Cel pracy

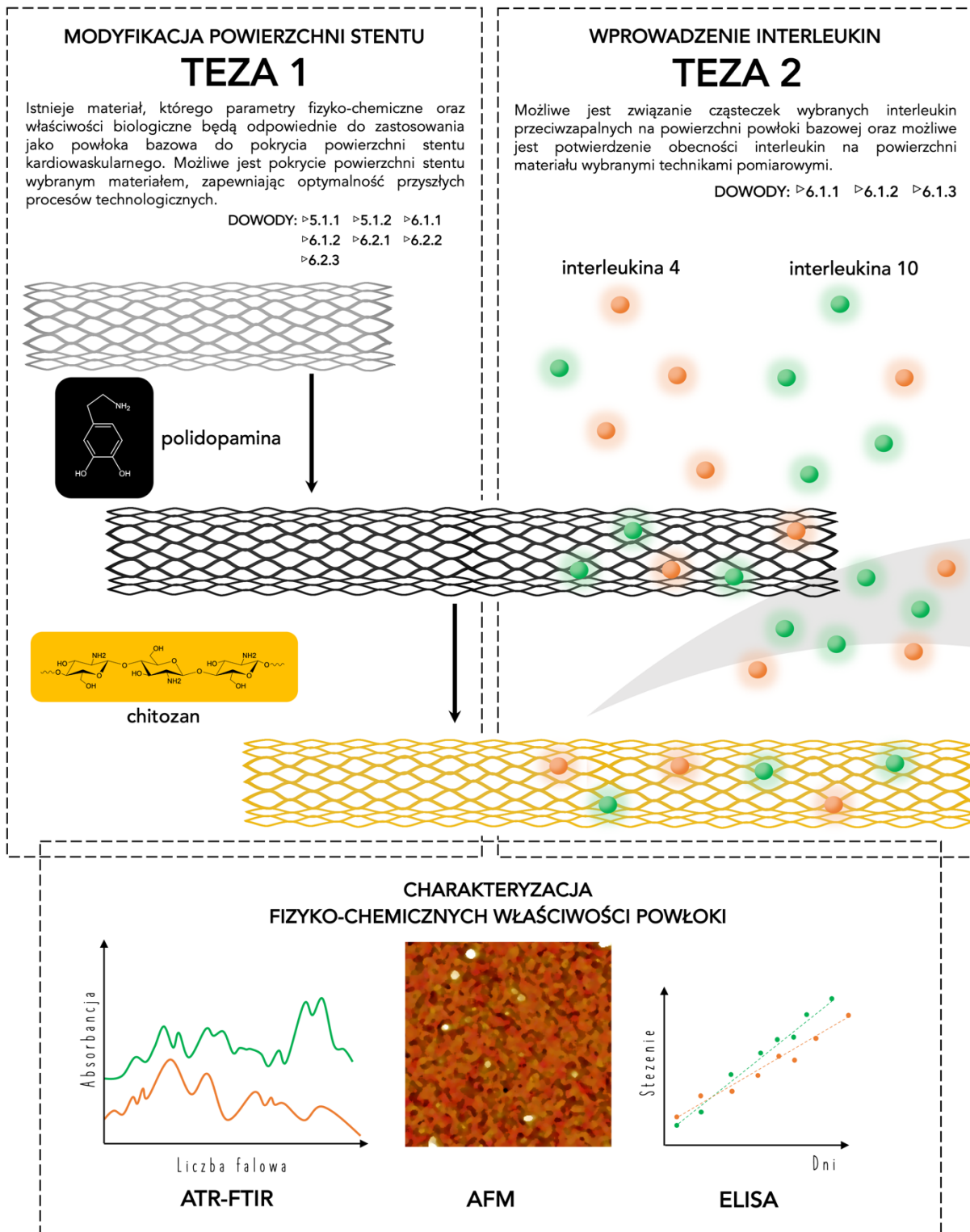
Nadrzędnym celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest **otrzymanie powłoki** na powierzchni kobaltowo-chromowego stentu kardiovaskularnego, przeciwdziałającej przewlekłym i ostrym procesom zapalnym, toczącym się w ścianie naczynia, a wynikających z progresującej miażdżycy oraz przeprowadzonego zabiegu przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej.

Powłoka będzie otrzymana na bazie biopolimerów (polidopamina oraz chitozan), wykazujących silne właściwości adhezyjne, służące zakotwiczeniu powłoki na powierzchni stentu oraz posiadających liczne grupy funkcyjne, służące związaniu interleukin przeciwzapalnych (interleukina 4 oraz interleukina 10) w reakcji bezpośredniej oraz za pośrednictwem techniki sieciowania.

Zostanie przeprowadzona **pełna charakterystyka otrzymanej powłoki** z wykorzystaniem spektroskopii osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera, mikroskopii sił atomowych i testów immunoenzymatycznych. Określenie **właściwości biologicznych powłoki w warunkach *in vitro*** pod kątem patomechanizmu miażdżycy i restenozy w stencie zostanie przeprowadzone wskutek oceny żywotności, proliferacji i morfologii komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach, ich odpowiedzi prozapalnej, adhezji monocytów/makrofagów do biomateriału i komórek śródbłonka hodowanych na zmodyfikowanej powierzchni oraz indukcji zmian fenotypowych w makrofagach.

Rozdział 4

Graficzny abstrakt

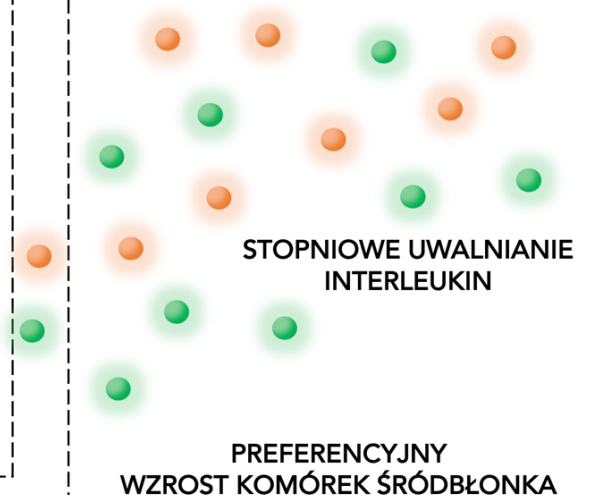
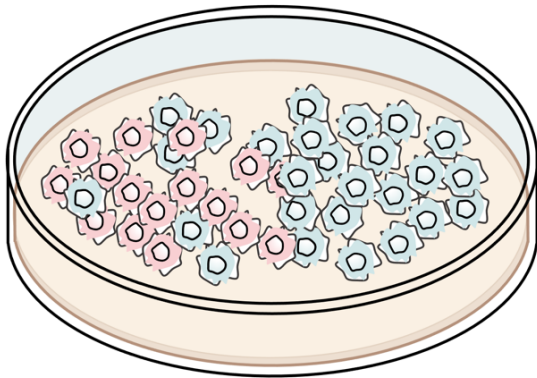


TEZA 3

Procedura wiązania interleukin na powierzchni powłoki bazowej nie upośledzi ich aktywności biologicznej wobec wybranych linii komórkowych.

DOWODY: ▷6.2.6

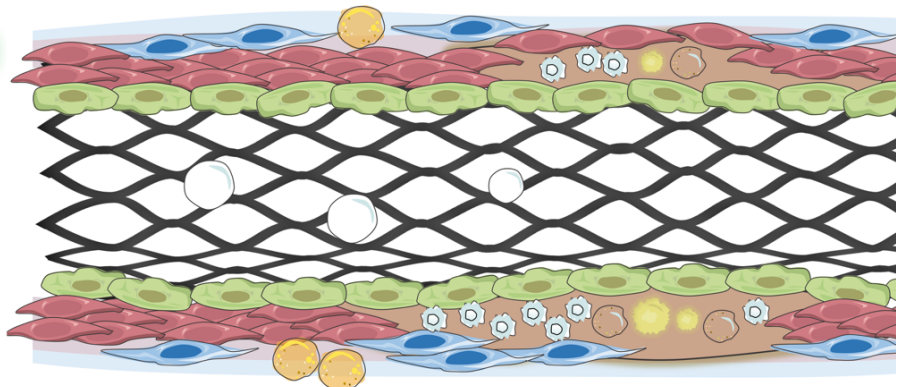
ZMIANA POLARYZACJI MAKROFAGÓW



STOPNIOWE UWALNIANIE INTERLEUKIN

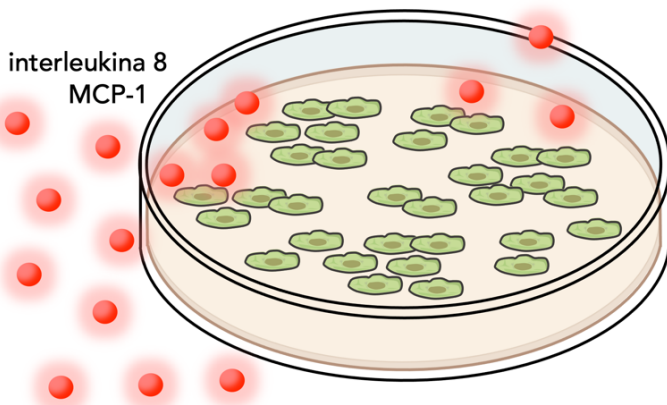
PREFERENCYJNY WZROST KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

TEZA 4



OGRANICZONA ADHEZJA MONOCYTÓW

interleukina 8
MCP-1



WYHAMOWANIE ODPOWIEDZI ZAPALNEJ ŚRÓDBŁONKA

Opracowana powłoka wykaże minimum dwie pożądane właściwości w odniesieniu do molekularnego bądź komórkowego patomechanizmu restenozy, co pozwoli wnioskować o korzyściach z zastosowania opracowanej modyfikacji powierzchni stentu.

DOWODY: ▷6.1.3 ▷6.2.1 ▷6.2.2
▷6.2.3 ▷6.2.4 ▷6.2.5
▷6.2.6

Rozdział 5

Tezy pracy

W niniejszym opracowaniu postawiono następujące cztery tezy, a próba udowodnienia każdej kolejnej umożliwi stopniową realizację nadrzędnego celu rozprawy doktorskiej, wskazanego w poprzednim rozdziale.

Teza nr 1: Istnieje materiał, którego parametry fizyko-chemiczne oraz właściwości biologiczne będą odpowiednie do zastosowania jako powłoka bazowa do pokrycia powierzchni stentu kardiowaskularnego. Możliwe jest pokrycie powierzchni stentu wybranym materiałem, zapewniając optymalność przyszłych procesów technologicznych.

Teza nr 2: Możliwe jest związanie cząsteczek wybranych interleukin przeciwzapalnych na powierzchni powłoki bazowej oraz możliwe jest potwierdzenie obecności interleukin na powierzchni materiału wybranymi technikami pomiarowymi.

Teza nr 3: Procedura wiązania interleukin na powierzchni powłoki bazowej nie upośledzi ich aktywności biologicznej wobec wybranych linii komórkowych.

Teza nr 4: Opracowana powłoka wykaże minimum dwie pożądane właściwości w odniesieniu do molekularnego bądź komórkowego patomechanizmu restenozy, co pozwoli wnioskować o korzyściach z zastosowania opracowanej modyfikacji powierzchni stentu.

Rozdział 6

Materiały i metody

6.1 Procedury przygotowania powłok

6.1.1 Procedura przygotowania powłok na bazie polidopaminy funkcjonalizowanych interleukiną

Pierwszym krokiem w procesie funkcjonalizacji wybranego materiału było pokrycie jego powierzchni warstwą polidopaminy. Początkowo, przygotowano roztwór chlorowodoru dopaminy (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) o stężeniu 2 mg/mL. Jako rozpuszczalnik wykorzystano 10 mM Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) o pH = 8,5. pH buforu zostało doprowadzone do wskazanej wartości poprzez dodanie odpowiedniej objętości 0,1 M roztworu HCl, przygotowanego z 35–38% kwasu solnego (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska) oraz dejonizowanej i destylowanej wody (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone). Następnie powierzchnię wybranego materiału pokryto warstwą polidopaminy. W tym celu materiał zanurzono bądź pokryto tak przygotowanym roztworem chlorowodoru dopaminy na ~4 godziny, w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem oraz ciągle mieszając na wytrząsarce orbitalnej z funkcją grzania. Tak uzyskano powłokę bazową (referowaną jako **pDA**). Następnie powierzchnię materiału dokładnie przemyto dejonizowaną i destylowaną wodą w celu usunięcia niezwiązanej polidopaminy. Na tym etapie, zmodyfikowane powierzchnie wysuszono i wysterylizowano światłem UV (245 nm, 8 W) przez 15 minut.

Reaktywne właściwości polidopaminy, omówione powyżej (patrz 1.4.1 Polidopamina – wysoce adhezyjny i reaktywny chemicznie materiał bazowy), wykorzystano do bezpośredniego związania cząsteczek interleukiny na powierzchni materiału nią pokrytego (patrz 1.4.2 Teoria wiązania interleukin na powierzchni materiału bazowego), przygotowując powłoki referowane w dalszej części pracy jako **pDA_IL-4** bądź **pDA_IL-10**.

W tym celu przygotowano roztwór rekombinowanej ludzkiej IL-4 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) o stężeniu 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ w dejonizowanej i destylowanej wodzie oraz roztwór rekombinowanej ludzkiej IL-10 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) również o stężeniu 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ w dejonizowanej i destylowanej wodzie. Następnie 100 μL roztworu IL-4 bądź IL-10 naniesiono na odpowiednią powierzchnię pokrytą wcześniej pDA (co odpowiada masie 200 ng odpowiedniej interleukiny). Reakcja przebiegała przez ~ 4 godziny w temperaturze pokojowej, z ciągłym mieszaniem na wytrząsarce orbitalnej. Następnie materiał pokryty pDA i cząsteczkami interleukiny został dokładnie przemyty dejonizowaną i destylowaną wodą w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek interleukin, i przechowywany w temperaturze 4°C do dalszego wykorzystania w zaplanowanych eksperymentach.

Zależnie od przeprowadzanego eksperymentu badaną powłokę nanoszono odpowiednio na dnie dołków 24- lub 96-dołkowej płytki do kultur komórkowych (Corning Incorporated, Corning, Nowy Jork, Stany Zjednoczone; Biologix Group Limited, Jinan, Chiny; TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Szwajcaria), na okrągłe szkiełko nakrywkowe (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Niemcy) o średnicy 13 mm, na powierzchnię blaszki wykonanej ze stopu Co-Cr L605 (Balton, Warszawa, Polska), na dnie 8-dołkowej komory (ibidi, Gräfel-fing, Niemcy), świeżo rozlupanej mice potasowej (Labnatek, Warszawa, Polska) o średnich wymiarach 10 mm \times 10 mm czy na stencie wykonanym ze stopu Co-Cr L605 (Balton, Warszawa, Polska).

6.1.2 Wzbogacenie powłoki o chitozan. Funkcjonalizacja powłoki interleukinami za pośrednictwem techniki sieciowania

Aby wprowadzić chitozan, na przygotowaną w poprzednim kroku, powłokę bazową pDA, przeprowadzono następujące czynności.

Początkowo przygotowano 1% roztwór chitozanu w 1% kwasie octowym. W tym celu odważono żadaną ilość chitozanu niskocząsteczkowego o deacetylacji 75–85% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) i dodano do szklanej butelki. Następnie dodawano odpowiednią objętość 1% roztworu kwasu octowego, przygotowanego z 99,5% kwasu octowego (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska) oraz odpowiedniej objętość dejonizowanej i destylowanej wody. Butelkę z zawartością umieszczono na mieszadle magnetycznym i mieszano z pełną prędkością aż do całkowitego rozpuszczenia chitozanu. Upřednio sfunkcjonalizowany polidopaminą materiał umieszczono bądź pokryto odpowiednią objętością tak przygotowanego roztworu chitozanu i pozostawiono na około ~ 4 godziny, w temperaturze pokojowej, z ciągłym mieszaniem na wytrząsarce orbitalnej. Umożliwiło to związanie chitozanu na powierzchni materiału pokrytego pDA poprzez wytworzenie wiązania pomiędzy grupami aminowymi licznie obecnymi

w makrocząsteczce chitozanu oraz grupami karbonylowymi polidopaminy. W taki sposób uzyskano powłokę referowaną w dalszej części jako **pDA_CH**.

W celu związania cząsteczek interleukin na powierzchni pokrytej pDA_CH, posłużono się następującą procedurą. Na wstępie przygotowano roztwór rekombinowanej ludzkiej IL-4 (jak powyższa) w soli fizjologicznej buforowanej 0,1 M MES (pH = 4,7) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) o stężeniu 2 µg/mL oraz roztwór rekombinowanej IL-10 (jak powyższa) w soli fizjologicznej buforowanej 0,1 M MES (pH = 4,7), również o stężeniu 2 µg/mL. Następnie kolejno dodano chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) oraz sól sodową N-hydroksysulfosukcynoimidu (sulfo-NHS; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone), do końcowego stężenia odpowiednio 80 ng/mL i 220 ng/mL. Składniki reakcji dobrze wymieszano i pozostawiono na 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie tak uzyskany roztwór IL-4 oraz IL-10 naniesiono na każdą z powierzchni pokrytej pDA_CH. Reakcja przebiegała przez ~4 godziny w temperaturze pokojowej, z ciągłym mieszaniem na wytrząsarce orbitalnej. Następnie materiał pokryty warstwą pDA_CH i cząsteczkami interleukiny został dokładnie przemyty dejonizowaną i destylowaną wodą, i przechowywany w temperaturze 4°C do dalszego wykorzystania w zaplanowanych eksperymentach.

W ten sposób dokonano immobilizacji wybranych interleukin z wykorzystaniem EDC i sulfo-NHS na powłoce bazowej wzbogaconej chitozaniem (referowane odpowiednio jako **pDA_CH_IL-4** oraz **pDA_CH_IL-10**) poprzez wytworzenie wiązania amidowego pomiędzy grupami aminowymi występującymi w makrocząsteczce chitozanu i grupami karboksylowymi łańcuchów bocznych aminokwasów wchodzących w skład cząsteczki interleukiny (patrz 1.4.4 Technika sieciowania a immobilizacja interleukin). Zależnie od przeprowadzanego eksperymentu, badane powłoki nanoszono na odpowiednie, wybrane powierzchnie (patrz wyżej).

6.2 Fizyko-chemiczne metody charakteryzacji powłoki

6.2.1 Ocena struktury chemicznej powłoki za pomocą spektroskopii w podczerwieni

Do oceny struktury chemicznej wykorzystano spektroskopię osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ATR-FTIR, z ang. *attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy*).

Widma ATR-FTIR wodnych roztworów interleukin uzyskano przy użyciu spektrometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) z przystawką ATR Golden Gate Mk II z podgrzewaną elektrycznie płytą diamentową (PIKE Technologies, Fitchburg, Wisconsin, Stany Zjednoczone). Spektrometr był w sposób ciągły

przedmuchiwany suchym powietrzem. Wszystkie widma zbierano w zakresie 4000–400 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} , liczba skanów 256. Bezpośrednio przed pomiarem próbki, widmo tła diament/powietrze rejestrowano jako odniesienie (512 skanów, 4 cm^{-1}). Wszystkie widma rejestrowano w temperaturze 25°C. Widma rejestrowano w programie OMNIC 8 Software Spectra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). W celu otrzymania widma próbki, na kryształ naniesiono około 3–5 μL wodnego roztworu IL-4 o stężeniu 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i wodnego roztworu IL-10 o stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i odczekano około 1–2 godziny do utworzenia cienkiego filmu poprzez odparowanie wody z roztworu. Uzyskane widma posłużyły jako widma odniesienia.

Widma ATR-FTIR blaszki wykonanej ze stopu Co-Cr L605 pokrytej właściwą powłoką uzyskano przy użyciu mikroskopu w podczerwieni Nicolet iN10 MX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) wyposażonego w chłodzony ciekłym azotem detektor MCT i kryształ germanu MicroTip ATR do rejestracji w trybie kontaktu. Mikroskop w sposób ciągły był przedmuchiwany suchym powietrzem. Wszystkie widma zbierano w zakresie 4000–675 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1} , liczba skanów 256, apertura 75 $\mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$, skok 100 μm , liczba punktów, z których zbierano widma 9 (3 \times 3). Bezpośrednio przed pomiarem próbki, widmo tła german/powietrze rejestrowano jako odniesienie (512 skanów, 4 cm^{-1}). Widma rejestrowano w programie OMNIC Picta Software Spectra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Dzięki zastosowaniu mikroskopu w podczerwieni Nicolet iN10 MX możliwa była charakteryzacja większej powierzchni materiału niż w przypadku spektrometru Nicolet 6700 FT-IR.

Wszystkie zarejestrowane widma analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Origin Pro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Każdorazowo dokonano korekcji tła, a do wygładzenia widma zastosowano filtr Savitzky-Golay z wielomianem drugiego stopnia i 21-punktowym oknem uśredniania. Widma znormalizowano względem intensywności pasma drgań rozciągających grupy C–H przy około 2930 cm^{-1} . Celem właściwej analizy było wskazanie takich zmian w zarejestrowanych widmach, które potwierdziłyby obecność powierzchniowo związanych z polidopaminą lub polidopaminą i chitozanem interleukin.

6.2.2 Charakterystyka nanostrukturalna powłoki za pomocą mikroskopii sił atomowych

Przygotowane na świeżo rozłupanej mice potasowej próbki powłok zostały scharakteryzowane przy zastosowaniu mikroskopii sił atomowych (AFM, z ang. *atomic force microscopy*).

W tym celu do magnetycznego dysku (TED PELLA, INC., Redding, California, Stany Zjednoczone) przy pomocy dwustronnej taśmy samoprzylepnej (TED PELLA, INC., Redding, California, Stany Zjednoczone) przymocowano płytki z naniesioną powłoką. Magnetyczne dyski

umieszczono na piezoelektrycznym skanerze (model E, maksymalny obszar skanowania $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$), składającym się na bazę mikroskopu MultiMode Atomic Force Microscopy (Bruker, Billerica, Massachusetts, Stany Zjednoczone). W uchwycie mikroskopu umieszczono sondę wykonaną z krzemu domieszkowanego antymonem (Bruker, Billerica, Massachusetts, Stany Zjednoczone) o częstotliwości rezonansowej $\sim 320\ \text{kHz}$ i o stałej sprężystości $42\ \text{N/m}$ oraz o średnicy maksymalnej ostrza $4\ \text{nm}$ (model NCHV). Mikroskop podłączono do kontrolera NanoScope 3D IIIa (Bruker, Billerica, Massachusetts, Stany Zjednoczone) skomunikowanym z zainstalowanym na komputerze oprogramowaniem Nanoscope v. 6.13 (Bruker, Billerica, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Uchwyt z zamontowaną sondą umieszczono w optycznej głowie mikroskopu (Bruker, Billerica, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Sonda skanująca pracowała w zakresie swojej nominalnej częstotliwości rezonansowej. Częstotliwość skanowania została nastawiona w zakresie $1,0\text{--}1,5\ \text{Hz}$, liczba skanów 512×512 na obraz, skanowany obszar $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, kąt skanowania 0° . Przy nastawieniu mikroskopu wykorzystano układ mikroskopu optycznego (Fiber-Lite® PL-800, Dolan-Jenner Industries Inc., Boxborough, Massachusetts, Stany Zjednoczone).

Zarejestrowane obrazy opracowano za pomocą oprogramowania Nanoscope v. 6.13.

6.2.3 Ocena kinetyki uwalniania interleukin z powierzchni powłoki z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego

Do oceny stopnia uwalniania IL-4 oraz IL-10 z badanych powłok (pDA_IL-4 i pDA_IL-10 oraz pDA_CH_IL-4 i pDA_CH_IL-10) wykorzystano testy ELISA, odpowiednio zestaw ELISA IL-4 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) oraz zestaw ELISA IL-10 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Testy przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Zakres krzywej standardowej w przypadku testu ELISA IL-4 wynosił $7,8\text{--}500\ \text{pg/mL}$, z kolei dla ELISA IL-10 zakres ten wynosił $3,15\text{--}200\ \text{pg/mL}$. Każdorazowo wykonywano minimum trzykrotne oznaczenie danej cytokiny w analizowanej próbce.

Na wstępie powłoki naniesiono na dno dołków płytki 24-dółkowej zgodnie z opisaną powyżej procedurą. Powłoki w dołkach następnie przemyto jednokrotnie PBS ($\text{pH} = 7,4$) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), a następnie zanurzono w $1\ \text{mL}$ tymże PBS, ale z dodatkiem $0,1\%$ albumin surowicy bydlęcej (BSA, z ang. *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone). Płytki inkubowano z wytrząsaniem ($500\ \text{rpm}$) przez 1, 3, 5, 7 i 10 dni w temperaturze pokojowej. Po każdym czasie inkubacji zbierano PBS-BSA i zastępowano świeżym roztworem. Zebrane próbki przechowywano w temperaturze -80°C do końca eksperymentu. Obie cytokiny (IL-4 i IL-10) oznaczano w próbkach

pobranych w każdym punkcie czasowym. Absorbancję mierzono za pomocą czytnika płytek Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Szwajcaria) przy 450 nm.

Wyniki wyrażono jako wartość skumulowaną stężenia uwolnionej cytokiny (sumowano oznaczone stężenie z odpowiednich dni) w funkcji czasu inkubacji.

6.3 Metody badań na modelu komórkowym

6.3.1 Hodowle komórkowe

6.3.1.1 Hodowla ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej stanowiących model komórek śródbłonka

Ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (HUVECs; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) były rutynowo hodowane w medium bazowym przeznaczonym do hodowli komórek śródbłonka dużych naczyń *Human Large Vessel Endothelial Cell Basal Medium*, wcześniej *Medium 200* (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Medium bazowe zostało uzupełnione o czynniki wzrostu i suplementy wchodzące w skład zestawu *Low Serum Growth Supplement* (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) w stężeniach wskazanych przez producenta. Wzbogacone medium (w dalszej części referowane jako kompletne medium) składało się z 2% v/v płodowej surowicy bydlęcej (FBS, z ang. *fetal bovine serum*), 1 µg/mL hydrokortyzonu, 10 ng/mL ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (hEGF, z ang. *human epidermal growth factor*), 3 ng/mL podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, z ang. *basic fibroblast growth factor*) oraz 10 µg/mL heparyny. Hodowle prowadzono bez dodatku związków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych.

Dno butelek (neoLab, Heidelberg, Niemcy) przeznaczonych do rutynowej hodowli komórek pokrywane były żelatyną. W tym celu bezpośrednio przed wprowadzeniem komórek, nanoszono zależną od wielkości butelki objętość (1 mL roztworu na każde 10 cm² powierzchni hodowlanej) 0,1% roztworu żelatyny (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) i inkubowano przez 30 minut w 37°C bądź 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór odbierano i wprowadzono komórki. Pokryte żelatyną butelki hodowlane przechowywano maksymalnie do miesiąca w 4°C.

Hodowle komórkowe prowadzono w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂) w inkubatorze CO₂ do hodowli komórkowych Innova CO-170 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, Stany Zjednoczone). Komora z laminarnym przepływem powietrza o II klasie bezpieczeństwa biologicznego Airstream (Esco Lifescience, Singapur) zapewniała sterylne warunki pracy. Komórki wirowano przy względnej sile odśrodkowej (RCF, z ang. *relative centrifugal force*) rzędu

180 × g przez 7 minut z wykorzystaniem wirówki laboratoryjnej EBA 21 (Hettich, Tuttlingen, Niemcy) lub 350R (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska). Komórki obserwowano przy pomocy mikroskopu odwróconego MBI 100T (mikroLAB, Lublin, Polska).

Medium wymieniano co 1–2 dni, zależnie od gęstości HUVECs. Gdy komórki osiągały 80–90% konfluencji, komórki pasażowano. Komórki pasażowano z wykorzystaniem roztworu 0,025% trypsyny i 0,01% EDTA w PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) oraz roztworu 0,5% surowicy cielęcej w PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) bądź z wykorzystaniem *TrypLE Express Enzyme* (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone).

Liczenie komórek z jednoczesną zgrubną oceną żywotności prowadzono poprzez barwienie 0,4% błękitem trypanowym w PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), przy użyciu komory Bürkera (Brand, Wertheim, Niemcy).

Krioprezerwację komórek prowadzono w kompletnym medium z dodatkiem 10% v/v dimetylosulfotlenku (DMSO) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Komórki zamrażano powoli w –80°C, obniżając temperaturę o około 1°C na minutę przy użyciu pojemnika do zamrażania *Mr. Frosty* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) umieszczonym w zamrażarce niskotemperaturowej Innova U101 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, Stany Zjednoczone). Po 24 godzinach komórki przenoszono do naczynia z ciekłym azotem przeznaczonym do krioprezerwacji próbek biologicznych Cryomaster 600 (Antech Scientific, Qingdao, Chiny).

6.3.1.2 Hodowla ludzkich komórek ostrej białaczki monocytowej stanowiących model monocytów/makrofagów

Ludzka linia komórek ostrej białaczki monocytowej (THP-1; Elabscience, Houston, Teksas, Stany Zjednoczone) posłużyła jako model monocytów/makrofagów. Komórki hodowano w medium RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) zawierającej 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), 0,05 mM 2-merkaptoetanolu (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) i 1% antybiotyków (penicylina i streptomycyna) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone), określanej dalej jako podłoże kompletne.

Hodowlę prowadzono w szalkach (neoLab, Heidelberg, Niemcy) bądź w butelkach (neoLab, Heidelberg, Niemcy) w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂) w inkubatorze CO₂ do hodowli komórkowych. Z komórkami pracowano w komorze z laminarnym przepływem powietrza o II klasie bezpieczeństwa biologicznego, celem zapewnienia sterylnych warunków pracy.

Komórki wirowano przy RCF rzędu $180 \times g$ przez 7 minut z wykorzystaniem wirówki laboratoryjnej. Komórki obserwowano przy pomocy mikroskopu odwróconego.

Medium wymieniano co 2–3 dni. Komórki pasażowano zależnie od ich gęstości (przy $\sim 8 \times 10^5$ komórek/mL). Liczenie komórek z jednoczesną oceną żywotności prowadzono jak wyżej. Krioprezervację komórek prowadzono w kompletnym medium z dodatkiem 5% v/v DMSO jak wyżej.

6.3.2 Metody biologii komórkowej i molekularnej

6.3.2.1 Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach

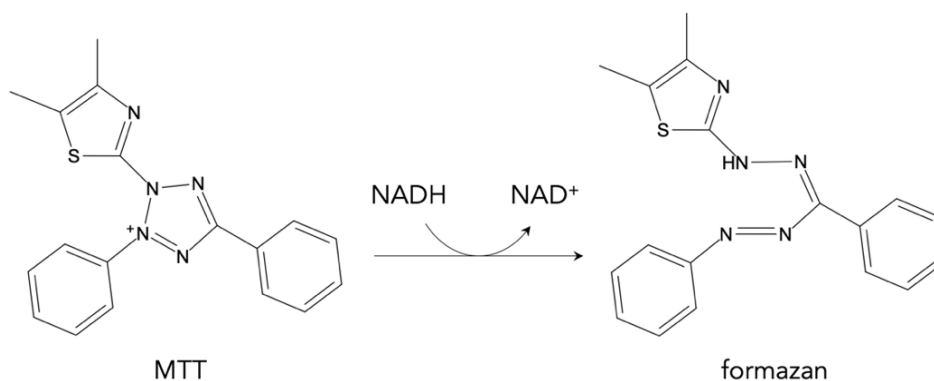
Do oceny żywotności i proliferacji komórek śródbłonka posłużono się testem MTT. Test ten polega na przekształceniu soli tetrazolowej (bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolowego – MTT, z ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide*), przyjmującej w roztworze wodnym żółte zabarwienie, do nierozpuszczalnych w wodzie kryształów formazanu (1-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-3,5-difenyloformazanu), będących fioletowym produktem reakcji bio-redukcji. Reakcja redukcji tetrazolowego barwnika możliwa jest dzięki enzymowi z grupy oksydoreduktaz zależnych od NADH bądź NADPH – dehydrogenazy mitochondrialnej. Poziom aktywnych oksydoreduktaz, a zatem ilość powstałego barwnego produktu reakcji, jest proporcjonalna do liczby żywych (a więc aktywnych metabolicznie) komórek. Po rozpuszczeniu kryształów formazanu w DMSO, intensywność zabarwienia powstałego roztworu może zostać zmierzona spektrofotometrycznie, mierząc poziom absorpcji światła przy długości fali 570 nm.

Na wstępie przygotowano 96-dółkową płytkę hodowlaną (niemodyfikowaną lub pokrytą badanymi powłokami – zależnie od eksperymentu). Do każdego dołka dodano po 10^4 komórek śródbłonka zawieszonych w 100 μ L kompletnego medium. Płytkę inkubowano przez zadany w eksperymencie czas, w inkubatorze CO₂, w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂).

W międzyczasie przygotowano roztwór podstawowy MTT poprzez rozpuszczenie 5 mg MTT (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) na każde 1 mL PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Roztwór wysterylizowano poprzez filtrację z użyciem filtrów strzykawkowych (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) o średnicy porów 0,2 μ m.

Po zadanym czasie inkubacji, do każdego dołka dodano 10 μ L roztworu podstawowego MTT. Płytkę inkubowano przez ~ 3 godziny w standardowych warunkach. Po tym czasie ostrożnie odebrano medium z każdego z dołków, a następnie dolki uzupełniono 100 μ L DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone), mieszając poprzez pipetowanie. Płytkę ponownie umieszczono w 37°C na 15 minut. Pomiaru absorbancji dokonano z wykorzystaniem czytnika

plytek Infinite M Nano+ (Tecan Group Ltd., Männedorf, Szwajcaria) przy długości fali 570 nm. Próbę ślełą stanowił dołek bez badanych komórek, po dodaniu 100 μ L DMSO.



Rys. 19 Reakcja przekształcania soli tetrazolowej (bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolowego – MTT, z ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide*), przyjmującej w roztworze wodnym żółte zabarwienie, do nierozpuszczalnych w wodzie kryształów formazanu (1-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-3,5-difenyloformazanu), będących fioletowym produktem reakcji bio-redukcji. Opracowanie własne

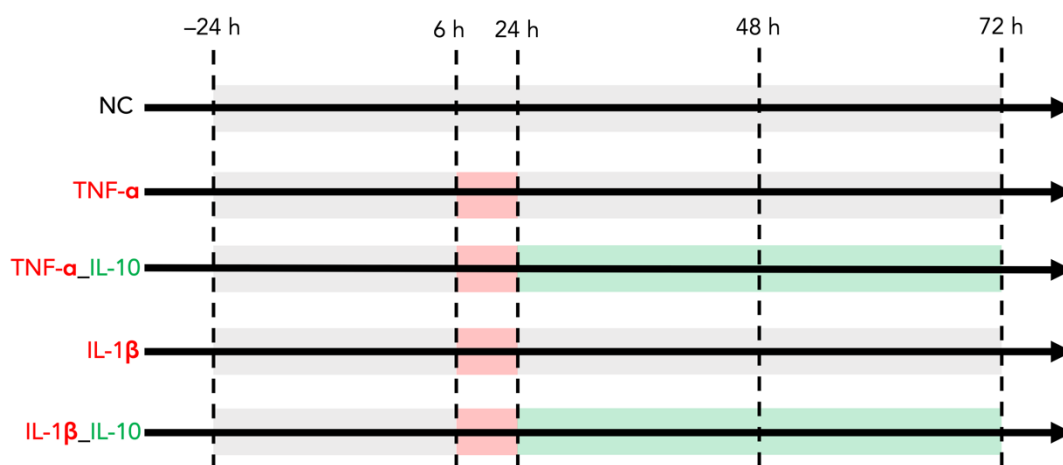
Uzyskane wyniki wyrażono jako procent kontroli negatywnej – jako stosunek wartości zmierzonej absorbancji dla próbki badanej do wartości zmierzonej absorbancji dla kontroli negatywnej. Od uzyskanych wyników każdorazowo odejmowano średnią wartość otrzymaną dla próby ślepej.

Celem oceny żywotności i proliferacji komórek hodowanych na powłoce, dno dołków płytki hodowlanej było pokryte badaną powłoką. Ocenie poddawano komórki po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z powłoką.

Celem oceny żywotności i proliferacji komórek po stymulacji cytokinami prozapalnymi i interleukiną przeciwzapalną, eksperyment zaplanowano w następujący sposób.

Po wysianiu komórek w odpowiedniej liczbie (jak wyżej) na płytkę hodowlaną, wstępnie inkubowano komórki przez 24 godziny w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie odebrano medium i poddano komórki działaniu wybranych cytokin prozapalnych – odpowiednio rekombinowanym ludzkim TNF- α (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) o stężeniu 5 ng/mL oraz rekombinowaną ludzką IL-1 β (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) o stężeniu 5 ng/mL, w kompletnym medium. Inkubację prowadzono przez 6 godzin w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie ponownie odebrano medium, dodając odpowiednio medium suplementowane rekombinowaną ludzką IL-10 o stężeniu 50 ng/mL. Komórki inkubowano przez 24, 48 i 72 godziny, dokonując analizy w każdym z tych punktów czasowych. Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane wyłącznie w kompletnym medium przez cały czas trwania eksperymentu. Kontrole pozytywne obejmowały komórki traktowane przez 6 godzin wybraną cytokiną prozapalną, wymianą medium hodowlanego i równoległej inkubacji komórek z tymi, które były

traktowane IL-10. Schematycznie zaplanowany eksperyment przedstawiono poniżej (patrz Rys. 20).



Rys. 20 Schematyczne przedstawienie zaplanowanego eksperymentu, mającego na celu ocenę żywotności i proliferacji komórek po stymulacji cytokinami prozapalnymi z następczą inkubacją z interleukiną przeciwzapalną. Wysiane komórki wstępnie inkubowano przez 24 godziny, następnie poddano przez 6 godzin działaniu odpowiednio rekombinowanemu ludzkiemu TNF- α o stężeniu 5 ng/mL bądź rekombinowanej ludzkiej IL-1 β o stężeniu 5 ng/mL, w kompletnym medium. Po tym czasie wprowadzono rekombinowaną ludzką IL-10 o stężeniu 50 ng/mL, w kompletnym medium i inkubowano przez 24, 48 i 72 godziny, dokonując właściwej oceny w każdym z punktów czasowych.

6.3.2.2 Ocena morfologii komórek śródbłonna hodowanych na otrzymanych powłokach

W eksperymencie, który polegał na ocenie interakcji HUVECs z badanymi powłokami, dokumentowano wzrost i morfologię komórek rejestrując obrazy kontrastu fazowego za pomocą mikroskopu IX71 (Olympus, Tokio, Japonia). Dodatkowo, fluorescencyjne wyznakowano jądra komórkowe i cytoszkielet aktynowy, rejestrując obrazy przy użyciu wspomnianego powyżej już mikroskopu fluorescencyjnego IX71. Wstępnie, w dołku 24-dółkowej płytki hodowlanej umieszczono okrągłe szkiełko nakrywkowe z naniesioną powłoką, następnie do dołka wysiano 5×10^4 komórek zawieszonych w 500 μ L kompletnego medium. Komórki poddawano ocenie po 24, 48 i 72 godzin od wysiania.

Komórki do typowej mikroskopii kontrastu fazowego nie wymagały szczególnego przygotowania. W przypadku mikroskopii fluorescencyjnej posłużono się następującym protokołem przygotowania próbek. Na wstępie komórki utrwalono poprzez inkubację w 4% roztworze paraformaldehydu (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) w PBS przez 15 minut, w temperaturze pokojowej. Komórki przemyto jednokrotnie PBS. Komórkowe włókna aktynowe barwiono falloidyną znakowaną FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (stężenie 330 nM w PBS), natomiast jądra komórkowe DAPI (Thermo Fisher Science, Waltham, Massachusetts, USA) (stężenie 300 nM w PBS). Barwienie struktur prowadzono jednocześnie,

przez 15 minut, w temperaturze pokojowej, w ciemności. Na koniec komórki przemyto PBS, zawieszając w świeżej porcji PBS.

Ocenę morfologii komórek dokonano również za pomocą skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego (CLSM, z ang. *confocal laser scanning microscopy*) poprzez fluorescencyjne wyznaczenie jąder komórkowych, cytoszkieletu aktynowego oraz wybranego markera ECs – czynnik von Willebranda (vWF, z ang. *von Willebrand factor*). Eksperyment przeprowadzono dla protokołu przedstawionego na Rys. 20.

W tym celu do każdego dołka 8-dółkowej mikropłytki (ibidi, Gräfelting, Niemcy) dodano po 10^4 komórek śródbłonka zawieszonych w 200 μ L kompletnego medium. Płytkę inkubowano wstępnie przez 24 godziny w inkubatorze CO₂, w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie komórki poddano właściwemu eksperymentowi. Po zakończeniu eksperymentu komórki jednokrotnie przemyto PBS i utrwalono poprzez inkubację w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS przez 15 minut, w temperaturze pokojowej. Komórki przemyto jednokrotnie PBS i przechowywano w 4°C do czasu barwienia.

Barwienie fluorescencyjne wybranych struktur komórkowych prowadzono według następującej procedury. Na wstępnie utrwalone komórki poddano działaniu 0,2% roztworu Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) i 10% koziej surowicy (NGS, z ang. *normal goat serum*) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) w PBS, przez 20 minut w temperaturze pokojowej, celem permabilizacji błony komórkowej i zablokowania niespecyficznych wiązań. Następnie naniesiono roztwór pierwszorzędowych, poliklonalnych, króliczych przeciwciał skierowanych przeciwko vWF (Bioss, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) rozcieńczonych roztworem 10% NGS w PBS o stężeniu 10 μ g/mL. Komórki inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności przez ~2 godziny. Po tym czasie odebrano roztwór przeciwciał pierwszorzędowych, komórki przepłukano jednokrotnie PBS, a następnie naniesiono roztwór drugorzędowych, poliklonalnych kozich przeciwciał, znakowanych Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) o stężeniu 4 μ g/mL. Przeciwciała drugorzędowe rozcieńczono do zadanego stężenia roztworem 10% NGS w PBS. Komórki inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności przez ~2 godziny. Następnie komórki trzykrotnie przemyto PBS, po czym inkubowano w PBS z 300 nM DAPI i 330 nM falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, Stany Zjednoczone) przez 15 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności, celem wybarwienia jądra komórkowego i cytoszkieletu aktynowego. Na koniec komórki ponownie przemyto dwukrotnie PBS i zawieszono w PBS

z dodatkiem medium montującego *ProLong Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone).

Obrazy zarejestrowano z wykorzystaniem CLSM TCS SPE (Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy) wyposażonego w diodowe lasery wzbudzające o długości fali 405 nm dla DAPI, 488 nm dla wykorzystanych przeciwciał drugorzędowych znakowanych Alexa Fluor 488 oraz 635 nm dla falloidyny znakowanej Alexa Fluor 647. Moc lasera została ustawiona na 20% mocy maksymalnej. Obrazy uzyskano w oprogramowaniu do mikroskopu LAS AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy).

6.3.2.3 Oznaczenie stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki śródbłonna hodowanych na otrzymanych powłokach

Wpływ powłok biofunkcjonalizowanych IL-4 i IL-10 na poziom uwalniania cytokin prozapalnych (MCP-1 i IL-8) przez HUVECs oceniano przy użyciu zestawu ELISA MCP-1 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) oraz zestawu ELISA IL-8 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Zakres krzywej standardowej w przypadku testu ELISA MCP-1 oraz ELISA IL-8 wynosił 15,6–1000 pg/mL. Każdorazowo wykonywano minimum trzykrotne oznaczenie danej cytokiny w próbce.

W eksperymencie HUVECs hodowano (jak wyżej) na 24-dolkowej płytce, w kompletnym medium, na badanych powłokach przez 24, 48 i 72 godziny. Początkowo, do każdego dolka wysiano 5×10^4 komórek. Codziennie zbierano medium hodowlane i zastępowano świeżym. Zebrane media przechowywano w temperaturze -80°C . Po zakończeniu eksperymentu, w zebranych mediach oznaczono poziom MCP-1 oraz IL-8, zgodnie z instrukcją producenta testów ELISA.

Dla każdej z badanych powłok wynik przedstawiono jako procent wartości oznaczonej dla kontroli negatywnej (która stanowiła 100%) po 24, 48 i 72 godzinach. W kolejnych dniach sumowano wartości stężeń danej cytokiny w próbce z wartością z dnia poprzednich, co było konieczne, gdyż medium podmieniano codziennie (patrz wyżej). Dodatkowo określono dzienny przyrost uwalnianej cytokiny dla każdej z badanych powłok, odejmując od uzyskanej wartości dla danego dnia, wartość z dnia poprzedniego.

6.3.2.4 Ocena adhezji makrofagów do otrzymanych powłok

W celu scharakteryzowania oddziaływań samej powłoki z monocytami oceniono przyleganie komórek THP-1 do powłoki, jak również do kontroli negatywnej (powierzchnia niepokryta).

W tym celu THP-1, zróżnicowane w makrofagi M0 (patrz poniżej) hodowano przez 72 godziny na testowanych powłokach. Powłoki przygotowano na 8-dolkowej mikropłytkie. Do każdego dolka wysiano 6×10^4 komórek zawieszonych w 300 μL medium. Po 72 godzinach, komórki

jednokrotnie przemyto PBS i utrwalono 4% paraformaldehydem w PBS przez 15 minut, w temperaturze pokojowej. Następnie komórki dwukrotnie przemyto PBS, po czym inkubowano w PBS z 300 nM DAPI i 330 nM falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 przez 15 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności, celem wybarwienia jądra komórkowego i cytoszkieletu aktynowego. Na koniec komórki ponownie przemyto dwukrotnie PBS i zawieszono w PBS z dodatkiem medium montującego. Obrazy zebrano z wykorzystaniem CLSM TCS SPE wyposażonego w diodowe lasery wzbudzające o długości fali 405 nm dla barwionych jąder komórkowych i 635 nm dla barwionej aktyny. Moc lasera została ustawiona na 20% mocy maksymalnej. Obrazy uzyskano w oprogramowaniu do mikroskopu LAS AF. Wybarwione fluorescencyjnie komórki THP-1, które przywarły do szkiełek pokrytych powłoką zliczono w 16 różnych polach widzenia.

6.3.2.5 Ocena interakcji między komórkami śródbłónka hodowanymi na otrzymanych powłokach a komórkowym modelem monocytów

Aby dokonać oceny interakcji międzykomórkowych przeprowadzono następujące doświadczenie. Ocenie poddano adhezję komórek THP-1 do HUVECs hodowanych przez 72 godziny na testowych powłokach, naniesionych na okrągłych szkiełkach nakrywkowych, umieszczonych w 24-dolkowej płytce do hodowli. Eksperyment miał odpowiedzieć na pytanie dotyczące stopnia rekrutacji monocytów do miejsca wprowadzenia stentu, wskutek oddziaływań z komórkami śródbłónka.

W tym celu komórki THP-1 zebrano i odwirowano ($180 \times g$, 10 minut, 4°C) i zawieszono w kompletnym medium RPMI-1640 z $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ kalceiny-AM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Związek ten nie wpływa na żywotność monocytów. Kalceina-AM biernie przechodzi przez błonę komórkową i jest hydrolizowana przez esteryazy komórkowe. Tego typu barwienie umożliwia ocenę integralności błony komórkowej i aktywności enzymów badanych komórek. Komórki inkubowano przez 1 godzinę w 37°C w standardowych warunkach (37°C , 5% CO_2). Następnie komórki ponownie zawieszono w kompletnym medium RPMI-1640 w liczbie 5×10^5 komórek zawieszonych w 1 mL. Następnie do dołka dodano $2,5 \times 10^5$ wybarwionych kalceina-AM komórek THP-1. W dołku znajdowała się warstwa HUVECs, pokrywająca powłokę (komórki w liczbie 5×10^4 zawieszonych w $500 \mu\text{L}$ kompletnego medium hodowane przez 72 godziny). Inkubację prowadzono przez 4 godziny. Następnie dwukrotnie przemyto komórki PBS i utrwalano 4% paraformaldehydem (10 minut, temperatura pokojowa). Po tym czasie ponownie, trzykrotnie przepłukano komórki PBS.

Zliczono liczbę komórek THP-1 przylegających do HUVECs pod mikroskopem fluorescencyjnym IX71. Komórki THP-1 wybarwione kalceiną-AM przyległe do warstwy HUVECs zliczono średnio w 6–8 różnych polach widzenia. Wyniki wyrażono jako procent przylegających monocytów w odniesieniu do kontroli negatywnej (czyli HUVECs hodowanych na niepokrytych powłoką

szkiełkach, te stanowiły 100%). HUVECs wstępnie traktowane przez 18 godzin LPS z *Salmonella Typhimurium* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) w stężeniu 4 ng/mL w kompletnym medium hodowlanym służyły jako kontrola pozytywna, referowana jako LPS.

6.3.2.6 Ocena aktywności biologicznej interleukin po związaniu na powłoce bazo- wej – polaryzacja makrofagów wskutek kontaktu z proponowaną powłoką

Na wstępie monocytu THP-1 zostały zróżnicowane w makrofagi M0 poprzez 24-godziną inkubację w kompletnym medium uzupełnionym 100 ng/mL 12-mirystynianem 13-octanu forbolu (PMA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) i 48-godziną inkubację w kompletnym medium hodowlanym bez PMA. Następnie komórki THP-1 wysiano do dołków w liczbie 10^5 zawieszonych w 500 μ L na 24-dółkową płytkę hodowlaną z dnem każdej studzienki pokrytym badaną powłoką. Tak wysiane komórki hodowano przez 72 godziny. Komórki traktowane masą interleukiny, która odpowiada masie naniesionej na powłokę podczas jej przygotowywania (200 ng odpowiedniej interleukiny) stosowano jako kontrolę pozytywną, a komórki nietraktowane interleukiną lub powłoką stosowano jako kontrolę ujemną.

Do analizy techniką cytometrii przepływowej, komórki THP-1 hodowane przez 72 godziny z proponowaną powłoką (oraz kontrolę ujemną i pozytywną) oderwano od naczynia hodowlanego przy użyciu roztworu 5 mM EDTA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) i odwirowano ($360 \times g$ przez 5 minut w 4°C). Komórki inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej w 100 μ L PBS uzupełnionym 2,5% inaktywowanym termicznie FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) oraz 5 μ L roztworu ludzkich przeciwciał IgG w PBS, blokujących receptor Fc (*TruStain FcX*; BioLegend, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Następnie komórki barwiono przeciwciałami MHC II sprzężonymi z V450 (BioLegend, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone), przeciwciałami CD163 sprzężonymi z FITC (BioLegend, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone) i przeciwciałami CD209 sprzężonymi z FITC (BioLegend, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone) lub odpowiednimi kontrolami izotypowymi (BioLegend, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone) w rozcieńczeniu 1:100 przez 20 minut na lodzie, w ciemności. Przygotowano oddzielne próbki dla przeciwciał barwionych FITC. Na koniec komórki przepłukano trzykrotnie w PBS i analizowano przy użyciu cytometru przepływowego LSRFortessa (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, Kalifornia, Stany Zjednoczone).

Wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania Flowing Software 2.5.1 (Cell Imaging and Cytometry, Turku Bioscience Center, Turku, Finlandia), określając procent komórek dodatnich względem odpowiednich markerów w porównaniu z kontrolą ujemną.

6.3.2.7 Ocena ekspresji cząsteczek adhezyjnych w komórkach śródbłónka

Ocenę ekspresji wybranych cząsteczek adhezyjnych w HUVECs dokonano, korzystając z CLSM, poprzez fluorescencyjne wyznakowanie ICAM-1.

HUVECs po przeprowadzonym eksperymencie (odpowiednio, po stymulacji cytokinami prozapalnymi oraz po następczej stymulacji cytokinami przeciwzapalnymi – patrz Rys. 20) jednokrotnie przemyto PBS i utrwalono poprzez inkubację w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS przez 15 minut, w temperaturze pokojowej. Komórki przemyto ponownie jednokrotnie PBS i przechowywano w 4°C do czasu barwienia.

Po utrwaleniu komórki poddano działaniu 0,2% roztworu Triton X-100 i 10% NGS w PBS, przez 20 minut, w temperaturze pokojowej. Następnie naniesiono roztwór pierwszorzędowych, monoklonalnych, mysich przeciwciał skierowanych przeciwko ICAM-1, znakowanych FITC (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, Stany Zjednoczone) rozcieńczonych roztworem 10% NGS w PBS o stężeniu 2 µg/mL. Komórki inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności przez ~3 godziny. Po tym czasie odebrano roztwór przeciwciał pierwszorzędowych, a komórki przepłukano jednokrotnie PBS. Dodatkowo wybarwiono jądra komórkowe i cytoszkielet aktynowy, inkubując komórki w PBS z 300 nM DAPI i 330 nM falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 przez 15 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności. Na koniec komórki ponownie przemyto dwukrotnie PBS i zawieszono w PBS z dodatkiem medium montującego.

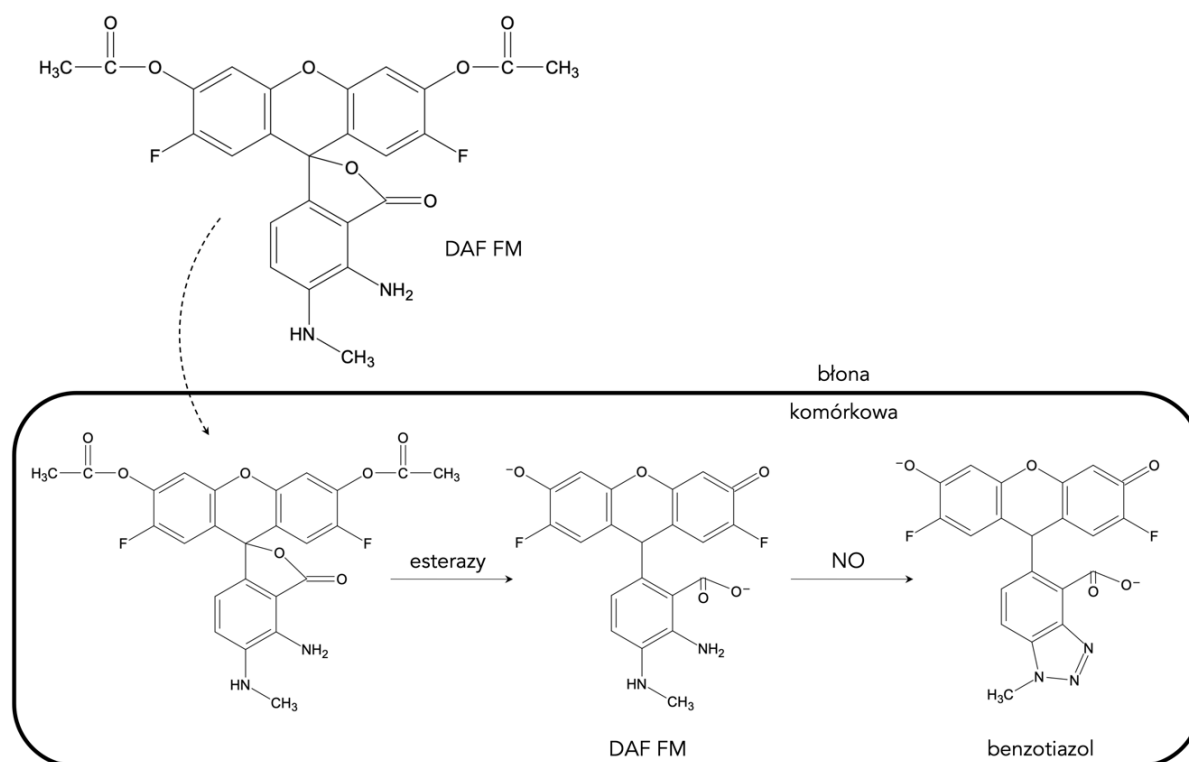
Obrazy zarejestrowano z wykorzystaniem CLSM TCS SPE. Za pomocą lasera o długości fali 405 nm wzbudzono DAPI, za pomocą lasera o długości fali 488 nm wzbudzono FITC, z którą sprzężone były przeciwciała wykorzystane do wyznakowania ICAM-1, natomiast za pomocą lasera o długości fali 635 nm wzbudzono Alexa Fluor 647 z którą sprzężono falloidynę. Standardowo moc lasera ustawiono na 20% mocy maksymalnej, a obrazy rejestrowano w oprogramowaniu do mikroskopu LAS AF.

6.3.2.8 Oznaczenie stężenia tlenu azotu w komórkach śródbłónka

HUVECs poddane działaniu wybranych czynników (patrz Rys. 20) poddano ocenie pod względem produkcji NO. Do tego celu wykorzystano diocetan 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluororesceiny (DAF-FM, z ang. *4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein*). Jest to odczynnik, który umożliwia ilościowe oznaczenie niskich stężeń NO. Diocetan DAF-FM biernie dyfunduje przez błony komórkowe i jest wewnątrzkomórkowo deacetylowany przez esterazy. Powstaje niewykazujący fluorescencji DAF-FM, który w wyniku reakcji z NO, tworzy fluorescencyjny już benzotriazol – patrz Rys. 21.

Na wstępie przygotowano roztwór podstawowy diocetanu DAF-FM o stężeniu 5 mM. W tym celu 50 µg diocetanu DAF-FM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts,

Stany Zjednoczone) rozpuszczono w 20 μL bezwodnego DMSO (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Następnie przygotowano roztwór roboczy, poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego kompletnym medium do stężenia 10 μM . Komórki, które uprzednio zebrano, inkubowano z rozcieńczonym dioctanem DAF-FM przez 60 minut w inkubatorze, w standardowych warunkach (37°C , 5% CO_2). Po tym czasie komórki przemyto PBS poprzez wirowanie, celem usunięcia nadmiaru sondy i zastąpiono świeżym, kompletnym medium. Komórki naniesiono na 8-dółkową mikroplótkę. Inkubowano komórki w wyżej wskazanych warunkach dodatkowo 2 godziny, aby umożliwić całkowitą deestryfikację wewnątrzkomórkowych dioctanów i wstępne przyklejenie komórek do dna płytki.



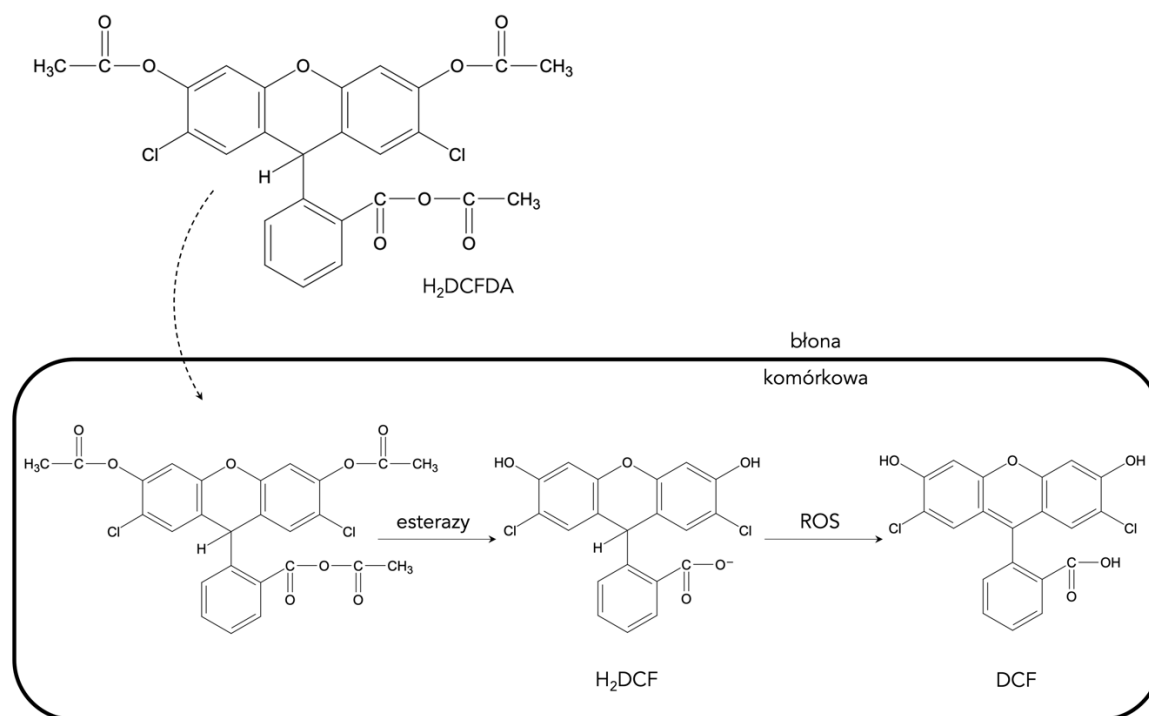
Rys. 21 Mechanizm oznaczenia tlenku azotu (NO, z ang. *nitric oxide*) w komórkach z wykorzystaniem dioctanu 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluororesceiny (DAF-FM, z ang. *4-amino-5-methylamino-2',7'-difluororescein*). Dioctan DAF-FM biernie dyfunduje przez błony komórkowe i jest wewnątrzkomórkowo deacetylowany przez esterazy. Powstaje niewykazujący fluorescencji DAF-FM, który w wyniku reakcji z NO, tworzy fluorescencyjny już benzotriazol. Opracowanie własne.

Powyżej wskazany krok zbierania komórek i ponownego nanoszenia na nowe naczynie hodowlane wynikało z zaobserwowanego podczas wstępnych eksperymentów odklejania się komórek wskutek zadziałania użytej sondy.

Na koniec zarejestrowano obrazy fluorescencyjne badanych komórek z wykorzystaniem CLSM TCS SPE, korzystając z lasera wzbudzającego o długości fali 488 nm, przy ustawieniach standardowych mikroskopu (jak wyżej).

6.3.2.9 Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłónka

Oznaczeniu poddano również poziom ROS generowanych w HUVECs poddanych działaniu wybranych czynników (patrz Rys. 20).



Rys. 22 Mechanizm oznaczenia reaktywnych form tlenu (ROS, z ang. *reactive oxygen species*) w komórkach z wykorzystaniem diocjanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA, z ang. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Odczynnik ten jest chemicznie zredukowaną formą fluoresceiny. Po deacetylacji H₂DCFDA przez wewnątrzkomórkowe esterazy i utlenieniu powstałego związku, niefluorescencyjny H₂DCFDA przekształcany jest w wysoce fluorescencyjną 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF, z ang. *2',7'-dichlorofluorescein*). Opracowanie własne.

Do tego celu posłużono się przenikającym do komórek diocjanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA, z ang. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Odczynnik ten jest chemicznie zredukowaną formą fluoresceiny, która znalazła zastosowanie jako wskaźnik ROS w komórkach. Po deacetylacji H₂DCFDA przez wewnątrzkomórkowe esterazy i utlenieniu powstałego związku, niefluorescencyjny H₂DCFDA przekształcany jest w wysoce fluorescencyjną 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF, z ang. *2',7'-dichlorofluorescein*) – patrz Rys. 22.

Procedurę prowadzono analogicznie jak przy oznaczaniu NO. Początkowo przygotowano roztwór podstawowy H₂DCFDA o stężeniu 5 mM. W tym celu nważono odpowiednią ilość H₂DCFDA, rozpuszczając ją w adekwatnej objętości DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone). Następnie przygotowano roztwór roboczy, poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego kompletnym medium do stężenia 10 μM. Komórki, które uprzednio zebrano, inkubowano z rozcieńczonym H₂DCFDA przez 60 minut w inkubatorze, w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie komórki przemyto PBS poprzez wirowanie, celem usunięcia nadmiaru sondy i zastąpiono świeżym, kompletnym medium. Komórki naniesiono na 8-dółkową

mikropłytkę. Inkubowano komórki w wyżej wskazanych warunkach dodatkowo 2 godziny, aby umożliwić całkowitą deestryfikację wewnątrzkomórkowych diocetanów i wstępne przyklejenie komórek do dna płytki. Ponownie krok ze zbieraniem komórek i ponownym nanoszeniem na nowe naczynie hodowlane był konieczny – poczyniono analogiczną obserwację jak wyżej.

Na koniec zarejestrowano obrazy fluorescencyjne badanych komórek z wykorzystaniem CLSM TCS SPE, korzystając z lasera wzbudzającego o długości fali 488 nm, przy ustawieniach standardowych mikroskopu (jak wyżej).

6.4 Analiza statystyczna uzyskanych danych

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania SPSS Statistics (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone). Zastosowano następujące testy statystyczne. Testowania założenia normalności rozkładu prowadzono z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka na poziomie istotności 0,05. Do sprawdzenia, czy analizowane dane spełniają kryterium równości wariancji, wykorzystano test Levene'a na poziomie istotności 0,05. Gdy dane spełniały warunki normalności rozkładu i równości wariancji, przeprowadzano jednokierunkową ANOVA na poziomie istotności 0,05 oraz analizę *post hoc* HSD Tukeya. W przypadku niespełnienia warunków do przeprowadzenia testów parametrycznych, wykonywano testy nieparametryczne. Posługiwano się testem Kruskala-Wallisa na poziomie istotności 0,05, gdzie przy wielokrotnych porównaniach międzygrupowych dokonywano korekty poziomu istotności za pomocą poprawki Bonferroniego. Wartości *p* uzyskiwane podczas przeprowadzonych analiz każdorazowo podawano wraz z właściwą interpretacją wyniku.

Rozdział 7

Wyniki i dyskusja

7.1 Fizyko-chemiczne właściwości otrzymanej powłoki

7.1.1 Ocena struktury chemicznej powłoki za pomocą spektroskopii w podczerwieni

Do oceny struktury chemicznej otrzymanych powłok wykorzystano technikę ATR-FTIR. Zarejestrowano zarówno widma powłok, na każdym z etapów funkcjonalizacji powierzchni, jak i widma wodnych roztworów wybranych interleukin. W późniejszej analizie widma interleukin posłużyły jako referencyjne, celem wykazanie obecności cytokin na powierzchni otrzymanej powłoki. W przypadku powłok wzbogaconych o chitozan, zarejestrowano również widma roztworu chitozanu, wykorzystanego w procesie modyfikowania powierzchni.

Na Rys. 23A przedstawiono widma ATR-FTIR uzyskane odpowiednio dla wodnych roztworów IL-4 i IL-10. Zgodnie z posiadaną wiedzą, widma wybranych interleukin nie były wcześniej publikowane w literaturze naukowej. Oba widma są typowe dla białek i są zdominowane przez amidowe pasma wibracyjne szkieletu peptydowego. Szerokie pasmo w zakresie $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ pochodzi głównie od drgań rozciągających N–H (Amid A) z udziałem drgań rozciągających O–H, które pochodzą od pozostałej w próbce wody. Pasma Amidu I, powstałe wskutek drgań rozciągających C=O i pasmo Amidu II, powstałe wskutek drgań zginających w płaszczyźnie N–H, obserwowane są w zakresie liczby falowej $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Z kolei pasmo Amidu III, które powstaje w wyniku drgań zginających w płaszczyźnie N–H oraz drgań rozciągających C–N, występuje w zakresie spektralnym $1300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ (Kong and Yu 2007). Dominujące pasmo przy $\sim 1060\text{ cm}^{-1}$ związane jest z drganiami rozciągającymi C–N amin alifatycznych (Munje et al. 2017). Omówione pasma zostały zidentyfikowane na widmach interleukin – zarówno dla IL-4 jak i IL-10.

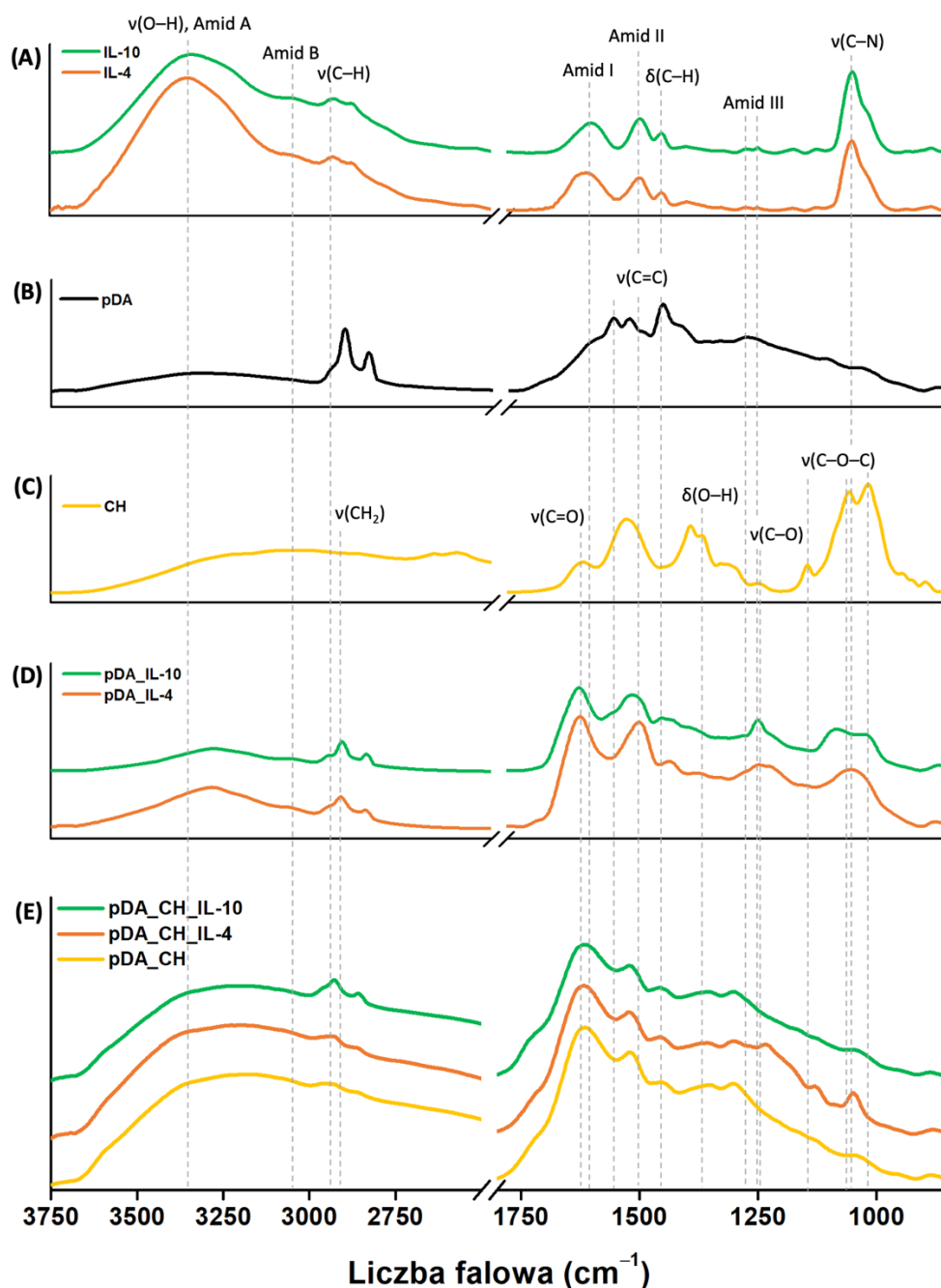
Opisane powyżej pasma są także łatwo identyfikowalne podczas analizy widm uzyskanych dla powłok sfunkcjonalizowanych interleukinami — odpowiednio pDA_IL-4 oraz pDA_IL-10

(patrz Rys. 23D). Niemniej jednak na widmach uzyskanych dla tych powłok obserwuje się znaczny wzrost wartości absorpcji pasma Amidu III przy 1260 cm^{-1} z jednoczesnym zmniejszeniem intensywności pasma przy $\sim 1060\text{ cm}^{-1}$. Niniejszą obserwację można wyjaśnić następująco. Syntezę warstwy pDA przeprowadzono w warunkach alkalicznych, co spowodowało przesunięcie równowagi w kierunku chinonu dopaminy. To nadało warstwie opartej na pDA reaktywność wobec grup aminowych białek (patrz 1.4.1 Polidopamina – wysoce adhezyjny i reaktywny chemicznie materiał bazowy) (H. Lee, Rho, and Messersmith 2009). Zatem, z tego może wynikać wzrost absorpcji pasma Amidu III (wynikającego zwłaszcza z drgań rozciągających C–N). Ponadto warto zauważyć, że tak powstałe wiązanie jest zasadniczo odporne na hydrolityczne działanie wody, które jest powszechne w przypadku innych metod biokoniugacji (H. Lee, Rho, and Messersmith 2009). Stanowi to niewątpliwie zaletę prezentowanego rozwiązania. Tak powstała powłoka może zachowywać swoje właściwości w środowisku docelowego zastosowania. Co więcej, już sama zmiana kształtu pasm amidowych wskazuje na powstanie nowych oddziaływań pomiędzy polidopaminą a cząsteczką interleukiny.

Opisane powyżej pasma z powodzeniem można również wskazać na widmach uzyskanych dla powłok wzbogaconych o chitozan i sfunkcjonalizowanych interleukinami — odpowiednio pDA_CH_IL-4 oraz pDA_CH_IL-10 (patrz Rys. 23E). Jednak w tym przypadku pasma te często występują w zakresie spektralnym pasm pochodzących od chitozanu (patrz dalej), stąd momentami utrudnia to identyfikację pasm swoistych dla interleukin i nie jest możliwe jednoznaczne wskazanie, którym cząsteczkom one odpowiadają.

W przypadku warstwy polidopaminy (patrz Rys. 23B), uwagę zwracają charakterystyczne pasma w zakresach spektralnych $1600\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ i $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ powstałe na skutek drgań rozciągających C=C w pierścieniu aromatycznym (X. Yang, Duan, and Ran 2017).

Z kolei analizowane widmo ATR-FTIR chitozanu (patrz Rys. 23C) charakteryzuje się szerokim pasmem w zakresie $3600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ (patrz wyżej), któremu można przypisać drgania rozciągające grup O–H oraz N–H. Pasma przy $\sim 2927\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2870\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1403\text{ cm}^{-1}$ oraz $\sim 1320\text{ cm}^{-1}$ związane są z symetrycznymi i asymetrycznymi drganiami rozciągającymi CH_2 w pierścieniu piranozowym polisacharydu. Ponadto, pasmo 1631 cm^{-1} można przypisać drganiom rozciągającym C=O w grupach amidowych (z powodu częściowej deacetylacji chitozanu). Pasma przy 1537 cm^{-1} wskazują na drgania zginające N–H w pierwszorzędowych grupach aminowych, licznych i charakterystycznych dla chitozanu. Pasma przy 1376 cm^{-1} przypisuje się drganiom zginającym O–H grup alkoholowych, podczas gdy pasmo przy 1253 cm^{-1} jest wynikiem drgań rozciągających C–O. Na koniec, pasma przy 1150 cm^{-1} , 1063 cm^{-1} oraz 1015 cm^{-1} wiąże się z ugrupowaniem C–O–C wiązania glikozydowego (Minisy, Salahuddin, and Ayad 2020).



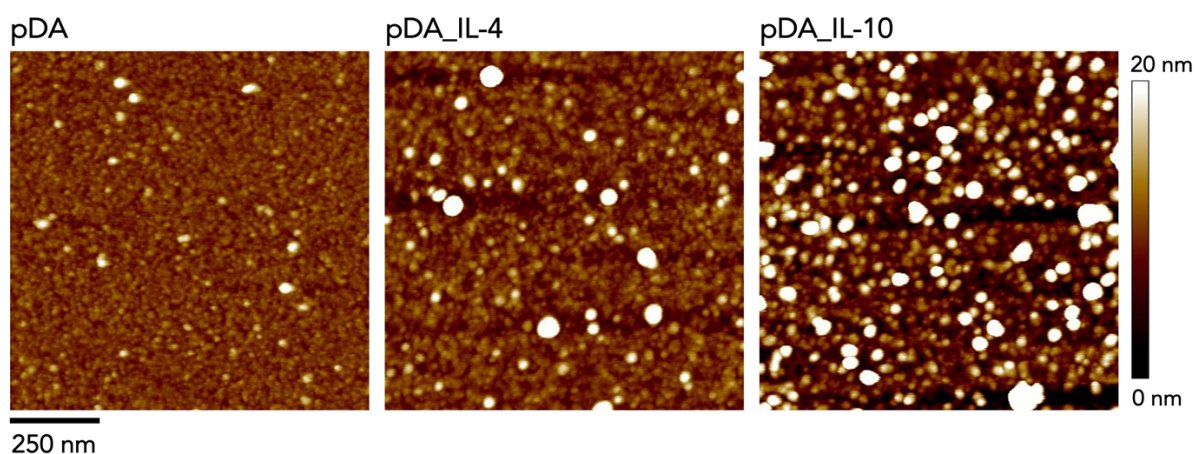
Rys. 23 (A) Referencyjne widma ATR-FTIR wybranych interleukin – IL-4 (linia pomarańczowa) i IL-10 (linia zielona). (B) Referencyjne widmo ATR-FTIR polidopaminy (pDA, linia czarna). (C) Referencyjne widmo ATR-FTIR chitozanu (linia żółta). (D) Uśrednione widma ATR-FTIR materiału pokrytego powłoką na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej odpowiednio IL-4 (pDA_IL-4, linia pomarańczowa) oraz IL-10 (pDA_IL-10, linia zielona). (E) Uśrednione widma ATR-FTIR materiału pokrytego powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozaniem (pDA_CH, linia żółta) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4, linia pomarańczowa) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10, linia zielona). Na widmach wskazano wybrane, charakterystyczne pasma.

Podsumowując, na podstawie opisanych powyżej wyników, można z całą pewnością stwierdzić, że w strukturze powłoki obecne są cząsteczki wybranych interleukin oraz pomiędzy materiałem bazowym powłoki — zarówno polidopaminą, jak i chitozaniem — a interleukinami istnieje swoistego rodzaju oddziaływanie chemiczne, opisane we wstępie (patrz 1.4.2 Teoria wiązania

interleukin na powierzchni materiału bazowego oraz 1.4.4 Technika sieciowania a immobilizacja interleukin). To sugeruje, że przeprowadzony proces funkcjonalizacji powierzchni zakończył się sukcesem (Kane, Ashby, and Pruitt 2009; Morent et al. 2008).

7.1.2 Charakterystyka nanostrukturalna powłoki za pomocą mikroskopii sił atomowych

Technika AFM umożliwiła dokonanie charakterystyki nanostruktury i obrazowanie topografii otrzymanej powłoki na każdym etapie jej przygotowania. Technikę wykorzystano również do wykazania obecności odpowiednich cząsteczek interleukiny na powierzchni badanych materiałów oraz ich rozmieszczenia w obrębie powłoki.



Rys. 24 Obrazy AFM otrzymane na każdym etapie przygotowania powłoki – powierzchnia pokryta powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powierzchnia pokryta powłoką na bazie polidopaminy i sfunkcjonalizowana przez wprowadzenie IL-4 lub IL-10 (odpowiednio pDA_IL-4 i pDA_IL-10). Powierzchnia skanowania wynosiła $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. Po prawej stronie przedstawiono skalę wysokości obiektów.

Można zauważyć, że otrzymana powłoka polimerowa, naniesiona na zadaną powierzchnię (w tym przypadku mika potasowa) charakteryzuje się jednorodną nanostrukturą (patrz Rys. 24). W literaturze przedstawiono analogiczne obrazy AFM cienkowarstwowej nanostruktury polidopaminy (X. Han, Tang, and Jin 2018). W zależności od czasu jej polimeryzacji oraz stężenia chlorowodoru dopaminy możliwe są modyfikacje, zarówno grubości, jak i chropowatości uzyskanej warstwy (Ball et al. 2012). Parametry te mogą istotnie wpływać na adhezję i wzrost komórek śródbłonna na otrzymanej, odpowiednio opracowanej powierzchni (Tsai et al. 2014). Na podstawie zmian chropowatości, którą łatwo modyfikować w przypadku polidopaminy, można również oczekiwać odmiennego wpływu na pozostałe komórki naczyniowe (K. Zhou et al. 2021). Stwarza to tym samym możliwość optymalizacji struktury powierzchni stentu z otrzymaną powłoką, w zależności od odpowiedzi komórek zasiedlających tę powierzchnię.

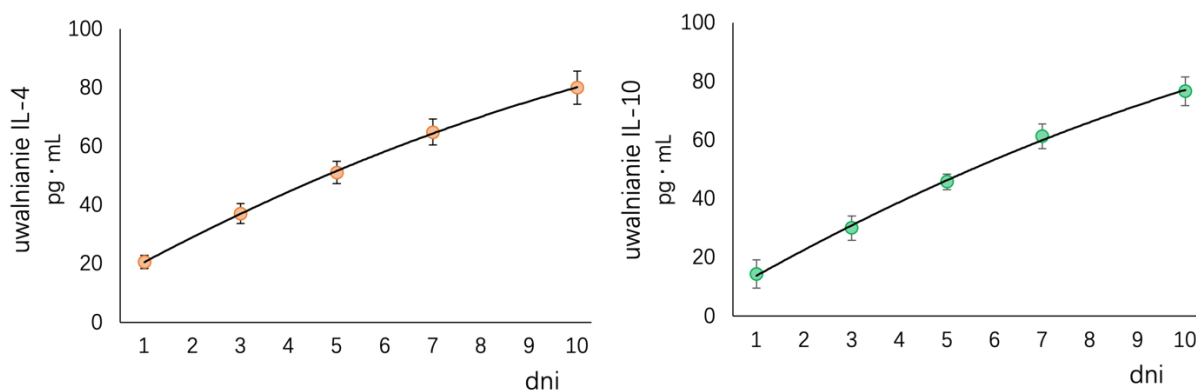
Kolejne dwa obrazy przedstawione na Rys. 24 odpowiadają powłoce pDA_IL-4 i pDA_IL-10. Są to powłoki na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej IL-4 lub IL-10. W tym przypadku, w porównaniu do pDA, widoczny jest wzrost liczby swoistych obiektów w obrębie modyfikowanej

powierzchni, jak również można wyróżnić duże struktury. Stąd można wnioskować, że powłoka na bazie polidopaminy wykazuje reaktywność chemiczną i jest zdolna do wiązania cząsteczek interleukiny wprowadzonych do roztworu, w którym zanurzono odpowiednią powierzchnię. Poparciem dla poczynionej obserwacji mogą być przedstawione powyżej badania z wykorzystaniem techniki ATR-FTIR (patrz wyżej). Szczególnie większe zagęszczenie wspomnianych obiektów obserwuje się na powierzchni pokrytej powłoką pDA_IL-10. Niemniej jednak i w przypadku powłoki pDA_IL-4 takie obiekty są obecne w wystarczająco dużej liczbie.

Podsumowując, zaproponowana procedura umożliwiła otrzymanie powłoki na bazie polidopaminy o jednorodnej, łatwo modyfikowalnej powierzchni, a także umożliwiła wzbogacenie powierzchni o odpowiednie znacznie większe obiekty, które to stanowią interleukiny.

7.1.3 Kinetyka uwalniania interleukin z powierzchni otrzymanej powłoki

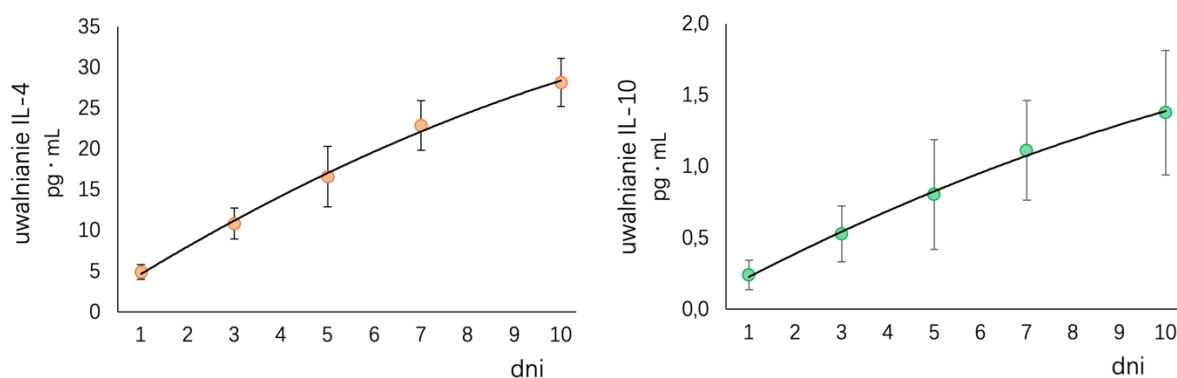
Ostatnią z metod oceny właściwości fizyko-chemicznych powłok sfunkcjonalizowanych wybranymi cytokinami, była ocena kinetyki uwalniania interleukin z powierzchni powłok. Służyło to sprawdzeniu, czy badana powłoka — oprócz tego, że jest nośnikiem interleukin — może lokalnie uwalniać interleukiny, które były związane na jej powierzchni. W tym celu oznaczono stężenie badanych interleukin (IL-4 i IL-10) w PBS z dodatkiem BSA, w którym inkubowano badane powłoki. Oznaczenie tego stężenia wykonano w 1., 3., 5., 7. i 10. dniu inkubacji.



Rys. 25 Wykres zależności uwalniania wybranej interleukiny z powłoki (odpowiednio uwalnianie IL-4 z powłoki pDA_IL-4 – wykres po lewej, uwalnianie IL-10 z powłoki pDA_IL-10 – wykres po prawej) w funkcji czasu (kolejne dni). Materiałem bazowym powłoki była polidopamina. Przedstawiono odchylenie standardowe dla powłoki pDA_IL-4 oraz 5-krotność odchylenia standardowego dla powłoki pDA_IL-10 (dla lepszej wizualizacji).

Zarówno powłoka sfunkcjonalizowana IL-4, jak i powłoka sfunkcjonalizowana IL-10 wykazują stopniowe, liniowe uwalnianie niektórych cytokin w ciągu 10-dniowego okresu inkubacji, osiągając maksymalne stężenie ~ 80 pg/mL pod koniec tego okresu (patrz Rys. 25). Warto zauważyć, że po 10-dniowym okresie inkubacji profil uwalniania nie wydaje się osiągać *plateau* ani maleć. Kinetyka uwalniania pozostaje względnie stała, co niewątpliwie może być zaletą otrzymanej powłoki. Ze względu na doniesienia, że niedobór IL-4 lub IL-10 jest poważnym czynnikiem ryzyka rozwoju

ISR (Sun et al. 2020; Verma et al. 2016), otrzymane powłoki mogą znacznie ograniczać to zjawisko poprzez uwalnianie wybranych cytokin *in situ*. Podobne rozwiązania koncepcyjne (w tym uwalnianie cytokin), ale charakteryzujące się bardziej skomplikowanym procesem produkcyjnym, opisano dla biomateriałów ortopedycznych (Gao et al. 2018; Hachim et al. 2017). W przytoczonych publikacjach, omówionych również we wstępie (patrz 1.3.2 Wybrane efekty molekularne i komórkowe zależne od interleukiny 4 w okresie przed- i poimplantacyjnym) początkowe uwalnianie IFN- γ , jak i opóźnione uwalnianie IL-4 osiągają plateau w 10. dniu obserwacji (Gao et al. 2018), czego nie zaobserwowano w tym punkcie czasowym dla otrzymanej w niniejszej rozprawie doktorskiej powłoki. Można zatem stwierdzić, że w przypadku otrzymanych powłok profil uwalniania jest względnie stały w dłuższym okresie, w porównaniu z wyżej wymienionymi biomateriałami. Większą kinetykę uwalniania cytokin w 10. dniu, gdzie również nie zaobserwowano spadku nachylenia krzywej, odnotowano dla biomateriału, który również przywołano już wcześniej. Niemniej jednak protokół przygotowania jest bardziej skomplikowany w porównaniu z proponowanym w niniejszej pracy (nie ma potrzeby pokrywania cytokin warstwą polimeru ani prowadzenia sieciowania w odpowiednich warunkach) (Yiting Li et al. 2019).



Rys. 26 Wykres zależności uwalniania wybranej interleukiny z powłoki (odpowiednio uwalnianie IL-4 z powłoki pDA_CH_IL-4 – wykres po lewej, uwalnianie IL-10 z powłoki pDA_CH_IL-10 – wykres po prawej) w funkcji czasu (kolejne dni). Materiałem bazowym powłoki była polidopamina wzbogacona o chitozan. Przedstawiono odchylenie standardowe dla powłoki pDA_CH_IL-4 oraz odchylenie standardowe dla powłoki pDA_CH_IL-10.

Co ciekawe, dla powłok otrzymanych na bazie polidopaminy, wzbogaconych w chitozan i sfunkcjonalizowanych wybranymi interleukinami za pośrednictwem techniki sieciowania zaobserwowano niższe, osiągane maksymalne stężenia cytokin w poszczególnych dniach inkubacji. Były to wartości rzędu $\sim 25\text{--}30$ pg/mL dla powłoki pDA_CH_IL-4. Jeszcze niższe stężenia odnotowano dla powłoki pDA_CH_IL-10, rzędu $\sim 1,5$ pg/mL (patrz Rys. 26). Profil uwalniania biocząsteczek utrzymuje jednak tendencję wzrostową (analogicznie jak powyżej). Wydaje się zatem, że metoda biokoniugacji z wykorzystaniem EDC i sulfo-NHS skutkuje wytworzeniem bardziej odpornego na rozkład wiązania kowalencyjnego. Poparciem tej teorii może być fakt, że wiązanie amidowe jest odporne na hydrolizę (Massolo, Pirola, and Benaglia 2020), a co najważniejsze, przecież

jest odpowiedzialne za stabilizację struktury pierwszorzędowej białek (Sanvictores and Farci 2022). Z kolei wytłumaczenia zaobserwowanych różnic pomiędzy powłoką pDA_CH_IL-4 i pDA_CH_IL-10 można upatrywać w zawartości poszczególnych aminokwasów w sekwencji interleukin, uczestniczących w procesie biokoniugacji (patrz 1.4.4 Technika sieciowania a immobilizacja interleukin). W przypadku IL-4, aminokwasów wprowadzających wolne grupy karboksylowe jest 14, podczas gdy w cząsteczce IL-10 jest ich aż 21. Stąd IL-10 posiada więcej punktów uchwytu w obrębie powłoki, a zatem mniejsze jej ilości mogą zostać uwolnione z powierzchni.

Podsumowując, przedłużony czas uwalniania interleukin z otrzymanych w niniejszej rozprawie doktorskiej powłok został osiągnięty przy mniej skomplikowanej procedurze. Ponadto dłuższy okres uwalniania, bez zauważalnych zmian w jego profilu, wskazuje na terapeutyczny potencjał powłoki zarówno w pierwszych dniach po zabiegu implantacji stentu, jak i dla późniejszego uwalniania IL-4 lub IL-10. Różnice pomiędzy sfunkcjonalizowanymi powłokami, odpowiednio na bazie polidopaminy i polidopaminy z chitozanem mogą sugerować bardziej miejscowe działanie tych drugich (co wynika z silniejszego związania biocząsteczek na tak zmodyfikowanej powierzchni).

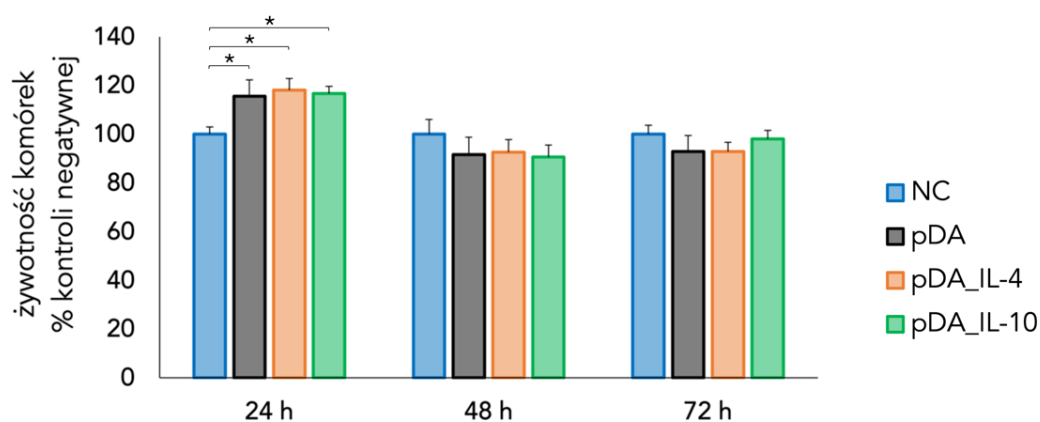
7.2 Aktywność biologiczna otrzymanych powłoki

7.2.1 Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłónka hodowanych na otrzymanych powłokach

Celem oceny zmian w żywotności i proliferacji HUVECs, zależnie od zastosowanej modyfikacji powierzchni, przeprowadzono test MTT (patrz Rys. 27 oraz Rys. 28). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej (patrz 6.4 Analiza statystyczna uzyskanych danych).

Dla wszystkich analizowanych grup, parametry opisujące żywotność i proliferację komórek, spełniły zarówno założenie o normalności rozkładu (wg testu Shapiro-Wilk) oraz kryterium równości wariancji (wg testu Levene'a). Na podstawie przeprowadzonego testu jednokierunkowej ANOVA, po 24-godzinnej inkubacji komórek na badanych powłokach, uzyskana wartość p jest znacznie niższa niż 0,001, co wskazuje, że podczas pierwszego dnia inkubacji HUVECs proliferowały znacznie lepiej na otrzymanych powłokach niż komórki w kontroli negatywnej (NC, z ang. *negative control*) – komórki hodowane w dołkach płytki hodowlanej bez powłok. Analiza *post hoc* wykazała wartość p znacznie niższą niż 0,001 za każdym razem dla porównania NC z pDA, pDA_IL-4 i pDA_IL-10. Nie odnotowano statystycznych różnic w stopniu proliferacji HUVECs porównując powłoki między sobą. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że proponowana modyfikacja powierzchni sprzyja wzrostowi HUVECs w początkowej fazie.

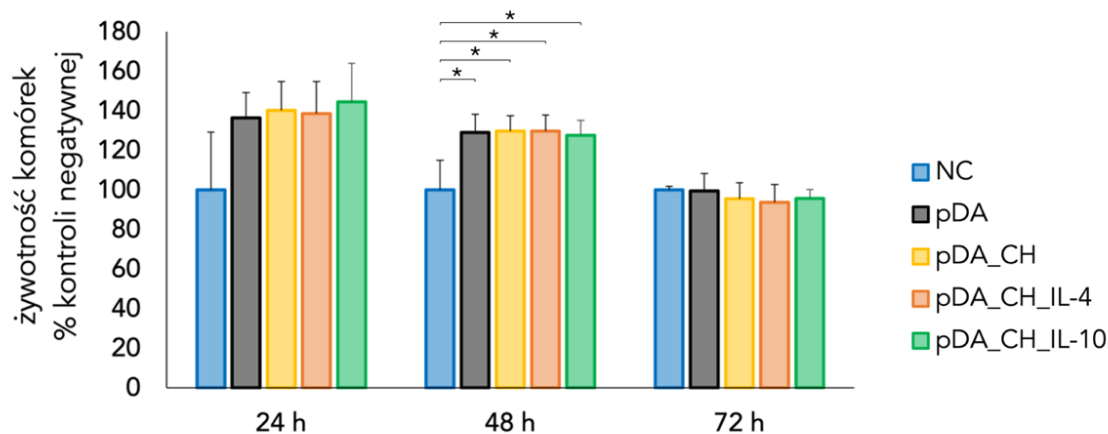
Podobną analizę przeprowadzono dla następujących punktów czasowych, odpowiednio po 48 godzinach i 72 godzinach. Przy 48-godzinnej inkubacji nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między grupami (zgodnie z jednoczynnikową ANOVA wartość p wynosiła 0,063). Analiza *post hoc* również nie wykazała różnic międzygrupowych na poziomie istotności statystycznej ustalonym na 0,05. Przy 72-godzinnej inkubacji jednoczynnikowa ANOVA wykazała statystyczną różnicę między grupami przy założonym poziomie istotności statystycznej (wartość p wyniosła 0,033). Niemniej jednak analiza *post hoc* nie wykazała istotnych statystycznie różnic między grupami w porównaniach wielokrotnych. Tak więc powłoki nie wpływają na wzrost komórek w późniejszym okresie w istotnym statystycznie stopniu – wzrost nie różni się od tego, scharakteryzowanego dla NC.



Rys. 27 Żywotność HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach po wprowadzeniu ich na powierzchnię naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która została pokryta — odpowiednio — powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoką na bazie polidopaminy z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_IL-4) oraz IL-10 (pDA_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Żywotność tych komórek stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości p przedstawiono jako * ($p < 0,05$).

Warto zauważyć, że spadek proliferacji, który nastąpił po 48 godzinach i 72 godzinach może wynikać z promowania adhezji i wzrostu komórek w pierwszym dniu inkubacji z powłokami. Skutkowało to szybszym osiągnięciem wysokiej konfluencji komórek w późniejszym okresie (patrz Rys. 29), co mogło ograniczyć dalszy wzrost komórek (z ang. *contact inhibition*) i w rezultacie spadek ich żywotności w badaniach *in vitro*. Ograniczenie wzrostu nie może wynikać z wysokiego stężenia zastosowanych interleukin, gdyż dokonano odpowiednich pomiarów ich uwalniania (patrz 7.1.3 Kinetyka uwalniania interleukin z powierzchni otrzymanej powłoki).

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że otrzymana powłoka zapewnia lepszą endotelializację powierzchni stentu kardiowaskularnego w pierwszych 24 godzinach (w porównaniu do NC, rozumianej jako rutynowa hodowla komórkowa).



Rys. 28 Żywotność HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach po wprowadzeniu ich na powierzchnię naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która została pokryta — odpowiednio — powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozaniem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Żywotność tych komórek stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości p przedstawiono jako * ($p < 0,05$).

Analizę statystyczną przeprowadzono również dla powłok wzbogaconych chitozaniem. W przypadku analizy prowadzonej dla 24-godzinnej inkubacji, parametry opisujące żywotność i proliferację komórek w niektórych grupach nie spełniły wymagań do przeprowadzenia testów parametrycznych. Stąd wykonano analizę nieparametryczną – test Kruskala-Wallisa na poziomie istotności 0,05, gdzie przy wielokrotnych powtórzeniach dokonano korekty poziomu istotności za pomocą poprawki Bonferroniego – poziom istotności po poprawce wynosił 0,005. Na podstawie przeprowadzonego testu uzyskana wartość p wyniosła 0,043, wskazując na istotne statystycznie różnice między grupami. Wskutek wielokrotnych powtórzeń jednak nie wykazano różnic na poziomie istotności po poprawce, niemniej jednak były wyniki sugerujące możliwe zmiany w proliferacji i żywotności pomiędzy grupą NC a pDA_CH ($p = 0,008$) oraz pomiędzy NC a pDA_CH_IL-10 ($p = 0,008$). Dla kolejnych punktów czasowych, dla których prowadzono analizę, dane spełniły zarówno założenie o normalności rozkładu (wg testu Shapiro-Wilk) oraz kryterium równości wariancji (wg testu Levene’a), dlatego przeprowadzono testy parametryczne. Na podstawie przeprowadzonego testu jednokierunkowej ANOVA, po 48-godzinnej inkubacji komórek na badanych powłokach, uzyskana wartość p była znacznie niższa niż 0,001, co wskazuje, że komórki proliferowały znacznie lepiej na otrzymanych powłokach niż komórki w NC. Analiza *post hoc* wykazała wartość p znacznie niższą niż 0,001 za każdym razem dla porównania NC z pDA, pDA_CH, pDA_CH_IL-4 i pDA_CH_IL-10. Nie odnotowano statystycznych różnic w stopniu proliferacji HUVECs porównując powłoki między sobą. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że każda proponowana modyfikacja powierzchni sprzyja wzrostowi HUVECs. Analogiczna analiza po 72-

godzinnej inkubacji nie wykazała już wartości p sugerującej różnice międzygrupowe istotne statystycznie na zadanym poziomie istotności ($p = 0,259$).

Na podstawie uzyskanych wyników w przypadku i tych powłok można stwierdzić, że otrzymana powłoka z pewnością wpływa na wzrost komórek śródbłonka, sugerując, że może sprzyjać endotelializacji powierzchni stentu kardiowaskularnego. Niemniej jednak nie zauważa się różnic we wzroście komórek w późniejszym okresie.

Zaproponowane w niniejszej rozprawie doktorskiej powłoki wpisują się niewątpliwie w trend obecnie promowany w opracowywaniu nowych koncepcji powłok. Zapewniając szybszą i skuteczniejszą re-endotelializację powierzchni stentu można zapobiec powikłaniom po PCI, w tym NIH i ISR (Baek et al. 2022; Marei, Ahmetaj-Shala, and Triggle 2022).

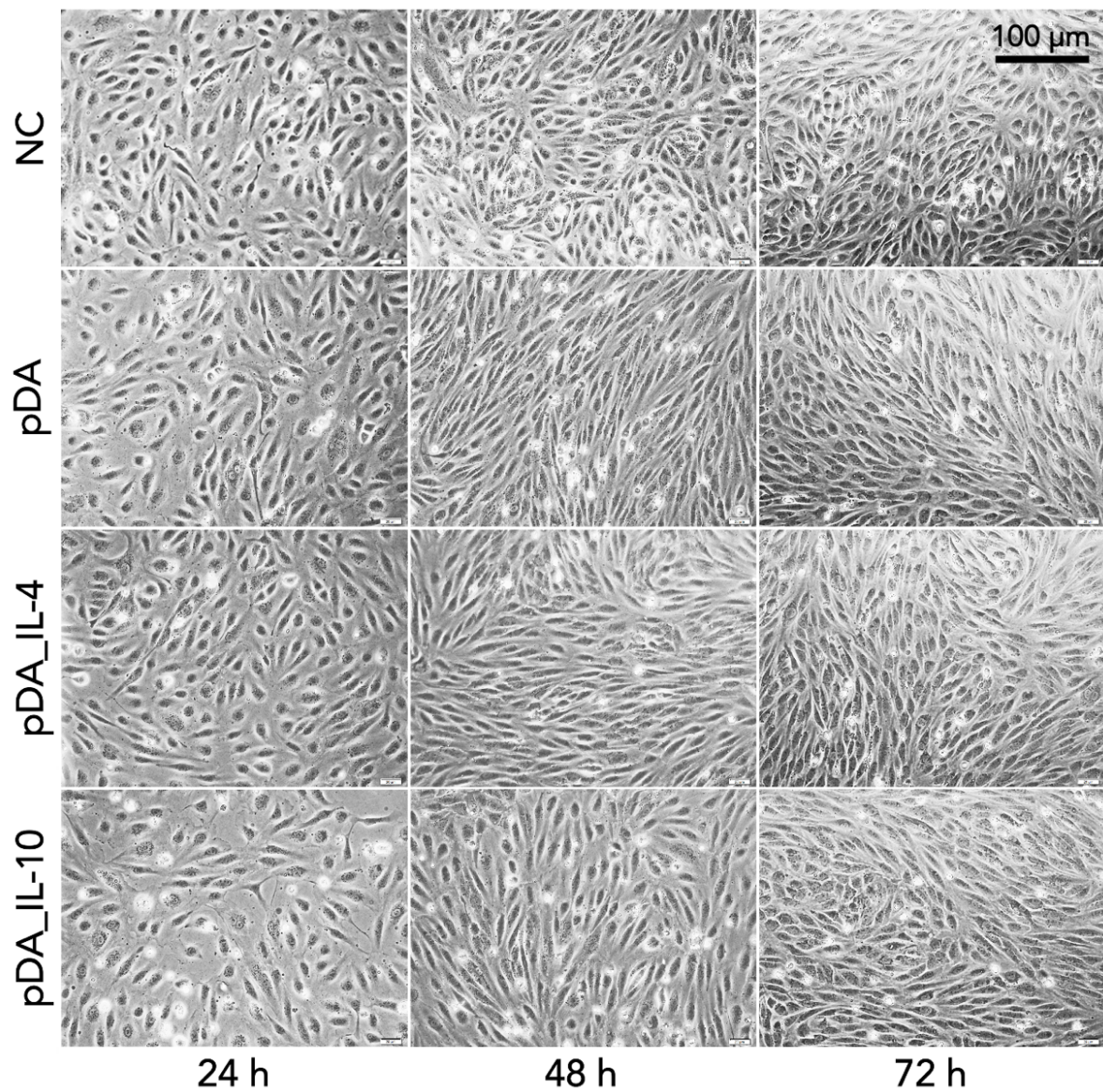
7.2.2 Ocena morfologii komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach

Ocenę morfologii HUVECs, które hodowano przez 24, 48 i 72 godziny na powłoce pDA i powłoce sfunkcjonalizowanej wybranymi interleukinami – pDA_IL-4 oraz pDA_IL-10, przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii kontrastu fazowego oraz mikroskopii fluorescencyjnej (patrz Rys. 29 oraz Rys. 30). Komórki hodowane w standardowych naczyniach hodowlanych, w ocenie morfologii, służyły jako NC.

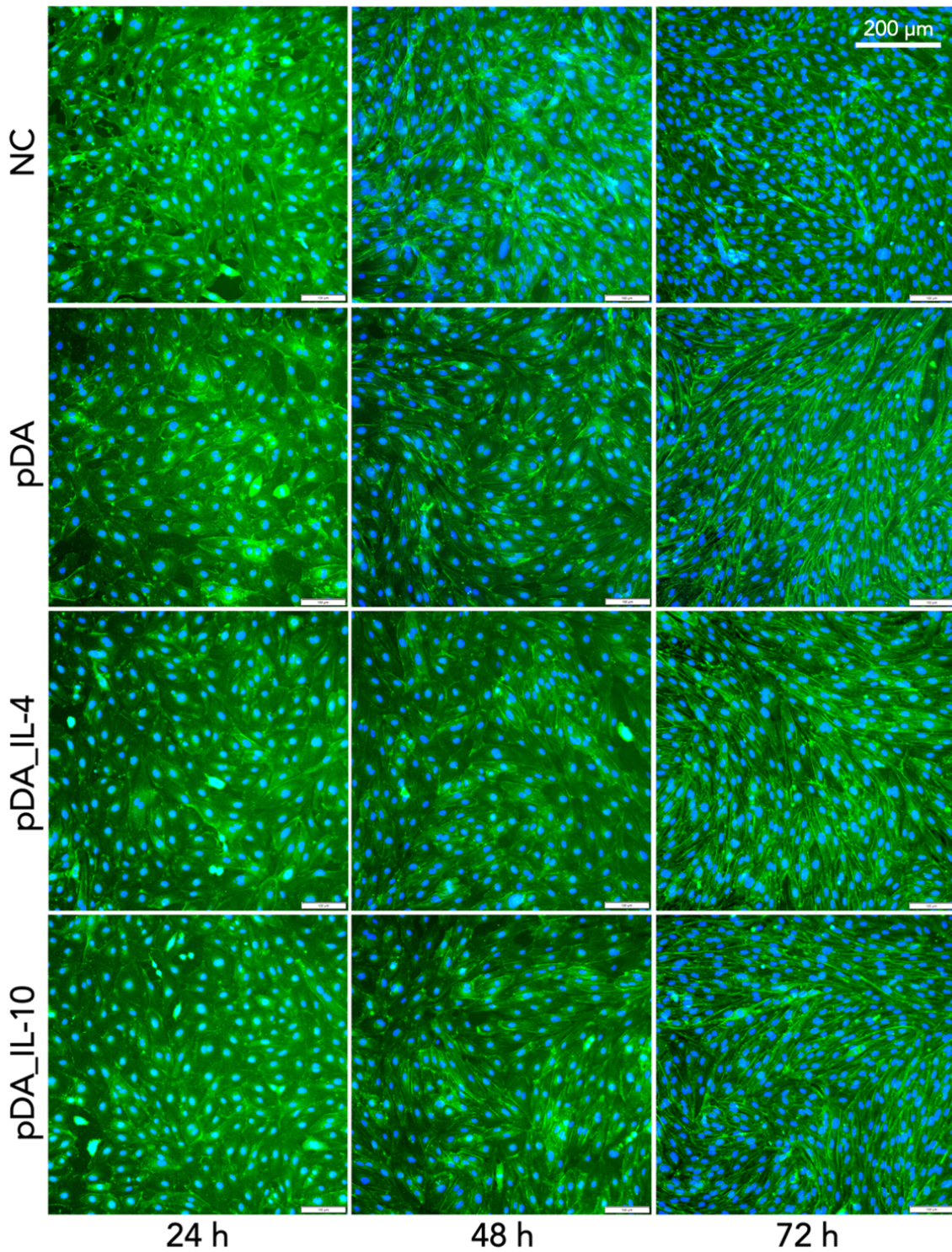
Nie stwierdzono widocznych różnic w morfologii komórek śródbłonka rosnących na badanych powłokach w stosunku do komórek kontroli negatywnej. Po 3. dniu inkubacji komórki na powłokach utworzyły monowarstwę typu kostki brukowej, identycznie jak te z NC. Co więcej, morfologia komórek hodowanych na powłokach jest jednorodna i powtarzalna w całym polu widzenia. Warto również zaznaczyć, że komórki szczelnie pokrywają badany materiał. Prowadzona obserwacja pozwala stwierdzić, że komórki śródbłonka, które hodowano na powłoce pDA i powłoce pDA_IL-10 wydają się być bardziej konfluentne w porównaniu z NC. Ta wyższa konfluencja może być przyczyną swoistego spadku żywotności komórek (ale statystycznie nieistotnego) po 48 i 72 godzinach po wprowadzeniu komórek na powłokę – patrz wyżej.

HUVECs, hodowane na powłokach pDA, pDA_CH, pDA_CH_IL-4 oraz pDA_CH_IL-10, również poddano ocenie pod względem morfologii w 24., 48. i 72. godzinie po wysianiu. Wykonano obrazy mikroskopii kontrastu fazowego (patrz Rys. 31) oraz mikroskopii fluorescencyjnej (patrz Rys. 32, Rys. 33 oraz Rys. 34). NC stanowiły komórki hodowane w standardowych naczyniach hodowlanych, bez powłoki.

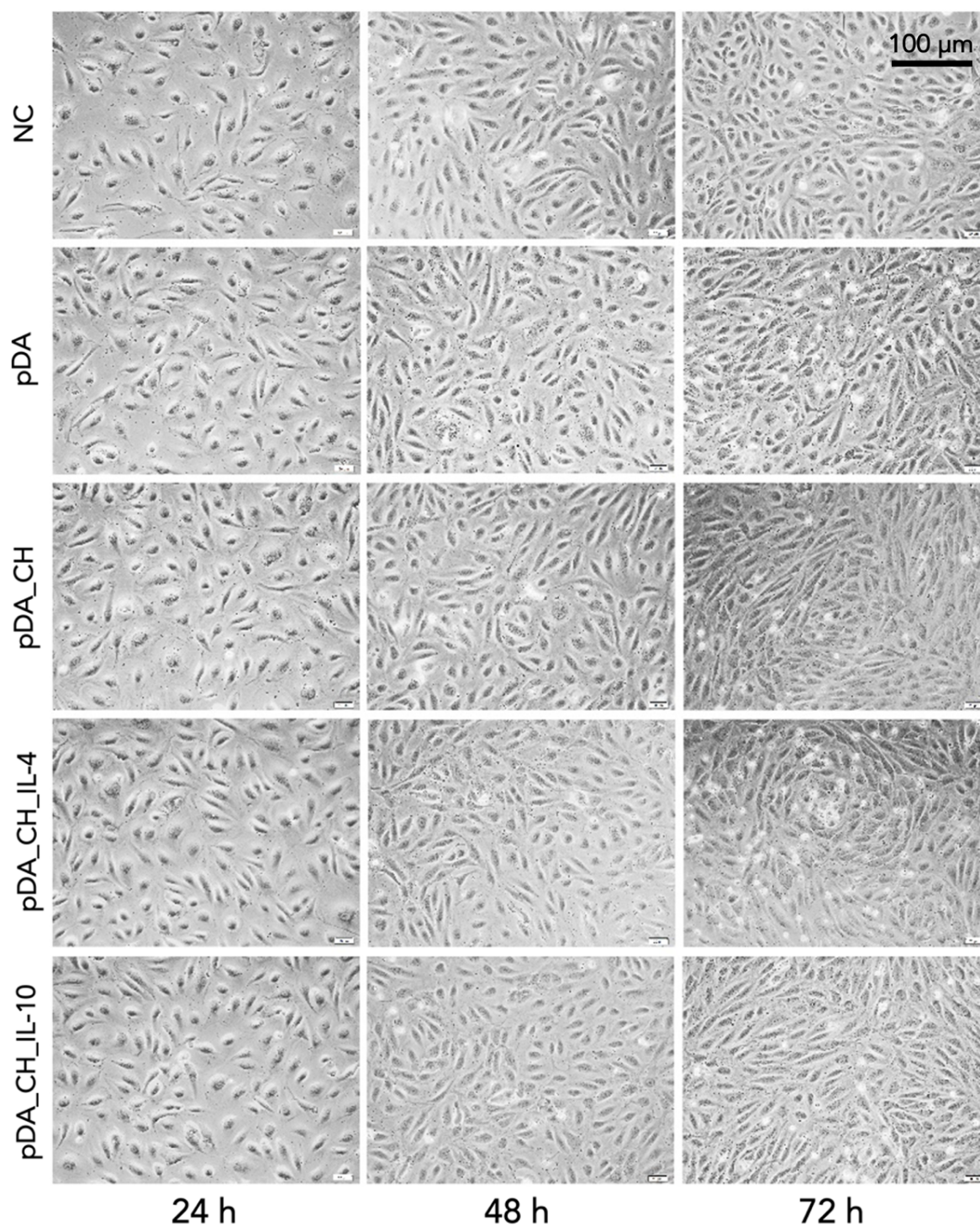
Również i w tym przypadku nie stwierdza się widocznych różnic w morfologii komórek śródbłonka. Komórki na powłokach również utworzyły monowarstwę, która jest jednorodna i powtarzalna w całym polu widzenia.



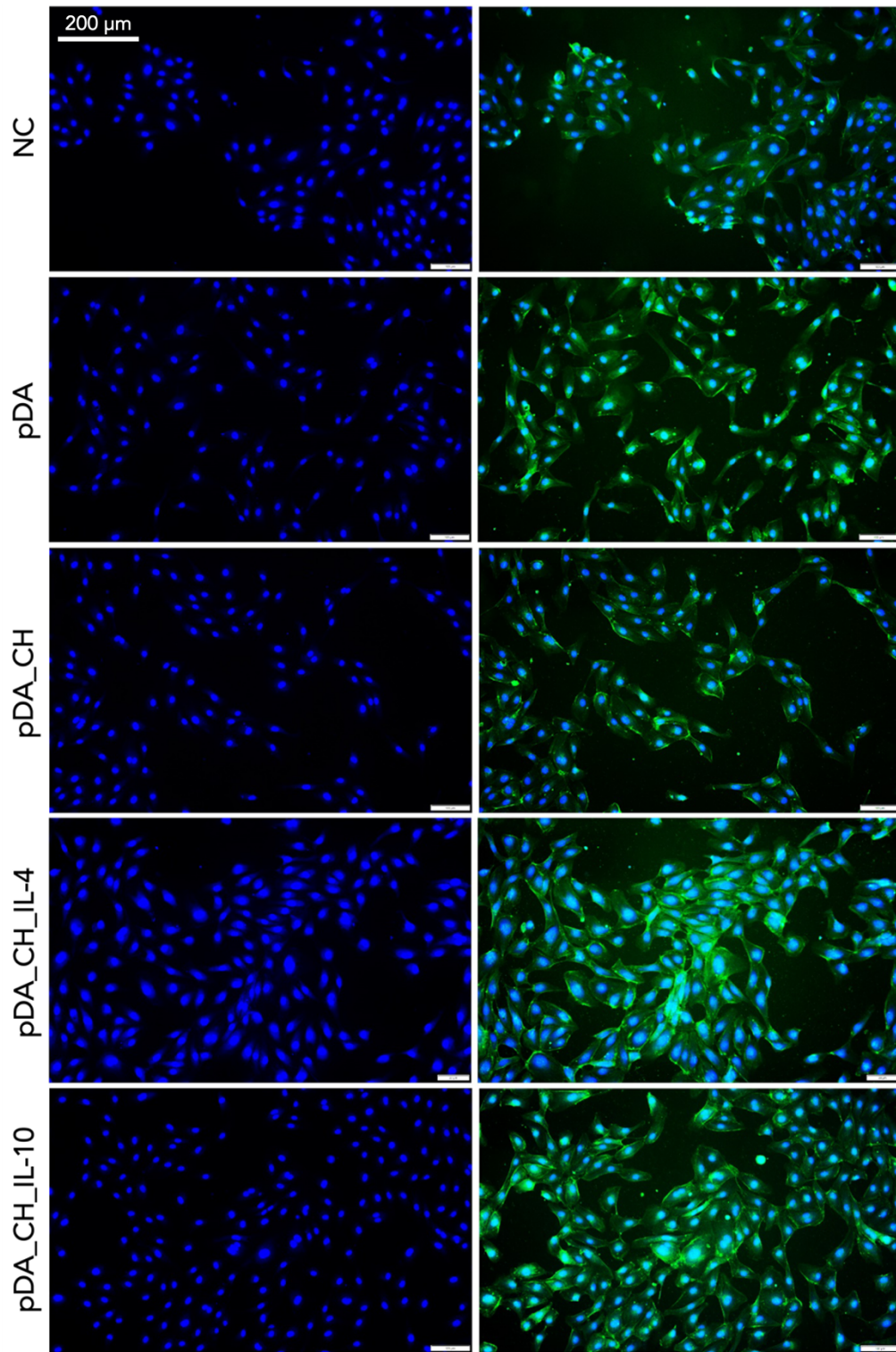
Rys. 29 Obrazy mikroskopii kontrastu fazowego HUVECs hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoce na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej cząsteczkami IL-4 (pDA_IL-4) i IL-10 (pDA_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 100 μm.



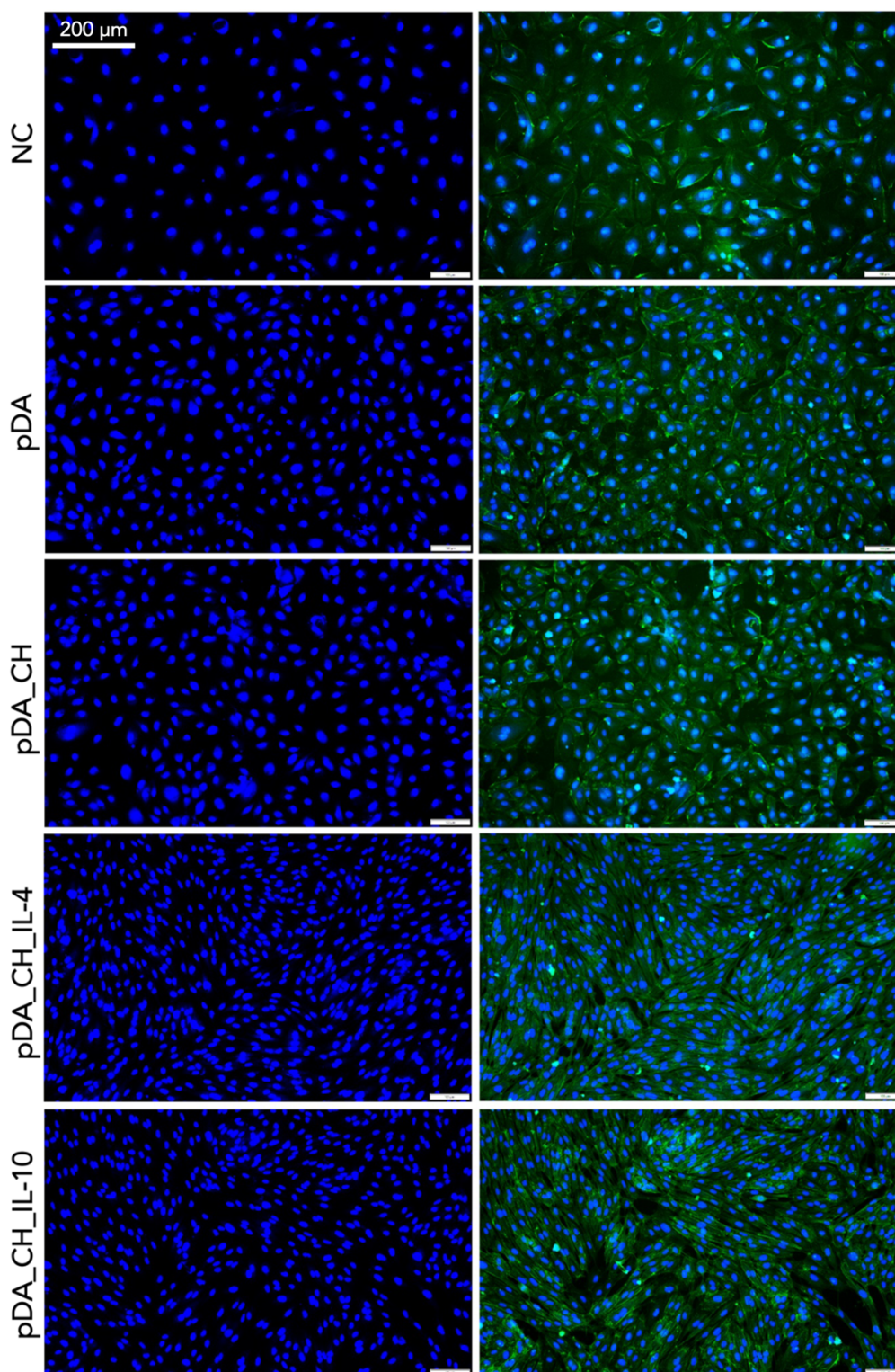
Rys. 30 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej HUVECs hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoce na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej cząsteczkami IL-10 (pDA_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoskielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z FITC (zielony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm .



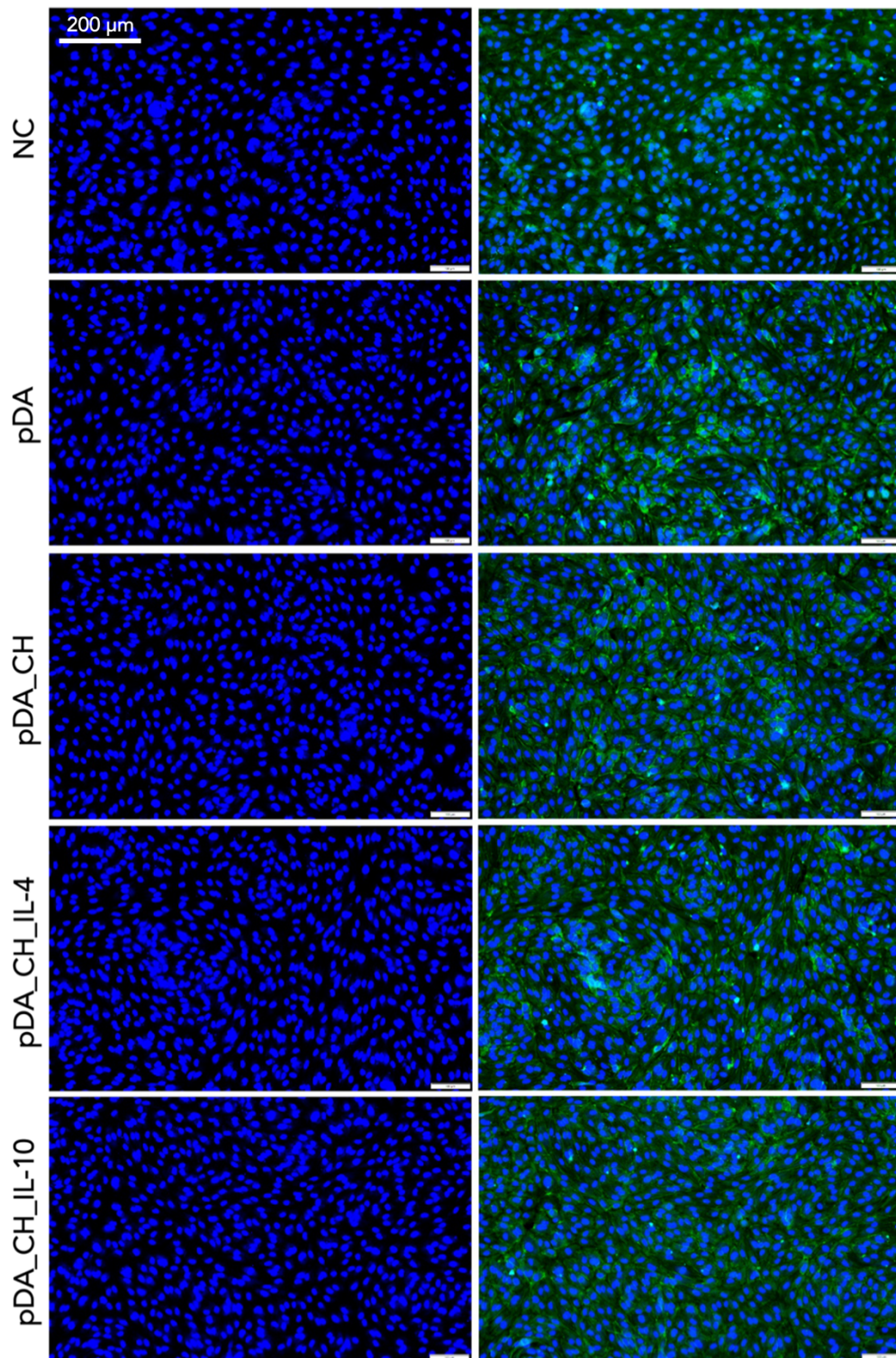
Rys. 31 Obrazy mikroskopii kontrastu fazowego HUVECs hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozaniem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 100 µm.



Rys. 32 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej HUVECs hodowanych przez 24 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozaniem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z FITC (zielony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w lewym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm.



Rys. 33 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej HUVECs hodowanych przez 48 godzin na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z FITC (zielony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w lewym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm.



Rys. 34 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej HUVECs hodowanych przez 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozaniem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoskielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z FITC (zielony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w lewym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm.

Podsumowując, nic nie budzi wątpliwości, jakoby jakakolwiek zaproponowana powłoka była niekorzystaną do wzrostu komórek, co potwierdza się również w opisanych wyżej wynikach dotyczących proliferacji i żywotności tychże komórek (patrz 7.2.1 Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonna hodowanych na otrzymanych powłokach). Wyniki uzyskane w niniejszym eksperymencie sugerują, aby w przyszłości skupić się na pracy związanej z oceną funkcji barierowej komórek śródbłonna, uzależniając ją od wpływu IL-10. Takie doniesienia literaturowe już są notowane. Wskazują w nich, że IL-10 może regulować połączenia międzykomórkowe i wspomaga naprawę komórek (Nguyen, Aljamaei, and Stadnyk 2021; Wei, Wang, and Li 2020), co byłoby ugruntowaniem poczynionych obserwacji.

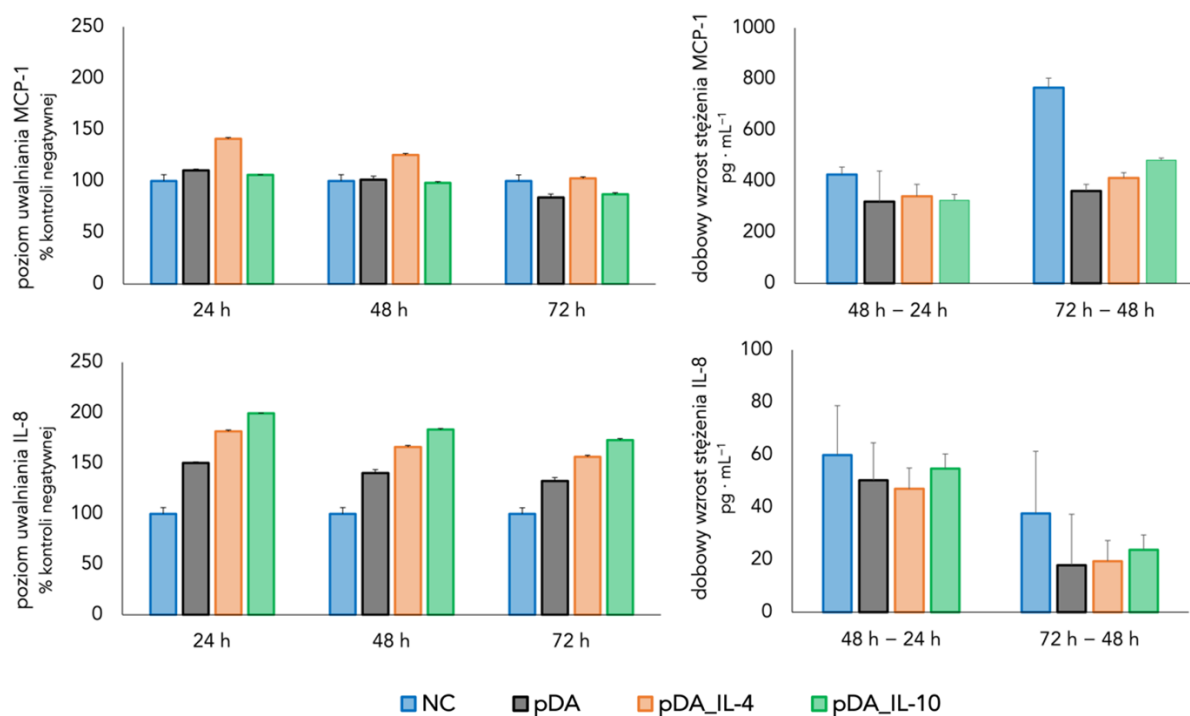
7.2.3 Ocena stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki śródbłonna – odpowiedź zapalna komórek

Celem oceny odpowiedzi zapalnej HUVECs hodowanych na otrzymanych powłokach, w odniesieniu do komórek NC, dokonano oznaczenia wydzielanych do medium następujących cytokin prozapalnych – MCP-1 oraz IL-8. Oznaczeń dokonano po 24-, 48- i 72-godzinnej inkubacji komórek z badanymi powłokami (patrz Rys. 35 oraz Rys. 36).

W przypadku pierwszej serii powłok, a więc pDA, pDA_IL-4 oraz pDA_IL-10, poczyniono następujące obserwacje. W pierwszych trzech dniach inkubacji komórek z powłoką pDA, jak i z pDA_IL-4 oraz pDA_IL-10 zaobserwowano zwiększone wydzielanie IL-8 przez HUVECs w stosunku do komórek NC (patrz Rys. 35). W przypadku powłok sfunkcjonalizowanych interleukinami, wzrost ten był nawet większy niż w przypadku powłoki pDA. Jednak analizując dobowe tempo wzrostu wydzielania tej interleukiny (różnica między stężeniem IL-8 oznaczonym dla 48-godzinnej inkubacji a 24-godzinnej inkubacji oraz różnica między stężeniem IL-8 oznaczonym dla 72-godzinnej inkubacji a 48-godzinnej inkubacji) można zauważyć, że w porównaniu z NC jest ono znacząco niższe. Można zatem stwierdzić, że wraz z upływem czasu, postęp odpowiedzi zapalnej jest wolniejszy. Poziom wydzielanej IL-8 stabilizuje się na stałym poziomie w porównaniu z komórkami niestymulowanymi otrzymanymi powłokami. Wyznaczony błąd standardowy różnicy średnich wskazuje również na mniejszy rozrzut uzyskanych wyników dla pDA_IL-4 oraz pDA_IL-10, w stosunku do NC i pDA. Podsumowując, powłoki mogą hamować postęp odpowiedzi zapalnej w komórkach, stabilizując jego przebieg w czasie. Zatem wyniki te wskazują, że zarówno pDA_IL-4, jak i pDA_IL-10, wykazują potencjał przeciwzapalny po przedłużonej inkubacji.

Analogiczną analizę przeprowadzono dla cytokiny MCP-1 (patrz Rys. 35). W pierwszym dniu inkubacji komórek z powłokami pDA, pDA_IL-4 i pDA_IL-10, HUVECs zwiększyły poziom wydzielania MCP-1. Różnice te nie są jednak znaczne. Ponadto poziom wydzielania MCP-1 w przypadku dokonanych modyfikacji powierzchni z czasem spada, spadając nawet po 72-

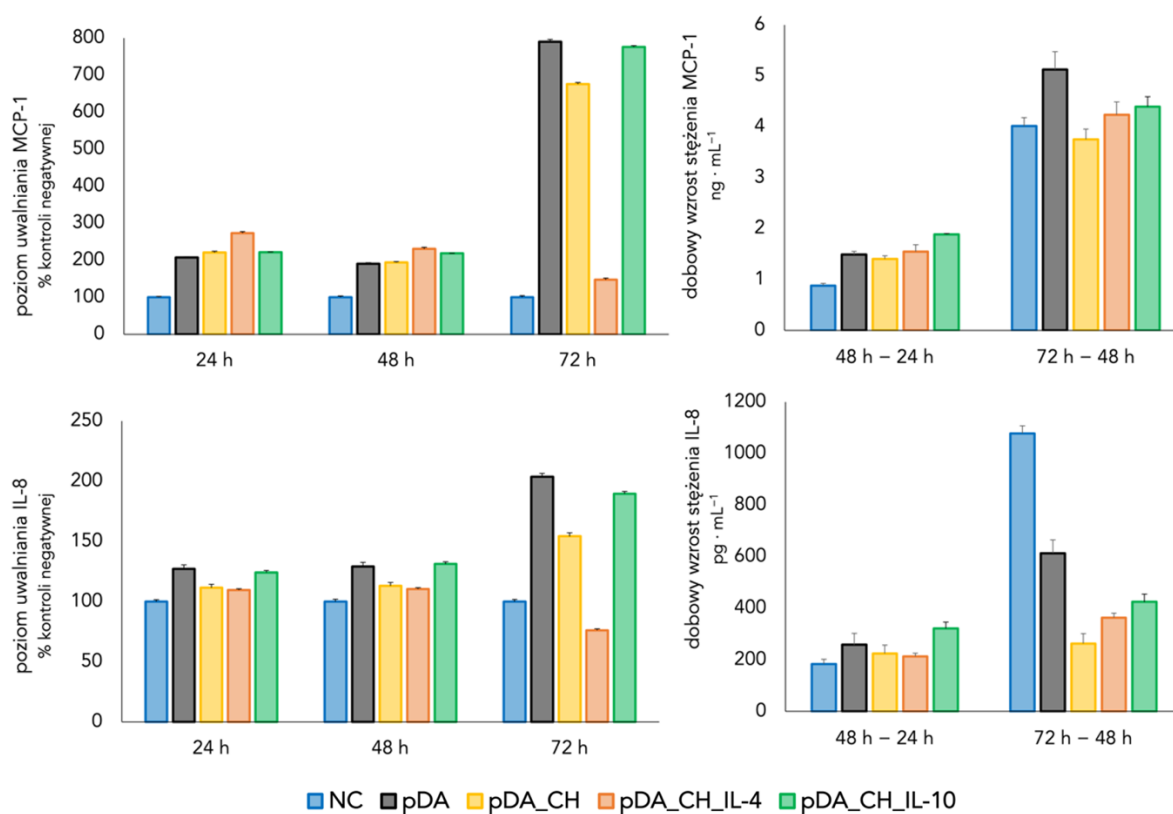
godzinach poniżej poziomu MCP-1 wytwarzanego przez komórki NC. Zaobserwować można również zmiany w dobowym wzroście wydzielania cytokiny prozapalnej MCP-1, analogiczne jak w przypadku IL-8. Różnice te są znacznie mniejsze dla powłok w porównaniu z NC. Powłoki wydają się stabilizować wydzielanie MCP-1 na stałym, niskim poziomie. W przypadku powłok sfunkcjonalizowanych interleukinami błąd standardowy wskazuje również na mniejszy rozrzut wyników w obrębie badanej grupy. Stąd również te wyniki wskazują na korzystny wpływ powłok na stabilizację i stopniowe wygaszenie stanu zapalnego.



Rys. 35 Ocena odpowiedzi zapalnej HUVECs hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoce na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej cząsteczkami IL-4 (pDA_IL-4) i IL-10 (pDA_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. W lewej kolumnie przedstawiono poziom uwalnianych cytokin prozapalnych (odpowiednio MCP-1 oraz IL-8) wyrażone jako % kontroli negatywnej (poziom uwalnianych cytokin przez NC stanowiło 100%) wraz z odchyleniem standardowym. W prawej kolumnie przedstawiono dobowy wzrost uwalniania cytokin prozapalnych (różnica pomiędzy wyznaczonym stężeniem wybranej interleukiny w 48 godzinie i 24 godzinie inkubacji oraz w 72 godzinie i 48 godzinie, z zaznaczonymi błędami standardowymi).

Uzyskane wyniki mogą być poparte innymi badaniami omówionymi poniżej. Niektóre doniesienia wskazują, że mRNA IL-8 i MCP-1 osiągają swoje szczyty w ciągu kilku godzin po uszkodzeniu ściany naczynia w wyniku implantacji stentu i są wykrywane dopiero 14 dni po leczeniu. Obserwuje się wczesną rekrutację neutrofilów, po której następuje przedłużona akumulacja makrofagów. Codzienny spadek poziomu tych cytokin spowodowany działaniem otrzymanej powłoki może więc przyczynić się do wygaszenia procesu zapalnego i doprowadzić do niewykrywalnego poziomu badanych cytokin w dniu 14. Ponadto należy zwrócić uwagę, że podwyższone poziomy IL-8, jak również MCP-1 są czynnikami ryzyka ISR i nawet pożądanym wydaje się działanie mające na celu

obniżenie ich stężenia. W porównaniu z grupami kontrolnymi, w grupach badawczych, w których wystąpiła ISR, nastąpił prawie dwukrotny wzrost poziomu badanych cytokin (R. Zhang et al. 2018). Tak więc efekt powłoki prawdopodobnie zmieniłby ten trend. Dodatkowo, przedoperacyjne poziomy ekspresji IL-4 były obniżone u pacjentów z ISR w porównaniu z pacjentami bez. Pacjenci ci wykazywali również zwiększone przedoperacyjne poziomy TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17A i IL-23. Otrzymana powłoka ma więc znaczny potencjał terapeutyczny, uwalniając *in situ* pożądane cytokiny, przy jednoczesnym zmniejszeniu stężeń tych uważanych za kluczowe czynniki ISR (Sun et al. 2020).



Rys. 36 Ocena odpowiedzi zapalnej HUVEC hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconej chitozaniem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczyń stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. W lewej kolumnie przedstawiono poziom uwalnianych cytokin prozapalnych (odpowiednio MCP-1 oraz IL-8) wyrażone jako % kontroli negatywnej (poziom uwalnianych cytokin przez NC stanowiło 100%) wraz z odchyleniem standardowym. W prawej kolumnie przedstawiono dobowy wzrost uwalniania cytokin prozapalnych (różnica pomiędzy wyznaczonym stężeniem wybranej interleukiny w 48 godzinie i 24 godzinie inkubacji oraz w 72 godzinie i 48 godzinie, z zaznaczonymi błędami standardowymi).

W przypadku drugiej serii powłok, a więc powłok po wprowadzeniu chitozanu – pDA_CH, pDA_CH_IL-4 oraz pDA_CH_IL-10, obserwacje powtórzyły się. Powłoki indukują w komórkach wydzielanie IL-8. Najbardziej zbliżona odpowiedź prozapalna, do tej występującej w NC, została wykazana dla powłok pDA_CH oraz pDA_CH_IL-4. W 3. dniu poziomy IL-8 ulegają zwiększeniu, przekraczając znacząco poziom w NC. W tym dniu wyróżnia się powłoka pDA_CH_IL-4,

gdzie zbadany poziom jest najniższy spośród proponowanych modyfikacji powierzchni (patrz Rys. 36). Analizując dobowe tempo wzrostu wydzielania IL-8, można zauważyć, że w porównaniu z NC, jest ono niższe po 72-godzinnym okresie inkubacji. Nasuwa to wniosek, że wraz z upływem czasu, postęp odpowiedzi zapalnej jest wolniejszy. Obserwacja efektu przeciwzapalnego w późniejszym okresie wydaje się wynikać z niższej ilości uwalnianej cytokiny przeciwzapalnej, co zostało wykazane wcześniej (patrz 7.1.3 Kinetyka uwalniania interleukin z powierzchni otrzymanej powłoki oraz Rys. 26) w porównaniu do powłok bez chitozanu (patrz Rys. 25).

Analiza przeprowadzona dla cytokiny MCP-1 (patrz Rys. 36) wykazała, że w przypadku 72-godzinnego okresu inkubacji, komórki cechuje zwiększona produkcja MCP-1, szczególnie w 3. dniu inkubacji. Korzystne zmiany zachodzą w odniesieniu do dobowego tempa wydzielania tej cytokiny prozapalnej. Analogiczne jak w przypadku IL-8, w między 2. a 3. dniem inkubacji rozpoczyna się proces wyhamowania stanu zapalnego w badanych komórkach, w wyniku zadziałania powłok. Jednak okres, po jakim można obserwować ten efekt jest również wydłużony, w stosunku do powłok bez chitozanu.

Stąd również te wyniki (odpowiednio dla pDA_CH_IL-4 i pDA_CH_IL-10) wskazują na korzystny wpływ powłok na stopniowe wygaszenie stanu zapalnego, jednak po dłuższym okresie inkubacji niż powłoki pDA_IL-4 i pDA_IL-10. Przeciwzapalny efekt wykazał również chitozan, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi (Azuma et al. 2015; Jhundoo et al. 2020).

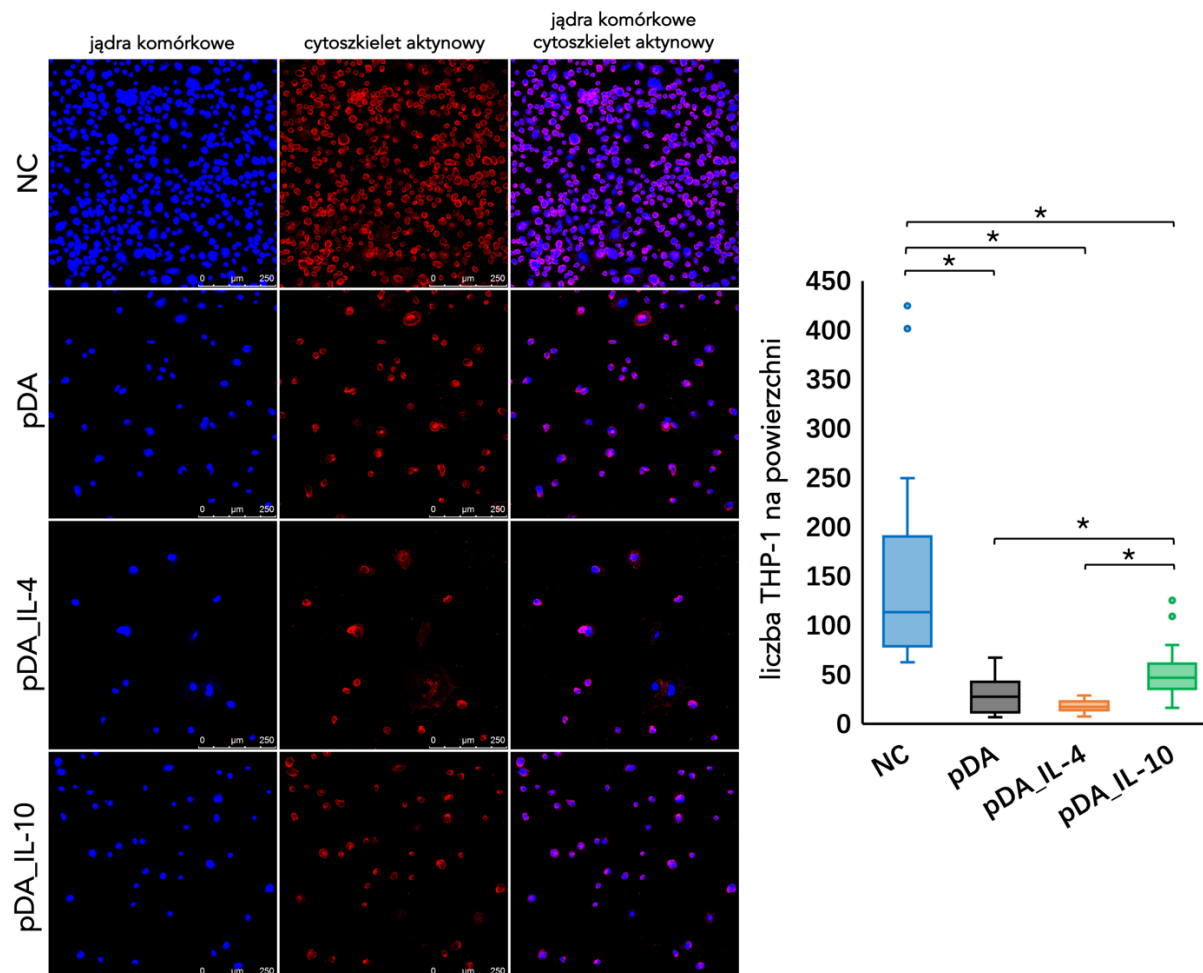
7.2.4 Ocena adhezji makrofagów do otrzymanych powłok

W celu oceny adhezji makrofagów do badanych powłok przeprowadzono poniższą analizę. Zliczono komórki THP-1, które przylegały do badanych powierzchni pokrytych otrzymaną powłoką (odpowiednio pDA, pDA_IL-4 i pDA_IL-10). Grupę NC stanowiły komórki THP-1 hodowane na powierzchni nie pokrytej powłoką.

Można zauważyć, że liczba komórek, które zliczono na powierzchni NC znacznie przekracza liczbę komórek związanych z testowanymi powłokami. Jest to szczególnie godne uwagi w przypadku powłoki sfunkcjonalizowanej IL-4 – pDA_IL-4. Większą adhezję obserwuje się dla powłoki sfunkcjonalizowanej IL-10 – pDA_IL-10. Również obecność na powierzchni materiału powłoki pDA skutkuje zmniejszeniem adhezji komórek THP-1 zróżnicowanych do makrofagów (poprzez stymulację PMA) – patrz Rys. 37. Wyniki te nasuwają wniosek o selektywnym wzroście komórek na zaproponowanych powłokach – sprzyjają proliferacji HUVECs (patrz wyżej) i ograniczają wzrost modelowych makrofagów.

Ze względu na niespełnienie kryterium rozkładu normalnego zmiennych (wg testu Shapiro-Wilka, wartość p dla dwóch z czterech analizowanych grup była $< 0,05$), przeprowadzono analizę nieparametryczną. Wykorzystano test Kruskala-Wallisa oraz wielokrotne porównania z korektą

poziomu istotności metodą Bonferroniego ($\alpha = 0,0125$). Test Kruskala-Wallisa wykazał statystycznie istotne różnice między grupami (wartość $p < 0,001$). Przeprowadzone porównania wielokrotne wykazały istotne różnice statystyczne przy skorygowanym α każdorazowo pomiędzy NC i pDA, pDA_IL-4, pDA_IL-10 (wartość p znacznie niższa niż 0,0125 w każdym przypadku). Istniały również statystycznie istotne różnice w porównaniu pDA_IL-10 z pDA oraz pDA_IL-10 z pDA_IL-4 (wartość p odpowiednio 0,005 i $< 0,001$).



Rys. 37 Po lewej panel obrazów, uzyskanych z wykorzystaniem skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej (CLSM, z ang. *confocal laser scanning microscopy*), przedstawiający poziom adhezji komórek THP-1 zróżnicowanych do makrofagów (w wyniku stymulacji PMA) do materiału niepokrytego (NC) i materiału pokrytego testowanymi powłokami (odpowiednio pDA, pDA_IL-4 i pDA_IL-10). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoskielet aktynowy – falojdyną sprzężoną z Alexa Fluor 647 (czerwony). Trzecia kolumna obrazów od lewej stanowi nałożenie dwóch poprzednich kanałów. Skala przedstawiona jest na poszczególnych obrazach, w ich prawych dolnych rogach, wskazując 250 μm . Obserwuje się znaczne zmniejszenie adhezji THP-1 do otrzymanych powłok w stosunku do NC. Po prawej stronie przedstawiono wykres pudełkowy, który wskazuje liczbę komórek zliczoną z 16 pól widzenia. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu Kruskala-Wallisa z porównaniami wielokrotnymi z korekcją poziomu istotności metodą Bonferroniego ($\alpha = 0,0125$), przedstawiono jako * dla $p < 0,0125$.

Podsumowując, można stwierdzić, że obecność powłoki na powierzchni materiału znacząco hamuje adhezję komórek THP-1 (patrz Rys. 37). Wyciągnięte wnioski są zgodne z doniesieniami literaturowymi, jakoby już sama powłoka pDA wykazywała selektywność wobec komórek, innych niż śródbłonek (F. Zhang et al. 2019).

7.2.5 Określenie poziomu adhezji monocytów do monowarstwy utworzonej z komórek śródbłonna hodowanych na otrzymanych powłokach

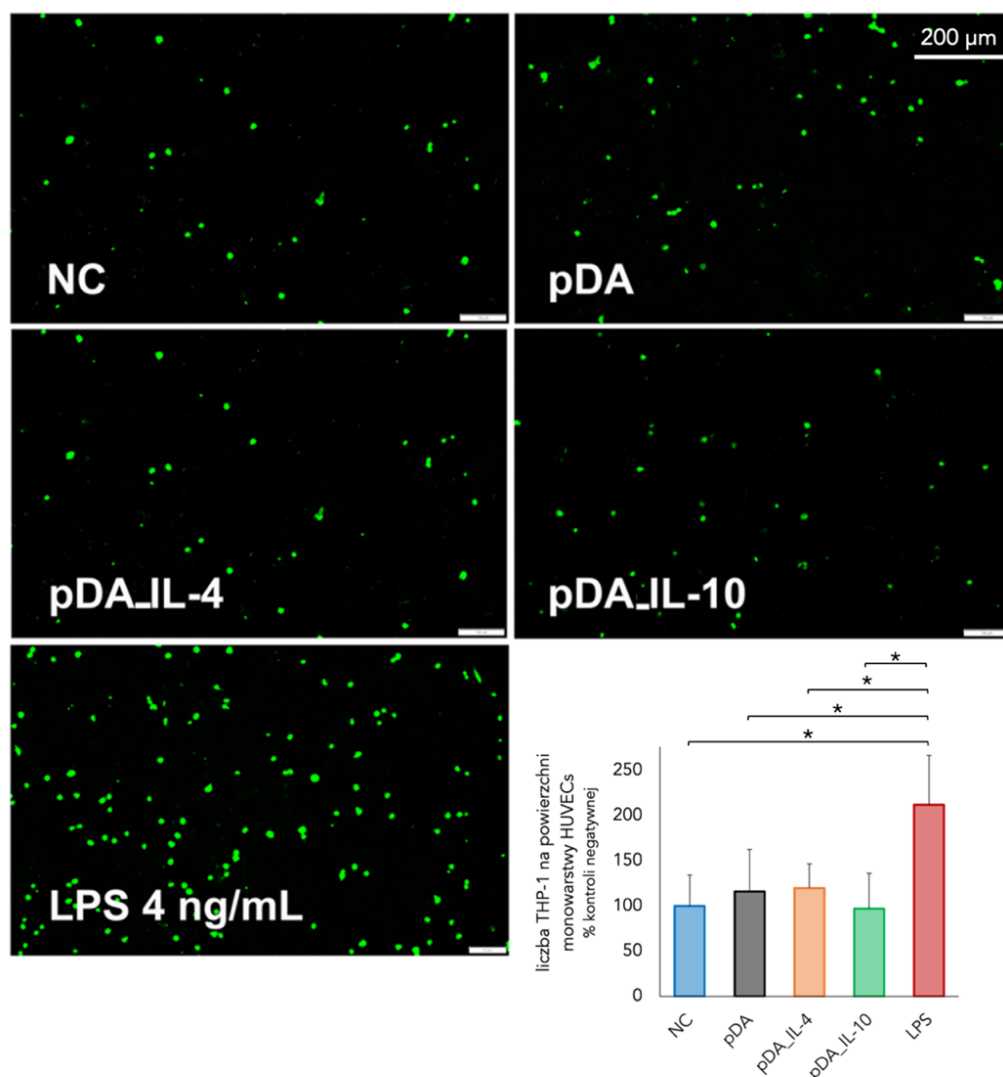
Adhezję modelowych komórek monocytów, wybarwionych kalceina-AM do HUVECs, hodowanych przez 72 godziny na testowanych powłokach przeprowadzono w celu oceny wystąpienia zmian w procesie, będącym istotą progresji miażdżycy i ISR – rekrutacji monocytów do miejsca tworzącej się blaszki miażdżycowej lub rozwijającej się neomiażdżycy (patrz 1.1 Patomechanizm miażdżycy oraz 1.3.1 Patomechanizm restenozy w stencie). W doświadczeniu, HUVECs hodowane przez 72 godziny na niepokrytych szkiełkach i komórki traktowane przez 18 godzin LPS (4 ng/mL) w kompletnym medium hodowlanym stanowiły odpowiednio kontrolę negatywną i kontrolę pozytywną.

Celem porównania uzyskanych danych przeprowadzono testowanie statystyczne. Założenie o normalności rozkładu (wg testu Shapiro-Wilka) dla każdej grupy zostało spełnione (wartość $p > 0,05$). Kryterium równości wariancji z kolei nie zostało spełnione (wg test Levene'a, wartość $p = 0,004$). Niemniej jednak zdecydowano się przeprowadzić test parametryczny – test jednoczynnikowej ANOVA, gdyż jest on odporny na złamanie założenie o homogeniczności wariancji, gdy liczebność grup jest podobna (co zostało zapewnione).

W przypadku powłok, odpowiednio pDA, pDA_IL-4 i pDA_IL-10, po 4 godzinach inkubacji monocytów z HUVECs zaobserwowano najsilniejszą adhezję monocytów do komórek śródbłonna traktowanych LPS.

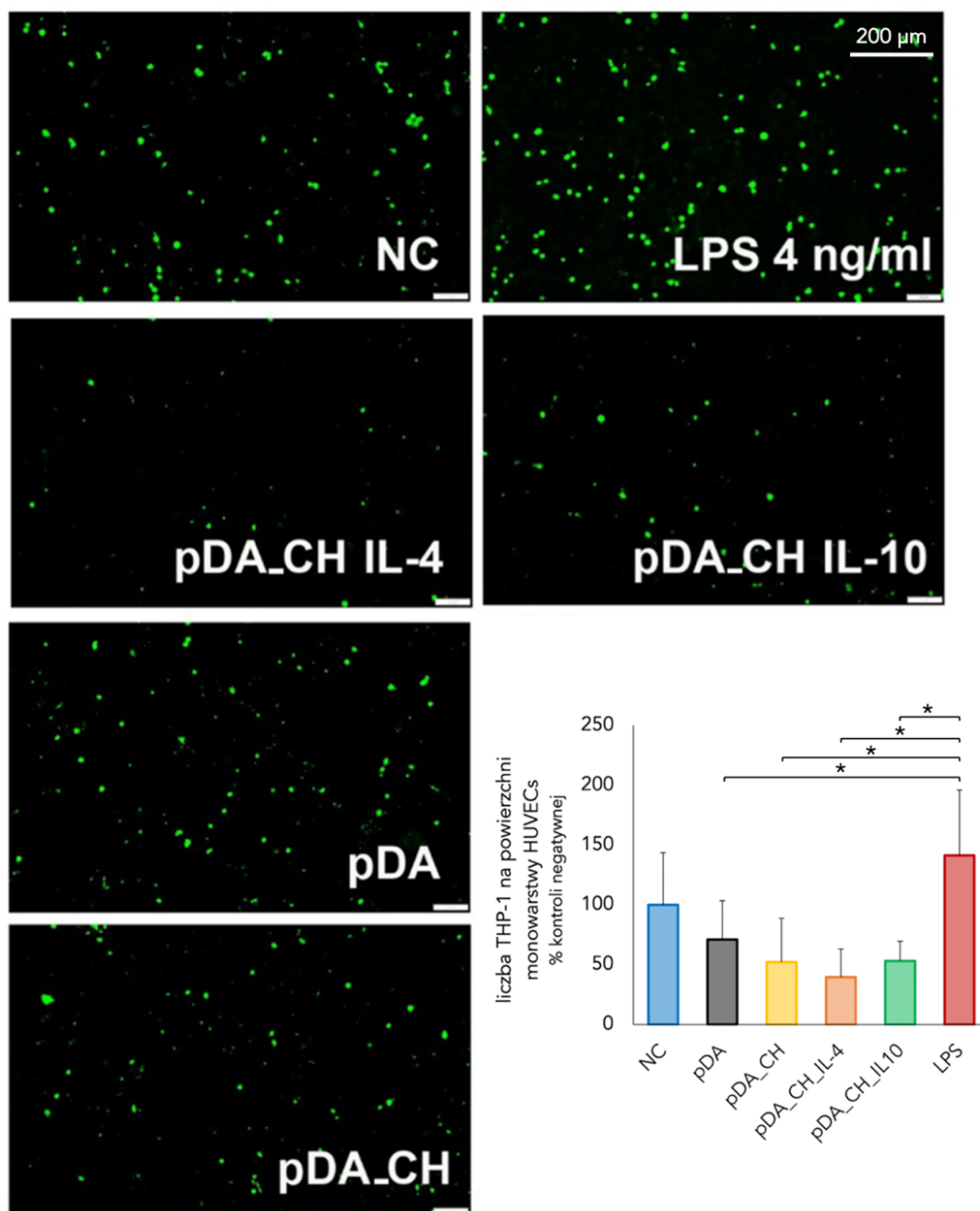
Test jednoczynnikowej ANOVA wykazał, że między grupami występują istotne statystycznie różnice (wartość $p < 0,001$). Analiza *post hoc* Tukey HSD ujawniła statystycznie istotne różnice między LPS w porównaniu z NC, pDA, pDA_IL-4 i pDA_IL-10 (wartość p wyniosła odpowiednio $< 0,001$, $0,001$, $0,008$, $< 0,001$). Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic między NC a testowanymi powłokami (patrz Rys. 38).

Oznacza to, że powłoki nie sprzyjają zwiększonej rekrutacji monocytów. Nie nasilają oddziaływań monocytów z HUVECs. Niewielkie zmniejszenie adhezji THP-1 do HUVECs na powłoce obserwuje się dla pDA_IL-10. Wydaje się to zgadzać z wynikami opisanymi powyżej, ponieważ szczególnie powłoka sfunkcjonalizowana IL-10 zmniejsza wydzielanie MCP-1, porównując z powłoką sfunkcjonalizowaną IL-4 (patrz wyżej).



Rys. 38 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej komórek THP-1 wybarwionych kalceina-AM (zielony), które przylegały do HUVECs (niewybarwione) hodowanych przez 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoką na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej cząsteczkami IL-4 (pDA_IL-4) i IL-10 (pDA_IL-10). Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm . Kontrolę negatywną (NC) stanowiły komórki przyległe do HUVECs utrzymywanych na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Komórki hodowane analogicznie, jak w grupie NC, jednak traktowane przez 16 godzin lipopolisacharydem (LPS, z ang. *lipopolysaccharide*), w stężeniu 4 ng/mL, bezpośrednio przed wprowadzeniem THP-1, stanowiły kontrolę pozytywną (LPS). Na podstawie uzyskanych obrazów, oceniono liczbę komórek THP-1, które przyległy do HUVECs. Wykres przedstawiający liczbę komórek THP-1 zliczonych na uzyskanych obrazach mikroskopowych, które przyległy do HUVECs. Liczba THP-1 zliczonych dla NC stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości p przedstawiono jako * ($p < 0,05$).

W eksperymencie przeprowadzonym dla powłok wzbogaconych chitozanem, odpowiednio pDA_CH, pDA_CH_IL-4 i pDA_CH-IL-10, po 4 godzinach inkubacji monocytów z HUVECs, analogicznie jak wyżej, zaobserwowano najsilniejszą adhezję monocytów do komórek śródbłonna traktowanych LPS (patrz Rys. 39).



Rys. 39 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej komórek THP-1 wybarwionych kalceina-AM (zielony), które przylegały do HUVECs (niewybarwione) hodowanych przez 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozaniem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm. Kontrolę ujemną (NC) stanowiły komórki przyległe do HUVECs utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Komórki hodowane analogicznie, jak w grupie NC, jednak traktowane przez 16 godzin LPS, w stężeniu 4 ng/mL, bezpośrednio przed wprowadzeniem THP-1, stanowiły kontrolę pozytywną (LPS). Na podstawie uzyskanych obrazów, oceniono liczbę komórek THP-1, które przyległy do HUVEC. Wykres przedstawiający liczbę komórek THP-1 zliczonych na uzyskanych obrazach mikroskopowych, które przyległy do HUVEC. Liczba THP-1 zliczonych dla NC stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości p przedstawiono jako * ($p < 0,05$).

Test jednoczynnikowej ANOVA wykazał, że między grupami występują istotne statystycznie różnice (wartość $p < 0,001$). Analiza *post hoc* Tukey HSD ujawniła statystycznie istotne różnice

w następujących porównaniach. Porównując pDA, pDA_CH, pDA_CH_IL-4 i pDA_CH_IL-10 z LPS otrzymano za każdym razem wartość $p < 0,05$ (odpowiednio 0,018, 0,002, $< 0,001$, $< 0,001$). Te powłoki, które sfunkcjonalizowane zostały interleukinami, wykazały najbardziej istotne zmiany w stosunku do komórek traktowanych LPS. Bliskie założonemu poziomowi istotności było porównanie NC z pDA_CH_IL-4, gdzie p wartość kształtowała się na poziomie 0,06. Nie odnotowano innych statystycznie istotnych różnic (patrz Rys. 39).

Oznacza to, że także powłoki wzbogacone chitozanem nie nasilają procesu adhezji monocytów do HUVECs. Dlatego też otrzymane powłoki mogą skutecznie zapobiegać miażdżycy i ISR, poprzez modyfikację patomechanizmu tych stanów.

7.2.6 Ocena polaryzacji makrofagów wskutek kontaktu z powłoką – ocena aktywności biologicznej związanych z powłoką cytokin

Aby ocenić zmiany w polaryzacji komórek THP-1, określono ekspresję odpowiednich markerów wskazujących na subpopulację M1 (w tym marker MHC II) oraz na subpopulację M2 (w tym marker CD163 i CD209) – patrz Rys. 40. Metodę tę wykorzystano celem odpowiedzi na pytanie, czy cząsteczka interleukiny wprowadzona na powierzchnię powłoki zachowała swoją aktywność biologiczną. Wykorzystano fakt, że makrofagi w ściśle określony sposób reagują na obecność odpowiednich cytokin w środowisku, zmianą polaryzacji.

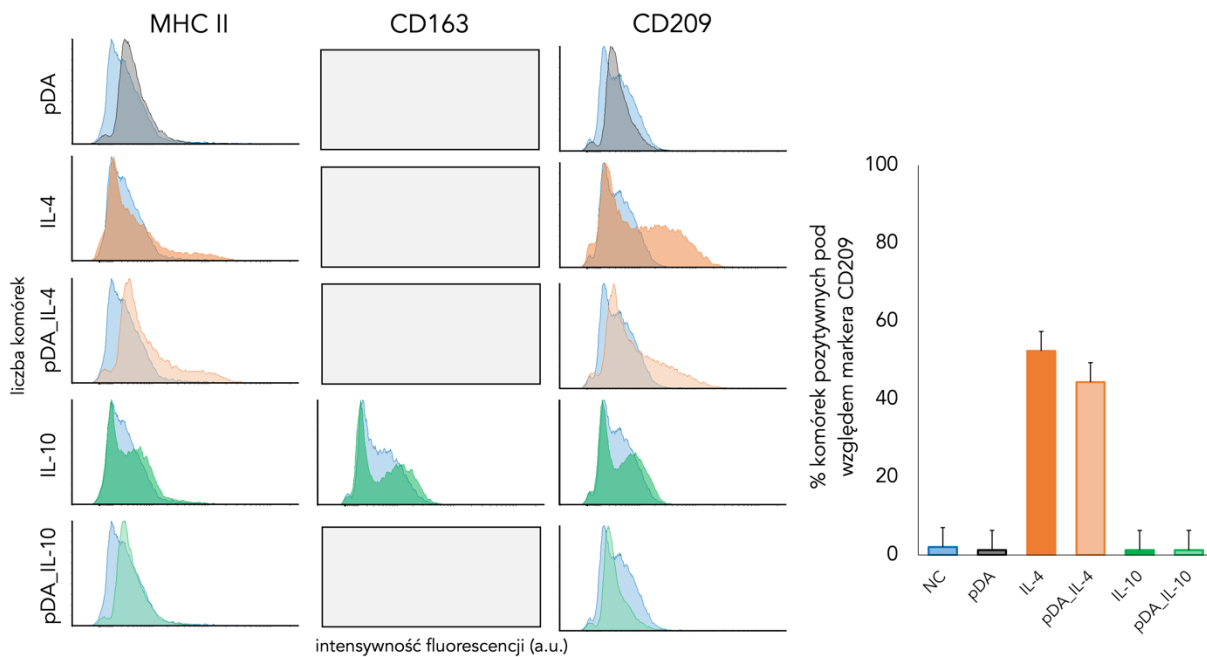
W przypadku pierwszego etapu funkcjonalizacji powierzchni (naniesienie warstwy opartej na pDA) komórki THP-1 nie wykazują ekspresji MHC II jak i CD209. Świadczy to o braku aktywacji komórek THP-1 w sposób klasyczny (prozapalna rola komórek) oraz alternatywny (przeciwzapalna rola komórek). Zatem pDA jest immunologicznie obojętnym polimerem dla komórek układu odpornościowego.

W przypadku powłok sfunkcjonalizowanych IL-4, zaobserwowano, że prawie połowa komórek różnicowała się do podtypu M2 ($44,3 \pm 18,2\%$ komórek) – komórki CD209 dodatnie. Dla porównania, gdy IL-4 została wprowadzona do medium (niezwiązana z powłoką) w stężeniu jednakowym, jakie wykorzystano podczas przygotowywania powłok, komórki różnicowały się w $52,3 \pm 9,5\%$. Test t przeprowadzono w celu porównania efektu indukowanego przez wolną IL-4 z efektem indukowanym przez IL-4 związaną z pDA i nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic (wartość $p = 0,537$). Warunek rozkładu normalnego i jednorodności wariancji został spełniony (dla obu testów wartość $p > 0,05$). Można zatem stwierdzić, że procedura pozwala na uzyskanie powłoki immunologicznie czynnej i nie upośledza aktywności biologicznej interleukiny związanej z powłoką polimerową.

W przypadku powłoki sfunkcjonalizowanej IL-10 nie zaobserwowano indukcji ekspresji markera CD209. Jest to oczekiwany wynik, ponieważ zastosowana interleukina nie jest odpowiedzialna

za indukcję ekspresji tego markera. Różnicowanie THP-1 w kierunku komórek podtypu M2 sprawdzono również za pomocą markera CD163. Wiadomym jest, że za indukcję tego markera odpowiada IL-10. Nie zauważono również istotnych zmian w ekspresji tego białka. Dzieje się tak dlatego, że linia komórkowa THP-1 nie wykazuje naturalnej ekspresji CD163, w przeciwieństwie do komórek wyizolowanych z ludzkiej krwi obwodowej (Tedesco et al. 2018).

W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano również, że zarówno powłoki pDA_IL-4, jak i pDA_IL-10 nie sprzyjają klasycznej aktywacji makrofagów i indukcji ich roli w procesach prozapalnych (komórki są ujemne względem markera MHC II). Odpowiednie wyniki przedstawiono na Rys. 40.



Rys. 40 Ekspresja markerów wybranych subpopulacji makrofagów na komórkach THP-1 oddziaływających z otrzymanymi powłokami (w postaci histogramów) – marker MHC II wskazuje subpopulację makrofagów M1, natomiast markery CD163 i CD209 są wskaźnikami subpopulacji M2 makrofagów. Analizę przeprowadzono na komórkach THP-1, które naturalnie nie wykazują ekspresji CD163, co zostało potwierdzone analizą CD163 po stymulacji wolną IL-10 (stąd szare pola, wskazujące na brak konieczności badania CD163 podczas interakcji z testowanymi powłokami, gdyż IL-10 nie indukuje ekspresji CD163 w komórkach THP-1). Wykres po prawej przedstawia procentowy udział komórek dodatnich względem markera CD209, gdzie marker CD209 indukowany jest w wyniku oddziaływania komórek z powłoką pDA_IL-4 oraz wolną IL-4. Badane powłoki nie indukują markerów MHC II (marker subpopulacji makrofagów M1). Powłoka funkcjonalizowana IL-4 sprzyja różnicowaniu makrofagów do subpopulacji M2, stąd wynika zachowanie jej aktywności biologicznej.

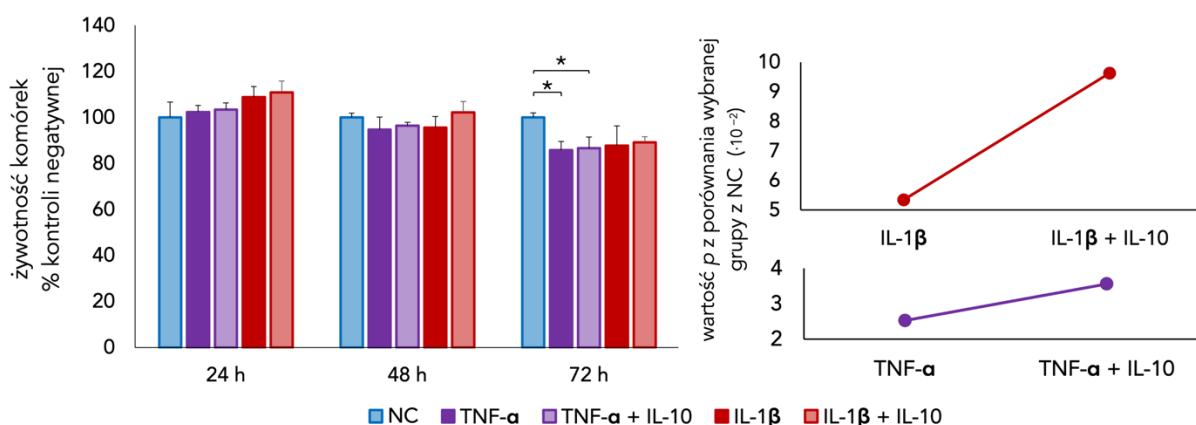
7.3 Modelowanie stanu zapalnego – oddziaływanie komórek śródbłonna z niezwiązanymi z powłoką cytokinami – perspektywy rozwoju badań nad patomechanizmem miażdżycy i restenozy w stencie

7.3.1 Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonna po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi

Celem oceny żywotności i proliferacji HUVECs po 6-godzinnej inkubacji z wybranymi cytokinami prozapalnymi (TNF- α oraz IL-1 β w stężeniu 5 ng/mL) z następczą 24-, 48- i 72-godziną inkubacją z IL-10, w stężeniu 10-krotnie przewyższającym stężenie czynników prozapalnych, przeprowadzono test MTT (patrz 6.3.2.1 Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonna oraz Rys. 20).

Warto nadmienić, że po okresie 6 godzin od wprowadzenia do medium cytokin prozapalnych, medium zostało zastąpione nowym, bez dodatku tych czynników. Eksperyment zatem pozwolił ocenić efekty wynikające z czasowego działania czynnika stymulującego, z późniejszym jego ustąpieniem.

Żywotność komórek kształtuje się na > 80% w stosunku do kontroli. Co wstępnie pozwala stwierdzić, że eksperyment prowadzony był na żywych komórkach, a stosowane cytokiny nie są toksyczne względem nich. Wydaje się to racjonalne, toteż reakcja zapalna z założenia nie powinna skutkować śmiercią komórek, a jedynie indukcją reakcji obronnych.



Rys. 41 Żywotność HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone na wykresie odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Żywotność tych komórek stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości p przedstawiono jako * ($p < 0,05$). Po prawej, wykres przedstawiający wzrost wartości p dla porównania wybranej grupy z NC po zastosowaniu IL-10. Sugeruje to antagonistyczny wpływ tej cytokiny względem aktywacji prozapalnej komórek śródbłonna.

Uzyskane dane spełniły zarówno założenie o normalności rozkładu (wg testu Shapiro-Wilk) oraz kryterium równości wariancji (wg testu Levene'a). W analizie statystycznej uwzględniono

następujące grupy: komórki negatywnej kontroli (referowane jako NC, nietraktowane cytokinami), komórki traktowane przez 6 godzin TNF- α (referowane jako TNF- α), komórki traktowane przez 6 godzin IL-1 β (referowane jako IL-1 β) oraz odpowiednio, komórki traktowane przez 6 godzin TNF- α i przez zadany czas IL-10 (referowane jako TNF- α + IL-10) i komórki traktowane przez 6 godzin IL-1 β i przez zadany czas IL-10 (referowane jako IL-1 β + IL-10).

Na podstawie przeprowadzonego testu jednokierunkowej ANOVA, po 24- i 48-godzinnej inkubacji komórek z IL-10 uzyskana wartość p nie wskazała na wystąpienie istotnych statystycznie różnic między grupami (wartość p odpowiednio wynosiła 0,134 oraz 0,221). Różnice istotne statystycznie wystąpiły po 72-godzinach, gdzie wartość p wyniosła 0,022, czyli poniżej poziomu istotności statystycznej 0,05. Analiza *post hoc* wykazała wartość p wynoszącą odpowiednio 0,025 oraz 0,036 dla porównania NC z TNF- α oraz NC z TNF + α _IL-10. Dla porównania NC z IL-1 β wartość p wyniosła 0,053, a dla NC z IL-1 β + IL-10 wartość p wyniosła 0,096. Poczynione obserwacje sugerują, że wprowadzona cytokina prozapalna indukuje swoistego rodzaju zmiany w komórkach śródbłonna, niemniej jednak jednoczesne zastosowanie cytokiny przeciwzapalnej wykazuje potencjał minimalizujący zajście tych zmian (zmniejsza obserwowane różnice w stosunku do NC) – patrz Rys. 41. Co więcej, zmiany wywołane aktywacją prozapalną uwiadcniają się po pewnym czasie (w tym przypadku po 72 godzinach), stąd otrzymana w poprzedniej części niniejszej rozprawy doktorskiej powłoka, wykazująca działanie mające na celu wyhamowanie reakcji porozpalanej HU-VECs po przedłużonej inkubacji, może odegrać korzystną rolę w zapobieganiu rozwojowi patologii naczyniowej (Makó et al. 2010).

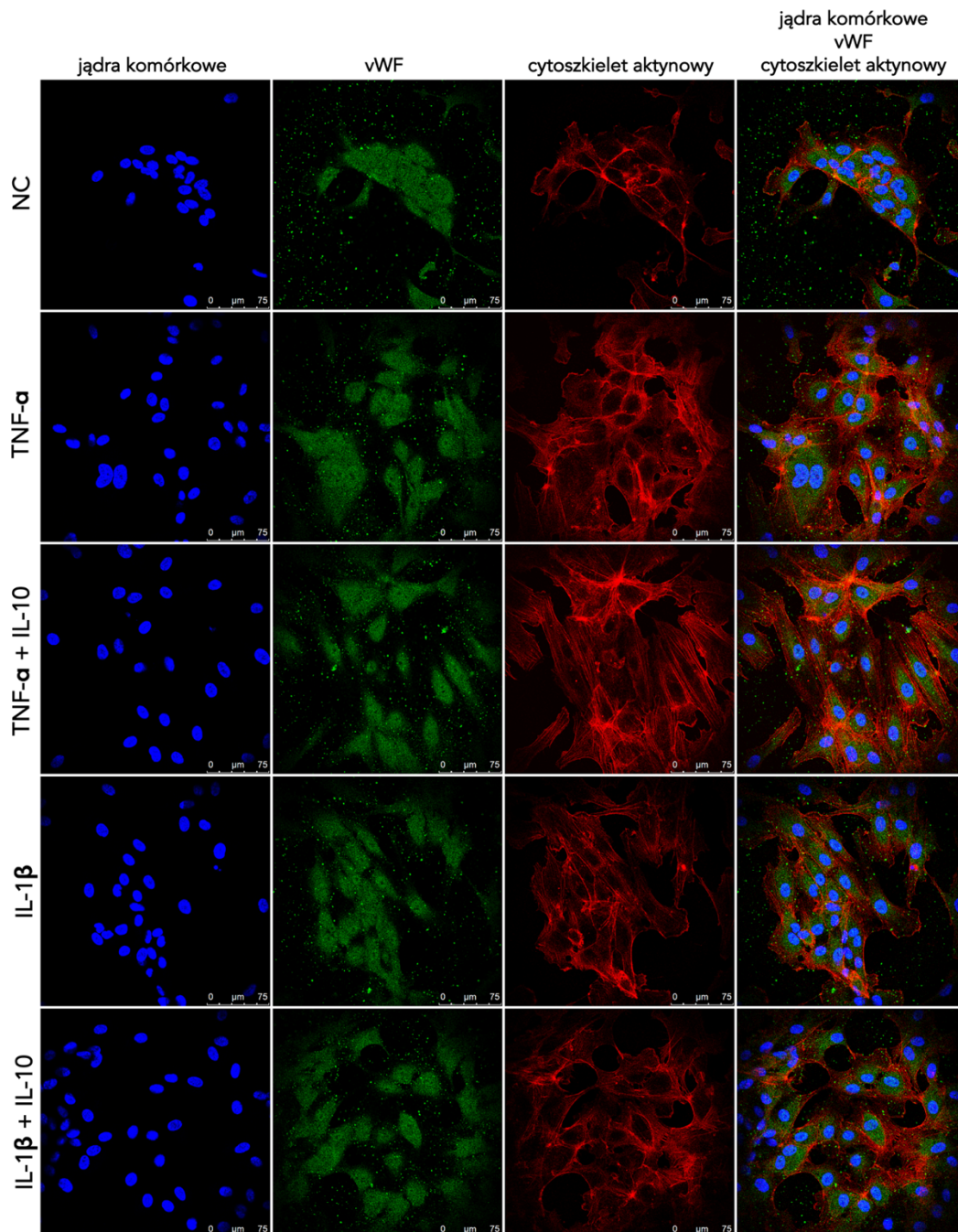
Niewątpliwie wymaga to dalszych badań, które umożliwi zglebienie tematu aktywacji prozapalnej komórek śródbłonna i prób wyhamowania tego procesu, co może przełożyć się na opracowanie nowych strategii terapeutycznych.

7.3.1 Ocena morfologii komórek śródbłonna po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi

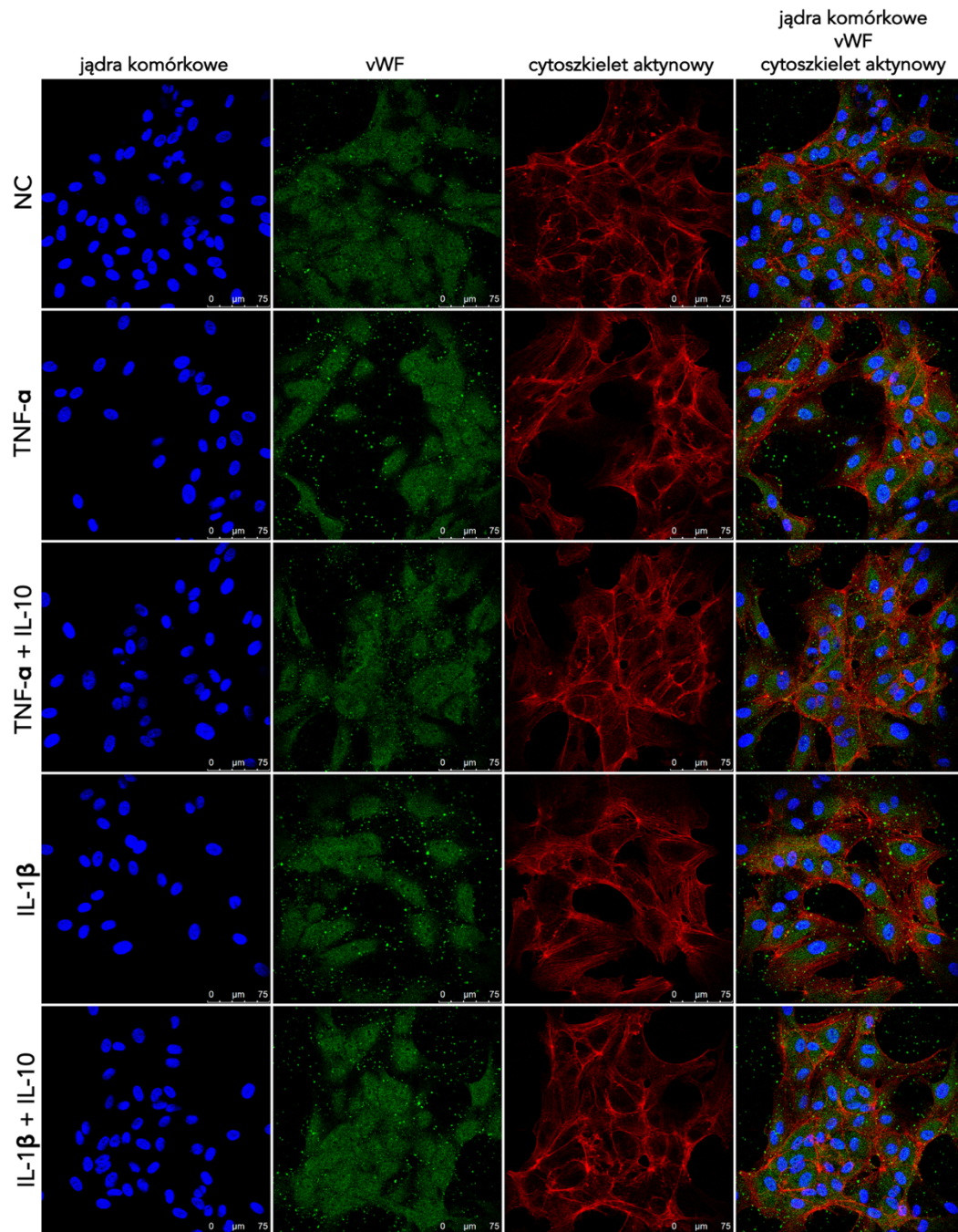
Dokonano również wstępnej oceny morfologii komórek śródbłonna po 6-godzinnej inkubacji z wybranymi cytokinami prozapalnymi (TNF- α oraz IL-1 β w stężeniu 5 ng/mL) z następczą 24-, 48- i 72-godzinną inkubacją z IL-10, w stężeniu 10-krotnie przewyższającym stężenie czynników prozapalnych (patrz Rys. 42, Rys. 43 oraz Rys. 44).

Nie zaobserwowano istotnych zmian morfologii komórek po stymulacji cytokinami w różnych konfiguracjach (patrz Rys. 20). Niemniej jednak, nieznaczne różnice można zaobserwować w odniesieniu do vWF, gdzie zgodnie z literaturą czynniki prozapalne modyfikują — zarówno na poziomie mRNA jak i białek — jego poziom oraz uwalnianie (Yan Li et al. 2015; Meiring, Allers, and

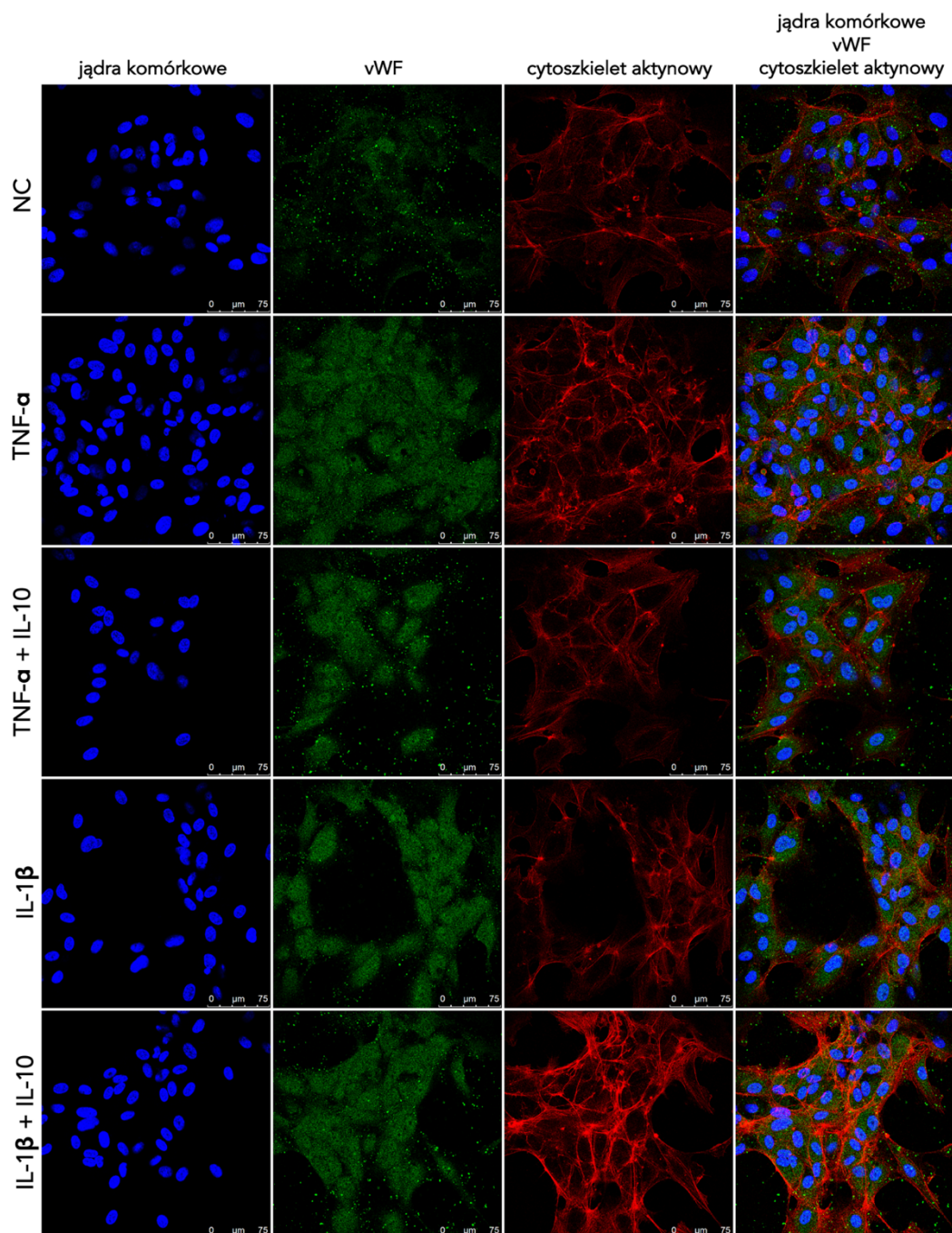
Le Roux 2016). Stanowi to kolejny punkt warty w przyszłości uwagi oraz poddania dokładniejszemu analizom.



Rys. 42 Morfologia HUVECs po 24 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), vWF z użyciem pierwszorzędowych, poliklonalnych, króliczych przeciwciał i drugorzędowych, poliklonalnych kozich przeciw-króliczych przeciwciał, znakowanych Alexa Fluor 488 (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μ m.



Rys. 43 Morfologia HUVECs po 48 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), vWF z użyciem pierwszorzędowych, poliklonalnych, króliczych przeciwciał i drugorzędowych, poliklonalnych kozich przeciw-króliczych przeciwciał, znakowanych Alexa Fluor 488 (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μm .



Rys. 44 Morfologia HUVECs po 24 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), vWF z użyciem pierwszorzędowych, poliklonalnych, króliczych przeciwciał i drugorzędowych, poliklonalnych kozich przeciw-króliczych przeciwciał, znakowanych Alexa Fluor 488 (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μm .

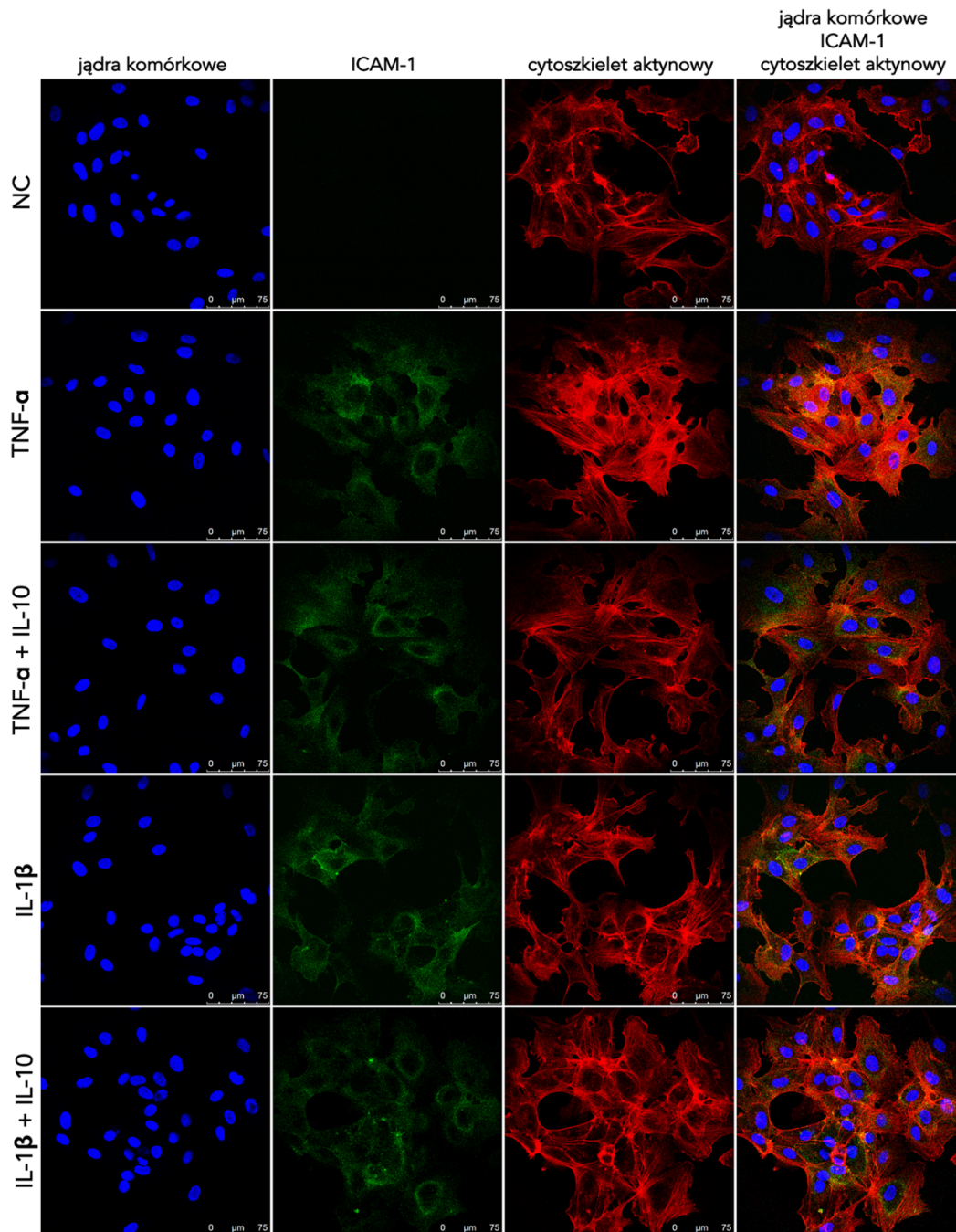
7.3.2 Ocena ekspresji cząsteczek adhezyjnych przez komórki śródbłonna po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi

Jak omówiono we wstępie do niniejszej rozprawy doktorskiej (patrz 1.1 Patomechanizm miażdżycy), wybrane cytokiny prozapalne nasilają ekspresję wybranych cząsteczek adhezyjnych w ECs, co skutkuje swoistą ich interakcją z WBCs i rekrutacją komórek układu odpornościowego do zmienionych chorobowo miejsc w obrębie ściany CA. Zjawisko to leży u podstaw rozwoju i progresji miażdżycy (Filippi 2016; Muller 2002; Yau, Teoh, and Verma 2015).

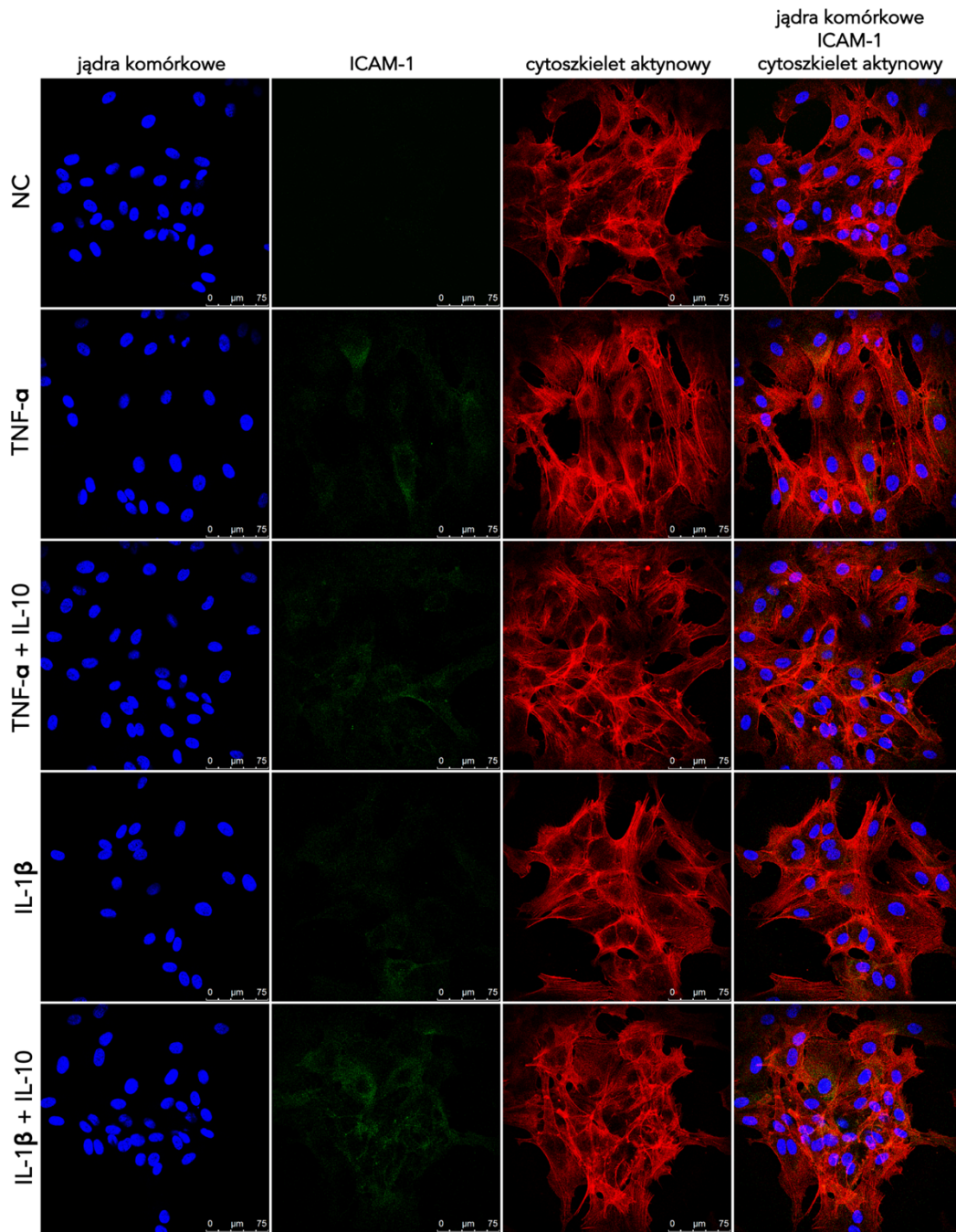
W celu określenia wpływu cytokin pro- i przeciwzapalnych na ekspresję cząsteczek adhezyjnych dokonano oceny ekspresji ICAM-1 w komórkach śródbłonna po 6-godzinnej inkubacji z wybranymi cytokinami prozapalnymi (TNF- α oraz IL-1 β w stężeniu 5 ng/mL) z następczą 24-, 48- i 72-godzinną inkubacją z IL-10, w stężeniu 10-krotnie przewyższającym stężenie czynników prozapalnych (patrz Rys. 45, Rys. 46 oraz Rys. 47).

Usunięcie ze środowiska komórek cytokin prozapalnych (poprzez odebranie medium z dodatkiem TNF- α lub IL-1 β po 6-godzinnej inkubacji i zastąpieniem świeżą jego porcją), skutkowało w kolejnych dniach stopniowym zanikiem ICAM-1 w HUVECs. Po 72-godzinach inkubacji poziom ICAM-1 jest prawie nieoznaczalny. Obserwowane zjawisko jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, gdzie przykładowo zastosowanie przeciwciała anty-TNF- α — infliksymab — które poprzez neutralizację czynników prozapalnych, jest w stanie całkowicie odwrócić efekt ich działania, czyli obserwowaną w stanie zapalnym regulację w dół mRNA PECAM-1 oraz regulację w górę ICAM-1 i VCAM-1 (Moriconi et al. 2012). Inne substancje mogą wykazywać analogiczne działanie, na różnych typach komórek poddawanych działaniu TNF- α (Huang et al. 2018).

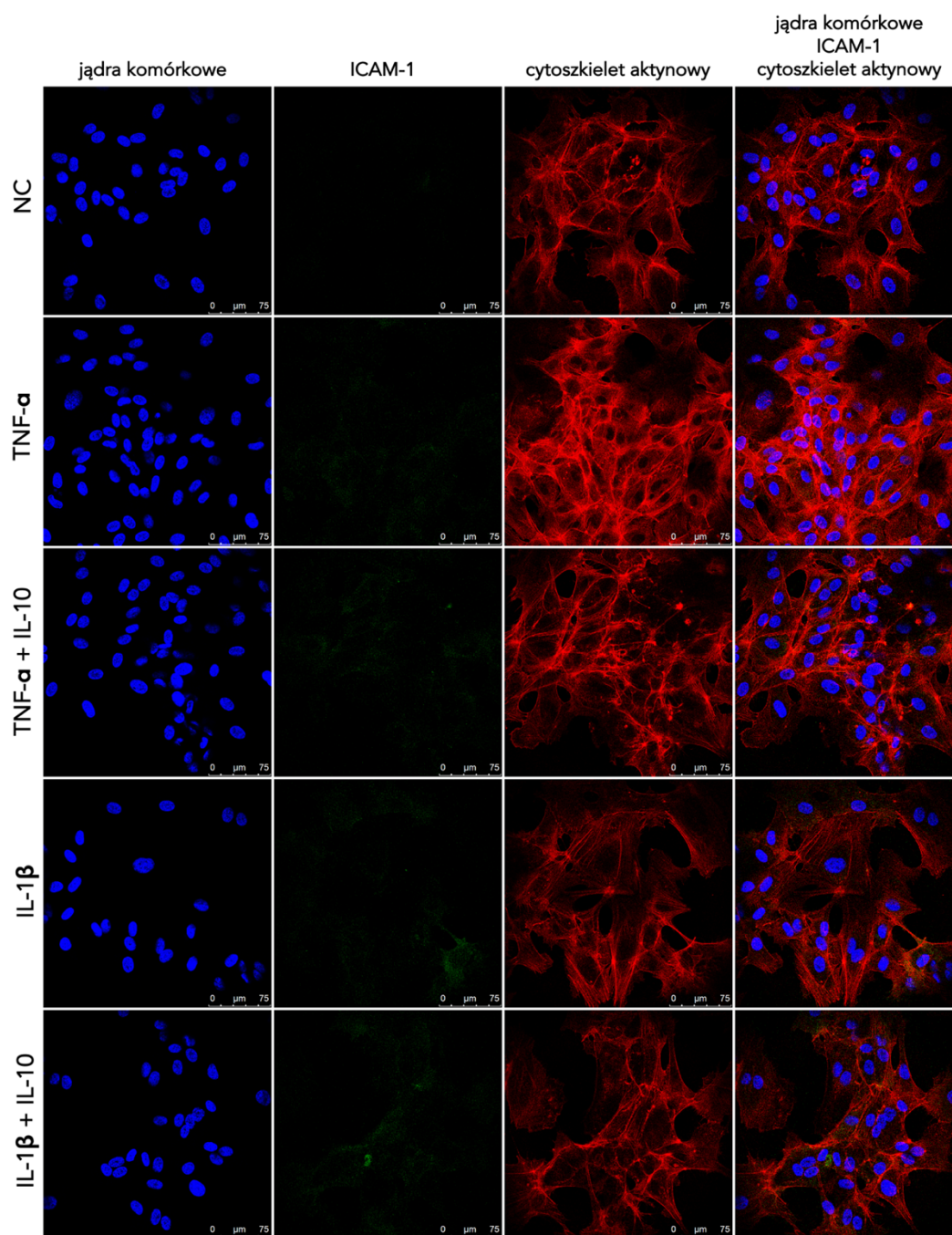
Przyglądając się serii zarejestrowanych obrazów, uzyskanych w różnych punktach czasowych (patrz Rys. 45, Rys. 46 oraz Rys. 47), można zauważyć, że wprowadzona IL-10 nie wykazuje istotnego wpływu, ograniczającego ekspresję ICAM-1 w HUVECs. Co więcej, na niektórych obrazach można stwierdzić nawet nieznacznie większą fluorescencję znakowanych przeciwciał skierowanych ku tej cząsteczce adhezyjnej. Stąd należy rozważyć skuteczność IL-10 w hamowaniu szlaku sygnalizacyjnego skutkującego — zależnym od TNF- α oraz IL-1 β — nasileniem produkcji ICAM-1 w HUVECs. Być może w przypadku zbadanych cytokin prozapalnych, IL-10 nie wykazuje tak silnego, antagonistycznego działania. Co więcej, być może takie działanie mogłoby być zaobserwowane podczas stymulacji HUVECs przez IFN- γ . Poparciem tej tezy może być fakt (wspomniany już wyżej), że domena zewnątrzkomórkowa jednego z łańcuchów IL-10R wykazuje znaczne podobieństwo do receptora swoistego dla IFN- γ . Białka te, pośrednicząc w przekazaniu sygnału do komórki mogą generować przeciwstawne efekty komórkowe bądź skutkować wzajemnym blokowaniem swoistych receptorów (Mak and Saunders 2006).



Rys. 45 Ocena ekspresji ICAM-1 w HUVECs po 24 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), ICAM-1 z użyciem pierwszorzędowych, monoklonalnych, mysich przeciwciał znakowanych FITC (zielony), natomiast cytoskielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μm .



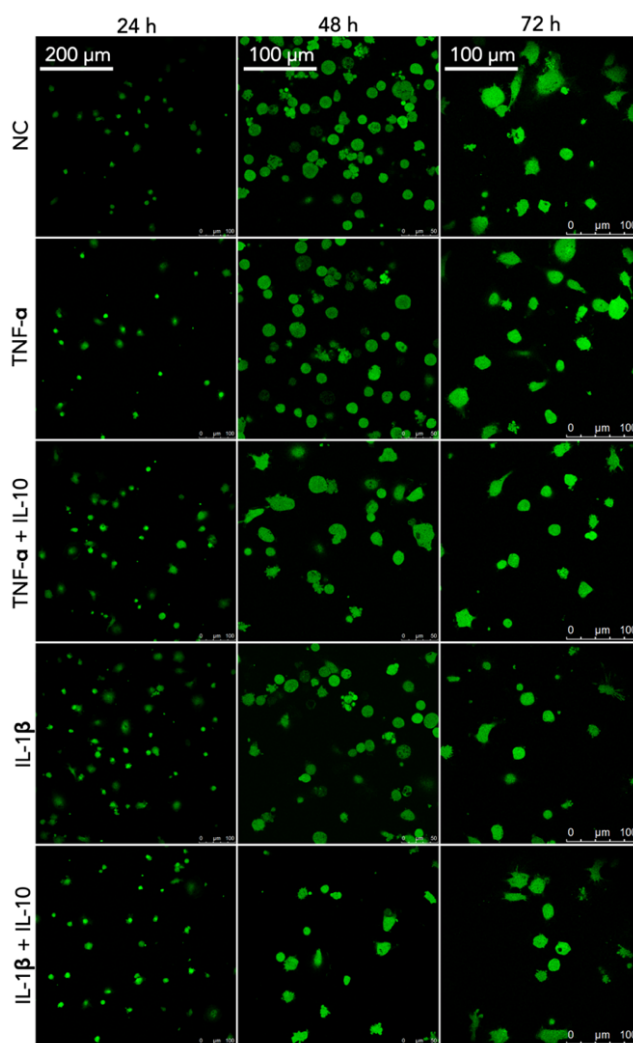
Rys. 46 Ocena ekspresji ICAM-1 w HUVECs po 48 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), ICAM-1 z użyciem pierwszorzędowych, monoklonalnych, mysich przeciwciał znakowanych FITC (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μm .



Rys. 47 Ocena ekspresji ICAM-1 w HUVECs po 72 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), ICAM-1 z użyciem pierwszorzędowych, monoklonalnych, mysich przeciwciał znakowanych FITC (zielony), natomiast cytoskielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μm .

7.3.3 Oznaczenie stężenia tlenku azotu w komórkach śródbłonka po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi

Przedstawione poniżej badania nad poziomem NO w HUVECs po stymulacji cytokinami pro- i przeciwzapalnymi mogą stanowić wstęp do dalszych badań nad dysfunkcją śródbłonka. Wskazuje się, że NO jest ważną cząsteczką sygnalizacyjną w organizmie, a spadek jej produkcji może skutkować patologią. Wzrost z kolei świadczyć może o utrzymaniu zdolności HUVECs do pełnienia właściwych sobie funkcji. Warto jednak postawić pytanie, czy przypadkiem nadprodukcja NO *in situ* nie będzie sprzyjać procesom oksydacyjnym. Nie chodzi tu o ROS, a stres zależny od reaktywnych form azotu.

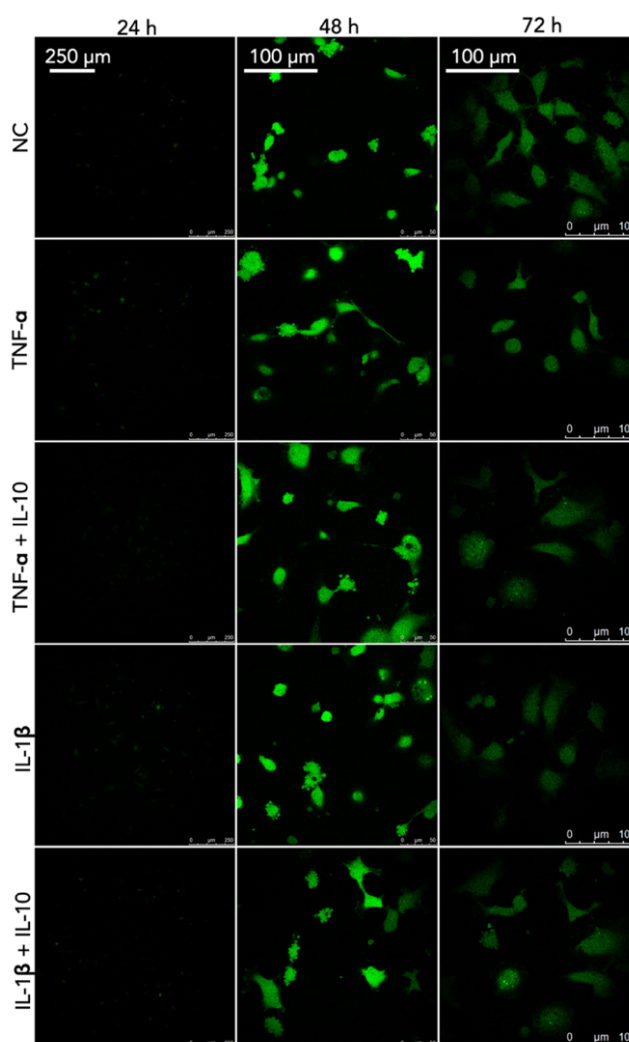


Rys. 48 Oznaczenie poziomu NO w HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Oznaczenie możliwe było wskutek reakcji NO z diocjanem 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluororesceiny (DAF-FM, z ang. *4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein*) (zielony). Skalę pokazano w lewym, górnym rogu dla każdej kolumny, wskazującą odpowiednio 200 μ m lub 100 μ m.

Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono istotnych różnic w produkcji NO przez komórki poddane działaniu cytokin pro- jak i przeciwzapalnych (patrz Rys. 48). Niemniej jednak planowane są prace eksperymentalne dogłębnie oceniające istotę tego procesu oraz ulepszające procedurę pomiarową.

7.3.4 Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłonna po stymulacji wolnymi cytokinami pro- i przeciwzapalnymi

Dokonano także wstępnego oznaczenia poziomu produkowanych przez HUVECs ROS w wyniku 6-godzinnej inkubacji z wybranymi cytokinami prozapalnymi (TNF- α oraz IL-1 β w stężeniu 5 ng/mL) z następczą 24-, 48- i 72-godzinną inkubacją z IL-10, w stężeniu 10-krotnie przewyższającym stężenie czynników prozapalnych.



Rys. 49 Oznaczenie poziomu ROS w HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Oznaczenie możliwe było wskutek reakcji ROS z diocetanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA, z ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) (zielony). Skalę pokazano w lewym, górnym rogu dla każdej kolumny, wskazującą odpowiednio 250 μ m lub 100 μ m.

Nie zaobserwowano istotnych zmian między grupami w wybranych punktach czasowych – patrz Rys. 49. Niemniej jednak po 48 godzinach zaobserwowano wysoki poziom reaktywnych form tlenu w HUVECs, który po 72 godzinach zaczął ustępować. Wynik nie jest jednoznaczny i na obecny moment trudny do wyjaśnienia. Niemniej jednak zakłada się, że przyczyną tego zjawiska może być utrata przez komórki kontaktu z podłożem (jako proces niezbędny w procedurze, którego konieczność przeprowadzenia zakomunikowano w 6.3.2.9 Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłonka) (Giannoni et al. 2008). Zatem też rozwój zaproponowanej metody w tym konkretnym zastosowaniu jest wskazany celem precyzyjnego oszacowania zmian zachodzących w komórkach wskutek zadziałania wybranych czynników.

Rozdział 8

Dowiedzenie tez pracy

W niniejszej rozprawie doktorskiej postawiono cztery hipotezy badawcze. Na tym etapie można stwierdzić, że wszystkie tezy — spośród postawionych — zostały potwierdzone za pomocą odpowiednio zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów badawczych oraz właściwej interpretacji uzyskanych wyników.

Teza nr 1: Istnieje materiał, którego parametry fizyko-chemiczne oraz właściwości biologiczne będą odpowiednie do zastosowania jako powłoka bazowa do pokrycia powierzchni stentu kardiovaskularnego. Możliwe jest pokrycie powierzchni stentu wybranym materiałem, zapewniając optymalność przyszłych procesów technologicznych.

Podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej z sukcesem — według opracowanej, autorskiej procedury — otrzymano powłoki modyfikujące powierzchnię stentów kobaltowo-chromowych rutynowo stosowanych podczas zabiegów przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej. Otrzymano powłokę na bazie biopolimerów (w tym polidopaminy i chitozanu), które szczelnie pokrywają powierzchnię implantu naczyniowego i nie wymywają się podczas procedury przygotowania powłoki.

Za pośrednictwem spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera potwierdzono obecność reaktywnych ugrupowań chinonu dopaminy oraz licznych grup aminowych na powierzchni implantu, które w kolejnym kroku, z powodzeniem wykorzystano do immobilizacji interleukin, zarówno w reakcji bezpośredniej lub za pośrednictwem techniki sieciowania (patrz 7.1.1 Ocena struktury chemicznej powłoki za pomocą spektroskopii w podczerwieni).

Przeprowadzona charakteryzacja za pomocą mikroskopii sił atomowych wykazała, że otrzymana powłoka na bazie polidopaminy jest jednorodna pod względem nanostruktury (patrz 7.1.2 Charakterystyka nanostrukturalna powłoki za pomocą mikroskopii sił atomowych).

W niniejszej rozprawie doktorskiej opracowano i zastosowano prostą, jedynie dwuetapową, efektywną oraz szybką procedurę pokrywania powierzchni stentów powłoką, przy niewymagających warunkach eksperymentalnych, co jest niewątpliwie korzystne z punktu widzenia procesów produkcyjnych. Pozwala to na precyzyjną kontrolę jakości funkcjonalizowanych stentów podczas syntezy powłoki na linii technologicznej (patrz 6.1.1 Procedura przygotowania powłok na bazie polidopaminy funkcjonalizowanych interleukiną oraz 6.1.2 Wzbogacenie powłoki o chitozan. Funkcjonalizacja powłoki interleukinami za pośrednictwem techniki sieciowania).

Otrzymana powłoka bazowa jest biokompatybilna, co zostało potwierdzone w licznych eksperymentach, w tym oceniających żywotność, proliferację i morfologię komórek śródbłonka (patrz 7.2.1 Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach oraz 7.2.2 Ocena morfologii komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach). Wykazano, że wykorzystane materiały bazowe wykazują selektywność względem wybranych komórek naczyniowych, jednocześnie hamując ich odpowiedź prozapalną (patrz 7.2.1 Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach, 7.2.3 Ocena stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki śródbłonka – odpowiedź zapalna komórek oraz 7.2.4 Ocena adhezji makrofagów do otrzymanych powłok).

Podsumowując, w oparciu o przedstawione wyniki, dowiedziono, że zastosowane biopolimery cechują się odpowiednimi parametrami fizyko-chemicznymi oraz właściwościami biologicznymi do zastosowania jako powłoka bazowa do pokrycia powierzchni stentów kardiowaskularnych. Udowodniono, że możliwe jest pokrycie powierzchni stentów kardiowaskularnych wybranymi materiałami, korzystając ze zaproponowanej, zoptymalizowanej procedury.

Teza nr 2: Możliwe jest związanie cząsteczek wybranych interleukin przeciwzapalnych na powierzchni powłoki bazowej oraz możliwe jest potwierdzenie obecności interleukin na powierzchni materiału wybranymi technikami pomiarowymi.

Analiza widm uzyskanych za pośrednictwem spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera wykazała charakterystyczne dla interleukiny 4 oraz interleukiny 10 pasma w widmach zarejestrowanych dla otrzymanych powłok. Co więcej zaobserwowano jednocześnie zmianę kształtu pasm amidowych na widmach powłok. Dowodzi to, że powstały wiązania pomiędzy ugrupowaniem chinonu dopaminy oraz wolnymi grupami aminowymi i tiolowymi interleukin, a także wiązania amidowe pomiędzy grupami aminowymi chitozanu oraz wolnymi grupami karboksylowymi interleukin. Zatem wykazano, że w strukturze otrzymanej

powłoki obecne są cząsteczki wybranych cytokin, odpowiednio interleukiny 4 oraz interleukiny 10 (patrz 7.1.1 Ocena struktury chemicznej powłoki za pomocą spektroskopii w podczerwieni).

Za pośrednictwem mikroskopii sił atomowych potwierdzono jednorodną nanostrukturę otrzymanej powłoki. Technika ta równocześnie wykazała obecność powierzchniowo związanych, niezagregowanych biocząsteczek. Na tej podstawie wnioskuje się, że ugrupowanie chinonu dopaminy powłoki wykazuje reaktywność chemiczną w stosunku do wolnych grup aminowych i tiolowych interleukin. Zatem wykorzystany materiał bazowy jest zdolny do wiązania cząsteczek interleukiny 4 i interleukiny 10 (patrz 7.1.2 Charakterystyka nanostrukturalna powłoki za pomocą mikroskopii sił atomowych).

Z wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych potwierdzono, że powłoki funkcjonalizowane interleukiną 4 i interleukiną 10 wykazują stopniowe, liniowe uwalnianie tych cytokin do środowiska w przeciągu pierwszych 10 dni inkubacji, co może ograniczyć hipoplazję neointimy oraz rekrutację monocytów do miejsc implantacji stentu, a także negatywnie korelują z rozwojem restenozy w stencie (patrz 7.1.3 Kinetyka uwalniania interleukin z powierzchni otrzymanej powłoki).

W związku z powyższym, z wykorzystaniem wskazanych wyżej technik pomiarowych, dowiedziono, że możliwe jest wiązanie cząsteczek interleukiny 4 i interleukiny 10 na powierzchni powłoki na bazie polidopaminy oraz polidopaminy i chitozanu.

Teza nr 3: Procedura wiązania interleukin na powierzchni powłoki bazowej nie upośledzi ich aktywności biologicznej wobec wybranych linii komórkowych.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że wskutek kontaktu makrofagów z otrzymaną powłoką, komórki te dokonują zmiany polaryzacji, nasilając ekspresję markera CD209, charakterystycznego dla alternatywnie aktywowanych makrofagów subpopulacji M2. Jednocześnie, nie zaobserwowano indukcji markerów MHC II, charakterystycznych dla klasycznie aktywowanych makrofagów subpopulacji M1. W rezultacie sprzyja to ograniczeniu procesów zapalnych w ścianie naczynia (patrz 7.2.6 Ocena polaryzacji makrofagów wskutek kontaktu z powłoką – ocena aktywności biologicznej związanych z powłoką cytokin).

Dowiedziono zatem, że zaproponowana procedura immobilizacji interleukin na powierzchni materiału bazowego nie upośledza aktywności biologicznej biocząsteczek.

Teza nr 4: Opracowana powłoka wykaże minimum dwie pożądane właściwości w odniesieniu do molekularnego bądź komórkowego patomechanizmu restenozy, co pozwoli wnioskować o korzyściach z zastosowania opracowanej modyfikacji powierzchni stentu.

Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących analizy żywotności i proliferacji komórek śródbłonka wykazano, że otrzymane powłoki funkcjonalizowane interleukiną 4 i interleukiną 10 zapewniają optymalne warunki do wzrostu i proliferacji komórek śródbłonka, co sprzyja re-endo-telializacji powierzchni stentu kardiowaskularnego. Poprzez zapewnienie szybszej i skuteczniejszej re-endo-telializacji powierzchni implantu można zapobiegać powikłaniom po zabiegach przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej, w tym przerostowi neointymy i restenozie w stencie (patrz 7.2.1 Ocena żywotności i proliferacji komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach).

Udowodniono, że warstwa komórek śródbłonka utworzona na otrzymanych powłokach szczelniej pokrywa sfunkcjonalizowany materiał, co implikuje korzystny wpływ funkcjonalizacji powierzchni na realizację funkcji barierowej śródbłonka, upośledzonej w przebiegu miażdżycy (patrz 7.2.2 Ocena morfologii komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach).

Analiza odpowiedzi zapalnej komórek naczyniowych hodowanych na zmodyfikowanych powierzchniach dowiodła, że otrzymane powłoki hamują stan zapalny, poprzez ograniczenie wydzielania cytokin prozapalnych przez komórki śródbłonka (patrz 7.2.3 Ocena stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki śródbłonka – odpowiedź zapalna komórek).

Dowiedziano, że funkcjonalizowana powłoka znacząco hamuje adhezję monocytów/makrofagów do materiału (patrz 7.2.4 Ocena adhezji makrofagów do otrzymanych powłok). Jednocześnie do komórek śródbłonka hodowanych na powierzchni zmodyfikowanego materiału monocyty adherują w ograniczonym stopniu (patrz 7.2.5 Określenie poziomu adhezji monocytów do monowarstwy utworzonej z komórek śródbłonka hodowanych na otrzymanych powłokach). W rezultacie powłoka zapobiega progresji zmian miażdżycowych i zmian neomiażdżycowych, ograniczając rekrutację wskazanych komórek układu odpornościowego.

Wykazana zdolność powłok do indukowania zmian fenotypowych makrofagów zgromadzonych w ścianie tętnicy może wpłynąć korzystnie na procesy gojenia i regeneracji tkanek. Jednocześnie indukcja alternatywnej aktywacji makrofagów stanowi dobry czynnik rokowniczy w przebiegu choroby naczyniowej (patrz 7.2.6 Ocena polaryzacji makrofagów wskutek kontaktu z powłoką – ocena aktywności biologicznej związanych z powłoką cytokin).

Innym czynnikiem decydującym o korzystnym rokowaniu pacjenta po zabiegu przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej jest obniżony poziom cytokin prozapalnych i podwyższony poziom cytokin przeciwzapalnych w surowicy. Dowiedziano, że otrzymana powłoka ogranicza wydzielanie cytokin prozapalnych w środowisku naczynia (patrz 7.2.3 Ocena stężenia cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki śródbłonka – odpowiedź zapalna komórek),

z jednoczesnym uwalnianiem cytokin przeciwzapalnych (patrz 7.1.3 Kinetyka uwalniania interleukin z powierzchni otrzymanej powłoki).

Uwzględniając powyższe można stwierdzić, że nadrzędny cel rozprawy doktorskiej został zrealizowany. Stent z autorską powłoką został otrzymany, scharakteryzowany, a jego aktywność biologiczna względem wybranych, modelowych linii komórkowych została potwierdzona.

Rozdział 9

Oryginalny wkład w tematykę pracy

Zrealizowanie niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliło rozwinąć tematykę obejmującą problem miażdżycy i restenozy w stencie po zabiegu przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyki wieńcowej oraz rzucono nowe wyzwania tradycyjnym założeniom, co może stanowić podłoże nowatorskich metod terapeutycznych celowanych na molekularny i komórkowy patomechanizm choroby. Oryginalny wkład w tematykę pracy obejmuje następujące elementy.

- (1) Przeprowadzono z sukcesem proces funkcjonalizacji powierzchni kobaltowo-chromowych stentów kardiowaskularnych, wprowadzając na ich powierzchnię biopolimery i interleukiny przeciwzapalne.
- (2) Otrzymano po raz pierwszy przeciwzapalną powłokę, która w naczyniu uwalnia lokalnie cytokiny przeciwzapalne, uznane za deficytowe w stanie choroby naczyniowej. Wykazano tym samym, że ogranicza to patologiczny rozrost neointymy, zmniejszając prawdopodobieństwo rozwoju restenozy w stencie do minimum.
- (3) Stwierdzono, że immunologicznie funkcjonalizowana powłoka za pomocą interleukiny 4 i interleukiny 10 nie upośledza istotnych procesów re-endotelializacji powierzchni stentu w naczyniu.
- (4) Wykazano, że autorska powłoka ogranicza wydzielanie cytokin prozapalnych przez komórki śródbłonna, stabilizując ich stężenie na stałym, niskim poziomie, co stopniowo hamuje toczące się procesy zapalne.
- (5) Udowodniono, że otrzymana powłoka jest zdolna do indukowania zmian fenotypowych makrofagów zgromadzonych w ścianie tętnicy, co korzystnie wpływa na procesy gojenia i regeneracji tkanek oraz wyhamowanie procesów zapalnych.

- (6) Dowiedziono, że funkcjonalizowana powłoka, otrzymana według autorskiej procedury, znacząco hamuje adhezję monocytów/makrofagów, przeciwdziałając ewentualnym stanom zapalnym.
- (7) Wykazano, że monocyty adherują w ograniczonym stopniu do komórek śródbłonka, które pokrywały zmodyfikowaną powierzchnię implantu naczyniowego, co hamuje postęp choroby naczyniowej.

Rozdział 10

Dorobek naukowy autora

10.1 Tytuły zawodowe

- 2018– Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, studia doktoranckie w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych, w dyscyplinie inżynieria biomedyczna.
- 2018– Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wydział Lekarski, studia jednolite magisterskie na kierunku lekarskim.
- 2017–2018 Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, studia II stopnia (magisterskie) na kierunku inżynieria biomedyczna. Praca magisterska nt. *Ocena charakterystyka amplitudowych i fazowych sygnału pulsu rogówki u pacjentów z jaskrą po interwencji chirurgicznej.*
- 2013–2017 Politechnika Wroclawska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, studia stacjonarne I stopnia (inżynierskie) na kierunku inżynieria biomedyczna, specjalność optyka biomedyczna. Praca inżynierska nt. *Zależności fazowe pomiędzy sygnałami pulsu rogówki i pulsu dna oka u osób zdrowych.*

10.2 Publikacje naukowe

- [1] **Sareło, P.**, Sobieszcańska, B., Wysokińska, E., Gašior-Głogowska, M., Kałas, W., Podbielska, H., Wawrzyńska, M., Kopaczyńska, M., 2023. *In vitro examinations of the anti-inflammatory interleukin functionalized polydopamine based biomaterial as a potential coating for cardiovascular stents.* Biocybern Biomed Eng, 43, s. 369–385. MNiSW: 140, IF(2022): 05.687.
- [2] Danielewska, M. E., Kostyszak, M. A., **Sareło, P.**, Gašior-Głogowska, M., Niemczyk, M., Prządka, P., Antończyk, A., Kielbowicz, Z., Iskander, D. R., 2022. *Indirectly assessing changes*

- in corneal properties with OCT speckle after crosslinking in porcine eyes.* Exp Eye Res, 219, s. 1–7. MNiSW: 140, IF(2022): 03.770.
- [3] Cyboran-Mikołajczyk, S., **Sareło, P.**, Paslowski, R., Paslawska, U., Przybyło, M., Nowak, K., Płóciennik, M., Podbielska, H., Kopaczyńska, M., Wawrzyńska, M., 2021. *Impact of liposomal drug formulation on the RBCs shape, transmembrane potential, and mechanical properties.* Int J Mol Sci, 22(4), s. 1–12. MNiSW: 140, IF(2021): 06.208.
- [4] **Sareło, P.**, Duda, M., Gąsior-Głogowska, M., Wysokińska, E., Kałas, W., Podbielska, H., Wawrzyńska, M., Kopaczyńska, M., 2020. *Antibody CD133 Biofunctionalization of Ammonium Acryloyldimethyltaurate and Vinylpyrrolidone Co-Polymer-Based Coating of the Vascular Implants.* Materials, 13(24), s. 1–13. MNiSW: 140, IF(2020): 03.623.
- [5] Zaręba, M., **Sareło, P.**, Kopaczyńska, M., Białońska, A., Uram, Ł., Walczak, M., Aebisher, D., Wołowicz, S., 2019. *Mixed-Generation PAMAM G3-G0 Megamer as a Drug Delivery System for Nimesulide: Antitumor Activity of the Conjugate Against Human Squamous Carcinoma and Glioblastoma Cells.* Int J Mol Sci, 20(20), s. 1–24. MNiSW: 100, IF(2019): 04.556.

10.3 Inne prace

- [1] **Sareło, P.**, Zaręba, M., Białońska, A., Uram, Ł., Walczak, M., Aebisher, D., Wołowicz, S., Kopaczyńska, M., 2019. *Structural characteristics of mixed-generation PAMAM G3-G0 megamer as a drug delivery system and its antitumor activity.* W: *21st Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering: abstract book.* Zielona Góra: Lubuskie Towarzystwo Naukowe, p. 56.

10.4 Konferencje naukowe

- [1] Członek Krajowego Komitetu Organizacyjnego Światowego Kongresu Europejskiego Stowarzyszenia Medycyny Predykccyjnej, Prewencyjnej i Personalizowanej (*The EPMA World Congress 2021*), 20–23 września 2021, Wrocław, Polska.
- [2] Wystąpienie konferencyjne pt. *Structural characteristics of mixed-generation PAMAM G3-G0 megamer as a drug delivery system and its antitumor activity* podczas 21. Polskiej Konferencji Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej (*21st Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering*), 25–27 września 2019, Zielona Góra, Polska.
- [3] Wystąpienie konferencyjne pt. *Ocena charakterystyk amplitudowych i fazowych sygnału pulsu rogówki u osób z jaskrą po interwencji chirurgicznej* podczas II Wrocławskiego Spotkania Ambitnych Bioinżynierów WASABI, 17 kwietnia 2018, Wrocław, Polska. Wystąpienie nagrodzono za największy wkład w eksperymenty badawcze i trudność realizowanej pracy oraz za najlepszą prezentację.

- [4] Wystąpienie konferencyjne pt. *Zależności fazowe pomiędzy sygnałami pulsu rogówki i pulsu dna oka u osób zdrowych* podczas I Wrocławskiego Spotkania Ambitnych Bioinżynierów WASABI, 27 kwietnia 2017, Wrocław, Polska.

10.5 Udział w grantach i projektach

- 09.2021–12.2021 Wykonawca w zadaniu pt. *Usługa kompleksowej charakteryzacji i ocena biokompatybilności nano-nośników z wykorzystaniem technik optycznych, mikroskopowych i analitycznych* (Nr 42IR/0002/21) zgodnie z umową PRO/DPN/ZKO/0181/478/2021 z dnia 19 lutego 2021 zawartą między Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym we Wrocławiu a Katedrą Inżynierii Biomedycznej na rzecz projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju pt. *Opracowanie nano-nośnika nowej generacji do zastosowań okulistycznych wraz z innowacyjnymi metodami oceny skuteczności celem poprawy wydajności dostarczania substancji w podaży do spojówkowej* (Nr POIR.04.01.01-00-0016/19).
- 07.2020–12.2020 Stypendysta w grantcie OPUS 13 Narodowego Centrum Nauki pt. *Molekularny mechanizm działania i ocena efektu terapeutycznego kombinacji 5-aza-2'-deoksytydyny i inhibitorów topoiżomerazy w leczeniu raka okrężnicy* (Nr 2017/25/B/NZ5/02608) – kierownik projektu dr hab. Wojciech Kałas, prof. PAN.
- 01.2018–09.2018 Stypendysta w grantcie LIDER VI Narodowego Centrum Badań i Rozwoju pt. *Prototyp urządzenia do rejestracji i analizy dykrotyzmu oka oraz wczesnej diagnostyki jaskry* (Nr LIDER/074/L-6/14/NCBR/2015) – kierownik projektu dr hab. inż. Monika Danielewska, prof. uczelni.

10.6 Stypendia

- [1] Zwiększone stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w roku akademickim 2019/2020, 2020/2021, 2021/2022, 2022/2023.
- [2] Stypendium Rektora Politechniki Wrocławskiej w roku akademickim 2018/2019, 2019/2020, 2020/2021, 2021/2022, 2022/2023.

10.7 Współpraca naukowa

- [1] Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (ul. Tytusa Chalubińskiego 4, 50-368 Wrocław).

- [2] Laboratorium Immunologii Molekularnej Nowotworów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk (ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław).
- [3] Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (ul. Karola Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław).
- [4] Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (ul. Wybrzeże Ludwika Paustera 4, 50-367 Wrocław).
- [5] Zintegrowana Grupa Przetwarzania Sygnałów i Elektroniki Medycznej Katedry Inżynierii Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej (ul. Stanisława Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław).
- [6] Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (ul. Cypriana Kamila Norwida 31, 50-375 Wrocław).

10.8 Działalność dydaktyczna

- [7] Prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów studiów stacjonarnych 1. i 2. stopnia na kierunku inżynieria biomedyczna na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej z podstaw chemii ogólnej (CHP001008C), anatomii (MDP001000W), fizjologii (MDP002016L), podstaw biofotoniki (FTP002003L, FTP002029S), grafiki komputerowej (INP002006L, INP001034L) i diagnostyki obrazowej (ETP002956L).
- [8] Współprowadzenie pracy inżynierskiej dyplomantki Moniki Berent nt. *Modyfikacja powierzchni stentów wewnątrznaczyniowych za pomocą interleukin przeciwzapalnych* (promotor dr hab. Marta Korpaczewska, prof. uczelni) – Wrocław, 2021.

10.9 Działalność dodatkowa

- [9] Utworzenie w ramach Katedry Inżynierii Biomedycznej Laboratorium badań komórkowych i molekularnych (04a/D-1), w tym nadzorowanie jego działalności.
- [10] Utworzenie stanowiska pomiarowego na bazie czytnika płytek Infinite M Nano+ (Tecan Group Ltd., Männedorf, Szwajcaria).
- [11] Współdziałanie w tworzeniu stanowiska pomiarowego na bazie szczypiec optycznych (Thorlabs, Newton, New Jersey, Stany Zjednoczone).

10.10 Doświadczenie naukowe

Posiadane doświadczenie w zastosowaniu następujących technik badawczych i pomiarowych: skaningowa laserowa mikroskopia konfokalna (CLSM), mikroskopia holotomograficzna, mikroskopia

sił atomowych (AFM), spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ATR-FTIR), spektroskopia ramanowska z transformatą Fouriera (FT-Raman), technika pęsety optycznej (OT, z ang. *optical tweezers*). Dodatkowo udokumentowane doświadczenie w pracy laboratoryjnej (w tym prowadzenie badań z wykorzystaniem linii komórkowych i materiału pochodzenia biologicznego, organizacja pracy laboratorium, zaopatrzenie laboratorium i koordynowanie prac rozwojowych) oraz umiejętność zastosowania metod statystycznych w analizie uzyskanych wyników.

10.11 Działalność promująca naukę

- [1] Udział w filmie pt. *Tunele życia - stenty. Medycyna 4.0* promującym prowadzone badania naukowe nad stentami kardiowaskularnymi (5 grudnia 2022 | <https://youtu.be/SIg2V5Yz0bk>).
- [2] Udział w filmie pt. *Nauka. Tego nie przeoczysz – odc.6* promującym prowadzone badania naukowe nad nową, szybką techniką oceny chemoodporności komórek ostrej białaczki szpikowej (13 stycznia 2023 | <https://youtu.be/Y5IG6dDC0gs>).

Spis ilustracji

- Rys. 1 Schematyczne przedstawienie warstwowej budowy tętnicy wieńcowej (CA, z ang. *coronary artery*). Błonę wewnętrzną naczynia (tzw. *tunica intima*) tworzą komórki śródbłonka (ECs, z ang. *endothelial cells*) ❶, które pokrywają podśródbłonkową macierz pozakomórkową (ECM, z ang. *extracellular matrix*) ❷. Błona środkowa (tzw. *tunica media*) rozciąga się między blaszką wewnętrzną (IEL, z ang. *internal elastic lamina*) ❸, a blaszką zewnętrzną (EEL, z ang. *external elastic lamina*) ❹. Występują tu licznie komórki mięśni gładkich naczyń (VSMCs, z ang. *vascular smooth muscle cells*) ❺. Głównymi komórkami błony zewnętrznej, in. przydanki (tzw. *tunica externa*, in. *adventitia*) są fibroblasty ❻. Najbardziej zewnętrzną warstwą naczynia jest okolonaczyniowa tkanka tłuszczowa (PVAT, z ang. *perivascular adipose tissue*), utworzona z nie zróżnicowanych ostatecznie adipocytów ❼. Rezydują tutaj również leukocyty (WBCs, z ang. *white blood cells*) ❽. Schemat autorski. 21
- Rys. 2 Przedstawienie interakcji międzykomórkowych ECs i WBCs, skutkujących wynaczynieniem WBCs i ich migracją do tkanek sąsiadujących. Uwzględniono molekuly pośredniczące w każdym z etapów tej interaktywności międzykomórkowej – odpowiednio selektyna L (CD62L) oraz selektyna E (CD62E), integryna bardzo późny antygen 4 (VLA-4, z ang. *very late antigen 4*) oraz cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1 (VCAM-1, z ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) (CD106), antygen związany z funkcją limfocytów 1 (LFA-1 z ang. *lymphocyte function-associated antigen 1*) oraz cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1, z ang. *intercellular adhesion molecule 1*) (CD54), a także cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonka 1 (PECAM-1, z ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule*), CD99 oraz antygen makrofaga-1 (Mac-1, z ang. *macrophage-1 antigen*). Przedstawiony proces rozpoczyna się od przylegania ❶, z następnym rolowaniem WBCs po aktywowanej powierzchni ECs ❷. Następnie dochodzi do stabilnej adhezji ❸ i diapedyzy parakomórkowej ❹. Migracja WBCs w obrębie ECM ❺ stanowi ostatni etap, w którym to WBCs osiągają docelowe miejsce w obrębie aktywowanych zapalnie tkanek. Schemat autorski. 23
- Rys. 3 Molekularne mechanizmy skurczu i rozkurczu (omówione w tekście) VSMCs w odpowiedzi na czynniki wazoaktywne produkowane przez ECs – tlenek azotu (NO, z ang. *nitric oxide*), prostaglandyna I₂ (PGI₂, z ang. *prostaglandin I₂*), śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF, z ang. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*), endotelina 1 (ET-1, z ang. *endothelin 1*), tromboksan A₂ (TXA₂, z ang. *thromboxane A₂*), angiotensyna II (Ang II, z ang. *angiotensin II*), tetrafosforan urydynoadenozyny (Up₄A, z ang. *uridine adenosine tetraphosphate*). Dodatkowe oznaczenia: kalmodylina (CaM, z ang. *calmodulin*), cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan (cAMP, z ang. *cyclic adenosine monophosphate*), cykliczny guanozylo-3',5'-monofosforan (cGMP, z ang. *cyclic guanosine monophosphate*), 1,4,5-trifosforan inozytoli (IP₃, z ang. *inositol triphosphate*), fosfataza lekkich łańcuchów miozyny (MLCP, z ang. *myosin light-chain phosphatase*), kinaza lekkich łańcuchów miozyny (MLCK, z ang. *myosin light-chain kinase*), kinaza Rho (ROCK, z ang. *Rho-associated protein kinase*), siateczka sarkoplazmatyczna (SaRe, z ang. *sarcoplasmic reticulum*). Schemat autorski. 26
- Rys. 4 Na wczesnym etapie aterogenezy dochodzi retencji i sekwestracji lipoprotein o małej gęstości (LDL, z ang. *low-density lipoprotein*) w błonie wewnętrznej ❶. W proces ten zaangażowana jest przezśródbłonkowa transcytoza, zależna od receptorów zmiataczy, klasy B typu 1 (SR-BI, z ang. *scavenger receptor, class B type I*) oraz kinazy typu 1 podobnej do receptora aktywiny (ALK1, z ang. *activin receptor-like kinase 1*) oraz wymagająca obecności kaweoli. Uwięzione w podśródbłonkowej przestrzeni cząsteczki LDL ulegają modyfikacji oksydacyjnej (oxLDL, z ang. *oxidized low-density lipoprotein*) ❷. Cząsteczki oxLDL są wychwytywane przez ECs za pośrednictwem lektynopodobnego receptora utlenionej lipoproteiny o małej gęstości 1 (LOX-1, z ang. *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*) ❸, co wywołuje wzrost ekspresji na powierzchni ECs cząsteczek adhezyjnych ❹. Schemat autorski. 34
- Rys. 5 Ekspresja cząsteczek adhezyjnych na powierzchni ECs skutkuje rekrutacją monocytów ❶ i ich migracją do przestrzeni podśródbłonkowej ❷, gdzie nabywają cechy prozapalnych makrofagów (MCs, z ang. *macrophages*) ❸. Za pośrednictwem receptorów zmiatających (SR, z ang. *scavenger receptor*) MCs intensywnie fagocytują cząsteczki LDL ❹, przekształcając się w komórki piankowe (FCs, z ang. *foam cells*) ❺. Jednocześnie MCs indukują stan zapalny poprzez wydzielanie czynników prozapalnych ❻, które przyczyniają się do dalszej infiltracji ściany naczynia przez kolejne WBCs ❼. Schemat autorski. 34
- Rys. 6 Powstające nieprzerwanie FCs ulegają apoptozie, a zwiększona apoptoza sprzyja powstawaniu martwiczego rdzenia w ścianie naczynia ❶. W odpowiedzi na mediatory stanu zapalnego wytwarzane przez MCs, VSMCs przechodzą zmiany fenotypowe ❷. Komórki te proliferują, przebudowują ECM, migrują ❸, współuczestnicząc w progresji blaszki miażdżycowej ❹. Różnicując się

- także w komórki podobne do MCs, intensywnie fagocytując cząsteczki LDL ⑤. Białki miażdżycowe nacieczone są również przez inne podzbiory WBCs, które kształtują mikrośrodowisko zmiany. Schemat autorski..... 35
- Rys. 7 Powstała blaszka miażdżycowa zbudowana jest z martwiczego rdzenia, otoczonego przez MCs i komórki podobne do MCs, które nieustannie fagocytują cząsteczki LDL. Białce towarzyszy populacja WBCs, wytwarzających cytokiny prozapalne. W skład blaszki również wchodzi zmodyfikowana ECM, która względnie stabilizuje wrażliwą blaszkę miażdżycową. Zaawansowane blaszki miażdżycowe wykazują również neowaskularyzację, co przyczynia się do dalszej ekspansji martwiczego rdzenia przez lokalne wynaczynienie płytek krwi (PLT, z ang. *platelets*) i czerwonych krwinek (RBCs, z ang. *red blood cells*). Po erozji lub pęknięciu blaszki miażdżycowej ① uszkodzone ECs wydzielają zwiększone ilości czynników prozakrzepowych i zmniejszone ilości czynników przeciwzakrzepowych, co skutkuje powikłaniem zakrzepowo-zatorowym ②. Schemat autorski..... 35
- Rys. 8 Choroba wieńcowa (CHD, z ang. *coronary heart disease*) obejmuje stany niedokrwienia mięśnia sercowego, które związane są z postępującymi zmianami miażdżycowymi w CA. Zaawansowane zmiany naczyniowe mogą skutkować znacznym ograniczeniem przepływu krwi w CA lub jego całkowitym ustaniem. W takim przypadku, niezbędne jest podjęcie odpowiednich działań terapeutycznych mających na celu przywrócenie niezakłóconego przepływu krwi przez mięsień sercowy i niedoprowadzenie do martwicy wybranych jego obszarów funkcjonalnych. Schemat autorski..... 38
- Rys. 9 Schematyczne przedstawienie idei przezskórnej interwencji wieńcowej (PCI, z ang. *percutaneous coronary intervention*) z implantacją stentu kardiowaskularnego, którego element strukturalny oznaczono na schemacie ①. W wyniku podjętego działania terapeutycznego, poprzez wywołanie odpowiedniej zmiany geometrii ② objętego chorobą miażdżycową odcinka naczynia, następuje poszerzenie zwężonego światła CA lub przywrócenie jej drożności po całkowitym zamknięciu. Zapewnia to właściwy przepływ krwi i poprawia perfuzję mięśnia sercowego. Schemat autorski..... 38
- Rys. 10 Odcinek CA, uprzednio poddany PCI, w którym rozwinęła się restenoza w stencie (ISR, z ang. *in-stent restenosis*), skutkująca nawrotem zwężenia. Widoczna jest dysfunkcyjna, obnażona warstwa śródbłonka ①, pod którą widoczne są intensywnie dzielące się VSMCs ②, jednocześnie produkujące zmodyfikowaną ECM ③. Migrujące VSMCs stanowią główne komórki odpowiedzialne za przerost neointymy (NIH, z ang. *neointimal hyperplasia*). Towarzyszą im miofibroblasty ④, pochodzące z fibroblastów przydanki. Miejscami, eksponowane są prozakrzepowe składniki błony wewnętrznej, które sprzyjają adhezji i agregacji PLTs, co skutkuje uformowaniem zakrzepu ⑤. Wśród komórek neointymy widoczny jest element strukturalny stentu ⑥, a poniżej natywna blaszka miażdżycowa ⑦. Schemat autorski..... 48
- Rys. 11 Szlak wewnątrzustrojowej syntezy dopaminy (DA, z ang. *dopamine*) z aminokwasów (bezpośrednio z L-tyrozyny oraz pośrednio z L-fenylalaniny) przy udziale odpowiednich enzymów i kofaktorów (gdzie BH₄ oznacza tetrahydrobiopterynę, przekształcaną w BH₂, czyli w dihydrobiopterynę). Zwrócić należy uwagę na strukturę chemiczną DA (in. 3,4-dihydroksyfenyloetyloaminy). Wskazano elementy strukturalne pozwalające zaklasyfikować DA odpowiednio do katecholamin bądź pochodnych 2-fenyloetyloaminy. Opracowanie własne..... 57
- Rys. 12 Wewnątrzustrojowy metabolizm dopaminy do kwasu homowanilinowego (HVA, z ang. *homovanillic acid*), filtrowanego i wydalanego wraz z moczem. Oznaczenia: dehydrogenaza aldehydowa (ALDH, z ang. *aldehyde dehydrogenase*), katechol-O-metylotransferaza (COMT, z ang. *catechol-O-methyltransferase*), monoaminooksydaza B (MAO-B, z ang. *monoamine oxidase B*). Opracowanie własne..... 57
- Rys. 13 Jednostki monomeryczne tworzące pDA wraz z wskazanymi prawdopodobnymi miejscami wiązania między nimi. Związki te łączą się ze sobą poprzez wiązania C–C między pierścieniami benzenu. Możliwe są dodatkowo połączenia między jednostkami za pośrednictwem wiązania w pozycji 2 lub 3 indolu, połączenia potrójne C–C indolin oraz wiązania C–N. W mniejszym stopniu możliwe jest wytworzenie grupy karboksylowej jako skutek zniszczenia pierścienia benzenowego indolu. Opracowanie własne. 59
- Rys. 14 Uproszczony szlak tworzenia polidopaminy (pDA, z ang. *polydopamine*) poprzez utlenianie DA. W początkowych etapach polimeryzacji powstaje chinon dopaminy, który może tworzyć kilka tautomerycznych struktur (w tym indolino-5,6-dion). Dalsza dehydrogenacja prowadzi do tworzenia 5,6-dihydroksyindolu (DHI, z ang. *dihydroxyindole*) oraz indol-5,6-dionu. Opracowanie własne. 59
- Rys. 15 Schemat tworzenia struktur supramolekularnych. Na wstępnym etapie powstają wiązania kowalencyjne pomiędzy jednostkami monomerycznymi (patrz wyżej). W strukturze pDA często powtarza się motyw trimery złożonego z dwóch cząsteczek DHI i jednej DA. Na dalszych etapach główną rolę odgrywają oddziaływania fizyczne (w tym wiązania wodorowe, oddziaływania π - π czy kation- π). Polidopamina zatem jest strukturą, którą tworzą jednostki monomeryczne (patrz wyżej) połączone wiązaniami kowalencyjnymi w różnych konfiguracjach, a w procesie agregacji powstają coraz większe formy, stabilizowane oddziaływaniami fizycznymi. Opracowanie własne. 60
- Rys. 16 Schematyczne przedstawienie mechanizmu wiązania cząsteczek wybranych interleukin z powłoką na bazie pDA, w wyniku reakcji Michaela ① lub reakcji z wytworzeniem zasady Schiffa ②. Pozycja wiązania zależy od grupy funkcyjnej biorącej udział w wytworzeniu wiązania. Reakcja z udziałem grupy aminowej zachodzi preferencyjnie w pozycji 6 chinonu dopaminy ③ lub w pozycji 6 indol-5,6-dionu ④. Reakcja z udziałem grupy tiolowej zachodzi w pozycji 6 chinonu dopaminy ⑤ lub w pozycji 7' indol-5,6-dionu ⑥. Opracowanie własne..... 64
- Rys. 17 Struktura chemiczna meru chityny – N-acetyloglukozaminy oraz struktura chemiczna chityny. Chitozan powstaje w procesie deacetylacji chityny, w wyniku którego część grup acetylowych zostaje usunięta. Skutkuje to znacznym zwiększeniem udziału wolnych grup aminowych w strukturze powstałego biopolimeru. Zatem można uznać, że chitozan jest kopolimerem złożonym z podstawowych dla chityny merów – N-acetyloglukozaminy oraz z merów będących zdeacetylowaną formą N-acetyloglukozaminy – N-glukozaminy. Opracowanie własne..... 65

- Rys. 18 Reakcja tworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy wolną grupą karboksylową znajdującą się w obrębie cząsteczki interleukiny (odpowiednio IL-4 lub IL-10) i grupą aminową, wprowadzaną licznie na modyfikowaną powierzchnię wraz z chitozanem. W tym celu cząsteczki wybranych interleukin zostały aktywowane w reakcji z 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidem (EDC, z ang. *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide*) oraz z hydroksylsulfosukcynoimidem (sulfo-NHS, z ang. *N-hydroxysulfosuccinimide*), przez co stały się one zdolne do reagowania z odpowiednimi grupami funkcyjnymi chitozanu. Wskutek zachodzących reakcji, powstało wiązanie amidowe pomiędzy reagentami (interleukiną i chitozanem). Opracowanie własne. 68
- Rys. 19 Reakcja przekształcania soli tetrazolowej (bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazolowego – MTT, z ang. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide*), przyjmującej w roztworze wodnym żółte zabarwienie, do nierozpuszczalnych w wodzie kryształów formazanu (1-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-3,5-difenylformazanu), będących fioletowym produktem reakcji bio redukcji. Opracowanie własne..... 85
- Rys. 20 Schematyczne przedstawienie zaplanowanego eksperymentu, mającego na celu ocenę żywotności i proliferacji komórek po stymulacji cytokinami prozapalnymi z następczą inkubacją z interleukiną przeciwzapalną. Wysiane komórki wstępnie inkubowano przez 24 godziny, następnie poddano przez 6 godzin działaniu odpowiednio rekombinowanemu ludzkiemu TNF- α o stężeniu 5 ng/mL bądź rekombinowanej ludzkiej IL-1 β o stężeniu 5 ng/mL, w kompletnym medium. Po tym czasie wprowadzono rekombinowaną ludzką IL-10 o stężeniu 50 ng/mL, w kompletnym medium i inkubowano przez 24, 48 i 72 godziny, dokonując właściwej oceny w każdym z punktów czasowych. 86
- Rys. 21 Mechanizm oznaczenia tlenu azotu (NO, z ang. *nitric oxide*) w komórkach z wykorzystaniem diocjanu 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluoro fluoresceiny (DAF-FM, z ang. *4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein*). Diocjan DAF-FM biernie dyfunduje przez błony komórkowe i jest wewnątrzkomórkowo deacetylowany przez esterazy. Powstaje niewykazujący fluorescencji DAF-FM, który w wyniku reakcji z NO, tworzy fluorescencyjny już benzotriazol. Opracowanie własne. 92
- Rys. 22 Mechanizm oznaczenia reaktywnych form tlenu (ROS, z ang. *reactive oxygen species*) w komórkach z wykorzystaniem diocjanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA, z ang. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Odczynnik ten jest chemicznie zredukowaną formą fluoresceiny. Po deacetylacji H₂DCFDA przez wewnątrzkomórkowe esterazy i utlenieniu powstałego związku, niefluorescencyjny H₂DCFDA przekształcany jest w wysoce fluorescencyjną 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF, z ang. *2',7'-dichlorofluorescein*). Opracowanie własne. 93
- Rys. 23 (A) Referencyjne widma ATR-FTIR wybranych interleukin – IL-4 (linia pomarańczowa) i IL-10 (linia zielona). (B) Referencyjne widmo ATR-FTIR polidopaminy (pDA, linia czarna). (C) Referencyjne widmo ATR-FTIR chitozanu (linia żółta). (D) Uśrednione widma ATR-FTIR materiału pokrytego powłoką na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej odpowiednio IL-4 (pDA_IL-4, linia pomarańczowa) oraz IL-10 (pDA_IL-10, linia zielona). (E) Uśrednione widma ATR-FTIR materiału pokrytego powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH, linia żółta) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4, linia pomarańczowa) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10, linia zielona). Na widmach wskazano wybrane, charakterystyczne pasma. 97
- Rys. 24 Obrazy AFM otrzymane na każdym etapie przygotowania powłoki – powierzchnia pokryta powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powierzchnia pokryta powłoką na bazie polidopaminy i sfunkcjonalizowana przez wprowadzenie IL-4 lub IL-10 (odpowiednio pDA_IL-4 i pDA_IL-10). Powierzchnia skanowania wynosiła 1 μm \times 1 μm . Po prawej stronie przedstawiono skalę wysokości obiektów. 98
- Rys. 25 Wykres zależności uwalniania wybranej interleukiny z powłoki (odpowiednio uwalnianie IL-4 z powłoki pDA_IL-4 – wykres po lewej, uwalnianie IL-10 z powłoki pDA_IL-10 – wykres po prawej) w funkcji czasu (kolejne dni). Materiałem bazowym powłoki była polidopamina. Przedstawiono odchylenie standardowe dla powłoki pDA_IL-4 oraz 5-krotność odchylenia standardowego dla powłoki pDA_IL-10 (dla lepszej wizualizacji). 99
- Rys. 26 Wykres zależności uwalniania wybranej interleukiny z powłoki (odpowiednio uwalnianie IL-4 z powłoki pDA_CH_IL-4 – wykres po lewej, uwalnianie IL-10 z powłoki pDA_CH_IL-10 – wykres po prawej) w funkcji czasu (kolejne dni). Materiałem bazowym powłoki była polidopamina wzbogacona o chitozan. Przedstawiono odchylenie standardowe dla powłoki pDA_CH_IL-4 oraz odchylenie standardowe dla powłoki pDA_CH_IL-10. 100
- Rys. 27 Żywotność HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach po wprowadzeniu ich na powierzchnię naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która została pokryta — odpowiednio — powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoką na bazie polidopaminy z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_IL-4) oraz IL-10 (pDA_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Żywotność tych komórek stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości *p* przedstawiono jako * ($p < 0,05$)..... 102
- Rys. 28 Żywotność HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach po wprowadzeniu ich na powierzchnię naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która została pokryta — odpowiednio — powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Żywotność tych komórek stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości *p* przedstawiono jako * ($p < 0,05$)..... 103
- Rys. 29 Obrazy mikroskopii kontrastu fazowego HUVECs hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoce na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej cząsteczkami IL-4 (pDA_IL-4) i IL-10 (pDA_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej

hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 100 μm 105

Rys. 30 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej HUVECs hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoce na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej cząsteczkami IL-10 (pDA_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z FITC (zielony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm 106

Rys. 31 Obrazy mikroskopii kontrastu fazowego HUVECs hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 100 μm 107

Rys. 32 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej HUVECs hodowanych przez 24 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z FITC (zielony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w lewym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm 108

Rys. 33 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej HUVECs hodowanych przez 48 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z FITC (zielony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w lewym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm 109

Rys. 34 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej HUVECs hodowanych przez 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z FITC (zielony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w lewym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm 110

Rys. 35 Ocena odpowiedzi zapalnej HUVECs hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoce na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej cząsteczkami IL-4 (pDA_IL-4) i IL-10 (pDA_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. W lewej kolumnie przedstawiono poziom uwalnianych cytokin prozapalnych (odpowiednio MCP-1 oraz IL-8) wyrażone jako % kontroli negatywnej (poziom uwalnianych cytokin przez NC stanowiło 100%) wraz z odchyleniem standardowym. W prawej kolumnie przedstawiono dobowy wzrost uwalniania cytokin prozapalnych (różnica pomiędzy wyznaczonym stężeniem wybranej interleukiny w 48 godzinie i 24 godzinie inkubacji oraz w 72 godzinie i 48 godzinie, z zaznaczonymi błędami standardowymi). 112

Rys. 36 Ocena odpowiedzi zapalnej HUVEC hodowanych przez 24, 48 i 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Negatywną kontrolę (NC) stanowiły komórki utrzymywane na powierzchni naczynia stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. W lewej kolumnie przedstawiono poziom uwalnianych cytokin prozapalnych (odpowiednio MCP-1 oraz IL-8) wyrażone jako % kontroli negatywnej (poziom uwalnianych cytokin przez NC stanowiło 100%) wraz z odchyleniem standardowym. W prawej kolumnie przedstawiono dobowy wzrost uwalniania cytokin prozapalnych (różnica pomiędzy wyznaczonym stężeniem wybranej interleukiny w 48 godzinie i 24 godzinie inkubacji oraz w 72 godzinie i 48 godzinie, z zaznaczonymi błędami standardowymi)..... 113

Rys. 37 Po lewej panel obrazów, uzyskanych z wykorzystaniem skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej (CLSM, z ang. *confocal laser scanning microscopy*), przedstawiający poziom adhezji komórek THP-1 zróżnicowanych do makrofagów (w wyniku stymulacji PMA) do materiału niepokrytego (NC) i materiału pokrytego testowanymi powłokami (odpowiednio pDA, pDA_IL-4 i pDA_IL-10). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną sprzężoną z Alexa Fluor 647 (czerwony). Trzecia kolumna obrazów od lewej stanowi nałożenie dwóch poprzednich kanałów. Skala przedstawiona jest na poszczególnych obrazach, w ich prawych dolnych rogach, wskazując 250 μm . Obserwuje się znaczne zmniejszenie adhezji THP-1 do otrzymanych powłok w stosunku do NC. Po prawej stronie przedstawiono wykres pudełkowy, który wskazuje liczbę komórek

- zliczoną z 16 pól widzenia. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu Kruskala-Wallisa z porównaniami wielokrotnymi z korekcją poziomu istotności metodą Bonferroniego ($\alpha = 0,0125$), przedstawiono jako * dla $p < 0,0125$ 115
- Rys. 38 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej komórek THP-1 wybarwionych kalceina-AM (zielony), które przylegały do HUVECs (niewybarwione) hodowanych przez 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA) oraz powłoką na bazie polidopaminy sfunkcjonalizowanej cząsteczkami IL-4 (pDA_IL-4) i IL-10 (pDA_IL-10). Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm . Kontrolę negatywną (NC) stanowiły komórki przyległe do HUVECs utrzymywanych na powierzchni naczyń stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Komórki hodowane analogicznie, jak w grupie NC, jednak traktowane przez 16 godzin lipopolisacharydem (LPS, z ang. *lipopolysaccharide*), w stężeniu 4 ng/mL, bezpośrednio przed wprowadzeniem THP-1, stanowiły kontrolę pozytywną (LPS). Na podstawie uzyskanych obrazów, oceniono liczbę komórek THP-1, które przyległy do HUVECs. Wykres przedstawiający liczbę komórek THP-1 zliczonych na uzyskanych obrazach mikroskopowych, które przyległy do HUVECs. Liczba THP-1 zliczonych dla NC stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości p przedstawiono jako * ($p < 0,05$). 117
- Rys. 39 Obrazy mikroskopii fluorescencyjnej komórek THP-1 wybarwionych kalceina-AM (zielony), które przylegały do HUVECs (niewybarwione) hodowanych przez 72 godziny na powierzchni pokrytej powłoką na bazie polidopaminy (pDA), powłoką na bazie polidopaminy, wzbogaconą chitozanem (pDA_CH) oraz powłoką na bazie polidopaminy i chitozanu z powierzchniowo związanymi cząsteczkami IL-4 (pDA_CH_IL-4) oraz IL-10 (pDA_CH_IL-10). Skalę pokazano w prawym, górnym rogu, wskazującą odpowiednio 200 μm . Kontrolę negatywną (NC) stanowiły komórki przyległe do HUVECs utrzymywanych na powierzchni naczyń stosowanego do rutynowej hodowli komórek, która nie została poddana żadnym modyfikacjom. Komórki hodowane analogicznie, jak w grupie NC, jednak traktowane przez 16 godzin LPS, w stężeniu 4 ng/mL, bezpośrednio przed wprowadzeniem THP-1, stanowiły kontrolę pozytywną (LPS). Na podstawie uzyskanych obrazów, oceniono liczbę komórek THP-1, które przyległy do HUVEC. Wykres przedstawiający liczbę komórek THP-1 zliczonych na uzyskanych obrazach mikroskopowych, które przyległy do HUVEC. Liczba THP-1 zliczonych dla NC stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości p przedstawiono jako * ($p < 0,05$). 118
- Rys. 40 Ekspresja markerów wybranych subpopulacji makrofagów na komórkach THP-1 oddziałujących z otrzymanymi powłokami (w postaci histogramów) – marker MHC II wskazuje subpopulację makrofagów M1, natomiast markery CD163 i CD209 są wskaźnikami subpopulacji M2 makrofagów. Analizę przeprowadzono na komórkach THP-1, które naturalnie nie wykazują ekspresji CD163, co zostało potwierdzone analizą CD163 po stymulacji wolną IL-10 (stąd szare pola, wskazujące na brak konieczności badania CD163 podczas interakcji z testowanymi powłokami, gdyż IL-10 nie indukuje ekspresji CD163 w komórkach THP-1). Wykres po prawej przedstawia procentowy udział komórek dodatnich względem markera CD209, gdzie marker CD209 indukowany jest w wyniku oddziaływania komórek z powłoką pDA_IL-4 oraz wolną IL-4. Badane powłoki nie indukują markerów MHC II (marker subpopulacji makrofagów M1). Powłoka funkcjonalizowana IL-4 sprzyja różnicowaniu makrofagów do subpopulacji M2, stąd wynika zachowanie jej aktywności biologicznej. 120
- Rys. 41 Żywotność HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone na wykresie odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Żywotność tych komórek stanowiła 100%. Różnice istotne statystycznie na podstawie testu *post hoc* Turkey HSD przyjęto dla $\alpha < 0,05$, gdzie wyliczone wartości p przedstawiono jako * ($p < 0,05$). Po prawej, wykres przedstawiający wzrost wartości p dla porównania wybranej grupy z NC po zastosowaniu IL-10. Sugeruje to antagonistyczny wpływ tej cytokiny względem aktywacji prozapalnej komórek śródbłonna. 121
- Rys. 42 Morfologia HUVECs po 24 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), vWF z użyciem pierwszorzędowych, poliklonalnych, króliczych przeciwciał i drugorzędowych, poliklonalnych kozich przeciw-króliczych przeciwciał, znakowanych Alexa Fluor 488 (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μm 123
- Rys. 43 Morfologia HUVECs po 48 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), vWF z użyciem pierwszorzędowych, poliklonalnych, króliczych przeciwciał i drugorzędowych, poliklonalnych kozich przeciw-króliczych przeciwciał, znakowanych Alexa Fluor 488 (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μm 124

- Rys. 44 Morfologia HUVECs po 24 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), vWF z użyciem pierwszorzędowych, poliklonalnych, króliczych przeciwciał i drugorzędowych, poliklonalnych kozich przeciw-króliczych przeciwciał, znakowanych Alexa Fluor 488 (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μ m..... 125
- Rys. 45 Ocena ekspresji ICAM-1 w HUVECs po 24 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), ICAM-1 z użyciem pierwszorzędowych, monoklonalnych, mysich przeciwciał znakowanych FITC (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μ m..... 127
- Rys. 46 Ocena ekspresji ICAM-1 w HUVECs po 48 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), ICAM-1 z użyciem pierwszorzędowych, monoklonalnych, mysich przeciwciał znakowanych FITC (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μ m..... 128
- Rys. 47 Ocena ekspresji ICAM-1 w HUVECs po 72 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski), ICAM-1 z użyciem pierwszorzędowych, monoklonalnych, mysich przeciwciał znakowanych FITC (zielony), natomiast cytoszkielet aktynowy – falloidyną znakowaną Alexa Fluor 647 (czerwony). Na podstawie uzyskanych obrazów, scharakteryzowano morfologię HUVECs. Skalę pokazano w prawym, dolnym rogu obrazów, wskazującą odpowiednio 75 μ m..... 129
- Rys. 48 Oznaczenie poziomu NO w HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Oznaczenie możliwe było wskutek reakcji NO z diocetanem 4-amino-5-metyloamino-2',7'-difluororesceiny (DAF-FM, z ang. *4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein*) (zielony). Skalę pokazano w lewym, górnym rogu dla każdej kolumny, wskazującą odpowiednio 200 μ m lub 100 μ m. 130
- Rys. 49 Oznaczenie poziomu ROS w HUVECs po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z 50 ng/mL IL-10 (oznaczone odpowiednio TNF- α + IL-10 oraz IL-1 β + IL-10) po uprzednim 6-godzinnym traktowaniu czynnikami prozapalnymi (5 ng/mL TNF- α bądź 5 ng/mL IL-1 β). Oznaczenie TNF- α oraz IL-1 β wskazuje, że komórki po traktowaniu odpowiednim czynnikiem prozapalnym, nie były poddane działaniu czynnika przeciwzapalnego. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane czynnikiem prozapalnym jak i przeciwzapalnym przez cały okres eksperymentu (oznaczone NC). Oznaczenie możliwe było wskutek reakcji ROS z diocetanem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA, z ang. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*) (zielony). Skalę pokazano w lewym, górnym rogu dla każdej kolumny, wskazującą odpowiednio 250 μ m lub 100 μ m. 131

Bibliografia

- Abumrad, Nada A. et al. 2021. "Endothelial Cell Receptors in Tissue Lipid Uptake and Metabolism." *Circulation Research* 128(3): 433–50.
- Ahmad, Mansoor, Parth Mehta, Anil Kumar Reddy Reddivari, and Sudhir Mungee. 2022. "Percutaneous Coronary Intervention." *StatPearls*.
- Akhavanpoor, Mohammadreza et al. 2018. "Adventitial Tertiary Lymphoid Organ Classification in Human Atherosclerosis." *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 32: 8–14.
- Alboaklah, Hadeel K.M., and David S. Leake. 2020. "Effect of Vitamin E on Low Density Lipoprotein Oxidation at Lysosomal PH." *Free Radic Res* 54(8–9): 574–84.
- Alfieri, Maria Laura et al. 2018. "The Chemistry of Polydopamine Film Formation: The Amine-Quinone Interplay." *Biomimetics (Basel, Switzerland)* 3(3).
- Alm, Per A. 2021. "The Dopamine System and Automatization of Movement Sequences: A Review With Relevance for Speech and Stuttering." *Frontiers in Human Neuroscience* 15: 663.
- Ang, Hui Ying et al. 2017. "Bioresorbable Stents: Current and Upcoming Bioresorbable Technologies." *International Journal of Cardiology* 228: 931–39.
- Aranaz, Inmaculada et al. 2021. "Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications." *Polymers* 13(19).
- Azuma, Kazuo et al. 2015. "Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides." *Journal of Functional Biomaterials* 6(1): 33–49.
- Baek, Seung Woon et al. 2022. "Reduced Restenosis and Enhanced Re-Endothelialization of Functional Biodegradable Vascular Scaffolds by Everolimus and Magnesium Hydroxide." *Biomaterials Research* 26(1): 1–17.
- Ball, Vincent, Doriane Del Frari, Valérie Toniazzo, and David Ruch. 2012. "Kinetics of Polydopamine Film Deposition as a Function of PH and Dopamine Concentration: Insights in the Polydopamine Deposition Mechanism." *Journal of Colloid and Interface Science* 386(1): 366–72.
- Beldowski, Piotr et al. 2022. "Effect of Chitosan Deacetylation on Its Affinity to Type III Collagen: A Molecular Dynamics Study." *Materials* 15(2): 463.
- Bian, Qihao, Junying Chen, Yajun Weng, and Suiyan Li. 2022. "Endothelialization Strategy of Implant Materials Surface: The Newest Research in Recent 5 Years." *Journal of applied biomaterials & functional materials* 20.
- Bobryshev, Yuri V. et al. 2016. "Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis." *BioMed Research International* 2016.
- Bock, Nathalie et al. 2020. "Polydopamine Coating of Uncrosslinked Chitosan as an Acellular Scaffold for Full Thickness Skin Grafts." *Carbohydrate Polymers* 245: 116524.
- Briukhovetska, Daria et al. 2021. "Interleukins in Cancer: From Biology to Therapy." *Nature Reviews Cancer* 2021 21:8 21(8): 481–99.
- Buccheri, Dario, Davide Piraino, Giuseppe Andolina, and Bernardo Cortese. 2016. "Understanding and Managing In-Stent Restenosis: A Review of Clinical Data, from Pathogenesis to Treatment." *Journal of Thoracic Disease* 8(10): E1150.

- Buccheri, Sergio, and Davide Capodanno. 2019. "Bioabsorbable Stents: Only Bad News?" *European Heart Journal Supplements* 21(Supplement_B): B28–30.
- Calderón-Sánchez, Eva M. et al. 2020. "Role of Orai1 and L-Type CaV1.2 Channels in Endothelin-1 Mediated Coronary Contraction under Ischemia and Reperfusion." *Cell Calcium* 86: 102157.
- Cancel, Limary M., and John M. Tarbell. 2010. "The Role of Apoptosis in LDL Transport through Cultured Endothelial Cell Monolayers." *Atherosclerosis* 208(2): 335.
- Cao, Genmao et al. 2022. "How Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Switching Contributes to Vascular Disease." *Cell Communication and Signaling* 2022 20:1 20(1): 1–22.
- Catar, Rusan et al. 2022. "Native and Oxidized Low-Density Lipoproteins Increase the Expression of the LDL Receptor and the LOX-1 Receptor, Respectively, in Arterial Endothelial Cells." *Cells* 11(2).
- Cattaruzza, Marco et al. 2003. "Interleukin-10 Induction of Nitric-Oxide Synthase Expression Attenuates CD40-Mediated Interleukin-12 Synthesis in Human Endothelial Cells." *The Journal of biological chemistry* 278(39): 37874–80.
- Cerutti, Camilla, and Anne J. Ridley. 2017. "Endothelial Cell-Cell Adhesion and Signaling." *Experimental Cell Research* 358(1): 31.
- Chandramohan, V., John H. Sampson, I. H. Pastan, and D. D. Bigner. 2017. "Immunotoxin Therapy for Brain Tumors." *Translational Immunotherapy of Brain Tumors*: 227–60.
- Chang, Hao et al. 2017. "Stiffness of Polyelectrolyte Multilayer Film Influences Endothelial Function of Endothelial Cell Monolayer." *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 149: 379–87.
- Chen, Jialong et al. 2019. "Anti-CD34-Grafted Magnetic Nanoparticles Promote Endothelial Cell Adhesion on an Iron Stent for Rapid Endothelialization." *ACS Omega* 4(21): 19469.
- Chen, Shusheng, Yewen Cao, and Jiachun Feng. 2014. "Polydopamine as an Efficient and Robust Platform to Functionalize Carbon Fiber for High-Performance Polymer Composites." *ACS applied materials & interfaces* 6(1): 349–56.
- Chistiakov, D. A., A. N. Orekhov, and Y. V. Bobryshev. 2017. "Effects of Shear Stress on Endothelial Cells: Go with the Flow." *Acta Physiologica* 219(2): 382–408.
- Chistiakov, Dmitry A. et al. 2017. "Mechanisms of Foam Cell Formation in Atherosclerosis." *Journal of Molecular Medicine* 95(11): 1153–65.
- Circu, Monica, and Claudiu Filip. 2018. "Closer to the Polydopamine Structure: New Insights from a Combined ¹³C/¹H/²H Solid-State NMR Study on Deuterated Samples." *Polymer Chemistry* 9(24): 3379–87.
- Clare, Jessie et al. 2022. "The Mechanisms of Restenosis and Relevance to Next Generation Stent Design." *Biomolecules* 12(3): 430.
- Cornelissen, Anne, and Felix Jan Vogt. 2019. "The Effects of Stenting on Coronary Endothelium from a Molecular Biological View: Time for Improvement?" *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23(1): 39.
- Cyboran-Mikolajczyk, Sylwia et al. 2021. "Impact of Liposomal Drug Formulations on the RBCs Shape, Transmembrane Potential, and Mechanical Properties." *International journal of molecular sciences* 22(4): 1–12.
- Danielewska, Monika E. et al. 2022. "Indirectly Assessing Changes in Corneal Properties with OCT Speckle after Crosslinking in Porcine Eyes." *Experimental eye research* 219.
- Dirschinger, Josef et al. 1999. "Influence of Balloon Pressure During Stent Placement in Native Coronary Arteries on Early and Late Angiographic and Clinical Outcome." *Circulation* 100(9): 918–23.
- Dugina, Vera B., Galina S. Shagieva, Anton S. Shakhov, and Irina B. Alieva. 2021. "The Cytoplasmic Actins in the Regulation of Endothelial Cell Function." *International Journal of Molecular Sciences* 22(15): 7836.
- Dunn, Jessilyn, Rachel Simmons, Salim Thabet, and Hanjoong Jo. 2015. "The Role of Epigenetics in the Endothelial Cell Shear Stress Response and Atherosclerosis." *The international journal of biochemistry & cell biology* 67: 167–76.
- Durham, Andrew L. et al. 2018. "Role of Smooth Muscle Cells in Vascular Calcification: Implications in Atherosclerosis and Arterial Stiffness." *Cardiovascular Research* 114(4): 590.
- Farahi, Lia, Satyesh K. Sinha, and Aldons J. Lusis. 2021. "Roles of Macrophages in Atherogenesis." *Frontiers in Pharmacology* 12: 3336.
- Fernandes, Denise C., Thaís L.S. Araujo, Francisco R.M. Laurindo, and Leonardo Y. Tanaka. 2018. "Hemodynamic Forces in the Endothelium: From Mechanotransduction to Implications on Development of Atherosclerosis." *Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes*: 85–95.

- Filippi, Marie Dominique. 2016. "Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route." *Advances in immunology* 129: 25–53.
- Fischer, Marcel J.E. 2010. "Amine Coupling through EDC/NHS: A Practical Approach." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 627: 55–73.
- Foerster, A. et al. 2016. "Stainless Steel Surface Functionalization for Immobilization of Antibody Fragments for Cardiovascular Applications." *Journal of biomedical materials research. Part A* 104(4): 821–32.
- Gao, Lili et al. 2018. "Dual-Inflammatory Cytokines on TiO₂ Nanotube-Coated Surfaces Used for Regulating Macrophage Polarization in Bone Implants." *Journal of biomedical materials research. Part A* 106(7): 1878–86.
- Genovesi, Simonetta et al. 2022. "Relationship between Endothelin and Nitric Oxide Pathways in the Onset and Maintenance of Hypertension in Children and Adolescents." *Pediatric Nephrology* 37(3): 537–45.
- Ghaffari, Siavash et al. 2021. "Endothelial HMGB1 Is a Critical Regulator of LDL Transcytosis via an SREBP2-SR-BI Axis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 41(1): 200–216.
- Giannoni, E. et al. 2008. "Redox Regulation of Anoikis: Reactive Oxygen Species as Essential Mediators of Cell Survival." *Cell Death & Differentiation* 2008 15:5 15(5): 867–78.
- Golshiri, Keivan et al. 2020. "The Importance of the Nitric Oxide-CGMP Pathway in Age-Related Cardiovascular Disease: Focus on Phosphodiesterase-1 and Soluble Guanylate Cyclase." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 127(2): 67–80.
- Gorabi, Armita Mahdavi et al. 2019. "Statin-Induced Nitric Oxide Signaling: Mechanisms and Therapeutic Implications." *Journal of Clinical Medicine* 8(12): 2051.
- Hachim, Daniel, Samuel T. LoPresti, Cecelia C. Yates, and Bryan N. Brown. 2017. "Shifts in Macrophage Phenotype at the Bio-material Interface via IL-4 Eluting Coatings Are Associated with Improved Implant Integration." *Biomaterials* 112: 95–107.
- Han, Congzhen et al. 2019. "Nature-Inspired Extracellular Matrix Coating Produced by Micro-Patterned Smooth Muscle and Endothelial Cells Endows Cardiovascular Materials with Better Biocompatibility." *Biomaterials Science* 7(7): 2686–2701.
- Han, Xuwen, Feng Tang, and Zhaoxia Jin. 2018. "Free-Standing Polydopamine Films Generated in the Presence of Different Metallic Ions: The Comparison of Reaction Process and Film Properties." *RSC Advances* 8(33): 18347–54.
- Hedrick, Catherine C. 2015. "Lymphocytes in Atherosclerosis." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35(2): 253.
- Hertault, Adrien et al. 2021. "In Vivo Evaluation of a Pro-Healing Polydopamine Coated Stent through an in-Stent Restenosis Rat Model." *Biomaterials Science* 9(1): 212–20.
- Higashi, Yukihito. 2022. "Roles of Oxidative Stress and Inflammation in Vascular Endothelial Dysfunction-Related Disease." *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11(10).
- Huang, Chun Hsun et al. 2018. "Spilanthol Inhibits TNF- α -Induced ICAM-1 Expression and pro-Inflammatory Responses by Inducing Heme Oxygenase-1 Expression and Suppressing PJNK in HaCaT Keratinocytes." *Molecular Medicine Reports* 18(3): 2987–94.
- "IL4 - Interleukin-4 - Homo Sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt." <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05112/entry> (June 10, 2023).
- "IL10 - Interleukin-10 - Homo Sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt." <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P22301/entry> (June 10, 2023).
- Jenei, Csaba et al. 2016. "Wall Shear Stress in the Development of In-Stent Restenosis Revisited. A Critical Review of Clinical Data on Shear Stress after Intracoronary Stent Implantation." *Cardiology journal* 23(4): 365–73.
- Jhundoo, Henusha D. et al. 2020. "Anti-Inflammatory Activity of Chitosan and 5-Amino Salicylic Acid Combinations in Experimental Colitis." *Pharmaceutics* 12(11): 1–16.
- Jia, Guanghong, William Durante, and James R. Sowers. 2016. "Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors: A Potential Therapeutic Target for Vascular Dysfunction in Obesity and Insulin Resistance." *Diabetes* 65(8): 2118–20.
- Jiang, Hui et al. 2022. "Mechanisms of Oxidized LDL-Mediated Endothelial Dysfunction and Its Consequences for the Development of Atherosclerosis." *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9: 1442.
- Jin, Anting, Yitong Wang, Kaili Lin, and Lingyong Jiang. 2020. "Nanoparticles Modified by Polydopamine: Working as 'Drug' Carriers." *Bioactive materials* 5(3): 522–41.

- Jung, Friedrich, Michael Raghunath, Anna Blocki, and Tommaso Gori. 2022. "Restenosis after Coronary Stent Implantation: Cellular Mechanisms and Potential of Endothelial Progenitor Cells (A Short Guide for the Interventional Cardiologist)." *Cells* 11(13): 2094.
- Kane, Sheryl R., Paul D. Ashby, and Lisa A. Pruitt. 2009. "ATR-FTIR as a Thickness Measurement Technique for Hydrated Polymer-on-Polymer Coatings." *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 91(2): 613–20.
- Kang, Hongyan et al. 2019. "Interaction of Arterial Proteoglycans with Low Density Lipoproteins (LDLs): From Theory to Promising Therapeutic Approaches." *Medicine in Novel Technology and Devices* 3: 100016.
- Kang, In Gu et al. 2020. "Bioactive and Mechanically Stable Hydroxyapatite Patterning for Rapid Endothelialization of Artificial Vascular Graft." *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 106.
- Karthika, C. L. et al. 2021. "Hemodynamics Mediated Epigenetic Regulators in the Pathogenesis of Vascular Diseases." *Molecular and cellular biochemistry* 476(1): 125–43.
- Ke, Cai Ling, Fu Sheng Deng, Chih Yu Chuang, and Ching Hsuan Lin. 2021. "Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan." *Polymers* 13(6): 904.
- Khire, Tejas S. et al. 2020. "Microvascular Mimetics for the Study of Leukocyte–Endothelial Interactions." *Cellular and Molecular Bioengineering* 13(2): 125–39.
- Klein, Marianne O. et al. 2019. "Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases." *Cellular and molecular neurobiology* 39(1): 31–59.
- Kong, Jilie, and Shaoning Yu. 2007. "Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures." *Acta biochimica et biophysica Sinica* 39(8): 549–59.
- Korei, Nima, Atefeh Solouk, Masoumeh Haghbin Nazarpak, and Alireza Nouri. 2022. "A Review on Design Characteristics and Fabrication Methods of Metallic Cardiovascular Stents." *Materials Today Communications* 31: 103467.
- Koskinas, Konstantinos C., Yiannis S. Chatzizisis, Antonios P. Antoniadis, and George D. Giannoglou. 2012. "Role of Endothelial Shear Stress in Stent Restenosis and Thrombosis: Pathophysiologic Mechanisms and Implications for Clinical Translation." *Journal of the American College of Cardiology* 59(15): 1337–49.
- Kostov, Krasimir, and Jaetaek Kim. 2021. "The Causal Relationship between Endothelin-1 and Hypertension: Focusing on Endothelial Dysfunction, Arterial Stiffness, Vascular Remodeling, and Blood Pressure Regulation." *Life* 11(9): 986.
- Krüger-Genge, Anne, Anna Blocki, Ralf Peter Franke, and Friedrich Jung. 2019. "Vascular Endothelial Cell Biology: An Update." *International Journal of Molecular Sciences* 20(18).
- Kubo, Terufumi, Hideaki Morita, Kazunari Sugita, and Cezmi A. Akdis. 2017. "Introduction to Mechanisms of Allergic Diseases." *Middleton's Allergy Essentials: First Edition*: 1–27.
- Kyaw, Tin et al. 2017. "Cytotoxic Lymphocytes and Atherosclerosis: Significance, Mechanisms and Therapeutic Challenges." *British Journal of Pharmacology* 174(22): 3956.
- Lee, Haeshin, Junsung Rho, and Phillip B. Messersmith. 2009. "Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings." *Advanced Materials* 21(4): 431–34.
- Lee, Sang Jin et al. 2019. "Vascular Endothelial Growth Factor Immobilized on Mussel-Inspired Three-Dimensional Bilayered Scaffold for Artificial Vascular Graft Application: In Vitro and in Vivo Evaluations." *Journal of colloid and interface science* 537: 333–44.
- Li, Mengting et al. 2018. "Controllable Release of Interleukin-4 in Double-Layer Sol–Gel Coatings on TiO₂ Nanotubes for Modulating Macrophage Polarization." *Biomedical Materials* 13(4): 045008.
- Li, Yan et al. 2015. "Plasma von Willebrand Factor Level Is Transiently Elevated in a Rat Model of Acute Myocardial Infarction." *Experimental and Therapeutic Medicine* 10(5): 1743.
- Li, Yiting et al. 2019. "Alginate/Chitosan Multilayer Films Coated on IL-4-Loaded TiO₂ Nanotubes for Modulation of Macrophage Phenotype." *Article in International Journal of Biological Macromolecules*.
- Libby, Peter, Paul M. Ridker, and Göran K. Hansson. 2011. "Progress and Challenges in Translating the Biology of Atherosclerosis." *Nature* 473(7347): 317–25.

- Liebscher, Jürgen. 2019. "Chemistry of Polydopamine – Scope, Variation, and Limitation." *European Journal of Organic Chemistry* 2019(31–32): 4976–94.
- Liu, Mingjun, and Delphine Gomez. 2019. "Smooth Muscle Cell Phenotypic Diversity." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39(9): 1715–23.
- Liu, Tao et al. 2014. "Endothelialization of Implanted Cardiovascular Biomaterial Surfaces: The Development from in Vitro to in Vivo." *Journal of biomedical materials research. Part A* 102(10): 3754–72.
- Looser, Patrick M., Luke K. Kim, and Dmitriy N. Feldman. 2016. "In-Stent Restenosis: Pathophysiology and Treatment." *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 18(2).
- Luchetti, Francesca et al. 2021. "LDL Receptors, Caveolae and Cholesterol in Endothelial Dysfunction: OxLDLs Accomplices or Victims?" *British journal of pharmacology* 178(16): 3104–14.
- Ma, Shelby D., Marion Mussbacher, and Elena V. Galkina. 2021. "Functional Role of B Cells in Atherosclerosis." *Cells* 10(2): 1–29.
- Mak, Tak W., and Mary E. Saunders. 2006. "Cytokines and Cytokine Receptors." *The Immune Response*: 463–516.
- Makó, Veronika et al. 2010. "Proinflammatory Activation Pattern of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS." *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77(10): 962–70.
- Malik, Talia F., and Vijai S. Tivakaran. 2023. "Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty." *StatPearls*.
- Marei, Isra, Blerina Ahmetaj-Shala, and Chris R. Triggle. 2022. "Biofunctionalization of Cardiovascular Stents to Induce Endothelialization: Implications for in-Stent Thrombosis in Diabetes." *Frontiers in Pharmacology* 13: 982185.
- Markey, Kate A., Shuichiro Takashima, Alan M. Hanash, and Geoffrey R. Hill. 2019. "Cytokines in GVHD and GVL." *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*: 293–322.
- Massolo, Elisabetta, Margherita Pirola, and Maurizio Benaglia. 2020. "Amide Bond Formation Strategies: Latest Advances on a Dateless Transformation." *European Journal of Organic Chemistry* 2020(30): 4641–51.
- Matsumoto, Takayuki et al. 2015. "Constrictor Prostanoids and Uridine Adenosine Tetraphosphate: Vascular Mediators and Therapeutic Targets in Hypertension and Diabetes." *British Journal of Pharmacology* 172(16): 3980–4001.
- Matsumoto, Takayuki, Rita C. Tostes, and R. Clinton Webb. 2011. "The Role of Uridine Adenosine Tetraphosphate in the Vascular System." *Advances in Pharmacological Sciences* 2011.
- Meiring, Muriel, W. Allers, and E. Le Roux. 2016. "Tissue Factor: A Potent Stimulator of Von Willebrand Factor Synthesis by Human Umbilical Vein Endothelial Cells." *International Journal of Medical Sciences* 13(10): 759–64.
- Meraj, Perwaiz M., Rajiv Jauhar, and Avneet Singh. 2015. "Bare Metal Stents Versus Drug Eluting Stents: Where Do We Stand in 2015?" *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 17(8).
- Milutinović, Aleksandra, Dušan Šuput, and Ruda Zorc-Pleskovič. 2020. "Pathogenesis of Atherosclerosis in the Tunica Intima, Media, and Adventitia of Coronary Arteries: An Updated Review." *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 20(1): 21–30.
- Mineo, Chieko. 2020. "Lipoprotein Receptor Signalling in Atherosclerosis." *Cardiovascular Research* 116(7): 1254–74.
- Mínisy, Islam M., Nehal A. Salahuddin, and Mohamad M. Ayad. 2020. "In Vitro Release Study of Ketoprofen-Loaded Chitosan/Polyaniline Nanofibers." *Polymer Bulletin* 78(10): 5609–22.
- Morello, Silvana, Elisabetta Caiazzo, Roberta Turiello, and Carla Cicala. 2021. "Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39." *Cells* 10(9).
- Morent, R. et al. 2008. "Comparison between XPS- and FTIR-Analysis of Plasma-Treated Polypropylene Film Surfaces." *Surface and Interface Analysis* 40(3–4): 597–600.
- Moriconi, Federico et al. 2012. "The Anti-TNF- α Antibody Infliximab Indirectly Regulates PECAM-1 Gene Expression in Two Models of in Vitro Blood Cell Activation." *Laboratory Investigation* 92(2): 166–77.
- Muller, William A. 2002. "Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response." *Laboratory Investigation* 82(5): 521–34.
- Mundi, Santa et al. 2018. "Endothelial Permeability, LDL Deposition, and Cardiovascular Risk Factors-a Review." *Cardiovascular research* 114(1): 35–52.
- Munje, Rujuta D., Sriram Muthukumar, Badrinath Jagannath, and Shalini Prasad. 2017. "A New Paradigm in Sweat Based Wearable Diagnostics Biosensors Using Room Temperature Ionic Liquids (RTILs)." *Scientific Reports* 7(1): 1–12.

- Napoli, Claudio et al. 2013. "Effects of Nitric Oxide on Cell Proliferation: Novel Insights." *Journal of the American College of Cardiology* 62(2): 89–95.
- Neubauer, Katharina, and Barbara Zieger. 2022. "Endothelial Cells and Coagulation." *Cell and Tissue Research* 387(3): 391–98.
- Nguyen, Huong D., Hanan M. Aljamaei, and Andrew W. Stadnyk. 2021. "The Production and Function of Endogenous Interleukin-10 in Intestinal Epithelial Cells and Gut Homeostasis." *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 12(4): 1343.
- Niccoli, Giampaolo et al. 2008. "Plasma Levels of Thromboxane A2 on Admission Are Associated with No-Reflow after Primary Percutaneous Coronary Intervention." *European Heart Journal* 29(15): 1843–50.
- Okhota, Sergey et al. 2020. "Shear Stress-Induced Activation of von Willebrand Factor and Cardiovascular Pathology." *International Journal of Molecular Sciences* 21(20): 1–18.
- Paszkwowiak, Jacek J., and Alan Dardik. 2003. "Arterial Wall Shear Stress: Observations from the Bench to the Bedside." *Vascular and endovascular surgery* 37(1): 47–57.
- St. Paul, Amanda, Cali B. Corbett, Rachael Okune, and Michael V. Autieri. 2020. "Angiotensin II, Hypercholesterolemia, and Vascular Smooth Muscle Cells: A Perfect Trio for Vascular Pathology." *International Journal of Molecular Sciences* 21(12): 1–16.
- Pleva, Leos, Pavel Kukla, and Ota Hlinomaz. 2018. "Treatment of Coronary In-Stent Restenosis: A Systematic Review." *Journal of Geriatric Cardiology* 15(2): 173–84.
- Poznyak, Anastasia V. et al. 2021. "Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis." *Frontiers in Pharmacology* 11: 2248.
- Pulous, Fadi E., and Brian G. Petrich. 2019. "Integrin-Dependent Regulation of the Endothelial Barrier." *Tissue Barriers* 7(4).
- Qiu, Min et al. 2020. "MicroRNA-150 Deficiency Accelerates Intimal Hyperplasia by Acting as a Novel Regulator of Macrophage Polarization." *Life Sciences* 240: 116985.
- Rasweefali, M. K. et al. 2021. "Consequences of Chemical Deacetylation on Physicochemical, Structural and Functional Characteristics of Chitosan Extracted from Deep-Sea Mud Shrimp." *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2: 100032.
- Rekhi, Umar, Julia E. Piche, Linnet Immaraj, and Maria Febbraio. 2022. "Neointimal Hyperplasia." *Current Opinion in Lipidology* 30(5): 377–82.
- Ren, Zhong Qiao, Ning Liu, and Kan Zhao. 2016. "Micro RNA-19a Suppresses IL-10 in Peripheral B Cells from Patients with Atherosclerosis." *Cytokine* 86: 86–91.
- Sanvictores, Terrence, and Fabiola Farci. 2022. "Biochemistry, Primary Protein Structure." *StatPearls*.
- Sarelo, Przemyslaw et al. 2020. "Antibody CD133 Biofunctionalization of Ammonium Acryloyldimethyltaurate and Vinylpyrrolidone Co-Polymer-Based Coating of the Vascular Implants." *Materials (Basel, Switzerland)* 13(24): 1–13.
- . 2023. "In Vitro Examinations of the Anti-Inflammatory Interleukin Functionalized Polydopamine Based Biomaterial as a Potential Coating for Cardiovascular Stents." *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 43(1): 369–85.
- Sesorova, Irina S. et al. 2022. "Role of Endothelial Regeneration and Overloading of Enterocytes with Lipids in Capturing of Lipoproteins by Basement Membrane of Rat Aortic Endothelium." *Biomedicines* 10(11): 2858.
- Shim, Jae Won et al. 2018. "Hydrophilic Surface Modification of Coronary Stent Using an Atmospheric Pressure Plasma Jet for Endothelialization." *Journal of biomaterials applications* 32(8): 1083–89.
- Shoenfeld, Yehuda. 2017. "The Heart in Rheumatic, Autoimmune and Inflammatory Diseases: Pathophysiology, Clinical Aspects and Therapeutic Approaches, 1st Edition." *The Israel Medical Association journal: IMAJ* 19(6): 395–96.
- Shouval, Dror S. et al. 2014. "Interleukin 10 Receptor Signaling: Master Regulator of Intestinal Mucosal Homeostasis in Mice and Humans." *Advances in Immunology* 122: 177–210.
- Skuratovskaia, Daria et al. 2020. "Tissue-Specific Role of Macrophages in Noninfectious Inflammatory Disorders." *Biomedicines* 8(10): 1–23.
- Sobocinski, Jonathan et al. 2014. "Mussel Inspired Coating of a Biocompatible Cyclodextrin Based Polymer onto CoCr Vascular Stents." *ACS Applied Materials and Interfaces* 6(5): 3575–86.
- Summerhill, Volha I. et al. 2019. "The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis." *International Journal of Molecular Sciences* 20(14).

- Sun, Jinling et al. 2020. "Correlation of Pre-operative Circulating Inflammatory Cytokines with Restenosis and Rapid Angiographic Stenotic Progression Risk in Coronary Artery Disease Patients Underwent Percutaneous Coronary Intervention with Drug-eluting Stents." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 34(3).
- Tan, Jianying et al. 2020. "Heparin/Poly-L-Lysine Nanoplatfrom with Growth Factor Delivery for Surface Modification of Cardiovascular Stents: The Influence of Vascular Endothelial Growth Factor Loading." *Journal of biomedical materials research. Part A* 108(6): 1295–1304.
- Tedesco, Serena et al. 2018. "Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization?" *Frontiers in pharmacology* 9(FEB).
- Tellides, George, and Jordan S. Pober. 2015. "Inflammatory and Immune Responses in the Arterial Media." *Circulation research* 116(2): 312–22.
- Trinh, Kieu The Loan, Nguyen Xuan Thanh Le, and Nae Yoon Lee. 2020. "Chitosan–Polydopamine Hydrogel Complex: A Novel Green Adhesion Agent for Reversibly Bonding Thermoplastic Microdevice and Its Application for Cell-Friendly Microfluidic 3D Cell Culture." *Lab on a Chip* 20(19): 3524–34.
- Tsai, Wei Bor et al. 2014. "Poly(Dopamine) Coating to Biodegradable Polymers for Bone Tissue Engineering." *Journal of biomaterials applications* 28(6): 837–48.
- Tsakiris, Violeta, Christu Tardei, and Florentina Marilena Clicinschi. 2021. "Biodegradable Mg Alloys for Orthopedic Implants – A Review." *Journal of Magnesium and Alloys* 9(6): 1884–1905.
- della Vecchia, Nicola F. et al. 2013. "Building-Block Diversity in Polydopamine Underpins a Multifunctional Eumelanin-Type Platform Tunable Through a Quinone Control Point." *Advanced Functional Materials* 23(10): 1331–40.
- Verma, Suresh K. et al. 2016. "IL-10 Accelerates Re-Endothelialization and Inhibits Post-Injury Intimal Hyperplasia Following Carotid Artery Denudation." *PloS one* 11(1).
- Wang, Di, Zhiyan Wang, Lili Zhang, and Yi Wang. 2017. "Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis." *Mediators of Inflammation* 2017.
- Wang, Weizhong et al. 2019. "Nanofibrous Vascular Scaffold Prepared from Miscible Polymer Blend with Heparin/Stromal Cell-Derived Factor-1 Alpha for Enhancing Anticoagulation and Endothelialization." *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 181: 963–72.
- Wang, Yang, Yun Zhang, Chen Hou, and Mingzhu Liu. 2016. "Mussel-Inspired Synthesis of Magnetic Polydopamine–Chitosan Nanoparticles as Biosorbent for Dyes and Metals Removal." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 61: 292–98.
- Wassif, Heba, and Frederick G.P. Welt. 2023. "Restenosis." *SCAI Interventional Cardiology Board Review: Second Edition*: 10–15.
- Wautier, Jean Luc, and Marie Paule Wautier. 2022. "Vascular Permeability in Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 23(7): 3645.
- Wawrzyńska, Magdalena et al. 2019. "Functionalized CD133 Antibody Coated Stent Surface Simultaneously Promotes EPCs Adhesion and Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation-A Novel Approach to Prevent in-Stent Restenosis." *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 174: 587–97.
- Wei, Hua Xing, Baolong Wang, and Bofeng Li. 2020. "IL-10 and IL-22 in Mucosal Immunity: Driving Protection and Pathology." *Frontiers in Immunology* 11: 1315.
- West-Livingston, Lauren et al. 2020. "Antibody-Conjugated Electrospun Vascular Scaffolds to Enhance In Situ Endothelialization." *ACS applied bio materials* 3(7): 4486–94.
- Wu, Feng et al. 2016. "Multifunctional Coating Based on Hyaluronic Acid and Dopamine Conjugate for Potential Application on Surface Modification of Cardiovascular Implanted Devices." *ACS Applied Materials and Interfaces* 8(1): 109–21.
- Wu, Meng Yu, Chia Jung Li, Ming Feng Hou, and Pei Yi Chu. 2017. "New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis." *International Journal of Molecular Sciences* 18(10).
- Wu, Ming Lun, Mohanchandra K. Panduranga, and Gregory P. Carman. 2018. "Proliferation of Human Aortic Endothelial Cells on Nitinol Thin Films with Varying Hole Sizes." *Biomedical microdevices* 20(2).
- Xu, Yanan et al. 2018. "Polydopamine-Induced Hydroxyapatite Coating Facilitates Hydroxyapatite/Polyamide 66 Implant Osteogenesis: An in Vitro and in Vivo Evaluation." *International Journal of Nanomedicine* 13: 8179.

- Xue, Peng et al. 2017. "Surface Modification of Poly(Dimethylsiloxane) with Polydopamine and Hyaluronic Acid to Enhance Hemocompatibility for Potential Applications in Medical Implants or Devices." *ACS Applied Materials and Interfaces* 9(39): 33632–44.
- Yan, Qin et al. 2015. "EDC/NHS Activation Mechanism of Polymethacrylic Acid: Anhydride versus NHS-Ester." *RSC Advances* 5(86): 69939–47.
- Yang, Feng et al. 2020. "Macrophage-Derived MMP-8 Determines Smooth Muscle Cell Differentiation from Adventitia Stem/Progenitor Cells and Promotes Neointima Hyperplasia." *Cardiovascular Research* 116(1): 211.
- Yang, Xiao, Lian Duan, and Xiaoqi Ran. 2017. "Effect of Polydopamine Coating on Improving Photostability of Polyphenylene Sulfide Fiber." *Polymer Bulletin* 74(3): 641–56.
- Yau, Jonathan W., Hwee Teoh, and Subodh Verma. 2015. "Endothelial Cell Control of Thrombosis." *BMC Cardiovascular Disorders* 15(1).
- Ye, Qian, Feng Zhou, and Weimin Liu. 2011. "Bioinspired Catecholic Chemistry for Surface Modification." *Chemical Society Reviews* 40(7): 4244–58.
- Yu, Han, Lin Xian Cui, Nan Huang, and Zhi Lu Yang. 2019. "Recent Developments in Nitric Oxide-Releasing Biomaterials for Biomedical Applications." *Medical Gas Research* 9(4): 184.
- Yuan, Sarah Y., and Robert R. Rigor. 2010. "The Endothelial Barrier." In *Regulation of Endothelial Barrier Function*, Morgan & Claypool Life Sciences.
- Yuan, Shuaishuai et al. 2014. "Enhanced Biocompatibility of Biostable Poly(Styrene-*b*-Isobutylene-*b*-Styrene) Elastomer via Poly(Dopamine)-Assisted Chitosan/Hyaluronic Acid Immobilization." *RSC Advances* 4(59): 31481–88.
- Zareba, Magdalena et al. 2019. "Mixed-Generation PAMAM G3-G0 Megamer as a Drug Delivery System for Nimesulide: Antitumor Activity of the Conjugate against Human Squamous Carcinoma and Glioblastoma Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 20(20).
- Zhang, Feng et al. 2019. "Mussel-Inspired Dopamine-CuII Coatings for Sustained in Situ Generation of Nitric Oxide for Prevention of Stent Thrombosis and Restenosis." *Biomaterials* 194: 117–29.
- Zhang, Lei et al. 2020. "Oscillating Magnetic Field Regulates Cell Adherence and Endothelialization Based on Magnetic Nanoparticle-Modified Bacterial Cellulose." *ACS applied materials & interfaces* 12(47): 52467–78.
- Zhang, Rendan et al. 2018. "Fufang-Zhenzhu-Tiaozhi Capsule Reduces Restenosis via the Downregulation of NF-KappaB and Inflammatory Factors in Rabbits." *Lipids in Health and Disease* 17(1): 1–9.
- Zhang, Xinbo, and Carlos Fernández-Hernando. 2020. "Transport of Low-Density Lipoproteins (LDL) into the Arterial Wall: Impact in Atherosclerosis." *Current opinion in lipidology* 31(5): 279.
- Zhang, Youzhi et al. 2014. "TNF- α Promotes Early Atherosclerosis by Increasing Transcytosis of LDL across Endothelial Cells: Crosstalk between NF-KB and PPAR- γ ." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 72: 85–94.
- Zhou, Jingwen et al. 2021. "Advances in the Preparation and Assessment of the Biological Activities of Chitosan Oligosaccharides with Different Structural Characteristics." *Food & Function* 12(3): 926–51.
- Zhou, Ke et al. 2021. "Nano-Micrometer Surface Roughness Gradients Reveal Topographical Influences on Differentiating Responses of Vascular Cells on Biodegradable Magnesium." *Bioactive Materials* 6(1): 262–72.
- Zhou, Zhichao et al. 2019. "Uridine Adenosine Tetraphosphate and Purinergic Signaling in Cardiovascular System: An Update." *Pharmacological research* 141: 32.
- Zorc-Pleskovič, Ruda et al. 2018. "Immune Cells and Vasa Vasorum in the Tunica Media of Atherosclerotic Coronary Arteries." *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 18(3): 240.