



České vysoké učení technické v Praze

Fakulta elektrotechnická
Katedra kybernetiky

Příprava uhlíkových nanostruktur pro tkáňové inženýrství

Diplomová práce

Program: Elektrotechnika a informatika
Obor: Biomedicínské inženýrství

Školitel: Prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc.
Konzultant: Ing. Tomáš Hubáček

Autor: Bc. Rezá Khalili



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v příloženém seznamu.

V Praze dne 11. 11. 2011

Khalil
.....
podpis





České vysoké učení technické v Praze
Fakulta elektrotechnická

Katedra kybernetiky

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: Bc. Reza K h a l i l i
Studijní program: Elektrotechnika a informatika (magisterský), strukturovaný
Obor: Biomedicínské inženýrství
Název tématu: Příprava uhlíkových nanostruktur pro tkáňové inženýrství

Pokyny pro vypracování:


1. Seznamte se dostupnou literaturou z daného tématu podle doporučení vedoucího práce.
2. Připravte uhlíkové vrstvy napařováním na polymerní substrát.
3. Stanovte smáčivost připravených uhlíkových vrstev.
4. Změřte plošný elektrický odpor těchto vrstev.
5. Dostupnými metodami stanovte chemické složení vrstev.
6. Studujte interakci buněčných kultur s uhlíkovou vrstvou.
7. Diskutujte získané výsledky s publikovanými údaji.

Seznam odborné literatury:

- [1] Hubáček, T. ; Lyutakov, O.; Rybka, V.; Švorčík, V.: Electrical properties of flash evaporated carbon nanolayers on PTFE, J. Mater. Sci. 45, 279 (2010).
- [2] Švorčík, V.; Hubáček, T.; Slepíčka, P.; Siegel, J.; Kolská, Z.; Bláhová, O.; Macková, A.; Hnatowicz, V.: Characterization of carbon nanolayers flash evaporated on PET and PTFE, Carbon 47, 1770 (2009).
- [3] Robertson, J.: Diamond-like amorphous carbon, Mater. Sci. Eng. R 37, 129 (2002).
- [4] Kubová, O.: Vliv tenkých uhlíkatých vrstev na interakci buněk, disertační práce, VŠCHT Praha, 2006.

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc.

Platnost zadání: do konce zimního semestru 2012/2013


prof. Ing. Vladimír Mařík, DrSc.
vedoucí katedry




prof. Ing. Pavel Ripka, CSc.
děkan

V Praze dne 7. 10. 2011



Rád bych poděkoval několika kolegům za spolupráci na mojí diplomové práci.

- Prof. Ing. Václavu Švorčíkovi, DrSc. za vedení práce, přátelství a vstřícný přístup
- Ing. Tomáši Hubáčkovi za připomínky a pomoc při řešení dílčích problémů
- Ing. Nikole Slepíckové Kasálkové a Ing. Zuzaně Makajové za pomoc s biologickými experimenty
- Ing. Martinu Člupekovi, Ph.D. za provedení Ramanovských měření
- všem kolegům z ÚIPL VŠCHT Praha za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí
- doc. RNDr. Janu Vovsovi, CSc., svému garantovi, za podporu z FEL ČVUT

Ještě mně dovolu poděkovat mé manželce Aleně a celé své rodině za podporu, porozumění a trpělivost při uskutečňování této práce.





Abstract

This work describes physico-chemical properties of the carbon nanostructures created with PVD method on the polymeric substrate and interaction carbon nanostructures with the cell.

Polyethylenetephtalate (PET) and polytetrafluoroethylene (PTFE) were covered with carbon layer prepared by flash evaporation deposition. The layers were evaporated from the distance of 2, 3, 4, 5, 6 and 7 cm.

The physicochemical properties of substrates like the wettability and the surface resistance was studied.

The wettability of prepared layers was characterized using contact angle measurement. The "character" of the prepared carbon layers was studied by Raman spectroscopy. Consequently, the adhesion and the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) were studied *in vitro*. The adhesion and proliferation were studied on PTFE and PET with the carbon layer deposited from the distance of 2, 4 and 6 cm. The study of adhesion was carried out using Burker cell and by microscope cell counting. The study of proliferation was carried out by microscope cell counting and counting using cell viability analyzer Vi-Cell. Viability of the cells was studied by cell viability analyzer Vi-Cell.

The surface wettability is increasing with the presence of carbon deposited on PET, PTFE surface. the sheet resistance of all studied substrates is increasing with distance of deposition. The carbon layers have positive effect on adhesion and proliferation of VSMC cells compared to uncarbonized substrates (PTFE, PET).



Abstrakt

Tato práce se zabývá vlastnostmi uhlíkových vrstev deponovaných na polymerní substráty. Uhlíkové vrstvy byly napařeny na polymerní folie PTFE (polytetrafluorethylen), PET (polyethylen) ze vzdálenosti 2, 3, 4, 5, 6 a 7 cm. Nejprve byly na všech připravených vzorcích zjišťovány fyzikálně-chemické vlastnosti – smáčivost a morfologie povrchu jejich vrstev. Smáčivost povrchu vrstev byla stanovována goniometricky měřením kontaktního úhlu. Charakter připravených uhlíkových vrstev byl studován Ramanovou spektroskopií. Poté byla na vzorcích z PET a PTFE s uhlíkovými vrstvami deponovanými ze vzdálenosti 2, 4 a 6 cm studována adheze a proliferace hladkých svalových buněk (VSMC) *in vitro*. Pro studium adheze byla zvolena Bürkerova komůrka a přímé počítání buněk pod mikroskopem. Ke zjištění proliferace bylo použito přímé počítání buněk pod mikroskopem a počítání pomocí automatického počítače buněk Beckman Vi-Cell. Viabilita buněk byla zjišťována pomocí automatického počítače buněk Beckman Vi-Cell.

Uhlíková vrstva, která je deponována na povrch PET a PTFE, zvyšuje jeho smáčivost. Plošný odpor u všech studovaných substrátů roste s rostoucí vzdáleností vzorku od zdroje uhlíku při depozici. Uhlíková vrstva má amorfnní charakter. Přítomnost uhlíkové vrstvy pozitivně ovlivňuje adhezi i proliferaci VSMC buněk.



Seznam zkratek

DMEM	D ulbeccos M odified E agle M inimum E ssential M edium
FS	F etal S erum albumin
PET	P olyethylene terephthalate
PTFE	P olytetrafluorethylen
PBS	P hosphate B uffered S aline
TCPS	T issue C ulture P olystyrene = tkaňovy polystyren
VSMC	V ascular S mooth M uscle C ell = svalove buňky z aorty potkana



Seznam obrázků

- Obr. 2.1** *Diagram vlivu druhu vazeb mezi atomy na vznik modifikací uhlíku*
- Obr. 2.2** *Stavový diagram systému C-H*
- Obr. 2.3** *Základní depoziční procesy*
- Obr. 2.4** *PVD fyzikální procesy*
- Obr. 2.5** *Trojfázový postup pro dvě různé vrstvy pro zvýšení povrchové aktivity*
- Obr. 2.6** *Kontaktní úhel*
- Obr. 2.7** *Interakce buňky s povrchem*
- Obr. 2.8** *Biologická membrána*
- Obr. 2.9** *Vazby proteinů na membránové lipidy*
- Obr. 2.10** *Mezibuněčná spojení*
- Obr. 2.11** *Schéma buněčného cyklu eukaryotické buňky*
- Obr. 4.1** *Schéma napařovací komory a přístroj pro napařování*
- Obr. 4.2** *Přístroj a vyhodnocování kontaktního úhlu kapky*
- Obr. 4.3** *Schéma napařovací komory a schéma rozmístění Au kontaktů pro měření plošného odporu*
- Obr. 4.4** *Bürkerovy komůrka*
- Obr. 5.1** *Závislost velikosti kontaktního úhlu na vzdálenosti depozice od zdroje*
- Obr. 5.2** *Závislost velikosti plošného odporu na velikosti vzdálenosti depozice od zdroje*
- Obr. 5.3** *Ramanovo spektrum vzorku napařené uhlíkové vrstvy na Au-Pt substrát ze vzdálenosti 2 cm*
- Obr. 5.4** *Separace pásů z Ramanova spektra vzorku*
- Obr. 5.5** *Závislost počtu adherovaných buněk na studovaných vzorcích stanovení Bürkerovou komůrkou na vzorcích PET a PTFE s uhlíkovou vrstvou napařenou ze 2 , 4 a 6 cm*



Obr. 5.6 *Závislost počtu adherovaných buněk na typu vzorku PET a PTFE s uhlíkovou vrstvou napařenou ze 2 , 4 a 6 cm stanovená metodou zorného pole*

Obr. 5.7 *Závislost počtu adherovaných (1. den) a proliferovaných (3. a 7. den) buněk na typu vzorku PET a PTFE s uhlíkovou vrstvou napařenou ze 2 , 4 a 6 cm stanovená metodou zorného pole*

Obr. 5.8 *Fotografie adherovaných (1. den) a proliferovaných (3. a 7. den) bunek na PET substraty*

Obr. 5.9 *Fotografie adherovaných (1. den) a proliferovaných (3. a 7. den) bunek na PTFE substraty*

Obr. 5.10 *Fotografie adherovaných (1. den) a proliferovaných (3. a 7. den) bunek na TCPS*

Obr. 5.11 *Počet buněk na vzorcích studovaných materiálů stanovených 3. a 7. den kultivace automatickým počítačem buněk Vi-Cell*



Seznam Tabulek

Tab. 2.1 *Požadované vlastnosti polymerních biomateriálů*

Tab. 2.2 *Běžně používané polymery v biomedicině*

Tab. 2.3 *Vlastnosti elementárního uhlíku*

Tab. 2.4 *Srovnání diamantu, grafitu a diamond-like uhlíku (DLC)*

Tab. 4.1 *Použité polymerní materiály*

Tab. 5.1 *Oblasti charakteristické pro různé uhlíkové nanostruktury v Ramanově spektroskopii*

Tab. 5.2 *Oblasti získané nafitováním dat z Ramanova spektra*

Tab. 5.3 *Pozice typických píků v uhlíkovém spektru a poměr I_D/I_G (Sp^3/Sp^2)*



Obsah

1. Úvod.....	3
2. Přehled problematiky	4
2.1 Tkáňové inženýrství	4
2.2 Biomateriály	4
2.2.1 Polymery	5
2.2.2 Uhlíkové vrstvy	7
2.3 Depozice tenké vrstvy	10
2.3.1 Princip metody CVD.....	10
2.3.2 Princip metody PACVD.....	11
2.3.3 Princip metody PVD.....	12
2.4.1 Polarita a smáčivost povrchu.....	16
2.4.2 Morfologie povrchu.....	17
2.4.3 Elektrická vodivost povrchu.....	17
2.4.4 Chemické složení povrchu	18
2.5 Cytologie	18
2.5.1 Struktura a fyziologie buňky	18
2.5.2 Buněčná (plazmatická) membrána a cytoskelet	19
2.5.3 Buněčná adheze	21
2.5.4 Buněčný cyklus a smrt.....	23
2.5.5 Buněčné kultury	24
3. Cíl práce	26
4. Experimentální část	27
4.1. Použité materiály.....	27
4.2 Metody depozice uhlíkových vrstev.....	27
4.3 Použité analytické metody	28
4.3.1 Goniometrie.....	28
4.3.2 Stanovení plošného odporu vrstev.....	29
4.3.3 Ramanova spektroskopie.....	30
4.4 Sterilizace vzorků	30
4.5 Buněčné kultury, media a roztoky.....	31
4.6 Metody pro stanovení adheze a proliferace buněk	31
4.6.1 Kultivace hladkých svalových buněk	31
4.6.2 Příprava vzorků a měření adheze a proliferace	31



5. Výsledky a diskuze	34
5.1 Stanovení smáčivosti pomocí goniometrie.....	34
5.2 Stanovení elektrického odporu deponované vrstvy.....	34
5.3 Stanovení struktury napařovaných uhlíkových vrstev pomocí Ramanovy spektroskopie	35
5.4 Studium adheze a proliferace buněk	37
5.4.1 Stanovení počtu adherovaných buněk na vzorcích pomocí Bürkerovy komůrky	38
5.4.2 Stanovení počtu adherovaných buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu.....	38
5.4.3 Proliferace VSMC buněk na vzorcích	40
5.4.4 Stanovení počtu živých buněk pomocí automatického počítáče buněk Vi-Cell	43
6. Závěr	44
7. Literatura	45



1. Úvod

V dnešní době je v rámci tkáňového inženýrství snaha najít nové možnosti léčby, zlepšení zdraví a kvality života a proto se hledají perspektivní materiály s jejichž pomocí se tyto problémy řeší. Jednou z nejužitečnějších skupin materiálů jsou polymery. Pro použití těchto materiálů je potřeba zlepšovat jejich biokompatibilní vlastnosti. Jedno z možných řešení je povlakování povrchu polymeru uhlíkovou vrstvou, se kterou buňky bez problémů interagují, protože uhlík je součástí živých organismů. Využití takovýchto vrstev závisí na jejich chemickém složení a metodě depozice. Tato práce se zabývá studiem vlastností polymerů s deponovanou uhlíkovou vrstvou a jejich interakcí s buňkami. Pro přehlednost byla literární rešerše rozdělena na několik oblastí a to tkáňové inženýrství, polymerní biomateriály, depozice tenkých vrstev a kultivace buněk.



2. Přehled problematiky

2.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství nebo-li regenerativní medicína je multidisciplinární obor spojující biologii, medicínu a inženýrství. Cílem je vytvořit způsoby jak obnovit, zachovat a zlepšit funkce tkání a orgánů, a tím zlepšit zdraví a kvalitu života pro miliony lidí na celém světě [9, 10].

Tkáňové inženýrství je založeno na několika obecných principech, které logicky rozšiřují konvenční medicínu a chirurgické postupy. Zahrnuje kontrolu a regulaci běžného procesu hojení, zkouší nahradit nebo doplnit buňky v nemocných tkáních, využívá buněčné procesy k řízení účinku léčiv a vytváří nové modely pro studium lidské fyziologie [10, 13].

Tkáňové inženýrství se rozvíjí také pod vlivem nedostatku orgánů vhodných k transplantaci a omezení nežádoucích účinků s ní spojených (reakce štěpu, podávání imunopresiv). Hlavní myšlenkou je vytvoření tkání nebo celých orgánů z buněk na vhodném nosiči. K vytvoření kvalitní tkáňové náhrady je nutné použití vysoce propracovaných biologických přístupů a kultivace buněk na biologicky kompatibilním nosiči [10, 12].

Nosiče mohou mít různé vlastnosti. Používají se materiály přírodní, syntetické nebo materiály kombinované, které spojují výhody jak přírodních (biokompatibilita, biodegradabilita, obsah přirozených vazebných míst pro buňky) tak syntetických materiálů (přesně definovatelné složení a vlastnosti, možnost inkorporace mediátorů proliferace a diferenciací buněk). Nosiče mívají různou podobu (gel, hydrogel, pěna, tkané a netkané textilie).

Výběr buněk je klíčový pro úspěšnou léčbu. Nejvhodnější jsou autologní transplantáty (zdravá tkáň nebo buňky téhož jedince), méně vhodné jsou allogenní (z různých jedinců téhož živočišného druhu), případně xenogenní (dárce je jiného živočišného druhu než příjemce) [10, 11].

2.2 Biomateriály

Biomateriál je neživý materiál používaný v lékařských přístrojích a je určený k interakci s biologickými systémy. Biomateriály jsou syntetické materiály, které se používají k výrobě pomůcek, k nahrazení části živého systému nebo jeho funkce v organismu. Jsou bezpečné, spolehlivé a fyziologicky přijatelné. Při léčbě nemocí nebo úrazů se používá řada pomůcek a materiálů, např. jehly, katétry, zubní výplně apod [11].

Materiály lze klasifikovat na polymery, kovy, keramiku a kompozitní materiály. Úspěšné použití biomateriálů v těle závisí na mnoha faktorech např. vlastnostech daného materiálu,



strukturu a biokompatibilitě, ale i na použité chirurgické technice, stavu pacienta a jeho chování po zákroku [11, 12].

Biokompatibilita vyjadřuje přijetí umělého implantátu okolními tkáněmi a tělem jako celkem. Biokompatibilní materiály by měly být nedráždivé pro okolní struktury, nekancerogenní a neměly by vyvolávat abnormální zánětlivou, alergickou ani imunologickou odpověď [12]. K dalším důležitým vlastnostem nezbytných pro správnou funkci implantátu z biomateriálů patří (1) odpovídající mechanické vlastnosti jako je pevnost, pružnost a stálost vlastností, (2) příslušné optické vlastnosti v případě, že materiál má být použit do očí, kůže nebo zubů a (3) vhodná hustota. Dále je důležité, aby byl implantát sterilizovatelný, měl vhodnou technickou konstrukci a bylo ho možné relativně dlouhodobě uchovávat (viz Tab. 2.1) [1-4, 15, 16].

Tab. 2.1 Požadované vlastnosti polymerních biomateriálů [11]

Vlastnost	Popis
Biokompatibilita	Nekarcinogenní, nepyrogenní, netoxický, nealergizující odezva
Sterilizovatelnost	Autokláv, suché teplo, ethylenoxid, záření
Fyzikální vlastnosti	Pevnost, elasticita, stálost
Zpracovatelnost	Obrábění, tváření, extruze (vytlačování), zvláknění

2.2.1 Polymery

Polymery jsou přírodní nebo syntetické makromolekulární sloučeniny, v nichž se mnohonásobně opakuje základní jednotka (monomer). Počtem monomerů a jejich seřazením do různých struktur lze vytvářet látky různých vlastností [17].

Polymery se dělí na elastomery a plasty. Elastomery jsou vysoce elastické polymery, jež lze za běžných podmínek značně deformovat (převážně vratně) relativně malou silou bez jejich porušení. Příkladem elastomerů jsou kaučuky, z nichž se vyrábí pryž.

Plasty jsou polymery za běžných podmínek většinou tvrdé, při zvýšené teplotě se stávají plastickými a tvarovatelnými [19].

1. Termoplasty – měknou teplem, chladem tuhnou, tato změna je opakovatelně vratná (nylon, polyethylen, polyvinylchlorid, polystyren, teflon)
2. Reaktoplasty (termosety, pryskyřice) – změknou teplem, po ochlazení nevratně ztvrdnou (bakelit, epoxid, polyester, polyurethan)

Polymerní biomateriály

Zvláštní skupinu tvoří “polymerní biomateriály“. Využívání polymerů v medicínských aplikacích je stále častější. Mezi jejich výhody patří vysoká poddajnost při výrobě a formování



do různých tvarů o různých rozměrech, dobré mechanické vlastnosti, chemická stabilita a nízká hmotnost [4].

V současnosti jsou v klinických aplikacích nejrozšířenější používané polymerní nedegradabilní hydrofobní materiály např. silikon, polyethylen, polyuretan, poly (methylmetakrylátu) a poly (ethylen-covinylacetát) . Z biodegradabilních se používají polylaktáty a polyglykoly [17, 19, 20]. K jejich výhodám patří cenová dostupnost, snadná opracovatelnost a dobré mechanické vlastnosti. Vysoká elasticita a nízká specifická hmotnost činí z polymerů atraktivní materiály např. pro transplantace měkkých tkání. V současnosti se polymery v medicínské praxi používají např. pro náhrady cév, srdečních chlopní, panchytických orgánů nebo jako kultivační nosiče (substrát) kožního krytu. Po vyztužení kovovými nebo keramickými vlákny mohou být použity při konstrukci umělých kloubů a kostí. Velmi perspektivní uplatnění biodegradabilních polymerů bude jejich aplikace při transportu léčiv (např. cytostatika, antibiotika, hormony, růstové faktory) v organismu k místu působení. Pro některé aplikace polymerů je nutné změnit jejich biologické vlastnosti, čímž se myslí např. zvýšení adheze, růstu a homogenity buněk kultivovaných na povrchu polymeru. Toho lze dosáhnout fyzikální nebo chemickou modifikací povrchu polymeru [17, 22]. Uhlík je současné době jedním z nejpoužívanějších materiálů vhodných pro depozici na povrchy polymerních substrátů, protože má jednak své zvláštní chemické chování, ale také je součástí biologických systémů. V *Tab. 2.2* jsou shrnuty běžně používané polymery a možnosti jejich použití.

Tab. 2.2 Běžně používané polymery v biomedicině [15]

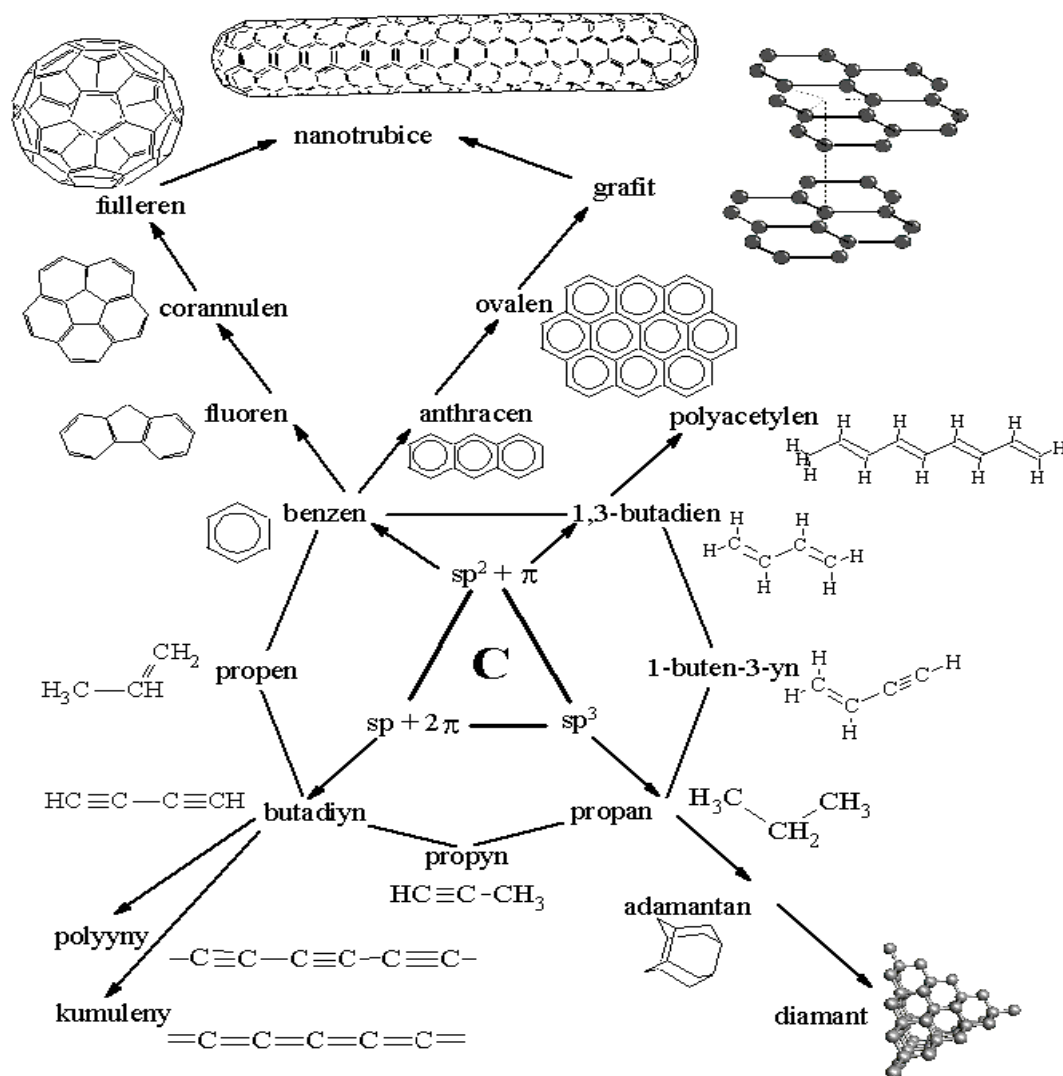
<i>Syntetický polymer</i>	<i>Aplikace</i>
Polvinylchlorid (PVC)	Vaky na krev a roztoky, chirurgické obaly, dialyzační pomůcky
Polyethylen (PE)	Farmaceutické láhve, netkané textilie, katétry, flexibilní zásobníky, orthopedické implantáty, váčky
Polypropylen (PP)	Jednorázové injekční stříkačky, membrány, šicí nitě, netkané textilie, umělé cévy
Polymethymethakrylát (PMMA) a jeho deriváty	Krevní pumpy a rezervoáry, membrány pro krevní dialyzéry, nitrooční čočky, kostní cement
Polystyren (PS)	Láhve pro tkáňové kultury, filtrační zařízení
Polyethylentereftalát (PET)	Implantovatelné spojnice, cévní implantáty, sítě, srdeční pumpy
Polyterafluorethylen (PTFE)	Katétry, cévní implantáty
Polyuretan (PU)	Filmy, hadice, různé součásti
Polyamid (PAD)	Obalové fólie, katétry, zformované součásti



2.2.2 Uhlíkové vrstvy

Uhlík a jeho sloučeniny

Uhlík je velmi důležitý prvek pro živé organismy na Zemi, protože součástí všech organických sloučenin je uhlíkový řetězec. Atom uhlíku má tři různé hybridní orbitály sp^3 , sp^2 a sp , které umožňují různé chemické vazby. Tato rozmanitost umožnila vznik obrovského počtu uhlovodíků. Vazba mezi uhlíky využívající orbitály sp^3 a sp^2 tvoří strukturu anorganických uhlíkatých sloučenin (diamant, grafit). U nedávno objevených sloučen fullerenu C₆₀ a carbynu přepokládáme, že jsou tvořeny vazbami sp [1, 23, 24]. Obrázek 2.1 ukazuje, jak rozmanitost vazeb atomů uhlíku vede k velké skupině organických molekul a anorganických uhlíkových materiálů jako např. diamantu, grafitu a fullerenu, které vyplynuly z rozšíření, aby se stal obří molekuly těchto organických materiálů [25].



Obr. 2.1 Diagram vlivu druhu vazeb mezi atomy na vznik modifikací uhlíku [24,50]



V Tab. 2.3 jsou uvedeny vlastnosti elementárního uhlíku, které se liší svojí strukturou.

Tab. 2.3 Vlastnosti elementárního uhlíku [50]

	diamant	grafit	C60
vzhled krystalu	bezbarvé, silně lámající světlo	sedočerné, vrstevnaté	hnedočerné, lesklé
krystalová soustava	kubická	hexagonální	kubická
tvrdost	nejtvrděší nerost	měkký	měkký
teplota tání	netaje, nad 1500°C přechází na grafit	cca 3700°C	při 600°C sublimuje

Zvláštní forma uhlíku nazvaná “diamantu podobný uhlíku” (dále jen DLC), která se nachází mezi modifikacemi diamantu a grafitu a je odlišná od přírodního diamantu, zejména proto, že je amorfní. V dostatečné míře však zachovává užitečné vlastnosti diamantu, jako jsou vysoká tvrdost, nízký třecí koeficient, vysoká odolnost proti opotřebení a korozi, chemická inertnost, vysoký elektrický odpor, infračervená transparentnost, vysoký index lomu a vynikající hladkost [3, 23].

V přírodě se uhlík vyskytuje v různých alotropických modifikacích. Srovnání typických vlastností DLC s diamantem a grafitem je v Tab. 2.4.

Tab. 2.4 Srovnání diamantu, grafitu a diamond-like uhlíku (DLC) [50]

	diamant	grafit	DLC
složení	čistý uhlík < 1% atomů vodíku	čistý uhlík	do 50% atomů vodíku
mikrostruktura	krystalická	krystalická	amorfní
vazby	jen sp^3	jen sp^2	různý poměr sp^3 , sp^2 , sp
stabilita	stabilní	stabilní	metastabilní
Ramanovo spektrum	ostrý pík 1332 cm^{-1}	ostrý pík 1580 cm^{-1}	široké pásy 1330 a 1550 cm^{-1}
elektrická vodivost	isolant	vodič	Dle chemického složení isolant až nedokonalý vodič

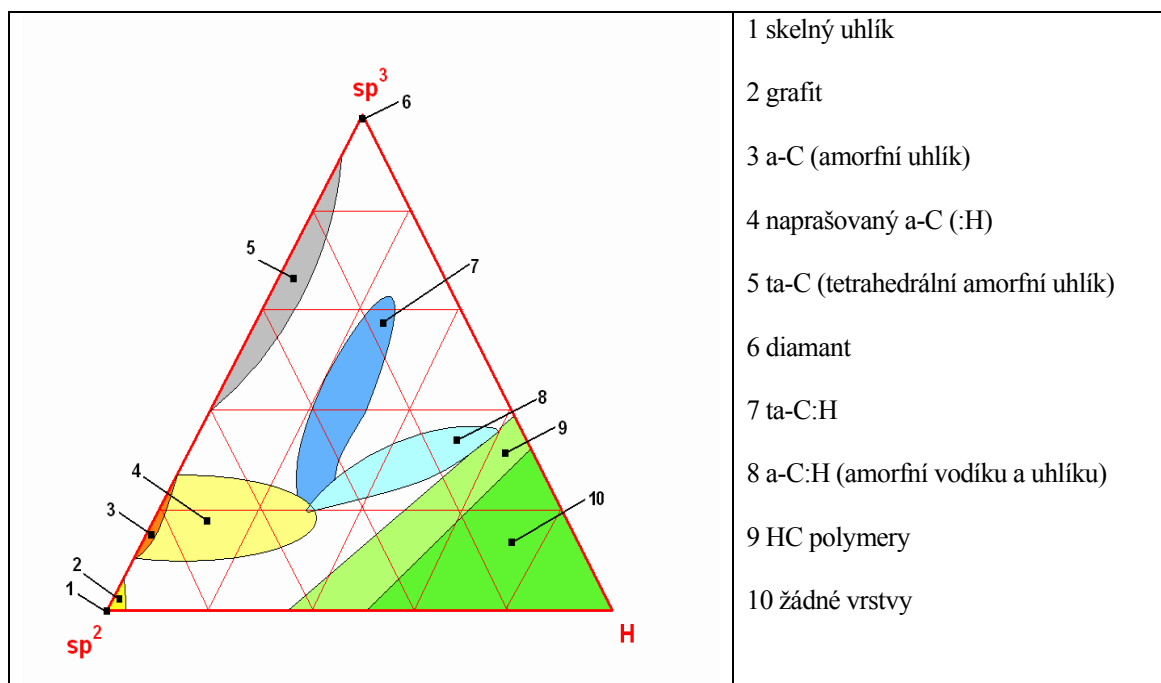
Uhlík a jeho modifikace

Při kontaktu povrchu biomateriálu s krví dochází k aktivaci různých kaskád plazmytických enzymů (např. koagulace, fibrinolýzy i kininů a komplementárního system). Je nutné vyrábět biomateriály s povrchem, který nebude aktivovat enzymy potlačující hemokoagulaci. Interakce biomateriálu s krví začíná adsopcí plazmatických bílkovin na jeho povrchu. DLC vrstvy s povrchovou úpravou (nanesení na různé substraty) se používají jako "biokompatibilní" materiály pro biomedicinske aplikace [1-4].



Zvýšení hemokompatibility závisí na výši poměru sp^2/sp^3 a poměru Ramanovi D-vazby a G-vazbové intenzity (I_D / I_G) na DLC filmech. DLC je skupina materiálů, která ve své struktuře obsahuje široké spektrum atomových vazeb, ježhož vlastnosti jsou závislé na způsobu přípravy. Všechny tyto vlastnosti také odpovídají kritériím pro biomateriály vhodné pro použití v ortopedii, kardiologii, zubním lékařství nebo pro kontaktní čočky. DLC filmy obsahují směs sp^3 a sp^2 uhlíkových vazeb, ve kterých je uloženo velké množství energie. DLC filmy se vyrábějí různými metodami za použití iontového svazku, radiofrekvenční plazmy, chemické depozice z plynné fáze, filtrace na katodickém oblouku ve vakuu, iontového pokovování, implantace a depozice iontů ponořením do plazmy, magnetronového naprašování, iontového naprašování, pulzní laserové depozice a ukládání množstvím vybraných iontových svazků [1-4].

Obrázek 2.2 ukazuje, stavový diagram systému C-H v amorfním stavu objevený Jakobem a Mollerem. Je patrné, že filmy DLC obsahují 3 fáze. Hybridní C (sp^3 a sp^2) a H atomy.



Obr. 2.2 Stavový diagram systému C-H [1]

Tento diagram tvoří tři fáze. V pravém spodním rohu je limitující část oblasti tvorby polyethylenu $-(CH_2)_n-$. Depoziční metody byly vyvíjeny tak, aby byl obsah sp^3 co nejvyšší. Naprašováním můžeme zvýšit poměr sp^3/sp^2 [1-4].

Pro depozici uhlíku existuje mnoho metod, kterými lze připravovat uhlíkové vrstvy s různými vlastnostmi. Uhlíkaté materiály jsou známy svou vysokou biokompatibilitou, jež byla ověřena v podmínkách *in vitro* stejně jako *in vivo*. Jsou proto studovány možnosti zvýšení biokompatibility polymerů zvyšováním obsahu uhlíku v jejich povrchové vrstvě. Je využíváno

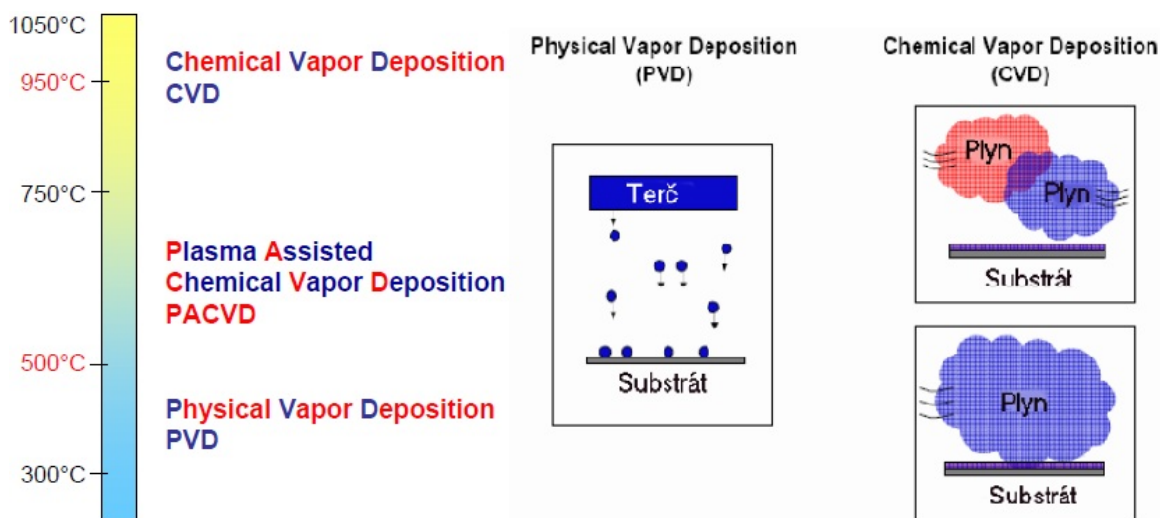


např. depozice uhlíkových vrstev na povrchu polymerů, dopování polymerů sazelem nebo iontové implantace. Ve všech uvedených případech bylo prokázáno zlepšení adheze a růstu buněk [18].

2.3 Depozice tenké vrstvy

Pro vytváření tenkých vrstev bylo nutné vyvinout více metod, které lze dělit do třech základních skupin (viz. Obr. 2.3) [28-30]:

- 1) metody chemické (CVD - Chemical Vapour Deposition)
- 2) metody fyzikálně chemické (PACVD - Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition)
- 3) metody fyzikální (PVD - Physical Vapour Deposition)



Obr. 2.3 Základní depoziční procesy [32]

2.3.1 Princip metody CVD

Metody chemické (CVD) se řadí mezi nejstarší a nejvíce propracované metody. Chemická metoda depozice vrstev CVD je syntetický proces, který využívá pro depozici směs chemicky reaktivních plynů (např. CH_4 , C_2H_2 , apod.) zahřátou na poměrně vysokou teplotu 900 – 1100°C. Reakční složky jsou přiváděny v plynné fázi a vrstva vzniká na povrchu substrátu heterogenní reakcí. Produktem je pevný film na povrchu substrátu. Koncem šedesátých let začala být metoda CVD používána v průmyslu, zvláště pro povlakování řezných břitových destiček a nástrojů ze slinitých karbidů.



Depoziční zařízení vhodné pro vytváření tenkých vrstev metodou CVD se skládá z šesti základních částí: generátoru, systému míchání plynů, depoziční nádoby, obvodu ohřevu, čerpacího systému a systému regulace a řízení depozičního procesu.

V podstatě je možné do depoziční aparatury napouštět libovolnou kombinaci plynů. Tato metoda má řadu výhod jako je vytvoření vrstev s vysokou teplotní stabilitou, možnost vytvářet složité vrstvy a to nejen nitridů kovů (Al_2O_3 , uhlíkové kluzné vrstvy, diamantové vrstvy), vysoká adheze vrstev, odolnost proti opotřebení a rovnoměrná tloušťka i u tvarově složitých nástrojů a předmětů. [30-32]

Použití technologie CVD je omezeno použitím vysoké teploty depozičního procesu, která může vést k degradaci základního materiálu. Nevýhodou může být vysoká energetická náročnost a dlouhý pracovní proces, proto byly hledány nové metody depozice vrstev [3, 30]. Existuje několik způsobů chemického nanášení. Chemické nanášení při atmosférickém tlaku (APCVD), nízkotlaké chemické nanášení (LPCVD), chemické nanášení s obohacenou plasmou (PECVD) a laserem obohacené chemické nanášení (LECVD).

Všechny tyto procesy mají společné základní fáze postupu při vytváření vrstvy, které jsou následující [32, 43]:

- 1) Dochází ke konvenčnímu a difuznímu přenosu reaktantů z plynu do reakčního prostoru
- 2) Probíhá chemická reakce v plynné fázi k vytvoření nových reaktivních druhů a vedlejších produktů
- 3) Přenášení původních reaktantů a jejich produktů na povrch substrátu
- 4) Adsorbce (chemická a fyzická) a difuze obou skupin prvků na povrchu substrátu
- 5) Heterogenní reakce katalyzovaná povrchem a vedoucí k vytvoření vrstvy
- 6) Desorbce těkavých vedlejších produktů při povrchových reakcích
- 7) Konvekční a difuzní přenos vedlejších produktů vzniklých při reakci pryč z reakční oblasti.

2.3.2 Princip metody PACVD

Metody fyzikálně chemické (PACVD) jsou nejnověji používané metody depozice tenkých vrstev. Začaly se používat v 80. letech dvacátého století ve strojním průmyslu.

Tyto metody vytváří deponované tenké strukturované vrstvy při chemické reakci v plazmatu (v ionizovaném prostředí) za významně nižší teploty než CVD, s vyšší přesností depozice a jsou použitelné při nanášení tenkých vrstev i na nerovné povrchy.

Principem jsou plazmochemické reakce probíhající ve výboji hořícího v plynné fázi a vytvářejí na povrchu substrátu charakteristickou vrstvu určitého složení. Při kontaktu



plazmatu s povrchem předmětu dochází k přenosu části energie, a tím ke značnému zvýšení jeho reaktivity, která umožní navázat molekuly z pracovní směsi na povrch předmětu [28].

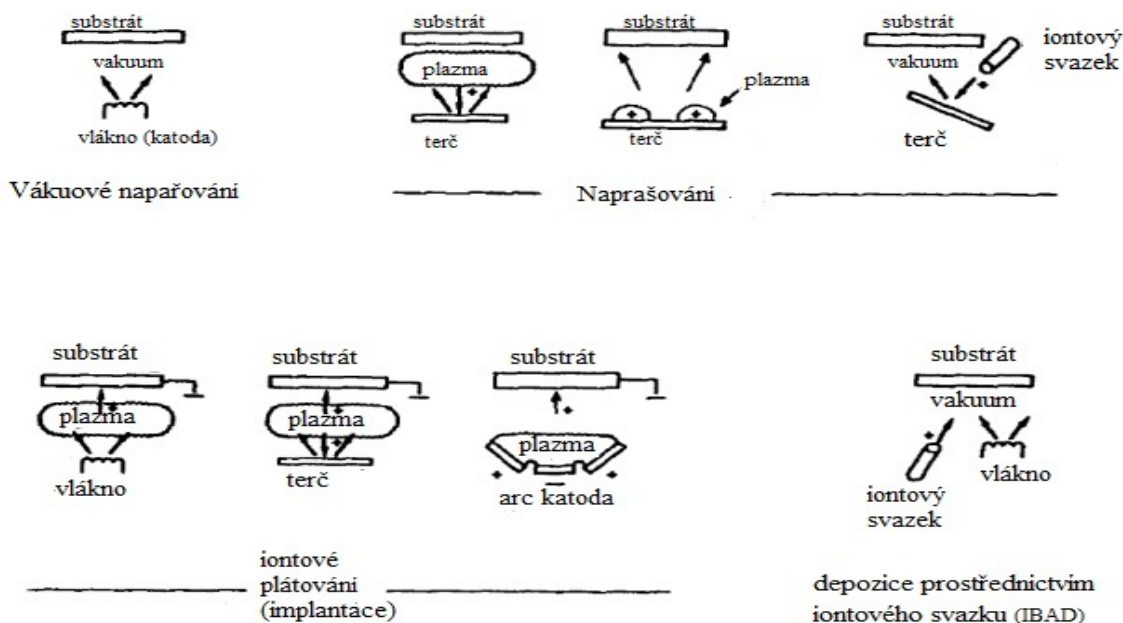
Vznik a vlastnosti tenké vrstvy ovlivňuje jak reaktivita povrchu předmětu při působení plazmového výboje, tak i složení pracovního plynu, prekurzorů a nastavení depozičních podmínek. Reprodukovatelnost technologických procesů je závislá na přesné regulaci a kontrole velkého množství parametrů (pracovní plyn, prekurzor, příměsi, průtoky, rychlost depozice, výška, výkon, atd).

Rozvoj technologie depozice tenkých vrstev souvisí s experimentálním výzkumem fyzikálně chemické podstaty plazmatických procesů, která není úplně objasněná [8, 28].

2.3.3 Princip metody PVD

Metody fyzikální (PVD) umožňují vytváření tenkých vrstev na materiálech, u kterých by během procesu depozice hrozila tepelná degradace např. předměty z rychlořezné oceli, z hliníku, plastu včetně velmi tenkých, několik mikrometrů silných fólií z PP, PE. PVD procesy probíhají v prostředí vysokého vakua při teplotách mezi 150°C – 500°C. Skládají se ze tří fází [30]: (i) převedení nanášeného materiálu do plynné fáze, (ii) transport par ze zdroje k substrátu a (iii) vytváření vrstvy na povrchu substrátu [29].

Mezi základní PVD fyzikální metody patří napařování a napařování, které se dále dělí na DC, AC, reaktivní, magnetronové napařování a iontové plátování. Existuje několik dalších hybridních modifikací těchto dvou základních metod, ale výše zmíněné patří k nejrozšířenějším. (viz Obr. 2.4):



Obr. 2.4 PVD fyzikální procesy [29]



Vakuové napařování

Vakuové napařování je nejjednodušší a nejrozšířenější technologií nanášení tenkých vrstev, lze je použít jak pro kovové tak i nekovové materiály. V komoře vakuové napařovačky zahříváme napařovaný materiál, až se z něho začnou uvolňovat částice a utvoří se rovnovážný stav tenze jejich nasycených par. Toto zahřívání vedoucí k vypařování může být zajištěno odporovým ohřevem, iontovým svazkem, vysokofrekvenčním ohřevem, elektronovým paprskem a pulsní (Flash) metodou, kdy se vypařovaná látka rovnoměrně sype ve formě jemných zrníček na vypařovací zdroj, který má vysokou teplotu a z něhož se v těchto malých množstvích kvantitativně vypaří daná látka [38].

Tím jsou vytvořeny podmínky pro přenos materiálu z místa o vyšší teplotě tzv. výparníku do místa s nižší teplotou tj. na povrch, na kterém kondenzuje tenká vrstva. Celý proces probíhá ve vakuu 10^{-4} - 10^{-6} Pa z důvodu zvětšení střední volné dráhy molekul nanášeného materiálu. Tepelná energie se šíří ve vakuu daleko pomaleji, a proto je možné nanášet tenké vrstvy i na termolabilní materiály. Nanesené vrstvy obsahují množství strukturních nehomogenit a defektů, proto zde mohou probíhat děje směřující k dosažení termodynamické rovnováhy systému. To lze urychlit preventivním „zestárnutím“ vrstvy za zvýšené teploty [38].

Naprašování

Naprašování je další fyzikální metodou umožňující vytváření tenkých vrstev. Ve vakuu jsou bombardováním ionty s vysokou energií z terče nanášené látky vytrhávány atomy, molekuly i shluky molekul. Zdrojem iontů je pracovní plyn např. helium, neon, argon, xenon. Tyto ionty jsou elektricky urychlovány na požadovanou energii. Naprašování dělíme na 4 hlavní metody DC, AC, reaktivní a magnetronové naprašování [3, 29].

DC Naprašování

DC naprašování bývá také často nazýváno jako diodové nebo katodové naprašování, při kterém je na systém dvou elektrod přiváděno stejnosměrné napětí. Na katodu dopadají ionty, které z ní vyrážejí elektrony, které se pak pohybují směrem k anodě a při tom ionizují atomy pracovního plynu. V praxi jsou pak stejnosměrné diody omezeny buď vysokým napětím a nízkým iontovým proudem nebo pracovním tlakem, který je příliš vysoký na to, aby se depozice uskutečnila rychleji. Toto lze řešit zvýšením hustoty plynu, při kterém je nutné zvýšit pracovní tlak (až desítky Pa). Naprašované atomy pak při takto velkých tlacích mají velmi malou střední dráhu. Dalším problémem pak je rychlá oxidace katody [32].



AC Naprašování

Při tomto způsobu naprašování je použit střídavý proud zapojený přes kondenzátor, to vede k odstranění problému nízké depoziční rychlosti i zoxidování katody. Střídavě nabíjená elektroda může díky vyšší pohyblivosti elektronů zachytit během jednoho cyklu větší než elektronový proud. Elektroda se pak může nabíjet záporně. Ale zvyšováním výkonu napětí na katodě se lineárně nezvyšuje naprašovací rychlost u AC naprašování [32].

Reaktivní naprašování

Reaktivní naprašování je na principu rozprašování materiálu terče ionty směsi inertního a reaktivního plynu, které jsou urychlovány elektrickým polem. Vytrhané částice terče dopadají na povrch povlakovaných předmětů, kde vzniká reaktivní depoziční vrstev různých chemických sloučenin. Takto se připravují vrstvy oxidů, nitridů, karbidů a dalších [51].

Magnetronové naprašování

Metoda magnetronové naprašování je založena na uvolňování částic z pevného terče katody kladnými ionty z plazmatu pracovního plynu s třikrát větší energií než je povrchová vazebná energie, v magnetickém poli. Částice uvolněné z terče katody prolétají plazmatem k záporně nabitému substrátu [51].

Iontová implantace

Iontová implantace je další metoda úpravy povrchu předmětů založená na zavedení cizího prvku tzv. dopantu do materiálu v aparatuře pro iontové naprašování s urychlovačem elektrostaticky urychlujícími ionty. Tento proces probíhá za relativně nízké teploty, vytváří vhodné modifikace polymeru při zachování rozměru konečného povrchu. Tato metoda se dá aplikovat i jen na určité oblasti předmětů. Velkou nevýhodou této metody je malá penetrační hloubka a poměrně vysoká cena. Používají se různé iontové implantace aplikované na kovy, polymery a keramiku. Nejvýhodnější se zdá být úprava pro změny buněčné adheze, třecích vlastností a chemické inertnosti povrchu ve vlhkém prostředí a při výrobě implantátů pro transplantace v medicíně [66, 70].



2.4 Vliv fyzikálně chemických vlastností povrchu substrátu na adhezi buněk

Na adhezi je závislá životaschopnost většiny buněk, které mohou začít plnit své fyziologické funkce až po uchycení na povrchu vhodného substrátu. Adhezi ovlivňuje řada faktorů vnějšího prostředí např. dostupnost živin, osmotický tlak, pH, teplota atd., ale i náročnost různých druhů buněk na tyto podmínky [1-4].

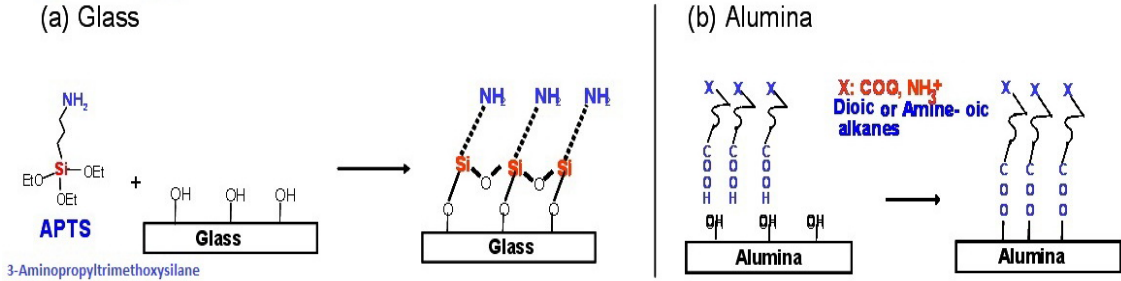
Živé buňky nemohou přímo interagovat s cizími materiály. Adheze buněk probíhá až po adsorpci adhezivních proteinů k povrchu substrátů. Adsorpci proteinů na povrchu materiálů ovlivňuje jak intenzita energetických interakcí mezi molekulami na povrchu substrátu a proteinu (např. vodíkové můstky, elektrostatické a van der Waalsovy síly) tak i entropické změny v důsledku změn konformace molekul bílkovin i uvolňování vody vázané na povrchu [39-41].

Adhezivní proteiny (např. fibronektin, vitronektin, fibrinogen, kolagen, laminin) jsou obsaženy ve fyziologických tekutinách, extracelulární matrix a v kultivačním médiu při metodách *in vitro*. Na tyto adhezivní proteiny se v místě určitých sekvencí aminokyselin navažují buňky svými transmembránovými glykoproteiny (integriny). Úspěšnost kultivace buněk na umělých materiálech velmi závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech jeho povrchu (smáčivosti, chemickém složení, polaritě povrchu i morfologii povrchu) [41, 45].

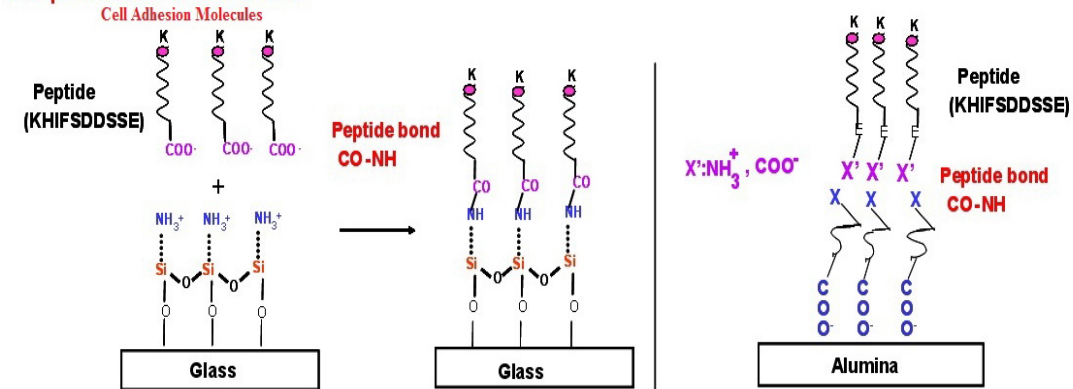
Substrát je často polymerní biomateriál, který by měl stimulovat nejen buněčné uchycení a diferenciaci, ale také tvorbu extracelulární matrix a regeneraci tkání. Znalost mechanismu interakce buňky s povrchem je velmi důležitá pro navržení povrchu biomateriálu s lepšími biokontaktními vlastnostmi. Je známo, že různé typy buněk používají různé mechanismy, kdy ke spojený či adhezi buněk na různé povrchy zpravidla nedochází přímo, ale prostřednictvím proteinů, které jsou vylučované a následně adsorbované k povrchu materiálů a mají „funkci lepidla. Různé metody povrchového inženýrství vedoucí ke zlepšení adheze buněk jsou rozděleny do dvou hlavních skupin: fyzikálně-chemických a biologických. 1- Fyzikálně-chemické metody (pro rozvoj povrchového inženýrství bioinertních nebo bioaktivních biomateriálů) vedoucí ke změně povrchového napětí a drsnosti (oxidace, pomocí ionizujícího záření např. studená plazma, iontové a elektronové svazky, laser, foto-litografie, povrchové implantace funkčních skupin), 2- Biologické metody (jednoduché fyzikální preadsorpce bílkovin, peptidů a nebo růstových faktorů, enzymy imobilizace a buněčného růstu) pro navrhování extracelulární matrix podobné přírodní se specifickými vlastnostmi nebo funkcemi [40, 47, 49]. (viz Obr. 2.5)



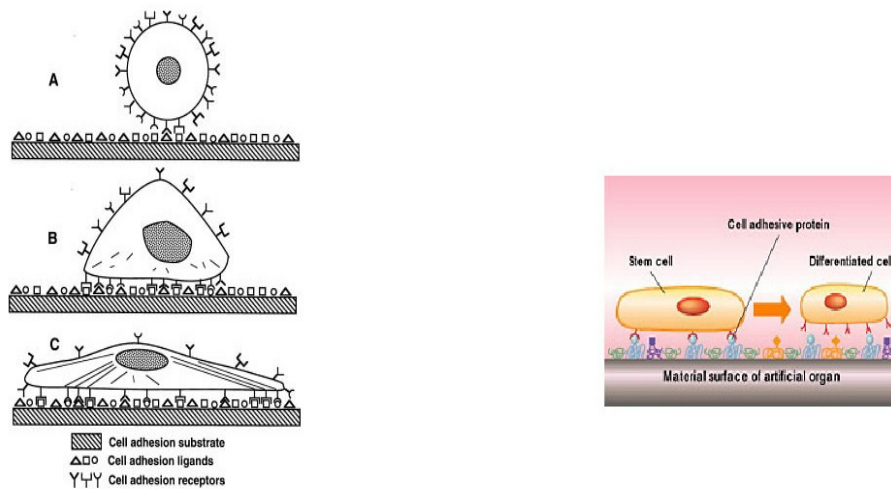
Step 1: Conjugate attachment



Step 2: CAM attachment



Step 3: Cell-Biomaterial Adhesion



Obr. 2.5 Trojfázový postup pro dvě různé vrstvy pro zvýšení povrchové aktivity

2.4.1 Polarita a smáčivost povrchu

Polarita (povrchový náboj) povrchu materiálu výrazně ovlivňuje adsorpci bílkovin a tím i adhezi buněk. Mírné zvýšení polarity povrchových polymerů zvyšuje buněčnou adhezi. Smáčivost povrchu je výsledkem působení adhezních a kohezních sil mezi molekulami v místě styku kapaliny



a pevného povrchu, bývá vyjádřena hodnotou kontaktního úhlu kapaliny (úhel, který svírá tečna k povrchu kapky, vedená v bodě styku kapky s rozhraním) (viz Obr. 2.6). U biomateriálů lze stanovit smáčivost povrchu pomocí vody. Pokud je kontaktní úhel měřící kapaliny menší než 90° jedná se o materiál smáčivý, jehož povrch je hydrofilní a jeli kontaktní úhel větší než 90° je materiál nesmáčivý s hydrofóbním povrchem. Na základě měření kontaktního úhlu je možné určit vlastnosti povrchu materiálu například po nanesení tenké vrstvy [4, 57]. Na slabě hydrofilní povrchy, které umožňují adsorpci sérových proteinů s nestabilní vratnou vazbou, adherují buňky přednostně, protože se mohou snáze na tyto proteiny navázat nebo je malý, což ztěžuje i adhezi buněk na tyto povrchy [2, 53, 58, 59].



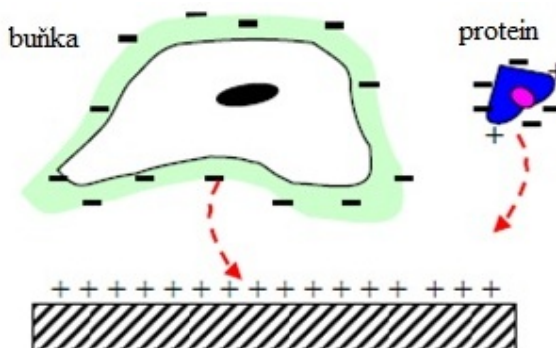
Obr. 2.6 Kontaktní úhel

2.4.2 Morfologie povrchu

Morfologie povrchu neboli drsnost povrchu je dána velikostí, tvarem a vzdáleností povrchových nerovností. Buňky vykazují různou afinitu k rozdílně drsným povrchům. Vhodnost drsnosti závisí na druhu a tvaru buněk, umožňuje jejich adhezi, proliferaci, migraci a orientaci. Ze studií uhlíkových kompozitních materiálů pro konstrukci kostních náhrad vyplývá, že snížením drsnosti povrchu materiálu dojde k vyšší smáčivosti, tím snazší adsorpci proteinů i adhezi, proliferaci a diferenciaci lidských kostních buněk. Pro jiné druhy buněk má drsnost zanedbatelný vliv na počáteční adhezi [1-4, 53].

2.4.3 Elektrická vodivost povrchu

Elektrická vodivost povrchu je dalším důležitým faktorem pro adhezi, interakci a pohyb buněk. Na buněčné membráně jsou místa se záporným nábojem, která buňka využívá v rozpoznávacím procesu a při interakcích se substrátem (viz Obr. 2.7). Elektrický náboj povrchu substrátu ovlivňuje adsorpci adhezivních proteinů. Elektrickou vodivost povrchu lze zvýšit několika metodami např. ozářením UV světlem, karbonizací nebo grafitizací nebo iontovou implantací dopantu [1-4, 755, 60].



Obr. 2.7 Interakce buňky s povrchem

2.4.4 Chemické složení povrchu

Chemické složení povrchu biomateriálu má rovněž velký vliv na adhezi a proliferaci buněk. Důležitá je přítomnost vodíku, ale i obsah a množství aminoskupin, hydroxylových, aldehydových, karbonylových skupin na povrchu materiálu. V poslední době se studují povrchy s navázanými vazebnými sekvencemi aminokyselin pro přímou adhezi buněk, které mají suplementovat extracelulární matrix [1, 53].

2.5 Cytologie

2.5.1 Struktura a fyziologie buňky

Buňku definujeme jako nejmenší jednotku živého organismu schopnou samostatné existence. Veškeré živé organismy jsou složeny z buněk. Hlavními životními projevy buňky jsou metabolismus, dráždivost, schopnost dělení a růst. U vyšších organismů je tvar buněk přizpůsoben jejich specifickým funkcím. V buňkách rozlišujeme tři základní kompartmenty – jádro, cytoplazmu a buněčnou membránu. V cytoplazmě buněk se dále nachází množství buněčných organel, např. jádro, jadérko, mitochondrie, ribozomy, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, lyzozomy, peroxizomy, centrioly, cytoskelet. Buňka je ohraničena plazmatickou membránou, která chrání její vnitřní prostředí. Kolem buněk např. vyšších organismů je tzv. extracelulární matrix, kterou tvoří sloučeniny vylučované buňkami. Z hlediska fyziologie mnohobuněčných živočichů hraje velmi významnou roli buněčná (plazmatická) membrána [2, 63, 64].

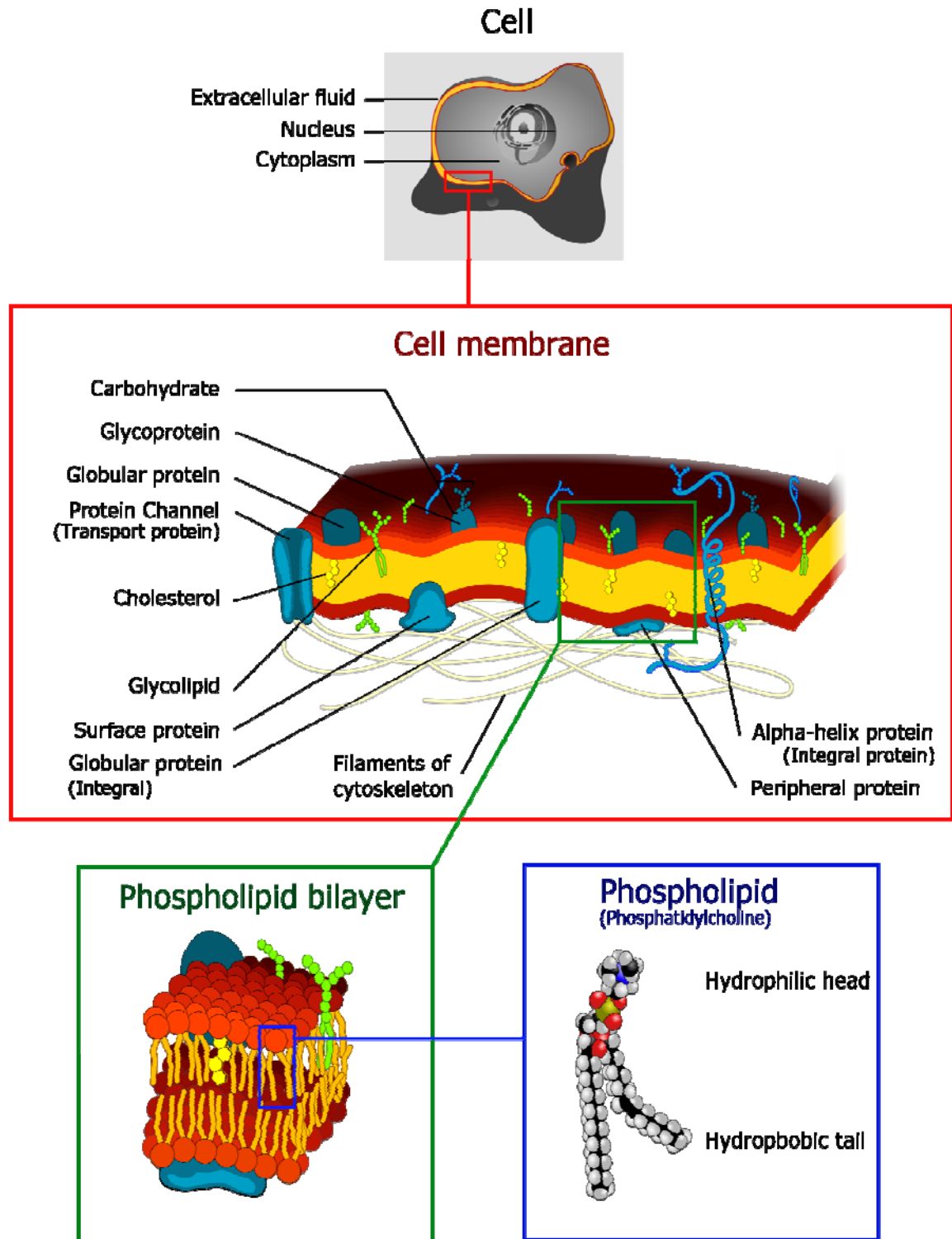


2.5.2 Buněčná (plazmatická) membrána a cytoskelet

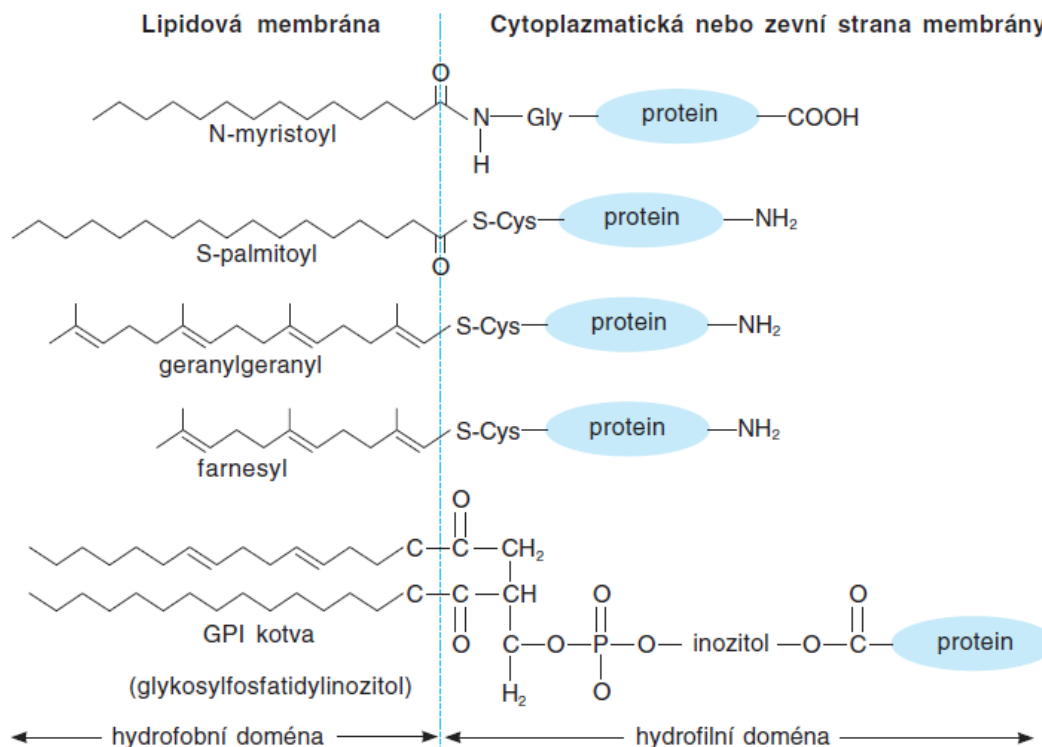
Buněčná (plazmatická) membrána obklopuje buňku, je polopropustná, tvoří ji fosfolipidová dvojvrstva a proteiny. Membránové proteiny dělíme podle jejich uložení na integrální proteiny a periferní proteiny, mají mnoho různých funkcí, např. buněčné adhezivní molekuly, připoutávají buňky k buňkám sousedním nebo k bazálním membránám, transportní molekuly- iontové kanály, pumpy a přenašeče, receptory pro vazbu neurotransmiterů a hormonů, a enzymy. Membrány mají dynamickou strukturu, složky se neustále obměňují. Další důležitou vlastností membrány je udržování homeostázy tj. různých koncentrací kationtů a aniontů v intra- a extracelulárním prostředí. Uvnitř buněk většiny mnohobuněčných živočichů je koncentrace K^+ kationtů podstatně vyšší než koncentrace Na^+ kationtů, zatímco v extracelulární tekutině jsou poměry obou iontů opačné. Vznik klidového membránového potenciálu je podmíněn odlišnou prostupností plazmatické membrány pro jednotlivé ionty a rovněž aktivními přenašečovými systémy. Membránové napětí je v klidu uvnitř buňky vždy záporné proti kladnému extracelulárnímu prostoru [65, 66].

Bazální vrstva (basal lamina) obklopuje většinu buněk, je to tenká chmýřitá vrstva, nebo-li extracelulární matrix, kterou tvoří mnoho typů proteinů (kolagenní proteiny, lamininy, fibronectin, tenascin a proteoglykany), které udržují buňky pohromadě, regulují jejich vývoj a určují jejich růst [65, 66]. (viz Obr. 2.8 a 2.9)

Dynamický systém vláknitých proteinových struktur v cytoplasmě buněk se nazývá cytoskelet. Cytoskelet buňky je systém mikrofilament, mikrotubulů, intermediálních filament a mikrotrabekulů, který zajišťuje dynamickou organizaci cytoplazmy a organel, přenos některých informací (tlak, pohyb), fixuje tvar buňky a zároveň umožňuje změny tvaru buňky a její aktivní pohyb. Hraje důležitou roli také při dělení buňky [4, 69, 70].



Obr. 2.8 Biologická membrána. Molekuly fosfolipidů obsahují vždy dva řetězce mastných kyselin (vlnovky), které jsou vázány na fosfátovou hlavičku (nevyplněná kolečka). Proteiny jsou zobrazeny jako vybarvené útvary. Většina proteinů je integrální částí membrány a procházejí celou membránou, ale periferní proteiny jsou přichycené uvnitř membrány a na vnější stranu jsou někdy k membráně přichyceny glykosylfosfatidylinozitem (GPI) [69]

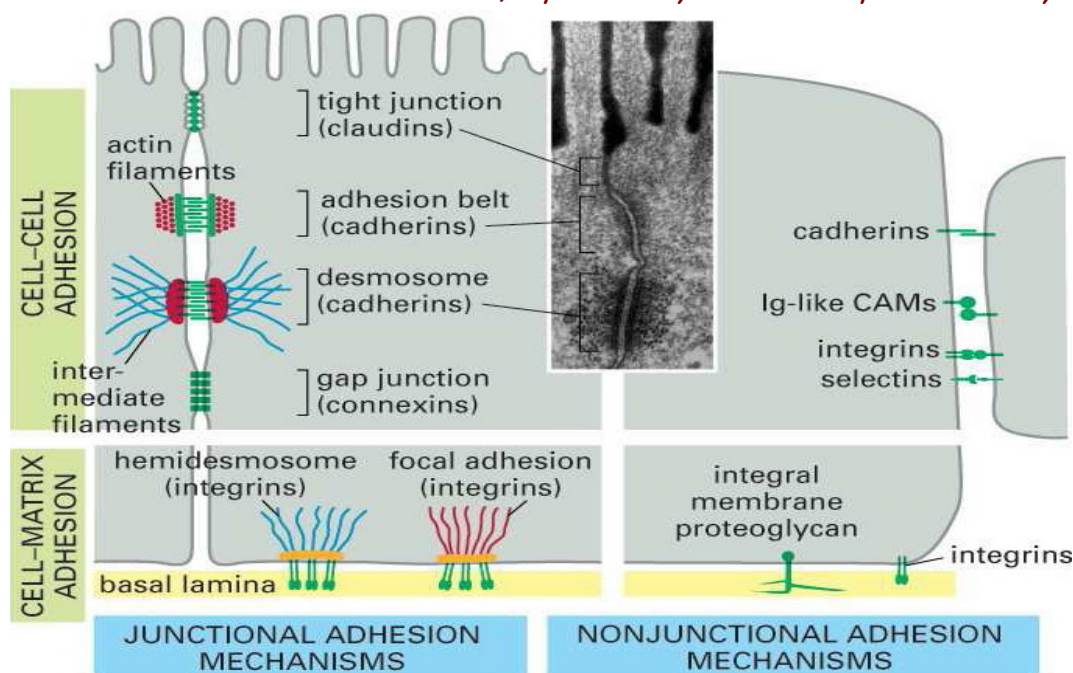


Obr. 2.9 Vazby proteinů na membránové lipidy. Některé se vážou svými aminokonci, jiné svými karboxylovými konci. Mnohé aminokyseliny jsou vázány pomocí glykosylované formy fosfatidylinozitolu (GPI přichycení). [69]

2.5.3 Buněčná adheze

Mezibuněčná spojení

Mezibuněčná spojení ve tkáních zajišťují připoutání buněk mezi sebou a k okolní tkáni i mezibuněčnou komunikaci a transport iontů a dalších molekul z buňky do buňky. Mezibuněčná spojení sousedních buněk zajišťují soudržnost a stabilitu tkání, patří sem pevná spojení (tight junctions, zonula occludens) umožňující transport malých iontů do mezibuněčného prostoru, dezmosomy a „zonula adherens“ vzájemně spojují buňky, hemidezmosomy a fokální adheze váží buňky k jejich bazální membráně. Štěrbinová spojení (duté spoje, gapjunction) mezi buňkami umožňují průchod iontům a nízkomolekulárním rozpuštěným látkám (sacharidům, aminokyselinám aj.) [68, 69]. (viz Obr. 2.10)



Obr. 2.10 Mezibuněčná spojení [71]

Buněčné adhezivní molekuly

Buněčné adhezivní molekuly (Cell Adhesion Molecules, CAM) jsou důležitou součástí intercelulárních spojení a bazální membrány, zajišťují nejen pevná spojení sousedních buněk, ale i přenos signálů z buňky a do buňky [69]. Dělíme je do čtyř skupin:

1. integriny, což jsou heterodimery, které se váží s různými receptory, jejich interakce s cytoskeletem, odpovídají za buněčný pohyb.
2. nadrodiny IgG, které patří do rodiny imunoglobulinů, některé tvoří vazbu heterofilní a jiné homofilní.
3. kadheriny, Ca^{2+} dependentní molekuly, které zprostředkovávají homofilní vazby mezi buňkami.
4. selektiny obsahují části podobné lektinům a tvoří vazby s glykany.

Extracelulární matrix

Extracelulární matrix (ECM) nebo-li mezibuněčná hmota je uložena v mezibuněčných prostorech obsahuje proteiny (hlavní složkou je kolagen), glykosaminoglykany (hlavní složkou jsou proteoglykany) a glykoproteiny (laminin, fibronectin), její proměnné složení umožňuje velkou různorodost podle potřeb dané tkáně. Extracelulární matrix je k buňkám přichycena pomocí integrinů, má důležitou úlohu ve fixaci a ochraně buněk, mezibuněčné komunikaci i buněčné diferenciaci [69].

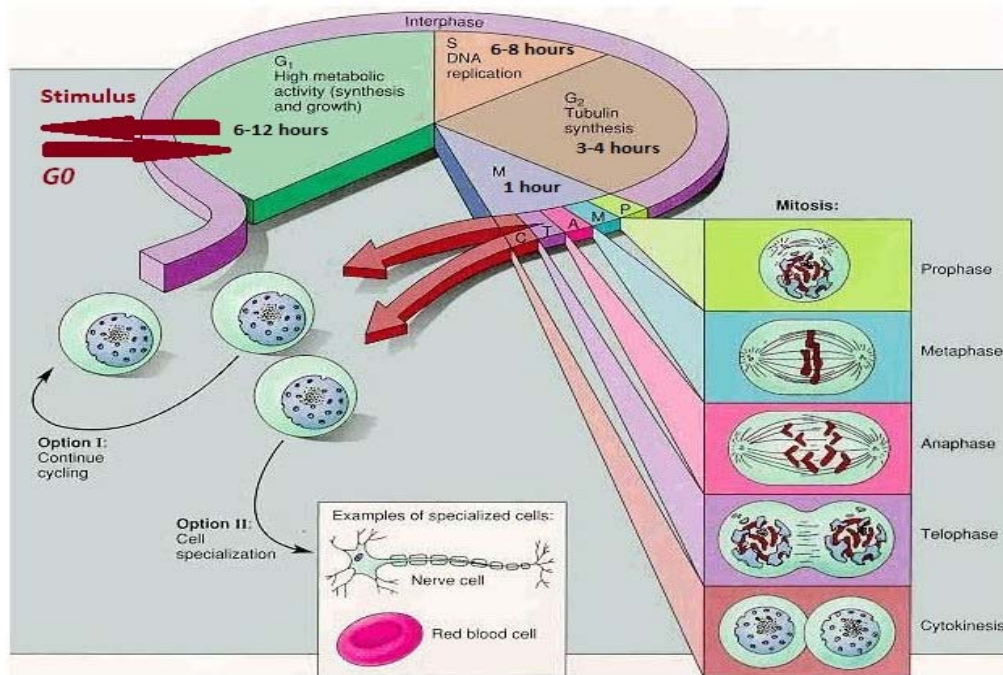


2.5.4 Buněčný cyklus a smrt

Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je řada na sebe navazujících procesů, kterými prochází každá buňka od svého vzniku po další dělení. Generační dobou se nazývá celkové trvání cyklu. Doba od konce jedné mitózy po začátek druhé nazýváme interfáze, kdy po sobě následují přípravné fáze (G₁, S, G₂) a mitóza (M) a vlastní dělení buňky. (viz Obr. 2.11)

- Fáze G₁ (growth, nebo-li růstová) období, kdy buňka roste, produkuje RNA, proteiny a nukleotidy, tím znásobuje svou buněčnou hmotu. Na jejím počátku je umístěn hlavní kontrolní uzel buněčného cyklu, který může zastavit přípravu na další dělení a tím i další cyklus, buňka přejde do fáze G₀. V této fázi se nachází většina diferencovaných buněk.
- Fáze S (synthesis, nebo-li syntetická) následuje po fázi G₁, kromě produkce RNA a následné protesyntézy, dochází k replikaci DNA, každý chromosom je na konci této fáze zdvojený, tj. tvoří jej dvě sesteské chromatidy.
- Fáze G₂, kdy probíhá zdvojování organel, probíhá produkce struktur potřebných pro tvorbu mitotického vřetenka.
- Fáze M (mitosis, mitóza) probíhá dělení jádra (karyokineze), dělení buňky (cytokineze), výsledkem jsou dvě buňky o stejném počtu chromozómů [63-65].



Obr. 2.11 Schéma buněčného cyklu eukaryotické buňky



Buněčná smrt

Buněčná smrt je konec života buňky, kterému předchází soubor procesů. Buněčná smrt probíhá dvěma hlavními cestami a to nekrózou a apoptózou.

Nekróza je patologický proces. Buňka při ní odumírá z důvodu mechanického, chemického, fyzikálního nebo biologického poškození nebo při nepříznivých životních podmínkách. Při nekróze dochází k porušení integrity buněčné membrány, následnému narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky. Vede k objemovým změnám celé buňky i některých jejích organel (mitochondrií, endoplazmatického retikula), enzymatickému poškození buněčných struktur až k jejímu rozpadu. Uvolnění buněčného obsahu do okolí může indukovat nekrózu okolních buněk a způsobit tak rozsáhlejší poškození tkáně a následný zánět. Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt je fyziologický proces [70]. Může být indukována proapoptotickým signálem zvenčí i z buňky samotné. Průběh apoptózy využívá enzymatické regulační kaskády buňky. Buňka se smršťuje a mění se i charakter různých organel, nakonec se rozpadá do apoptotických membránou ohraničených tělísek, která neohrozí okolní buňky [70].

2.5.5 Buněčné kultury

Buněčné kultury jsou populace buněk pěstované na umělých kultivačních médiích v kultivačních nádobách, tvoří je buňky izolované z živočichů nebo rostlin.

Buněčné kultury se v již běžně používají v základním a aplikovaném výzkumu i ve výrobě. Ve výzkumu slouží především jako zdroj materiálu pro pokusy. Biotechnologické aplikace patří mezi nejpoužívanějších biologické modely, i když nemohou úplně nahradit ostatní typy modelů (tkáně, orgány, laboratorní zvířata, lidské dobrovolníky) [72].

Výhodou je, že buněčné kultury umožňují práci s jedním dobře charakterizovaným typem buněk. Jejich použití má svá omezení např. buňky se kultivují za nefyziologických podmínek, chybí jim okolí obvyklé v tkáních, někdy během kultivace dediferencují či mění svůj fenotyp. Dále práce s buněčnými kulturami vyžaduje vhodně vybavenou laboratoř, používání speciálních pomůcek a materiálu a proškolený personál a to má nemalé organizační a ekonomické nároky [74].

Dělení buněčných kultur

Buněčné kultury dělíme podle jejich stáří do tří skupin:

1. Primární buněčné kultury - vznikají z buněk izolovaných z nativní tkáně kultivací v kultivačním médiu v kultivačních nádobách. Zpravidla se jedná o směs různých typů diploidních buněk. Tyto kultury mají relativně krátkou životnost, slouží k získání buněk, které jsou schopny se přizpůsobit kultivačním podmínkám [66].



2. Sekundární buněčné kultury (diploidní) - obsahují pouze jeden vybraný typ buněk, které byly více než jednou pasážované z primární kultury. Takto připravené buněčné kmeny, jejichž buňky jsou schopny v průměru 40-50 dělení a poté zanikají, lze pasážovat zhruba jeden rok.
3. Buněčné linie (heteroploidní) – jsou získány řízeným výběrem z primárních kultur pomocí fyzikálních nebo chemických mutagenů případně přímo z nádorových buněk. Jedná se o linie heteroploidních buněk s prakticky neomezenou životností a schopností neomezeně se dělit.

Růstová křivka buněčné kultury

Růstová křivka popisuje růst buněk v buněčné kultuře, skládá se ze čtyř částí:

1. Lag fáze je charakterizována poklesem počtu buněk, který po adaptaci buněk na kultivační médium začne pozvolna narůstat
2. Log fáze vykazuje exponenciální nárůst počtu buněk, které mají dostatek živin pro svůj metabolismus.
3. Stacionární fáze dochází ke zpomalování a zastavování buněčného růstu důsledkem nedostatku živin a hromaděním odpadních produktů.
4. Fáze odumírání - konečná fáze, kdy je nutné převést buňky na nové médium, protože již nelze udržet buněčnou kulturu. V médiu došlo k vyčerpání živin a hromaděním metabolitů i k poklesu pH [65,71].

Podmínky kultivace

Základním předpokladem pro práci s buněčnými kulturami je dokonalé zvládnutí sterilní pracovní techniky a zamezení kontaminace. Kultivace může být krátkodobá (několik dní) nebo dlouhodobá (týdny), probíhá ve vhodných kultivačních nádobách s kultivačním médiem. Kultivační média jsou směsí několika desítek látek, obsahují anorganické ionty, zdroj energie, aminokyseliny, pufrující složku, vitamíny a růstové faktory, případně antibiotika.

Kultivace probíhá za stálé teploty 37°C, konstantního pH a stálé atmosféře buď v běžné nebo se zvýšeným parciálním tlakem oxidu uhličitého [73, 74].

Stanovení počtu buněk

Práce s buněčnými kulturami často vyžaduje stanovení počtu buněk. Používají se techniky založené na přímém počítání pod mikroskopem, průtokové počítáče buněk, kvantifikace buněk podle koncentrace vybraných látek (bílkovina, nukleové kyseliny) či podle aktivity některých enzymů. Dalším úkolem bývá uchování živých buněk. Je možné je dlouhodobě skladovat zmrazené kapalným dusíkem nebo v hlubokomrazicím boxu. Před poškozením mrazem chrání buňky vhodné kryokonzervační látky (nejčastěji dimetylsulfoxid). Důležitý je proces zmrazování a rozmrazování suspenze buněk, který musí probíhat vhodnou rychlostí [74].



3. Cíl práce

Diplomové práce je zaměřena na studium přípravy uhlíkových vrstev na polymerních substrátech (PET a PTFE), jejich fyzikálně-chemických vlastností a interakcí s buněčným materiálem.

Cíle práce lze shrnout do několika bodů:

- seznámení s danou problematikou uhlíkových vrstev a jejich aplikací pro tkáňové inženýrství
- příprava uhlíkových vrstev napařováním na polymerní substrát
- měření fyzikálně-chemických vlastností (smáčivosti, elektrického odporu) připravených uhlíkových vrstev
- stanovení chemického složení vrstev pomocí Ramanovy spektroskopie
- studování interakcí buněčných kultur s uhlíkovou vrstvou
- diskuze získaných výsledků s publikovanými údaji

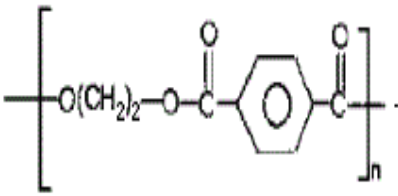
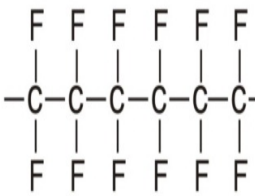
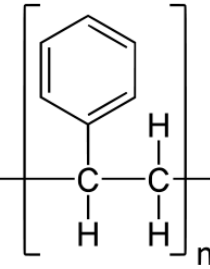


4. Experimentální část

4.1. Použité materiály

Pro studium vlastností a biokompatibility polymerních materiálů s deponovanou vrstvou byl použit polyethyltereftalat (PET) a polytetrafluoroethylen (PTFE). Jako kontrola při studiu biokompatibility byl použit tkáňový polystyren (TCPS- Tissue Culture Polystyrene). Strukturní vzorec jsou zobrazeny v Tab. 4.1. Tkáňový polystyren je běžně používaný ve tkáňovém inženýrství i k výrobě kultivačních nádob a pomůcek. PET i PTFE byly od výrobce Goodfellow Cambridge Ltd. Materiály měly tloušťku 30 μm . Vzorky PET i PTFE byly připraveny ve formě koleček fólií o průměru 20 mm. Před depozicí byly všechny vzorky z obou stran očištěny stlačeným dusíkem.

Tab. 4.1 Použité polymerní materiály

Strukturní vzorec	 <p>Poly(ethylene terephthalate) (PET)</p>	 <p>Polytetrafluoroethylene (PTFE)</p>	 <p>Polystyrene (PS)</p>
-------------------	--	---	--

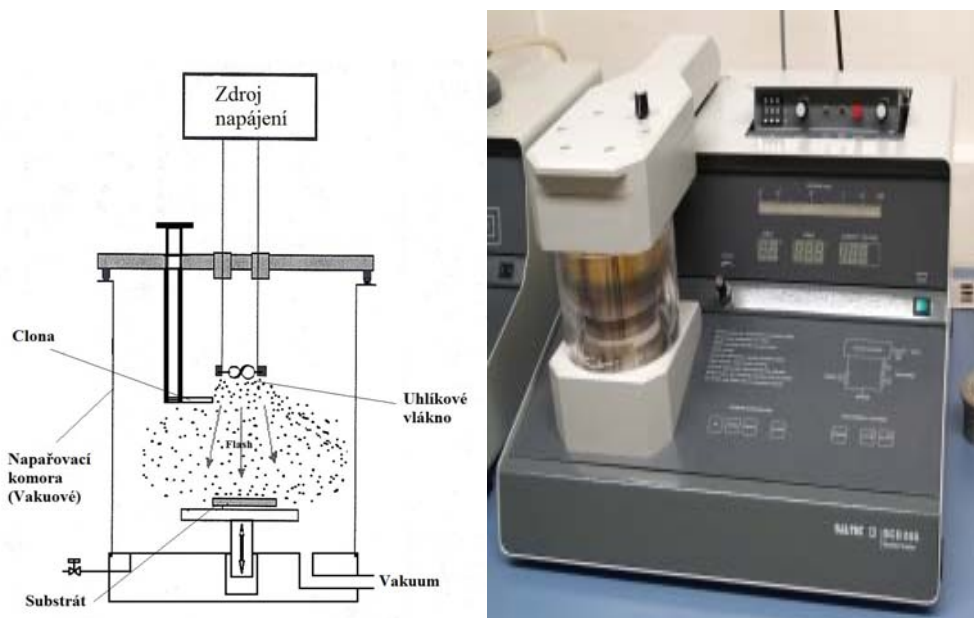
4.2 Metody depozice uhlíkových vrstev

K přípravě uhlíkových vrstev byla použita metoda napařování – flash evaporation pomocí přístroje SPUTTER COATER SCD 050 od firmy BAL-TEC se speciální napařovací hlavou.

Na Obr. 4.1. je znázorněno schéma přístroje. Horní část komory je tvořena odnímatelnou hlavicí se dvěma měděnými elektrodami, mezi kterými bylo natažené zdvojené uhlíkové vlákno (BAL-TEC), zdroj uhlíku pro napařování. Ve spodní části komory je umístěn polohovatelný stolek, kterým lze měnit vzdálenost substrátu od uhlíkového zdroje. Pro napařování uhlíkových vrstev byl na přístroji zvolen režim *EVAP*. Vzdálenost depozice uhlíkových vrstev na vzorek byla 2, 3, 4, 5, 6 a 7 cm. Napařování probíhalo při pracovním tlaku 4 Pa a za laboratorní teploty cca 21°C. Před zahájením vlastní depozice bylo vždy provedeno odplynění uhlíkového vlákna proudem 2,5 – 2,7 A po dobu cca 10 s. Během odplynění bylo vlákno stíněno clonou. Po odstínění byl spuštěn jednorázový vysoký proud



cca 16 A, tím došlo k přetavení uhlíkového vlákna, a tím k expanzi částic do prostoru komory a napaření uhlíkové vrstvy na substrát. Během tohoto způsobu napařování nevzniká homogenní vrstva na celém povrchu stolku. Za homogenní lze považovat vrstvu ve středu polohovatelného stolku o průměru 2 cm, na okrajích stolku je tloušťka vrstvy nižší. [4], proto byly vzorky o průměru 2 cm jednotlivě připevňovány na střed stolku, aby byla docílena nejvyšší možná homogenita deponované vrstvy. Takto byly modifikovány vzorky PET a PTFE.



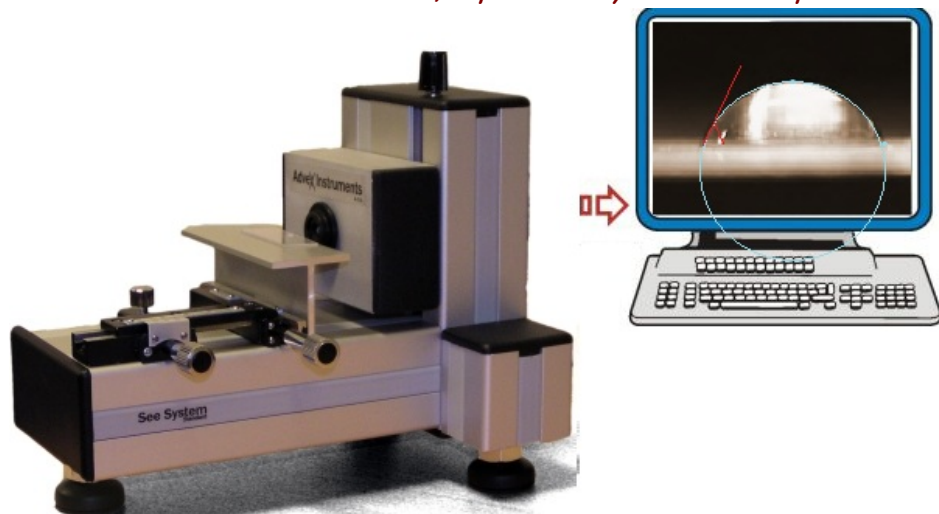
Obr. 4.1 Schéma napařovací komory a přístroj pro napařování

4.3 Použité analytické metody

Ke studiu složení a fyzikálních vlastností připravených uhlíkových vrstev byly použity goniometrie, stanovení plošného odporu vrstev a Ramanova spektroskopie.

4.3.1 Goniometrie

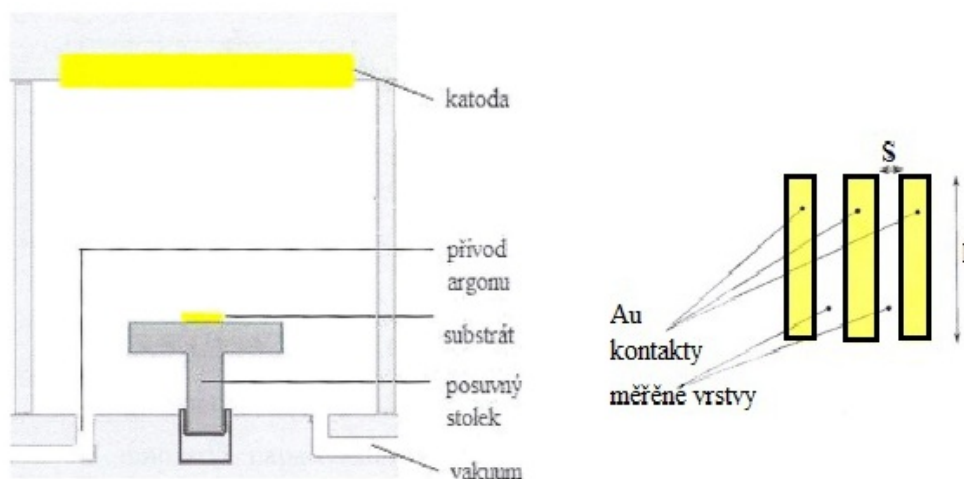
K měření smáčivosti povrchu byl použit přístroj Surface Energy Evaluation System firmy Advex Instruments s.r.o. (SEE system). (viz Obr. 4.2) Smáčivost povrchu vzorku byla stanovena goniometrickým měřením kontaktního úhlu kapky destilované vody o konstantním objemu 8 μ l nanosené na povrchy vzorků. Na každý vzorek bylo automatickou pipetou (Tranferpette® electronic 0,5 μ l - 10 μ l firmy BRAND) nanaseno šest kapek. Každá kapka byla vyfocena ve vodorovném směru přístrojem pomocí CCD kamery a jeho softwarem byl metodou tří bodů vypočten kontaktní úhel. Měření probíhala za laboratorní teploty.



Obr. 4.2 Příklad přístroje a vyhodnocování kontaktního úhlu kapky

4.3.2 Stanovení plošného odporu vrstev

Ke stanovení plošného odporu vrstev byl u vzorků nanášených ze vzdáleností 6 a 7 cm použit pikoampermetr KEITHLY 487 s rozsahem $M\Omega$ - $p\Omega$ a vzorků nanášených ze vzdáleností 2, 3, 4 a 5 cm multimetrem UNI-T typu UT83 s rozsahem 0 - 1 $M\Omega$. Plošný odpor byl stanoven pomocí Au kontaktů, které byly na vzorky nanášeny metodou katodového napařování pomocí přístroje SPUTTER COATER SCD 050 v režimu (*SPUT*). Na katodu by umístěn Au terč, tlak plynu v pracovní komoře byl 4 Pa. Na stolek, který byl anodou, byly rozmístěny čtyři vzorky a překryty mosaznou šablonou tak, aby se na každém vzorku naprášily tři proužky zlata (Au kontakty) (viz Obr. 4.3). Po zapálení výboje, které probíhalo po dobu 120 s a při proudu 40 mA, docházelo k odpařování zlata urychlenými ionty pracovního plynu až na vzorky. Odpor naměřený na kontaktech byl přepočítán pomocí rovnice $R_s = R_z \cdot (l/s)$ [1], kde R_z je měrný odpor, l je délka jednotlivých kontaktů ($l = 1 \cdot 10^{-2}$ m) a s je vzdálenost mezi kontakty ($s = 1 \cdot 10^{-3}$ m).



Obr. 4.3 Schéma naprašovací komory a schéma rozmístění Au kontaktů pro měření plošného odporu [1]

4.3.3 Ramanova spektroskopie

Vzorky naprašovaných vrstev byly charakterizovány pomocí Near-infrared excited surfaceenhanced Raman scattering (NIR SERS). Spektra byla měřena na aktivním pozlaceném platinovém substrátu použitím Fourierovy transformace (FT-NIR) a spektrometru Equinox 55/S (Bruker, Německo) s FT Raman modulem FRA 106/S. Koherentní Laserový paprsek Nd:YAG laser s vlnovou délkou 1064,1 nm, výkonem 50 mW, USA byl použit pro excitaci Ramanova rozptylu. Použitím Si separátoru a Ge detektoru chlazeného kapalným N₂ bylo získáno 1024 – terferogramu. Měření byla provedena na Ústavu analytické chemie, VŠCHT Praha.

4.4 Sterilizace vzorků

Ke sterilizaci vzorků byl použit v 75% vodný roztok nedenaturovaného ethanolu. Sterilizace probíhala po dobu 60 minut za běžné laboratorní teploty.

Bezprostředně po sterilizaci byly vzorky pro kultivaci umístěny do kultivačních plat s dvanácti jamkami (o průměru 2,14 cm, TTP Switzerland) a fixovány polymerními kroužky. Během manipulace, která probíhala v boxu s laminárním prouděním vzduchu, došlo k odpaření roztoku denaturovaného ethanolu ze vzorků.



4.5 Buněčné kultury, media a roztoky

Na vzorcích polymerů s deponovanou uhlíkovou vrstvou byla kultivována 8. pasáž buněk hladké svaloviny cév (vascular smooth muscle cells = VSMC) získané z aorty potkana. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (Sigma Aldrich, U.S.A.), ke kterému bylo přidáno 10% fetálního bovinního séra (FBS, Sebak GmbH, Aidenbach, Německo). K oplachům buněk byl používán fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline - PBS). Pro odvolňování buněk od povrchu vzorků byl použit trypsin s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (trypsin-EDTA, Sigma Aldrich).

K fixaci buněk pro focení byl použit 75% ethanol o teplotě -20°C a k obarvení buněk směs fluorescenčních barviv. Pro obarvení buněčné membrány bylo použito barvivo Texas Red C2-maleimid (Molecular Probes, Invitrogen), pro obarvení chromatinu barvivo Hoechst # 33342 (Sigma Aldrich, U.S.A.). Směs fluorescenčních barviv byla připravena smísením 25 ml PBS, 50 μl barviva Texas a 120 μl barviva Hoechst.

4.6 Metody pro stanovení adheze a proliferace buněk

4.6.1 Kultivace hladkých svalových buněk

Kultivace hladkých svalových buněk probíhala v připravených kultivačních platech. Do všech komůrek se vzorky byly napipetovány 3 ml média s 50 000 buňkami. Kultivace probíhala v médiu DMEM s přídatkem FBS po dobu 1, 3 a 7 dní při teplotě 37°C , vlhkosti 85%, v atmosféře vzduchu s 5% CO_2 . Každý typ vzorku byl studován ve třech exemplářích.

- Stanovení adheze: Dva vzorky byly použity pro počítání buněk v Bürkerově komůrce a jeden pro přímé počítání pod mikroskopem.
- Stanovení proliferace: Dva vzorky byly použity pro počítání buněk v automatickém počítací buněk Vi-Cell XR a jeden pro přímé počítání buněk pod mikroskopem.

Práce byla prováděna ve Fyziologickém Ústavu Akademie věd ČR na Oddělení růstu a diferenciaci buněčných populací.

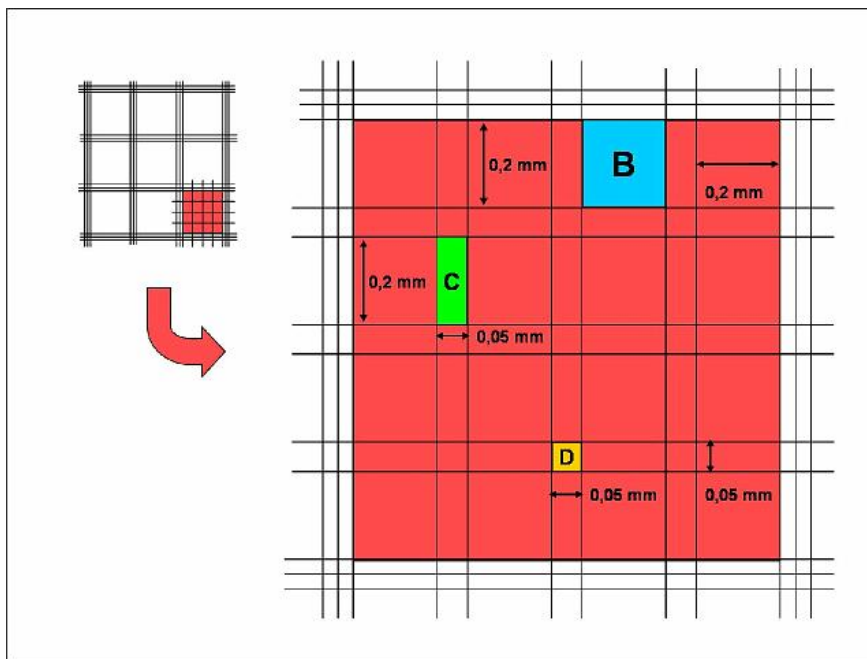
4.6.2 Příprava vzorků a měření adheze a proliferace

Měření adheze buněk pomocí Bürkerovy komůrky

Adheze buněk k povrchu vzorků byla stanovována po 24 hodinách od nasazení. Z komůrek bylo pipetou odstraněno médium, ze vzorků byly odstraněny polymerní kroužky. Vzorky s adherovanými buňkami byly opatrně opláchnuty v čistém PBS a přemístěny do



čistých plat s 0,7 ml trypsinu a umístěny do termostatu na cca 10 minut, dokud se buňky neuvolnily z povrchu vzorku. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 0,7 ml média. Směs média s buňkami byla přenesena pipetou do Bürkerovy komůrky. Počet buněk byl stanoven 4x u každého vzorku. Bürkerova komůrka (Marienfeld, Germany) je kalibrovaná, má hloubkou 0,100 mm a mřížku o rozměrech čtverců 0,0025 mm² a 0,04 mm². Mřížka je složena z devíti čtverců, ve kterých se počítá množství buněk. Počítání probíhalo pod světelným mikroskopem OLYMPUS IX51. Výsledky byly porovnávány s výsledkem adheze na tkáňovém PS (viz Obr. 4.4).



Obr. 4.4 Bürkerovy komůrka

Měření adheze a proliferace buněk pomocí mikroskopů

VSMC buňky byly nasazeny v množství cca 16 tisíc buněk/cm² do 12-jamkových kultivačních plat se vzorky. Vzorky 1., 3. a 7. den od nasání byly opatrně vyndány a opláchnuty PBS jako při předchozím měření, ale poté byly po dobu 45 minut fixovány ethanolem ochlazeným na -20°C. Po odstranění ethanolu byly vzorky opět opláchnuty PBS a pak cca 60 minut barveny roztokem fluorescenčních barviv (viz kapitola 4.5) v temnu za laboratorní teploty. Po opláchnutí v PBS byly přeneseny na podložní sklíčka a přikryta krycími sklíčky. Za použití fluorescenčního mikroskopu OLYMPUS IX51 s použitím digitální kamery Olympus DP 70 bylo pořízeno 20 fotografií buněk z různých míst na vzorku. Počet buněk na fotografiích byl stanoven pomocí software GSA Image Analyser v3.5.9. Výsledky byly porovnávány s výsledky na tkáňovém PS.



Stanovení počtu buněk pomocí Vi-Cell XR

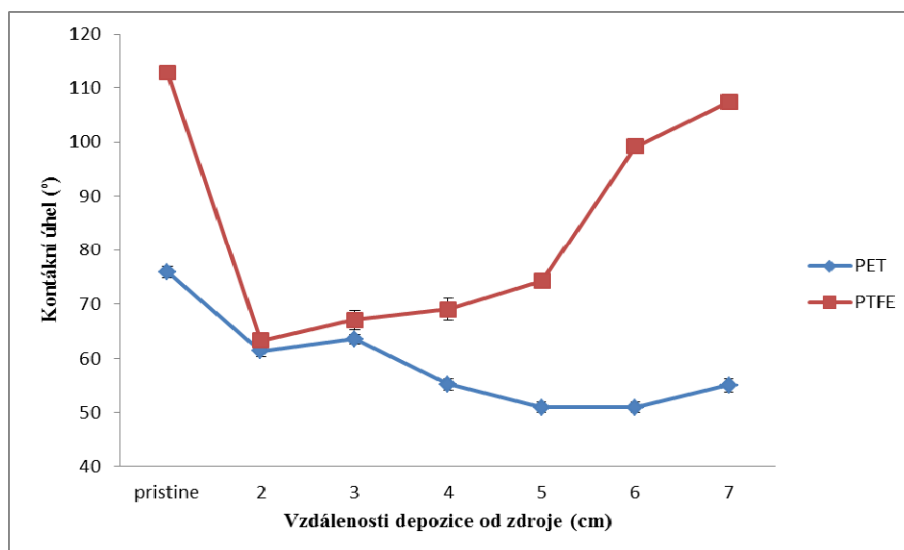
Vzorky na nichž byly buňky kultivovány po dobu 3 a 7 dnů byly opatrně vyndány a opláchnuty PBS jako při předchozích stanovení a poté přemístěny do čistých plat s 0,7 ml trypsinu a umístěny do termostatu na cca 10 minut, aby se buňky uvolnily z povrchu vzorku. Dále bylo ke vzorkům napipetováno 0,7 ml media. 1 ml směsi buněk v médiu byla přenesena do kyvety pro měření v automatickém počítači buněk Cell Viability Analyzer (Vi-Cell XR, Beckman Coulter). Tento přístroj zjistí základní vlastnosti kultivovaných buněk, stanoví množství živých i mrtvých buněk i celkovou životaschopnost buněk. Počítání buněk je založeno na vylučovacím testu trypanovou modří, kdy nedojde k obarvení živých buněk. Celkový počet buněk a jejich životaschopnost byly stanoveny ze dvou vzorků, oba vzorky byly proměřeny dvakrát. Výsledky byly porovnávány s výsledky na tkáňovém PS.



5. Výsledky a diskuze

5.1 Stanovení smáčivosti pomocí goniometrie

Smáčivost povrchu uhlíkových vrstev deponovaných na polymerní substráty byla stanovována goniometricky. Na Obr. 5-1 jsou uvedeny hodnoty kontaktních úhlů uhlíkových vrstev připravených napařováním na oba substráty (PTFE a PET). V závislosti na vzdálenosti depozice od 2 do 7 cm byly u vrstev sledovány změny kontaktních úhlu. U původního substrátu PTFE, tj. bez nanesené uhlíkové vrstvy, byl naměřen kontaktní úhel 112° a u původního substrátu PET bez nanesené uhlíkové vrstvy byla tato hodnota 75° . Po napaření uhlíkových vrstev došlo, jak je patrné z Obr. 5.1, ke snížení hodnot kontaktních úhlů a tím ke zvýšení smáčivosti povrchu u všech substrátů.



Obr. 5.1. Závislost velikosti kontaktního úhlu na vzdálenosti depozice od zdroje

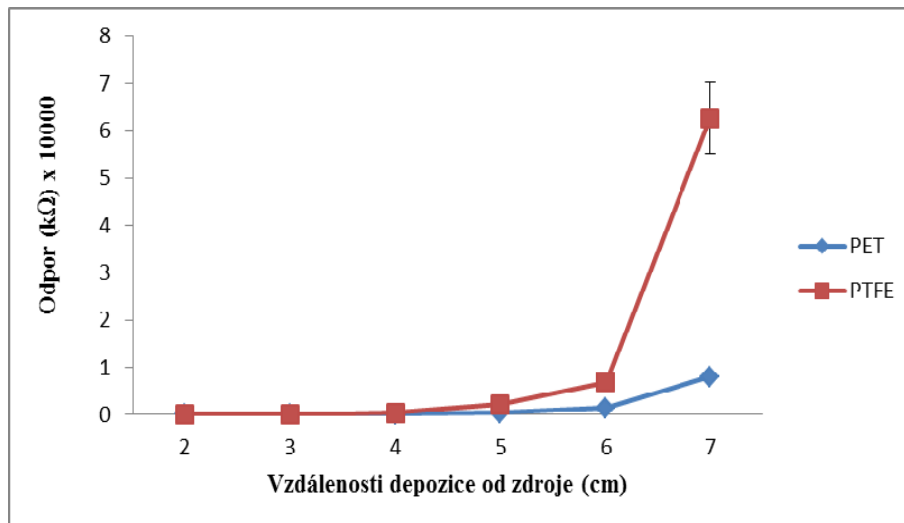
Kontaktní úhel se zvyšoval u substrátů z nepolárního PTFE s rostoucí vzdáleností vzorku od “zdroje”, tzn. čím byly vrstvy tenčí. Oproti tomu se kontaktní úhel u substrátů z polárního PET neměnil v rámci experimentální chyby.

5.2 Stanovení elektrického odporu deponované vrstvy

Při měření hodnot plošného odporu na uhlíkových vrstvách napařených na PET a PTFE substráty byly zaznamenány jejich změny v závislosti na vzdálenosti depozice (viz. Obr. 5.2). Plošný odpor původních substrátů byl stanoven $R = 1 \times 10^{14} \Omega$ pro PET a z literatury je známo, že $R = 1 \times 10^{17} \Omega$ pro PTFE. Napařované uhlíkové vrstvy se vykazují polovodivý charakter [53]. Podle výsledků plošný odpor u vzorků s deponovanými vrstvami klesá v porovnání s původními substráty. Pokles vzrůstá s tlouškou a “elektrickou” spojitostí



deponované vrstvy. Je známo, že při depozici se uhlík ukládá přednostně na nerovnosti povrchu a až poté se začne vytvářet spojitější vrstva s nižším elektrickým odporem.



Obr. 5.2 Závislost plošného odporu na velikosti vzdálenosti depozice od zdroje

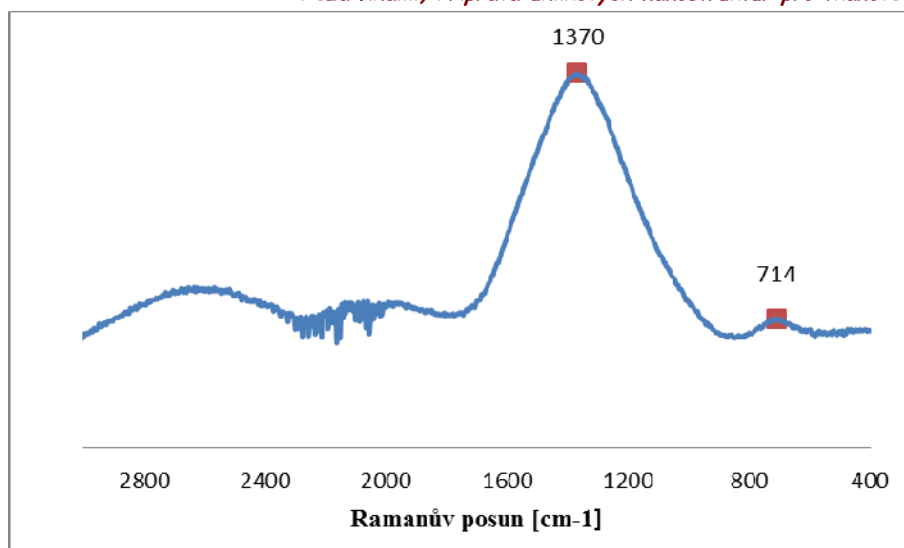
5.3 Stanovení struktury napařovaných uhlíkových vrstev pomocí Ramanovy spektroskopie

Ramanovou spektroskopie se studuje struktura uhlíkových vrstev. Důležitým parametrem je poměr sp^3/sp^2 nebo poměr intenzit I_D/I_G nebo také poměr ploch pod křivkou (integrated areas) (A_D/A_G) [76 -79]; v této literatuře zabývající se podrobným studiem uhlíkových nanostruktur pomocí Ramanovy spektroskopie je uvedeno několik oblastí, které jsou shrnuty v Tab. 5.1

Tab. 5.1 Oblasti charakteristické pro různé uhlíkové nanostruktury v Ramanově spektroskopii

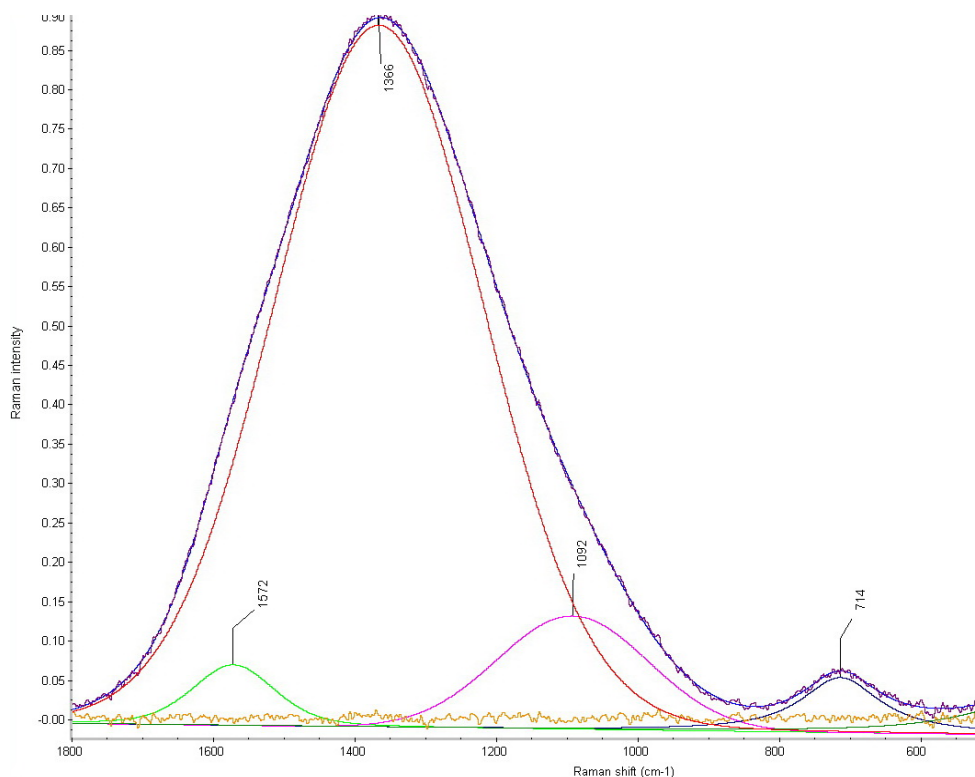
Ramanův posun cm^{-1}	Název oblastí a typ uhlíkové struktury
712 cm^{-1}	Pás nerovinné deformace (neuspořádaná vrstva)
1360 cm^{-1}	"D pás", amorfni uhlík (neuspořádaný ve struktuře vrstvy)
1580 cm^{-1}	"G pás", grafitická struktura (valenční C=C vibrace uhlíku (Sp^2))
2950 cm^{-1}	Pás vibrací valenční vazby C-H

Charakter vazeb je silně závislý na typu krystalové mřížky [4,76 -79]. Spektra, která byla získána měřením uhlíkových vrstev napařených ze 2 cm na aktivní pozlacený platinový substrát, jsou uvedena na Obr. 5.3.



Obr. 5.3 Ramanovo spektrum vzorku napařené uhlíkové vrstvy na Au-Pt substrát ze vzdálenosti 2 cm

Na spektru je patrný pík 714 cm^{-1} , který je typický pro nerovinné deformace a je potvrzením neuspořádané vrstvy. Dále je zřejmý velmi intenzivní asymetrický pík s maximem při 1370 cm^{-1} typickým pro amorfni uhlík. Pro získání bližších informací o typu uhlíku ve vrstvě byla provedena separace pásů v oblasti 1800 - 500 cm^{-1} . Pro separaci jsme použili program Origin pro verze 8.5, funkci *peak Analyzer*, algoritmus Gaussian/Lorentzian. Výsledek separace pásů je uveden na Obr. 5.4.



Obr. 5.4 Separace pásů z Ramanova spektra vzorku



Z nesymetrické části byly takto získány 3 pásy. Výsledky všech nafitovaných hodnot jsou shrnuty v Tab. 5.2.

Tab. 5.2 Oblasti získané nafitováním dat z Ramanova spektra

Ramanův posun cm^{-1}	Název oblast a typ uhlíku
712 cm^{-1}	Pás nerovinné deformace (neuspořádaná vrstva)
1392 cm^{-1} byl separován na: 1- 1092 cm^{-1} 2- 1366 cm^{-1} 3- 1572 cm^{-1}	1- Pás cyklických uspořádání související s grafitickou strukturou 2- "D pás" amorfniho uhlíku 3- "G pás" grafitickeho uhlíku

V Tab. 5.3 jsou uvedeny pozice jednotlivých nafitovaných píků a poměr I_D/I_G (Sp^3/Sp^2).

Tab. 5.3 Pozice typických píků v uhlíkovém spektru a poměr I_D/I_G (Sp^3/Sp^2).

Č. píku	Typy píků	Vrchol X	Intenzita	FWHM	obsah plochy (A)	I_D/I_G
1	Gaussian/Lorentzian	713,83	0,07	135,15	14,77	11,59
2	Gaussian/Lorentzian	1092,44	0,14	252,41	38,74	
3	Gaussian/Lorentzian	1366,39	0,89	346,8	334	
4	Gaussian/Lorentzian	1572,1	0,07	137,53	13,09	

Z výsledků uvedených ve spektrech lze konstatovat, že napařováním uhlíkových vrstev z uhlíkového vlákna dojde k depozici „dominantně“ největší části amorfniho typu uhlíku a z „malé“ části grafitickeho uhlíku.

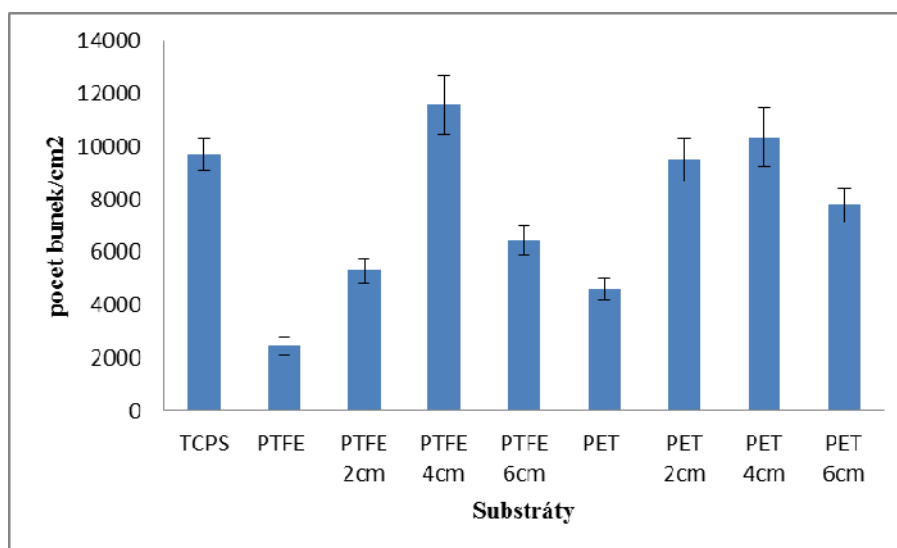
5.4 Studium adheze a proliferace buněk

V tkáňovém inženýrství se používají polymerní materiály s deponovanými uhlíkovými nanostrukturami s doloženou biokompatibilitou. V této části jsou shrnuty výsledky adheze a proliferace buněk hladké svaloviny cév (vascular smooth muscle cells = VSMC) na uhlíkových vrstvách napařených ze vzdálenosti 2, 4 a 6 cm na polymerní substráty PET a PTFE. První den po nasazení dochází k adhezi buněk na materiál. Po uchycení následuje lag fáze (24-48 hodin po nasazení). Pokud buňky tuto fázi "přežijí", začíná jejich růst a dělení, dochází k tzv. proliferaci.



5.4.1 Stanovení počtu adherovaných buněk na vzorcích pomocí Bürkerovy komůrky

Počet buněk hladkého svalstva VSMC adherovaných na studované substráty je uveden na Obr. 5.5. Počet byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky po 24 hodinách od začátku kultivace. Jako srovnávací materiál (kontrolní vzorek) byl použit tkáňový polystyren (PS). Nejnižší množství buněk bylo nalezeno na nemodifikovaném PTFE. Největší počet adherovaných buněk byl na PTFE s uhlíkovou vrstvou napařenou ze 4 cm (cca 11000 buněk/cm²). Více naadherovaných buněk bylo nalezeno i na vzorcích PET s uhlíkovou vrstvou napařenou ze 2 a 4 a 6 cm. Toto množství je srovnatelné s kontrolním vzorkem. V rámci odchylek jsou počty buněk na všech dalších vzorcích „velmi“ podobné. (viz Obr. 5.5)



Obr. 5.5 Závislost počtu adherovaných buněk na studovaných vzorcích stanovení Bürkerovou komůrkou na vzorcích PET a PTFE s uhlíkovou vrstvou napařenou ze 2, 4 a 6 cm

Výsledky studia adheze VSMC potvrdily, že přítomnost uhlíkové vrstvy má příznivý vliv na uchycování buněk. Z výsledků dále vylývá, že nejen použitý substrát, ale i tloušťka vrstvy ovlivňuje množství adherovaných buněk. Tenká vrstva napařeného uhlíku vzniklá při depozici větší vzdálenosti (6 cm), vedla při studiu PET ke snížení, při použití PTFE ke zvýšení počtu adherujících VSMC buněk.

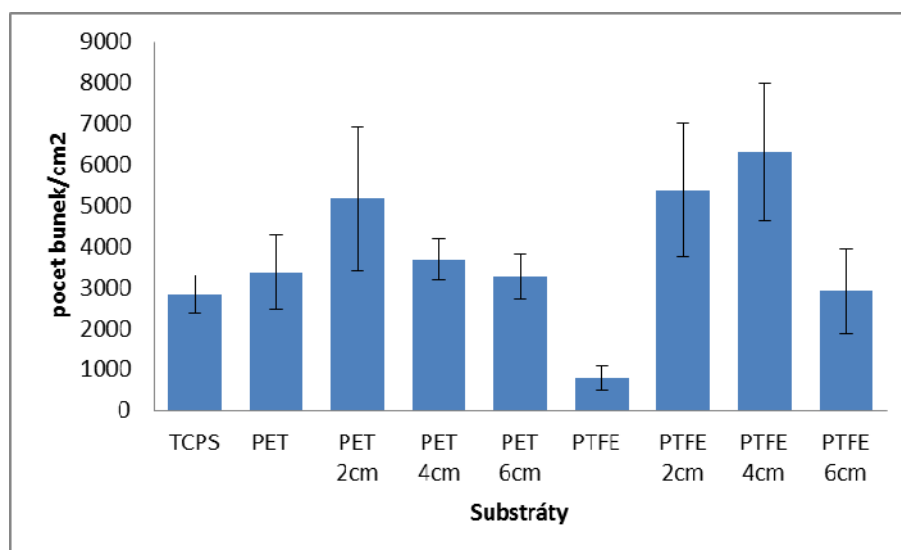
5.4.2 Stanovení počtu adherovaných buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu

Počet adherovaných buněk po 24 hodinách kultivace na studovaných vzorcích byl vypočítán jako průměr počtů buněk z dvaceti fotografií pořízených z fluorescenčního



mikroskopu. Počet buněk na substrátech bez uhlíkové vrstvy je nižší než na substrátech s napařenou uhlíkovou vrstvou (viz Obr. 5.6). To je pravděpodobně způsobeno vyšší smáčivostí vzorků s napařenými uhlíkovými vrstvami v porovnání s původními polymerními fóliemi. PET vykazoval srovnatelnou adhezi buněk k povrchu bez a s uhlíkovou vrstvou. tato adheze byla výrazně vyšší než v případě PTFE. Toto je nejspíš způsobeno nižší hodnotou kontaktního úhlu PET ve srovnání s původním PTFE. Velké odchylky (viz Obr. 5.6) jsou dány pravděpodobně díky shlukování buněk (nízkou homogenitou), tedy výskytem oblastí s velkým počtem buněk i oblastí s velmi malým počtem buněk.

Na Obr. 5.6 jsou fotografie VSMC buněk adherovaných na studovaných vzorcích. Z hlediska morfologie jsou VSMC buňky na uhlíkových vrstvách větší a více rozprostřeny. To je více zřetelné na fotografii vzorku PTFE. Pro vzorky z PET (viz Obr. 5.6) po 1. dnu od nasazení adherovaly buňky přichytily v rámci chyby měření srovnatelně jak u nemodifikovaného tak u substrátu s napařenými uhlíkovými vrstvami. Vzhledem k výsledkům smáčivosti bylo takovéto chování buněk očekáváno. Pro vzorky z PTFE (viz Obr. 5.6) po 1. dnu kultivace se buňky přichytily na substráty s napařenými uhlíkovými vrstvami lépe než na původní PTFE. Mezi substráty s napařenými uhlíkovými vrstvami buňky nejméně adherovaly na substrát deponovaný ze 6 cm. Vzhledem k výsledkům smáčivosti bylo takovéto chování buněk opět očekáváno.



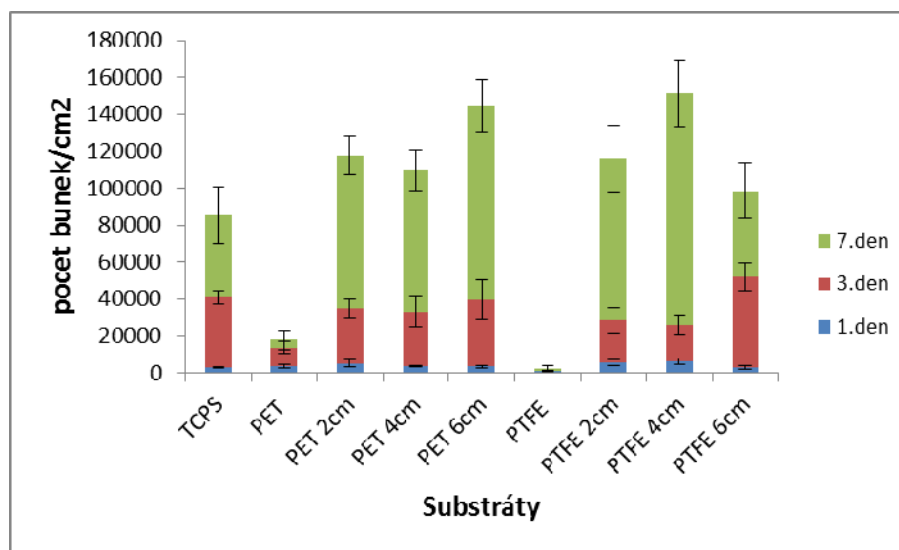
Obr. 5.6 Závislost počtu adherovaných buněk na typu vzorku PET a PTFE s uhlíkovou vrstvou napařenou ze 2, 4 a 6 cm stanovená metodou zorného pole



5.4.3 Proliferace VSMC buněk na vzorcích

Na obrázku 5.7 je patrný nárůst počtu proliferovaných buněk 3. a 7. den kultivace buněk na vzorcích s uhlíkovou vrstvou napařenou ze vzdálenosti 2, 4 a 6 cm. Množství proliferovaných buněk na vzorcích PET s napařenými uhlíkovými vrstvami je dokumentováno na *Obr. 5.7*. Ze stanovení, které probíhalo 3. den od nasazení vyplývá, že množství proliferovaných buněk na všech vzorcích mimo nemodifikovaného PTFE je v rámci chyby měření srovnatelné. Po 7 dnech kultivace buněk byl stanoven největší počet proliferovaných buněk na PTFE s vrstvou uhlíku naprášenou ze vzdálenosti 6 cm. Na ostatních vzorcích PTFE s uhlíkem byl stanoven výrazně nižší počet buněk. V případě nemodifikovaného PET byl oproti 3. dni zjištěn mírný nárůst množství proliferujících buněk. V případě PET s uhlíkovými vrstvami byl nárůst mnohem výraznější, avšak v rámci chyb měření srovnatelný. Lze předpokládat, že tloušťka vrstvy napařeného uhlíku na PET není určující pro proliferaci buněk.

Pro vzorky PTFE (viz *Obr. 5.7*) pro 3. a 7. den kultivace ve stanovení s 3. dnem kultivace vyplývá, že buňky nejvíce proliferovaly na substrát deponovaný ze 6 cm. U substrátů napařených ze vzdáleností 2 a 4 cm byla proliferace “srovnatelná”. Toto jsme na základě výsledků studia adheze neočekávali. Zdá se, že buňkám po adhezi na substrát deponovaný ze 6 cm podmínky více vyhovovaly a to vede k vyšší proliferaci než u ostatních substrátů.

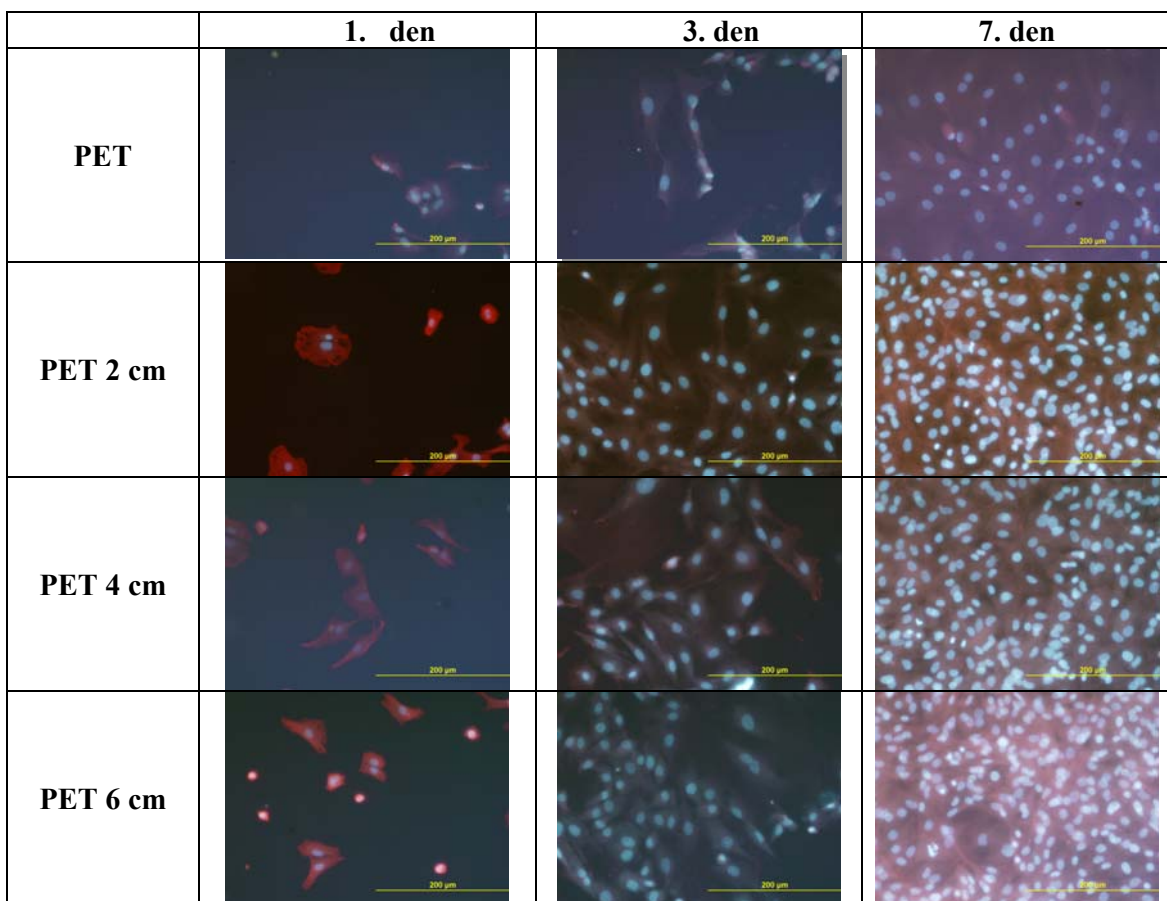


Obr. 5.7 Závislost počtu adherentních (1. den) a proliferovaných (3. a 7. den) buněk na typu vzorku PET a PTFE s uhlíkovou vrstvou napařenou ze 2, 4 a 6 cm stanovená metodou zorného pole



Při stanovení množství proliferovaných buněk po 7. dnu od nasazení jsme z předchozích výsledků očekávali nejvyšší nárůst buněk u substrátu deponovaného ze 6 cm. Ale jak je patrné z výsledků uvedených na *Obr. 5.7*, nárůst byl menší než u substrátů napařených ze vzdáleností 2 a 4 cm. Z výsledků smáčivosti bylo možné tyto výsledky ze 7. dne předpokládat. Je ale možné, že výsledky na substrátu deponovaného ze 6 cm byly zkresleny buď tím, že použitá mikropická technika neumožnila zachytit a rozlišit několik na sobě ležících vrstev buněk nebo během manipulace došlo k “odlomení” horních vrstev buněk, případně došlo k předčasnému vyčerpání živin v médiu a tím zpomalení proliferace. Pokud nedošlo k výše uvedeným skutečnostem, buňky na substrátu deponovaném ze 6 cm narostly podle výsledku, jak jsme předpokládali z výsledků smáčivosti. U substrátů napařených ze vzdáleností 2 a 4 cm byla proliferace v rámci odchylek srovnatelná.

Z *Obr. 5.8* je patrné, že množství uhlíku, které bylo napařeno na substráty PET z různých vzdáleností, není pro adhezi ani proliferaci buněk určující.

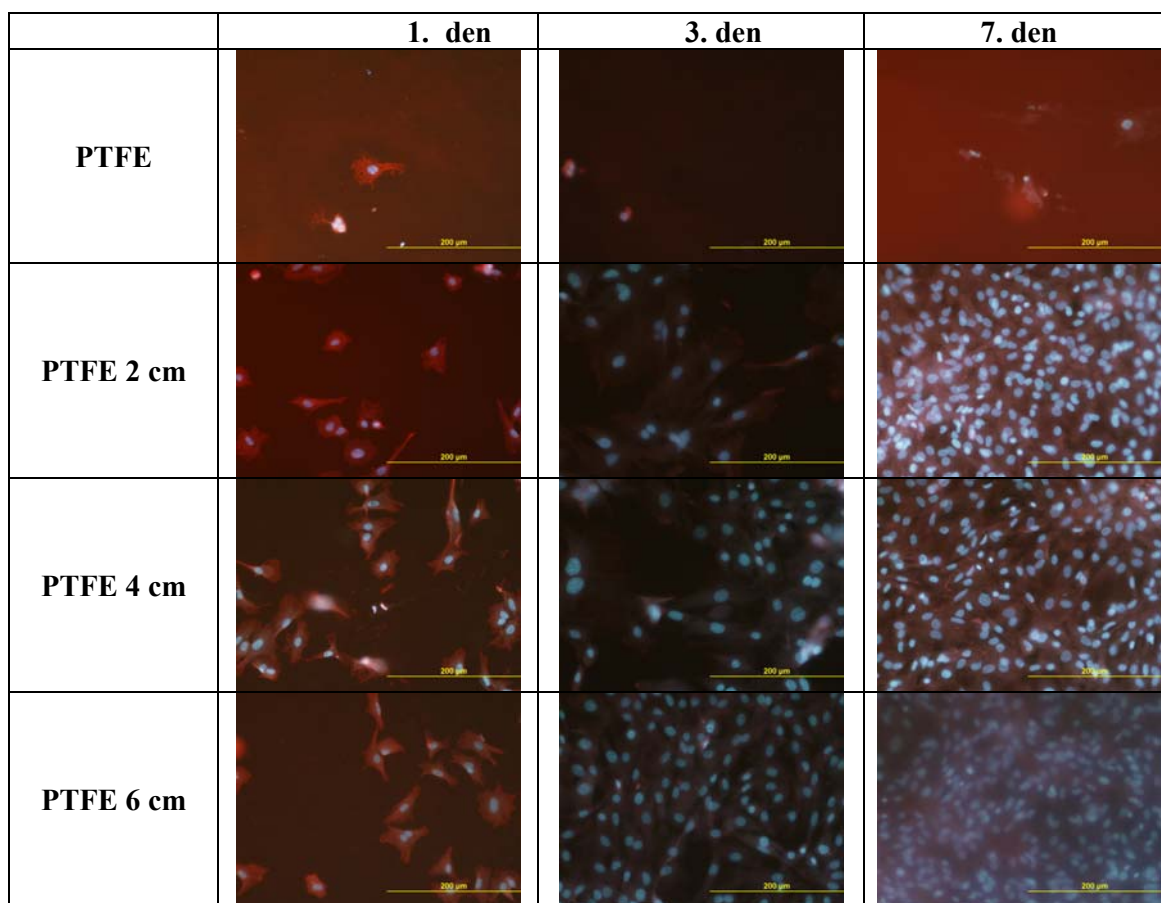


Obr. 5.8 Fotografie adherovaných (1. den) a proliferovaných (3. a 7. den) buněk na PET substráty

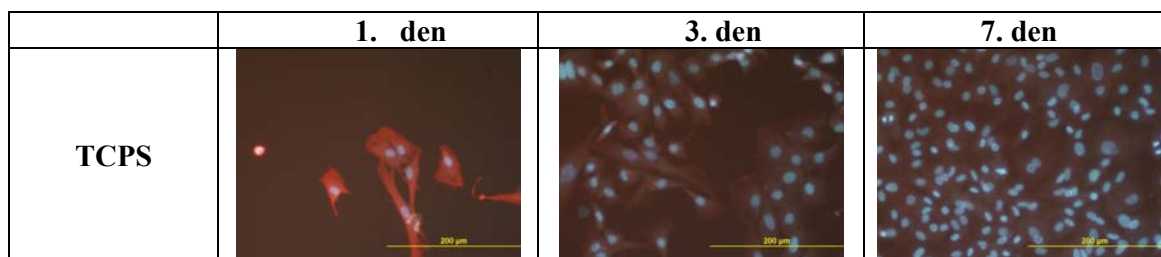


Z Obr. 5.9 je zřejmé, že na vzorcích PTFE, na které nebyl uhlík deponován, buňky nepřežívají. Na fotografiích jsou vidět jen zbytky rozpadlých buněk. Pro jejich správné přichycení, usazení a životaschopnost je důležité, aby byly buňky již po 1. dnu rozprostřené. U PTFE substrátů s uhlíkovou vrstvou deponovanou ze 2, 4 a 6 cm je patrné, že po 1. dnu lze z tvaru buněk (protáhlý a zploštělý) usuzovat, že dobře adherovaly. Na fotografiích ze 3. a 7. dne je patrný nárůst buněk hlavně u substrátu deponovaného ze 6 cm, na kterém bylo 7. den nalezeno velké množství buněk přerůstajících přes sebe.

Na Obr. 5.10 je patrná výrazná adheze a proliferace buněk u TCPS.



Obr. 5.9 Fotografie adherovaných (1. den) a proliferovaných (3. a 7. den) buněk na PTFE substráty

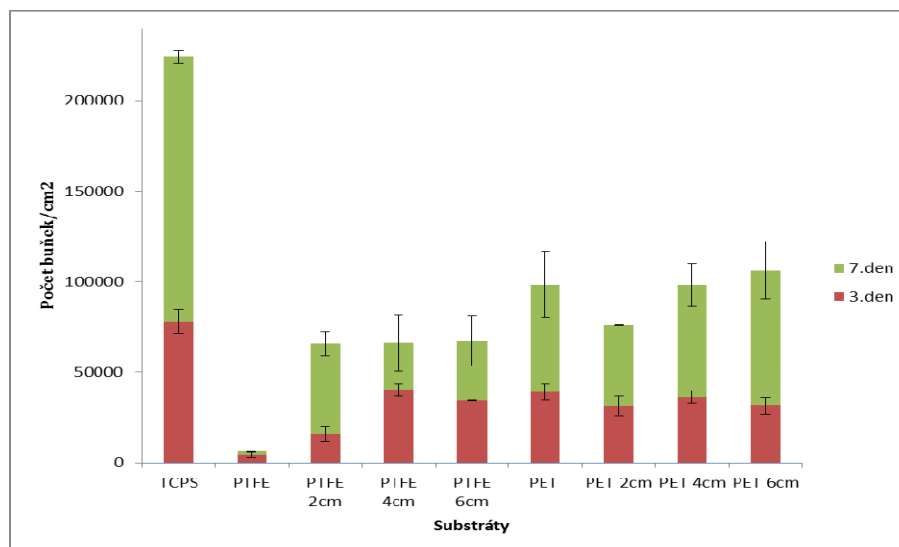


Obr. 5.10 Fotografie adherovaných (1. den) a proliferovaných (3. a 7. den) buněk na TCPS substráty



5.4.4 Stanovení počtu živých buněk pomocí automatického počítače buněk Vi-Cell

Počet buněk a jejich životaschopnost v průběhu proliferace na vzorcích byla stanovována pomocí automatického počítače buněk Vi-Cell 1., 3. a 7. den od začátku kultivace. Na *Obr. 5.11* je v případě PTFE vzorků patný vyšší počet živých buněk na vzorcích s napařovanou uhlíkovou vrstvou v porovnání s původním PTFE substrátem. Stejný výsledek jsme očekávali i u vzorků z PET z výsledků stanovení proliferace fluorescenčním mikroskopem. Podle výsledků (viz *Obr. 5.11*) je ale patrný nárůst počtu životaschopných buněk u substrátu bez uhlíkové vrstvy, který je dokonce o něco vyšší v porovnání s množstvím životaschopných buněk ze vzorků s deponovanou uhlíkovou vrstvou. Pro tento výsledek nemám přesné vysvětlení. Mohlo se jednat o chybu metodiky výpočtu nebo přístroje, nedostatečné množství vzorků, případně mohly nastat chyby během přípravy vzorků nebo v průběhu manipulace se vzorky. Odchytky v počtu životaschopných buněk mohly být také způsobeny nedostatečnou dobou působení trypsinu, protože buňky velmi dobře přilnou k povrchu substrátů a je obtížné je z nich enzymaticky uvolnit, nebo naopak příliš dlouhou dobou působení trypsinu, která může způsobit odumírání uvolněných buněk. Pro zpřesnění výsledků by bylo potřeba provedení dalších experimentů. Buňky VSMC měly průměrnou životaschopnost 80 % (3. den 83 % a 7. den 78 %). Z výsledků lze usuzovat, že deponované uhlíkové vrstvy na povrchu polymerních substrátů mají příznivý vliv na adhezi, proliferaci a životaschopnost buněk, tedy s výjimkou nemodifikovaného PET.



Obr. 5.11 Počet buněk na vzorcích studovaných materiálů stanovených 3. a 7. den kultivace automatickým počítačem buněk Vi-Cell



6. Závěr

Výsledky studia fyzikálně-chemických vlastností a interakcí buněk s uhlíkovými vrstvami připravenými metodou napařování na PET a PTFE substráty ukázaly:

- ✓ vzdálenost vzorků od zdroje depozice uhlíkových vrstev na PET substrát nemá zásadní vliv na hodnotu kontaktního úhlu na rozdíl od PTFE, kde tato hodnota na vzdálenosti depozice závisí. S klesající hodnotou kontaktního úhlu roste smáčivost povrchu polymerního substrátu,
- ✓ se zvětšující se vzdáleností vzorku od zdroje depozice uhlíkových vrstev na PET a PTFE substráty narůstá plošný elektrický odpor,
- ✓ během napařování uhlíku z uhlíkoveho vlákna dochází převážně k depozici amorfního uhlíku,
- ✓ adhezi a proliferaci hladkosvalových buněk (VSMC) z aorty potkana pozitivně ovlivňuje přítomnost uhlíku na PET a PTFE substrátech, ale nejspíš není „příliš“ závislá na tloušťce jeho vrstvy. VSMC buňky adherují k uhlíkovým vrstvám velmi dobře,
- ✓ množství buněk stanovených na vzorcích s deponovanou vrstvou uhlíku bylo vyšší než na původním PET a PTFE substrátu a srovnatelné s množstvím buněk stanovených na tkáňovém PS,
- ✓ nejlépe VSMC buňky proliferovaly na vzorcích PTFE s uhlíkovou vrstvou deponovanou ze vzdálenosti 4 a 6 cm,
- ✓ životaschopnost VSMC buněk na vzorcích studovaných materiálů byla ca 80%.



7. Literatura

- 1) ČECHOVÁ M. *Vliv teplotního namáhání na uhlíkové nanovrstvy*, Diplomová práce. VŠCHT, Praha: 2011.
- 2) MAKAJOVÁ Z. *Studium adheze buněk na roubovaném PS a PE*, Diplomová práce. VŠCHT, Praha: 2010.
- 3) GÓRECKÁ K. *Studium adheze buněk na uhlíkové vrstvě deponované na polymer*, Diplomová práce. VŠCHT, Praha: 2010.
- 4) KUBOVÁ O. *Interakce buněk s uhlíkovými vrstvami na polymerních substrátech*, Doktorské práce. VŠCHT, Praha: 2010.
- 5) VONDRÁČKOVÁ B. *Adheze buněk na roubovaném polymeru*, Diplomová práce. VŠCHT, Praha: 2010.
- 6) ŠUPOVÁ K. *Adheze buněk na uhlíkové vrstvě deponované na polymer*, Diplomová práce. VŠCHT, Praha: 2009.
- 7) BAČÁKOVÁ M. *Interakce buněk s polymery modifikovanými v plasmě*, Diplomová práce. VŠCHT, Praha: 2011.
- 8) HUBÁČEK T. *Depozice uhlíkových nanovrstev na polymerní substrát*, Diplomová práce. VŠCHT, Praha: 2009.
- 9) AMLER E, BUZGO M, FILOVÁ E, JAKUBOVÁ R, KOLÁČNÁ L, KOTYK A, MÍČKOVÁ A, PLENCNER M, PROSECKÁ E, RAMPICHOVÁ M, VARGA F, ZAVŘELOVÁ T, *Lékařské textilie – 1. díl.*; Centrum pro podporu konkurenceschopnosti v biomedicínských technologiích; Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha: 2008.
- 10) AMLER E, ČAPEK L, KOLÁČNÁ L, KOŠŤÁKOVÁ E, LUKÁŠ D, MARTINOVÁ L, NOVÁK O, VODSEĎÁLKOVÁ K, *Lékařské textilie – 2. díl.*; Centrum pro podporu konkurenceschopnosti v biomedicínských technologiích; Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha: 2009.
- 11) SALTZMAN WM, *Tissue Engineering, Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues*, Oxford University Press, USA; 2004.
- 12) IKADA Y, *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*, Academic Press; 2006.
- 13) ŠRÁMEK J, *Nanotechnologie v medicíně*, MU v brně, Brno.
- 14) PARK OB, BRONZINO JD, *Biomaterials : principles and applications*, CRC Press LLC, 2003.
- 15) WONG JY, BRONZINO JD, *Biomaterials*, Taylor & Francis Group LLC, 2007.
- 16) JAYACHANDRAN V, SE-KWON K, *Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering*, Marine Drugs (2010); 8:2252.
- 17) PATHIRAJA AG, RAJU A, *Biodegradable Synthetic Polymers for tissue engineering*, European Cells and Materials (2003); 5:1.
- 18) ŠVORČÍK, V. . Polymerní Filmy v Medicíně a Elektronice, VŠCHT Praha 2011.
- 19) ŠVORČÍK, V. . Struktura a vlastnosti polymeru – stručne, VŠCHT Praha, 2011.
- 20) WILLIAM GE, ALDO BA, JINWENZ, *Polymer nanocomposites: synthetic and natural fillers A review*, Maderas. Ciencia y tecnología, (2005), 7(3):159..
- 21) PROKOPOVÁ I, *Makromolekulární chemie*. VŠCHT, Praha: 2007
- 22) FREITAG R, *Synthetic Polymers for Biotechnology and Medicine* (Biotechnology Intelligence Unit, 4), Eureka.Com Inc, 2003
- 23) DRABOLD DA, STUMM P, FEDDRES PA, *Theory of diamondlike amorphous carbon*, Physical Review B (1994); 49 (23):16415.
- 24) ROBERTSON J, *Diamond-Like Amorphous carbon*, Material Sciens and Engineering, (2002); R37:129.
- 25) INAGAK M, *New Carbons - Control of Structure and Functions*, Elsevier Science; 2000
- 26) JACKSON MJ, *Microfabrication and Nanomanufacturing*, CRC Press; 2005



- 27) CAO G, *Nanostructures and nanomaterials: Synthesis properties and applications*, Imperial College Press, London (UK); 2004
- 28) SESHAN K, *Handbook of Thin-Film Deposition Processes and Techniques - Principles, Methods, Equipment and Applications*, William Andrew Publishing/Noyes; 2002.
- 29) MATTOX DM, *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing: Film Formation, Adhesion, Surface Preparation and Contamination Control..* Westwood, N.J.: Noyes Publications, 1998.
- 30) PIERSON HO, *Handbook of Chemical Vapor Deposition: Principles, Technology and Applications*, William Andrew, 1999.
- 31) VAN OS MT, *Surface Modification by Plasma. Polymerization: Film Deposition*, Print Partners Ipskamp, Enschede, Netherlands, 2000.
- 32) OHRING M, *Materials Science of Thin Films*. Academic Press, 2001.
- 33) ČLUPEK M, *Studium látek deponovaných na povrchu kovů metodami Ramanovy spektroskopie*, Praha, 2009 Doktorské práce. VŠCHT.
- 34) KELAR L, *Příprava Ochranných Vrstev na Polymerní Materialy Metodou Plazmochemické Depozice*, Bakalářské práce, Brno: 2007.
- 35) MALINSKY P, *Studium procesů ve strukturách polymer modifikovaných plasmatickým vybojem*, Diplomové práce, Usti nad labem: 2007.
- 36) ČERNA, Z. *Tenké vrstvy systému Ge-As-S připravené metodou spin-coating*, Diplomová práce, Pardubice: 2009.
- 37) DEKKEQA A, REITSMA K, BEUGELING T, BANTJEQA A, FEIJEN J, KIRKPATRICKB CJ, VAN AKEN WG, *Surface Modification of Hydrophobic Polymers for Improvement of Endothelial Cell-Surface Interactions*, *Clinical Materials* (1992);11:157.
- 38) IVANOVA S, *Vytváření strukturovaných tenkých*, Bakalářské práce, Brno: 2010.
- 39) VLADKOVA TG, *Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved Biocontact Properties*, *Polymer Science*(2010);10:1155.
- 40) VASITAA R, SHANMUGAM IK, KATT DS, *Improved Biomaterials for Tissue Engineering Applications: Surface Modification of Polymers*, *Current Topics in Medicinal Chemistry* (2008); 8: 341.
- 41) SALMERÓN-SÁNCHEZ M, ALTANKOV G, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, InTech, 2010.
- 42) RAO, SHREYAS S, WINTER, JESSICA O, *Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering*, *Frontiers in neuroengineering*, 2009.
- 43) [cit. 2011-11-11], Dostupné z WWW:<https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=15113>.
- 44) LATOUR RA, *Biomaterials Protein-Surface Interactions*, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Taylor & Francis, 2005.
- 45) BAČÁKOVÁ L, FILOVÁ E, RYPÁČEK F, ŠVORČÍK V, STARÝ V, *Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering*, *Physiological Research*, (2004), 53:35.
- 46) PULEO DA, BIZIOS R, *Biological Interactions on Material Surfaces: Understanding and Controlling Protein, Cell and Tissue Responses*, Springer. New York, NY, 2009.
- 47) CUI FZ, JIAO YP, *Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering*. *Biomedical Materials*, (2007), 2(4):R24.
- 48) CASTNER D G, RATNER BD, *Surface Modification of Polymeric Biomaterials*, Springer, 1997.
- 49) XU Z-K, HUANG X-J, WAN L-S, *Surface Engineering of Polymer Membranes*. London : Springer, 2009.



- 50) GRÉGR J, *Povrchové vlastnosti uhlíkových vláken*, TU v Liberci, 2004, [cit. 11.11.2011], Dostupné z WWW: <[http://centrum.tul.cz/centrum/centrum/3Aplikace/3.1_zaverecne_zpravy/\[3.1.09\].pdf](http://centrum.tul.cz/centrum/centrum/3Aplikace/3.1_zaverecne_zpravy/[3.1.09].pdf)>.
- 51) KORMUNDA M, *Reaktivní naprašování – principy*, Univerzita J.E. Purkyně: Seminář 2008, [cit. 11.11.2011], Dostupné z WWW: <<http://phymatsci.webs.com/Prednasky/Kormunda%20-%20Reaktivni%20naprasovani.pdf>>.
- 52) KOPECEK M, BACA KOVA L, VACIK J, FENDRYCH F, VORLICEK V, KRATOCHVILOVA I, LISA V, VAN HOVE E, MER C, BERGONZO P, NESLADEK M, *Improved adhesion, growth and maturation of human bone-derived cells on nanocrystalline diamond films*, *physica status solidi*, (2008), 205:2146.
- 53) STAMM M, *Polymer Surfaces and Interfaces.*, Springer, 2008.
- 54) ŠVORČÍK V, HUBÁČEK T, SLEPIČKA P, SIEGEL J, KOLSKÁ Z, BLAHOVÁ O, MACKOVÁ A, H NATOWICZ V, *Characterization of carbon nanolayers flash evaporated on PET and PTFE*, *Carbon* (2009), 47:1770.
- 55) HUBÁČEK T, LYUTAKOV O, RYBKA V, ŠVORČÍK V, *Electrical properties of flash evaporated carbon nanolayers on PTFE*, *Journal of Materials Science*. (2010), 45:279.
- 56) MILTAL KL, *Polymer Surface Modification: Relevance to Adhesion*, Vol. 4, pp. 251-262, VSP 2007.
- 57) KRÁSNÝ I, *Měření kontaktních úhlů smáčení a určování povrchové energie plastů*, Diplomova práce, Brno 2010.
- 58) BARTOVSKÁ L, ŠIŠKOVÁ M, *Měření úhlu smáčení*, VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2011-11-11], Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_uhlu_smaceni.html>.
- 59) WIENER, J. . *Kontaktní úhel*, TUL Liberec, 2008 [cit. 2011-11-11], Dostupné z WWW: <http://www.ft.tul.cz/depart/ktc/include/osobni_stranky/vikova.martina/teaching/11smac3.pdf>.
- 60) YAGLIOGLU O, JOHN HART A, MARTENS R, SLOCUM AH, *Method of characterizing electrical contact properties of carbon nanotube coated surfaces*, *Review of Scientific Instruments*, (2006), 77:095.
- 61) HOLUB J, *Smáčivost povrchu vůči kapalinám a druhá vizkozita kapalin*, Bakalářská Práce, Brno 2010.
- 62) KUTASI K, BIBINOV N, VON KEUDELL A, WIESEMANN K, *wettabilities of plasma deposited polymer films*, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, (2005);7(5):2549.
- 63) MASOPUST J, PRŮŠA R, *Patobiochemie Buňka*, 2LF UK, Praha 2003.
- 64) ZÁVODSKÁ R, *Biologie buněk*, Scientia, 2006
- 65) *Cytologie*, [cit. 2011-11-11], Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/ptacek/cytologie6.htm>>.
- 66) *Cell biology wikipedia*, [cit. 2011-11-11], Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_biology>.
- 67) *Molecular Biology*, [cit. 2011-11-11], Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_biology>.
- 68) MARES V, *Fyziologie živočichu*, Přírodovědecká fakulta Univerzity J.E. Purkyně, eKniha 2006, [cit. 2011-11-11], Dostupné z WWW: <http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Fyziologie_zivocichu_a_cloveka.pdf>.
- 69) GANONG WF, *Přehled lékařské fyziologie*, Galén, 2005.
- 70) ALBERTS B, WALTER P, *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*, Espero Publishing, 2005.
- 71) BEHRENS J, NELSON WJ, *Cell Adhesion*, Springer, 2004.



- 72) FRESHNEY RI, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Wiley-Blackwell, 2010.
- 73) VUNJAK-NOVAKOVIC G, FRESHNEY RI, *Basic Principles of Cell Culture*, John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- 74) VEJRAZKA M, *Bunecne kultury*, 1.LF UK v Praze 2008.
- 75) ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science; 2002.
- 76) TSACHI L, HASLETT TL, MOSKOVITS M, *Distinguishing disorder-induced bands from allowed Raman bands in graphite*, Physical Review B (2002);66(19):195110
- 77) TAN PH, DENG YH, ZHAO Q, CHENG WC, *The intrinsic temperature effect of the Raman spectra of graphite*, Applied Physics Letters (1999), 74:1818.
- 78) JORIO A, FERREIRA HM, MOUTINHO VO, STAVALE F, ACHETE CA, CAPAZ RB, *Measuring disorder in graphene with the G and D bands*, Physics Status Solidi B, (2010), 247:2980.
- 79) YASUDA E, INGAKI M, KANEKO K, ENDO M, OYA A, TANABE Y, *Carbon Alloys: Nove Concepts to Develop Carbon Science and Technology*, Elsevier Science; 2003.

Převzaté obrázky:

Obr. 2.5, http://www.nims.go.jp/bmc/group/bfm/index_e.html, [cit. 2011-11-11]

Obr. 2.5, <http://nanostructure.usc.edu/research/bio4.shtml>, [cit. 2011-11-11]

Obr. 2.6, <http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/labchcht-001/n150013-b6.pdf>, [cit. 2011-11-11]

Obr. 2.7, <http://ocw.mit.edu/courses/materials-science-and-engineering/3-051j-materials-for-biomedical-applications-spring-2006/lecture-notes/lecture9.pdf>, [cit. 2011-11-11]

Obr. 2.8, http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cell_membrane_detailed_diagram_4.svg, [cit. 2011-11-11]

Obr. 2.11, http://giobio.ic.cz/obrazky/obecna_biologie/buncyk.jpg, [cit. 2011-11-11]

Obr. 4.4, http://atraktivnibiologie.upol.cz/?stranka=obrazova_genetika, [cit. 2011-11-11]

Tab. 4.1, http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000200004, [cit. 2011-11-11]

Tab. 4.1, <http://www.anticopumps.co.in/blog/?p=113>, [cit. 2011-11-11]

Tab. 4.1, <http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Polystyrene?uselang=cs>, [cit. 2011-11-11]