

Biologická rozhraní v simulovaných *in vivo* podmínkách

Veronika Pleváková

Bakalářská práce
2017

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Pleváková**
Osobní číslo: **T14344**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biologická rozhraní v simulovaných in vivo podmínkách**

Zásady pro vypracování:

Předmětem práce je v teoretické rovině seznámení se s problematikou vlivu povrchových vlastností, mechanického namáhání a kultivačních podmínek na buněčné reakce. V návaznosti na znalosti získané v teoretické části se poté navrhne série pokusů ve kterých bude srovnána buněčná adheze a proliferace na chemicky i topograficky stejných površích v podmínkách běžné kultivace a kultivace v bioreaktoru.



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Disertační práce dr. Unadkat: Materiomics: Deciphering topographic cues for cell surface interactions

Biomaterials: 'Braille code' for cell growth. Nature. 2011;478:9.

Baker M. Trying out topographies. Nat Meth. 2011;8:900.

Pamies P. Screening for topographies. Nat Mater. 2011;10:808.

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.

DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 9780387981604

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

2. ledna 2017

Termín odevzdání bakalářské práce:

17. května 2017

Ve Zlíně dne 1. března 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: PLEVAŘKOVÁ VERONIKA

Obor: POLYMERNÍ MATERIÁLY
A TECHNOLOGIE

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 10.5.2014

..... Plevařková

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na buněčný růst v simulovaných *in vivo* podmínkách. V teoretické části jsou shrnuty dosavadní znalosti ohledně biomateriálů, vlivu povrchových vlastností, mechanického namáhání a kultivačních podmínek na chování buněk. V praktické části byla buněčná morfologie sledována pomocí invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem na chemicky i topograficky stejných površích v podmínkách běžné kultivace a kultivace v bioreaktoru. V poslední části byl proveden MTT test, díky kterému byly získány hodnoty buněčné viability u všech vzorků.

Klíčová slova: biomateriál, polystyren, bioreaktor, *in vivo*

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on cell growth in simulated *in vivo* conditions. The theoretical part summarizes the current knowledge about biomaterials, influence of surface properties, mechanical stress and culture conditions on cell behaviour. In the practical part, cell morphology was monitored by an inverted phase microscope on both chemically and topographically identical surfaces under conditions of conventional cultivation and cultivation in the bioreactor. In the last part, the MTT test was performed, resulting in cell viability for all samples.

Keywords: biomaterial, polystyrene, bioreactor, *in vivo*

Ráda bych poděkovala doc. Ing Petru Humpolíčkovi, Ph.D za cenné rady a odborný dohled při psaní této bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Zdence Capákové, Ph.D a Mgr. Petře Rejmontové, za ochotu a pomoc při realizaci praktické části. V neposlední řadě patří mé poděkování rodině za podporu ve studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOMATERIÁLY	12
1.1 HISTORIE BIOMATERIÁLŮ	12
1.2 KLASIFIKACE BIOMATERIÁLŮ.....	13
1.2.1 Kovy.....	13
1.2.2 Keramika	14
1.2.3 Polymery	14
1.2.3.1 Přírodní polymery	15
1.2.3.2 Syntetické polymery	15
1.2.4 Kompozity.....	15
1.3 APLIKACE BIOMATERIÁLŮ.....	15
1.3.1 Kardiovaskulární implantáty	16
1.3.2 Zubní implantáty	17
1.3.3 Ortopedické implantáty	18
1.3.4 Oční implantáty	19
2 POVRCHOVÉ VLASTNOSTI	20
2.1 POVRCHOVÁ ENERGIE	20
2.2 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ	20
2.3 OBJEMOVÉ VLASTNOSTI	21
2.4 MORFOLOGIE	21
2.5 TOPOGRAFIE.....	21
2.6 METODY STUDIA POVRCHOVÝCH VLASTNOSTÍ	22
2.6.1 Mikroskopické metody.....	22
2.6.2 Spektroskopické metody	22
2.6.3 Kontaktní úhel.....	23
3 BIOLOGICKÁ ROZHRAŇÍ	25
3.1 VLIV MATERIÁLOVÉHO POVRCHU NA BIOLOGICKÉ SYSTÉMY	25
3.2 ADSORPCE PROTEINŮ	25
3.3 INTERAKCE S KRVÍ.....	27
3.4 ADHEZE BUNĚK	27
3.5 DIFERENCIACE BUNĚK.....	28
4 IN VIVO / IN VITRO STUDIE	30
4.1 IN VIVO STUDIE	30
4.2 IN VITRO STUDIE.....	31
4.3 SROVNÁNÍ STATICKÝCH A DYNAMICKÝCH KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK	31
4.4 BIOREAKTORY A MECHANICKÁ STIMULACE	32
4.4.1 Reaktor s mechanickou stimulací.....	32

4.5	TECHNOLOGIE LAB ON THE CHIP S UŽITÍM DYNAMICKÝCH PODMÍNEK KULTIVACE.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST		34
5	MATERIÁL A METODIKA	35
5.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ	35
5.1.1	Polystyren.....	35
5.2	STERILIZACE VZORKŮ	36
5.3	POUŽITÁ BUNĚČNÁ LINIE A KULTIVAČNÍ MÉDIUM	36
5.4	PŘÍPRAVA BUNĚK	37
5.5	POSTUP TESTU	37
5.6	BUNĚČNÁ MORFOLOGIE	39
5.7	MTT TEST	40
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
ZÁVĚR		49
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		50
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		57
SEZNAM OBRÁZKŮ		59
SEZNAM TABULEK.....		60

ÚVOD

Biomateriály byly po velmi dlouhou dobu používány pro jednoduché aplikace, které měly účel spíše kosmetický než funkční. Poté došlo k navrhování biomateriálů použitelných v kardiovaskulárních, zubních, ortopedických a oftalmologických operacích. Je podstatné, aby implantovaný biomateriál byl organismem přijat a nevyvolal tak žádnou negativní reakci. Z tohoto důvodu jsou velmi důležité vlivy materiálového povrchu na biologický systém, jakožto adsorpce proteinů a následná buněčná adheze a diferenciace. Důležitou roli také hraje struktura a povrchová morfologie materiálu, které přímo ovlivňují interakci mezi implantovaným materiálem a tkání.

Každý biomateriál musí nejprve projít sérií testů, než je plně používán v lidském těle. Obecně platí, že se používají nejčastěji dva typy testů a to *in vivo* a *in vitro* testy. Pro lepší a kvalitnější výsledky slouží *in vivo* studie, ale z etických důvodů je používána v menší míře jako *in vitro* studie. Hodnocení bezpečnosti materiálu by mělo být také provedeno podle mezinárodní normy ISO 10993 pro použití řízení rizika na zdravotnické prostředky.

V této práci budou použity ke srovnání jak statické, tak i dynamické kultivační podmínky. Jako zástupce dynamické kultivační podmínky byl vybrán reaktor s mechanickou stimulací, který simuluje *in vivo* podmínky. Tento bioreaktor reguluje teplotu, živiny, koncentraci kyslíku a hodnoty pH. Je tedy ideální pro překonání určité nevýhody statické kultury, jelikož rotační pohyb zabraňuje sedimentaci a vytvořená suspenze prostředí posiluje interakce mezi buňkami a simuluje tak skutečné prostředí živého organismu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁLY

Existuje mnoho definic termínu biomateriál. Pro účely této bakalářské práce je vhodná následující definice: „Biomateriál, je syntetický materiál, který je určen k náhradě orgánů a tkání nebo pro interakci s biologickým systémem v lidském těle“ [1]. Existuje velké množství biomateriálů, a tedy i jejich členění. Z praktického pohledu je pak podstatné, že mohou mít různé specifické a charakteristické vlastnosti v závislosti na jejich aplikaci. Každé místo aplikace má specifické požadavky vycházející z anatomie, fyziologie, či mechanických vlastností. Mechanické vlastnosti, jako je pevnost, pružnost, tuhost a propustnost se budou lišit v různých místech. Reakce organismu s materiálem lze rozdělit do tří hlavních kategorií: bioinertní, bioaktivní a bioresorbovatelné. Bioinertní reakce zahrnují minimální interakci materiálu s okolní tkání. Bioaktivní materiál naopak komunikuje s okolní tkání, což ovlivňuje např. adhezi, proliferaci či diferenciaci buněk. Bioresorbovatelný materiál se odbourává a je odstraněn pomocí metabolické aktivity lidských buněk [2]. Kromě výše uvedených vlastností je klíčová biokompatibilita, „schopnost materiálu vyvolávat požadovanou hostitelskou reakci v konkrétních aplikacích“. Dále by měly být biomateriály schopné usnadňovat biochemické a biologické procesy potřebné pro růst či regeneraci tkáně v těle. Před implantací by měly být sterilizovány, aniž by došlo k jejich poškození. Úspěch implantace závisí i na mnoha jiných faktorech, jako je konstrukce implantátu, chirurgická technika a zdravotní stav pacienta. Volba správného biomateriálu je velmi důležitá a musí se vzít v úvahu před samotnou implantací [3]. Základem poznání vlastností biomateriálů jsou *in vitro* testy za použití alternativních modelů. Z tohoto pohledu je pak klíčovým poznáním chování modelových systémů za běžných (statických) kultivačních podmínek a za podmínek simulujících *in vivo* podmínky, tedy např. pomocí dynamických systémů kultivace.

1.1 Historie biomateriálů

Použití biomateriálů nastalo prakticky až po příchodu aseptické chirurgické metody vyvinuté Dr. J. Listerem v roce 1860. Dříve byly chirurgické zákroky s implantáty i bez nich obecně neúspěšné v důsledku infekce, která nastala. Nejvíce úspěšné implantáty byly v kosterním systému. Kostní destičky byly zavedeny v roce 1900 na pomoc při fixaci zlomeniny. Mnohé z těchto destiček byly zlomeny v důsledku špatné mechanické konstrukce, kdy byly destičky příliš tenké a měly v rozích koncentrované napětí. Také materiály, jako vanadová ocel, které byly vybrány pro své dobré mechanické vlastnosti, rychle

zkorodovaly a způsobily špatné hojení. Brzy následovaly lepší materiály a jejich konstrukce. V roce 1930 byla zavedena nerezová ocel a kobaltová slitina chromu, poté bylo dosaženo lepšího úspěchu u fixace zlomeniny, kde byla provedena první implantace. Následně bylo zjištěno, že úlomky z polymetylmetakrylátu (PMMA), kterými byli zraněni vojenští piloti za 2. Světové války, nejsou chronicky nepříznivé pro lidské tělo. Polymetylmetakrylát se proto stal používaným materiálem pro výměnu rohovky a náhradu části poškozené lebky [4]. V roce 1937 byl poprvé úspěšně použit zubní implantát. První cévní protéza byla implantována u lidí v roce 1952 a následně v roce 1959 byl poprvé implantován kardiostimulátor. Poté v roce 1960 nastaly další pokroky v materiálech v chirurgické technice, kdy byly nahrazeny srdeční chlopně a použity kloubní náhrady. V roce 1964 Dr. Branemark objevil titan, jako vhodný materiál pro zubní a ortopedické implantáty [5]. K rozvinutí kyčelní protézy došlo mezi lety 1968-1972 a poté mezi lety 1978-1986 došlo k vyvinutí designu prvního implantovaného stentu [2]. V dnešní době jsou biomateriály velmi využívány. Existují akademická oddělení, programy a výzkumné ústavy zaměřené speciálně na vzdělání a průzkum v oblasti biomateriálů [6].

1.2 Klasifikace biomateriálů

Materiály používané v medicíně mohou být klasifikovány do tří základních skupin podle druhu zvoleného materiálu: kovy, keramiky a polymery. Tento systém je založen především na chemickém složení a na chemických vazbách. Čtvrtým druhem materiálu je kompozit, který je kombinací dvou nebo více materiálů z uvedených tří základních tříd [7].

1.2.1 Kovy

Kovy se používají jako biomateriály z důvodů jejich vynikající elektrické a tepelné vodivosti a dobrým mechanickým vlastnostem [8]. Materiály jsou složeny z jednoho nebo více kovových prvků (např. Fe, Ni, Al, Cu, Zn a Ti) a často také i z nekovových prvků (např. C, N a O) ve velmi malém množství. Atomy kovů a jejich slitin jsou velmi uspořádané. Elektrony atomů kovů jsou delokalizované a tvoří elektronový oblak, ve kterém jsou uloženy kovové ionty. Kovová vazba je elektrostaticky přitažlivá síla mezi záporně nabitým elektronovým obalem a kladně nabitými ionty kovů. Častým problémem pro kovy a slitiny v mokřém nebo slaném prostředí je koroze. Lidský organismus je agresivní prostředí pro kovové implantáty, jelikož obsahuje všechny tři reaktivní prvky: kyslík, vodík a iontové soli. Z tohoto důvodu je koroze nejzávažnějším problémem trvale implantovaného

kovového materiálu [7]. Použití kovových materiálů je všestranné. Nejčastěji jsou používány jako náhrady kostní hmoty, a to buď jako trvalé protézy (kyčelní protézy a zubní implantáty) nebo jako dočasné implantáty (desky, čepy, šrouby a tyče pro fixaci zlomenin) [9].

1.2.2 Keramika

Použití keramiky sahá až do devatenáctého století, kdy byl síran vápenatý používán jako lepidlo pro fixaci kostí. V současné době se běžně používají oxidy kovů (např. Al_2O_3 a MgO , SiO_2 a ZrO_2), fosforečnan vápenatý a sklokeramika. Oxidy kovů jsou téměř bioinertní v biologických prostředích, zatímco fosforečnan vápenatý a sklokeramika jsou bioaktivní, protože se mohou vázat na kost v místech implantace [9]. Až do nedávné doby bylo použití keramiky poněkud omezené v důsledku křehkosti, nízké pevnosti v tahu a nízké rázové houževnatosti. V posledních letech si lidé uvědomili, že keramika a její kompozity mohou být také používány pro nahrazení různých částí těla, zejména kostí, díky dobré biokompatibilitě. Jejich relativní inertnost k tělesným tekutinám, vysoká pevnost a esteticky příjemný vzhled vedly k použití keramiky v zubním lékařství jako zubní korunky [8]. Používané implantované keramiky můžeme rozdělit na vstřebatelné a nevstřebatelné biokeramiky. Nevstřebatelné biokeramiky jsou bioaktivní a podporují tvorbu biologické vazby mezi tkání a implantátem, aniž by docházelo k degradaci v průběhu času. Na druhou stranu vstřebatelné biokeramiky, jako například fosforečnan vápenatý, hydroxyapatit a síran vápenatý, degradují a jsou nahrazeny živou tkání [10].

1.2.3 Polymery

Nejširší třídu biomateriálů tvoří polymery skládající se z opakujících se malých chemických jednotek zvaných monomery. V dnešní době je řada polymerů k dispozici pro výrobu nejrůznějších biomateriálů. Polymery mohou být jak přírodního, tak i syntetického původu [3]. I když polymery mají mnoho žádoucích charakteristik, mají také tendenci mít nízkou mechanickou pevnost v porovnání s kovy a keramikou, proto jsou často používány v rekonstrukci měkkých tkání. Hrají tedy klíčovou roli ve tkáňovém inženýrství [8].

1.2.3.1 Přírodní polymery

V průběhu posledních 40-50 let, jsme svědky značného nárůstu zájmu o polymery přírodní, jako např. kolagen, kyselina polymléčná, želatina a kopolymer kyseliny glykolové [11]. Přírodní biomateriály mají řadu výhod, jako je vynikající biokompatibilita a snadné zpracování. Můžou mít také tu výhodu, že indukují pouze mírné zánětlivé odpovědi. Nevýhodou je pak nehomogenita materiálu s ohledem na jeho zdroj [12].

1.2.3.2 Syntetické polymery

Na rozdíl od přírodních polymerů se syntetické polymery vyrábí řízenými procesy, které poskytují produkty konzistentních vlastností [12]. Mezi pozoruhodné příklady syntetických polymerů patří polyetylen, polyethylentereftalát a polymetylmakrylát. Díky jejich biokompatibilitě, flexibilitě, nízké hmotnosti a tvárné povaze jsou tyto polymery využívány v širokém rozsahu biomedicínských aplikací [3].

1.2.4 Kompozity

Kompozitní materiály jsou pevné látky, které obsahují dva nebo více rozdílných konstrukčních materiálů. Tyto materiály nabízí celou řadu výhod, např. možnost kontroly nad vlastnostmi materiálu [8]. Cílem návrhu kompozitů je dosáhnout kombinaci nejlepších vlastností z daného materiálu. Pro biokompozity je důležité, aby každá složka kompozitu byla biokompatibilní [7]. Aplikace kompozitních materiálů je široká. Ve velkém měřítku se používají jako dentální výplně a ortopedické implantáty s porézními povrchy [8].

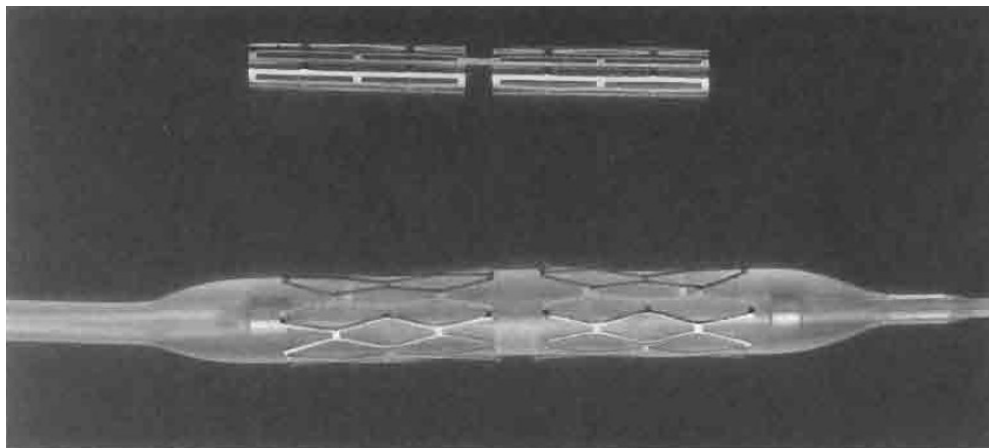
1.3 Aplikace biomateriálů

Velká rozmanitost a propracovanost materiálů, které se používají v medicíně a biotechnologii, jsou svědectvím významných vědeckých a technologických pokroků, ke kterým došlo v průběhu posledních 50 let. Jsou navrhovány tak, aby byly vhodné pro použití v přímém kontaktu s biologickým systémem. Kontakt biomateriálu je realizován třemi způsoby. Jsou to permanentní implantace (> 30 dní, např. srdeční chlopně, náhrady kloubů a nitrooční čočky), dlouhodobé aplikace (24 hodin-30 dní, např. fixace zlomenin, kontaktní čočky a zubní protézy) a nakonec materiály s přechodným použitím (≤ 24 hodin, např. jehly pro očkování, hojení ran a přístroje pro mimotělní oběh). Kritéria pro výběr vhodného biomateriálu jsou určena podle jeho specifické aplikace [5, 9].

1.3.1 Kardiovaskulární implantáty

Během uplynulých 30 let bylo dosaženo významného pokroku v použití biomateriálů k rozvoji kardiovaskulárních zařízení. V případě kardiovaskulárních zařízení je třeba vzít v úvahu interakce s krví, s přilehlými okolními tkáněmi a navíc také adhezi a růst bakterií v blízkosti zařízení. Tyto materiály mohou být jak přírodní, tak i syntetické [6]. Materiály vhodné pro regeneraci srdce či náhrady musí být biokompatibilní a nesmí vyvolávat nežádoucí reakce. Mezi přírodní materiály patří želatina, kolagen, alginát, chitosan a fibrinové lepidlo. Kolagen, hlavní součást extracelulární matrix, je jedním z populárních přírodních materiálů pro použití v srdečních implantátech. Alginát je polysacharid z mořských řas a byl intenzivně zkoumán při hojení ran, dodávce léčiva a při tkáňovém inženýrství. Chitosan byl používán pro zlepšení endotelu a pro větší přežití buněk. Fibrinové lepidlo, které bylo vyrobeno převážně z fibrinogenu a trombinu, se používá pro vytvoření fibrinové sraženiny. Obvykle se používá k opravě stěny levé komory a k utěsnění prasklého myokardu. Naopak syntetické materiály jsou vyrobeny ze syntetického polymeru, kovu nebo jejich kombinací. Materiály mají vynikající pevnost a trvanlivost, ale přítomné zvýšení toxicity vytváří problémy [13].

Mezi kardiovaskulární implantáty patří protetické srdeční chlopně, které se používají k nahrazení přirozené srdeční chlopně, pokud přestává plnit svou normální funkci z důvodu nemoci. Poprvé byly použity u lidí v roce 1960. Jsou vyrobené z pyrolytického uhlíku, Co-Cr slitin a titanu. Dalšími implantáty jsou syntetické cévní štěpy, které jsou vyrobeny z polyuretanů, silikonů a PTFE, který je uspokojivý, pokud jde o pevnost v tahu. Stent, který je na obrázku 1, je další implantát vyrobený z inertních materiálů, jako je titan, tantal a NiTi slitiny. Stent slouží jako dočasné nebo trvalé vnitřní lešení.



Obrázek 1: Koronární stent tepen [6]

Často používaný je také kardiostimulátor. Elektrody kardiostimulátorů jsou vyrobeny z platiny, stříbra, titanu, nerezové oceli nebo ze slitin kobaltu. Perfluorchemikálie slouží jako skupina sloučenin, které se ukázaly jako slibné v náhradě krve. Některé z nich mohou nést stejné množství kyslíku jako hemoglobin. Do budoucna mají biomateriály velký potenciál v srdeční reparaci a regeneraci [13, 6].

1.3.2 Zubní implantáty

Snad nejdůležitějším aspektem implantátů je, že mohou ovlivňovat kvalitu lidského života. Během 18. a 19. století syntetické materiály a jejich design pokročily do stádia, kdy byly stanoveny fyzikální, mechanické, chemické, elektrické a biologické vlastnosti zubních implantátů. Syntetické materiály pro kořenové formy byly původně vyrobeny z drahých kovů, jako jsou zlato, platina, iridium a paladium. Vysoké náklady na materiály a vysoká pevnost brzy vedly k používání slitin, jako je tantal, titan, zirkon a kovových systémů z lehkých slitin na bázi kobaltu a železa. Od roku 1950 se začaly používat i ostatní materiály a to keramiky, atomy uhlíku, polymery a kompozity. Zubní systémy implantátů se dají rozdělit na ty, které jsou přímo v kontaktu s tkáněmi a ty, které nahrazují části zubů. Kromě tohoto rozdělení je lze ještě dále dělit na endostální a subperiostální. Mezi nejčastěji používané materiály pro endostální implantáty, což jsou různé kořenové formy (čepele, sponky, rámy, šrouby a dráty) patří titan, slitiny titanu, oxid hlinitý a povlaky z keramiky vyrobené z fosforečnanu vápenatého. Subperiostální implantáty se skládají z kovové mřížky, která je implantovaná pod periostu z alveolárního výběžku [6,14]. Naopak intraorální protézy, jako jsou korunky, můstky a zubní protézy, zahrnují širokou škálu kovů, keramik, polymerů a kompozitů. Nejčastěji se však používají zesíťované polymery. Tyto vysoce zesíťované polymery musí mít navíc stejné vlastnosti jako má zubní sklovina nebo tkáň, na kterou mají být připojeny. Obecně tedy platí, že zubní protézy se skládají ze základního materiálu, jako je polymetylmetakrylát a pružného obkladového materiálu etylenvinylacetátu. Polymetylmetakrylát se běžně používá jako základní materiál pro zubní protézy kvůli jeho dobré biokompatibilitě, snadné manipulaci a nízké toxicitě. Etylenvinylacetát je netoxický materiál s minimální absorpcí vlhkosti, dobré pružnosti, snadné výroby a dobrými mechanickými vlastnostmi. Jako materiály na zubní náhrady se používají nerezová ocel, Co-Cr-Mo slitiny, Ti slitiny a biosklo [9, 15].

1.3.3 Ortopedické implantáty

S rostoucím využíváním ortopedických implantátů na celém světě, existuje stále velký zájem o vývoj nových technologií, s cílem dále zlepšit efektivní klinickou účinnost současných léčebných zařízení. Za posledních 60 let byly biomateriály pro ortopedické aplikace přesunuty z dostupných materiálů pro různé aplikace, do vývoje materiálů se schopností komunikovat s biologickým prostředím. Ortopedické implantáty jsou určeny k provádění určité biologické funkce, nebo opravy odlišné tkáně, jako jsou kosti, chrupavky, vazy a šlachy. Moderní materiály, jako je kobalt, chrom, polyetylén a keramiky (oxid hlinitý, oxid zirkoničitý, lze vidět na obrázku 2), jsou přijímány jako sypané materiály pro ortopedické implantáty [17, 18].



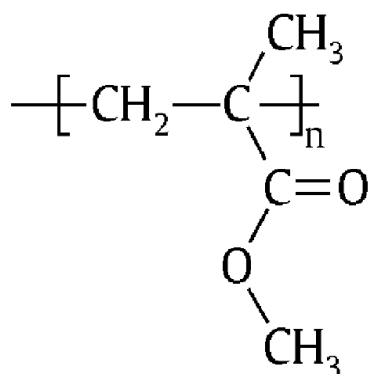
Obrázek 2: Ukázka ortopedických protéz z keramického materiálu [19].

Stále více používané biomateriály pro spinální implantáty jsou polyetherketony, které se také používají jako stehenní stonky, nosné materiály pro kyčle a kolena. Silikony jsou tradičně známé pro jejich biokompatibilitu. Nejčastější aplikace silikonu jsou kloubní implantáty, např. klouby prstů. Dokonce i teď silikon zůstává nejrozšířenějším typem malých kloubních implantátů [18]. V dnešní době jsou velmi používány i bioresorbovatelné implantáty, které jsou často vyrobeny z kyseliny polyglykolové (PGA) a kyseliny polymlečné (PLA). Postupem času vedou ke vstřebání implantátu a jeho místo je naplněno novou kostní tkání. Pokud se jedná o celkovou kyčelní protézu, je důležité, aby hlava stehenní protézy byla vyrobena ze slitiny kobaltu, chromu nebo keramiky. Součástí, která ve skutečnosti

nahrazuje stehenní kost, je z titanové slitiny. Způsob jak zvolit vhodné materiály pro ortopedické operace závisí na specifickém umístění implantátu [19].

1.3.4 Oční implantáty

Pro korekci očních nedostatků způsobených chorobami, věkem a očním traumatem se používají zařízení, vyrobené ze široké škály biomateriálů. Rozmanité polymerní zařízení, jako jsou brýle, kontaktní čočky a intraokulární implantáty, se používají pro korekci optické funkce oka. Moderní implantáty jsou často založeny na hydroxyapatitu nebo na porézním polyetyleny. Hlavními vlastnostmi materiálů u kontaktních čoček, kromě požadovaných optických vlastností, chemické stability a dobré výrobní ceny, jsou vysoká propustnost pro kyslík, smáčenlivost a odolnost proti hromadění usazenin na povrchu čočky. Musí být také snadno čistitelné a dezinfikovatelné. V roce 1940 byl objeven polymethylmetakrylát (PMMA, viz obrázek 3), za předpokladu využití jiného materiálu pro výrobu očních přístrojů. Tento objev vedl k vývoji současných čoček. PMMA má dobré optické vlastnosti, je lehký, má přijatelnou smáčenlivost a výjimečnou trvanlivost. Nízká propustnost pro kyslík tohoto materiálu omezuje dlouhodobé nošení těchto čoček. Kvůli propustnosti pro kyslík by měla být ideální kontaktní čočka vyrobena z polydimetylsiloxanu [6, 16]. V roce 1961 Otto Wichterle poprvé vyrobil měkké kontaktní čočky z polyhydroxyethylmetakrylátu (PHEMA). Tento materiál obsahoval 38% vody a měl vynikající smáčenlivost, což vedlo k lepšímu pohodlí nositele. V dnešní době se nejvíce pro výrobu kontaktních a nitroočních čoček používají hydrogely, silikony a akryláty [9, 16].



Obrázek 3: Strukturální vzorec PMMA [20].

2 POVRCHOVÉ VLASTNOSTI

Atomy a molekuly tvoří nejzevnější povrch biomateriálů, což je rozhraní mezi materiálem a okolním prostředím. Tyto atomy a molekuly, které jsou umístěny na povrchu, mají zvláštní organizaci, reaktivitu a přímou biologickou odpověď. Vyžadují speciální metody k charakterizaci a řízení mnoha biologických reakcí, které se objevují v reakci na biomateriál (např. adsorpce proteinů, adheze buněk, růst buněk a kompatibilita krve). Pohyby atomů a molekul blízko povrchu v závislosti na okolním prostředí jsou velmi významné [5].

2.1 Povrchová energie

Povrchová energie je definovaná jako povrch přebytečné volné energie na jednotku plochy a je zásadní pro pochopení přilnavosti. Povrchové energie jsou také spojeny s tvorbou adhezivní vazby [21, 22]. Povrchy pevných materiálů mohou být rozděleny do kategorie s vysokou nebo s nízkou povrchovou energií. Kategorie vysoké povrchové energie zahrnuje materiály, jako jsou kovy a anorganické sloučeniny, mezi které patří oxidy, silikáty, diamant a nitridy. Nízkoenergetické materiály jsou převážně složeny z organických látek a polymerů. Polymerní povrchy jsou klasifikovány zvlášť, a to jako polymery s nízkou, střední nebo vysokou povrchovou energií [23].

2.2 Povrchové napětí

Síla působící na povrchu kapaliny kolmo na jednotku délky se nazývá povrchové napětí. Je to také výslednice přitažlivých sil, které působí mezi molekulami. Tyto síly se navzájem ruší, protože na molekulu uvnitř kapaliny působí přitažlivé síly okolních molekul ze všech stran stejně. V mezinárodní soustavě jednotek je jeho jednotka Nm^{-1} . Síly, které působí směrem dovnitř kapaliny, převažují u povrchu a díky tomu jsou molekuly z povrchu vtahovány dovnitř kapaliny. Povrchové napětí způsobuje, že se kapalina snaží nabýt takového tvaru, aby byl její povrch co nejmenší. Vytváří proto tvar kapičky [24, 25].

2.3 Objemové vlastnosti

Objemové vlastnosti biomateriálů jsou důležité pro lékařské implantáty. Ukázalo se, že objemové vlastnosti přímo ovlivňují a v některých případech kontrolují dynamické interakce, ke kterým dochází při tkáň-implantát rozhraní. Je důležité, že syntetické materiály mají specifické hmotnosti a charakteristiky. Tyto charakteristiky musí být známy před každým medicínským použitím, ale také musí být ve vztahu ke změnám, které se mohou v *in vivo* testech v čase uskutečnit. Informace, týkající se základních vlastností, jsou předepsány národní a mezinárodní normou, a také v příručkách a různých odborných časopisech. [26].

2.4 Morfologie

Struktura a povrchová morfologie patří k faktorům, které přímo ovlivňují interakci mezi implantovaným materiálem a tkání. Morfologie ovlivňuje zánětlivé reakce, jakožto odpověď na mikrobiální napadení. Intenzita zánětlivé reakce se zvyšuje s počtem ostrých hran implantovaného materiálu. Drsnost povrchu má významný vliv na hemokompatibilitu a na biokompatibilitu daného materiálu. Pro uchycení buněk a jejich růst na materiálu je důležitá tvrdost povrchu a kombinace fyzikální a chemické formy [27].

2.5 Topografie

Topografie je obecný termín označující tvar povrchu. Používá se k popisu povrchu materiálů, jak se mění s ohledem na hladkost a drsnost. Pro implantované zařízení je obvykle topografie stanovena výrobním procesem. Obrábění a odlévání mohou mít za následek nerovnosti, které mohou být sníženy elektrolytickým leštěním. Povrchová úprava ovládá vlastnosti, jako je tření a opotřebení dosedacích ploch u kloubních náhrad, korozi a degradační procesy materiálu. Buňky a proteiny jsou schopny komunikovat se specifickými rysy povrchu materiálu, proto může být topografie záměrně zavedená a má pravidelný tvar. Samotné textury na materiálech mohou být vyrobeny různými technikami, které jsou většinou na bázi litografie, včetně elektronové litografie a laserového paprsku [11]. Nepravidelnosti povrchu podporují ulpívání bakterií a tvorbu biofilmu, protože drsný povrch má větší povrchovou plochu a trhliny v povrchu poskytují příznivé místo pro kolonizaci. Přilnavost bakterií na povrchu nakonec závisí na šířce vzniklých drážek [28].

2.6 Metody studia povrchových vlastností

Povrchové vlastnosti mají obrovský vliv na úspěch nebo neúspěch biomateriálů. Dostatečná charakterizace povrchu daného materiálu má tedy velký význam. Vlastnosti, které jsou předmětem zájmu při charakterizaci povrchů biomateriálů, zahrnují chemickou strukturu (hydrofilnost a hydrofobicitu), přítomnost iontových skupin, morfologii a topografii. Různé informace o těchto vlastnostech lze získat pomocí různých metod analýzy. Volba použité metody pro charakterizaci povrchu může být závislá na nepřehledném množství úvah, zahrnujících rozsah analyzovaného povrchu, požadovanou přesnost a správnost, vliv vzorku na přístroj, různá omezení, jakožto i snadnost a dostupnost daného zařízení [29].

2.6.1 Mikroskopické metody

Mezi tyto metody patří skenovací elektronová mikroskopie (SEM), která může pojmout poměrně velké vzorky a poskytuje téměř trojrozměrné obrazy. Zaměřený paprsek elektronů se přežene po celém povrchu. Elektrony, které unikají z povrchu, jsou zachyceny a počítány pomocí detektoru. Počty elektronů v každém bodě jsou sestaveny do digitálního obrazu. Stejně jako u většiny technik elektronového paprsku se musí vzorek umístit do vakua. Povrch materiálu musí být čistý, suchý a elektricky vodivý. Jinou technikou je energická disperzní rentgenová spektroskopie (EDX), která poskytuje dodatečné informace o chemických prvcích přítomných na povrchu materiálu. Oproti skenovací elektronové mikroskopii má mikroskopie atomárních sil (AFM) vyšší rozlišení a snadno detekuje hřebeny nebo prohlubně na povrchu materiálu. Další jedinečnou předností mikroskopie atomárních sil před skenovací elektronovou mikroskopií je schopnost použití ve vodném prostředí, jako v reálném prostředí pro biomateriály [11,30].

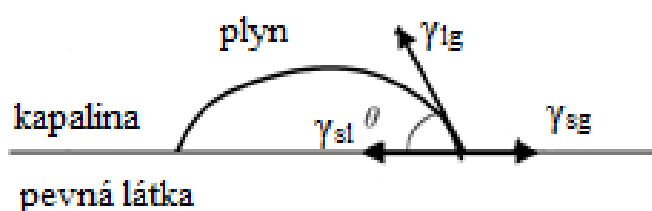
2.6.2 Spektroskopické metody

Spektroskopické metody jsou široce používány pro získání informací o základních prvcích a chemické struktuře v blízkosti povrchu [29]. Velmi používaná je elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu (ESCA), která poskytuje komplexní kvalitativní a kvantitativní přehled o povrchu, který by bylo velmi těžké získat jiným způsobem. Na rozdíl od jiných metod vyžaduje složité a drahé přístroje. Tato metoda, také nazývaná jako rentgenová fotoelektronová spektroskopie, je založena na fotoelektrickém efektu. Interakce rentgenového záření s atomy ve vzorku způsobí emise na úrovni jádra elektronů. Energie těchto elektronů se měří a jejich hodnoty poskytují informace o povaze prostředí atomů, z něhož

pocházejí. Mezi výhody patří vysoký obsah informací, rychlost analýzy, nízké poškození a schopnost analyzovat vzorky bez speciálních příprav. K nevýhodám patří nutnost vakuové kompatibility [21]. Další metodou je infračervená spektroskopie, která se používá k získání informací o molekulární struktuře. Při analýze infračervenou spektroskopií (IR) se vzorek podrobí elektromagnetickému záření v infračervené oblasti spektra. Vlnové délky závisí na přítomné chemické skupině. Tyto vlnové délky jsou definovány vlnočtem (cm^{-1}). Přípravy vzorků jsou minimální a přístrojové vybavení je relativně levné [23, 29].

2.6.3 Kontaktní úhel

Měření kontaktního úhlu kapalného prostředí kapky na pevném povrchu je přímočará technika odhalující informace o povrchové energii. I když tento způsob představuje jednu z nejstarších metod zkoumání povrchové struktury, stále poskytuje velmi užitečné informace. Kapka kapaliny je umístěná na povrchu biomateriálu, je dosaženo rovnovážné polohy a kontaktní úhel je určen z tečny spojené s povrchem. Analýza kontaktního úhlu může rychle poskytnout informace o hydrofobnosti a hydrofilnosti povrchu. Obvykle nejsou zapotřebí žádné speciální postupy při přípravě vzorků pro analýzu kontaktního úhlu, avšak povrchy musí být čisté [29].



Obrázek 4: Kontaktní úhel v ideálním stavu,

upraveno podle [23].

Na obrázku 4 je vidět kontaktní úhel v ideálním stavu, kdy je povrch pevný, hladký a tuhý. Indexy l, s a g značí kapalnou, pevnou a plynou fázi [23]. Pod určitým úhlem θ se kapalná fáze stýká s fází tuhou. Tento úhel se nazývá úhel smáčení. Kapalina smáčí povrch tuhé podložky, pokud $0 < \theta < 90^\circ$. Na druhou stranu kapalina daný povrch nesmáčí, pokud $90^\circ < \theta < 180^\circ$. Úhel smáčení závisí na mezipovrchových energiích a mezifázových rozhraních, mezi které patří rozhraní mezi tuhou a kapalnou fází (γ_{sl}), rozhraní mezi tuhou a

plynou fází (γ_{sg}) a rozhraní mezi kapalnou a plynou fází (γ_{lg}). Pro úhel smáčení je možno odvodit vztah (1).

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{sg} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lg}} \quad (1)$$

Pokud $\gamma_{sg} > \gamma_{sl}$ je $\cos \theta$ kladný, úhel θ je menší než 90° a kapalina smáčí povrch. V případě, že $\gamma_{sl} > \gamma_{sg}$ má $\cos \theta$ zápornou hodnotu, poté je úhel smáčení větší než 90° a kapalina tuhý povrch nesmáčí [31].

3 BIOLOGICKÁ ROZHRAŇÍ

Interakce mezi biologickými systémy a umělými materiály se běžně vyskytují na jejich rozhraní. To znamená, že biologické rozhraní a odpovídající biologický systém mají zásadní význam pro studii biomateriálů a přímo řídí jejich úspěch či selhání *in vivo* a *in vitro* aplikacích. Nejjednodušší biologické rozhraní je, pokud se molekuly, jako jsou DNA, RNA, proteiny a protilátky, dotýkají povrchu pevné látky. Na druhou stranu složitější biologické rozhraní zahrnuje větší biologické předměty, jako membrány, viry, nebo buňky, které jsou uvedeny do styku s umělým materiálem [32].

3.1 Vliv materiálového povrchu na biologické systémy

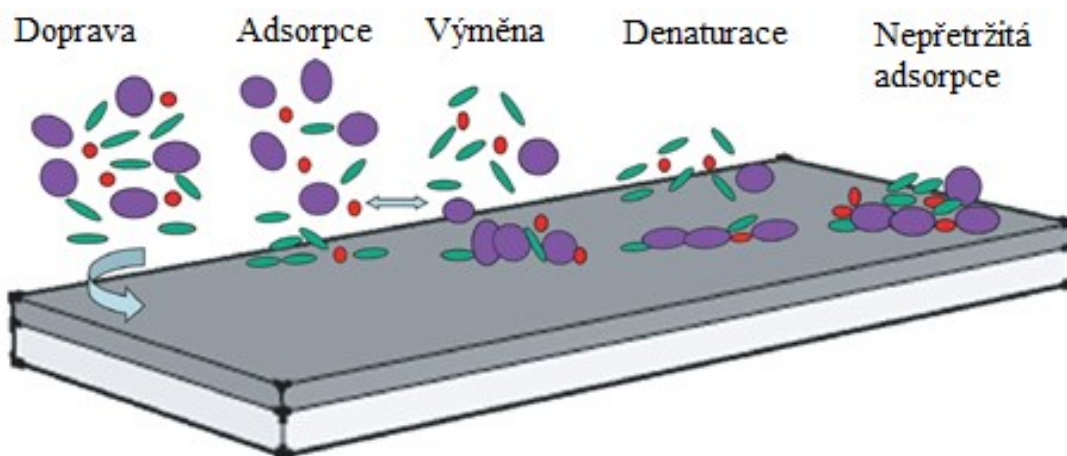
Je již dlouho známo že, chemická a fyzikální podstata povrchů velmi ovlivňuje různé makroskopické vlastnosti. Kontakt povrchu biomateriálu a jakékoli živé hmoty (tkáň, buňky, krve a jiné biologické tekutiny uvnitř nebo vně lidského těla) je doprovázena zánětlivými reakcemi těla, které se mohou překonat vhodným povrchovým inženýrstvím materiálu. Zejména použitím biokompatibilního vnějšího povrchu materiálu upraveného vrstvou nebo povlakem, můžeme minimalizovat dané negativní reakce při zachování funkčnosti zařízení. Existují různé inženýrské metody k vytvoření biomateriálů s lepšími vlastnostmi povrchů pro biologický kontakt. Dosud známé inženýrské metody jsou rozděleny do tří hlavních skupin. Do první skupiny patří fyzikálně chemické metody včetně leptání kyselinou, roubování povrchu funkčními skupinami a ozařování plazmou. Další skupinou jsou metody založené na imobilizaci biomolekul, jako je matrice proteinů a peptidové sekvence. Poslední metodou je vzorování povrchu modifikací, neboli vytváření povrchových mikro nebo nanostruktur [30].

3.2 Adsorpce proteinů

Existují různé typy biologických reakcí na implantované biomateriály, které často omezují jejich použití, včetně srážení krve a reakce na cizí těleso. Je zřejmé, že lidské tělo biomateriál rozpozná a reaguje na něj. Základem těchto reakcí je adsorpce proteinů na povrch biomateriálu. Adsorpce proteinů biomateriál převádí na biologicky rozpoznatelný materiál. Tato reakce je velmi rychlá a děje se na všech materiálech, které byly implantovány do biologického systému [5]. Reakce je obecně rozdělena do pěti fází, které jsou popsány v tabulce 1 a schematicky znázorněny na obrázku 5 [26].

Fáze 1	Fáze 2	Fáze 3	Fáze 4	Fáze 5
Doprava	Adsorpce	Výměna	Denaturace	Nepřetržitá adsorpce
Přeprava molekul proteinů k povrchu.	Vratná vazba molekuly znovu na povrch.	Změna složení adsorbované vrstvy, dokud nedojde k ustálenému stavu.	Adsorbované proteiny podstupují konformační změnu v jejich trojrozměrné struktuře.	Tvorba násobné proteinové vrstvy.

Tabulka 1: Fáze adheze proteinů na biomateriál, upraveno podle [26].



Obrázek 5: Různé fáze adsorpce proteinů na povrchu biomateriálů, upraveno podle [26].

Adsorpce proteinů se řídí jak vlastnostmi proteinů, tak i povrchovými vlastnostmi biomateriálu a podmínkami prostředí. Na této reakci se také podílí molekulární síly, jako jsou hydrofobní interakce a elektrostatické síly. Často se stává, že vrstva proteinů interaguje s dalšími biomolekulami a buňkami, což také vede k jejich adhezi na povrchu [9, 30].

3.3 Interakce s krví

Krev je intersticiální tekutina, která se dostane do kontaktu s implantáty a s mnoha dalšími biomedicínskými a bio-analytickými přístroji. Kompatibilita krve má tedy velký význam v mnoha klinických postupech [30]. Pro kompatibilitu krve je známá tato definice: „Kompatibilita krve je vlastnost materiálu nebo zařízení, která umožňuje správnou funkci materiálu v kontaktu s krví bez vyvolání nežádoucích účinků“ [5]. Pokud je tedy biomateriál vložen do kardiovaskulárního systému, jako první dojde k adsorpci plazmatické bílkoviny. Na adsorpci proteinů je závislá řada biologických reakcí, jako je adheze destiček, aktivace leukocytů a další. Složení adsorbované proteinové vrstvy se mění s komplexním procesem v závislosti na době expozice. Poté dojde k adsorbování fibrinogenu a jiných krevních destiček. Ty stimulují přilnavost proteinů a podporují nevratnou adhezi krevních destiček, které podporují tvorbu bílého trombu. Konečné kroky v koagulační kaskádě zahrnují tvorbu trombinu, který přeměňuje fibrinogen na nerozpustný fibrin, z něhož jsou vyrobeny fibrinové sítě. Z toho vyplývá, že krev má sklon ke srážení při kontaktu s cizími povrchy [26].

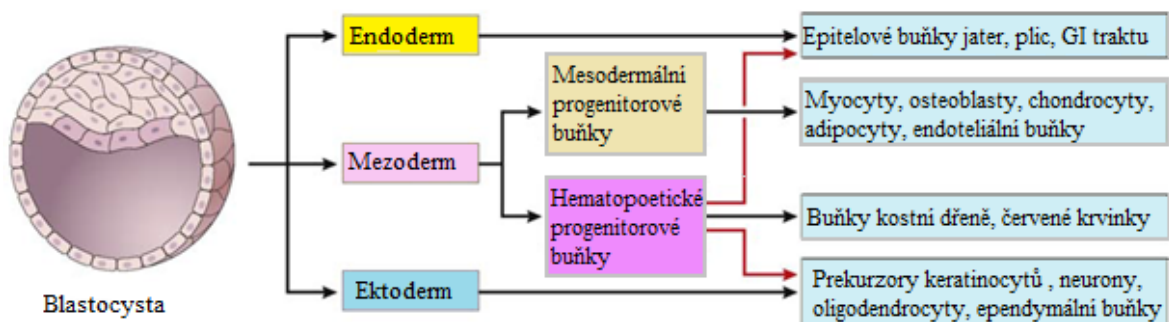
3.4 Adheze buněk

Počáteční adsorpce proteinů na povrchu materiálu kontrolují všechny následné události, jako je adheze buněk, diferenciace a tvorba konečné tkáně [33]. Buňky pomocí difúze migrují na povrch implantátu, který je ponořen v tělní tekutině. Po tom co buňky přilnou k povrchu, mohou zde růst, množit se a organizovat do tkání. Daná adheze buněk závisí na povrchových vlastnostech a struktuře jednotlivých buněčných membrán, které tvoří dvojité vrstvy fosfolipidů s glykoproteiny, lipoproteiny a sacharidy. Různým částem buněčných membrán odpovídají různé funkce, jako je absorpce, transport, sekrece tekutiny a komunikace s ostatními buňkami. Buňky jsou spojeny intracelulárními vlákny cytoskeletu. Kontinuální vláknitá síť po celém epitelovém listě je poskytována spojováním vláken na desmosomy nebo přechody do sousedních buněk. Pohromadě buňky drží také těsné spojení (tight junction), které tvoří téměř nepropustné mezibuněčné těsnění a vytváří tak kontinuální bariéru, přes kterou molekuly nemohou projít. Komunikační spojení (gap junctions) umožňuje průchod malých molekul z cytoplazmy z jedné buňky do druhé a také komunikaci mezi sousedními buňkami. Mezi molekuly, které mohou takto přecházet, patří anorganické soli, cukry, aminokyseliny, nukleotidy a vitamíny. Velké molekuly jako nukleové kyseliny a proteiny nemůžou projít. Buněčná adheze také závisí na fyzikálně chemických

površích, hydrofobnosti a je velmi důležitá pro přežití a růst buněk [9]. Důležitou roli v buněčné adhezi také hrají změny, které určují události v široké škále onemocnění, jako je artritida, rakovina a osteoporóza. V lidských nádorech je přilnavost buněk obecně snižena, což má za následek zničení histologické struktury, která je pro nádory charakteristická [34].

3.5 Diferenciace buněk

Mnohobuněčné organismy se skládají z jednotlivých buněk s výraznou specializací jejich funkcí a struktur [12]. Buněčná diferenciace je proces, při kterém se buňky stále více specializují. Klasickým příkladem diferenciace je proces, kdy se zygota vyvíjí z jedné buňky do mnohobuněčného embrya, které se dále rozvíjí [35].



Obrázek 6: Diferenciace buněčných linií z totipotentní blastocysty, upraveno podle [5].

Všechny specializované buňky pochází původně z buněk totipotentních, které jsou obsaženy v blastocystě. Podmnožiny těchto totipotentních buněk diferencují a specifikuji se, což nakonec vede k tvorbě zralých tkání (např. svalů, kostí, jater, kůže a mozku, jako je znázorněno na obrázku 6) [5]. Buněčná diferenciace je také regulována mnoha procesy a látkami, včetně buněčné velikosti, tvaru, hustoty, polaritě a složení extracelulární matrix. Každá z buněk je naprogramovaná tak, aby tyto vnější faktory rozlišila a nakonec zrála do specializované buňky, jako jsou např. buňky srdeční, kožní a mozkové [35]. Proces diferenciace v sobě zahrnuje pozměnění genové exprese. Každá buňka v těle obsahuje genotyp. S diferenciací jsou vybrané podmnožiny genů exprimovány, čímž se získá odlišný biologický profil, tzv. fenotyp. S postupnou specializací buňky vypínají obvykle nevratně

„zbytečné geny“. Některé z genů jsou aktivní po celou dobu, jiné mohou být selektivně aktivovány nebo upravovány v závislosti na vnějších vlivech. Funkční a strukturní změny, vyskytující se během diferenciací buněk, jsou obvykle nevratné. Kromě toho zvýšená specializace vede ke ztrátě buněčného dělení. [5].

4 *IN VIVO* / *IN VITRO* STUDIE

Tak jako všechny výrobky určené k použití u člověka, tak i zdravotnické prostředky a materiály musí být testovány kvůli jejich bezpečnosti na lidské zdraví. Každý biomateriál musí být tedy důkladně hodnocen z hlediska jeho biokompatibility a správné funkce v biomedicínské aplikaci. Obecně platí, že se pro tyto účely používají dva druhy hodnotících technik: *in vitro* (ve skle) a *in vivo* (v živém organismu). Hodnocení bezpečnosti by mělo být provedeno v souvislostech procesu řízení rizik, jako je popsáno v mezinárodní normě ISO 10993 pro použití řízení rizika na zdravotnické prostředky. Objevená rizika by měla být odstraněna nebo snížena, pokud je to možné [36, 37].

4.1 *In vivo* studie

Testování, které zahrnuje živá zvířata, je zařazeno do kategorie *in vivo*. Vzhledem k rostoucím obavám o dobré životní podmínky a práva zvířat, došlo k vyvinutí metody *in vitro* a k nahrazení tak tradičních testů *in vivo* [38]. Některé z *in vivo* testů jsou potřebné pro potvrzení nebo vyvrácení výsledků získaných v *in vitro* testech (např. odpověď genotoxicity), zatímco jiné toxikologické účinky mohou být určeny pouze na základě *in vivo* zkoušek (např. lokální reakce tkáně) [36]. Zkouška *in vivo* je tedy kritickým prvkem ve vývoji a zavádění implantátů pro uspokojivý *in vitro* screening. Cílem tohoto testu je posouzení slučitelnosti tkáně s biomateriálem na zvířecích modelech, aby se zjistilo, jestli materiál nepředstavuje žádné nebezpečí pro uživatele. Pro toto testování musí být vybrán zvířecí model, který nabízí přiměřeně stejné anatomické, fyziologické a biochemické systémy jako u lidí. Testy jsou následně rozděleny podle povahy kontaktu tkáně s povrchem biomateriálu (např. kůže, slizniční membrány), podle externího předávajícího typu (např. krevní cesty) a nakonec podle doby kontaktu na omezené (hodina), prodloužené (1-30 dnů) nebo permanentní (30 dnů a více). Pro krátkodobé testy se obvykle používají zvířata, jako jsou myši, krysy, morčata a králíci. Naopak pro dlouhodobé zkoušky se používají krysy, morčata, králíci, psi, ovce a kozy [3].

4.2 *In vitro* studie

Testy zahrnující umělé prostředí vytvořené vně živých zvířat se nazývají testy *in vitro* [38]. *In vitro* testování může poskytnout rychlejší a relativně levná data ve srovnání s *in vivo* testováním. Navíc také *in vitro* testy mohou poskytnout užitečný screening materiálu a mohou pomoci pochopit reakci materiálu z *in vivo* testů. Tyto poznatky mohou pomoci určit, zda implantát potřebuje další vyhodnocení a minimalizují tak množství zvířat použitých pro *in vivo* testy [37]. Obecně jsou *in vitro* testy užitečné pro identifikaci potenciálního nebezpečí, spojeného s chemickou sloučeninou nebo materiálem. Pro testování se používají jak pevné látky, tak i extrakty z biomateriálů. Velkým omezením *in vitro* testů je to, že nemohou poskytnout informace o dávce, kterou je možno extrapolovat na člověka. Kvůli tomu nemohou být použity při konečném hodnocení rizika biomateriálu na lidský organismus [36]. Testy jsou prováděny mimo živý systém, kdy jsou určeny podmínky prostředí, jako je pH a teplota. Charakteristika biomateriálu je hodnocena v purifikovaném roztoku za fyziologických podmínek, kdy pH je 7,4 a teplota je 37 °C. Po více než dvě desetiletí se k vyhodnocení biologické kompatibility materiálů používají buněčné kultivační metody. Pro testování se tedy používají různé typy buněk, které se liší v relativní citlivosti a času potřebného k testování. Pro hodnocení cytotoxicity biomateriálu se používá přímý kontakt, difúzní agar a eluční testy. Životaschopnost buněk se hodnotí po inkubaci dvou dní. Po skončení této testovací doby je toxicita hodnocena mikroskopicky na přítomnost morfologické změny, snížení hustoty buněk, nebo rozpadu zkoušeného materiálu [3].

4.3 Srovnání statických a dynamických kultivačních podmínek

V dnešní době se k buněčnému testování používají statické a dynamické kultivační podmínky. Statické kultury (baňky a Petriho misky) mají velkou nevýhodu v tom, že trpí nahromaděním odpadů a omezenou difúzí. Za účelem překonání těchto nedostatků statických podmínek bylo zkoumáno několik typů bioreaktorů, jako dynamické *in vivo* podmínky pro aplikace tkáňového inženýrství [39]. Dalším problémem statických kultur je také to, že jen málo buněk proniká do vnitřního prostoru Scaffoldu na rozdíl od dynamických podmínek, kde buňky pronikají dovnitř Scaffoldu, jako testovaného materiálu [40]. Bioreaktory umožňují řízení a monitoring teploty, pH, kyslíku a střední koncentrace živin, za účelem splnění požadavků tkáně v rámci studie. Celkově lze tedy říci, že kultura v závěsných systémech s odlišnou silou míchání, výrazně zlepšuje růst buněk a následnou diferenciaci ve srovnání se statickými podmínkami [41].

4.4 Bioreaktory a mechanická stimulace

Bioreaktory jsou *in vitro* kultivační systémy, které monitorují a řídí prostředí pro růst buněk. Bioreaktory jsou důležité pro růst a řízenou diferenciaci buněk před jejich použitím ve tkáňovém inženýrství. Tyto buňky vyžadují řízený *in vitro* růst za účelem rozšíření na velký počet. Kromě toho, diferenciace kmenových buněk může být ovlivněna jak fyzikálními (např. pH, teplota, rozpuštěný kyslík, smykové napětí a osmolarita) tak i biochemickými (např. živiny, metabolické odpadní produkty, růstové faktory a cytokiny) parametry v bioreaktorech [42]. Správně zkonstruovaný bioreaktor by měl vytvořit prostředí, které umožní buněčnou proliferaci a diferenciaci, měl by také zařídit prostorově jednotné rozložení buněk na Scaffoldu, udržet požadovanou koncentraci živin a zajistit efektivní přenos tkáňové hmoty. Záměrem konstrukce bioreaktoru je udržení klíčových podmínek v hodnotách, které napodobují *in vivo* podmínky. V první řadě to znamená regulaci teploty, živin, koncentraci kyslíku a hodnoty pH. Kontrola hodnoty pH je jedním z nejdůležitějších procesů. Typický výrobní proces vyžaduje rozmezí pH 6,9 až 7,2 pro konzistentní kvalitu a produktivitu. Druhým důležitým faktorem je teplota. Pro optimální buněčný růst je optimální teplota 36 až 37 °C. Danému systému by měly být rovněž určeny podmínky pro sterilní provoz, při kterých by nemělo dojít k infekci [43, 44].

4.4.1 Reaktor s mechanickou stimulací

Existuje několik druhů bioreaktorů. Tato práce je zaměřena na reaktor s mechanickou stimulací, jelikož byl použit v praktické části. Nedávné studie ukázaly, že reaktor s mechanickou stimulací může ovlivňovat nejdůležitější buněčné reakce, jako je diferenciace, proliferace a životaschopnost buněčného cyklu. Tento systém je tedy ideální pro překonání určité nevýhody statické kultury, jelikož rotační pohyb zabraňuje sedimentaci a vytvořená suspenze prostředí posiluje interakce mezi buňkami [45]. Reaktor s mechanickou stimulací patří do třídy konvenčních bioreaktorů. Tento bioreaktor se skládá z rotujících nádob, které míchají kultivační médium v celém objemu bioreaktoru. Pohyb oběžného kola poskytuje dobře smíchané prostředí a minimalizuje oblasti stacionární buněčné vrstvy na povrchu konstrukce. Velkou nevýhodou tohoto typu je turbulentní proudění, které vytváří smykové napětí a může poškodit buňky. Rotující nádoby zahrnují rotaci celého bioreaktoru, a tím zajišťují dynamické laminární proudění daného prostředí [42]. Tento druh bioreaktoru se úspěšně používá ke kultivaci buněk pro chrupavky, kůži a kosti [46].

4.5 Technologie Lab on the chip s užitím dynamických podmínek kultivace

Mikrofluidní systémy jsou součástí nově vznikající technologie, umožňující kombinovat různé systémy v rámci malých povrchů. Tyto systémy mají široké uplatnění v celé řadě vědních oborů, mimo jiné pro biosenzory [47]. Mikrofluidní systémy, založené na principu Lab on the Chip, hrají stále důležitější roli v objevech v buněčné biologii, neurobiologii, farmakologii a tkáňovém inženýrství [48]. Technologie Lab on the chip je např. ideálním nástrojem pro analýzu proteinů, jelikož poskytuje informace o velikosti, koncentraci a čistotě v jednom testu. Velkou výhodou je snadnost použití, dobrá reprodukovatelnost, digitální data a významné snížení nebezpečného odpadu. Lab on the chip technologie může být také použita s jinými činidly a čipy pro analýzu DNA a RNA. Kromě toho také technologie Lab on the chip může umožnit jednoduchou průtokovou cytometrii a detekci exprese proteinů v populaci eukaryotických buněk [49].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Příprava vzorků

Pro přípravu vzorků byla použita samoorganizovaná modifikace povrchové struktury, která je popsána v článku Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time Sequenced Dosing of Mixed Solvents. Vzorky byly připraveny na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství Fakulty technologické UTB. Jako substráty byly použity dvě velikosti Petriho misek z tkáňového polystyrenu (TPP, Švýcarsko). Velké misky o průměru 5,4 cm, které nebyly sterilizovány a malé misky o průměru 3,4 cm, které byly sterilizovány zářením. Před použitím velkých PS byly destičky promyty alkoholem, ultra čistou vodou a sušeny v sušárně při 323 K. Pro povrchovou úpravu substrátů byla použita metoda Spin-Coating s tetrahydrogenfuranem (THF) a 2-ethoxyethanolem (ETH). Nakonec byl u poloviny vzorků upraven povrch, pomocí plazmového zařízení Diener PICO (Diener electronic GmbH+Co.KG) s kapacitní radiofrekvenční spojkou na frekvenci 13,56 MHz a tlaku 0,4 mbar [50].

5.1.1 Polystyren

Polystyren je syntetický aromatický polymer vyrobený z monomerů styrenu. V průmyslu se připravuje radikálovou polymerací v suspenzi, emulzi i v bloku. Nejčastěji se zpracovává vytlačováním, tepelným tvářením nebo vstřikováním. Jeho neohebné a tuhé makromolekuly vedou k tomu, že je tvrdý, málo houževnatý, křehký, ale na druhou stranu má dobré dielektrické vlastnosti. Díky těmto vlastnostem je jeho využití rozsáhlé. Nejčastěji se používá jako obalový materiál potravin a materiál na výrobu kuchyňských spotřebičů a spotřební elektroniky. Polystyrenové pryskyřice patří mezi nejčastěji používaný materiál pro stavebnictví a také pro lékařské aplikace, včetně vaniček pro tkáňové kultury, zkumavek a Petriho misek [51, 52]. Pro přípravu našich vzorků byly využity komerčně dostupné Petriho misky speciálně upravené pro potřebu kultivace buněk. Jedná se o tzv. tkáňový polystyren. V našem případě byly použity misky od firmy TPP (Švýcarsko).

5.2 Sterilizace vzorků

Před samotným *in vivo* testováním byly obdržené vzorky dezinfikovány v 70 % etanolu. Následně byly vzorky opláchnuty ultračistou vodou a vysušeny v laminárním boxe s řízenou cirkulací vzduchu. I samotný bioreaktor byl sterilizován. Rotující nádoby byly z reaktoru s mechanickou stimulací odšroubovány a vloženy do autoklávu (Tuttnauer 3870 ELPV), kde byly sterilizovány při teplotě 121 °C a tlaku 101,5 kPa po dobu 23 minut.



Obrázek 7: Autokláv Tuttnauer 3870 ELPV

5.3 Použitá buněčná linie a kultivační médium

Testování v simulovaných *in vivo* podmínkách bylo provedeno pomocí myších embryonálních fibroblastů NIH / 3T3 buněčné linie (ATCC, USA). Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM) obsahující 10 % Calf séra (Biosérum, Francie) a 1 % penicilin / streptomycinu (PAA, Švýcarsko).

5.4 Příprava buněk

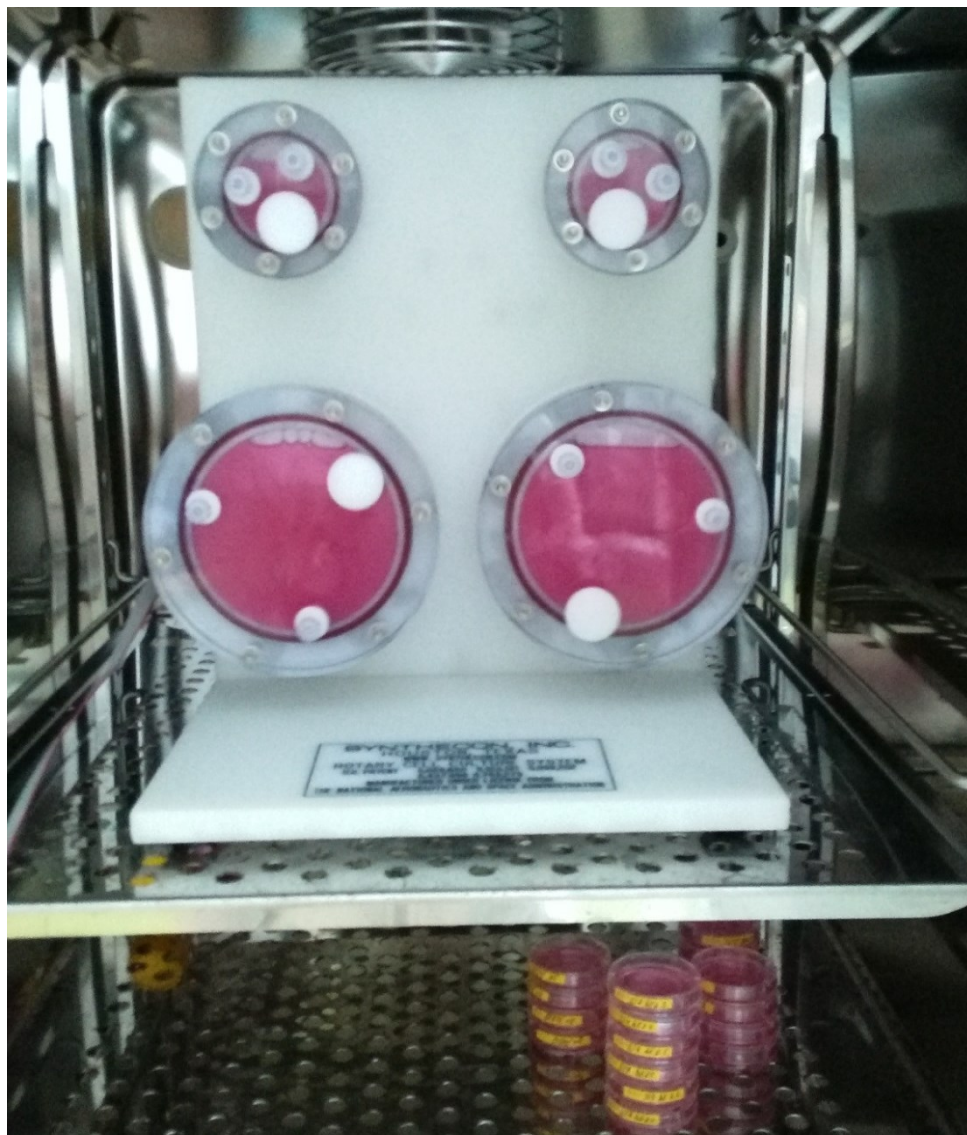
Použitá buněčná linie byla kultivována v polystyrenových kultivačních nádobách v biologickém inkubátoru s řízenou atmosférou CO₂ (HERAcell 150i). Po dostatečném namnožení buněk bylo provedeno pasážování buněk. Buňky byly přeneseny do laminárního boxu s řízenou cirkulací vzduchu, kde bylo kultivační médium odsáto. Kultivační nádoba byla promyta 15 ml fosfátového pufru (PBS, koncentrace 0,2 ml/cm²), který byl následně odsát pomocí odsávacího zařízení. Poté bylo do nádoby přidáno 7,5 ml trypsinu (koncentrace 0,1 ml/cm²), který byl zde ponechán po dobu 10 minut, než došlo k oddělení buněk od nádoby. Oddělené buňky byly zkontrolovány pomocí mikroskopu Olympus XI 8. Po oddělení buněk bylo do nádoby přidáno 7,5 ml kultivačního média a roztok byl pomocí mikropipety převeden do zkumavky. Zkumavka se vzniklým roztokem byla vožena do centrifugy Eppendorf 5702 R, kde probíhala centrifugace po dobu tří minut a 1100 rpm. Dále byl vzniklý supernatant odsát a ke koncentrovaným buňkám na dně zkumavky byl přidán 1 ml média, díky čemuž vznikla koncentrace 2×10^7 buněk v 1 ml média.

5.5 Postup testu

Polovina všech testovaných vzorků byla ponechána po dobu 24 hodin v Calf séru, druhá polovina pak byla ponechána bez další úpravy. Buňky byly na povrchy všech vzorků nasaženy v koncentraci 1×10^{-5} buněk na ml a vloženy do Petriho misek. Následně byly vzorky vloženy do biologického inkubátoru, kde se adherovaly po dobu 2 hodin. Poté, co se buňky dostatečně přichytily na povrch vzorků, byla polovina čistých i povrchově upravených vzorků vložena do předem připravených foliových konstrukcí, které byly upevněny v rotujících nádobách bioreaktoru. Bioreaktor obsahoval 2 rotující nádoby o objemu 50 ml a dvě nádoby o objemu 10 ml. Po uzavření byly všechny nádoby naplněny médiem a bioreaktor byl zapnut v biologickém inkubátoru s řízenou atmosférou CO₂. Druhá polovina vzorků, která nebyla vložena do bioreaktoru, byla doplněna 2 ml média v Petriho miskách a byla vložena do inkubátoru. Po 48 hodinách byly vzorky vytaženy z bioreaktoru a vloženy do Petriho misek.

Inkubátor	Velká komora bioreaktoru	Malá komora bioreaktoru
PS	PS	Str
PS_CS	PS_CS	
Str	Str	
Str_CS	Str_CS	

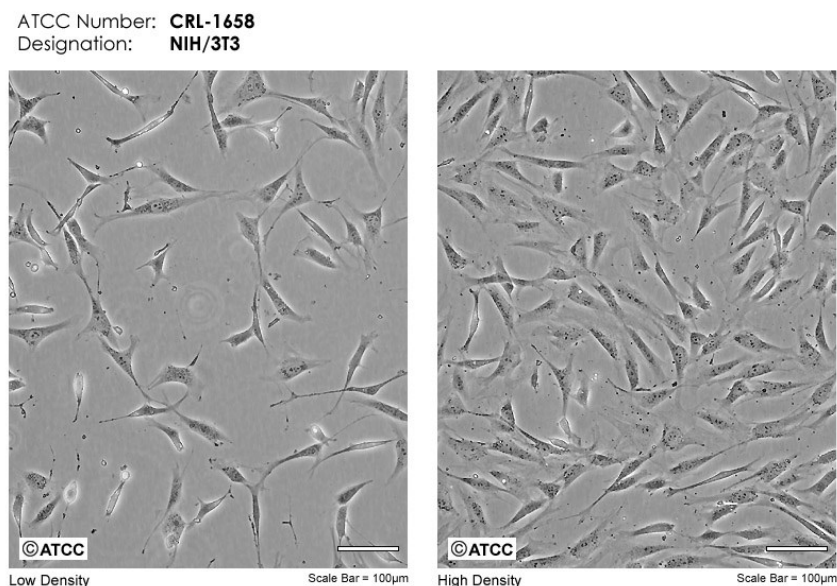
Tabulka 2: Souhrn použitých vzorků



Obrázek 8: Ukázka první poloviny vzorků v bioreaktoru a druhé poloviny vzorků v Petriho miskách

5.6 Buněčná morfologie

Buněčná morfologie byla stanovena za použití barviva Hoechst 33258 (Invitrogen, USA), který barví DNA buněk a barviva ActinRed 555 (Thermo Fisher Scientific, USA), který barví buněčný cytoskelet. U všech vzorků před samotným barvením byla provedena fixace buněk, kdy bylo odsávacím zařízením odsáto médium a Petriho misky byly promyty 1 ml fosfátového pufru (PBS, koncentrace 0,2 ml/cm²), který byl následně také odsát. Po odsátí fosfátového pufru byly na vzorky přidány 2 ml formaldehydu (koncentrace 4 %), které byly zde ponechány po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby byl formaldehyd odsát a vzorky byly třikrát promyty 1 ml fosfátového pufru (PBS, koncentrace 0,2 ml/cm²). Následně byly přidány 2 ml Tritonu X-100 (koncentrace 0,5 %), který působil po dobu 5 minut. Po 5 minutách byl Triton odsát a ke vzorkům byl přidán 1 ml fosfátového pufru (PBS, koncentrace 0,2 ml/cm²). Následovalo samotné barvení. Ke vzorkům bylo přidáno 20 μ l Hoechstu 33258 (Invitrogen, USA) a 1 kapka ActinRed 555 (Thermo Fisher Scientific, USA). Poté byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut ve tmě. Morfologie buněk byla pozorována pomocí obráceného mikroskopu s fázovým kontrastem (Olympus IX81, Japonsko).

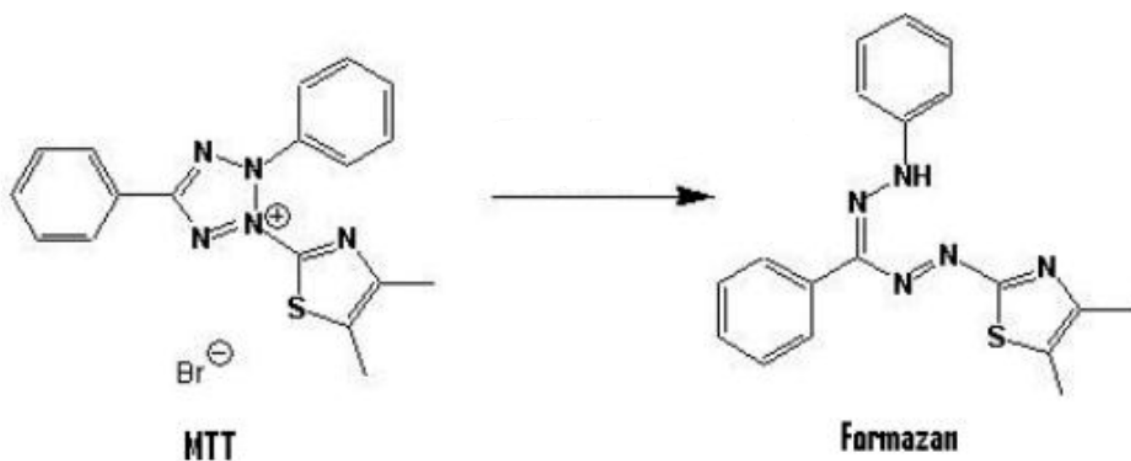


Obrázek 9: Reference NIH/3T3 [53].

5.7 MTT test

MTT test je široce používán pro hodnocení cytotoxicity a životaschopnosti buněk. Života-schopné buňky jsou schopny redukovat žlutý MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazoliumbromid], který se štěpí na ve vodě nerozpustný fialově modrý formazan. Naopak buňky, které jsou po toxickém poškození mrtvé, nemohou MTT transformovat [54].

Buňky byly na povrchy všech vzorků nasazeny v koncentraci 1×10^5 buněk na ml a vlože-ny do Petriho misek a následně do bioreaktoru. Po 48 hodinách, kdy byly buňky kultivová-ny v bioreaktoru, bylo provedeno MTT. Veškerý extrakt z Petriho misek byl odsát a poté nahrazen čistým médiem. Následně bylo k buňkám přidáno MTT (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, koncentrace 0,5 mg/ml). Po 4 hodinách v inkubátoru bylo z destičky odsáto 80 μ l a pipetou přidáno 80 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid, 99,9 %, Duchefa Biochemie, Ni-zozemsko). DMSO zde bylo ponecháno 20 minut. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance na mikrotitračním měřiči Infinite M200PRO (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 570 nm.

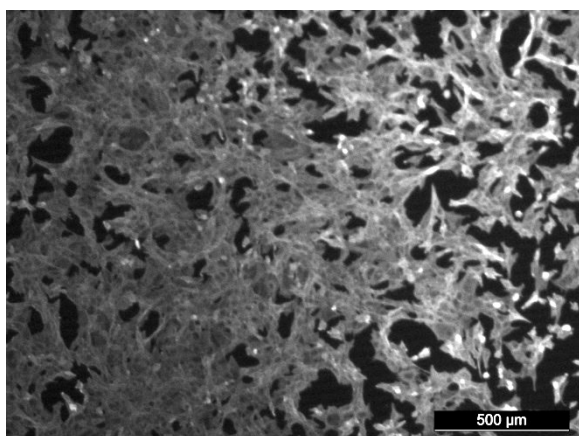


Obrázek 10: Přeměna MTT na formazan [55].

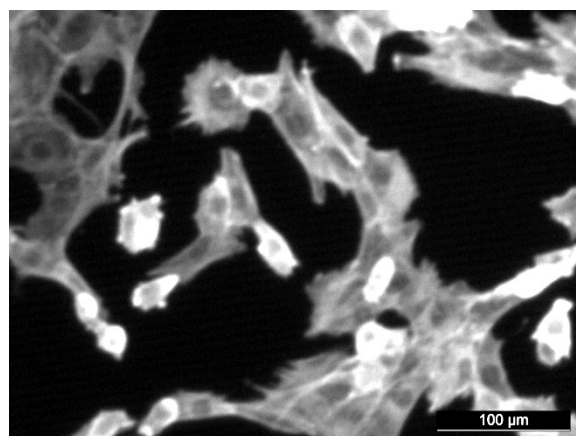
6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části byly zkoumány čtyři faktory na správný růst a morfologii buněk: úprava povrchu, použití Calf Sera, smykové napětí a dynamické vs. statické kultivační podmínky. Získané výsledky jsou dále uvedeny v textu.

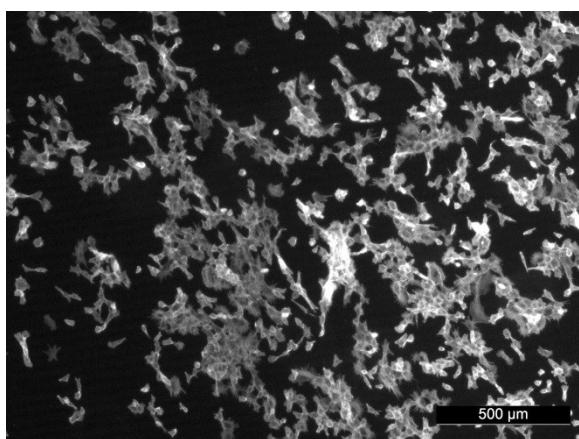
Aby byly lépe vidět rozdíly v buněčné morfologii, byly nabarvené buňky barvivem ActinRed 555 vyfoceny pomocí fluorescence invertovaným mikroskopem s fázovým kontrastem. Tyto fotografie můžeme vidět na obrázcích 11-15. Jelikož na fotografiích buněk, jejichž DNA bylo obarveno barvivem Hoechst 33258 nebyly vidět velké rozdíly, nebyly tyto fotografie zařazeny do praktické části této práce.



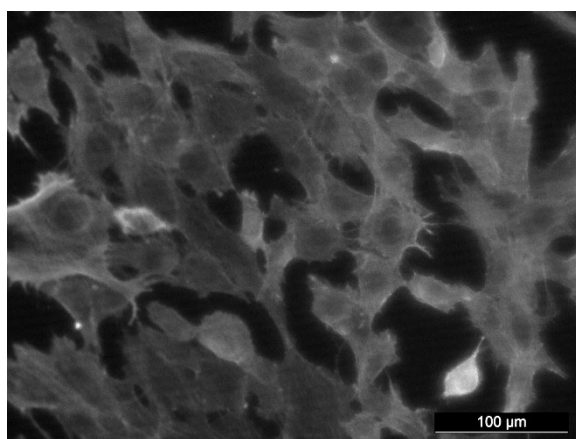
A) PS, 500 μm



B) PS, 100 μm

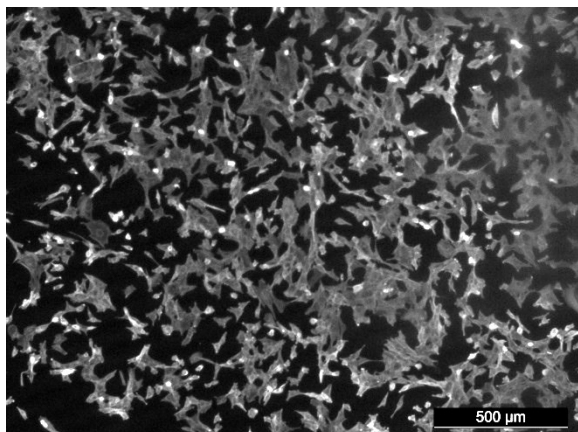


C) PS_Str, 500 μm

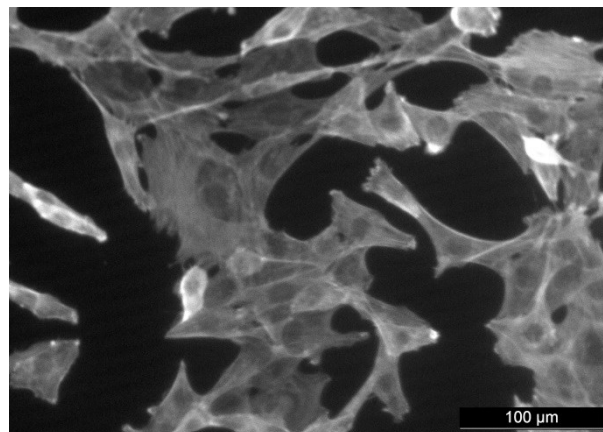


D) PS_Str, 100 μm

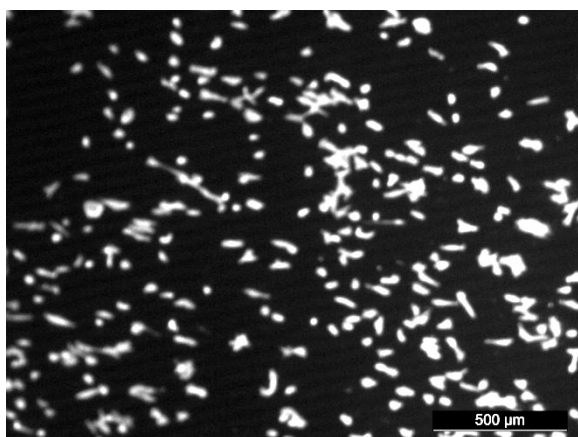
Obrázek 11: Fotografie buněčné morfologie



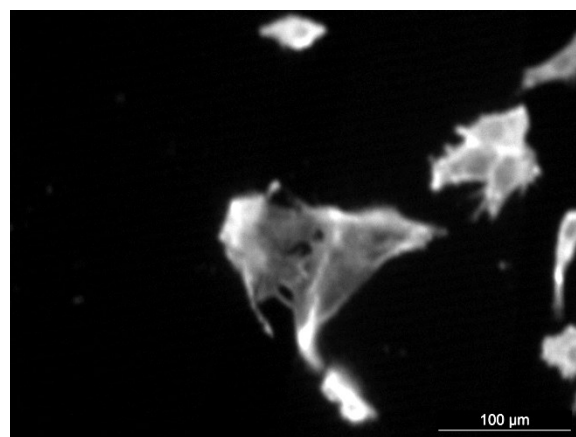
A) PS_CS, 500 μm



B) PS_CS, 100 μm

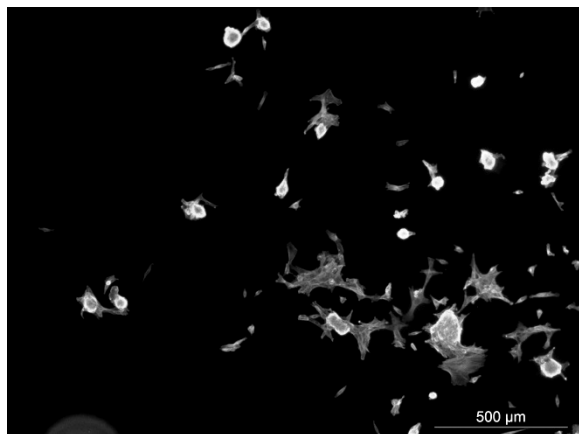


C) Str_CS, 500 μm

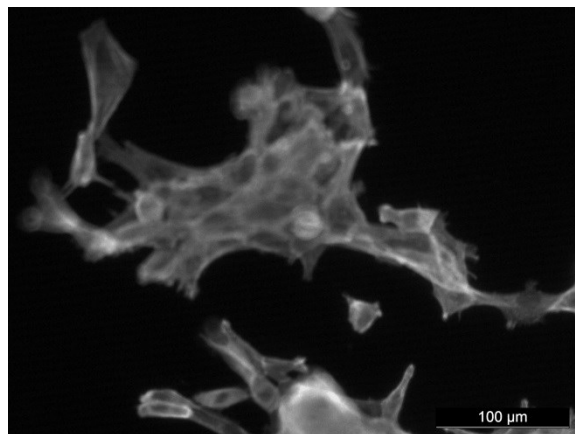


D) Str_CS, 100 μm

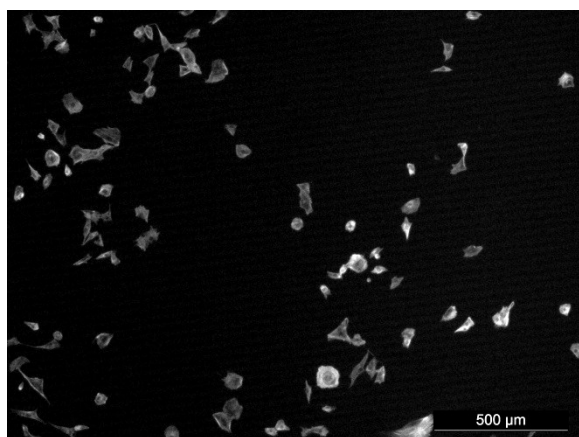
Obrázek 12: Fotografie buněčné morfologie



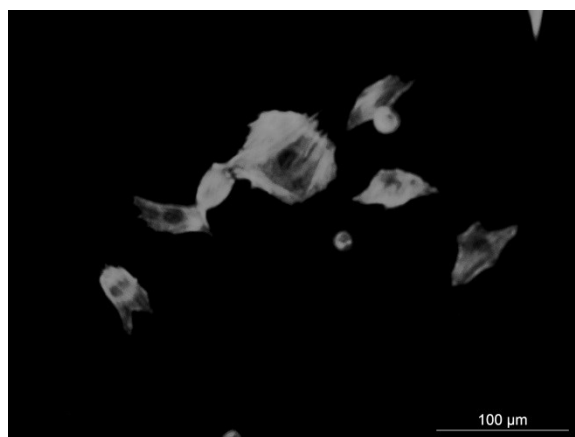
A) PS_bioreaktor, 500 μm



B) PS_bioreaktor, 100 μm

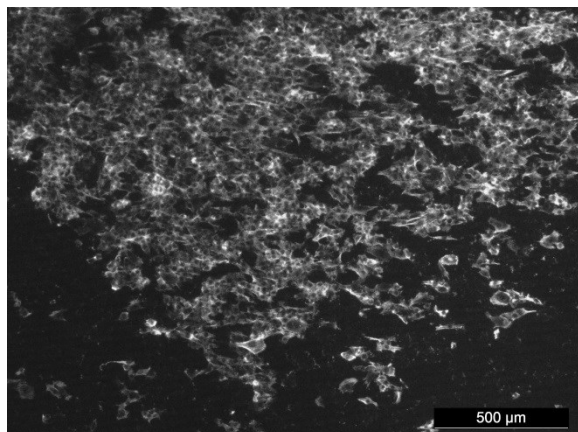


C) PS_CS_bioreaktor, 500 μm

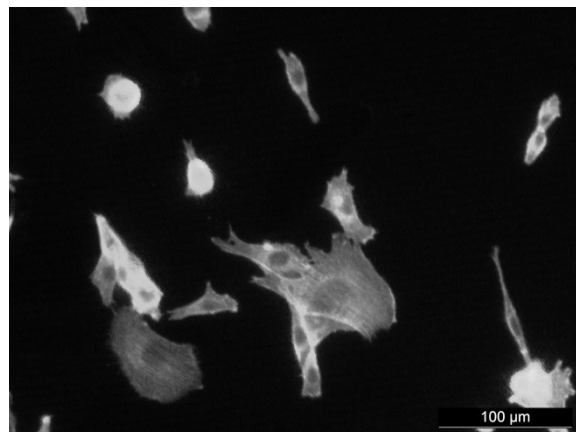


D) PS_CS_bioreaktor, 100 μm

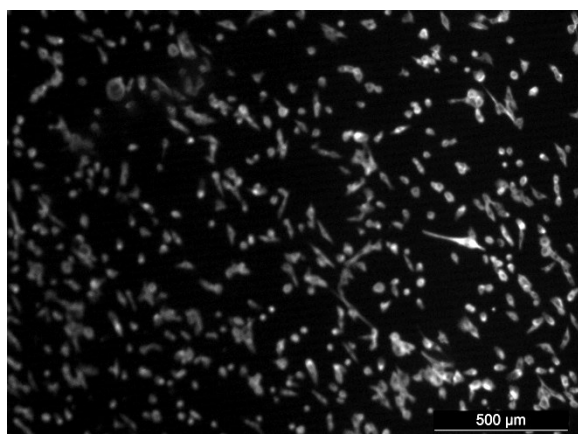
Obrázek 13: Fotografie buněčné morfologie



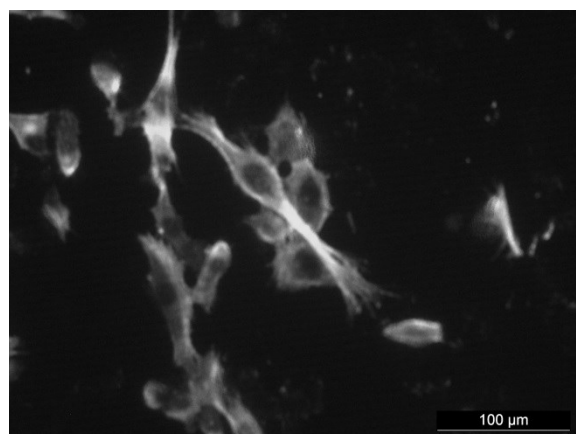
A) Str_bioreaktor, 500 μm



B) Str_bioreaktor, 100 μm

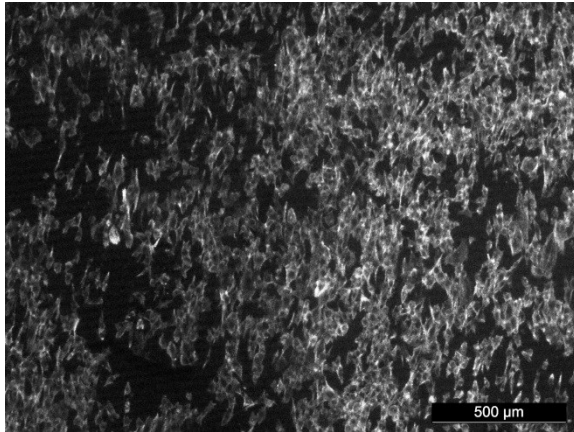


C) Str_CS_bioreaktor, 500 μm

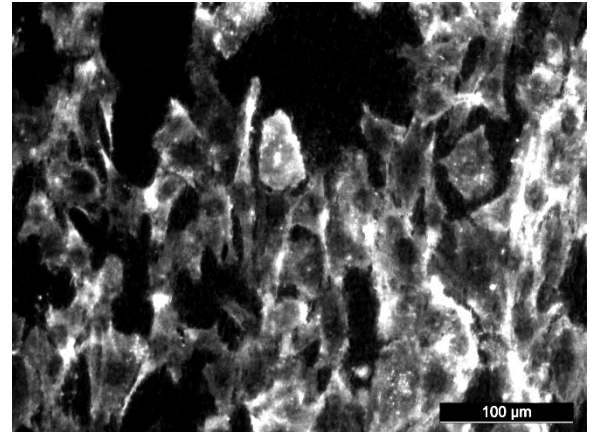


D) Str_CS_bioreaktor, 100 μm

Obrázek 14: Fotografie buněčné morfologie



A) Str_malý bioreaktor, 500 μm



B) Str_malý bioreaktor, 100 μm

Obrázek 15: Fotografie buněčné morfologie

Na obrázku 11 jsou zobrazeny fotografie buněk rostoucích v inkubátoru na upraveném i neupraveném povrchu polystyrenu. Jak je z fotek na první pohled vidět, na polystyrenu s upraveným povrchem rostou buňky v menším množství než na polystyrenu bez úpravy. Dokonce i vzhled buněk se liší. Buňky na strukturovaném povrchu vytváří větší množství výběžků než buňky na neupraveném povrchu.

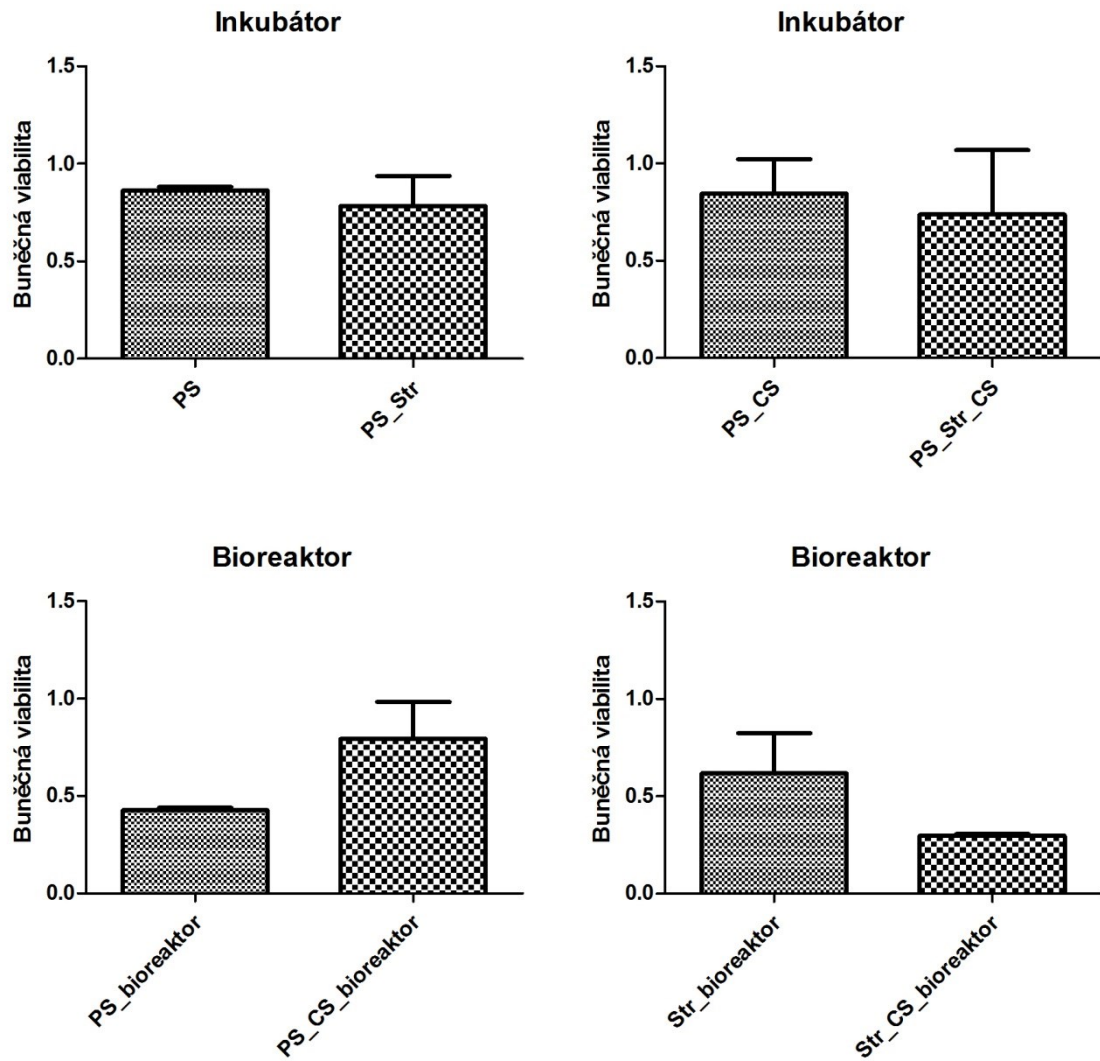
Na dalším obrázku jsou fotografie, jak neupraveného polystyrenu s Calf Serem, tak i upraveného s Calf Serem. Jako na předchozím obrázku jsou zde vidět stejné rozdíly v počtu i v samotné morfologii buněk.

Na obrázku 13, jsou zobrazeny fotografie buněk z neupraveného polystyrenu s Calf Serem, ale i bez něj. Tato kultivace probíhala ve velké komoře bioreaktoru. Na těchto fotkách můžeme vidět, že v bioreaktoru je menší počet buněk než v inkubátoru, ale rozdíly mezi buňkami se sérem nebo bez séra nejsou tak viditelné.

Na dalším obrázku jsou fotografie upraveného polystyrenu s Calf Serem i bez něj kultivované ve velké komoře bioreaktoru. Na fotkách můžeme vidět větší počet buněk, než na předešlých polystyrenových vzorcích bez úpravy. Je zde také vidět rozdíl v morfologii, kdy buňky na strukturovaných površích tvoří větší počet výběžků a jsou více nedefinovatelné. Viditelný je zde také rozdíl v přidavku Calf Sera, díky kterému je na vzorcích více buněk.

Na obrázku 15 jsou zobrazeny buňky upraveného polystyrenu kultivované v malé komoře bioreaktoru. Kvůli nedostatečnému počtu vzorků, byly do malé komory bioreaktoru vloženy jen tyto vzorky. Jsou zde vidět největší rozdíly oproti inkubátoru a velké komoře bioreaktoru. Díky malé komoře došlo k velkému smykovému napětí, proto jsou buňky orientovány v jednom směru, ve kterém teklo médium. Rozdíly v počtu buněk nejsou viditelné, ale vzhled buněk se velmi liší.

V druhé části práce byl použit MTT test, který se používá pro hodnocení viability, tedy životaschopnosti buněk. Z důvodu nedostatku vzorků byly vzorky, které se již použily na buněčnou morfologii opláchnuty 70 % etanolem a znovu použity na test MTT. Z toho důvodu je třeba vnímat výsledky jako preliminární.



Obrázek 16: Výsledky buněčné viability

Výsledky MTT testu byly rozděleny do čtyř grafů, které jsou zobrazeny na obrázku 16. Jak je na prvním grafu vidět, na polystyrenu bez úpravy kultivovaném v inkubátoru mají buňky o něco málo větší viabilitu, než na upraveném polystyrenu. Stejně je tomu tak i na druhém grafu, kde mají buňky polystyrenu bez úpravy s Calf Serem kultivované v inkubátoru o něco málo větší viabilitu, než na upraveném polystyrenu s Calf Serem. Na třetím grafu, kde jsou zobrazeny výsledky růstu buněk polystyrenu a polystyrenu s Calf Serem kultivované ve velké komoře bioreaktoru, je vidět mezi vzorky větší rozdíl. Buňky, které jsou na vzorcích opatřených Calf Serem, mají o poznání větší viabilitu než buňky, které jsou na vzorcích bez tohoto séra. Ve čtvrtém grafu je to však obráceně. Zde mají buňky na upraveném povrchu opatřeném Calf sérem menší viabilitu, než upravené vzorky bez tohoto séra. Tato neshoda je pravděpodobně způsobena poničením povrchové struktury vzorků. Z tohoto důvodu nemůžeme považovat výsledek tohoto testu za věrohodný.

MTT test byl také proveden u strukturovaných vzorků polystyrenu v malé komoře bioreaktoru. Z důvodu poškození povrchu strukturovaných vzorků však výsledek tohoto testu není v této práci zveřejněn.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že existuje rozdíl mezi běžnou kultivací a kultivací v bioreaktoru. Kultivace v bioreaktoru vytváří umělé prostředí, ve kterém je buňkám povolen růst nebo interakce s okolím ve všech třech rozměrech. Tato kultivace napodobuje buňkám *in vivo* podmínky ve srovnání s nepřírodně tenkými, jednovrstevnými buňkami, které rostou na dvourozměrném plastu. Kultivace v bioreaktoru radikálně zvyšuje buněčný růst, diferenciaci a funkci buněk. Kromě toho mají buněčné kultury v bioreaktoru větší stabilitu a delší životnost než buněčné kultury v Petriho miskách. Kultivace buněk v bioreaktoru je tedy podstatně lepší než kultivace za běžných statických podmínek [56]. Z výsledků mé práce však lze vidět, že vzorky, které byly kultivovány v bioreaktoru, byly pokryty menším množstvím buněk, než vzorky kultivované v inkubátoru. Kultivace za běžných podmínek buňkám vyhovovala více, než kultivace v bioreaktoru. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben velmi krátkou dobou kultivace, jelikož použití bioreaktoru významně zvyšuje životaschopnost buněk a umožňuje kultivaci buněk v delší době.

Velké rozdíly v počtu buněk jsou také vidět na vzorcích, které byly pokryty Calf Serem a na těch, které toto sérum neobsahovaly. Je známo, že sérové proteiny vysoce napomáhají adhezi buněk ke vzorku a následné proliferaci buněk [57]. Jak je vidět na fotkách obrázku 12, Calf Serum podporuje větší adhezi buněk. Na vzorcích, které toto sérum obsahovaly, můžeme tedy vidět větší počet buněk, než na vzorcích, bez tohoto séra.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřená na buněčný růst v simulovaných *in vivo* podmínkách, tedy v bioreaktoru. Pro tuto práci byl vybrán reaktor s mechanickou stimulací, který pro naše účely nejlépe simuluje *in vivo* podmínky.

Experimentální část této práce byla zaměřena na čtyři faktory pro správný růst buněk: úprava povrchu, použití Calf Sera, smykové napětí a dynamické vs. statické kultivační podmínky. Vzorky byly připraveny na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství Fakulty technologické UTB, kde došlo i k povrchové úpravě poloviny vzorků. Rozdíl smykového napětí zde byl způsoben velkou a malou komorou bioreaktoru a dynamické kultivační podmínky byly zajištěny rotačním bioreaktorem. Buňky byly ponechány v inkubátoru po dobu 48 hodin a poté byly nabarveny a vyfoceny. Kultivace buněk pro MTT test byla provedena stejně jako kultivace pro buněčné focení.

Z fotografií, které byly pořízeny invertovaným mikroskopem s fázovým kontrastem i z MTT testu, můžeme nejlépe vidět rozdíly v počtu buněk i buněčné morfologie. Z výsledků těchto testů můžeme říci, že počet buněk kultivovaných v inkubátoru je o něco větší než počet buněk kultivovaných v bioreaktoru, tedy statické kultivační podmínky buňkám vyhovovaly více. Stejně tak i přítomnost Calf Sera na vzorcích způsobila větší počet buněk, než na vzorcích, které tímto sérem nejsou pokryty. Velké rozdíly v buněčné morfologii můžeme vidět na upraveném povrchu, jak v inkubátoru, tak i v bioreaktoru. Je tedy zřejmé, že povrchová úprava vzorku ovlivňuje vzhled buňky. Největší rozdíly v buněčné morfologii jsou však vidět na buňkách na upraveném vzorku, které byly kultivovány v malé komoře bioreaktoru. Pravděpodobně vlivem velkého smykového napětí byly buňky orientovány ve směru toku média.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MIGONNEY, Véronique. *Biomaterials*. London: ISTE, 2014, 233s. ISBN 978-1-84821-585-6.
- [2] LECLERC, Mario a Robert GAUVIN. *Functional Materials: For Energy, Sustainable Development and Biomedical Sciences*. Berlín: Walter de Gruyter GmbH & Co, 2014, 493s. ISBN 978-3-11-030781-8.
- [3] RAMAKRISHNA, Seeram, Murugan RAMALINGAM, T.S. Sampath KUMAR a Winston O. SOBOYEJO. *Biomaterials: a nano approach*. New York: Boca Raton: CRC Press, 2010, 350s. ISBN 978-1-4200-4781-3.
- [4] WONG, Joyce Y., Joseph D. BRONZINO a Donald R. PETERSON. *Biomaterials: Principles and Practices*. Boca Raton: CRC Press, 2013, 281s. ISBN 978-1439872512.
- [5] RATNER, B. D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 3. vydání. Boston: Elsevier/Academic Press, 2013, 1519s. ISBN 978-0-12-374626-9.
- [6] RATNER, Buddy D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 1. vydání, San Diego: Academic Press, 1996, 484s. ISBN 0-12-582463-7.
- [7] CHEN, Qizhi a George THOUAS. *Biomaterials: a basic introduction*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015, 706s. ISBN 978-1-4822-2769-7.
- [8] PARK, Joon Bu. a Joseph D. BRONZINO. *Biomaterials: principles and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2003, 205s. ISBN 08-493-1491-7.
- [9] SHI, Donglu. *Biomaterials and tissue engineering*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004, 246 s. ISBN 3-540-22203-0.
- [10] LECLERC, Mario a Robert GAUVIN. *Functional materials for energy, sustainable development and biomedical sciences*. 2. Berlín: Walter de Gruyter, 2014, 493s. ISBN 978-311-0307-818.
- [11] WILLIAMS, D. F. *Essential biomaterials science*. Cambridge: Cambridge University Press, 2014, 640s. ISBN 978-052-1899-086.

- [12] KIM, Moon Suk, Jae Ho KIM, Byoung Hyun MIN, Heung Jae CHUN, Dong Keun HAN a Hai Bang LEE. Polymeric Scaffolds for Regenerative Medicine. *Polymer Reviews*. 2011, vol. 51, no. 1, 23-52. DOI: 10.1080/15583724.2010.537800. ISSN 1558-3724.
- [13] CUI, Zhi, Baofeng YANG a Ren-Ke LI. Application of Biomaterials in Cardiac Repair and Regeneration. *Engineering*. Toronto: Executive Associate Editors, 2016, vol. 2, no. 1, 141-148. DOI: 10.1016/J.ENG.2016.01.028. ISSN:2095-8099.
- [14] ZOHRABIAN, Vahe M., Michael SONICK, Debby HWANG a James J. ABRAHAMS. Dental Implants. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 2015, vol. 36, no. 5, 415-426. DOI: 10.1053/j.sult.2015.09.002. ISSN 08872171.
- [15] MICHLER, Goerg H. a F. J. BALTA-CALLEJA. *Nano- and micromechanics of polymers: structure modification and improvement of properties*. Cincinnati: Hanser Publications, 2012, 604s. ISBN 978-344-6428-447.
- [16] LLOYD, Andrew W., Richard G.A. FARAGHER a Stephen P. DENYER. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials*. Elsevier, 2001, vol. 22, no. 8, 769-785. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00237-4. ISSN 01429612.
- [17] ONG, Kevin, Min YUN a Joshua WHITE. New biomaterials for orthopedic implants. *Orthopedic Research and Reviews*. 2015, vol. 2015, 107-130. DOI: 10.2147/ORR.S63437. ISSN 1179-1462.
- [18] NAVARRO, M, A MICHIARDI, O CASTANO a J.A PLANELL. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of The Royal Society Interface*. 2008, vol. 5, no. 27, 1137-1158. DOI: 10.1098/rsif.2008.0151. ISSN 1742-5689.
- [19] RISTIĆ, Branko, Zoran POPOVIĆ, Dragan ADAMOVIĆ, Goran DEVEDŽIĆ. Selection of Biomaterials in Orthopedic Surgery. *Vojnosanitetski Pregled*. 2010, vol. 67, no. 10, 847-855. UDC:615.477::617.3-089-77. ISSN 0042-8450.
- [20] SHAH, Sejal, Anjum QURESHI, N.L. SINGH, P.K KULRIYA, K.P. SINGH a D.K. AVASTHI. Structural and chemical modification of polymer composite by proton irradiation. *Surface and Coatings Technology*. 2009, vol. 203, no. 17-18, 2595-2599. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2009.02.052. ISSN 02578972.

- [21] VITOS, L., A.V. RUBAN, H.L. SKRIVER a J. KOLLA. The surface energy of metals. *Surface Science*. 1998, vol. 411, no. 1-2, 186–202. ISSN 0039-6028.
- [22] PACKHAM, D.E. Surface Energy, Surface Topography & Adhesion. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2003, vol. 23, no. 6, 437-448. DOI: 10.1016/S0143-7496(03)00068-X. ISSN 0143-7496.
- [23] EBNESAJJAD, Sina. a Cyrus F. EBNESAJJAD. *Surface treatment of materials for adhesion bonding*. Norwich, NY, U.S.A.: William Andrew Pub., 2006. ISBN 978-0-8155-1523-4.
- [24] BRDIČKA, Rudolf, Mirko KALOUSEK a Alexander SCHÜTZ. *Úvod do fyzikální chemie*. 2. vydání, Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1972, 493 s.
- [25] KALOUS, Vítěz. *Základy fyzikálně chemických metod*. 2. vydání, Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1975, 476 s.
- [26] RATNER, B. D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2. vydání. Boston: Elsevier Academic Press, 2004, 864 s. ISBN 978-0-12-582463-7.
- [27] TAUBERT, Andreas, João F. MANO a J. Carlos RODRÍGUEZ-CABELLO. *Biomaterials surface science*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2013, 616 s. ISBN 978-3-527-33031-7.
- [28] GRIESSER, Hans J. *Thin Film Coatings for Biomaterials and Biomedical Applications*. 1. Duxford: Woodhead Publishing, 2016, 310 s. ISBN 978-1-78242-453-6.
- [29] MERRETT, K., R. M. CORNELIUS, W. G. MCCLUNG, L. D. UNSWORTH a H. SHEARDOWN. Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2002, vol. 13, no. 6, 593-621. DOI: 10.1163/156856202320269111. ISSN 0920-5063.
- [30] TODORKA G. VLADKOVA. *Surface engineering of polymeric biomaterials*. Versailles: Quae, 2013. ISBN 978-184-7356-581.
- [31] ŠIMEK, Lubomír a Josef HRNČIŘÍK. *Fyzikální chemie I*. Vydání 4. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, 180 s. ISBN 978-807-3183-240.

- [32] SUN, Taolei a Guangyan QING. Biomimetic Smart Interface Materials for Biological Applications. *Advanced Materials*. 2011, vol. 23, no. 12, H57-H77. DOI: 10.1002/adma.201004326. ISSN 09359648.
- [33] WILLIAMS, David F. Biocompatibility Pathways: Biomaterials-Induced Sterile Inflammation, Mechanotransduction, and Principles of Biocompatibility Control. *ACS Biomaterials Science*. 2017, vol. 3, no. 1, 2-35. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00607. ISSN 2373-9878.
- [34] KHALILI, Amelia a Mohd AHMAD. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, vol. 16, no. 8, 18149-18184. DOI: 10.3390/ijms160818149. ISSN 1422-0067.
- [35] ZHOU, S. Kevin. *Medical Image Recognition, Segmentation and Parsing: Machine Learning and Multiple Object Approaches*. London: Academic Press, 2016, 542 s. ISBN 978-0-12-802581-9.
- [36] BOUTRAND, Jean-Pierre. *Biocompatibility and performance of medical devices*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2012, 544 s. ISBN 978-0-85709-070-6.
- [37] ZHANG, Sam. *Biological and biomedical coatings handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011. Advances in materials science and engineering, 520 s. ISBN 978-1-4398-4996-5.
- [38] LUTTRELL, William E., Warren W. JEDERBERG a Kenneth R. STILL. *Toxicology principles for the industrial hygienist*. Fairfax, VA: American Industrial Hygiene Association, 2008, 453 s. ISBN 978-1-931504-88-1.
- [39] SILVA, H. Marques da, M. MATEESCU, A. PONCHE, C. DAMIA, E. CHAMPION, G. SOARES a K. ANSELME. Surface transformation of silicon-doped hydroxyapatite immersed in culture medium under dynamic and static conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, vol. 75, no. 1, 349-355. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.009. ISSN 09277765.
- [40] MERETOJA, Ville V., Minna MALIN, Jukka V. SEPPÄLÄ a Timo O. NÄRHI. Osteoblast response to continuous phase macroporous scaffolds under static and

- dynamic culture conditions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, vol. 89 A, no. 2, 317-325. DOI: 10.1002/jbm.a.31980. ISSN 15493296.
- [41] TANDON, Nina, Darja MAROLT, Elisa CIMETTA a Gordana VUNJAK-NOVAKOVIC. Bioreactor engineering of stem cell environments. *Biotechnology Advances*. 2013, vol. 31, no. 7, 1020-1031. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.03.007. ISSN 07349750.
- [42] MA, Peter X., ed. *Biomaterials and regenerative medicine*. 1. vydání. Cambridge: Cambridge University Press, 2014, 703 s. ISBN 978-1-107-01209-7.
- [43] CHAUDHURI, Julian. a Mohamed AL-RUBEAI. *Bioreactors for tissue engineering: principles, design and operation*. London: Springer, 2005, 376 s. ISBN 14-020-3740-6.
- [44] BALTZ, Richard H., Julian E. DAVIES a A. L. DEMAIN. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. 3. vydání. Washington, DC: ASM Press, 2010, 766 s. ISBN 978-1-55581-512-7.
- [45] LEI, Xiao-hua, Li-na NING, Yu-jing CAO, et al. NASA-Approved Rotary Bioreactor Enhances Proliferation of Human Epidermal Stem Cells and Supports Formation of 3D Epidermis-Like Structure. *PLoS ONE*. 2011, vol. 6, no. 11, e26603-. DOI: 10.1371/journal.pone.0026603. ISSN 1932-6203.
- [46] SUN, Liang, Chao YANG, Yaneng GE, Mei YU, Guoqing CHEN, Weihua GUO a Weidong TIAN. In vitro three-dimensional development of mouse molar tooth germs in a rotary cell culture system. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2014, vol. 24, no. 3, 175-183. DOI: 10.1111/ipd.12057. ISSN 09607439.
- [47] LUO, J. K., FU Y. Q., LI Y., DU X. Y., FLEWITT A. J., WALTON A. J. a MILNE W. I. Moving-part-free microfluidic systems for lab-on-a-chip. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2009, vol. 19, no. 5, 054001. DOI: 10.1088/0960-1317/19/5/054001. ISSN 0960-1317.
- [48] YI, Changqing, Cheuk-Wing LI, Shenglin JI a Mengsu YANG. Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells. *Analytica Chimica Acta*. 2006, vol. 560, no. 1-2, 1-23. DOI: 10.1016/j.aca.2005.12.037. ISSN 00032670.

- [49] KUSCHEL, Meike; NEUMANN, Tanja; BARTHMAIER, Peter; KRATZMEIER, Martin. Use of Lab-on-a-chip Technology for Protein Sizing and Quantitation. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2002, vol. 13, no. 3 s. 172-178. ISSN:1524-0215.
- [50] WRZECIONKO, Erik, Antonín MINAŘÍK, Petr SMOLKA, et al. Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents. *ACS Applied Materials*. 2017, vol. 9, no. 7. DOI: 10.1021/acsami.6b15774. ISSN 1944-8244.
- [51] PLASTICSEUROPE: *Types and categories of plastics: Polystyrene* [online]. [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://www.plasticseurope.org/what-is-plastic/types-of-plastics-11148/polystyrene.aspx>
- [52] KUČERA, Miloslav. *Vznik makromolekul*. Brno: VUTIUM, 2003, 172 s. ISBN 80-214-2127-4.
- [53] NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™). *Lgcstandards: atcc.org* [online]. [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1658.aspx?geo_country=cz#characteristics
- [54] SCHERLIEß, Regina. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, vol. 411, no. 1-2, 98-105. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.053. ISSN 03785173.
- [55] BRESCIA, Peter a et al., 2009. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Meso-thelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. *BioTek Instruments* [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <https://www.biotek.com/resources/single.html?newsid=10479>
- [56] ANTONI, Delphine, Hélène BURCKEL, Elodie JOSSET a Georges NOEL. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, vol. 16, no. 3, 5517-5527. DOI: 10.3390/ijms16035517. ISSN 1422-0067.
- [57] DELIVOPOULOS, Evangelos, Myriam M. OUBERAI, Paul D. COFFEY, Marcus J. SWANN, Kevin M. SHAKESHEFF a Mark E. WELLAND. Serum protein layers on parylene-C and silicon oxide: Effect on cell adhesion. *Colloids*

and Surfaces B: Biointerfaces. 2015, vol. 126, 169-177. DOI:
10.1016/j.colsurfb.2014.12.020. ISSN 09277765.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PMMA	Polymetylmetakrylát
Fe	Železo
Ni	Nikl
Al	Hliník
Cu	Měď
Zn	Zinek
Ti	Titan
C	Uhlík
N	Dusík
O	Kyslík
Al ₂ O ₃	Oxid hlinitý
MgO	Oxid hořečnatý
SiO ₂	Oxid křemičitý
ZrO ₂	Oxid zirkoničitý
CO	Oxid uhelnatý
Cr	Chrom
PTFE	Polytetrafluorethylen
Mo	Molybden
PGA	Kyselina polyglykolová
PLA	Kyselina polymléčná
PHEMA	Polyhydroxyethylmetakrylát
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
EDX	Energická disperzní rentgenová spektroskopie
AFM	Mikroskopie atomárních sil

ESCA	Elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu
IR	Infračervená spektroskopie
γ_{sl}	Rozhraní mezi tuhou a kapalnou fází
γ_{sg}	Rozhraní mezi tuhou a plynou fází
γ_{lg}	Rozhraní mezi kapalnou a plynou fází
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
RNA	Kyselina ribonukleová
THF	Tetrahydrogenfuran
ETH	2-ethoxyethanol
PS	Polystyren
DMSO	Dimetylsulfoxid
Str	Upravený - strukturovaný polystyren
CS	Calf Serum

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Koronární stent tepen [6]	16
Obrázek 2: Ukázka ortopedických protéz z keramického materiálu [19]	18
Obrázek 3: Strukturní vzorec PMMA [20]	19
Obrázek 4: Kontaktní úhel v ideálním stavu, upraveno podle [23]	23
Obrázek 5: Různé fáze adsorpce proteinu na povrchu biomateriálů, upraveno podle [26].	26
Obrázek 6: Diferenciace buněčných linií z totipotentní blastocysty, upraveno podle [5].	28
Obrázek 7: Autokláv Tuttnauer 3870 ELPV	36
Obrázek 8: Ukázka první poloviny vzorků v bioreaktoru a druhé poloviny vzorků v Petriho miskách	38
Obrázek 9: Reference NIH/3T3 [53].	39
Obrázek 10: Přeměna MTT na formazan [55].	40
Obrázek 11: Fotografie buněčné morfologie	41
Obrázek 12: Fotografie buněčné morfologie	42
Obrázek 13: Fotografie buněčné morfologie	43
Obrázek 14: Fotografie buněčné morfologie	44
Obrázek 15: Fotografie buněčné morfologie	45
Obrázek 16: Výsledky buněčné viability	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 3: Fáze adheze proteinů na biomateriál, upraveno podle [26].....	26
Tabulka 4: Souhrn použitých vzorků.....	38