

Mechanismus buněčné adheze a její vratnost

Jana Popelková

Bakalářská práce
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Jana POPELKOVÁ

Studijní program: B 2808 Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: Chemie a technologie materiálů

Téma práce: Mechanismus buněčné adheze a její vratnost.

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na zadané téma.
2. Kriticky zhodnoťte současné modely adheze vybraných buněk na daný substrát.
3. Uveďte současné metody používané pro studium buněčné adheze.
4. Citujte použitou literaturu.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Přístupné zdroje na ÚFMI a dále dle doporučení vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Marián Lehocký, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

14. února 2006

Termín odevzdání bakalářské práce:

13. června 2006

Ve Zlíně dne 17. února 2006

prof. Ing. Ignát Hoza, CSc.
děkan



prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Interakce mezi mikroorganismy a povrchy pevných látek silně ovlivňuje chování mikroorganismů v přírodních a průmyslových systémech. Mnoho reaktorů s biofilmem jsou na bázi buněk adsorbovaných na povrchu. Hlavním cílem této bakalářské práce je popis základních mechanismů buněčné adheze. Tento popis je nezbytný pro výzkum buněčné adheze obecně a důležitý pro mnohé praktické aplikace.

Klíčová slova: Buněčná adheze, Biofilm, Mechanizmy adheze

ABSTRACT

Interactions between micro organism and solid surfaces strongly influence the behaviour of micro organism in natural and industrial systems. Many biofilm reactors are on the surface adsorbed cell basis. The main goal of this thesis is to describe the basics mechanisms of cell adhesion. This description is Essentials for cell adhesion science in general, and important for many practical applications.

Keywords: Cell adhesion, Biofilm, Adhesion mechanisms

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Mariánu Lehockému, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky, které mi při řešení mé práce poskytoval.

Zvláště bych na tomto místě chtěla poděkovat mým rodičům za jejich soustavnou podporu během celé délky studia.

OBSAH

ÚVOD.....	7
I TEORETICKÁ ČÁST	8
1 KOLONIZACE POVRCHŮ	9
1.1 ADHEZNÍ VLASTNOSTI MIKROORGANIZMŮ	9
1.2 VÝBĚR POVRCHŮ PRO EXPERIMENTY	11
2 STATICKÉ VERSUS TOKOVÉ SYSTÉMY.....	12
2.1 STATICKÉ SYSTÉMY	13
2.2 TOKOVÉ SYSTÉMY	13
2.2.1 Koloidní částice vhodné pro depozici v toku.....	20
2.3 BUNĚČNÁ DESORPCE	21
3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KINETIKU A MECHANIZMUS BUNĚČNÉ ADHEZE	22
3.1 VLIV IONTOVÉ SÍLY	22
3.2 VLIV PH	22
3.3 VLIV ELEKTROKINETICKÉHO POTENCIÁLU ZETA A POTENCIÁLU PROUDĚNÍ	23
3.4 INTERAKČNÍ ENERGIE	24
3.5 VLIV SIL BORNOVA TYPU	25
3.6 VLIV SMÁČIVOSTI.....	25
3.7 VLIV DRSNOSTI POVRCHU.....	26
3.8 VLIV POVRCHOVÝCH NEHOMOGENIT	27
3.9 VLIV STRUKTURY TVOŘENÉHO BIOFILMU	27
3.10 ZÁVĚREČNÉ SHRNTÍ K TÉTO KAPITOLE.....	30
ZÁVĚR.....	31
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	32
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	33
SEZNAM OBRÁZKŮ	34

ÚVOD

K uchycení a imobilizaci mikroorganismů dojde zpravidla vždy, nachází-li se povrch pevných látek v jejich blízkosti. Pokud to podmínky dovolí, dojde k růstu kolonie, replikaci buněk, časté tvorbě nejrůznějších polysacharidů a tak zvaná kolonizace povrchu vede k tvorbě vícevrstevných struktur zvaných jako biofilm. V přírodě, biofilmy obsahují nejrůznější soustavy mikro a makroorganismů, které jsou prostorově a často také dočasně uspořádány v závislosti na jejich funkčních vztazích, jako například symbióza, konkurence, antagonismus a predace. Biofilmy na površích je však možno nalézt i v laboratorních podmínkách, přestože použité mikroorganismy jsou často odlišné od těch, které s tuhým povrchem interagují fyziologicky [1].

V několika posledních dekáдах byl zaznamenán neuvěřitelný rozmach studia buněčné adheze a tvorby biofilmů v důsledku významnosti jejich aplikací v širokých oblastech průmyslu, klinické medicíny, biotechnologii, farmakologii, atd. Biofilmy tvoří fázové rozhraní, které významně ovlivňuje množství technologických procesů, jako tok kapaliny v potrubí, přenos tepla ve výměnících a pohyb lodí na vodní hladině. Dále tvoří ochranu před patogeny na implantátech a umělých protézách, tvoří ochranu na obalových materiálech v potravinářství a v systémech pro úpravu pitné vody. Biofilmy se také podílí na korozi kovů, nejčastěji železa a oceli, manganu a mědi. Účinnost biofilmů je spojována také s korozi a degradací minerálů, jako např. mramoru nebo jejich oxidací, jako třeba v případě arsenopyritu. Biofilmy jsou také vhodné jako biologické filtry zachycující zdraví škodlivé a zhoubné mikroorganismy.

V posledních letech byly vyvinuty nové postupy pro analýzu složení biofilmů a jejich prostorovou orientaci, především molekulární analýza a charakterizace v reálném čase. Tyto metody byly důsledkem významných pokroků v porozumění funkčních a prostorových vztazích mezi organismy tvořící biofilmy a tím značně zvýšily potenciál pro řízenou kontrolu jejich tvorby. Pokroky v tvorbě molekulárních sond dovolují identifikaci mikroorganismů, jejich rozlišení a dávají informace o jejich fyziologické aktivitě. Obrazová a počítačem řízená analýza umožňuje studium kinetiky kolonizačního procesu, zatímco konfokální laserová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil dovoluje tří-rozměrnou analýzu a charakterizaci biofilmů v reálném čase [1].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOLONIZACE POVRCHŮ

Během posledních třiceti let bylo studium spoje buňka - substrát zaměřeno především k určení adhezních vlastností různých částí adherujících mikroorganismů pro identifikaci specifických povrchů, které zamezují kolonizaci a k posouzení vlivu okolního prostředí, jako teplota, pH a koncentrace elektrolytu, které řídí proces buněčného uchycení. Přestože byly provedeny nesčetné pokusy o identifikaci základních parametrů, které řídí buněčnou adhezi, stále nebyl nalezen základní model a množství získaných dat ukazuje na značnou odlišnost adheze jednotlivých druhů mikroorganismů na daný substrát. V důsledku toho, je vždy velmi důležité provést studium adheze buněk na konkrétní substrát, při zachování úzce definovaných podmínek.

1.1 Adhezní vlastnosti mikroorganismů

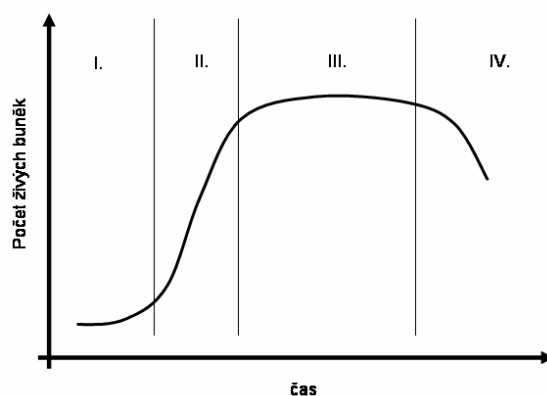
Počet bakterií které se navážou na povrch substrátu a jejich depoziční rychlost nezávisí jenom na jejich druhu, ale i na jejich fyziologickém fenotypu. Adhezní vlastnosti mohou být ovlivněny řadou vnějších vlivů, buď závislých na jejich fyziologii nebo chemické podstatě adhezní interakce. To znamená, že organismy musí být vybrány nejen na bázi jejich studované reprezentativnosti, ale i na způsobu přípravy v laboratorních podmínkách. Zachycení bakterií je rovněž ovlivněno koncentrací živin pro jejich růst a reprodukci. V jednorázových kulturách je někdy adheze ovlivněna fází růstu. U některých mikroorganismů je adheze lepší v exponenciální fázi, u jiných zase ve stacionární růstové fázi.

Životní cyklus mikroorganismů se skládá ze čtyř základních fází:

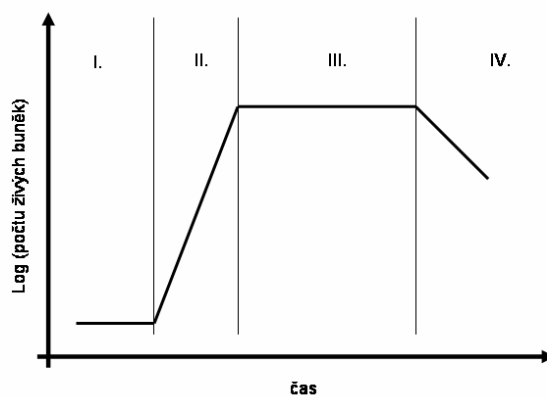
- I. Lag fáze
- II. Exponenciální (log) fáze
- III. Stacionární fáze
- IV. Fáze úmrtí buňky

Časový průběh růstu bakterií je popisován tzv. růstovou křivkou. Jsou-li bakterie přeneseny z jednoho prostředí do druhého, nastává typické období zpomalení růstu, tzv. lag fáze. Během této doby mění mikrobiální buňky svůj fyziologický stav, aby mohly

využívat nové prostředí. Počet buněk se nemění. Po určitém časovém intervalu si bakterie zvyknou na dané živiny a začnou se exponenciálně množit, nastává tzv. exponenciální (log) fáze charakteristická nárůstem optické hustoty systému. Jestliže se bakteriální buňky přestávají množit, nastupuje tzv. stacionární růstová fáze. Dochází k ní v případech vyčerpání živin, dosažení příliš vysoké populační hustoty buněk, příliš nízkého parciálního tlaku kyslíku nebo při nahromadění toxických produktů metabolismu (např. kyseliny mléčné nebo octové). Bakterie mohou ale zůstat i po dosažení své maximální populační hustoty ještě dlouho metabolicky aktivní, takže koncentrace senzoricky účinných produktů látkové výměny může kontinuálně narůstat. Jestliže je bakteriální populace příliš vysoká nebo množství toxických odpadů přeroste přípustnou mez, začnou bakterie exponenciálně odumírat.



Obr. 1. Růstová křivka v lineárních souřadnicích.

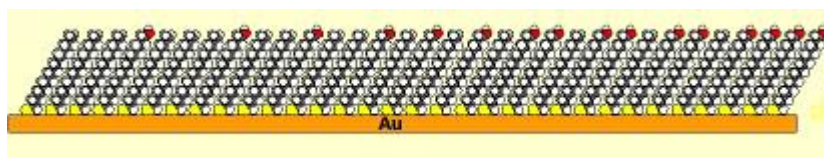


Obr. 2. Růstová křivka v logaritmických souřadnicích.

Na adhezi mohou mít vliv také faktory, které ovlivňují extracelulární produkci biopolymerů. Zdroje biologického uhlíku, poměr uhlík/dusík nebo koncentrace živin jsou hlavními faktory ovlivňující produkci výše zmíněných biopolymerů a tedy ovlivňují buněčnou adhezi v závislosti na daném mikroorganismu.

1.2 Výběr povrchů pro experimenty

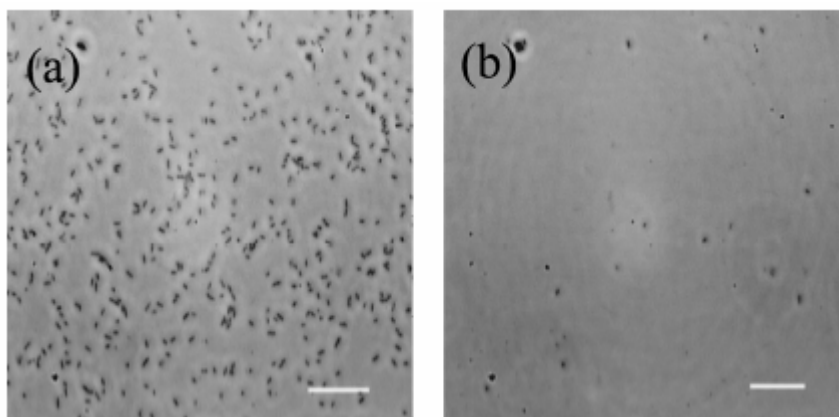
V posledních letech bylo provedeno mnoho pokusů které ukázaly, že množství buněk a síla jejich zachycení je závislá na charakteristikách povrchu např. elektrostatický náboj, volná povrchová energie, smáčivost a povrchová textura. V důsledku toho, jsou metody čištění povrchů před experimenty významným faktorem ovlivňujícím celý depoziční proces. To platí zvláště pro povrchy s vysokou povrchovou energií jako sklo, které jsou lehce kontaminovatelné nejrůznějšími adsorbenty v roztoku nebo v atmosféře. Takové povrchy mohou být čištěny použitím organických rozpouštědel nebo pomocí silných kyselin a opláchnuty důkladně v dvakrát destilované vodě, popřípadě ve vodě po reverzní osmóze. Autoklávování by nemělo být pro sterilizaci používáno, neboť při něm hrozí depozice nežádoucích prchavých produktů. Komerčně dostupné povrchy jako například sklo, organické polymery a kovy jsou běžné pokusné substráty. Jsou prováděny také pokusy na povrchově upravených materiálech. V poslední době se progresivně uplatňují tzv. „self-assembled monolayers“ (SAMs). Tyto jsou tvořeny monomolekulární vrstvou, která vzniká adsorpcí alkanthiolátů na povrch zlata, nebo častěji silikonových desek s naprášenou vrstvou zlata, přičemž se thiolová skupina naváže chemickou vazbou na povrch a do prostoru je orientován řetězec, který většinou nese 16 nebo 18 uhlíků, zakončený určitou funkční skupinou. Nejčastěji používanou funkční skupinou na konci řetězce a tím pádem skupinou interagující s mikroorganismy je methyl ($-CH_3$), hydroxyl ($-OH$), amin ($-NH_2$) a nebo karboxyl ($-COOH$). Ukázka SAMs je znázorněna na obr. 3.



Obr. 3. Ukázka „SAMs“ tvořených dvěma různými alkanthioly [2].

2 STATICKÉ VERSUS TOKOVÉ SYSTÉMY

Nejjednodušším postupem pro pozorování buněčné adheze je umístění po definovanou dobu do prostoru, kde jsou přítomny mikroorganismy. Tyto metody jsou označovány za statické. Testovaný povrch je většinou umístěn vertikálně nebo horizontálně, popřípadě diagonálně s definovaným třepáním, nejčastěji v rotační třepačce. V těchto případech je nutná přítomnost dalších zařízení, které udržují testovaný povrch v definované poloze, v důsledku čehož lze použít substráty předem definovaných rozměrů. Přesto jsou již vyvinuty systémy pro depozice na relativně větší plochy. I tak však byly nalezeny významné odchylky v depozičních množstvích a často bývá těžké dosáhnout uspokojivé opakovatelnosti výsledků. Jiné systémy (tokové systémy) byly vyvinuty pro studium depozic za laminárních toků v reálném čase. Po periodě adheze, která je zkoumána on-line pomocí systému optického mikroskopu a digitální kamery je velmi náročný krok odstranění vzorku z aparatury pro další studium. Pokud je síla adheze malá, může být vzájemná interakce buňka-substrát narušena i přechodem vzduchové bubliny v systému, jak je znázorněno na obr. 4. Touto metodou se dá studovat také desorpce mikroorganismů.



Obr. 4. Ukázka efektu přechodu vzduchové bubliny v tokovém reaktoru (a) před a (b) po přechodu bubliny, (měřítko, 20 μ m) [3].

Obě varianty systémů pro měření buněčné adheze budou zevrubně popsány v dalších kapitolách.

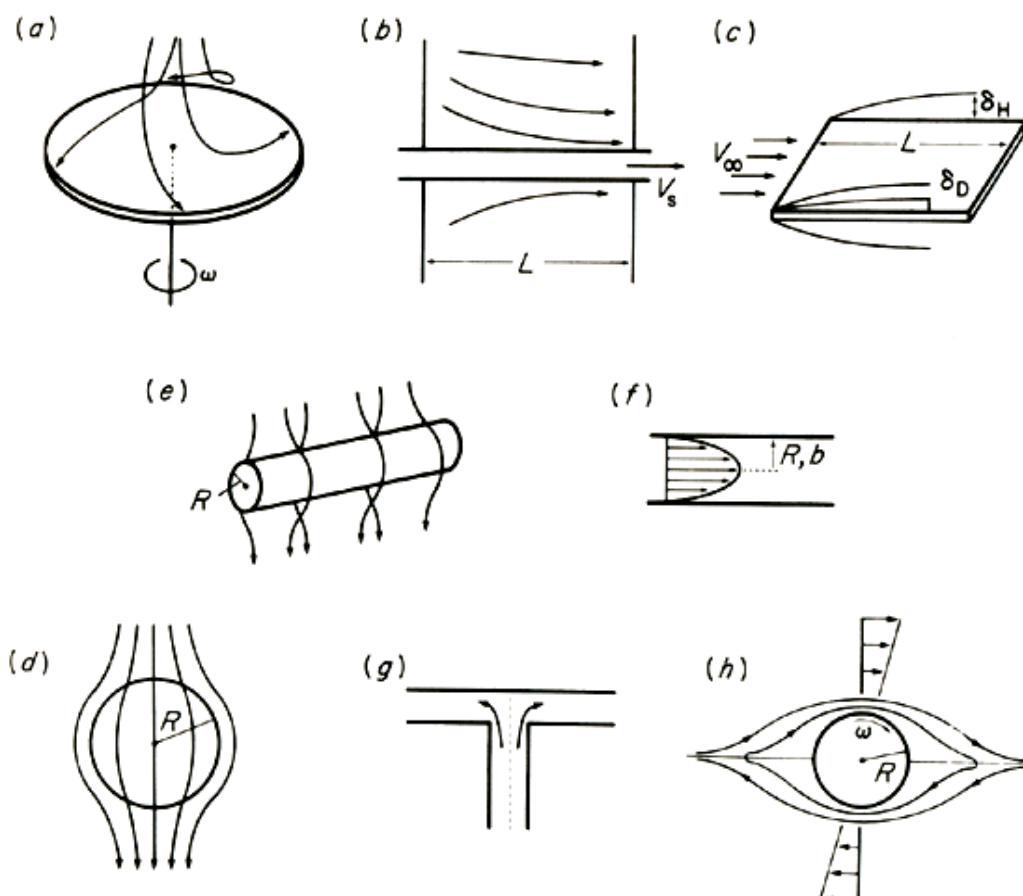
2.1 Statické systémy

Statické systémy pro studium adheze buněk patří k nejrychlejším a nejúspornějším co se buněčné suspenze týče. Zpravidla existují dva postupy. Buď se upevní vzorek do vertikální, či horizontální polohy a takto je ponořen do suspenze buněk nebo je položen horizontálně v aseptickém boxu a na jeho povrch je nanесena kapka buněčné suspenze. Čištění vzorku je prováděno omýváním v roztoku detergentů a dokonalém opláchnutí vodou nebo pokud to povaha povrchu dovolí v roztoku zvaném „piraňa“. Tento roztok se skládá z koncentrované kyseliny sírové a peroxidu vodíku. Výhodou je dokonalé odstranění nežádoucích mikroorganismů z povrchu testovaného substrátu silnými oxidačními činidly, umocněného zvýšenou teplotou, která vzniká smíšením peroxidu vodíku s kyselinou sírovou. Po této proceduře je opět velmi důležité testovaný povrch pečlivě opláchnout. Po uplynutí požadované doby po kterou povrch interagoval s buněčnou suspenzí dochází k dalšímu definovanému oplachu v dvakrát destilované vodě pro odstranění buněk, které nejsou zachyceny fyzikálně-chemickými vazbami z povrchu. Takto připravený a na vzduchu usušený vzorek za laboratorní teploty je předmětem dalšího vyhodnocení depozičního množství a jiných parametrů. V praxi dochází k mikroskopickému pozorování a následné analýze. Velkou výhodou tohoto systému je možnost studia relativně velkého množství vzorků najednou. Přičemž je nutné průměrovat hodnoty minimálně pěti měření pro získání jedné reprezentativní hodnoty. Nevýhodou je poněkud relativně slabší reprodukovatelnost měření, která je často závislá na testovaném povrchu a použitém buněčném substrátu. Přesto však, tato metoda je stále nejpopulárnější a široce používanou v laboratorních podmínkách [1].

2.2 Tokové systémy

Tokové systémy představují další skupinu metod, pomocí nichž lze zkoumat buněčnou adhezi a její vratnost. Velkou výhodou těchto systémů je fakt, že adhezi zkoumáme v reálném čase [1]. Tedy, není nutno srovnávat vzorky s jiným depozičním časem jako u statických metod, ale kontinuálně shromažďujeme data pro jeden vzorek v reálném čase. Tyto metody, na rozdíl od statických metod, vykazují mírně vyšší přesnost a

opakovatelnost. Kolektory pro něž máme matematický popis jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 5).

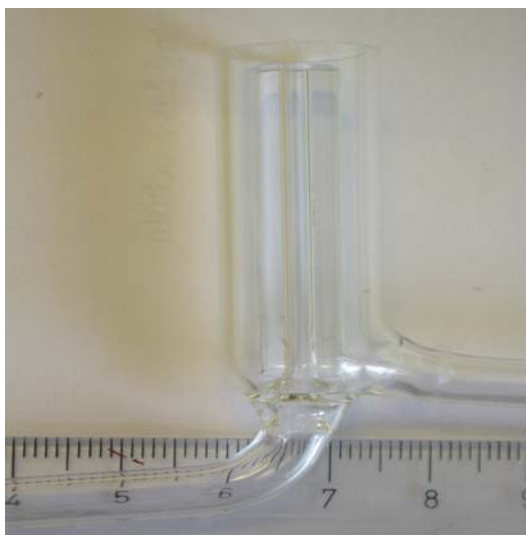


Obr. 5. Schématické znázornění kolektorů, pro něž známe matematický popis: (a) rotující disk, (b) plynule se pohybující drát nebo deska, (c) deska v ustáleném proudu, (d) koule v ustáleném proudu, (e) válcový kolektor v ustáleném proudu, (f) paralelní desky nebo válcový žlábek, (g) kolektor s bodem stagnace toku a (h) koule nebo válec v jednoduchém smykovém toku [4].

Tyto kolektory lze rozdělit do čtyř základních skupin:

- kolektory pohybující se konstantní úhlovou nebo posuvnou rychlostí v a nebo skrz disperzi (rotující disk, plynule se pohybující se drát nebo deska, Obr. 5. a, b).
- kolektory fixované v daném toku nebo sedimentující ve staticky klidné disperzi (deska, koule nebo válec v ustáleném proudu, Obr. 5. c, d, e).
- kolektory tvořící povrch uvnitř testovací komory (paralelní desky nebo žlábek a také kolektor s bodem stagnace toku, Obr. 5. f, g).
- Kolektory volně se pohybující v tokových polích jako koule či válec v jednoduchém smykovém toku, Obr. 5. h.

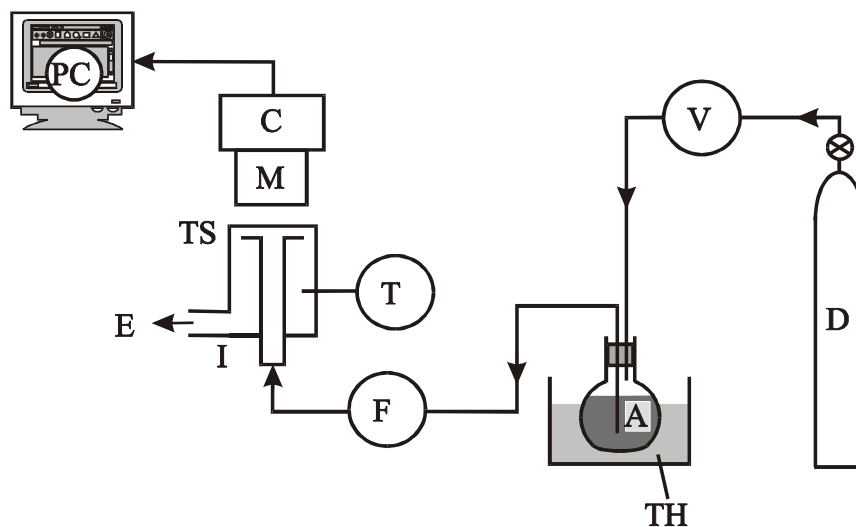
V praxi se pro studium buněčné adheze používají téměř výhradně kolektor s bodem stagnace v toku (Obr. 6, 7. a 8.) a komora tvořená paralelními deskami (Obr. 9. a, b, c, d).



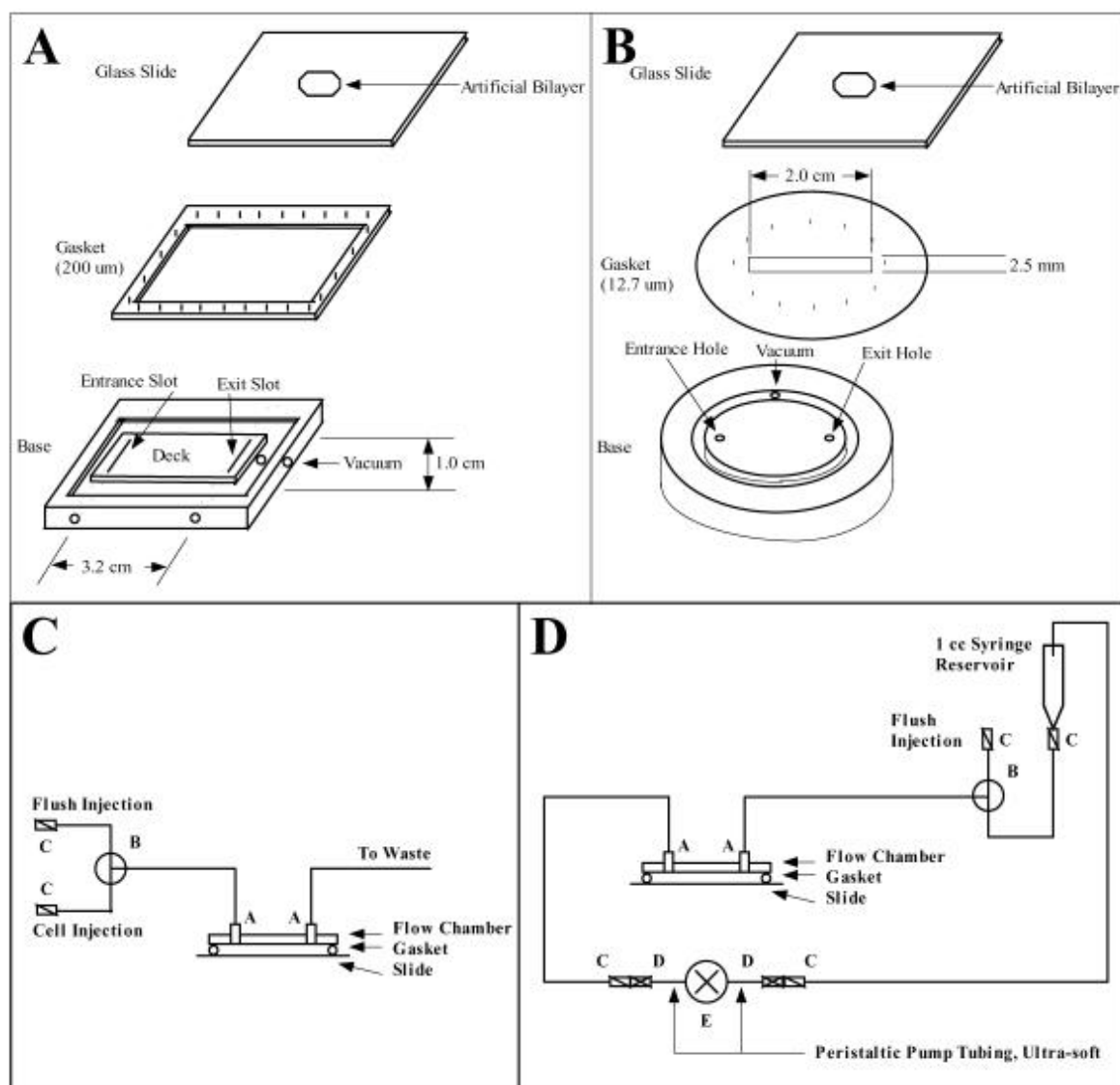
Obr. 6. Kolektor s bodem stagnace toku [5].



Obr. 7. Přodorys kolektoru s bodem stagnace v toku [5].

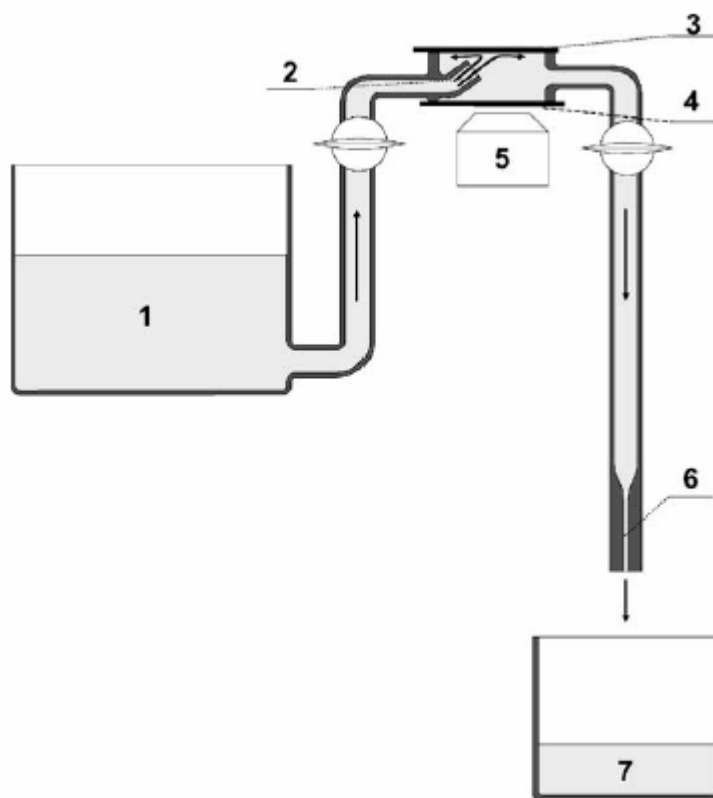


Obr. 8. Zapojení celé aparatury s celou s bodem stagnace v toku: PC – počítač, C – digitální vysokorychlostní kamera, M – mikroskop, E – výstup a I – vstup kapaliny, A – zásobník koloidní suspenze, D – plynová bomba, F – průtokoměr, T – teploměr, V – ventil, TH – termostat, TS – testovaný povrch jako vrchní část reaktoru [6].



Obr. 9. Různé druhy uspořádání komory tvořené paralelními deskami [7].

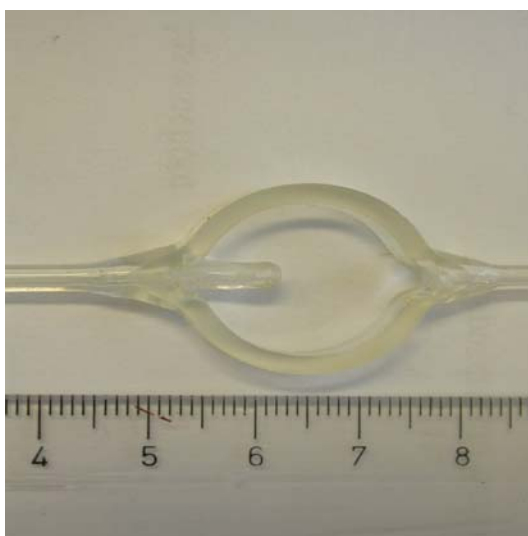
Tyto již zmíněné dva nejčastěji používané systémy mají ovšem několik vážných nedostatků. U reaktoru s bodem stagnace toku je hlavní nevýhodou omezení na studium povrchu, který je transparentní. Takovýchto povrchů je v praxi drtivá menšina. Na druhé straně, v reaktoru s paralelními deskami lze netransparentní povrchy zkoumat. Nevýhodou je ovšem fakt, že množství deponovaných koloidních částic závisí na poloze pozorování v reaktoru. Blízko vstupu jsou množství nedeponovaných částic vyšší než na konci tokové komory [8,9]. Kombinace výhod obou metod spolu s odstraněním jejich nedostatků byla základem pro konstrukci reaktoru s bodem stagnace toku se šikmou tryskou (Obr. 10, 11, 12.).



Obr. 10. Schématické znázornění reaktoru s bodem stagnace toku se šikmou tryskou: 1 – zásobník suspenze, 2 – vstupní kapilára, 3 – studovaný povrch, 4 – transparentní deska, 5 – mikroskop, 6 – výstupní kapilára a 7 – zásobník použité suspenze [9].



Obr. 11. Kolektor s bodem stagnace toku se šikmou tryskou [5].



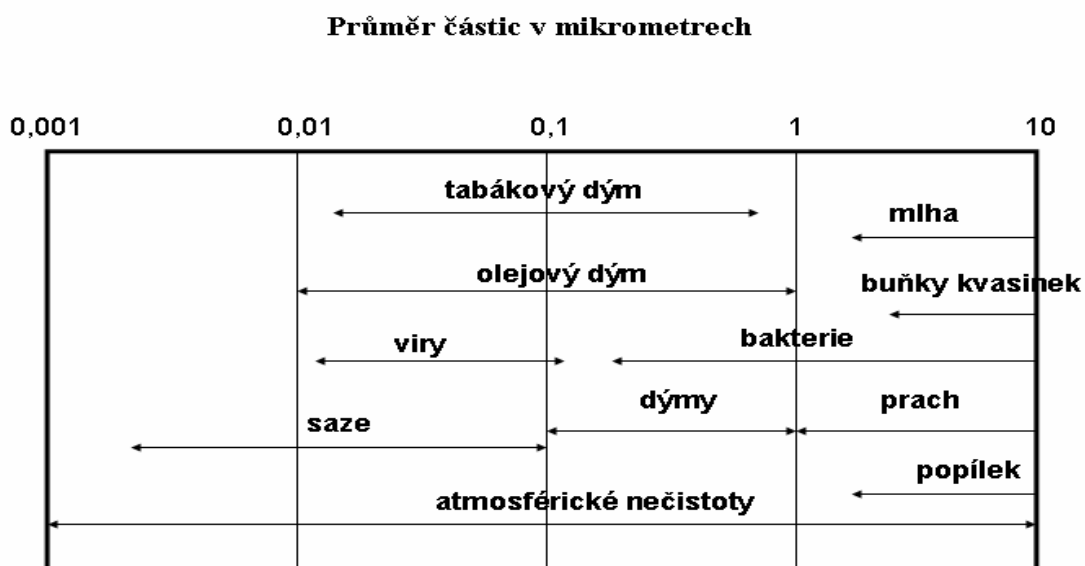
Obr. 12. Půdorys kolektoru s bodem stagnace toku se šikmou tryskou [5].

Pro podrobný matematický popis jednotlivých zařízení je potřeba vymezit několik zásadních omezení. Především, tok suspenze skrz reaktor musí být ustálený a laminární. Při turbulentním proudění je velmi složité daný systém matematicky popsat. Přestože smykové napětí turbulentního toku je vysoké a částice by teoreticky adherovat neměly, byly v praxi pozorovány případy kdy k adhezi v omezené míře dojde. Dalším limitujícím faktorem je velikost deponovaných koloidních částic. Vhodné koloidní částice budou popsány v další kapitole.

Je třeba mít na paměti, že v drtivé většině průmyslových operací, tak jako v procesech v živém organismu dochází k toku v trubce nebo skrz ventily, médium je třepáno či mícháno. V tomto tkví hlavní důležitost použití tokových zařízení, protože se přibližují reálné podstatě procesů v živém organismu.

2.2.1 Koloidní částice vhodné pro depozici v toku.

Koloidní částice vhodné pro depozici v tokových systémech musí vyhovovat především geometrickými rozměry. Vhodné koloidní částice nabývají rozměrů od 5 nm do 5 μm . Částice menší než 5 nm jsou považovány za molekulární úroveň a částice větší 5 μm jsou již příliš velké, aby na ně účinně působil Brownův pohyb, respektive jeho translační nebo-li posuvná složka. Reprezentace nejznámějších koloidních částic je přehledně zobrazena na následujícím obrázku (Obr. 13.). Na druhé straně jsme limitováni rozlišující schopností použitého optického mikroskopu.



Obr. 13. Reprezentace nejznámějších koloidních částic [5].

2.3 Buněčná desorpce

Byly provedeny pokusy, které studovaly také buněčnou desorpci. Nejjednodušší postup spočívá v metodě, kdy povrch o známém naadsorbovaném množství ponoříme do roztoku, který neobsahuje buňky. Po určitém časovém intervalu dojde k vysušení vzorku a následnému vyhodnocení množství buněk, které se pak porovnává s výchozím stavem [1]. Jiná možnost spočívá v studiu roztoku, do něž se buňky desorbují z povrchu. Tento roztok na začátku experimentu neobsahuje žádné buňky. S přibývajícím časem je však možno pozorovat množství buněk v roztoku pomocí měření spekter ve viditelné oblasti. Tato metoda ovšem nedovede spektrálně oddělit živé buňky od odumřelých. Další možností je studium koncentrace biotechnologického materiálu produkovaného buňkou. Princip je založen na faktu rozdílných aktivit buněk při produkci biomateriálu. Ty uchycené produkují s jinou kinetikou nebo produkují jiný produkt. Desorpci je možno sledovat i v tokových systémech při měření v reálném čase. Popřípadě provést experiment s průchodem vzduchové bubliny jak bylo popsáno dříve a znázorněno na Obr. 4.

3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KINETIKU A MECHANIZMUS BUNĚČNÉ ADHEZE

3.1 Vliv iontové síly

Je známo, že určité druhy buněk jsou schopny adherovat při nižší a jiné při vyšší iontové síle. Při teoretickém studiu je třeba provést experimenty pro širokou škálu iontových sil a vyhodnotit, která je pro daný typ buněk optimální pro daný substrát. Dále je v praxi třeba studovat systémy při iontové síle ekvivalentu v jejich přirozeném fyziologickém prostředí. Jako nejčastěji uvažovaná iontová síla je iontová síla odpovídající fyziologickému roztoku, tedy 0,9 % roztoku NaCl. Bylo již experimentálně zjištěno, že pomocí změny iontové síly prostředí lze ovlivnit adhezi již uchycených buněk. Může snadno dojít k desorpci buněk, je-li buňka adherována při nízké iontové síle a poté vystavena účinkům vyšší iontové síly okolí. Tímto postupem je možné vyplavit již nepotřebné a odumřelé buňky s buňkami živými a nahradit tento systém systémem s novými, živými buňkami a tím zvýšit výtěžnost biochemických reakcí v reaktorech. Podobně to platí i naopak, kdy určité typy buněk adherují při relativně vysokých iontových silách a při vystavení účinku okolního roztoku o menší iontové síle desorbují. Je však nutno přijmout fakt, že žádné ani ty nejodolnější buňky nesnesou široký rozsah iontových sil. Je to dáno v důsledku účinků osmotického tlaku vytvářeného uvnitř buňky. Snadno může dojít k poškození buněčného obalu a tím k denaturaci celého systému, který již není schopen reprodukce či biologické funkce.

3.2 Vliv pH

Acidita/alkalinita prostředí je dalším důležitým faktorem. Je známo, že rozdílné buňky snášejí různé pH různě. Nejčastěji jsou schopny odolávat i silně kyselému prostředí a ztrácí svoji funkci i v mírně zásaditém prostředí. Je třeba brát zřetel na fakt, že buňky jsou schopné produkovat reakční produkty za přísně vymezeného pH. To znamená, že při různých pH můžou v určitých případech produkovat jiné biochemické produkty. Tento interval pH je zpravidla velmi úzký. Z toho je zřejmé, že pH musí být nastaveno tak, abychom posunuli biochemickou reakci směrem k požadovaným produktům. Obdobně

jako u iontové síly i relativně malá změna pH může vyvolat denaturaci systému, tedy poškození biochemických nebo životních funkcí organismu.

3.3 Vliv elektrokinetického potenciálu zeta a potenciálu proudění

Interakce buněk a substrátu je významně závislá na povrchovém náboji v daných podmínkách (iontová síla, pH, a jiné). Elektrokinetický potenciál zeta určuje nabití povrchu koloidů, zatímco potenciál proudění nebo-li „streaming potential“ určuje míru nabití povrchů. Obecně lze říci, že buňky jsou záporně nabitě ve velkém rozsahu pH (prakticky 3 a více). Existují však i takové, které jsou nabitě kladně až do pH 8. Lze tedy obecně říci, že optimální povrchy pro buněčnou adhezi budou kladně nabitě. Jak je známo, polymerní materiály jsou téměř výhradně nabitě záporně. Existují však i výjimky. Často je ovšem potřeba povrch syntetického polymerního substrátu modifikovat pomocí nejrozumnějších postupů.

Jak již bylo zmíněno, buňky jsou převážně nabitě na povrchu záporně. Pro kvasinky toto tvrzení platí téměř bez výjimky. Je známo, že na adhezi se především podílí polární skupiny na testovaných površích které interagují s polárními skupinami na povrchu buněk. Z již zmíněných skupin se v přirozených systémech na površích buněk nachází především karboxyl ($-\text{COOH}$), amin ($-\text{NH}_2$), hydrogenfosforečnan ($-\text{HPO}_4$) a dihydrogenfosforečnan ($-\text{H}_2\text{PO}_4$). Povrch buňky s N_1 kyselými ($-\text{COOH}$) a N_2 zásaditými ($-\text{NH}_2$) nenabitými skupinami na jednotku objemu s disociačními konstantami K_{a1} a K_{a2} má prostorovou hustotu náboje vztaženou na povrch buněk ρ_{fix} , která může být vyjádřena rovnicí (1),

$$\rho_{fix} = eN_1 \frac{-K_{a1}}{K_{a1} + [H^+] \exp(-e\psi/kT)} + eN_2 \frac{[H^+] \exp(-e\psi/kT)}{K_{a2} + [H^+] \exp(-e\psi/kT)} \quad (1)$$

kde e je elementární náboj, k je Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota, $[H^+]$ je protonová koncentrace a ψ je elektrický potenciál v místě ionizovatelné skupiny [10]. Jak je z rovnice (1) zřejmé, stupeň ionizace molekulárních částí povrchu závisí na

elektrickém potenciálu ψ . Profil elektrického potenciálu na povrchu buňky je dán Poissonovou rovnicí, která je pro planární systémy

$$\frac{d^2\psi(x)}{dx^2} = -\frac{\rho(x)}{\varepsilon}$$

(2)

kde ρ je hustota plošného náboje a ε je dielektrická permitivita prostředí roztoku.

3.4 Interakční energie

Další veličina, na níž závisí buněčná adheze je interakční energie mezi buňkou a povrchem substrátu, $V_{i(h)}$, kterou lze spočítat pomocí rovnice (3)

$$V_{i(h)} = \varepsilon_0 \varepsilon_r a_b \left[(\psi_1 + \psi_2)^2 \log(1 + e^{-kh}) + (\psi_1 - \psi_2)^2 \log(1 - e^{-kh}) \right] -$$

$$- \frac{A}{6} \left[\frac{a_b}{h} + \frac{a_b}{h + 2a_b} + \log\left(\frac{h}{h + 2a_b}\right) \right]$$

(3)

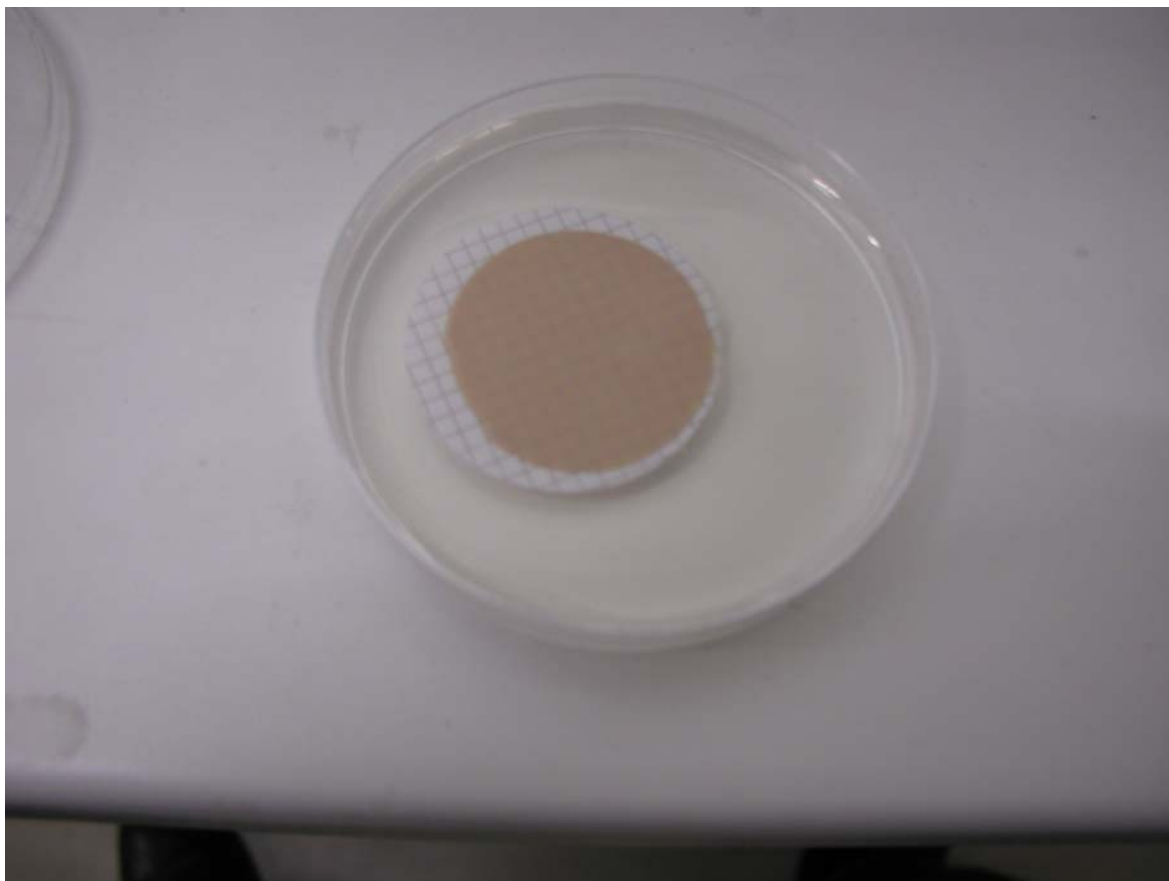
kde ε_0 je permitivita vakua, ε_r je relativní permitivita prostředí, a_b je poloměr buňky, ψ_1 a ψ_2 jsou povrchové potenciály buňky a povrchu a A je Hamakerova konstanta. První člen na pravé straně rovnice reprezentuje interakci elektrické dvojvrstvy přičemž se předpokládá, že oba povrchové potenciály jsou konstantní během jejich přibližování. Druhý člen reprezentuje neretardované van der Waalsovy síly [11].

3.5 Vliv sil Bornova typu

Je obecně usuzováno, že řetězce molekul na povrchu mohou penetrovat do struktury povrchu. Přesto však, pokud se vzdálenost přiblíží molekulárním dimenzím, určitý druh odpudivých sil brání penetraci řetězců do povrchové struktury. Tyto odpudivé síly jsou známy jako síly Bornova typu [4]. Tento typ interakce závisí výhradně na dané buňce a daném povrchu a zatím neznáme jakýkoliv obecný vztah. Hlavní faktor ovlivňující tento proces penetrace je většinou změna Gibbsovy volné energie systému (ΔG).

3.6 Vliv smáčivosti

Jak je známo, interakce hydrofilního individua s podobným probíhá snadno. Totéž lze říci o dvou látkách hydrofobních. Je zřejmé, že buňky, které jsou vesměs silně hydrofilní budou adherovat na hydrofilní povrch. V praxi má drtivá většina buněk kontaktní úhel pro vodu menší než 26 stupňů. Ty zbylé, asi 3% jsou považovány za hydrofobní. Postup pro měření smáčivosti a povrchové energie pro pevné látky je precizně popsán a zaveden jak pro statický, tak i dynamický mód. Jinak je tomu ovšem v případě měření smáčivosti u buněk. V praxi zatím jedinou osvědčenou metodou je měření statického kontaktního úhlu smáčení pomocí sedící kapky na vícevrstvých buněčných filmech. Tyto se připravují následovně. Do Petriho misky se odlije vrstva agaru, aby mohly být buňky vyživovány až do okamžiku měření. Připraví se buněčná suspenze, která se přefiltruje přes mikroporézní filtr umístěný na fritě, která je připojena na vakuum. Takto připravený film je třeba opatrně promývat a poté umístit i s mikroporézním filtrem do Petriho misky. Po vyrovnání přirozené fyziologického množství vody (to je asi po 3 hodinách) se tyto filmy měří, přičemž se s nimi manipuluje i s filtračním mikroporézním papírem. Takto měřený vzorek je již chemicky i biologicky kontaminován a nelze ho použít pro další experimenty. Vyhodnocení povrchové energie probíhá jako u běžných povrchů. Ukázka připraveného filmu buněk pro měření statického kontaktního úhlu smáčení v Petriho misce je vyfotografován na následujícím obrázku (Obr. 14.).



Obr. 14. Ukázka připraveného filmu buněk pro měření statického kontaktního úhlu smáčení.

3.7 Vliv drsnosti povrchu

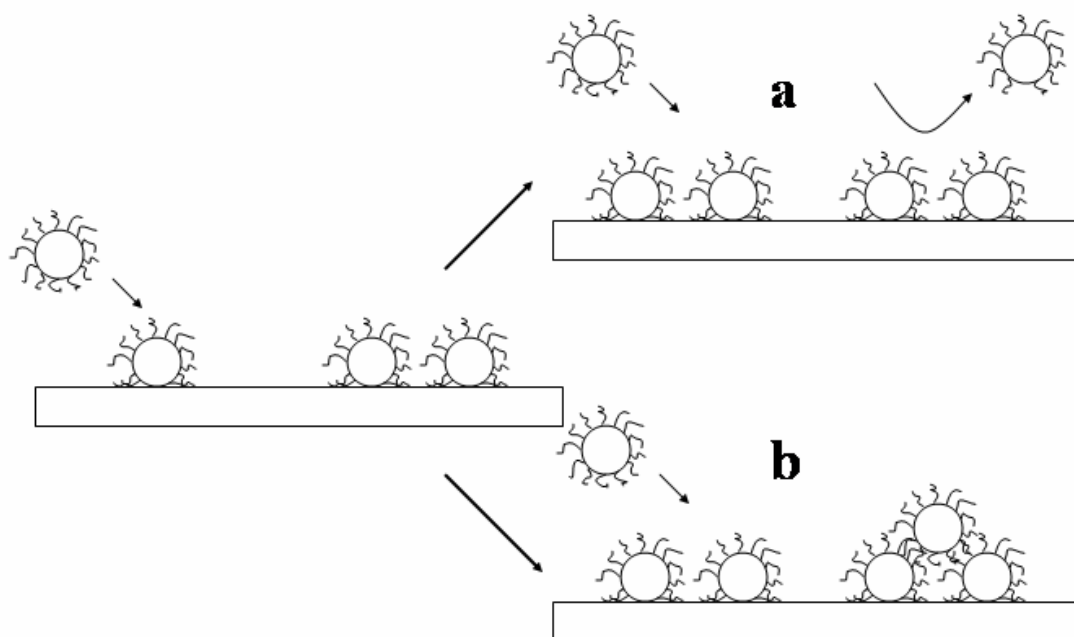
Drsnost povrchu má pro buněčnou adhezi zásadní vliv. U některých polymerních substrátů může dojít k situaci, že po zdrsňení povrchu je pozorován nárůst buněčné adheze. V jiných případech je tomu naopak. Je to způsobeno, tak jako v jiných případech, selektivitou daného mikroorganismu k substrátu a jeho povrchové morfologii. Změna profilu povrchu je však často doprovázena změnou v chemickém složení. Je tedy třeba na tento souhrn vlivů pohlížet komplexněji a vždy je třeba určit vliv dané buňky na daný substrát. Obecný model k popisu tohoto problému stále nebyl nalezen.

3.8 Vliv povrchových nehomogenit

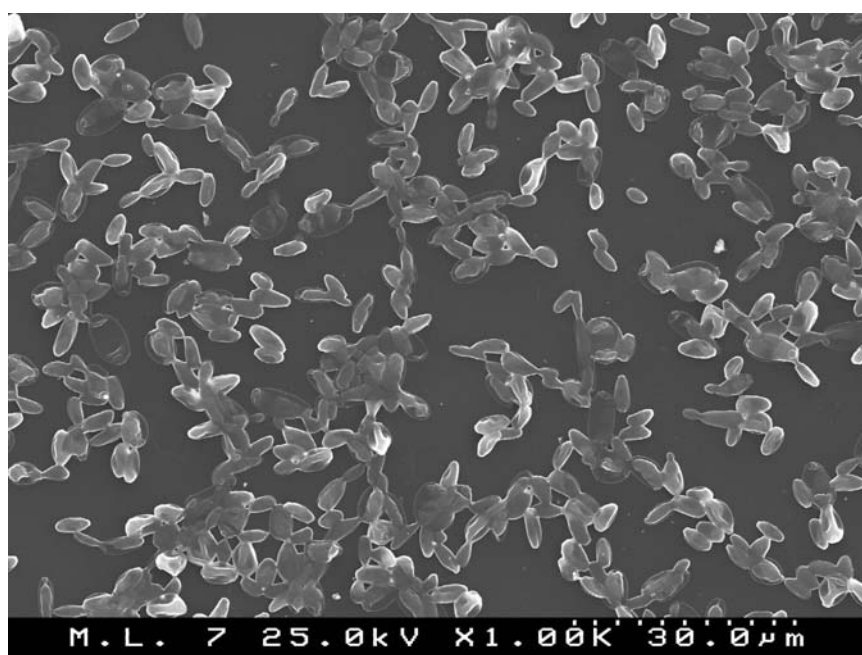
Povrchové nehomogenity a jiné vlivy (např. různá plošná hustota náboje) ovlivňují lokální adhezi. V důsledku toho lze v praxi na testovaných površích nalézt místa, kde k buněčné adhezi dochází v omezené míře a také místa, kde četnost buněk na jednotku plochy dosahuje vyšších hodnot od celkové průměrné hodnoty četnosti.

3.9 Vliv struktury tvořeného biofilmu

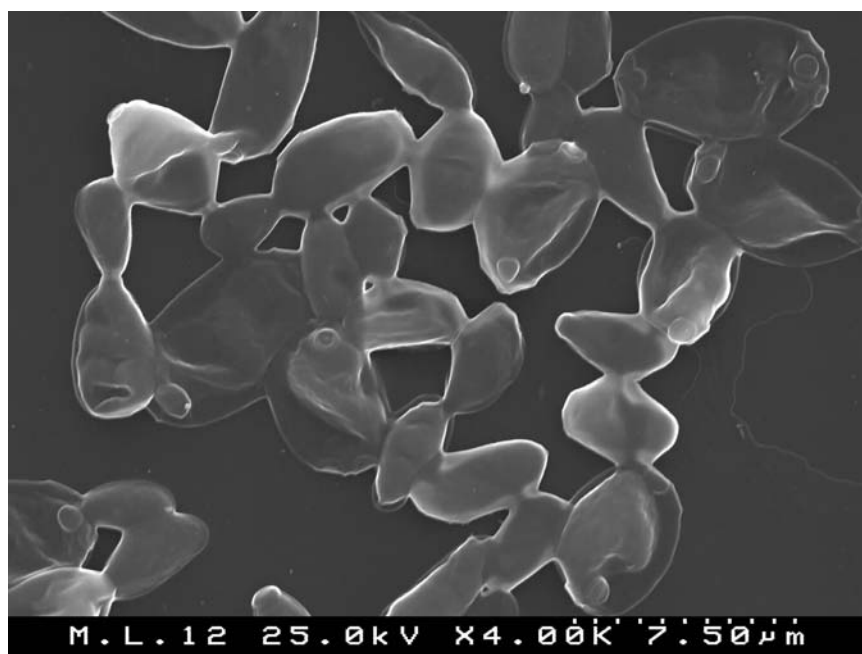
Vliv struktury tvořeného biofilmu závisí především na iontové síle roztoku buněčné suspenze, přesto však hraje velmi důležitou roli a v důsledku toho bývá často posuzován zvlášť. Ve zkratce tento jev lze popsat asi takto: V první řadě depozice závisí na depozičních podmínkách pro uchycení osamostatněných buněk. Je-li jedna buňka uchycena a přiblíží se jí druhá, může dojít k její depozici, pokud tomu nebrání jiné okolnosti. K velkým rozdílům však dochází v případě, je-li k těmto buňkám přiblížena třetí. Následují prakticky dvě rozdílné možnosti. Buď se buňka uchytí na buňkách již deponovaných a dojde k tvorbě vícevrstvé 3D buněčné struktury (Obr. 15. b) nebo k jejímu uchycení vůbec nedojde (Obr. 15. a) a buňka se nachází opět v suspenzi. V praxi jsou využívány oba typy biofilmů v závislosti na použití. Vícevrstvé systémy mají i pro povrch funkci ochrannou, naopak monovrstvy slouží k zabránění buněčných shluků a zachování daných rozměrů jako například buňky endothelia v cévách, které zabraňují srážení krevního barviva a tím ucpávání cév, které vede k ischemii a následné nekróze. Další SEM obrázky výsledných buněčných struktur znázorňující jak případ tvorby monovrstvy, která nedovolí další adsorpci (Obr. 16. a 17.) a případ vícevrstvých 3D struktur (Obr. 18. a 19.) jsou uvedeny níže.



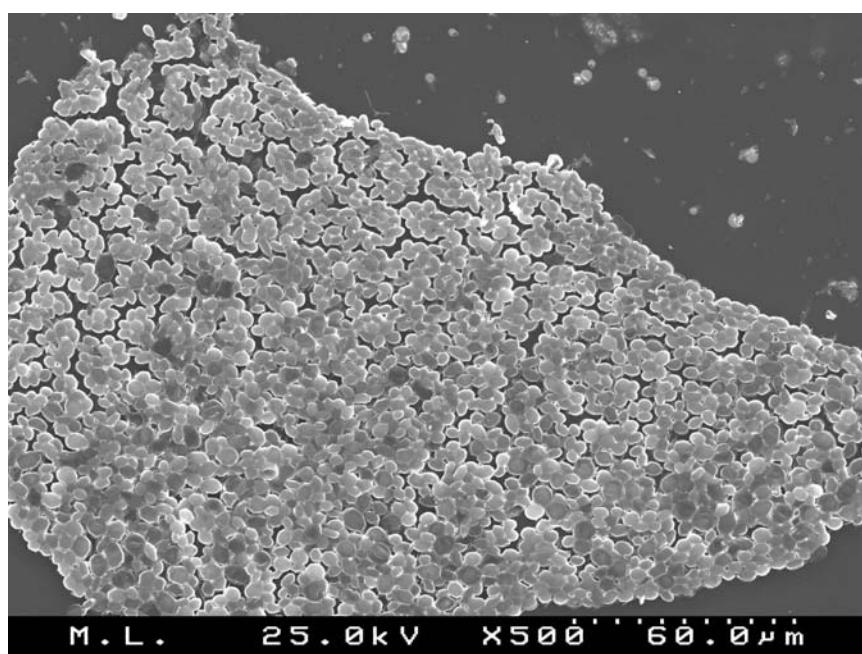
Obr. 15. Možné případy interakcí při tvorbě buněčných struktur.



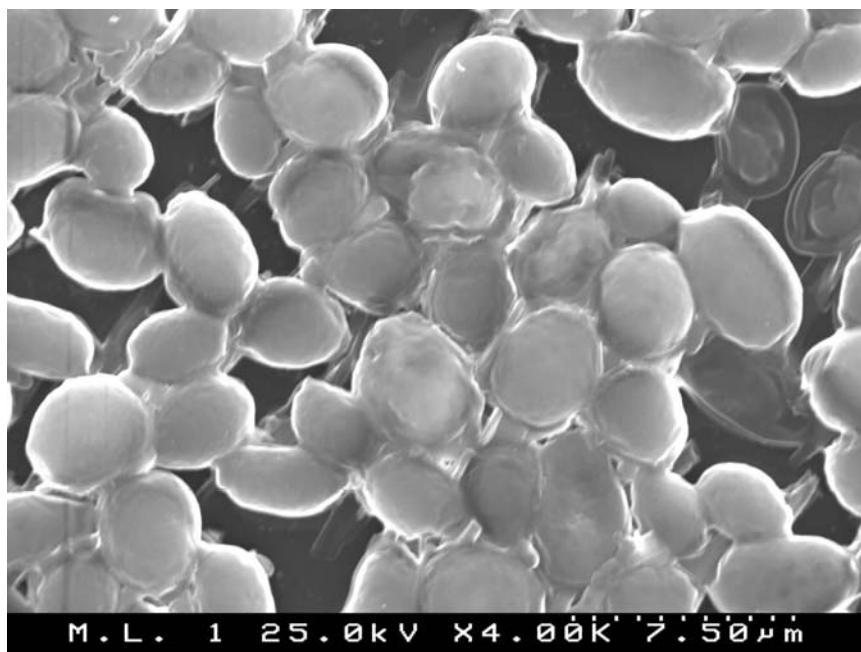
Obr. 16. Příklad tvorby monovrstvy, která nedovolí další adsorpci (zvětšení 500 krát).



Obr. 17. Příklad tvorby monovrstvy, která nedovolí další adsorpci (zvětšení 4000 krát).



Obr. 18. Vytvořené vícevrstvé buněčné 3D struktury (zvětšení 1000 krát).



Obr. 19. Vytvořené vícevrstvé buněčné 3D struktury (zvětšení 4000 krát).

3.10 Závěrečné shrnutí k této kapitole

V této kapitole byly podrobně popsány nejdůležitější vlivy, které ovlivňují buněčnou adhezi. Jak je zřejmé, buněčná adheze je velmi komplikovaný jev a jeho popis není vždy jednoznačný. Je třeba mít na paměti, že výjimek je více než pravidel a stále ještě nebyl vyvinut model popisující tento jev obecně. Zůstává tedy faktem, že buněčná adheze, jako složitě popsitelný děj, musí být chápána individuálně jako interakce vždy konkrétně daného buněčného systému na daný povrch.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce shrnuje současné metody studia mechanismu adheze buněk na povrch pevných látek. Detailně popisuje možnosti studia kinetiky adheze jak statickými, tak i tokovými metodami. Stručně je zmíněno i studium desorpce mikroorganismů z povrchu pevných látek.

V další části práce popisuje nejružnější vlivy a jevy, které se na kinetice a mechanismu adheze buněk podílí. Podrobně jsou rozpracovány ty nejznámější z nich, jako například vliv iontové síly, pH, elektrokinetického potenciálu zeta a potenciálu proudění, interakční energie, sil Bornova typu, smáčivosti a struktury tvořeného biofilmu.

Jak již bylo zmíněno dříve, buněčná adheze je velmi komplikovaný jev a jeho popis není vždy jednoznačný. Je třeba mít na paměti, že výjimek je více než pravidel a stále ještě nebyl vyvinut model popisující tento jev obecně. Zůstává tedy faktem, že buněčná adheze, jako složitě popsitelný děj, musí být chápána individuálně jako interakce vždy konkrétně daného buněčného systému na daný povrch.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DEMAİN AL, DAVIES JE: *Industrial Microbiology and Biotechnology*, second edition, ASM press, Washington D.C. 1999.
- [2] online: <http://www.ifm.liu.se/applphys/sensor/self.html> (4.6.2006).
- [3] GÓMES-SUÁREZ C, BUSSCHER HJ, van der MEI HC, *Applied and Environmental Microbiology* **67** (6) (2001), pp. 2531-2537.
- [4] van de VEN TGM, *Colloidal Hydrodynamics*, Academic press, London, San Diego, 1989.
- [5] LEHOCKÝ M, *Deposition/Detachment Phenomenon of Micro Particles at Solid Polymer/Liquid Interface*, dizertační práce, UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, 2004.
- [6] LAPČÍK L Jr., LEHOCKÝ M, URBAN P, *Fine Mechanics and Optics* **47** (4) (2002) pp. 119-121.
- [7] BROWN DM, FISCHER TL, WEI C, FRELINGER JG, LORD EM, *Immunology* **102** (4) (2001), pp.486-497.
- [8] ADAMCZYK Z, MUSIAŁ E, SIWEK B, *Journal of Colloid and Interface Science* **269** (2004) pp. 53-61.
- [9] ADAMCZYK Z, SZYK-WARSZYŃSKA L, ZEMBALA M, LEHOCKÝ M, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **235** (2004) pp. 65-72.
- [10] POORTINGA AT, BOS R, NORDE W, BUSSCHER HJ, *Surface Science Reports* **47** (1) (2002) pp. 1-32.
- [11] HAYASHI H, TSUNEDA S, HIRATA A, SASAKI H, *Colloids and Surfaces B: Bio-interfaces* **22** (2) (2001) pp. 149-157.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$[H^+]$	protonová koncentrace
3D struktura	tří rozměrná struktura
A	Hamakerova konstanta
a_b	poloměr buňky
-COOH	karboxyl
e	elementární náboj
h	empirická konstanta
-H ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan
-HPO ₄	hydrogenfosforečnan
k	Boltzmanova konstanta
k	empirická konstanta
K_{a1}	disociační konstanta kyselých nenabitých skupin
K_{a2}	disociační konstanta zásaditých nenabitých skupin
N_1	počet kyselých nenabitých skupin
N_2	počet zásaditých nenabitých skupin
NaCl	chlorid sodný
-NH ₂	amin
pH	acidita/alkalinita
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
T	termodynamická teplota
$V_{t(h)}$	interakční energie mezi buňkou a povrchem substrátu
ΔG	změna Gibbsovy volné energie systému
ε	dielektrická permitivita prostředí roztoku
ε_0	permitivita vakua
ε_r	relativní permitivita prostředí
ρ	hustota plošného náboje
ρ_{fix}	prostorová hustota náboje vztaženoá na povrch buněk
ψ	elektrický potenciál v místě ionizovatelné skupiny
ψ_1	povrchový potenciál buňky
ψ_2	povrchový potenciál povrchu

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1. Růstová křivka v lineárních souřadnicích. (10)
- Obr. 2. Růstová křivka v logaritmických souřadnicích. (10)
- Obr. 3. Ukázka „SAMS“ tvořených dvěma různými alkanothioly [2]. (11)
- Obr. 4. Ukázka efektu přechodu vzduchové bubliny v tokovém reaktoru (a) před a (b) po přechodu bubliny, (měřítko, 20 μ m) [3]. (12)
- Obr. 5. Schématické znázornění kolektorů, pro něž známe matematický popis [4]. (14)
- Obr. 6. Kolektor s bodem stagnace toku [5]. (15)
- Obr. 7. Půdorys kolektoru s bodem stagnace v toku [5]. (16)
- Obr. 8. Zapojení celé aparatury s celou s bodem stagnace v toku [6]. (16)
- Obr. 9. Různé druhy uspořádání komory tvořené paralelními deskami [7]. (17)
- Obr. 10. Schématické znázornění reaktoru s bodem stagnace toku se šikmou tryskou [9]. (18)
- Obr. 11. Kolektor s bodem stagnace toku se šikmou tryskou [5]. (19)
- Obr. 12. Půdorys kolektoru s bodem stagnace toku se šikmou tryskou [5]. (19)
- Obr. 13. Reprezentace nejznámějších koloidních částic [5]. (20)
- Obr. 14. Ukázka připraveného filmu buněk pro měření statického kontaktního úhlu smáčení. (26)
- Obr. 15. Možné případy interakcí při tvorbě buněčných struktur. (28)
- Obr. 16. Příklad tvorby monovrstvy, která nedovolí další adsorpci (zvětšení 500 krát). (28)
- Obr. 17. Příklad tvorby monovrstvy, která nedovolí další adsorpci (zvětšení 4000 krát). (29)
- Obr. 18. Vytvořené vícevrstvé buněčné 3D struktury (zvětšení 1000 krát). (29)
- Obr. 19. Vytvořené vícevrstvé buněčné 3D struktury (zvětšení 4000 krát). (30)