

Povrchové úpravy polymerů pro zvýšení buněčné proliferace

David Podlipný

Bakalářská práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **David Podlipný**
Osobní číslo: **T11462**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Povrchové úpravy polymerů pro zvýšení buněčné proliferace.**

Zásady pro vypracování:

Student se seznámí s dosud publikovanými informacemi o významu modifikace polymerních povrchů pomocí plasmu a praktického využití v rámci ovlivnění vazby lidských buněk. V teoretické části pak tyto informace přehledně zpracuje. Prakticky se seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a osvojí si základní techniky práce v laboratoři. V praktické části provede a vyhodnotí testy vazby a migrace buněk na modifikovaných polymerních površích.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Polymers for regenerative medicine. Publisher: Berlin ; New York : Springer, (2006) ISBN 3540333533.

Biomedical technology and devices handbook. Publisher: Boca Raton : CRC Press, (2004) ISBN 0-8493-1140-3

Cell Biology: A Laboratory Handbook, Four Volume Set. Publisher: Academic Press, 3 edition (July 18, 2005). ISBN-10: 0121647307.

Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique. Publisher: Wiley-Liss; 5 edition (July 29, 2005) ISBN-10: 0471453293.

Culture of Cells for Tissue Engineering. Publisher: Wiley-Liss; 1 edition (February 3, 2006) ISBN-10: 0471629359.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

10. ledna 2014

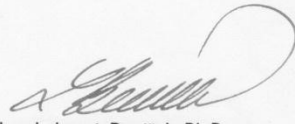
Termín odevzdání bakalářské práce:

28. května 2014

Ve Zlíně dne 7. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Hlavním cílem této práce je studium povrchových úprav polyanilinu pro zvýšení buněčné proliferace s tím, že se celková problematika pohybuje v oblasti plasmové úpravy povrchů a jejich následné modifikace. Teoretická část se zabývá především interakcemi mezi buňkou a povrchem materiálu. Jejím cílem je popsat základní operace a principy související s touto problematikou. V praktické části je testován vliv aplikace bovinního sérového albuminu na plasmou aktivované povrchy na eukaryotické buňky. Po působení plasmatu (v atmosféře vzduchu nebo vzácného plynu – argonu) na testované polyanilinové povrchy byl aplikován sérový albumin. Posléze byla studována schopnost buněk se na povrchy přichytit a následně růst. Zároveň byla také stanovena schopnost migrace buněk na studovaných površích. Výsledky poukazují na potencionální využití plasmových úprav a využití sérového albuminu k povrchovým modifikacím polyanilinu.

Klíčová slova:

Bioaktivní povrchy, buněčné modely, bovinní sérový albumin, plasma, polyanilin.

ABSTRACT

The main aim of this study was to detect the impact of plasma surface modification in combination with application of serum albumin on ability of cells to attach and proliferate on polyaniline films. Theoretical part is focused on interaction of cells with materials surfaces. The influence of plasma treatment in combination with bovine serum albumin on polyaniline films biocompatibility was studied in practical part. Concretely, the cell attachment, proliferation and scratch assay was used. The results outlined the possible application of plasma treatment and serum albumin on modification of polyaniline films.

Keywords:

Bioactive surfaces, cell models, bovine serum albumin, plasma, polyaniline.

Na tomto místě bych velice rád poděkoval panu doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, PhD., za jeho vstřícnou ochotu ve vedení této bakalářské práce, jeho cenné rady, toleranci a samozřejmě i za poskytnutí tohoto tématu a problematiky. Také bych velice rád poděkoval Ing. Zdence Kucekové za její přátelskou, milou a ochotnou výpomoc v laboratoři buněčných kultur jako takové, i za pomoc při vyhodnocování výsledků.

Motto:

„Signum eruditionis eminentis potestas est de rebus maximis modo simplicissimo loqui.“

(David Hume 1711 – 1776)

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

Obsah

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 VZÁCNÉ PLYNY	13
1.1 ÚVOD A CHARAKTERISTIKA VZÁCNÝCH PLYNŮ VČETNĚ JEJICH VÝSKYTU	13
1.2 VLASTNOSTI A REAKCE VZÁCNÝCH PLYNŮ	14
1.3 VÝROBA A VYUŽITÍ	15
1.4 VYUŽITÍ VZÁCNÝCH PLYNŮ V RÁMCI POVRCHOVÝCH ÚPRAV S PLASMOU	15
2 POLYMERY	17
2.1 ELEKTRICKY VODIVÉ A NEVODIVÉ POLYMERY	19
2.2 VYUŽITÍ POLYMERŮ	21
2.2.1 VYUŽITÍ POLYMERŮ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ	21
2.3 POVRCHOVÉ VLASTNOSTI	23
2.3.1 METODY STANOVENÍ POVRCHOVÝCH VLASTNOSTÍ	23
3 POLYANILIN	28
3.1 FORMY POLYANILINU	28
3.2 PŘÍPRAVA POLYANILINU	30
3.3 BIODOKOMPATIBILITA POLYANILINU	31
3.4 APLIKACE POLYANILINU	31
4 BUNĚČNÉ MODELY	33
4.1 DEFINICE A CHARAKTERISTIKA BUŇKY OBECNĚ	33
4.2 BUŇKA JAKO SYSTÉM	33
5 BUNĚČNÉ INTERAKCE	34
5.1 INTERAKCE MEZI BUŇKOU A POVRCHEM	34
5.2 POVRCHOVÝ DESIGN	34
5.2.1 ADHEZE BUŇKA – EXTRACELULÁRNÍ MATRIX	35
5.2.2 BUŇKY A JEJICH FILOPODIA	35
5.2.3 VAZBA NA POVRŠÍCH IMPLANTÁTU	36
5.2.4 INTEGRINY COBY NEJVÝZNAMNĚJŠÍ RECEPTORY	36
5.3 POVRCHY ODOLÁVAJÍCÍ ADSORPCI PROTEINŮ A BUNĚK	38
5.3.1 PŘÍKLADY POVRCHOVÝCH POVLAKŮ ODOLÁVAJÍCÍCH PROTEINŮM	38
5.4 PŘÍMÁ BUNĚČNÁ ADHEZE K DANÝM POVRCHŮM	41
5.4.1 PROTEIN DEKORATIVNÍ POVRCHY PRO PROSTOROVĚ ŘÍZENOU BUNĚČNOU ADHEZI	41
5.4.2 PŘÍMÉ A NEPŘÍMÉ VZOROVÁNÍ	44
5.4.3 PEPTID DEKORATIVNÍ POVRCHY PRO PROSTOROVĚ ŘÍZENOU BUNĚČNOU ADHEZI	45
5.5 STRUČNÝ SOUHRN K DANÝM INTERAKCÍM	46
6 PLASMOVÁ ÚPRAVA	48
6.1 PLASMOVÉ STRATEGIE – TERMÁLNÍ A NETERMÁLNÍ	48

6.2	PLASMOVÁ POLYMERACE – ÚVOD	49
6.2.1	PLASMOVÁ POLYMERACE – PRINCIP	49
6.3	VÝHODY PLASMOVÉ POVRCHOVÉ MODIFIKACE	50
6.4	PLASMOVÁ POVRCHOVÁ ÚPRAVA ZVYŠUJÍCÍ BUNĚČNOU ADHEZI A PROLIFERACI	51
6.4.1	PLASMOVÉ POVRCHOVÉ ÚPRAVY ANTIBAKTERIÁLNÍCH A PROTIHNILOBNÝCH POVRCHŮ	51
II	PRAKTICKÁ ČÁST	54
7	MATERIÁL A METODIKA	55
7.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	55
7.2	POUŽITÁ BUNĚČNÁ LINIE	55
7.3	PLASMOVÁ ÚPRAVA	56
7.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ	57
7.5	STANOVENÍ VIABILITY BUNĚK	58
7.6	SCRATCH ASSAY	59
8	VÝSLEDKY	60
8.1	STANOVENÍ BUNĚČNÉ VIABILITY	60
8.2	SCRATCH ASSAY	64
8.3	MIKROFOTOGRAFIE BUNĚČNÉ LINIE MYŠÍCH BUNĚK NIH/3T3	66
8.4	MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU	68
9	DISKUZE	69
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	79
	SEZNAM OBRÁZKŮ	80
	SEZNAM TABULEK	81
	SEZNAM GRAFŮ	82

ÚVOD

Hlavní problematikou práce bylo stanovení adheze, a následné proliferace myších fibroblastů (NIH/3T3) na povrchu polyanilinové soli, umístěné v jamkách kulturačních mikrotitračních destiček. Studovány byly jednak nativní polyanilinové filmy, jednak filmy upravené pomocí aplikace bovinního sérového albuminu (BSA), společně s aktivací povrchu pomocí plasmu.

Je již známo mnoho experimentů využívajících sérový albumin, ať se jedná o experimenty albuminů s krevními destičkami (*Sivaraman a Latour, 2010*), ať už se jedná o „zelené palivo budoucnosti“, spojeného v rámci porfyrino – albuminového komplexu (*Tsuchida, Komatsu a Curry, 2006*). Nicméně, v souvislosti s polyanilinovými filmy, využívajících myších fibroblastů, nebyla dosud publikována žádná práce. Právě určení vlivu aplikace bovinního sérového albuminu na polyanilinové filmy bylo jedním z cílů naší práce. Nebudeme zde v úvodu zmiňovat, jaké jsou formy polyanilinu, či jeho význam s ohledem na elektrickou vodivost. Jedná se o informace všeobecně známé, a navíc popsáné v teoretické části. Nicméně – je důležité říci, že se jedná o materiál, jenž nachází čím dál větší uplatnění v oblasti medicíny, ale také v oblasti elektrotechniky či elektroeologie.

Již bylo uvedeno, co je hlavním cílem této práce. Ovšem, jak se dané výsledky získaly, si uvedeme stručně v tomto krátkém odstavci. Především byla využita metoda zvaná MTT test. Jedná se o metodu využívající absorbanci látky mající název (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromid), pomocí níž se určí, jaká je viabilita, neboli životaschopnost buněk. Výsledky byly zhodnoceny pomocí T – testu, detekujícího průkaznost rozdílů mezi průměrnými hodnotami absorbancí vzorků a danou referencí. Referencí v tomto případě byla využita prázdná (bez přítomnosti polyanilinové soli) polystyrenová mikrotitrační destička. Získané výsledky jsou prezentovány i pomocí mikrofotografií.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VZÁCNÉ PLYNY

Na začátek této bakalářské práce je důležité podotknout, že problematika působení vzácných plynů na polyanilinové filmy upravené v plasmovém reaktoru je doposud ne příliš prozkoumaným a probádaným jevem. Proto se nebudeme zabývat tématem jako takovým, ale zaměříme se na jednotlivá klíčová slova – vzácné plyny, polyanilin a plasmové úpravy. Jedná se tedy o záležitost ne natolik prostudovanou, ale právě tato problematika byla cílem naší praktické bakalářské práce, jejíž výsledky budou diskutovány později.

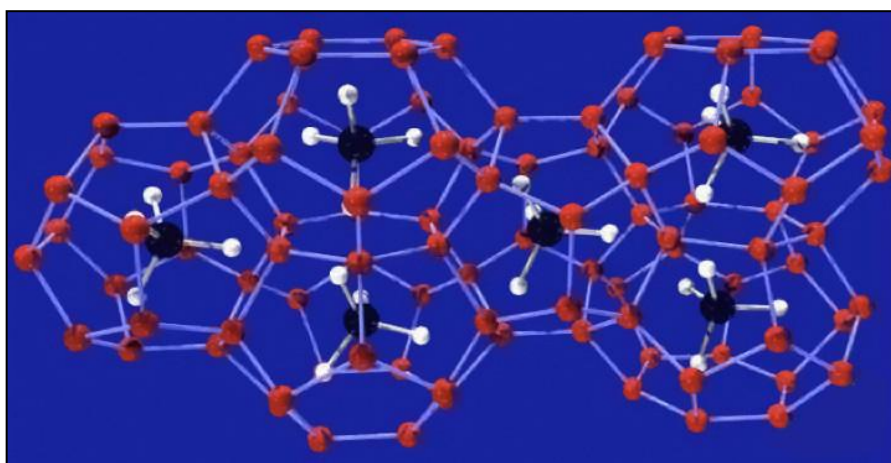
1.1 Úvod a charakteristika vzácných plynů včetně jejich výskytu

Vzácné plyny jsou prvky VIII. A skupiny periodické soustavy prvků, nazývané též prvky p^6 . Tyto plyny, nazývané dříve netečné či inertní, zahrnují prvky, jako jsou hélium, neon, argon, krypton, xenon a radioaktivní radon (*Vacík a kolektiv, 1999; Benešová a Satrapová, 2002*). Podle své polohy v periodickém systému lze zde eventuelně zařadit i synteticky připravený prvek mající protonové číslo 118, ununoctium (*Emsley a kolektiv, 2011*). Mají plně obsazené valenční orbitály (ns^2np^6), a tudíž se vyskytují v atomárním stavu stabilní, a navíc také nereaktivní. Důležité je znát, že vzácnými se nazývají z toho důvodu, poněvadž se v nepatrném množství vyskytují v atmosféře Země (*Vacík a kolektiv, 1999*). Velice často poté bývají produkty radioaktivních rozpadů nerostů, mluvíme zejména o héliu (*Benešová a Satrapová, 2002*). Ze vzácných plynů má ve vzduchu nejvyšší zastoupení argon ($w \doteq 1,28 \%$), nejméně poté xenon ($w \doteq 3,6 \cdot 10^{-5} \%$) a radon ($w \doteq 4 \cdot 10^{-17} \%$) (*Vacík a kolektiv, 1999*).

1.2 Vlastnosti a reakce vzácných plynů

Prvky VIII. A skupiny jsou nejen za běžných podmínek plynné (*Vacík a kolektiv, 1999*), ale také jsou složeny z jednotlivých atomů nevytvářejících molekuly. Také lze o těchto prvcích říci, že mají vysokou ionizační energii (*Benešová a Satrapová, 2002*).

Nesmíme zapomenout zmínit jeden důležitý fakt, a to, že až v 60. letech 20. století se podařilo připravit první sloučeniny xenonu, ale také kryptonu s prvky mající vysokou ionizační energii. Mluvíme například o fluoridu xenonovém XeF_2 , fluoridu xenoničitém XeF_4 , oxidu xenoničelém XeO_4 , anebo kyselině xenonové H_2XeO_4 (*Vacík a kolektiv, 1999*). Sloučeniny hélia, neonu a argonu nejsou doposud známy (*Benešová a Satrapová, 2002*). Vysoké úrovně v oblasti chemie vzácných plynů začínají postupně dosahovat sloučeniny hélia se rtutí, takzvané helidy (*Barthelmy, 2010*). Zvláštní skupina sloučenin vzácných plynů je představena takzvanými klatráty, což nejsou sloučeniny v pravém slova smyslu, ale jedná se pouze o sloučeniny (zpravidla krystalické adiční látky), v nichž jsou atomy vzácných plynů uzavřeny v dutině struktury krystalové mřížky jiných sloučenin. Sice nesouvisejí s touto kapitolou, ale uveďme si pro zajímavost jednu z nejznámějších – molekulu methanového klatrátu (*Pearce, 2009*) – jejíž struktura je zobrazena na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Molekula methanového klatrátu (*Pearce, 2009*)

1.3 Výroba a využití

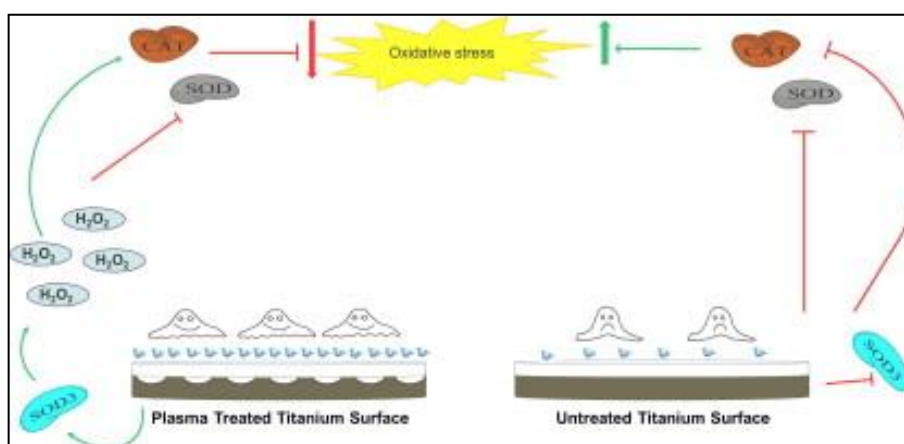
Vzácné plyny lze získat jako vedlejší produkty při frakční destilaci kapalného vzduchu (*Vacík a kolektiv, 1999*). Hélium, coby nejrozšířenější vzácný plyn ve vesmíru, se zpravidla získává na základě těžby zemního plynu (*Benešová a Satrapová, 2002*). Vzácnými plyny se plní zářivky a výbojové trubice, poněvadž mají schopnost zbarvovat produkované světlo do jednotlivých odstínů. Hélium zbarvuje červeně, neon oranžově, argon modře, krypton fialově a xenon modrofialově.

Mezi nejdůležitější prvky VIII. A skupiny patří bezpochyby hélium (*Vacík a kolektiv, 1999*). Díky tomu, že má hélium velmi malou viskozitu, nese dvě důležitá označení – supravodivý a supratekutý (*Benešová a Satrapová, 2002*). Hélium má ze všech známých plynů nejnižší teplotu tání (plní se jím balony). Kapalným stav (při velmi nízkých teplotách platí: $t_v = -269 \text{ }^\circ\text{C}$) značí vlastnosti, jako je například výborná kondukce elektrického proudu (*Vacík a kolektiv, 1999*). Společně s argonem vytváří hélium takzvané ochranné plyny zabraňující kontaktu látek se vzdušným kyslíkem, využívané v chemickém průmyslu a speciálním hutnictví při svařování některých kovů (*Benešová a Satrapová, 2002; Vacík a kolektiv, 1999*). V neposlední řadě se v silně zředěných roztocích využívá k léčebným účelům, především k léčbě rakoviny, radioaktivní radon (*Vacík a kolektiv, 1999*).

1.4 Využití vzácných plynů v rámci povrchových úprav s plasmou

Pro rozsáhlost bakalářské práce si uvedeme pouze konkrétní příklad, a to povrchovou modifikaci na základě plasmové úpravy argonem zvyšující antioxidační obranou schopnost ovariálních buněk čínské křečka (zkratkou CHO – k1) na titanovém povrchu. Je dáno, že titan patří mezi jedny z nejpoužívanějších materiálů v oblasti implantátů. Změny na jeho povrchu mohou modifikovat celulární funkční odpovědi pro lepší fixaci implantátu. Plasmová povrchová úprava argonem, která je i předmětem naší praktické části, generuje povrch se zlepšenými mechanickými vlastnostmi bez potřebné modifikace jeho chemické kompozice. Oxidační stres vyvolaný biomateriály je považován za jeden z majoritních důvodů selhání implantátů. Životaschopnost CHO – k1 buněk byla vyšší na takzvaných PTTS (plasma treated titanium surface) discích. Buňky rostoucí na titanovém povrchu byly podrobeny intracelulárnímu oxidačnímu stresu. Titanové disky podrobené plasmové úpravě indukovaly oxidační stres méně než ty, které podrobeny nebyly, což vedlo ke zvý-

šení přežití buněk (viz obrázek č. 2). A tento fakt je spojen se zlepšením buněčné celulórní odpovědi v PTTS. Zajímavost – u buněk rostoucích na zvrásněném povrchu byl pozorován pokles oxidačního poškození proteinů a molekul DNA více než u buněk rostoucích na povrchu hladkém. Studie týkající se této problematiky hrají hlavní roli v oblasti vyhodnocení biokompatibility nového materiálu. Lze tedy říci na základě tohoto experimentu, že úprava titanu pomocí argonové plazmy může zvýšit jeho biokompatibilitu, což je významný bod pro jeho využití coby implantáty či scaffold v tkáňovém inženýrství (*Freries de Queiroz a kolektiv, 2014*).



Obrázek č. 2: Ukázka upraveného a neupraveného titanového povrchu (*Freries de Queiroz a kolektiv, 2014*)

2 POLYMERY

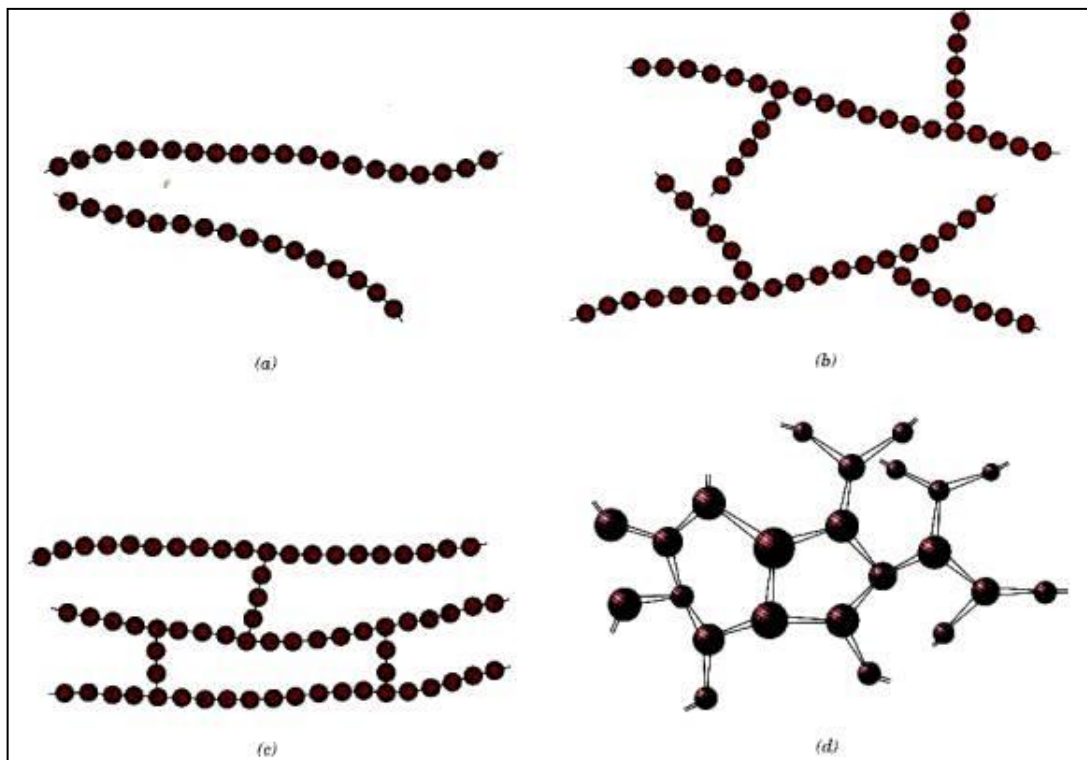
Základními stavebními jednotkami většiny látek jsou molekuly. Jedná se o stálá seskupení atomů spojených chemickými vazbami. Toto spojení je natolik pevné, že molekuly vystupují jako samostatné částice, například při různých fázových přeměnách. Z důvodu možného přerušení vazeb v molekulách na základě chemické reakce jsou molekuly považovány za nejmenší částice látky, mající schopnost reagovat v určitých reakcích. Moderní teorie chemické vazby nahlíží na molekulu jako na soubor atomových jader obklopených příslušným počtem elektronů, neboli na vícejadernou částici (*Vacík a kolektiv, 1999*). Uveďme si nyní základní rozdělení molekul. Takzvané stejnojaderné, alias mononukleární molekuly jsou takové, které obsahují pouze atomy téhož prvku, ku příkladu vodík, dusík či chlór. Naopak různojaderné, neboli heteronukleární molekuly, obsahují atomy různé, tedy voda, amoniak či kyselina chlorovodíková (*Benešová a Satrapová, 2002*).

V předchozím oddělení byl kladen důraz na to, co je základním kamenem všech látek. Pojďme se nyní zaměřit na značně široký pojem, polymer. Polymery jsou rozsáhlou skupinou látek, kterou je možno členit různými způsoby. Zde bude zmíněno pouze dvojí dělení. Abychom mohli říci, co je polymer, musíme si nejprve zodpovědět otázku týkající se dvou pojmů – makromolekula a mer. Syntetické polymery, které nás přednostně zajímají, i některé přírodní látky mají obrovské molekuly. Mluvíme o takzvaných makromolekulách, obsahující až desetitisíce atomů, jejichž počet se může v různých makromolekulách jedné látky poněkud měnit, zejména tedy u syntetických látek (*Vacík a kolektiv, 1999*). Makromolekuly, coby částice složené z velkého počtu atomů spojených do dlouhých řetězců (*Benešová a Satrapová, 2002*), vznikají tedy spojením velkého počtu opakujících se částí, neboli merů. Mery jsou zůstatky ze spojujících se výchozích molekul, takzvaných monomerů. Malé množství spojených merů se označuje pod pojmem oligomer, zatímco velké množství pod pojmem polymer (*Stoklasa, 2005*). Jak již bylo řečeno, existují i přírodní makromolekulární látky složené z makromolekul, z nichž nejvýznamnější jsou proteiny, nukleové kyseliny a polysacharidy (*Benešová a Satrapová, 2002*).

První možností je dělení na polymery přírodní, vyskytující se v živé přírodě, a polymery syntetické, v přírodě se nevyskytující, a vyrábějící se v posledních sto letech průmyslovou cestou (*Stoklasa, 2005*). Pojďme se nyní na tyto polymery podívat z hlediska bližšího.

Přírodní polymery, dále dělené na původní a chemicky modifikované, byly prvními makromolekulárními látkami, které našly technické využití. Mluvíme například o přírodním kaučuku ve formě mléčně bílé šťávy (latexu) získaného ze stromu pod názvem *Hevea brasiliensis* z čeledi *Euphorbiaceae* pěstovaného na plantážích, dále o gutaperče, různých derivátech celulózy (*Stoklasa, 2005; Ducháček, 2006*) či kaseinu, což je důležitý rozpustný fosfoprotein obsažený v mléce, kde na sebe váže vápník důležitý pro růst kostí (*Benešová a Satrapová, 2002*). Přírodní makromolekulární látky – biopolymery, se od syntetických polymerů liší stavbou polymerního řetězce a složitější strukturou molekul. Lze zde zařadit polysacharidy (škrob, celulóza) s monosacharidy coby základní stavební jednotky, proteiny s aminokyselinami coby stavební jednotky, nukleové kyseliny s nukleotidy, a izoprenoidy, konkrétně poté polyterpeny (přírodní kaučuk), jejichž základní stavební jednotkou je isopren (*Benešová a Satrapová, 2002; Stoklasa, 2005; Ducháček, 2006*).

Syntetické polymery vznikají činností člověka prostřednictvím jeho umu, ovšem na základě chemické syntézy (*Ducháček, 2006*). Lze je rozdělit podle typu chemických reakcí (příprava na základě polymerace, polykondenzace či polyadice), podle tvaru molekul (lineární, rozvětvené, zesíťované a prostorově zesíťované – viz obrázek č. 3) a podle chování za zvýšené teploty (termoplasty a termosety). Řetězce syntetických polymerů tvoří zpravidla atomy téhož prvku – uhlíku. Dále se může jednat o kyslík, dusík či síru, ale také i o atomy křemíku a kyslíku coby základ řetězců silikonů. Další možností dělení je na polymery vodivé a nevodivé.



Obrázek č. 3: Jednotlivé řetězce polymerů (*Benešová a Satrapová, 2002*), přičemž: a) Lineární řetězec syntetických polymerů; b) Rozvětvený řetězec syntetických polymerů; c) Zesíťovaný řetězec syntetických polymerů; d) Prostorově zesíťovaný řetězec syntetických polymerů

2.1 Elektricky vodivé a nevodivé polymery

Nyní bude celá problematika krátce zaměřena na rozdíl mezi vodivými a nevodivými polymery. Polymerní látky, jako polyethylen či polyvinylchlorid, jsou nevodivými a výbornými elektrickými izolanty. Ovšem existují i takové polymery, které vodivé jsou, mluvíme ku příkladu o polyacetylenu, polypyrrolu, polythiofenu, polyfenylenu či polyanilinu, o němž bude řečeno později (*Stejskal, 2001*). Ve struktuře vodivých polymerů se pravidelně střídají jednoduché a dvojné vazby, poněvadž jsou tvořeny systémem konjugovaných dvojných vazeb (*Stoklasa, 2005*). Konjugace není jediným předpokladem elektrické vodivosti polymerů, mluvíme také o takzvaném dopování, tedy o přítomnosti nositelů náboje zprostředkávající jeho transport po řetězci. Elektrická vodivost posledně zmíněných polymerů se pohybuje na úrovni

$0,01 - 30 \text{ S.cm}^{-1}$, což je srovnatelná hodnota s anorganickými polovodivými materiály, ku příkladu s germaniem (*Stejskal, 2001*).

Nejčastěji studovanými vodivými polymery jsou polyacetylen, polypyrrol a polyanilin. Samozřejmě byla provedena řada experimentů. Například halogenace *trans* – polyacetylenů zvýšila jeho elektrickou vodivost až o několik řádů. Na tento značně důležitý fakt přišel japonský vědec Hideki Shirakawa. Smysl experimentu spočíval ve vystavení polyacetylenových filmů parám jódu, což vedlo ke vzniku produktu o vodivosti až 38 S.cm^{-1} (*Stejskal, 2001*). Polyacetylen má svou omezenou stabilitu, mnohem stabilnější jsou již zmíněné polypyrrol či polyanilin, jež je předmětem naší práce.

Vodivé polymery jsou důležitým představitelem schopnosti měnit svou vodivost v reakci na vnější prostředí, a proto mohou nést označení „inteligentní polymer“ (*Prokeš, 2001*). A nyní z hlediska využití – vodivé polymery jsou zkoumány nejen pro své elektrické vlastnosti, ale také coby funkční materiály a z důvodu jejich schopnosti reakce na vnější podněty (viz pojem „inteligentní polymer“). Typickými vodivými polymery, studovanými samostatně, anebo coby součást kompozitních materiálů, jsou tedy polyanilin, polypyrrol a také poly(3,4 - ethylendioxythiofen). Zaměříme se nyní konkrétně na využití polyanilinu.

Změny ve fyzikálně – chemických vlastnostech polyanilinu, vyskytující se v odpovědi na vnější stimuly, jsou využívány v rozdílných aplikacích (*Levi, 2000; MacDiarmid, 2001*), jako jsou například organické elektrody, senzory a jednotlivé pohony (*Jin, Su a Duan, 2001; Sotomayor a kolektiv, 2001; Kane-Maguire a Wallace, 2001*). Další využití jsou založena na kombinaci elektrických vlastností typických pro polovodiče a charakteristických materiálových vlastností polymerů, jako jsou rozvoj „plastické“ mikroelektroniky (*MacDiarmid, 2001; Hamers, 2001*), elektrochromických zařízení (*Rosseinsky a Mortimer, 2001*), výrobou kompozitních systémů na míru (*Prokeš a kolektiv, 2000; Elyashevich a kolektiv, 2001*) a takzvaných „chytrých“ tkanin (*Armes a Miller, 1988*). Prokázání fyzikálních vlastností polyanilinu odrážejících podmínky preparace je tedy důležitou a významnou záležitostí. Další využití polyanilinu jsou známa coby zpomalovače hoření, v palivových článcích, při antikorozi ochraně kovů či v elektroeologii. Současným předmětem studia je především karbonizace vodivých polymerů zachovávající si svou morfologii,

kombinace vodivých polymerů a iontových kapalin či kombinace vodivých polymerů se stříbrem (*Stejskal a kolektiv, 2001*).

2.2 Využití polymerů

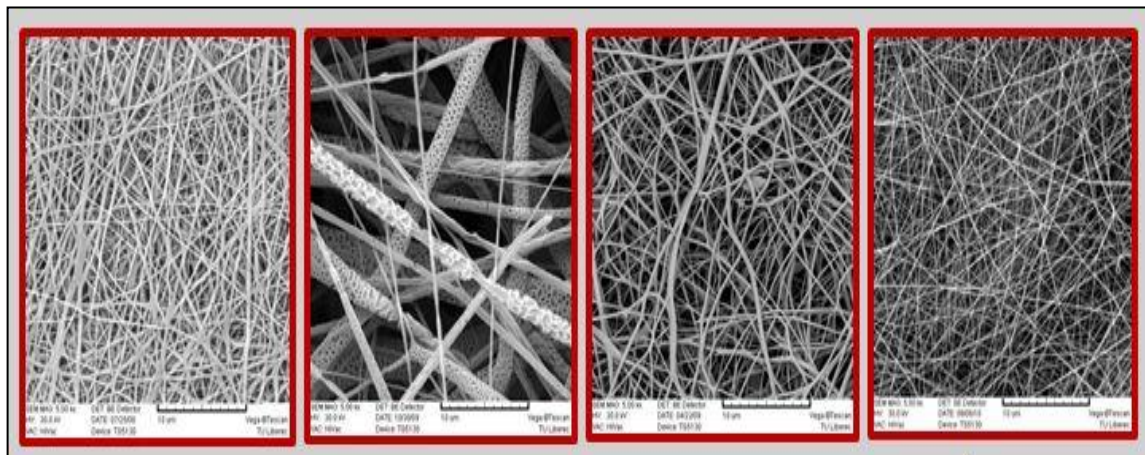
Polymerní látky jsou běžně využívány v průmyslu z důvodu jejich výborných objemových vlastností, jako jsou například pevnost či dobrá odolnost vůči chemikáliím. Povrchové vlastnosti polymerů jsou pro mnohé aplikace neadekvátní vzhledem k jejich nízké povrchové energii. Povrchová modifikace je velice často potřebná, z níž právě plasmová povrchová modifikace je v posledních desetiletích úspěšně využívána, především v oblasti zkoumání biomedicínských polymerních materiálů. Pro biomedicínské polymery musí být povrchové vlastnosti upraveny ze tří výrazně patrných důvodů – aby podporovaly přilnavost neboli adhezi buněk, jejich růst neboli proliferaci, a také z hlediska jejich vhodnosti pro různé implantáty. Tato reálná fakta poskytují přehled o využití plasmové povrchové modifikace biomedicínských materiálů a jejich vliv na buněčné interakce s jednotlivými materiály (*Jacobs a kolektiv, 2012*).

2.2.1 Využití polymerů v tkáňovém inženýrství

V posledních desetiletích byla moderní medicína vyzvána k „souboji“ se složitými problémy v oblasti zdravotnictví. Zmiňme například tkáňové inženýrství. Je to dáno tím, že se jedná o multidisciplinární obor kombinující principy biologie, medicíny a inženýrství, který si klade za cíl nahrazovat poškozené, zraněné nebo dokonce chybějící orgány a tkáně s funkčními umělými náhradami (*Tabata, 2001; Vasita, Shanmugam a Katti, 2008*). Tato komplexnost má za následek rozmanité nároky na použité materiály, jako je například biokompatibilita, jejíž definice a význam budou řečeny později v kapitole: Biokompatibilita polyanilinu, dále biodegradabilita či povrchové vlastnosti daného materiálu (*Oehr, 2003*).

Definujme si nyní pojem biodegradabilita. Biodegradabilita neboli zkráceně biodegradace představuje pojem zahrnující v sobě proces, při kterém dochází k přirozenému rozkladu látky (polymeru) za účinnosti mikroorganismů (*Stloukal, 2010*) či povětrnostních podmínek na vodu a oxid uhličitý v ideálním případě (*Lubasová, [b.r.]*), aniž by došlo k zátěži životního prostředí. Poslední dobou zaujímají velkého rozsahu takzvané biodegradabilní plasty (viz obrázek č. 4), anebo biode-

gradabilní kompostovatelné polymery (*Stloukal, 2010*), u nichž dochází k degradaci na základě prostého procesu – kompostování.



Obrázek č. 4: Ukázky elektrostatického zvlákňování biodegradabilních polymerů typu (zleva doprava: chitosan, polykaprolakton, želatina a sojový protein) (*Lubasová, [b.r.]*)

Z výše uvedeného plyne, že je velice obtížné najít materiál, který by splňoval a vyhovoval všem požadavkům. Jednou z možností, respektive strategií, je využití kompozitních materiálů, které kombinují vlastnosti jeho složek. Další možným způsobem je již zmíněné použití materiálu, který má požadované objemové vlastnosti, jako například biodegradabilita či pevnost, a u kterého je možné provést požadovanou povrchovou úpravu.

Příkladem takových materiálů mohou být biomedicínské polymery. Významnými a studovanými představiteli jsou poté kyselina polymlečná, poly- ϵ -kaprolakton či poly-(hydroxybutyrát) (*Ikada a Tsuji, 2000*). Jedná se o biokompatibilní, v některých případech mluvíme také o biodegradabilních materiálech, mající dobré mechanické a strukturální vlastnosti. Nicméně, jejich povrchové vlastnosti nejsou vhodné pro uchycení buněk, a proto je často využívána povrchová úprava. V posledních desetiletích byla důsledně studována ku příkladu povrchová úprava polymerů s netermálním plazmatem (*Chan, Ko a Hiraoka, 1996*), a stává se evidentním i fakt, že se jedná o velice slibný a zajímavý cíl zkoumání z hlediska biomedicínských materiálů (*Morent a kolektiv, 2011; Desmet a kolektiv, 2009*). Plas-

mová modifikace biomedicínských materiálů dává příležitost ke změně povrchových vlastností polymerních implantátů dosažením lepší biokompatibility beze změny objemových vlastností (*Chu a kolektiv, 2002*).

2.3 Povrchové vlastnosti

Důležitost povrchu vyplývá z faktu, že se jedná o interakční oblast pro jakoukoli komunikaci látky s okolním prostředím. Definujme nyní povrch z hlediska možností u kapalin a u pevných látek. U prvně zmíněných je povrch definován pomocí průběhu koncentrace částic ve směru kolmém k povrchu. Pro pevnou látku, zejména monokrystalickou, se lépe hodí definice odvozená od uspořádání molekul v látce, v níž hrají hlavní roli dva pojmy – povrch představující poslední atomární rovinu a povrchová oblast (okraj) coby část látky, která se liší od objemu svým uspořádáním či složením (*Jacobs a kolektiv, 2012*).

2.3.1 Metody stanovení povrchových vlastností

Co se týče metod stanovení povrchových vlastností, zde budou uvedeny tři významné základní metody – kontaktní úhel, metoda AFM, a nakonec i metoda XPS.

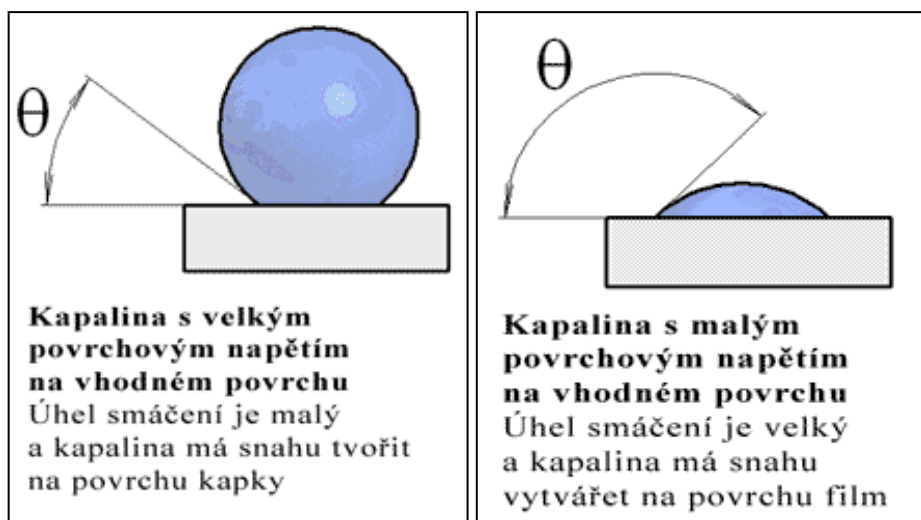
2.3.1.1 Kontaktní úhel

Jednou z možností stanovení povrchových vlastností je metoda měření kontaktního úhlu sedící kapky kapaliny na pevném podkladu coby velice přesná a rychlá metoda charakterizace pevných materiálů. Na základě zjištění kontaktního úhlu lze vypočítat povrchovou energii daného materiálu, čímž dochází k lepšímu porozumění interakcí mezi daným materiálem a kapalinou. Platí, že kapalná fáze se stýká s fází tuhou pod určitým úhlem θ , a právě tento úhel se nazývá úhel smáčení alias kontaktní úhel (*Šimek a Hrnčířik, 2010*). Měření se provádí stanovením úhlu, který svírá tečna k povrchu kapky vedená v bodě styku kapky s rozhraním (*Svoboda a kolektiv, 2006; Tarábek a kolektiv, 2006*). Podívejme se nyní na celou problematiku z hlediska fyziky. Pokud platí $0 < \theta < 90^\circ$ (viz obrázek č. 5 napravo), říkáme, že kapalina smáčí povrch tuhé podložky. Jestliže je situace jiná, tedy $90^\circ < \theta < 180^\circ$ (viz obrázek č. 5 nalevo), říkáme, že kapalina daný povrch nesmáčí (*Šimek a Hrnčířik, 2010; Svoboda a kolektiv, 2006*). Úhel smáčení (tvar kapky) závisí na mezipovrchových energiích tří koexistujících mezifázových rozhraní – mezi tuhou a kapalnou fází (γ_{sl}), mezi tuhou a plynou fází (γ_{sg}), a nakonec mezi fází kapalnou a

plynnou (γ_{lg}). Z termodynamického hlediska lze možno pro smáčecí úhel odvodit vztah (1).

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

Je – li $\gamma_{sg} > \gamma_{sl}$, má $\cos \theta$ kladnou hodnotu, úhel θ je menší než 90° a kapalina smáčí tuhý povrch. V případě opačném, tedy $\gamma_{sg} < \gamma_{sl}$, má $\cos \theta$ zápornou hodnotu, úhel smáčení je větší než 90° a kapalina nesmáčí tuhý povrch (Šimek a Hrnčířik, 2010). Poslední zajímavostí týkající se této menší kapitoly je fakt, že v případě použití vody coby testovací kapaliny mluvíme o hydrofilním, popřípadě hydrofobním povrchu. Přístroj sloužící k měření kontaktního úhlu sedící kapky na zkoumaném vzorku se nazývá Surface Energy Evaluation System (SeeSystem).



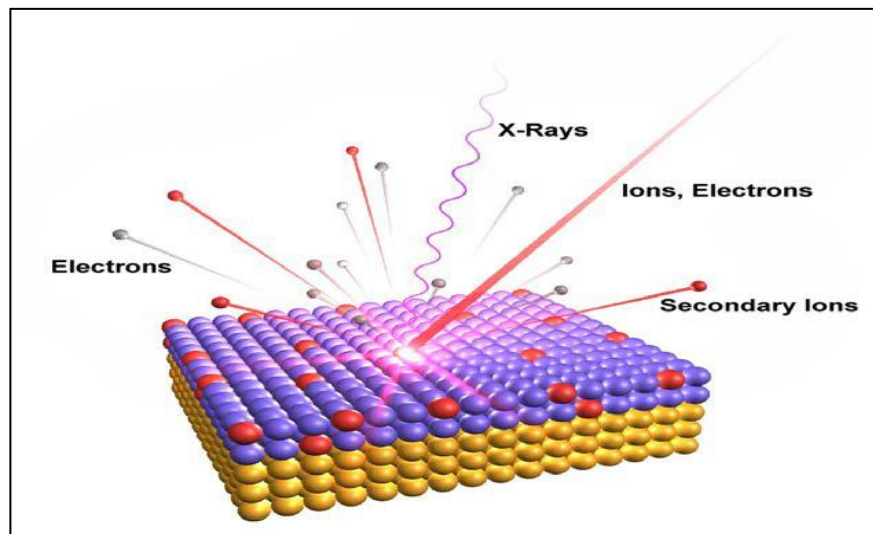
Obrázek č. 5: Ukázky obou případů úhlů smáčení (Šimek a Hrnčířik, 2010)

2.3.1.2 Mikroskopie atomárních sil

Pozoruhodnou vlastností mikroskopie snímacích sond (dále jen zkratkou SPM) je jejich schopnost zobrazení detailů na atomové a molekulární úrovni, což zvyšuje naše porozumění. Mikroskopie atomárních sil (zkratkou AFM) coby jedna z metod SPM, je založena na interakci sil mezi hrotem a vzorkem závisících na jejich vzdálenosti od sebe. V těsném kontaktu je síla repulsivní, zatímco větší oddělení způsobuje vznik síly přitažlivé. Mikroskopie atomárních sil je v současné době aplikována v různých prostředích, ať už se jedná o vzduch, kapalinu či vakuum, a typech materiálů, jakou jsou kovové polovodiče, měkké biologické vzorky, konduktivní a nekonduktivní materiály (*Vilalta-Cemente a Gloystein; 2008*).

2.3.1.3 Rentgenová fotoelektronová mikroskopie

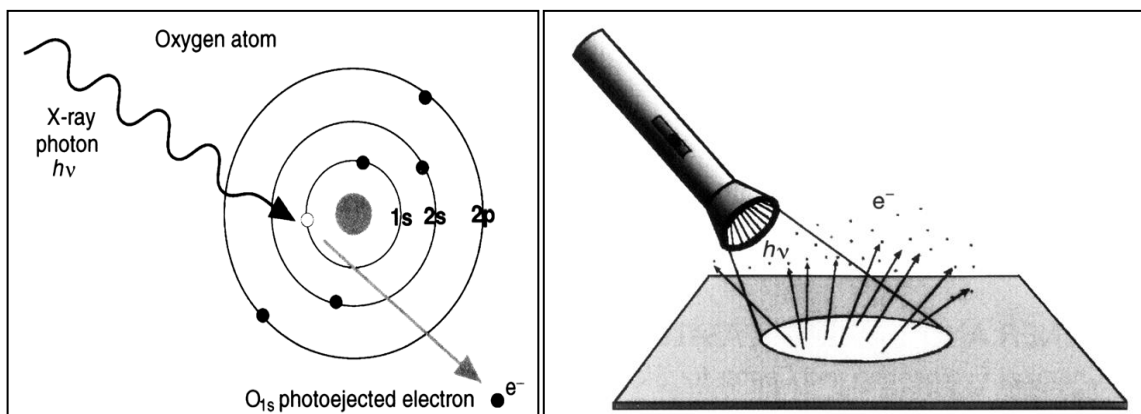
Tuto metodu lze vysvětlit na daných obrázcích, které se nijakým způsobem neliší, jen principiální hledisko bude uvedeno na základě dvou významných představitelů – Kai Siegbahna a Alberta Einsteina. Metoda XPS, neboli rentgenová fotoelektronová mikroskopie (viz obrázek č. 6), byla rozvinuta v polovině 60. let minulého století, Kaiem Siegbahnem (obdržení Nobelovy ceny v roce 1981) a jeho vědeckou skupinou na Universitě Uppsala ve Švédsku (University of Uppsala, Sweden). Povrchové analýzy (viz obrázek č. 7 nalevo) pomocí této metody je dosaženo na základě ozáření vzorku monoenergetickým měkkým rentgenovým zářením a energií analyzující emitované elektrony (*Moulder a kolektiv, 1995*).



Obrázek č. 6: Princip rentgenové fotoelektronové mikroskopie (*Moulder a kolektiv, 1995*)

Běžně jsou využívány dva druhy záření – $MgK\alpha$ rentgenové záření a $AlK\alpha$ rentgenové záření. Fotony těchto záření mají pouze omezenou pronikavou sílu v pevných látkách. Řádově se jedná o 1 až 10 mikrometrů. Nicméně – fotony interagují s atomy v této povrchové oblasti příčinou fotoelektrického jevu (viz obrázek č. 7 napravo), což způsobuje, že dané elektrony emitují. Emitované elektrony mají svou kinetickou energii danou vztahem (2), přičemž součin $h \cdot \nu$ představuje energii fotonu, E_B vazebnou energii atomového orbitalu, ze kterého elektron pramení, a veličina φ vyjadřuje takzvanou funkční činnost spektrometru (*Moulder a kolektiv, 1995*).

$$KE = h \cdot \nu - (E_B + \varphi) \quad (2)$$



Obrázek č. 7: Siegbahnův analytický nástroj (nalevo) a Einsteinův fotoelektrický jev (napravo) (*Smart a kolektiv, 1995*)

Vazebnou energii lze považovat za ionizující energii atomu. Z důvodu existence veliké různorodosti iontů z každého typu atomu existuje odpovídající sortiment kinetických energií emitovaných elektronů. Navíc se zde nachází jednotlivé pravděpodobnosti pro každý proces. Zatímco pravděpodobnosti integrací elektronů s danou hmotou jsou daleko větší nežli u fotonů, délka dráhy fotonů je v řádu mikrometrů, avšak u elektronů se vyskytuje v desítkách Ångströmů. Z toho tedy plyne následující – zatímco k ionizaci dochází až v hloubce několika mikrometrů, pouze tyto elektrony vznikající desítky Ångströmů pod pevným povrchem, mohou opustit povrch bez ztráty energie (*Moulder a kolektiv, 1995; Briggs a Grant, 2003*).

3 POLYANILIN

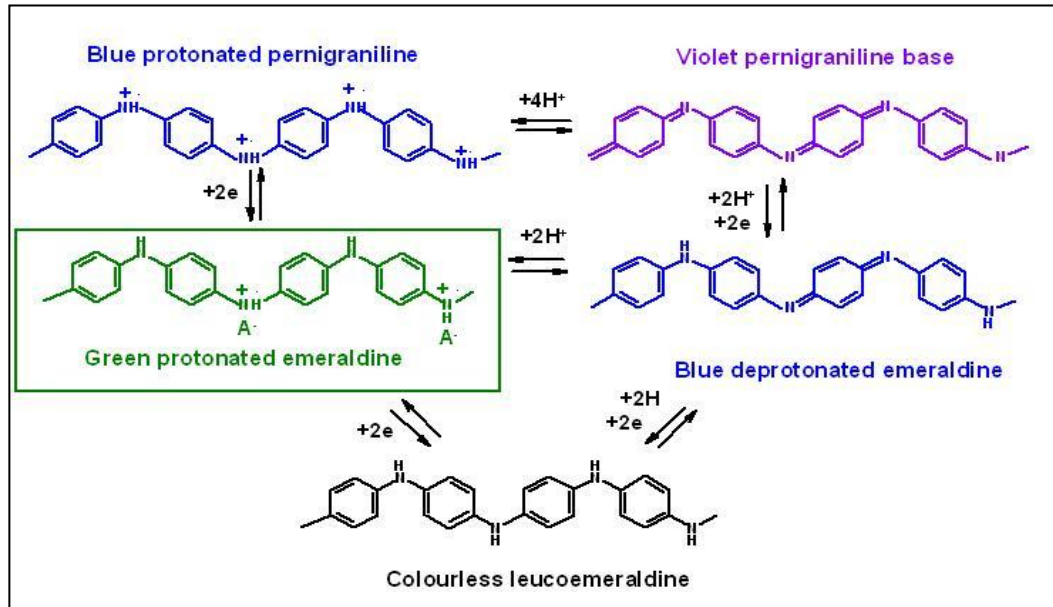
Nyní se v této kapitole nebudeme zabývat všeobecně polymery, ale zaměříme se na jeden konkrétní polymer, a to polyanilin, jehož historie, formy, příprava i biokompatibilita jsou uvedeny v následujících kapitolách.

Jak již bylo uvedeno, naše pozornost bude zaměřena na polymerní látku pod názvem polyanilin, připravovaného oxidací anilinu. Právě tento anilin byl získán v roce 1826 německým chemikem Unverdorbenem jako produkt na základě pyrolytické destilace indiga (*Stejskal, 2001*), což je sytě modré barvivo z kořenů tropického keře indigovníku, užívané dříve k výrobě inkoustu a barvení tkanin, a navíc je ho možné vyrábět i synteticky (*Klimeš, 1985*). Na základě různých experimentů byly již v roce 1840 popsány zelené oxidační produkty vykazující polyanilin (*Stejskal, 2001*). Právě proto je polyanilin považován za pravděpodobně nejstarší syntetický polymer, a důkazem byla právě syntéza prvního syntetického, průmyslově vyráběného barviva mauveinu, v roce 1856. V roce 1862 byla britským profesorem chemie Lethebym provedena elektrochemická oxidace při toxikologické identifikaci anilinu, která vedla k alkalizaci, a následně k modrému zbarvení produktu, jenž je typická pro polyanilinovou bázi. V roce 1910, kdy ještě nebyly známy polymery, navrhli britští chemici Green a Woodhead strukturu oktameru pro oxidační produkty anilinu (*Stejskal, 2001*). Ovšem experimenty vedoucí k syntéze polyanilinu byly popsány i v československé zemi v roce 1968 Honzlem a spol.

3.1 Formy polyanilinu

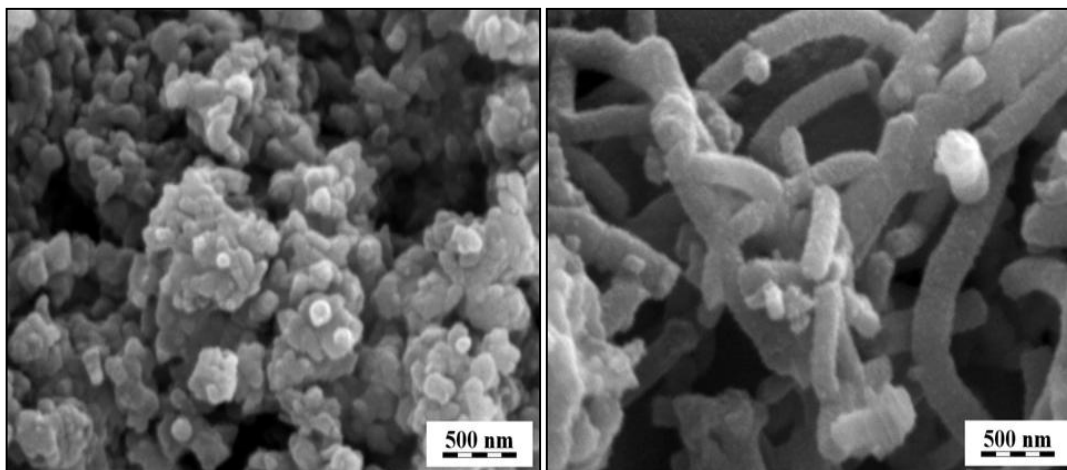
Polyanilin existuje v různých formách lišících se navzájem stupněm oxidace či protonace, čehož je dosahováno tím, že jsou dodávány, anebo odebírány elektrony na základě redukce či oxidace. Z různých oxidačních forem (viz obrázek č. 8), zmíněných níže, je nejvýznamnější emeraldin, nesoucí zelené, respektive smaragdové zbarvení. Z toho vyplývá, že polyanilin existuje v základní stabilní emeraldinové formě. Emeraldin může být oxidován na pernigranilin, nebo naopak redukován na bezbarvý leukoemeraldin. U emeraldinu i pernigranilinu vždy existují protonované formy a tomu odpovídající báze. Zatímco se zmíněný protonovaný vodivý emeraldin nachází v zelených odstínech, jeho báze vzniklá ku příkladu působením hydroxidu amonného je naopak nevodivá a modrého zbarvení (přechod při slabě kyselém pH 5 – 6). Protonovaný pernigranilin je modrý a jeho báze nese zbarvení fialové. Syn-

tetické experimenty vedoucí k získání polyanilinu byly popsány v roce 1968 v Československu (Stejskal, 2001).



Obrázek č. 8: Jednotlivé formy polyanilinu (Stejskal, Kratochvíl a Jenkins, 1996)

Povězme si nyní pár slov týkajících se následujících dvou obrázků. Polymerace anilinu v silně kyselém prostředí vede ke vzniku polyanilinu v granulární formě (viz obrázek č. 9 nalevo), zatímco ve vodě nebo při snížené kyselosti, ku příkladu v mírně kyselém prostředí kyseliny octové, dochází ke vzniku polyanilinových trubek (viz obrázek č. 9 napravo) dosahujících rozměrů 100 až 200 nanometrů a délky několik mikrometrů (Stejskal, 2001).



Obrázek č. 9: Polyanilin v granulární formě při polymeraci v silně kyselém prostředí (nalevo) a polyanilinové nanotrubky vzniklé při snížené kyselosti (napravo)
(*Stejskal a Gilbert, 2002*)

3.2 Příprava polyanilinu

Již bylo řečeno, že se polyanilin připravuje na základě oxidace anilinu, především peroxydvojsíranem amonným. Chemická reakce je jednoduchá a probíhá takřka bez problémů, to znamená – za laboratorní teploty, v kyselém vodném prostředí či bez nutnosti zahřívání nebo míchání (*Stejskal, 2001*), kdy na rozdíl od suspenzní polymerace je míchání nutné (*Stoklasa, 2005*), a s téměř stoprocentním výtěžkem (*Stejskal, 2001*). Probíhající exotermní reakce, což je reakce, při níž se uvolňuje teplo, které je předáno do okolí (*Benešová a Satrapová, 2002*), je ukončena během několika minut a produkt se oddělí filtrací (*Stejskal, 2001*). Pokud je při oxidaci anilinu do reakční směsi ponořen libovolný předmět, který je v kyselém prostředí stálý, pokryje se na povrchu vodivým polyanilinovým filmem o tloušťce zhruba 100 nanometrů. Je – li přidán do polymerační směsi polymer, jenž je ve vodném prostředí rozpustný, vzniká polyanilinová disperze připomínající roztok, nikoliv sraženina (*Stejskal, 2001*).

3.3 Biokompatibilita polyanilinu

Již byly uvedeny informace týkající se historie, jednotlivých forem polyanilinu a jeho přípravy. Nebojme se též zmínit i biokompatibilitu tohoto významného polymeru. Otázkou zůstává, co tento pojem znamená. Termín biokompatibilita všeobecně představuje schopnost materiálu koexistovat s žijícími organismy a tkáněmi bez jejich ohrožení a poškození (*Humpolíček a kolektiv, 2012*).

Ačkoliv je polyanilin potenciálně využitelný v oblasti medicíny, jsou údaje o jeho biokompatibilitě nedostačující. Důvod je pravděpodobně založen na faktu, že polyanilin je velice často přijímán s opatrností, jež je dána faktem, že monomer – anilin a reakční meziprodukty – dimery anilinu a oligomery, jsou aromatické aminy, které mohou být fyziologicky aktivní. Karcinogenní účinek dimeru anilinu pod názvem benzidin je považován za nejuznávanější potenciální hrozbu. Nicméně, samotný polyanilin je zcela nerozpustný ve vodných médiích. Publikované studie zabývající se biokompatibilitou polyanilinu lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupina se týká *in vivo* testování implantátů a post – implantačních změn tkání v okolí implantátu (*Wang a kolektiv, 1999; Kamalesh a kolektiv, 2000; Mattioli-Belmonte, 2003*). Druhá skupina metod testování se zabývá stanovením proliferace anebo diferenciaci buněk na površích polyanilinu pomocí metod *in vitro* (*Bidez a kolektiv, 2006; Wang a kolektiv, 2008; Liu a kolektiv, 2010*). Tyto studie referují především o testování polyanilinových filmů napolymerovaných na různých nosných plochách (*Wang a kolektiv, 2008; Liu a kolektiv, 2010*) a také se zabývají polyanilinovými komplexy (*Bayer a kolektiv, 2010*) či komposity (*Fernandes a kolektiv, 2010; Jeong a kolektiv, 2008; Li a kolektiv, 2007*).

3.4 Aplikace polyanilinu

V posledních desetiletích se vodivé materiály obecně, a zejména polyanilin, staly extenzivně studovanými materiály (*Stejskal a kolektiv, 2010*). Původní zájem o vodivost se postupně posunula do studií elektrochemického chování a jejich schopnosti reagovat změnami vodivosti na externí podněty. Aplikace v ochraně proti korozi (*Kalendová a kolektiv, 2008*), katalýzách organických reakcí (*Drelinkiewicz a kolektiv, 2009*), v palivových článcích (*Wang a kolektiv, 2009; Sapurina a kolektiv, 2009*), superkondenzátorech (*Snook a kolektiv, 2011*), či analytických elektrodách (*Shishkanova a kolektiv, 2005*), se stávají čím dál frekventovanější. Faktem je, že

vodivé polymery produkují také obrovský výběr nanostruktur, ku příkladu nanotrubičky (Huang a Lin, 2010; Konyushenko a kolektiv, 2006; Stejskal a kolektiv, 2006) nebo nanovlákna (Wang a kolektiv, 2009; Wang a kolektiv, 2010; Li a kolektiv, 2009). Polyanilin byl nedávno zkoumán pro různá využití zahrnující biomedicínské aplikace, spojených s jeho vodivostí, ku příkladu v oblasti srdečního (Fernandes a kolektiv, 2010), anebo neurálního (McKeon, Lewis a Freeman, 2010) tkáňového inženýrství a v neurálních sondách (Wang a kolektiv, 2010).

Vodivé polymery prokázaly potenciál pro elektrickou stimulaci elektro – sensitivních tkání použitelnou v regenerativní medicíně, například již zmíněné neurální a srdeční tkáň (Ghasemi-Mobarakeh a kolektiv, 2009). Uveďme si konkrétní případy. Buněčná linie citlivá na elektrickou stimulaci – H9c2 srdečních myoblastů – byla využívána vědeckým týmem pod vedením Bidez (Bidez a kolektiv, 2006), a to z důvodu studií a *in vitro* experimentů buněčné adheze a proliferace na polyanilinovém substrátu. Studie prokázaly, že polyanilin umožňuje buněčnou vazbu a proliferaci. Dalším významným a ukázkovým příkladem, ovšem neprokazujícím elektrickou stimulaci, jsou PC – 12 buňky, které byly využívány pro výzkum biokompatibility polyanilinových filmů připravovaných povrchovou polymerací (Liu a kolektiv, 2010). Buňky byly kultivovány nejen na silikonové desce potažené polyanilinem, ale také na nativní desce po dobu jednoho a dvou dnů. Po jednom dni kultivace bylo zřejmé, že potažený povrch umožňuje dobrou buněčnou adhezi a proliferaci ve srovnání se silikonovým povrchem bez povlaku.

4 BUNĚČNÉ MODELY

Pro začátek této kapitoly musíme opět říci jednu důležitou informaci. Buňku, coby základní stavební a funkční jednotku živých organismů, lze rozdělit na dva odlišné typy – prokaryotické buňky vyskytující se u bakterií, sinic a prochlorofyt, a buňky eukaryotické, nacházející se u rostlin, hub a živočichů. A naše pozornost právě bude kladena na tyto eukaryotické buňky z důvodu jejich využití v experimentální části.

4.1 Definice a charakteristika buňky obecně

Všeobecná definice buňky praví, že se jedná o nejmenší funkční a reprodukční jednotku živé hmoty, mající svůj vlastní genetický, proteosyntetický a metabolický aparát, umožňující vytvářet a využívat energii (*Benešová a kolektiv, 2003*). U jednobuněčných organismů je schopna buňka samostatné existence, u organismů mnohobuněčných poté ve spojitosti s ostatními buňkami (*Mišurcová, 2010*). Je důležité také říci, že lze buňku označit jako minimální jednotku, poněvadž je dále nedělitelná na jednodušší složky, takzvané subsystemy, které by vykazovaly všechny základní znaky živé soustavy a současně i to, že všechny složitější živé soustavy používají buňku jako svůj strukturální a funkční subsystem (*Nečas, 2000*).

4.2 Buňka jako systém

Hlavním cílem všech procesů probíhajících v buňce je uchování její existence a vedení k její reprodukci. To znamená, že lze buňku chápat coby systém s cílovým chováním. Nejen že buňku můžeme označit jako systém se sebeudržováním z důvodu zachování své existence, ale také nese označení pod názvem systém s autoreprodukcí. Pokud buněčné procesy nenásledují tyto cíle, nejenže buněčná stabilita pomíjí, ale také dochází k zániku buňky či k ukončení její reprodukce (*Nečas, 2000*). Pro konečný souhrn lze tedy říci, že existence buňky v čase představuje stacionární stav primárně determinovaný vnitřní pamětí systému, ale stacionární stav samotný, je udržován regulovanou výměnou látek, energie a informace mezi buňkou a okolím. Dynamická změna těchto komponent je poté označena jako tok látek, tok energie a tok informace (*Nečas, 2000; Jelínek a Zicháček, 2006; Mišurcová, 2010; Benešová a kolektiv, 2003*).

5 BUNĚČNÉ INTERAKCE

Splynutí biologie a moderní technologie mikrosystémů nese svým způsobem značné problémy. Míjíme tím fakt, že precizní regulace interakcí mezi uměle vytvořeným povrchem a biologickým prostředím je předpokladem pro úspěšnou souhru takzvaného „živého světa“ společně se syntetickou technologií. Každá konstrukce čipu pro prostorově regulovatelná „přípevnění“ a s tím související i prostorově regulovatelná „oddělení“ živých buněk musí splňovat dva základní, stále doposud protijdoucí požadavky. Prvním požadavkem je rozdělení povrchu do oblastí, které preferují buněčnou adhezi, druhým požadavkem poté proces odolávání této adhezi (*Petersen, Gattermayer a Biesalski, 2010*).

5.1 Interakce mezi buňkou a povrchem

Pojďme nyní nahlédnout obecně na záležitost týkající se interakcí mezi buňkami a materiálem. Dopodrobna se této problematice budeme věnovat v další podkapitole. Vzájemné interakce materiálu s okolní tkání je klíčovým faktorem ve finálním úspěchu implantátu. Reakce buňky v kontaktu s povrchem a adheze buněk k materiálu hraje důležitou roli v biokompatibilitě implantátu. Proto je důležité porozumět tomu, jak buňky komunikují, reagují a interagují se svým okolním prostředím (*Jacobs a kolektiv, 2012*).

5.2 Povrchový design

Naše porozumění molekulárních mechanismů, které jsou základem adheze živých buněk v přírodě, se ohromně zlepšila během posledních desetiletí. Adheze mezi dvěma buňkami, alias „adheze buňka – buňka“, jakož i adheze živých buněk na extracelulární matrix, je podmíněna a řízena specifickými interakcemi mezi molekulami buněčné adheze (zkratkou CAMs), lokalizovaných v plasmové membráně coby transmembránové proteiny, a jejich specifickými ligandy v extracelulární matrix. Samozřejmě byly identifikovány rozdílné hlavní třídy těchto receptorů (*Norde a Baszkin, 2000; Lodish a kolektiv, 2000; Alberts a kolektiv, 2002*). První třída zahrnuje imunoglobuliny a kadheriny, interagující s jejich protějšky, umístěnými v sousední buněčné membráně, a vytváří tedy „kontakt buňka – buňka“. Další třídu představují selektiny mající za cíl svazování glykoproteinových (glykosylovaných proteinů) mucinů. A nakonec mluvíme o takzvaných integrinech představujících

taktéž důležitou třídu molekul buněčné adheze, které především svazují proteiny extracelulární matrix a také interagují s imunoglobuliny.

5.2.1 Adheze buňka – extracelulární matrix

Takzvaná „adheze buňka – extracelulární matrix“ zahrnující kaskádu různých, především po sobě vyskytujících se událostí, je iniciována interakcí integrinových receptorů s malými ligandy – peptidy, uvedených v proteinech extracelulární matrix (*Alberts a kolektiv, 2002*). Jakmile ligand interaguje s tímto specifickým receptorem, buňka se začíná srovnávat, mluvíme o takzvaném „šíření se“, na rozhraní. Chemická informace je „přenesena“ do buňky konformační přestavbou receptoru na straně cytosolu, kde dochází ke spuštění další organizace aktinových vláken, která jsou často nazývána jako „stresová vlákna“. Nakonec, integrinové molekuly, které jsou připojeny k oběma peptidovým ligandům, a to z buňky ven a k cytoskeletu uvnitř (jsou zde přítomna stresová vlákna a různý počet dalších buněčných proteinů, jako jsou fokální adhezivní kináza, vinkulin, talin či tensin), se shlukují společně v plasmové membráně, čímž se vytváří takzvané „fokální adhezivní kontakty“ (*Zamir a Geiger, 2001; Geiger a Bershadsky, 2001; Petit a Thiery, 2000; Pande, 2000*).

Na první pohled se zdá být tento scénář jednoduchým, nicméně, je důležité si uvědomit, a to především z hlediska molekulárního, že mnoho rozdílných kroků, výše uvedených, není doposud přesně známo. Navíc je důležité uznat, že interakce peptidových ligandů s integriny nezajišťuje jen strukturální integritu živých buněk, ale také spouští počet různých dějů uvnitř buňky, které nakonec ovlivňují metabolismus, diferenciaci a proliferaci buněk (*Albeda a Buck, 1990; Travis, 1993*).

5.2.2 Buňky a jejich filopodia

Buňky vnímají své okolní prostředí také pomocí takzvaných výčnělků. Jedná se o ku příkladu mikrometr velikou strukturu připomínající list složený z aktinových vláknových pletiv. V extrémních případech se vyskytují menší výčnělky připomínající lidský vlas – filopodia, složená z dlouhých a tenkých aktinových vláknových svazků, vnímající extracelulární matrix a povrch materiálu (*Roach a kolektiv, 2007*). Například, když najdou filopodia vhodné vazebné místo pro přilnavost, zpětnovazebný signál v dané buňce umožňuje a dovoluje zmíněným integrinovým receptorům vázat se na toto specifické vazebné místo, což vede k umožnění těchto integri-

nových receptorů být více lokalizovány v těchto oblastech buňky, a to právě vede k adhezi buňky do této oblasti.

5.2.3 Vazba na površích implantátu

Pokud je materiál umístěn uvnitř biologického prostředí, vytvoří se jakýsi vodní obal (neboli jiným slovním spojením – vodní skořápka), který je vytvořen okolo materiálu během nanosekund. V následujících sekundách se povrch pokryje vrstvou adsorbovaných proteinů. Třetí fáze, která probíhá různou rychlostí, zahrnuje vazbu buněk a navíc je ovlivněna řadou faktorů – biologickými molekulami, biofyzikálním prostředím a povrchovými vlastnostmi. Čtvrtá etapa zvaná životnost implantátu, je poté pokračováním vývoje brzkých stádií implantátu (*Jiao a Cui, 2007; Roach a kolektiv, 2007*). Doba trvání této etapy může být různá, od dnů až po několik desetiletí.

5.2.4 Integriny coby nejvýznamnější receptory

Již jsme se o integrinech bavili v předešlých kapitolách 5.2.1. a 5.2.2., a to zejména v souvislostech týkající se interakcí s peptidovými ligandy. Pojdme si ale konkrétně říci, proč a jaký význam zaobírají.

Pojdme se na celou problematiku podívat z úplného počátku. Již víme, že buňka, coby nejmenší strukturní a funkční jednotka všech živých organismů, je fascinujícím systémem s ohledem na její vysoce komplexní a hierarchický systém. Buňky budují své vlastní mikroprostředí sekrecí a organizováním matrixových proteinů do supramolekulárního shromáždění, termínovaného jako extracelulární matrix (zkratkou ECM). Na základě tvarování molekulárních kompozic extracelulární matrix, buňky přizpůsobí své vlastnosti vystavením adhezních míst, zřízením strukturálních pletiv s definovanou elasticitou a presencí růstových faktorů. Napříč komplexního souboru chemických a fyzikálních interakcí mezi buňkami a matrixem, provádí buňky generování tkání a orgánů výstavbou specifických architektur a funkcí.

Je to již přes 20 let, co se dokázalo, že integriny hrají hlavní roli ve zprostředkování interakcí mezi buňkou a extracelulární matrix, a tím i přímých tkáňových morfogenezí. Integriny jsou buněčné povrchové receptory, které z fyzikálního hlediska spojují vnitřní buněčné orgány k extracelulárnímu prostředí. Integriny fungují jako buněčné kotevní body, ale také manipulují a reagují na funkce extracelulární matrix. Jinými slovy – integriny pracují jako signální převodníky, aktivující různé intracelulární signální cesty tehdy, jakmile se aktivuje vazba na extracelulární matrix. Buňka obdrží signály skrze integrin, který může být spojen s proliferací a diferenciací buňky. Lze tedy říci, že tyto proteiny regulují buněčnou migraci, přežití, progresi buněčného cyklu a také buněčné diferenciací dráhy (*Legate, Wickström a Fässler, 2009*).

Podívejme se nyní na „složení“ integrinů coby jedny z nejdůležitějších receptorů buněčné adheze. Tyto proteiny se skládají ze dvou nekovalentně spojených podjednotek, takzvaných alfa a beta podjednotek. To znamená, že zahrnují heterodimerickou strukturu (*Hynes, 2002; van der Flier a Sonnenberg, 2001; Humphries, 1990*). Je dosud známo více než dvacet různých integrinů (*Alberts a kolektiv, 2002*). Platí fakt, že se většina integrinů nachází v různých buňkách, a naopak, většina buněk vyjadřuje několik rozdílných integrinů, což jim umožňuje vázání se na různé matrixové molekuly. Nejdůležitější z těchto matrixových molekul jsou proteiny extracelulární matrix, mezi něž patří fibronectin, kolageny, laminin a vitronektin (*Keselowsky, Collard a Garcia, 2005; Lutolf a Hubbell, 2005*).

Biomedicínské zařízení, které si klade za cíl vyvolat normální buněčné chování *in vivo*, má za úkol napodobit extracelulární matrix takovým způsobem, aby umožnil iniciaci procesu buněčné adheze. Principiálně mohou nastat dva případy. Za prvé může biomedicínské zařízení modifikovat povrch s proteiny extracelulární matrix zprostředkovávající připevnění živých buněk, anebo v případě druhém, může způsobit buněčnou adhezi zprostředkovanou malými ligandy na vhodných površích. Dobře známým ligandem je tripeptid RGD, přičemž zkratka RGD znamená arginin – glycin – aspartát (*Giancotti a Ruoslahti, 1999; Giancotti, 2000; Pierschbacher a Ruoslahti, 1984; Pierschbacher a Ruoslahti, 1984; Ruoslahti a Pierschbacher, 1987; Ruoslahti, 1996*), který lze nalézt v mnoha rozdílných proteinech extracelulární matrix. Lze říci, že afinita různých integrinů je především řízena prostřednictvím doprovodných aminových kyselin, a počtem oligopeptidů zahrnující RGD sek-

venci identifikovanou jako vazbu ke specifickým členům této „integrinové rodiny“ (*Wintermantel a Ha, 2003; Hersel a Kessler, 2003*).

5.3 Povrchy odolávající adsorpci proteinů a buněk

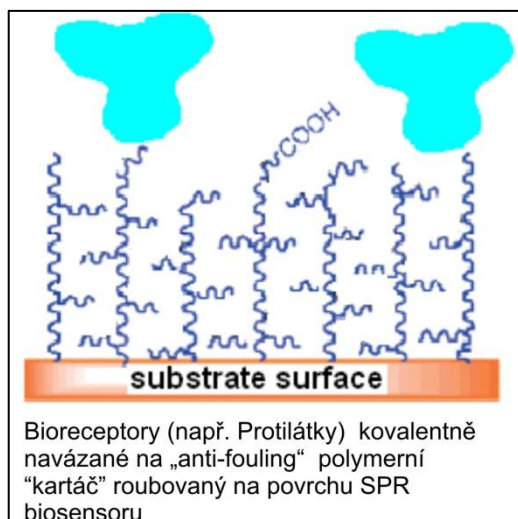
Tato méně rozsáhlá kapitola bude brána spíše z pohledu zamyšlení. V průběhu několika posledních desetiletí se vyvinul obrovský počet zajímavých strategií, které oslovují výstavbu obou druhů povrchů – ty, jež odolávají adsorpci proteinů, stejně jako ty, jež adsorpci proteinů podporují – a proto schopné buď potlačení, anebo podpory proteinu zprostředkovávajícího buněčnou adhezi. Proteinová adsorpce je stěžejní otázkou v oblasti designu a interpretace materiálů přicházejících do kontaktu s živými buňkami (*Andrade, Hlady a Jeon, 1996; Horbett a Brash, 1995*).

5.3.1 Příklady povrchových povlaků odolávajících proteinům

Mezi materiály, které byly použity jako povrchové povlaky pro design povrchů odolných vůči proteinům, jsou zahrnuty především přírodní polymery, jako jsou například heparin (*Römpp, Falbe a Regnitz, 1995*) či dextran (*Frazier a kolektiv, 2000*), ale i syntetické polymery, ku příkladu polyethyloxazolin PEtOx (*Rabinow a kolektiv, 1994; Lehmann a Rühle, 1999*), polydimethylakrylamid PDMAA (*Wörz a kolektiv, 2007; Petersen a kolektiv, 2009*), polyglyceroly (*Siegers, Biesalski a Haag, 2004*) a polyethylenglykol PEG (*Harris a Zalipsky, 1987*). Vzhledem k jeho dostupnosti, jakož i k jeho biokompatibilním vlastnostem, je polyethylenglykol co-by jednovrstvý „samouspořádaný“ polymer (*Yang, Galloway a Yu, 1999; Prime a Whitesides, 1993*), snad nejběžnějším příkladem polymerních látek využívaných k produkci povrchů, které jsou inertní k nespecifické povrchové adsorpci (*Jenney a Anderson, 1999; Jeon a kolektiv, 1991; Jeon a Andrade, 1991*). Povrchové povlaky „na bázi“ polyethylenglykolu jsou také vystaveny určitým přísným omezením s ohledem k chemické a termální stabilitě. Ku příkladu, filmy „na bázi“ polyethylenglykolu mohou podstoupit autooxidativní degradaci v přítomnosti přechodných kovů (*Ostuni a kolektiv, 2001*), anebo může dojít ke ztrátě konformační entropie povrchově upoutaných řetězců (*Nagaoka a kolektiv, 1984*).

5.3.1.1 Polymerní kartáče

Funkční rozhraní mezi syntetickými materiály a biologickými tekutinami či buňkami jsou vytvářena imobilizací makromolekulárních souborů obsahujících biologicky aktivní látky na povrchy materiálů (*Haj a Yang, 2012; Bačáková a kolektiv, 2011; Motlík a kolektiv, 2012*). Zajímavou třídou povrchových povlaků je třída skládající se z takzvaných polymerních kartáčů (viz obrázek č. 10). Polymerní kartáče představují polymerní monovrstvy vytvářené postupnou depozicí (layer – by – layer) molekulárních vrstev protilátek či kovalentní vazbou bioreceptorů (protilátky, antigeny) na polymerní kartáč (*Haj a Yang, 2012; Bačáková a kolektiv, 2011; Motlík a kolektiv, 2012*). Svým koncem jsou připojené k povrchu s vysokou hustotou roubování, která vede k protahování molekul kolmo k povrchu vzhledem k vyloučeným silným objemovým interakcím (*Advincula a kolektiv, 2004*). Obecně lze říci, že polymerní kartáč představuje vrstvu roubovaných polymerních řetězců připravenou povrchem iniciovanou radikálovou polymerací s přenosem atomu oligo(ethylenglykol)metakrylátu, hydroxyethylmetakrylátu či karboxybetainu (*Haj a Yang, 2012; Bačáková a kolektiv, 2011; Motlík a kolektiv, 2012*). Z hlediska specifického mohou poté být polymerní kartáče připraveny buď na základě růstu makromolekul v místě využívající povrchové nepohyblivé iniciátorové skupiny, takzvaný „*grafting from*“, anebo roubojícím ukončením funkčních makromolekul v místě, kde je povrch reaktivní. Nyní mluvíme o takzvaném „*grafting to*“. Ovšem to není vše. Polymerní kartáče mohou být také připraveny takzvanou fyzisorpcí blokových polymerů na pevném substrátu ze selektivních rozpouštědel, použitím povrchových nepohyblivých monomerů, anebo na základě příslušného „*grafting through*“ procesu (*Advincula a kolektiv, 2004*).



Obrázek č. 10: Ukázka protihnilobního polymerního kartáče (*Haj a Yang, 2012; Bačáková a kolektiv, 2011; Motlík a kolektiv, 2012*)

Velice úchvatný fenomén představují hydrofilní polymerní kartáče, jež ukázaly svou odolnost vůči nespecifické proteinové adsorpci (*Barbey a kolektiv, 2009; Szleifer a Carignano, 2000; Fristrup, Jankova a Hvilsted, 2009*) z biologických tekutin, včetně krevní plasmy a adhezi buněk – „anti – fouling“ (*Haj a Yang, 2012; Bačáková a kolektiv, 2011; Motlík a kolektiv, 2012*). Základní mechanismus byl připisán ztrátě entropie řetězců připojených k povrchu za předpokladu, že se daný protein přiloží k polymernímu kartáči. Z tohoto důvodu je připevnění proteinů k vysoce „oteklému“ polymernímu kartáči v prostředí vodného roztoku termodynamicky nepříznivé (*Barbey a kolektiv, 2009; Szleifer a Carignano, 2000; Fristrup, Jankova a Hvilsted, 2009*).

5.4 PŘÍMÁ BUNĚČNÁ ADHEZE K DANÝM POVRCHŮM

Na základě experimentů bylo navrženo několik cest k vytvoření lokálního prostředí vhodného pro připevnění živých buněk na umělém povrchu. Aby nedošlo k nedorozumění – buněčná adheze *in vivo* je založena na interakci molekul buněčné adheze a proteinů nacházejících se v extracelulární matrix, a přístup, který využívá lokálně deponovaných proteinů z extracelulární matrix, představuje vhodný počáteční bod pro „úspěšnou“ buněčnou adhezi. Naopak – pasivní ovládnutí proteinové adsorpce je vyhovující nejen pro krátkodobé aplikace, ale také pro mnoho situací v řízeném prostředí *ex vivo*.

5.4.1 Protein dekorativní povrchy pro prostorově řízenou buněčnou adhezi

Takzvané protein dekorativní povrchy pro prostorově řízenou buněčnou adhezi jsou založeny na deponování proteinů na površích za účelem řízené buněčné adheze vyžadující dvě hlavní nezbytné podmínky. Za prvé, fixované proteiny musí vykonávat jejich přirozenou biofunkci vůči buněčné vaznosti. Tedy, specifická rozpoznávací místa musí zůstat aktivními a přípustnými pro buňku. Za druhé, deponovaná proteinová vrstva musí být dostatečně stabilní za podmínek buněčné kultivace. Platí, že řídicí síly proteinové adsorpce na površích mohou být kategorizovány na dva příspěvky, entalpický, především se jedná o elektrostatické interakce vzhledem k redistribuci nabitých skupin na rozhraní, či o vodíkové vazby, což je nejvíce prominentní typ interakcí, a entropický. Mezi ně lze zahrnovat úplnou i částečnou dehydrataci proteinu anebo strukturní reorganizaci proteinové molekuly (*Haynes a Norde, 1995*).

5.4.1.1 Molekulová potence

Pro zachování schopnosti proteinové buněčné vaznosti, též označené termínem „molekulová potence“, může být rozkládání, respektive denaturace, prohibivním faktorem vedoucím ke ztrátě přírodní schopnosti proteinu zprostředkovat adhezi. U většiny proteinů se na základě adsorpčního procesu vyskytují některé konformační změny (*Giacomelli a Norde, 2001; Norde a Giacomelli, 1999; Norde a Giacomelli, 2000*). Ačkoliv některé studie naznačují, že si adsorbované proteiny udržují hlavní část jejich sekundární struktury, další zprávy navrhuje změny ve skládání proteinů jako pravděpodobnou příčinu zvýšení nebo snížení proteinové aktivity vůči buněčné

adhezi (Steele a kolektiv, 1993; Lewandowska a kolektiv, 1989; Grinnell a Feld, 1981; Liu a kolektiv, 2005; Taubenberger a kolektiv, 2010; Egles a kolektiv, 2008).

5.4.1.2 Lidský albumin coby příklad proteinů pro dekorativní povrchy

Obecně lze říci, že neglykosylovaný albumin produkovaný jaterními buňkami (Fusek, Káš a Ruml, 2008) představuje skupinu důležitých proteinů v krvi či bílku (Klimeš, 1985). Nás ovšem zajímá konkrétní příklad, a to lidský albumin (viz obrázek č. 11) coby nejhojnější globulární protein (Ducháček, 2006) v krvi, sloužící jako výborný a ukázkový příklad proteinů pro dekorativní povrchy. Lidský sérový albumin, zkratkou HSA – human serum albumin, tvoří 50 % až 60 % všech proteinů nacházejících se v lidské plasmě a jeho normální koncentrace se pohybuje okolo $42 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Fusek, Káš a Ruml, 2008). Každá molekula albuminu je složena ze tří společně fungujících podjednotek propůjčující dané molekule albuminu schopnost vázat nejrůznější látky. Jeho molekula obsahuje 585 aminokyselin.



Obrázek č. 11: Krystalografická struktura lidského albuminu (Tsuchida, Komatsu a Curry, 2006)

Lidský plasmatický albumin pomáhá v lidském těle udržovat osmotický tlak zodpovědný za udržení plasmy v cévách a zabránění jejího úniku do mezibuněčného prostoru (*Winston a kolektiv, 2007*). Nicméně také slouží k transportu látek nerozpustných ve vodě, jako jsou například hormony, enzymy či mastné kyseliny.

Lze uvést pro zajímavost dva experimenty. V prvním případě lze uvést příklad adheze lidského albuminu s trombocyty. Ačkoliv se jedná o protein, který je považovaný za „neadhezivní“ ke krevním destičkám, široce využívaný jako takzvaný povrchově pasivní protein proti nescifickým interakcím mezi krevními destičkami a povrchem, vědci Sivaraman a Latour ve svých studiích referovali, že adheze krevních destiček může být zprostředkována specifickými interakcemi s denaturovaným albuminem za předpokladu, že je protein adsorbovaný z nízkých koncentrací, anebo se vyskytuje na hydrofobních površích (*Sivaraman a Latour, 2010*). V druhém případě lze uvést příklad spojitosti lidského albuminu, ovšem geneticky upraveného, s porfyrinem, udávající krvi červenou barvu pomocí železa obsaženého ve své struktuře, za vzniku velkého molekulového komplexu (*Tsuchida, Komatsu a Curry, 2006*). Strukturní železo bylo zaměněno na zinek, a tím pádem došlo ke vzniku porfyrino – albuminového komplexu, schopného absorbovat světlo za vzniku značné energie schopné rozkládat vodu na vodík a kyslík. V souvislosti s vodíkem mluvíme o možném budoucím „zeleném palivu budoucnosti“.

5.4.1.3 Vromanův efekt

Již víme, že narůstání vícevrstvých proteinů na površích je termodynamicky nepříznivé. Části proteinové vrstvy vystavené vůči okolnímu roztoku mohou jednat jako druh „oteklé“ hydrofilní vrstvy, čímž je adsorpce dalších proteinů k povrchu opět termodynamicky nepříznivá. Kompetitivní adsorpce se stává rozhodujícím faktorem v buněčné odpovědi, jakmile je proteinem potažený povrch umístěn do kontaktu s buněčným kultivačním médiem, který je často obohacen směsicí více než 400 různých proteinů (*Alberts a kolektiv, 2002*). Povrchová koncentrace adsorbovaných proteinů z plasmové či modelové proteinové směsice závisí na jejich relativní abundanci a afinitě vůči povrchu (*Fabriziushoman a Cooper, 1991; Horbett, 1996; Slack a Horbett, 1988; Bale a kolektiv, 1989; Green a kolektiv, 1999*). V průběhu času je kompozice adsorbované proteinové vrstvy podrobená dynamické změně. Na počátku hrají hlavní roli menší proteiny s rychlejší difuzí a převládající funkcí, například albumin, které jsou následně nahrazeny molekulami s vyšší afinitou vůči

povrchu. Tento efekt je znám také jako takzvaný Vromanův efekt (*Vroman a Adams, 1986; Wertz a Santore, 1999; Slack a Horbett, 1995; Jung a kolektiv, 2003; Krishnan, Siedlecki a Vogler; 2004*). Na straně druhé, buňky aktivně přetvářejí jejich extracelulární prostředí na základě exprese proteinů nebo jejich odstraněním proteolýzou (*Brown a kolektiv, 1993; Werb, 1997; Grinnell, 1986; Nelson a kolektiv, 2003*). Ačkoliv může chemisorpce proteinů, například prostřednictvím procesu síťování biomolekul k matrixu (*Fink a kolektiv, 2007; Ito a kolektiv, 2005*), stabilizovat adsorbovanou vrstvu proti kompetitivnímu nahrazení v buněčném kultivačním médiu, proteolýza a vyplývající degradace biofunkčního povrchového povlaku zůstává otázkou v řízení interakcí mezi buňkou a povrchem.

5.4.2 Přímé a nepřímé vzorování

Jednoduše řečeno, je třeba mít neustále na paměti, že se kompozice proteinového filmu interagujícího s buňkami *in vitro*, a ještě více s buňkami *in vivo*, obecně liší od kompozice počátečních, depozitně fyzisorbovaných proteinů, především za předpokladu, že jsou prováděny dlouhodobé experimenty. Nicméně, povrchové filmy na bázi proteinu často ukazovaly poskytnutí uchvatných základů pro experimenty zahrnující buněčnou adhezi, ve kterých však precizní řízení interakcí mezi buňkou a povrchem nehraje klíčovou roli.

Většina studií týkajících se proteinů zprostředkovávajících buněčnou adhezi může být kategorizována do jednoho ze dvou základních konceptů pro strukturování takzvaných buněčných adhezních ostrovů. Za prvé se jedná o takzvané nepřímé vzorování, ve kterém je povrch odmítající přítomnost proteinu lokálně „otevřen“, a tím jsou tedy plochy daného povrchu náchylné k proteinové adsorpci. Vzorování je nepřímo dosaženo následující depozicí proteinů, a to buď preinkubací s roztokem proteinů, přičemž jsou nejvíce prominentními fibronectin, vitronektin a laminin, anebo adsorpcí ze séra doplněného buněčným kultivačním médiem během takzvaného buněčného setí. Za druhé se jedná o vzorování přímé. Buněčné adheze zprostředkované proteiny jsou v tomto případě přímo umístěny na povrch, který je již proteinu rezistentní (*Petersen a kolektiv, 2010*).

5.4.3 Peptid dekorativní povrchy pro prostorově řízenou buněčnou adhezi

Nyní bude řeč zavedena na takzvané peptid dekorativní povrchy pro prostorově řízenou buněčnou adhezi. Další zajímavá cesta směřující k řízení adheze živých buněk je představena takzvanými rozpoznávacími místy na povrchu, namísto celých, nespecificky adsorbovaných proteinů. Je samozřejmé, že toto „uvedení alias rozložení“ proteinů extracelulární matrix do jejich funkčních komponentů nabídne pouze minimalistickou, a tedy omezenou reprodukci přirozeného prostředí buněk *in vivo*. Nicméně, strategie využít odlišné peptidové zbytky pro přímé zprostředkování buněčného připevnění, má potenciál k vytvoření vysoce definovaných modelových systémů pro buněčnou adhezi, což právě zvýší naše porozumění základních mechanismů v oblasti interakcí mezi buňkou a substrátem. Kromě chemické identity peptidů, nám známé aminokyselinové sekvence, je klíčovým parametrem pro taková vyšetřování a různé výzkumy presence vazných ligandů k buňce.

V posledních třech desetiletích byly vytvořeny modelové povrchy tak, aby umožňovaly rozdílné stupně řízení nad presencí a hustotou povrchových funkčních skupin. Ukázkovým příkladem těchto modelových povrchů by mohly být náhodně rozmístěné peptidy v polymerních maticích (hydrogely) vedoucích až k vysoce uspořádaným systémům – ku příkladu mluvíme o již zmíněných „samouspořádaných monovrstvách“ (někdy též označovaných pojmem „vlastní montáž“) peptidových amphiphiles, anebo takzvaných hvězdných polyethylenglykolových sestavách.

Závisející na aplikacích v nynější době mohou vědci vybrat systém, který splní jejich požadavky, jež se týkají řízení interakcí, dlouhodobé stability buněčného vedení, jednoduchosti syntéz a techniky povlaků. Některé metody ovšem zahrnují i funkce s ohledem na specifické vazby k daným integrinům a také na dlouhodobou stabilitu produkovaných povrchových vlastností. Musíme mít na paměti, že za účelem zajištění exkluzivních interakcí buňky s příslušnými rozpoznávacími místy na površích, a nikoli s nespecificky adsorbovanými proteiny, musí mít matrix takzvané protein odpuzující vlastnosti (*Petersen a kolektiv, 2010*).

5.4.3.1 Zavedení funkčních skupin do polymerní matrix

Silná vazba adhezních skupin k polymerní matrix je předpokladem k poskytnutí mechanicky a chemicky stabilního prostředí pro buněčnou adhezi odolávající značným kontraktilním silám, působících v mnoha buněčných typech (*Katz a kolektiv, 2000; Pelhalm a Wang, 1998; Choquet, Felsenfeld a Sheetz, 1997*). Mimoto, buňky mohou aktivně remodelovat jejich extracelulární prostředí redistribucí nebo internalizací malých a mobilních ligandů (*Grinnel a Feld, 1981; Katz a kolektiv, 2000; Choquet, Felsenfeld a Sheetz, 1997; Castel a kolektiv, 2001; Zamir a Geiger, 2001; Memmo a McKeown-Longo, 1998; Gaebel a Feuerstein, 1991*). Mnoho chemiků zastává názor v kovalentním připojení krátkých peptidových sekvencí k polymernímu povrchu (*Hersel a Kessler, 2003; Tirrell, Kokkoli a Biesalski, 2002*). Nejčastěji je již peptid naroubován k povrchu odpuzujícího protein v post – syntetickém modifikačním kroku, především pomocí jeho aminu a koncové skupiny karboxylové kyseliny, a to na základě konjugačních chemických prostředků či fotoaktivních linkerů (například se jedná o benzofenon či aromatický azid uvedený do funkční činnosti pomocí peptidů). Zavedení vhodných funkčních skupin do polymerního prostředí může být dosaženo kombinací, doslova smícháním polymerů majících funkční skupiny se základním polymerem, dále kopolymerací, anebo chemickou i fyzikální úpravou povrchu odpuzujícího protein, jako je ku příkladu alkalická hydrolyza, redukce nebo oxidace, takzvaný track – etching, anebo plasmová depozice (*Biesalski, Tu a Tirrell, 2005; Biesalski a kolektiv, 2006*).

5.5 STRUČNÝ SOUHRN K DANÝM INTERAKCÍM

Precizní řízení interakcí mezi umělým povrchem a biologickým prostředím představuje klíčovou výzvu z hlediska úspěšných souher dvou světů – biologického a synteticky technologického. Ku příkladu se takzvané live – cell biočipy stávají stále více zajímavou tematikou v obou zmíněných světech. Navíc lze říci, že se průmysl v důsledku obrovského počtu potenciálně zajímavých aplikací rozvíjí od hlediska farmaceutického, přes stále se rozvíjející biosenzory, až po biofyzikální modelové systémy.

Požadavky, které jsou představovány pro povrchové úpravy (mluvíme v tomto případě o povlacích na povrchu), jsou náročné. Povrchy tedy musí poskytovat takové prostředí, která jsou sice inertní k buněčné adhezi, ale zároveň povolují, podporují a udržují adhezi živých buněk, a to vše může způsobit problém v definování daného prostředí, jak již bylo zjištěno v buněčné kultuře.

Je již od přírody dáno, že proteiny anebo dokonce krátké peptidové ligandy, které jsou „navzorkovány“ na povrchu, jsou využity k provedení buněčné adheze. Obě strategie, tedy proteinem a peptidem zprostředkované buněčné adheze, nabízí zřetelné výhody – ať už, co se týče adheze mezi buňkou a extracelulární matrix, pokud jde o proteiny, ať už, co se týče precizního řízení interakce mezi integrinem a ligandem, pokud se jedná o peptidy. Další faktor zaujímající naše myšlenkové pochody spočívá ve vědeckém experimentování s ohledem na tvorbu povrchů, které odolávají nespecifické proteinové adsorpci, a tedy zabraňují nežádoucí, proteinem zprostředkované buněčné adhezi. Ku příkladu se jedná o polymerní kartáče, k povrchu připevněné hydrogely, a hydrofilní, nenabitě polymerní monovrstvy.

Optimální kombinace buněk, které „mají rády“ povrchové modifikace a buněk, jež „odmítají“ povrchové modifikace, eventuelně závisí na jednotlivých aplikacích. V každém případě jsme svědkem obrovského počtu velmi slibných designových strategií a úspěšných integrací týkajících se stále přicházejících technologických mikrozařízení. S ohledem na již zmíněné – perzistence povlaků *in vitro*, exaktní řízení interakcí mezi buňkou a povrchem, a schopnost vyvolání a porozumění „normálního“ buněčného chování takzvaného „on – chipu“, jsou nanejvýše důležité a je třeba je v budoucnu pokrýt extenzivními a komparativními studiemi (*Petersen a kolektiv, 2010*).

6 PLASMOVÁ ÚPRAVA

Vzhledem k mnohým rozdílným biomedicínským materiálům a implantátům, jakož i rozdílným buňkám, tkáním a proteinům, neexistuje žádné universální řešení všech problémů, a tedy buněčná adheze, antibakteriální a protihnilobní vlastnosti musí být přizpůsobeny každé specifické potřebě. Jak již bylo dříve uvedeno, společnou a základní strategií je použití materiálu s vhodnými objemovými vlastnostmi a také úprava povrchových vlastností pro splnění daných požadavků. Biomedicínské polymery jsou excelentními kandidáty pro tento „výzkum“ (*Ikada a Tsuji, 2000*). Plazmová povrchová modifikace je velmi výhodná a všestranná technika, u níž nedochází ke změně objemových vlastností (*Desmet a kolektiv, 2009; Ho a kolektiv, 2006; Shen a kolektiv, 2007*).

Jen pro zajímavost můžeme říci, že kromě různých plazmových modifikačních strategií existují také neplasmatické strategie, založené na vazbě chemických funkčních skupin či imobilizaci proteinů (*Jiao a Cui, 2007; Cao a kolektiv, 2007; Chong, Lee a Teoh, 2007; Choong, Hutmacher a Triffitt, 2006*). Nicméně, tyto metody mohou být méně specifické a reprodukovatelné, poněvadž způsobují degradaci, nepravidelné leptání, a produkují chemický odpad (*Gatenholm, Ashida a Hoffman, 1997; Yu a kolektiv, 2007; Goda a kolektiv, 2008; Shim a kolektiv, 2001*).

6.1 Plazmové strategie – termální a netermální

Je známo, že v přírodě existují tři základní stavy hmoty – pevné, kapalné a plynné. Ale málo kdo ví, že plasma je často považována za čtvrtý stav hmoty. Plasma představuje kvazineutrální, ovšem silně vodivý ionizovaný plyn, který se vyskytuje ve vesmíru z více jako 99 % (*Hudeček a Sedláček, [b.r.]*). Jedná se o nabitou směs a navíc se zde nachází i neutrální částice, jako jsou atomy, molekuly, ionty, elektrony, radikály či fotony. Rozdělujeme dvě hlavní kategorie, a to termální a netermální plasmu (*Bogaerts a kolektiv, 2002*). Termální plasmu mající teplotu 9 700 stupňů Celsia nelze použít pro povrchovou úpravu polymerů z důvodu její vysoké teplotě plynu. Nicméně, netermální plasma s teplotou v intervalu 27 – 730 stupňů Celsia (*Hudeček a Sedláček, [b.r.]*) má mnohem nižší teplotu plynu, ale relativně vysokou teplotu elektronů. Tento druh plasmy nezpůsobí termální poškození povrchu materiálů citlivých na teplo, ačkoliv reaktivní druhy v netermálním plasmatu

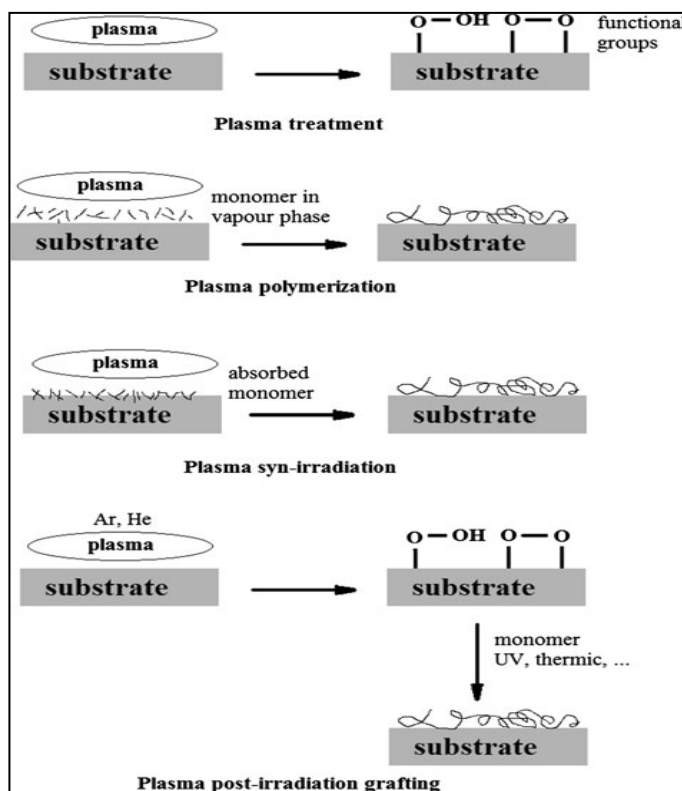
mohou zapříčinit chemické a fyzikální povrchové modifikace (*Zenkiewicz, Rytlewski a Malinowsky, 2011*).

6.2 Plasmová polymerace – úvod

Plasmová polymerace je depoziční technika spočívající v zavedení plynného a kapalného monomeru do plasmového výboje, a převedení jej v reaktivní fragmenty (*Morent a kolektiv, 2011; De Geyter a kolektiv, 2011; Morent a kolektiv, 2009; Morent a kolektiv, 2009*). Tyto reaktivní fragmenty mohou reagovat s povrchem, přičemž dochází ke vzniku takzvaného plasmového polymerního povlaku, který má jedinečné fyzikální a chemické vlastnosti. Povlaky jsou zpravidla bez „děr“, vysoce síťované a tedy nerozpustné, termálně stabilní, mechanicky a chemicky inertní. Často jsou tyto filmy vysoce koherentní a adherentní k různým substrátům zahrnující konvenční polymer, sklo a kovové povrchy (*Arefi a kolektiv, 1992*).

6.2.1 Plasmová polymerace – princip

Pojďme se nyní podívat konkrétně na způsob provedení plasmové polymerace. Raději než zavedení samotného monomeru do plasmy, jak bylo řečeno v předchozí části, může být monomer prvně adsorbován do substrátu, který je poté podroben procesu oplasmování. Plasma následně vytváří ve vrstvě monomeru a na povrchu substrátu povrchové radikály, což má právě za následek síťovaný polymer v horní vrstvě. Tento proces je znám pod názvem plasma syn – irradiation (*Desmet a kolektiv, 2009*). Dochází – li k ukládání plasmového polymeru v plasmové polymeraci anebo v procesu plasma syn – irradiation, dochází tím k přímému vystavení monomeru plasmě. Nicméně, je také možné nejprve aktivovat a „uvést do oběhu“ povrch s plasmovou úpravou. Vyvolané funkce mohou být následně využity pro iniciaci polymerační reakce tím, že se povrch nachází v kontaktu s monomery v plynné či kapalně fázi (*Vasilets a kolektiv, 1997*). Poněvadž monomer není podroben plasmě, roubovaný polymer bude mít stejnou kompozici jako polymery získané na základě procesů konvenční polymerace. Tato dvoustupňová metoda je nazvána jako plasma post – irradiation grafting. Na následujícím obrázku č. 12 lze spatřit různé modifikované strategie.



Obrázek č. 12: Schematická reprezentace rozdílných plasmových modifikovaných strategií (Zenkiewicz, Rytlewski a Malinowsky, 2011)

Jen pro zajímavost – v dnešní době je k dispozici široká řada plasmových zdrojů pro různé plasmové povrchové modifikace. Ku příkladu mluvíme o radio – frekvenčním výboji, dielektrických překážkových výbojích, takzvané plasmě doutnavého výboje, či mikrovlnné plasmě (Conrads a Schmidt, 2004; Tendero a kolektiv, 2008).

6.3 Výhody plasmové povrchové modifikace

I když posledně zmíněné metody se ukázaly být cennými i navzdory jejich nebezpečnosti, plasmová povrchová modifikace má řadu výhod, které způsobují, že tato technologie je úchvatným kandidátem pro polymerní materiálové úpravy. V prvním případě tato technologie nevyžaduje žádná nebezpečná a riziková rozpouštědla. V případě druhém se zde nenachází žádné ovlivnění objemových vlastností či způsobení degradace. Mimoto, může být tato metoda jednotně využita k úpravě složitých tvarových struktur. Na základě této plasmové techniky je také možná depozi-

ce povlaků a imobilizace bioaktivních molekul. Je tedy zřejmé a jasné, že plasmová modifikace biomedicínských polymerů má obrovský potenciál, a v budoucnu bude stále předmětem zkoumání (*Jacobs a kolektiv, 2012*).

6.4 Plasmová povrchová úprava zvyšující buněčnou adhezi a proliferaci

Jak již bylo řečeno, plasmová úprava povrchu daného polymeru vyplývá ze zavádění rozdílných chemických skupin na povrch (*Morent, De Geyter a Leys, 2008; Morent a kolektiv, 2008; Siow a kolektiv, 2006*), čímž dochází ke změně povrchových vlastností. Ku příkladu byla hluboce zkoumána a studována buněčná adheze na základě plasmové úpravy povrchu kyseliny polymléčné, překvapivě s uspokojivými výsledky (*Khorasani, Mirzadeh a Irani, 2006; Chu a kolektiv, 1999; Yang, Bei a Wang, 2002; Gugala a Gogolewski, 2006; Wan a kolektiv, 2003*).

6.4.1 Plasmové povrchové úpravy antibakteriálních a protihnilobných povrchů

Nyní bude diskuze zaměřena na plasmovou povrchovou úpravu antibakteriálních a protihnilobných povrchů. Pojem antibakteriální odkazuje na prevenci bakteriální adheze, zatímco pojem protihnilobní představuje obecně více prevence připevnění velikých molekul, mikroorganismů a buněk. Prevence bakterií a proteinové adheze je potřebná v mnoha aplikacích, jako například medicínské implantáty, nitrooční čočky, katetry a materiály přicházející do styku s krví (*Desmet a kolektiv, 2009; Chu a kolektiv, 2002*). Jakmile je implantát umístěn do těla, jak buňky okolní tkáně, tak i bakterie se účastní „souboje“ o navázání na povrch. Tento proces se nazývá „závod o navázání na povrch“ (*Gristina, 1978*). Pokud tkáňové buňky vyhrají závod, povrch daného implantátu je pokryt tkání. V případě opačném, tedy, pokud vyhrají bakterie, povrch bude pokryt biofilmem, a důsledkem může být zánětlivá reakce, a odstranění implantátu může být i nutné (*Subbiahdoss a kolektiv, 2009*).

6.4.1.1 Plasmové povrchové úpravy – antibakteriální povrchy

Několik vědeckých skupin zkoumalo plasmu vytvořenou antibakteriálním povrchem lékařského stupně polyvinylchloridu, aby byla aplikována a použita jako endotracheální trubice (*Triandafillu a kolektiv, 2003; Balazs a kolektiv, 2003; Balazs a kolektiv, 2004; Asadinezhad a kolektiv, 2010; Asadinezhad a kolektiv, 2010; Zhang a kolektiv, 2006*). Takzvaného kyslíku doutnavého výboje bylo použito k modifikaci malých „kupónů“ z polyvinylchloridu, aby se zabránilo adhezi mnoha kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (*Triandafillu a kolektiv, 2003; Balazs a kolektiv, 2003*). Úprava způsobila vytvoření více hydrofilního povrchu, a navíc bylo pozorováno 57 až 70 % redukce v adhezi bakterií. Právě tato redukce se stala věruhodnou z důvodu přičtení a začlenění kyslíkatých funkčních skupin. Nicméně, autoři uvádí, že je nepravděpodobné, že tento efekt bude dostatečný a vhodný k oddálení nebo zábraně tvorby biofilmu. Podle těchto autorů je tedy zřejmé, že k poskytnutí antibakteriálních vlastností na površích je nezbytný obsah stříbra (*Balazs a kolektiv, 2004*).

6.4.1.2 Plasmové povrchové úpravy – protihnilobní povrchy

Stejně jako antibakteriální povrchy, tak i povrchy protihnilobní mohou být jednoduše vytvořeny pomocí plasmových technologií. Jak již bylo řečeno, základem je krok jednotné plasy, tak i krok plasmového předčištění, následující polymerace, roubování a povlak. Totéž platí i zde, u protihnilobních povrchů. Někteří autoři studovali roubování polyethylenglykolu na površích, z důvodu vytváření protihnilobních vlastností. Roubování polyethylenglykolu na polyethylentereftalát omezuje adhezi makrofágů, jako jsou lidské leukocyty (*Ademovic a kolektiv, 2006*), zatímco roubování polyethylenglykolakrylátu na polypropylen ukázalo snížení adsorpce fibrinogenu z téměř 85 % (*Zanini a kolektiv, 2009*). Roubování polyethylenglykolu na plasmový allylamin polymerizovaných na silikonových deskách zabránilo adsorpci enzymu pod názvem „křenová peroxidáza“ a kolagenu (*Cole a kolektiv, 2007*), zatímco roubování na plasmaticky modifikovaný polydimethylsiloxan může být zabráněno adsorpcí avidin proteinu (*Geissler a kolektiv, 2010*).

Uvedme si další příklad. Skupina Timmons vyvinula, a zároveň rozvinula protihnilobní povlaky ethylenoxidu pomocí pulsní plasmové polymerace (*Wu a kolektiv, 2002; Beyer a kolektiv, 1997*). Zjistili, že velmi krátké řetězce upraveného povrchu polyethylenoxidu jsou z biologického hlediska bez zablokování, a jakéhokoliv zanášení.

6.4.1.2.1 Zdokonalení krevní kompatibility

U materiálů, které přijdou do kontaktu s krví, jsou nezbytné k dosažení dobré krevní slučitelnosti a snížení možnosti vzniku trombózy, minimální interakce s biologickým prostředím (*Sevast'yanov, Vasilets; 2009*). Takovým ukázkovým příkladem je polytetrafluorethylen používaný v oftalmologii, endoskopii či kardiologii. Plasmová úprava pomocí kyslíku, argonu, dusíku a amoniaku polytetrafluorethylenu by mohla významně snížit adhezi krevních destiček (*Rhodes, Wilson a Williams; 2007*). Dokonce bylo studováno i zdokonalení hemokompatibility polyethylentereftalátu na základě plasmové modifikace (*Topala, Dumitrascu a Pohoatoa, 2007; Want a kolektiv, 2006; Kumar a kolektiv, 2007*). Dalším možným příkladem může být následující případ. Jedná se o kombinovanou plasmovou polymeraci acetyleny potřebnou k získání uhlíku, následovanou plasmovou úpravou amoniaku, spojená s depozicí heparinu, což by mohlo vést ke zvýšení doby koagulace krve o faktor deset (*Steffen, Schmidt a Gonzales-Elipe; 2000*). Množství imobilizovaného heparinu na povrchu vedlo však ke zřejmé korelaci s dobou koagulace. Úpravy pomocí héliové plasmy (*Topala, Dumitrascu a Pohoatoa, 2007*) a plasmy acetylenové (*Want a kolektiv, 2006*) zvýšily dobu srážení a snížily adhezi krevních destiček a aktivaci. Plasmová polymerace polyethylenglykolu také vede k povrchu, který je méně trombogenní vzhledem k omezení adheze a agregace krevních destiček (*Kumar a kolektiv, 2007*). Také úprava dusíkovou radio – frekvenční plasmou polyetherurethanu by mohla omezit dobu srážení (*Wilson, Rhodes Williams, 2003*), zatímco povrch polydimethylsiloxanu aktivovaný pomocí argonové plasmy a roubovaný na základě polyethylenglykolumethylmetakrylátu neprokázal žádnou zvýšenou krevní kompatibilitu (*Pinto a kolektiv, 2010*).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 MATERIÁL A METODIKA

7.1 Použité přístroje

V rámci experimentální části byly využity následující přístroje: biologický inkubátor Heracell 150i (*ThermoScientific, USA*), zajišťující konstantní podmínky pro kultivaci buněk – stabilní relativní vlhkost, 5% koncentraci oxidu uhličitého a stálou teplotu 37,0 °C; světelný inverzní mikroskop s fázovým kontrastem (*Olympus CKX 41, Japan*) sloužící pro pozorování buněk; ultracentrifuga Eppendorf 5702 R (*Eppendorf, Německo*); spektrofotometrický, mikrotitrační přístroj pro měření absorbance Sunrise (*Tecan, Švýcarsko*) k vyhodnocení MTT testu.

7.2 Použitá buněčná linie

Jedinou buněčnou linií, jež byla využita v rámci našich experimentů, byla linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL – 1658). Jako kultivační médium bylo využito Dulbecco's Modified Eagle Medium (*PAA Laboratories GmbH, Rakousko*; DMEM, viz obrázek č. 13), což je modifikace Basal Medium Eagle (BME), které je široce využíváno pro kultivaci mnoha rozdílných savčích buněk. Buňky, jež jsou úspěšně kultivovány v tomto médiu, zahrnují primární fibroblasty, neurony, gliové buňky či buňky hladkého svalstva stejně tak, jako buněčné linie HeLa, 293, Cos-7 anebo PC-12 (*Thermo Fisher Scientific Inc, 2014*). Jedná se o médium obsahující až čtyřnásobnou koncentraci aminokyselin a vitamínů oproti ostatním druhům médií, u nichž koncentrace zmíněných látek může být podstatně menší (viz níže). Původní formy tohoto média obsahovaly 1000 mg · l⁻¹ glukózy s využitím pro kultivaci embryonálních myších buněk. Díky zvýšené koncentraci glukózy až na 4500 mg · l⁻¹ obdrželo toto médium název „DMEM/High“ (*Sigma-Aldrich Co.LLC, 2014*). V našem případě médium pro kultivace buněk obsahovalo dle návodu 10 % telecího séra a 100 μg · ml⁻¹ antibiotika Penicillin/Streptomycin (*PAA Laboratories GmbH, Rakousko*).



Obrázek č. 13: Ukázka jednoho z mnoha variant Dulbecco's Modified Eagle Medium (*Thermo Fisher Scientific Inc, 2014*)

7.3 Plasmová úprava

Mikrotitrační destičky s polyanilinovými filmy byly upraveny v plasmovém reaktoru, a to: a) V atmosféře vzduchu; b) V atmosféře vzácného inertního plynu, konkrétně argonu. Podmínky oplasmování jsou uvedeny v následující tabulce č. 1. Podmínky byly shodné pro atmosféru vzduchu i argonu.

Vysokofrekvenční reaktor (HFR):	40 kHz
Doba působení plasmatu:	1 min
Výkon:	50 W
Průtok:	10 SCCM

Tabulka č. 1: Nastavení plasmového reaktoru pro modifikaci polyanilinových filmů

7.4 Příprava vzorků

Polyanilinová sůl (PANI – S), přítomná na mikrotitračních destičkách (*TPP, Švýcarsko*), byla připravena v laboratoři buněčných kultur na Centru polymerních materiálů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, a to dle metodiky IUPAC (*Stejskal a Sapurina, 2005*).

Bovinní sérový albumin (BSA; *PAA Laboratories GmbH, Rakousko*) byl použit jakožto modelový systém vlivu sérového albuminu na polyanilinové filmy. Specifikace BSA jsou uvedeny v tabulce č. 2. Normální koncentrace lidského sérového albuminu se nachází okolo $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. U BSA, jakožto modelového systému, jsme vycházeli ze stejné koncentrace. V rámci preliminárních testů byla využita široká škála koncentrací BSA. Po zhodnocení prvních výsledků byly pro další testy vybrány pouze limitující koncentrace (tabulka č. 3).

Bovine Serum Albumin Fraction V (<i>PAA - The Cell Culture Company</i>)	
Cat No:	K41-001
Lot No:	K00110-1082
Volume:	100 g

Tabulka č. 2: Údaje týkající se BSA využitého v daném experimentu

Vzorek	Plasmová úprava	Koncentrace BSA [mg · ml ⁻¹]
PANI-S	Ne	0
PANI-S-V	Atmosféra vzduchu	0
PANI-S-Ar	Atmosféra argonu	0
PANI-S-V-50	Atmosféra vzduchu	50
PANI-S-Ar-50	Atmosféra argonu	50
PANI-S-V-40	Atmosféra vzduchu	40
PANI-S-Ar-40	Atmosféra argonu	40
PANI-S-V-30	Atmosféra vzduchu	30
PANI-S-Ar-30	Atmosféra argonu	30
PANI-S-V-20	Atmosféra vzduchu	20
PANI-S-Ar-20	Atmosféra argonu	20
PANI-S-V-10	Atmosféra vzduchu	10
PANI-S-Ar-10	Atmosféra argonu	10
PANI-S-V-5	Atmosféra vzduchu	5
PANI-S-Ar-5	Atmosféra argonu	5

Tabulka č. 3: Základní hodnoty BSA aplikované do jamek mikrotitračních destiček

7.5 Stanovení viability buněk

MTT test je využíván ke stanovení viability buněk. Jedná se o spektrofotometrickou metodu založenu na redukci žlutého solubilního (3-(4,5-dimethylthiazolu-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromidu) na nerozpustné intracelulární modré krystaly hvězdicovitých tvarů, formazan. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a jeho obsah se detekuje jako absorbance při vlnové délce 570 nm. Hodnota absorbance roztoku poté odpovídá životaschopnosti jednotlivých buněk. Platí – čím vyšší absorbance, tím vyšší procentuální zastoupení viabilních buněk.

MTT test byl proveden po 72 hodinách kultivace buněk na testovaných površích. MTT bylo aplikováno v koncentraci $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ kultivačního média. Po uplynulých 4 hodinách bylo odebráno mikropipetou $40 \mu\text{l}$ roztoku (daný obsah byl ovšem ponechán v mikropipetě a po odsátí zbytného suspenzního roztoku byl opět navrácen na své původní místo v jamce). Nato bylo mikropipetou přidáno $80 \mu\text{l}$ dimethylsulfoxidu. A posledním krokem tohoto testu bylo po 15 minutách působení dimethylsulfoxidu měření průměrné absorbance spektrofotometrickým přístrojem Sunrise (*Tecan, Švýcarsko*). Na základě tohoto faktu jsme získali množství zredukovaného modrofialového formazanu a tím pádem i procentuální zastoupení viabilních buněk.

7.6 Scratch assay

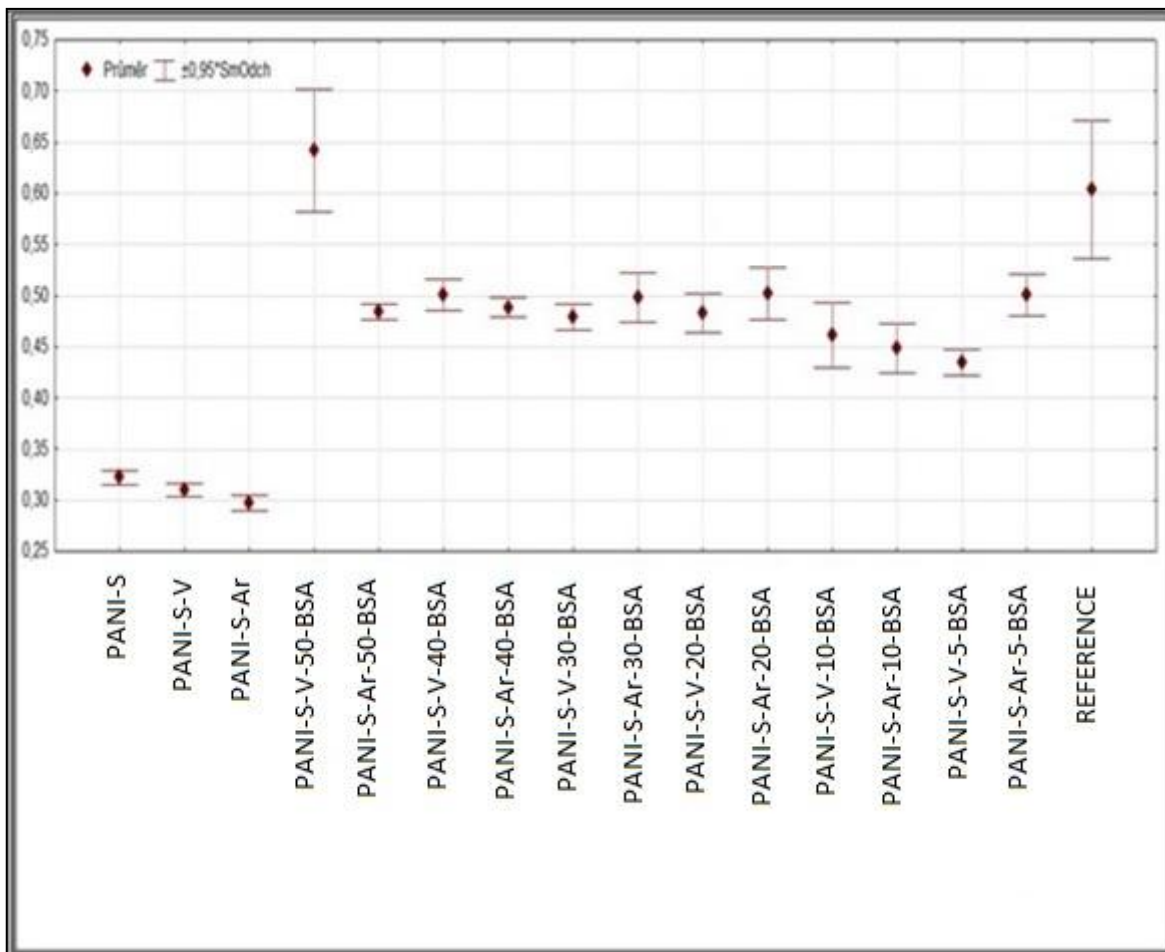
Scratch assay je metoda simulující proces buněčná migrace a proces hojení. Buňky byly kultivovány na polyaniliových filmech do stavu, kdy pokrývaly 90 % povrchu. Následně byla část buněk odstraněna pomocí mikropipety, a to tak, aby vznikla „viditelná čára“. Buňky se následně nechaly růst a průběžně byly pořizovány fotografie dokumentující zarůstání a migraci buněk do prostoru. V našem případě se tato metoda prováděla pouze na vybraných vzorcích – konkrétně čisté PANI-S, a oplasmovené PANI-S s přísadkou BSA o koncentracích 30, 40 a $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

8 VÝSLEDKY

Základním cílem práce bylo zkoumání adheze, proliferace a migrace buněk buněčné linie myších fibroblastů (NH3/3T3) na povrch nativního a modifikovaného polyanilinu. V práci byla použita protonovaná forma polyanilinu, emeraldinová sůl (PANI-S). Polystyrenové mikrotitrační destičky obsahující polyanilinovou sůl byly oplasmovány v atmosféře vzduchu (PANI-S-V) či inertního plynu argonu (PANI-S-Ar), ale to není vše. Nesmíme zapomenout na následovnou aplikaci BSA na oplasmované povrchy (PANI-S-V-koncentrace BSA; PANI-S-Ar-koncentrace BSA). Posledním testem provedeným v naší praktické oblasti byl test vlivu migrace buněk.

8.1 Stanovení buněčné viability

Vyhodnocení buněčné viability bylo provedeno pomocí statistického testu, konkrétně T – testu. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 5, č. 6 a č. 7. V grafu č. 1 jsou poté pro přehlednost uvedeny průměrné absorbance a jejich směrodatné odchylky. Z grafu je patrné, že existují výrazné rozdíly mezi čistým polyanilinem, upraveným v plasmě, a vzorky, na které byl aplikován BSA. Zároveň je možno pozorovat, že mezi různými použitými koncentracemi BSA není výrazný rozdíl v absorbanci.



Graf č. 1: Průměrná absorbance jednotlivých úprav polyanilinu

U PANI-S a PANI-S-V byly detekovány hodnoty průměrné absorbance přibližně stejné. V případě PANI-S se jedná o hodnotu $0,3221 \pm 0,0079$, v případě PANI-S-V poté $0,3097 \pm 0,0072$, což ve srovnání s referencí jsou tyto hodnoty přibližně o polovinu menší. Hodnota průměrné absorbance reference činí $0,6039 \pm 0,0706$. Za předpokladu využití inertního plynu platí, že hodnota průměrné absorbance u PANI-S-Ar dosahuje $0,2971 \pm 0,0082$. Na posledním zmíněném případě si můžeme všimnout, jak viabilita buněk dosahuje nejmenší hodnoty, a to 49,19 %, ve srovnání s referencí.

V případě aplikace BSA do jamek kultivačních mikrotitračních destiček dochází k razantním změnám. Výrazný pozitivní vliv je v případě PANI-S-V-50-BSA, kdy průměrná hodnota absorbance $0,6425 \pm 0,0629$ je vyšší než v případě reference $0,6039 \pm 0,0706$, a dosahuje tedy 106% reference. Ovšem tento rozdíl, jako jediný, není staticky průkazný (tabulka č. 5) ($p \doteq 0,3305$). Viabilita buněk je zde vyšší než 100 % – žádný cytotoxický efekt zde nenastává, ba naopak. V tabulce č. 5 jsou uvedeny také rozdíly ostatních povrchových úprav polyanilinu ve srovnání s referencí. Jak je patrné z procentuálního vyjádření viability i ze statistického vyhodnocení, tak jednotlivé koncentrace BSA neovlivňovaly výrazně růst buněk. Procentuálně rostly na všech úpravách s výjimkou výše uvedených (PANI-S, PANI-S-V, PANI-S-Ar a PANI-S-V-50-BSA) v rozmezí 70 % – 83 % ve srovnání s referencí. Ačkoliv statistické vyhodnocení poukazuje na průkazné rozdíly ve viabilitě při srovnání jednotlivých úprav s referencí, tak vyhodnocení dle ISO odpovídá necytotoxickému, případně slabě cytotoxickému efektu.

Je tedy možno konstatovat, že v případě vzorků PANI-S, PANI-S-V a PANI-S-Ar buňky na daném povrchu hůře proliferují. Otázkou zůstává, zda – li by stejný výsledek byl i v případě jiné buněčné linie. Nicméně, u ostatních vzorků se viabilita pohybuje v rozmezí 70 % – 83 %, což jsou hodnoty ve srovnání s předešlými o mnohem lepší.

Hodnota	Určení cytotoxického efektu dle ISO 10 993
> 80 %	Necytotoxický efekt
60 % – 80 %	Slabá cytotoxicita
40 % – 60 %	Střední cytotoxicita
< 40 %	Silná cytotoxicita

Tabulka č. 4: Vyhodnocení cytotoxického efektu dle ISO 10 993

Vzorek	Průměr ± SO	<i>p</i>	Viabilita [%]
PANI-S	0,3221 ± 0,0079	0,0000	53,33
PANI-S-V	0,3097 ± 0,0072	0,0000	51,27
PANI-S-Ar	0,2971 ± 0,0082	0,0000	49,19
PANI-S-V-50-BSA	0,6425 ± 0,0629	0,3305	106,38
PANI-S-V-40-BSA	0,4846 ± 0,0078	0,0037	80,24
PANI-S-V-30-BSA	0,5005 ± 0,0157	0,0100	82,86
PANI-S-Ar-50-BSA	0,4881 ± 0,0100	0,0046	80,82
PANI-S-Ar-40-BSA	0,4794 ± 0,0133	0,0027	79,38
PANI-S-Ar-30-BSA	0,4981 ± 0,0258	0,0091	82,48
PANI-S-V-20-BSA	0,4833 ± 0,0203	0,0036	80,02
PANI-S-V-10-BSA	0,5018 ± 0,0266	0,0114	83,09
PANI-S-V-5-BSA	0,4609 ± 0,0334	0,0010	76,31
PANI-S-Ar-20-BSA	0,4487 ± 0,0253	0,0004	74,3
PANI-S-Ar-10-BSA	0,4344 ± 0,0135	0,0002	71,92
PANI-S-Ar-5-BSA	0,5010 ± 0,0215	0,0106	82,96
REFERENCE	0,6039 ± 0,0706		

Tabulka č. 5: Vyhodnocení rozdílu viability buněk na různých površích dle T – testu a ISO 10 993

Na následujících dvou tabulkách (tabulky č. 6 a 7) je uvedeno srovnání vzorků upravených plasmou (PANI-S-V a PANI-S-Ar) oproti vzorkům s přidaným BSA (rozdílné koncentrace u PANI-S-V-BSA i PANI-S-Ar-BSA). V tabulce č. 6 jsou uvedeny hodnoty absorbance oplasované vzácným plynem argonem, zatímco v tabulce č. 7 mluvíme o oplasování vzduchem. Zde jsi opět, u obou případů, můžeme všimnout, jak přídavek BSA podstatně ovlivnil průměrné hodnoty absorbancí. Průkazný rozdíl je patrný u srovnání všech vzorků s BSA oproti vzorkům podrobeným pouze plasmové úpravě.

Vzorek	Průměr ± SO	<i>p</i>
PANI-S-Ar-50-BSA	0,4881 ± 0,0100	0,0000
PANI-S-Ar-40-BSA	0,4794 ± 0,0133	0,0000
PANI-S-Ar-30-BSA	0,4981 ± 0,0258	0,0000
PANI-S-Ar-20-BSA	0,4487 ± 0,0253	0,0000
PANI-S-Ar-10-BSA	0,4344 ± 0,0135	0,0000
PANI-S-Ar-5-BSA	0,5010 ± 0,0215	0,0000
PANI-S-Ar	0,2971 ± 0,0082	

Tabulka č. 6: Srovnání PANI-S-Ar-BSA oproti PANI-S-Ar

Vzorek	Průměr ± SO	<i>p</i>
PANI-S-V-50-BSA	0,6425 ± 0,0629	0,0000
PANI-S-V-40-BSA	0,4846 ± 0,0078	0,0000
PANI-S-V-30-BSA	0,5005 ± 0,0157	0,0000
PANI-S-V-20-BSA	0,4833 ± 0,0203	0,0000
PANI-S-V-10-BSA	0,2018 ± 0,0266	0,0000
PANI-S-V-5-BSA	0,4609 ± 0,0334	0,0000
PANI-S-V	0,3097 ± 0,0072	

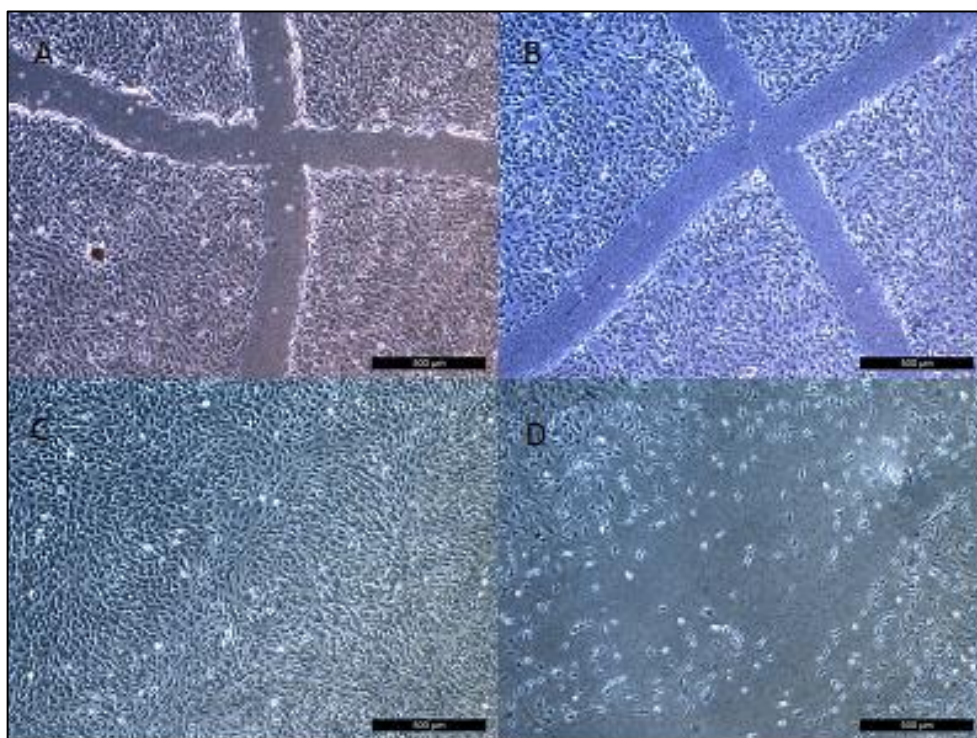
Tabulka č. 7: Srovnání PANI-S-V-BSA oproti PANI-S-V

8.2 Scratch assay

Pomocí metody Scratch assay bylo sledováno uzdravování buněk. Tento test se prováděl na povrchu čisté polyanilinové soli a na povrchu oplasmované polyanilinové soli upravené pomocí BSA. Obrázky 14 A i 14 B představují počátek testu, kdy buňky dosáhly konfluence, a pomocí mikropipety se část buněk porušila vytvořením „viditelné čáry“. Následně byla sledována proliferace buněk. Na obrázcích 14 C i 14 D lze zaznamenat buněčnou proliferaci po 24 hodinách po vytvoření „čáry“. Obrázek 14 C byl vybrán jako zástupce zaznamenávající migraci buněk na povrchu ošetřeném pomocí BSA, zatímco obrázek 14 D zaznamenává migraci buněk na povrchu polyanilinové soli bez jakékoli další úpravy. Po ošetření oplasmovaného po-

lyanilinu (v atmosféře vzduchu či vzácného plynu – argonu) pomocí všech použitých koncentrací BSA, byly buňky schopné během 24 hodin porůst celý povrch a dostat se opět do stavu konfluence. V případě sledování proliferace buněk na povrchu polyanilinové soli bez následného ošetření, rostly ovšem buňky na povrchu v podstatně menší míře, a za 24 hodin byly schopné pokrýt jen velmi malou část povrchu (obrázek 14 D).

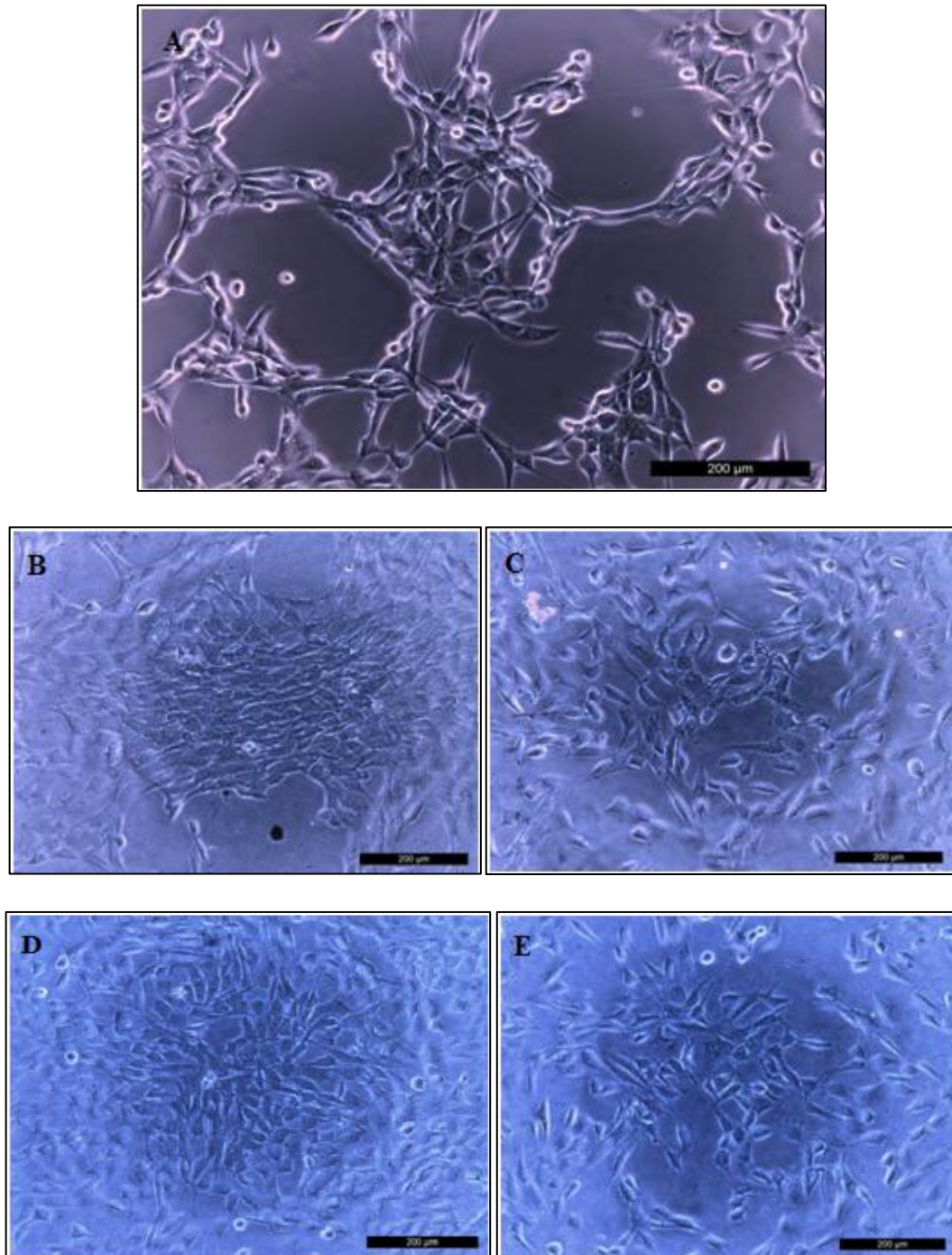
Tyto výsledky potvrzují i výsledky získané pomocí metody MTT testu, kde vzorky, na které byl aplikován BSA v koncentracích 30, 40 a 50 $mg \cdot ml^{-1}$, neprojevily toxický účinek, zatímco buňky kultivované na povrchu PANI-S vykazovaly střední cytotoxicitu.



Obrázek č. 14: Vybrané mikrofotografie ilustrující uzdravování buněčných linií myších fibroblastů (NIH/3T3) při zvětšení 40x, přičemž jednotlivé mikrofotografie zobrazují migraci buněk na površích: A) PANI-S-AR-40-BSA, začátek testu; B) PANI-S, začátek testu; C) PANI-S-AR-40-BSA, 24 hodin; D) PANI-S, 24 hodin.

8.3 Mikrofotografie buněčné linie myších buněk NIH/3T3

Podívejme se nyní na ukázkou jednotlivých naproliferovaných myších buněk na povrchu jamek kultivačních mikrotitračních destiček opatřených oplasmanou polyanilinovou solí (viz obrázek č. 15). Vysvětleno níže:



Obrázek č. 15: Vybrané mikrofotografie buněčných linií myších fibroblastů (NIH/3T3) při zvětšení 200x, přičemž: A) Reference NIH/3T3 – čistá polystyrenová kulturační mikrotitrační destička; B) Mikrotitrační destička s PANI-S-Ar-20-BSA; C) Mikrotitrační destička s PANI-S-Ar-5-BSA; D) Mikrotitrační destička s PANI-S-V-50-BSA; E) Mikrotitrační destička s PANI-S-V-5-BSA.

8.4 Měření kontaktního úhlu

Tato záležitost nebyla hlavním cílem týkající se naší práce. Ovšem z hlediska stručného se na něj zaměříme. Pro tuto problematiku bylo využito metody „The See System“ (*Advex Instruments, Czech Republic*). Testovacími kapalinami byly ethylenglykol (*Sigma – Aldrich*) a dijodomethan (*Sigma – Aldrich*) coby dvě známé deionizované kapaliny. Lze vidět na základě hodnot, že celková povrchová energie je dána součtem disperzní a polární povrchové energie. Ovšem na základě práce s polyanilinovou solí byla uvedena pouze souvislost mezi solí a bázi vodivého polyanilinu. Dané údaje můžete vidět v tabulce č. 8:

Vzorek	<i>Komponenta povrchové energie [$mN \cdot m^{-1}$]</i>		
	Celková povrchová energie γ^{TOT}	Disperzní část celkové povrchové energie γ^{LW}	Polární část celkové povrchové energie γ^{AB}
Polyanilinová sůl	52,54	46,05	6,49
Polyanilinová báze	50,88	46,54	4,35

Tabulka č. 8: Hodnoty povrchových energií získaných při měření kontaktního úhlu pomocí metody „The See System“ pro polyanilinovou sůl i bázi

9 DISKUZE

Pojďme si pro začátek této kapitoly říci, co je již všeobecně známo, respektive, jaká polymerní látka, poslední dobou, bývá stále více a více studována. Jedná se o polyanilin a jeho formy, který byl předmětem i naší práce (konkrétně poté jeho protonovaná emeraldinová sůl).

Z hlediska biokompatibility byly zkoumány jak nevodivý polyanilin, tedy emeraldinová báze, tak i vodivý polyanilin hydrochlorid, a to především, co se týče kožního podráždění, senzibilizace a cytotoxicity provedené na lidských immortalizovaných keratinocytech a buněčné linie lidského hepatocelulárního karcinomu. Testování byla provedena na extraktech polyanilinových prášků v souladu s požadavky mezinárodních standardů příslušných pro testování zdravotnických prostředků. Z toho důvodu mohou být výsledky obecně využity ve všech typech materiálů a zařízeních obsahujících polyanilin v různých koncentracích. Studie prokázala, že polyanilin nevyvolává žádnou senzibilizaci, a ani žádná kožní podráždění. Naproti tomu, obě polyanilinové formy prokázaly značnou cytotoxicitu, která byla vyšší pro polyanilinovou sůl ve srovnání s polyanilinovou bází, a navíc byla pozorována u obou buněčných linií. Ovšem lze dosáhnout významného omezení cytotoxicity na základě dvou procedur – deprotonace a reprotonace, využívaných jako další „čistící krok“ po přípravě polyanilinu. V souladu s tím je tedy cytotoxicita způsobena přílišnou reakcí vedlejších produktů a nečistot (*Humpolíček a kolektiv, 2012*).

Během posledních desetiletí se klade stále větší důraz na požadavky, a to z důvodu neustálého růstu a stárnutí populace, v oblasti zdravotní péče (*Tabata, 2001; Vasita, Shanmugam a Katti, 2008; Jiao a Cui, 2007*). Zejména poté v oblasti tkáňového inženýrství. Čím dál více lidí potřebuje pro svůj život implantát k transplantaci orgánu. Aby bylo možné splnit narůstající požadavky, zvyšuje se výzkum v oblasti tkáňového inženýrství. K nadějným pokrokům vedlo lepší porozumění buněčné biologie, věda o biomateriálech a interakce mezi buňkou a daným materiálem. V tomto kontextu, povrchová modifikace, respektive plasmová povrchová modifikace biokompatibilních materiálů, je zájmem a hlavním cílem mnoha výzkumných skupin (*Jacobs a kolektiv, 2012*). Nicméně – tkáňové inženýrství zůstává interdisciplinárním polem, a stále určité rozhodující informace a dobré porozumění interakcí mezi buňkou a polymerní látkou chybí.

V dnešní době se často využívají povrchové modifikace na bázi plasm, například plasmová polymerace (*Morent a kolektiv, 2011; De Geyter a kolektiv, 2011; Morent a kolektiv, 2009; Vasilets a kolektiv, 1997; Asadinezhad a kolektiv, 2010*) či plasmové roubování (*Krishnan, Weinman a Ober, 2007; Mathieson a Bradley, 1996; Mathieson a Bradley, 1996; Davidson, Mitchell a Bradley, 2005; Kato a kolektiv, 2003; Deng a kolektiv, 2009; Yang a kolektiv, 2003; Cho, Lee a Kim, 2005; Shojaei, Fathi a Sheikh, 2007; Gatenholm, Ashida a Hoffman, 1997; Yu a kolektiv, 2007; Goda a kolektiv, 2008; Shim a kolektiv, 2001*). Tyto technologie mohou vést ke zdokonalení interakcí mezi buňkou a materiálem u různých biomedicínských polymerů (*Desmet a kolektiv, 2009; Chu a kolektiv, 2002; Gristina, 1978; Subbiahdoss a kolektiv, 2009; Gizdavic-Nikolaidis a kolektiv, 2004*). Kromě lepší buněčné adheze a proliferace na povrchu implantátů, je rozhodující i prevence adhezí mikroorganismů. Vzhledem k rozdílným aplikacím biomedicínských polymerů, s ještě většími rozličnými požadavky, je evidentní, že procedury a technologie různě specializovaných plasmových modifikací budou neustále rozvíjeny z důvodu splnění rozdílných potřeb. Dva z těchto specializovaných procedur jsou úprava 3D struktur (*Vasita, Shanmugam a Katti, 2008; Rosso a kolektiv, 2004; Kim a Mooney, 1998*) a prostorová kontrola buněčné adheze (*Kim, Khang a Lee, 2008; Ruardy a kolektiv, 1997; Wilkinson a kolektiv, 2002; Lee a kolektiv, 2003; Choe a kolektiv, 2004; Lee a kolektiv, 1998*). Společně mohou být tyto procedury využity k vytvoření a designování nových a kompletních, synteticky „pěstovaných“ orgánů (*Jacobs a kolektiv, 2012*).

Experimentální část práce je prvotní studií. Za předpokladu, že aplikujeme BSA po působení plasm, dosáhneme lepších hodnot oproti jeho absenci. Je možné, že kombinace těchto dvou faktorů by mohla přispět k vývoji modifikací pro kloubní náhrady či uvedení jejich kombinace z důvodu proliferace a diferenciací kostní chrupavky.

ZÁVĚR

Před námi stojí poslední část práce, a to je celkový souhrn, týkající se povrchové úpravy polymerů pro zvýšení buněčné proliferace s tím, že jsme se v praktické části konkrétně zaměřili na působení vzácného plynu (argonu) na polyanilinové filmy, které jsou upravené v plasmovém reaktoru. Samozřejmě nebudeme na závěr mluvit pouze o plasmové úpravě v atmosféře argonu, ale také v atmosféře vzduchu. Dalším důležitým prvkem byla aplikace bovinního sérového albuminu, jakožto modelového systému. Za předpokladu, že mikrotitrační destičky obsahující polyanilinovou sůl byly, respektive nebyly podrobeny procesu oplasmování (vzduchem i argonem), a co je důležité – bez přídavku bovinního sérového albuminu – buněčné linie myších fibroblastů hůře proliferovali na daném povrchu. U polyanilinové soli platí, že viabilita myších buněk je nízká, pouze v rozmezí 45 % - 55 % (v tomto případě buňky vykazují střední cytotoxický efekt). Totéž můžeme říci i o polyanilinové soli podrobené oplasmování v atmosféře vzduchu či v atmosféře vzácného plynu (argonu), a to i navzdory tomu, že byla podrobena plasmatu, který pozměnil povrchové vlastnosti z hlediska chemické struktury a výskytu funkčních skupin.

Jiná situace nastala při aplikaci bovinního sérového albuminu. V tomto případě buňky proliferují mnohem lépe než v případě předchozích vzorků. Bez dalších analýz, které budou předmětem diplomové práce, je ovšem obtížné přesně říci, proč dochází k této razantní změně. V posledních kapitolách byl vysvětlen jakýsi nástin celé bakalářské práce, celé problematiky, týkající se adheze a proliferace eukaryotických buněk. Práce poukazuje na možnosti využití plasmové úpravy povrchu v kombinaci s bovinním sérovým albuminem k ovlivnění interakce buněk a povrchu polyanilinu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BARTHELMY, D. 2010. Mineral Species containing Mercury. In: *Mineralogy Database* [online]. [cit. 2014-05-18].
Dostupné z:
<http://webmineral.com/.../Chem-Hg.shtml>
2. BENEŠOVÁ, M., SATRAPOVÁ, H., 2002. *Odmaturuj! z chemie*. Vydání první - dotisk. Brno: DIDAKTIS. Kap. 10: *Vodík, kyslík, vzácné plyny – Vzácné plyny*, s. 61-62. ISBN 80-86285-56-1.
3. BÖRNER, H. G., LUTZ, J.-F. et al., ©2011. *Bioactive Surfaces*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. *Advances in polymer science*, roč. 240. Kap. 1: WISCHERHOFF, E., BADI, N. et al., 2010. *Smart Polymer Surfaces: Concepts and Applications in Biosciences*, s. 13-33. ISSN: 0065-3195. ISBN: 978-3-642-20155-4. DOI: 10.1007/978-3-642-20155-4.
Ukázka knihy *Bioactive Surfaces* dostupná z:
<http://www.springer.com/chemistry/polymer+science/book/978-3-642-20154-7>
4. BÖRNER, H. G., LUTZ, J.-F. et al., ©2011. *Bioactive Surfaces*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. *Advances in polymer science*, roč. 240. Kap. 2: PETERSEN, S., GATTERMAYER, M., BIESALSKI, M., 2010. *Hold on at the Right Spot: Bioactive Surfaces for the Design of Live-Cell Micropatterns*, s. 35-78. ISSN: 0065-3195. ISBN: 978-3-642-20155-4. DOI: 10.1007/978-3-642-20155-4.
5. DUCHÁČEK, V., 2006. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vydání druhé – přepracované. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 278 s. ISBN: 80-708-0617-6.
6. *Ekologické centrum Kralupy nad Vltavou (eckralupy)* [online]. Rok, autor neuveden. *Rádce - odpady - odpověď 71* [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
http://www.eckralupy.cz/radce/odpady_odpovedi/odpoved_71.html
7. EMSLEY, J. et al., 2011. *Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements (new edition)*. The Periodic Table [online]. [cit. 2014-05-18].
Dostupné z:
<http://www.rsc.org/periodic-table/element/118/ununoctium>

Příklad využití dostupné knihy:

EMSLEY, J., 2011. *Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements*. New Edition, completely rev. and updated. New York: Oxford University Press, vii, 699 s. ISBN: 978-019-9605-637.

8. ENGELHARD, M., rok neuveden. X-Ray Photoelectron Spectroscopy XPS [online]. United States Department of Energy: *Scientific Innovation Through Integration* [cit. 2014-05-17].

Dostupné z:

http://www.emsl.pnl.gov/capabilities/spectroscopy/engelhard_xps.pdf

9. FREIRES DE QUEIROZ, J. D. et al., April 2014. Surface modification by argon plasma treatment improves antioxidant defense ability of CHO-k1 cells on titanium surfaces [online]. Roč. 28, č. 3, s. 381-387 [cit. 2014-05-17].

Dostupné z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233313003160>

10. FUSEK, M., KÁŠ, J., RUML, T., 2008. *Bioléčiva* [online]. Vydání první. Praha: Vydavatelství VŠCHT [cit. 2014-05-17]. ISBN: 978-80-7080-678-4.

Dostupné z:

http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-678-4/pdf/049.pdf

11. HAJ, A. E., YANG, Y., BAČÁKOVÁ, L., MOTLÍK, J., 2008. Biomateriály a bioanalogické systémy [online]. *Ústav Makromolekulární chemie AV ČR* [cit. 2014-05-18].

Dostupné z:

http://www.imc.cas.cz/cz/umch/o_bioanal.html

12. HUDEČEK, O., SEDLÁČEK, T., rok neuveden. Povrchové úpravy plastových výrobků plazmou [online]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: *Fakulta Technologická* [cit. 2014-05-17].

Dostupné z:

<http://www.plastr.cz/files/new35/144->

[Povrchove_upravy_plastovych_vyrobku_plazmou.pdf](#)

13. HUMPOLÍČEK, P. et al., 2012a. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic metals* [online]. Roč. 162, s. 722-727 [cit. 2014-05-17]. ISSN: 0379-6779. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024.

Dostupné z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379677912000781>.

14. HUMPOLÍČEK, P. et al., 2012b. Proliferace buněk na vodivém polymeru, polyanilinu. *Chemické listy* [online]. Roč. 106, č. 5, s. 380-383 [cit. 2014-05-17]. ISSN: 0009-2770. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024.

Dostupné z:

http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_05_380-383.pdf.

15. *Introduction to X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)* [online]. Rok, autor neveden [cit. 2014-05-17].

Dostupné z:

<http://pire-ecci.ucsb.edu/pire-ecci-old/summerschool/papers/vohs1.pdf>

16. JACOBS, T. et al., 2012. Plasma Surface Modification of Biomedical Polymers: Influence on Cell-Material Interaction. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* [online] Roč. 32, č. 5, s. 1039-1073 [cit. 2014-05-17]. DOI: 10.1007/s11090-012-9394-8.

Dostupné z:

<http://link.springer.com/10.1007/s11090-012-9394-8>

17. JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V., 2006. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. Vydání osmé – rozšířené. Olomouc: Nakladatelství Olomouc. Kap.: *Biologie živočichů – Charakteristika živočišné buňky*, s. 91. ISBN: 80-718-2217-5.

18. JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V., 2006. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. Vydání osmé – rozšířené. Olomouc: Nakladatelství Olomouc. Kap.: *Vybrané kapitoly z obecné biologie – Buněčná biologie*, s. 336-338. ISBN: 80-718-2217-5.

19. KLIMEŠ, L., 1985. *Slovník cizích slov*. Vydání třetí – upravené. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, n. p., s. 14. SPN: 1-54-13/3.

20. KLIMEŠ, L., 1985. *Slovník cizích slov*. Vydání třetí – upravené. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, n. p., s. 286. SPN: 1-54-13/3.

21. *Lecture 10: Basic of Atomic Force Microscopy (AFM)* [online]. Rok, autor neveden. Před. č. 10 [cit. 2014-05-17].

Dostupné z:

http://www.eng.utah.edu/~lzung/images/Lecture_10_AFM.pdf

22. LUBASOVÁ, D., 2001. Biodegradabilní materiály. Technická univerzita v Liberci 2000/2001: *Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace (iNTEC)* [online]. Vydání první. Liberec: TU v Liberci [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
<https://int.cxi.tul.cz/cs/Bidegradabilita>
23. MIŠURCOVÁ, L., 2006. *Základy biologie*. Vydání první – dotisk. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: *Fakulta technologická*. Academia Centrum. Kap. 6.: *Buňka*, s. 76-77. ISBN: 978-807-3184-346.
24. MOULDER, J. F. et al., 1995. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy [online databáze]. ©Copyright By Perkin-Elmer Corporation. *Physical Electronics Inc.*, Eden Prairie [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
http://www.kepu.dicp.ac.cn/photo/07sl02/HANDBOOK_OF_X-RAY_PHOTOELECTRON_SPECTROSCOPY%20%20E5%A5%BD%EF%BC%81.pdf
25. NEČAS, O. et al., 2000. *Obecná biologie: pro lékařské fakulty*. Vydání třetí – přepracované. Praha: H & H Vyšehradská, s. r. o., Jinočany. 554 s. Kap. II.: *Molekulární a buněčná biologie*, s. 38-40. ISBN 80-860-2246-3.
26. OMASTKOVÁ, M., STEJSKAL, J., PROKEŠ, J., 2001. Vodivé polymery – materiály budoucnosti [online]. *Plasty a kaučuk*: č. 38, s. 136-140 [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/16.pdf>
27. *Osel.cz: Budeme využívat proteiny z krve k získávání vodíku?* [online]. PAZDERA, J., 2006-04-12 [cit. 2014-05-18].
Dostupné z:
<http://www.osel.cz/index.php?clanek=2286>
28. *Periodická tabulka prvků – rtuť*, 2009-2013. Autor neuveden [online]. [cit. 2014-05-18].
Dostupné z:
<http://www.prvky.com/80.html>

29. PROKEŠ, J., NEŠPŮREK, S., STEJSKAL, J., 2001. Vodivé polymery. Integritní materiály pro nové století [online]. *Vesmír*: č. 80, s. 35 [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
<http://casopis.vesmir.cz/clanek/vodive-polymery>
30. PROKEŠ, J., STEJSKAL, J., OMASTKOVÁ, M., 2001. Polyanilin a polypyrrol - dva představitelé vodivých polymerů [online]. *Chemické listy*: roč. 95, č. 8, s. 484-492 [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
<http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/08-PDF/484-492.pdf>
31. SIGMA-ALDRICH CO. LLC., 2014. Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose [online]. [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d5796?lang=en®ion=CZ>
32. SMART, R. et al., rok neuveden. X-ray Photoelectron Spectroscopy [online]. Department of Physics and Materials Science. City University of Hong Kong: *Surface Science Western, UWO* [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
http://mmrc.caltech.edu/SS_XPS/XPS_PPT/XPS_Slides.pdf
33. STEJSKAL, J., GILBERT, R. G., 2002-01-1. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report): *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. Roč. 74, č. 5, s. 857-867 [cit. 2014-05-17]. DOI: 10.1351/pac200274050857.
Dostupné z:
<http://www.degruyter.com/view/j/pac.2002.74.issue-5/pac200274050857/pac200274050857.xml>
34. STEJSKAL, J., SAPURINA, I., 2005-01-1. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. Roč. 77, č. 5, s. 815-826 [cit. 2014-05-17]. ISSN [Online]: 1365-3075, ISSN [Print]: 0033-4545. DOI: 10.1351/pac200577050815.

Dostupné z:

<http://www.degruyter.com/view/j/pac.2005.77.issue-5/pac200577050815/pac200577050815.xml>

Dostupné i z:

<http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/2005/pdf/7705x0815.pdf>

35. STLOUKAL, P., KOUTNÝ, M., 2010-03-24. Biodegradabilní plasty: současnost a perspektivy [online]. [cit. 2014-05-17]. ISBN: 978-80-86832-50-0.

Dostupné z:

http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/file/seminare/2010-03-24/prezentace/11_Stloukal.pdf

36. STOKLASA, K. et al., 2005. *Makromolekulární chemie I, skriptum*. Kapitola třetí [online]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: *Fakulta Technologická* [cit. 2014-05-17].

Dostupné z:

ht-

[ps://moodle.fp.tul.cz/nano/pluginfile.php/939/mod_resource/content/2/Skript_a_MMCH_I.pdf](https://moodle.fp.tul.cz/nano/pluginfile.php/939/mod_resource/content/2/Skript_a_MMCH_I.pdf)

37. SUO, Z., rok neuveden. Atomic Force Microscopy (AFM) – basic principles and applications [online]. Montana State University [cit. 2014-05-17].

Dostupné z:

http://www.igertmsu.montana.edu/pdfs/course%20materials/AFM_lecture_092209.pdf

38. SVOBODA, E. et al., ©2006. *Přehled středoškolské fyziky*. Vydání čtvrté - upravené. Praha: Prometheus. Kap. 3: *Molekulová fyzika a termika – Styk kapaliny se stěnou nádoby*, s. 170-171. ISBN 80-7196-307-0.

39. ŠIMEK, L., HRNČIŘÍK, J., 2010. *Fyzikální chemie I*. Vydání šesté – dotisk. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: *Fakulta technologická*. Academia Centrum. Kap. 2.2.: *Kapaliny – Úhel smáčení*, s. 53. ISBN 978-80-7318-324-0.

40. TARÁBEK, P., ČERVINKOVÁ, P. et al., 2006. *Odmaturuj! z fyziky*. Vydání – druhé. Brno: DIDAKTIS, Kap. 3.4.: *Struktura a vlastnosti plynů, kapalin a pevných látek – Kapilární jevy*, s. 85. ISBN 80-7358-058-6.

41. THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2014. *Life Technologies: DMEM, high glucose* [online]. [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11965084>
42. VACÍK, J., 1999. *Přehled středoškolské chemie*. Vydání třetí - doplněné. Praha: SPN - pedagogické nakladatelství, a. s., s. 175-176. ISBN 80-7235-108-7.
43. VANĚK, V., 2009. Methanové klatráty – potenciální zdroj energie i rizika [online]. In: PEARCE, F. *Ice on Fire*. New Scientist: č. 2714, s. 30-33 [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
<http://3pol.cz/1005-metanove-klatraty-potencialni-zdroj-energie-i-rizika>
44. WAGNER, C. D. et al., 1979. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy [online databáze]. ©Copyright By Perkin-Elmer Corporation [cit. 2014-05-17].
Dostupné z:
http://www.kepu.dicp.ac.cn/photo/07sl02/HANDBOOK_OF_X-RAY_PHOTOELECTRON_SPECTROSCOPY%20%20%E5%A5%BD%E5%BC%81.pdf

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Všechny uvedené zkratky byly vysvětleny v textu bakalářské práce.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Molekula methanového klatrátu (<i>Pearce, 2009</i>)	14
Obrázek č. 2: Ukázka upraveného a neupraveného titanového povrchu (<i>Freries de Queiroz a kolektiv, 2014</i>)	16
Obrázek č. 3: Jednotlivé řetězce polymerů (<i>Benešová a Satrapová, 2002</i>)	19
Obrázek č. 4: Ukázky elektrostatického zvlákňování biodegradabilních polymerů typu (<i>Lubasová, [b.r.]</i>)	22
Obrázek č. 5: Ukázky obou případů úhlů smáčení (<i>Šimek a Hrnčířík, 2010</i>)	24
Obrázek č. 6: Princip rentgenové fotoelektronové mikroskopie (<i>Moulder a kolektiv, 1995</i>)	26
Obrázek č. 7: Siegbahnův analytický nástroj a Einsteinův fotoelektrický jev (<i>Smart a kolektiv, 1995</i>)	27
Obrázek č. 8: Jednotlivé formy polyanilinu (<i>Stejskal, Kratochvíl a Jenkins, 1996</i>)	29
Obrázek č. 9: Polyanilin v granulární formě při polymeraci v silně kyselém prostředí a polyanilinové nanotrubky vzniklé při snížené kyselosti (<i>Stejskal a Gilbert, 2002</i>)	30
Obrázek č. 10: Ukázka protihnilobního polymerního kartáče (<i>Haj a Yang, 2012; Bačáková a kolektiv, 2011; Motlík a kolektiv, 2012</i>)	40
Obrázek č. 11: Krystalografická struktura lidského albuminu (<i>Tsuchida, Komatsu a Curry, 2006</i>)	42
Obrázek č. 12: Schematická reprezentace rozdílných plasmových modifikovaných strategií (<i>Zenkiewicz, Rytlewski a Malinowsky, 2011</i>)	50
Obrázek č. 13: Ukázka jednoho z mnoha variant Dulbecco's Modified Eagle Medium (<i>Thermo Fisher Scientific Inc, 2014</i>)	56
Obrázek č. 14: Vybrané mikrofotografie ilustrující uzdravování buněčných linií myších fibroblastů (NIH/3T3) při zvětšení 40x	65
Obrázek č. 15: Vybrané mikrofotografie buněčných linií myších fibroblastů (NIH/3T3) při zvětšení 200x	67

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Nastavení plasmového reaktoru pro modifikaci polyanilinových filmů	56
Tabulka č. 2: Údaje týkající se BSA využitého v daném experimentu	57
Tabulka č. 3: Základní hodnoty BSA aplikované do jamek mikrotitračních destiček	58
Tabulka č. 4: Vyhodnocení cytotoxického efektu dle ISO 10 993	62
Tabulka č. 5: Vyhodnocení rozdílu viability buněk na různých površích dle T – testu a ISO 10 993	63
Tabulka č. 6: Srovnání PANI-S-Ar-BSA oproti PANI-S-Ar	64
Tabulka č. 7: Srovnání PANI-S-V-BSA oproti PANI-S-V	64
Tabulka č. 8: Hodnoty povrchových energií získaných při měření kontaktního úhlu pomocí metody „The See System“ pro polyanilinovou sůl i bázi	68

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Průměrná absorbance jednotlivých úprav polyanilinu	61
---	----