



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra biomedicínské techniky**

**Měření povrchových vlastností titanových  
substrátů a jejich vliv na adhezi kmenových  
buněk**

**Measurement of surface properties of  
titanium substrates and their effect on stem  
cell adhesion**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: František Zima

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Jana Štěpanovská

---

**Kladno 2019**

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Zima** Jméno: **František** Osobní číslo: **465468**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra biomedicínské techniky**  
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**  
Studijní obor: **Biomedicínský technik**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Měření povrchových vlastností titanových substrátů a jejich vliv na adhezi kmenových buněk**

Název bakalářské práce anglicky:

**Measurement of surface properties of titanium substrates and their effect on stem cell adhesion**

Pokyny pro vypracování:

Provedte srovnání titanových substrátů s různou povrchovou úpravou z hlediska vlivu na adhezi kmenových buněk a následnou osteointegraci. Stanovte drsnost a hydrofilnost jednotlivých povrchů z obrazových dat. Dále navrhnete kultivační komoru pro statickou kultivaci buněk, kam bude možné uchytit titanový substrát tak, aby násada buněčné suspenze proběhla přímo na něj a nedošlo k vytečení do okolí mimo substrát. Kultivační komora musí být netoxická pro buňky a kompletně sterilizovatelná, např. v autoklávu. Funkčnost komory ověřte při krátkodobých buněčných experimentech. Na základě buněčných pokusů zhodnoťte vliv úprav na adhezi a proliferaci kmenových buněk. Zhodnocení proveďte pomocí základních analýz, tj. počtu a viability buněk na substrátech, buněčné morfologie, měření aktivity alkalické fosfatázy aj.

Seznam doporučené literatury:

[1] Joseph D Bronzino, The Biomedical Engineering Handbook, ed. First edition, Boca Raton : CRC Press, 2000, ISBN 0-8493-0461-X

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

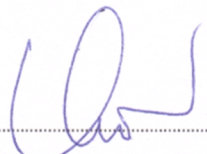
**Ing. Jana Štěpanovská**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

**Ing. Roman Matějka**

Datum zadání bakalářské práce: **18.02.2019**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2020**



prof. Ing. Peter Kneppo, DrSc.  
podpis vedoucí(ho) katedry



prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.  
podpis děkana(ky)

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Měření povrchových vlastností titanových substrátů a jejich vliv na adhezi kmenových buněk“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 14. 5. 2019

.....

František Zima

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval vedoucí své bakalářské práce Ing. Janě Štěpanovské za ochotnou pomoc a cenné rady.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV18-02-00422.

## **ABSTRAKT**

### **Měření povrchových vlastností titanových substrátů a jejich vliv na adhezi kmenových buněk**

Práce charakterizuje titanové substráty z hlediska vlivu adheze kmenových buněk a vyhodnocuje vliv drsnosti a smáčivosti povrchu titanu na adhezi a proliferaci kmenových buněk. Bylo zkoumáno kontrolní sklo a následující titanové povrchy: anodizovaný, DLC, kartáčovaný, leštěný a pískovaný, přičemž všechny povrchy byly zkoumány neplazmované i plazmované. Drsnost povrchu byla měřena pomocí softwaru vyhodnocující snímky ze skenovacího mikroskopu. Smáčivost byla určena pomocí velikosti kontaktního úhlu přisedlé kapky. Vliv povrchových vlastností substrátů byl hodnocen na základě buněčných experimentů. Pro tento účel byla navržena a vyrobena kultivační komora, která zajišťuje nasazení buněk přímo na substrát a zabraňuje natečení buněčné suspenze mimo něj. Proliferace buněk na substrátech byla hodnocena pomocí barvení jader a cytoskeletu buněk a následné obrazové analýzy. Dle primárních experimentů se jeví jako nejvhodnější povrch pro buňky neplazmovaný DLC povrch.

### **Klíčová slova**

titanové substráty, drsnost a smáčivost povrchu, kmenové buňky, anodizovaný povrch, DLC povrch, kartáčovaný povrch, leštěný povrch, pískovaný povrch

## **ABSTRACT**

### **Measurement of surface properties of titanium substrates and their effect on stem cell adhesion**

The paper characterizes titanium substrates in terms of stem cell adhesion and evaluates the effect of titanium surface roughness and wettability on stem cell adhesion and proliferation. The control glass and the following titanium surfaces were examined: anodized, DLC, brushed, polished and sandblasted; all surfaces examined both non-plasma-coated and plasma-coated. Surface roughness was measured from scanned microscope images. Wettability was determined by the contact angle of the sessile drop. The effect of surface properties of substrates was evaluated on the basis of cell experiments. For this purpose, a culture chamber has been designed and manufactured. It provides deployment of the cells directly on the substrate and prevents the cell suspension from flowing out of the substrate. Proliferation of the cells on substrates was evaluated by nuclear and cell cytoskeleton staining followed by image analysis. According to the primary experiments, the most suitable surface for cells is a non-plasma-coated DLC surface.

### **Keywords**

titanium substrates, roughness and wettability of surface, stem cells, anodized surface, DLC surface, brushed surface, polished surface, sandblasted surface

# Obsah

<b>Seznam symbolů a zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>10</b>
1.1 Přehled současného stavu .....	10
1.1.1 Biomateriály a biokompatibilita .....	11
1.1.2 Titan a jeho slitiny .....	12
1.2 Povrchové vlastnosti.....	14
1.2.1 Chemická struktura povrchu.....	14
1.2.2 Topografie povrchu.....	14
1.2.3 Povrchový náboj a energie .....	15
1.2.4 Povrchová úprava .....	16
1.2.5 Kmenové buňky a stavba kosti.....	17
1.2.6 Interakce na povrchu substrátu.....	18
1.3 Cíle práce .....	20
<b>2 Metody</b> .....	<b>21</b>
2.1 Studované typy materiálů .....	21
2.2 Skenovací elektronový mikroskop (SEM).....	22
2.3 Plazmování.....	22
2.4 Měření smáčivosti .....	23
2.5 Měření drsnosti.....	25
2.6 Návrh kultivační vložky a komory.....	26
2.7 Kultivace buněk .....	28
<b>3 Výsledky</b> .....	<b>29</b>
3.1 Skenovací elektronová mikroskopie .....	29
3.2 Měření povrchové drsnosti .....	31
3.3 Měření kontaktního úhlu.....	33
3.4 Kultivační vložka a komora.....	35
3.5 Kultivace buněk .....	36
<b>4 Diskuse</b> .....	<b>42</b>
<b>5 Závěr</b> .....	<b>45</b>
<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>46</b>

<b>Seznam příloh.....</b>	<b>52</b>
<b>Příloha A: Technické výkresy.....</b>	<b>53</b>
<b>Příloha B: Obsah přiloženého CD.....</b>	<b>58</b>



# Seznam symbolů a zkratek

## Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
$Ra$	$\mu\text{m}$	Průměrná aritmetická úchylka profilu
$Rq$	$\mu\text{m}$	Průměrná kvadratická úchylka profilu
$Rsm$	$\mu\text{m}$	Průměrná šířka prvku profilu
$Rt$	$\mu\text{m}$	Celková výška profilu
$Rz$	$\mu\text{m}$	Největší výška profilu
$Sa$	$\mu\text{m}$	Průměrná aritmetická výška povrchu
$Sdr$	%	Poměrná rozvinutá styková plocha
$Sds$	$1/\mu\text{m}^2$	Hustota vrcholů
$Sku$	-	Špičatost povrchu
$Sq$	$\mu\text{m}$	Průměrná kvadratická výška povrchu
$Ssk$	-	Šikmost povrchu
$Sy$	$\mu\text{m}$	Maximální výška povrchu
$\theta$	$^\circ$	Kontaktní úhel pro vyhodnocení smáčivosti

## Seznam zkratek

Zkratka	Význam
A	Anodizovaný povrch
ABS	Akrylonitrilbutadienstyren
ASC	Kmenové buňky izolované z tuku ( <i>Adipose derived Stem Cells</i> )
cpTi	Komerčně čistý titan
ČSN	Česká technická norma
D	Povrch s DLC úpravou
DLC	Povrchová úprava pomocí uhlíku ( <i>Diamond Like Carbon</i> )
EN	Evropská norma
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
K	Kartáčovaný povrch
KS	Kontrolní sklo
L	Leštěný povrch
MSC	Mezenchymální kmenové buňky (získané z lidského pupečníku)
nTi	Nanostrukturální titan
P	Pískovaný povrch
PA	Plazmovaný anodizovaný povrch
PD	Plazmovaný DLC povrch
PK	Plazmovaný kartáčovaný povrch
PL	Plazmovaný leštěný povrch
PP	Plazmovaný pískovaný povrch
prASC	Kmenové buňky izolované z tuku z prasete
PS	Plazmované kontrolní sklo
SEM	Skenovací elektronový mikroskop ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )

# 1 Úvod

Kostní tkáň patří mezi nejdůležitější pojivové tkáně lidského těla, jejíž funkcí je tvořit pevnou, ale pohyblivou oporu lidského organismu. Mnoho lidí avšak trpí artrózou či jiným kostním onemocněním způsobeným geneticky, infekcí, vlastním opotřebením či po úrazu. V namáhaných místech lidského těla, jako jsou kolenní, kyčelní či ramenní klouby dochází často k chorobným změnám a jedním z možných způsobů, jak řešit tyto problémy, je v krajních případech nahrazení poškozené části kostní tkáně implantátem. Tím dojde k obnovení pohyblivosti, snížení bolestivosti a zlepšení stavu pacienta. Aby implantát v těle správně fungoval, je potřeba na jeho povrch zajistit adhezi osteoblastů. Jsou to kostní buňky kubického tvaru s dlouhými výběžky, které jsou zodpovědné za novotvorbu a přestavbu kosti. Na rozhraní kost-implantát musí vzniknout pevné spojení, aby kost mohla opět fungovat jako celek a aby se mohla přenášet jednotlivá zatížení. V opačném případě, kdy nedojde k pevnému spojení, dochází ke vzniku vazivového obalu a implantát je tkání odmítnut. Kost však není schopna akceptovat jako implantát jakýkoli materiál, a proto je potřeba definovat požadavky na neoptimálnější látku. Kromě dobrých mechanických vlastností, jako je pevnost, pružnost, tažnost a korozivzdornost, by mělo docházet k co nejsnazšímu začlenění implantátu do kosti. Důležité také je, aby byl materiál biokompatibilní a nepůsobil negativně na kostní tkáň, nebo jiným způsobem nenarušoval okolní tkáň. Tyto požadavky splňuje titan a jeho slitiny. Titan se hojně využívá právě v tkáňovém inženýrství. Pomocí vhodných povrchových úprav je možné zlepšit bioaktivitu materiálu a zároveň jeho začlenění do kostní tkáně. [1]

V této práci bude řešena problematika vlivu různých povrchových modifikací titanových substrátů na adhezi buněk a bude charakterizován nejvhodnější povrch pro adhezi a proliferaci kmenových buněk.

## 1.1 Přehled současného stavu

Poptávka po efektivních a bezpečných materiálech v biomedicíně inženýrství velmi vzrůstá kvůli nárůstu světové populace, starších lidí a požadavkům mladých lidí na funkční náhrady. Hlavním požadavkem je, aby se materiál a lidské prostředí navzájem negativně neovlivňovaly. Interakce na rozhraní tkáň-materiál je řízena mnoha vlastnostmi, avšak klíčovým faktorem je povrch materiálu, který je v přímém kontaktu s biologickým prostředím. Biologickou odpověď na implantát lze zlepšit změnami povrchových vlastností jako je povrchové chemické složení, topografie, povrchová energie a náboj. Hlavním cílem těchto úprav je zlepšit antibakteriální vlastnosti, bioadhezi, biokompatibilitu a odolnost vůči korozi a opotřebením, zatímco vnitřní struktura materiálu zůstane zachovaná. Tyto modifikace by měly výrazně ovlivnit interakce s buňkami v biologickém prostředí, například proliferaci na povrchu biomateriálu, a tím

dosáhnout pevného spojení s kostí. Nežádoucím stavem je předčasné zatížení, které vede k nepatrným pohybům způsobujícím narušení nově vznikající tkáně, a tak vzniku vazivové vrstvy. Povrch takto vzniklé tkáně je mechanicky slabý a náchylný k změnám, které vyústí v předčasné uvolnění biomateriálu. Oproti tomu v případě rychlého spojení kosti s biomateriálem, může dojít k brzkému zatížení, a tím zabránit atrofii kosti a svalů z nečinnosti. [2]

### **1.1.1 Biomateriály a biokompatibilita**

Biomateriál je látka umělého či přírodního původu, která nahrazuje či rozšiřuje po určitou dobu danou funkci lidského systému. Od takového materiálu se vyžaduje, aby se co nejvíce podobal nahrazované tkáni a nebyl toxický pro lidské tělo a nevyvolával alergickou reakci. V současné době existují tři druhy materiálů pro kostní implantáty: biotolerantní, bioinertní a bioaktivní. Materiály biotolerantní (například korozivzdorné oceli) mohou do svého okolí uvolňovat určité množství netoxických částic, které se však nesmí šířit dále do lidského těla. Tomu je zabráněno přítomností vláknitých pojivových tkání, které však nejsou pro dlouhodobé spojení vhodné. Mezi materiály bioinertní patří např. titan a jeho slitiny. Tyto materiály vytvářejí malou chemickou interakci s okolními tkáněmi a vhojování probíhá pomocí osteointegrace. Materiály bioaktivní (například hydroxyapatit) již vyvolávají žádoucí buněčné reakce bez vzniku vazivové vrstvy a stimulují růst kosti a regeneraci tkání *in vivo*. Dochází tedy k adhezi buněk na povrch materiálu a tvorbě chemických pojivových můstků na rozhraní kosti a implantátu, které jsou schopny přenášet smyková a tahová napětí. Snadné vzájemné prorůstání je dáno stejným chemickým složením vlastní kosti a tohoto přídavného materiálu, který se na fixační část nanáší například pomocí termálních nástřiků. Vlastní nástřík bývá porézní a tělo dřívku hrubé, což umožní tvorbu kostních můstků a silnou fixaci. [3]

Jako materiál biokompatibilní je definován takový materiál, který je odolný proti korozi, únavě, opotřebení, má vysokou pevnost a nízký modul pružnosti a lidské tělo je schopno ho přijmout bez negativní odezvy. Tyto vlastnosti splňují z velké části určité kovy a jejich slitiny. Hlavními aspekty při jejich výběru pro biomedicínské aplikace jsou právě biokompatibilita, odpovídající mechanické vlastnosti, odolnost vůči korozi a opotřebení a přiměřená cena. Přestože jsou používány i čisté kovy, lze sloučeninami zlepšit materiálové vlastnosti jako pevnost a korozivzdornost.

Většina implantovaných kovových materiálů má tendenci v tělních tekutinách ztrácet elektrony. To většinou vede ke vzniku koroze a průniku korozivních částic do biologického prostředí, což způsobí zánětu a osteolýzu. Hlavními faktory, které limitují životnost implantátů, jsou opotřebení a koroze; např. kyčelní či kolenní endoprotézy mají životnost 10-15 let. Další vlastností kovových materiálů je to, že nejsou biologického původu, a tudíž jsou bioinertní. Bioinertní materiály nejsou schopné kladného osteogenetického spojení, tudíž je dosaženo pouze malé fixace. Z těchto důvodů se hledají a vyvíjejí nové sloučeniny a povrchové úpravy. [2]

V současné době se pro nahrazení kostní tkáně kovovými implantáty používají nejvíce austenitické korozivzdorné oceli (FeCrNiMo), kobaltové slitiny (CoCrMo, CoCrNiMo) nebo titan a jeho slitiny (TiAlV, TiAlNb). Nejčastěji užívaným materiálem pro implantáty je však třetí jmenovaný titan se svými slitinami, který nachází hojně využití při konstrukci implantátů jak v ortopedii, tak i ve stomatologii. V řadě případů však nejsou mechanické vlastnosti čistého titanu dostatečné, proto se používá slitina Ti6Al4V, která nachází upotřebení především jako náhrada pro přenášení zatížení ve velkých kostech. V čistém stavu se pak kov využívá spíše pro dentální náhrady. Titan je látka bioinertní, což znamená, že neobsahuje alergenní ani toxické látky, které by hostiteli škodily. Kromě dobrých mechanických vlastností, nízké hmotnosti, odolnosti vůči korozi a neškodné biologické odezvě, kterými se vyznačuje, se jeví jako vhodný materiál pro osteointegraci. Osteointegrace je začlenění implantátu do kosti a následné spojení s kostí, kdy převládá aktivita kostních buněk osteoblastů. Důležitá je především ta část povrchu implantátu, která přichází do přímého kontaktu s kostní tkání. Vhodnou povrchovou úpravou lze docílit zlepšení integrace implantátu do kosti. [1] [4]

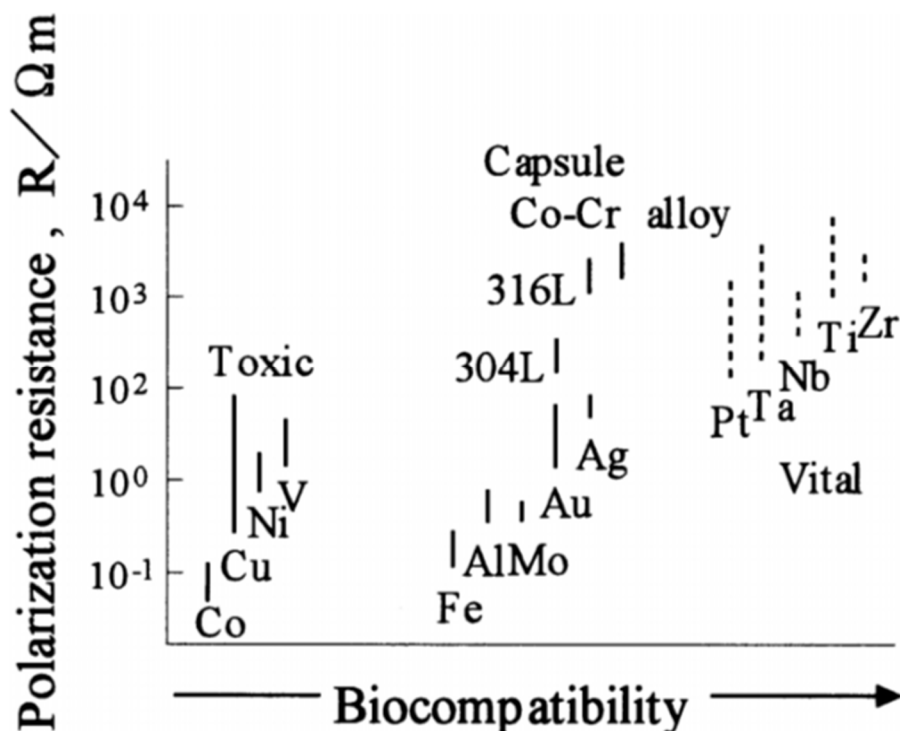
Při aplikaci implantátu však mohou nastat nepříznivé okolnosti, zejména nedostatečná integrace s kostní tkání a vznik infekce. Dále může dojít k opotřebení či zlomení materiálu či nepřilnutí implantátu. Zároveň je potřeba vyvarovat se vzniku měkké vláknité tkáně mezi kostí a povrchem kovu. Tyto nežádoucí účinky jsou řešeny různými modifikacemi povrchu tak, aby byla zvýšena bioaktivita povrchu. Povrch implantovaného materiálu můžeme upravit dvěma hlavními způsoby podle toho, zda na povrch nanášíme vrstvu nového materiálu, nebo zda měníme strukturu samotného povrchu. [5]

### **1.1.2 Titan a jeho slitiny**

V tkáňovém inženýrství se používají různé materiály, které mají za úkol nahradit tkáň či orgán. Těmito materiály jsou keramika, kompozity, polymery a kovy, které vynikají nad ostatními především svou pevností, a proto nacházejí uplatnění především jako ortopedické implantáty. Naopak nevýhodou kovů je možnost vzniku koroze a s tím související alergické reakce organismu. Alergie na kovy je způsobena uvolňováním iontů tělními tekutinami do okolní tkáně, což vede ke vzniku alergií a zároveň odmítnutí materiálu.

Své specifické místo mezi kovy má právě titan a jeho slitiny, který se využívá jako biomateriál pro konstrukci dentálních a ortopedických implantátů od druhé poloviny 60. let minulého století. V návaznosti na vývoj Ti slitin pro letecký, kosmický a zbrojní průmysl je vyvíjena i řada slitin pro medicínské aplikace, kde je vhodný především díky své vynikající biokompatibilitě, vysoké chemické a korozní odolnosti (viz Obr. 1.1), nízkému modulu pružnosti v tahu, nízké hmotnosti a hustotě ( $4,5 \text{ g/cm}^3$ ) a neškodné biologické odezvě. [6] Titan je prvek alotropní, to znamená, že se může vyskytovat v několika různých strukturálních formách. Ve srovnání s nerezovou ocelí je však

houževnatost titanu nižší. Stejně tak je i titan citlivý na namáhání na stříh. V přítomnosti kyslíku se na povrchu titanu spontánně tvoří ochranná vrstva oxidu, která zaručuje koroziodolnost, biokompatibilitu a nealergické reakce. Tato vrstva je silná jen několik nanometrů. [2]



**Obrázek 1.1:** Závislost polarizačního odporu na biokompatibilitě pro různé kovové prvky. Převzato z [7].

Z obrázku je patrné, že titan má mezi uvedenými kovy největší korozní odolnost a současně je i nejvíce biokompatibilní.

Jako slitina se nejvíce užívá kombinace prvků titan (Ti), hliník (Al) a vanad (V) ve formě Ti-6Al-4V. Avšak při korozí může dojít k uvolnění iontů hliníku a vanadu, které jsou toxické pro lidské tělo. Proto byly vyvinuty nové titanové sloučeniny obsahující niob, nikl, zirkon či tantal. Čistý titan má nižší pevnost, proto se užívá spíše jako dentální implantát. Čistotu titanu lze definovat stupněm čistoty (Grade) podle toho, jaké je procentuální zastoupení jiných prvků, přičemž nejčistší je označen stupněm 1 (Grade-1). [8] Čistý titan lze upravit do struktury nanomateriálu, tzn., že stavební prvky materiálu jsou v rozměrech nanometrů. Bylo zjištěno, že ačkoli má nanostrukturální titan (nTi) stejné biokompatibilní vlastnosti jako komerčně čistý titan (cpTi), má nTi mnohem vyšší pevnostní vlastnosti než jakýkoli jiný kovový materiál aplikovaný pro dentální implantát. [6]

Ke zvýšení bioaktivity a osteointegrace lze zlepšit vlastnosti titanu a jeho slitin mechanickými úpravami (např. pískováním, tryskáním), chemickými metodami (leptáním povrchu) či plazmovým nástřiku hydroxyapatitu.

## 1.2 Povrchové vlastnosti

Mimo vnitřní strukturu materiálu jsou povrchové vlastnosti, jako je chemická struktura povrchu, povrchová topografie, povrchová smáčivost a povrchový náboj zásadní pro úspěšné začlenění implantátu do kosti. Změnou jedné vlastnosti se mohou změnit i vlastnosti ostatní.

### 1.2.1 Chemická struktura povrchu

Chemické složení povrchu je důležité v tom ohledu, že definuje, které funkční skupiny jsou dostupné pro interakci s biomolekulami. Podle typu vzorku mohou mít biomolekuly různou afinitu pro různé povrchy. Modifikace chemického povrchu je nejpřímější cesta, jak ovlivnit proteinovou adsorpci a buněčné chování. Zároveň lze změnit i povrchovou smáčivost a elektrický náboj. Jedna z častých metod chemické modifikace povrchu je potahování. V případě titanových povrchů je biologický efekt spojen hlavně s vytvořením  $\text{TiO}_2$  vrstvy. Přidání iontů vápníku, síry, fosforu či magnézia k této vrstvě elektrochemickou oxidací se rozšířeně užívá k modifikaci implantátů. Protože je osteointegrace přímo spojena s tloušťkou  $\text{TiO}_2$  vrstvy, vykazuje tlustá vrstva, jako například u anodizovaného povrchu, silnou buněčnou odpověď tím, že je zvýšena tvorba kostní tkáně na povrchu implantátu. [2]

### 1.2.2 Topografie povrchu

Topografie povrchu implantátu je klíčový faktor ovlivňující proliferaci, diferenciaci a adhezi buněk na implantát. Povrchová topografie je charakterizována sledem výstupků a prohlubní, které můžeme kvantifikovat pomocí dvourozměrných či trojrozměrných parametrů. Požadavek na topografické vlastnosti je inspirován procesem remodelace kostí, kdy stará kost poskytuje vysoce topografický povrch, do kterého se vytváří nová kostní hmota. Substráty s více topografickými vlastnosti nabízí větší povrch pro možné interakce s proteiny. Povrchová drsnost poskytuje počáteční stabilizaci do té doby, než se kost připojí k implantátu. [9]

Povrchová drsnost implantátu se může pohybovat v rozsahu od milimetrů po nanometry, můžeme tak rozlišit makrodrsnost (100  $\mu\text{m}$  – milimetry), mikrodrsnost (100 nm – 100  $\mu\text{m}$ ) a nanodrsnost (méně než 100 nm), přičemž každá má specifický vliv na buněčnou odpověď. [10] Makrodrsnost povrchu upevňuje implantát v těle a zároveň nijak nebrání adhezi a usedání buněk na povrch materiálu. Mikrodrsnost maximalizuje propojení mezi kostí a povrchem implantátu. Výsledkem studií, které zkoumaly mikrodrsnost povrchů implantátu je, že podporuje diferenciaci osteoblastů, které jsou

důležité pro osteointegraci, a zároveň snižuje tvorbu a aktivitu osteoklastů. Důležitým poznatkem je také to, že exprese osteoblastových genů a mineralizace jsou více pozitivní na mikrodrsném povrchu než na hladkém. Na druhé straně je zde snižená přilnavost buněk, neboť velikost adhezní plochy buněk je limitována reliéfem povrchu materiálu. [11] [12] Povrchový profil v rozměrech nanometrů hraje důležitou roli v adsorbci proteinů, adhezi osteoblastů, a tudíž stupni osteointegrace. Přítomnost nanostruktury pozitivně působí na buňky lidských osteoblastů a zvyšuje jejich adhezi, proliferaci a diferenciaci. Abychom dosáhli zlepšení kontaktu na rozhraní kosti a implantátu, byly použity různé metody, aby byl vytvořen povrch s mikrodrsnými a nanodrsnými vlastnostmi. Některé z těchto metod zahrnují pískování, leptání, anodizování a plazmové postřiky. Buněčná odpověď na mikrodrsné či nanodrsné vlastnosti povrchu závisí hlavně na typu a velikosti buněk. [2]

Buňky nabývají různých tvarů podle toho, na jakém povrchu jsou kultivovány. Když jsou například kultivovány na anizotropním kartáčovaném povrchu, jsou buňky orientovány podél jednotlivých zářezů. Na plochem povrchu nabudou oválného tvaru bez prodlužování. Anizotropní či izotropní vlastnosti nezpůsobují významný rozdíl v kostním spojení a osteointegraci. [13]

Studie z roku 2015 se zabývala vyhodnocením osteointegrace šroubů vyrobených z nanotitanu. Pokusné skupině králíků byly implantovány tyto šrouby do femuru a tibie. Po 12 týdnech byly subjekty usmrceny a vyhodnocena osteointegrace. Výsledky ukázaly, že došlo k perfektní kostní integraci, což vede k závěru, že nanotitan je vhodný pro použití v implantologii. [14]

Ve studii z roku 2014 při zkoumání proliferace a osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk na porézním titanovém povrchu a kontrolním polystyrenovém, nebyly za stejných podmínek zřetelné významné rozdíly mezi oběma skupinami. Závěrem tedy je, že porézní titanové povrchy jsou vhodným kandidátem pro proliferaci a diferenciaci kmenových buněk kostní dřeně, které mohou poskytnout alternativu k použití autologních a alogenních kostních štěpů v ortopedické chirurgii. [15]

Při zavádění implantátu se však stále vyskytují problémy nedostatečné integrace kostní tkáně a zanesení infekce do implantátu. Aby se zvýšila úspěšnost přijetí implantátu, bylo by zapotřebí potlačit bakteriální kolonie a podpořit funkci a výskyt osteoblastů. Stále však není zcela objasněno, jak nejlépe upravit implantát pro optimální adhezi kostních buněk a nejefektivnější bezproblémové nahrazení kostní tkáně.

### **1.2.3 Povrchový náboj a energie**

Povrchový náboj je další z hlavních vlastností kovů, která ovlivňuje proteinovou adsorbci a buněčnou přilnavost. Pozitivně nabitě povrchy zvyšují buněčnou adhezi, zatímco negativně nabitě povrchy ji potlačují. Záleží také na hustotě povrchového náboje.

Proteiny se adsorbují na pozitivně nabitým povrchu, a tím způsobují přilnutí osteoblastů a jejich rozšíření. [16]

Na povrchu materiálu v důsledku chybějících přitažlivých interakcí povrchových molekul vzniká povrchová energie. Povrchové atomy se snaží snížit volnou energii spojením s dostupnými molekulami jako je vzduch či voda, aby dosáhly výhodnějšího energetického stavu. Proto má obvykle povrch materiálu jiné chemické složení než zbytek hmoty. Velmi známým příkladem je přítomnost oxidových vrstev téměř na každém kovu. Termín povrchová energie je úzce spojen se smáčivostí. Zatímco povrchová energie popisuje interakce s velkou škálou materiálů, povrchová smáčivost popisuje interakce pouze s kapalinami. A udává se obvykle pomocí kontaktního úhlu. Materiál s vyšší povrchovou energií může tvořit více interakcí s kapalinou, a tudíž bude více hydrofilní. Smáčivost je důležitá pro adsorpci proteinů a adhezi buněk. Když je implantát umístěn do lidského těla dojde v první řadě ke smáčení implantátu fyziologickými tekutinami. To následně řídí adsorpci proteinů následovanou napojením buněk na implantát. Tedy smáčivost je považována za důležité kritérium kompatibility biomateriálu. Faktory, které ji ovlivňují jsou: chemické složení, topografie a povrchový náboj. Několik studií prokázalo, že mírně smáčivé povrchy jsou příznivé pro adhezi a růst buněk. To může být způsobeno zvýšenou adsorpcí proteinů fibronektinu a vitronektinu na mírně smáčivé povrchy oproti hydrofilním a hydrofobním povrchům. Očekává se, že když povrch brání adsorpci proteinů, je poté i buněčný růst špatný, protože buňky interagují s povrchem hlavně skrze adsorbovanou vrstvu proteinů. [2]

#### 1.2.4 Povrchová úprava

Základní princip buněčné biologie říká, že zásadní vliv na chování buňky má to, s čím přijde buňka do styku. V závislosti na vhodném povrchu lze zlepšit či potlačit proteinovou adsorpci, buněčnou adhezi, proliferaci či diferenciaci.

Předmětem vědeckých studií zabývajících se adhezí osteoblastů na materiál, je především způsob modifikace povrchu implantátu, tak aby byla zvýšena diferenciaci a proliferaci kmenových buněk. Na rozdíl od vnitřní struktury materiálu, která určuje mechanickou integritu implantovaného materiálu, hraje povrch, který přichází do přímého kontaktu s tkání důležitou roli při reakcích vznikajících na rozmezí kost-implantát. Bylo zjištěno, že povrchové vlastnosti jako je topografie a smáčivost mají velký vliv na růst buněk a jejich diferenciaci. Podle řady studií bylo prokázáno, že na hrubších površích je zvýšena buněčná adheze a proliferace. [4] [8]

Potahování povrchu vhodným povlakem, který zvyšuje žádoucí účinky, je jedna z běžně užívaných metod. V několika studiích byly učiněny závěry, že potahování povrchu materiálu vrstvou oxidu titaničitého ( $\text{TiO}_2$ ) zlepšuje přilnavost a růst mezenchymálních kmenových buněk a jejich diferenciaci. [17] [18] Dále bylo zjištěno, že při aplikaci autologních osteoblastů jako povlak titanových implantátů, dochází k urychlení a zvýšení osteointegrace. [19] V současné době se používá potahování pomocí



aplikace plazmového nástřiku hydroxyapatitem, který je hlavní neorganickou složkou kostní tkáně. Hydroxyapatit je látka bioaktivní a biokompatibilní a díky tomu, že je zastoupen v lidské kosti, není považován za cizí materiál a dochází k vzájemnému prorůstání. Vrstva oxidu titaničitého mezi povrchem titanu a hydroxyapatitu zlepšení přilnavostí těchto dvou vrstev. [20]

Dalším možností, jak zlepšit osteointegraci na povrchu implantátu, je vytvoření  $\text{TiO}_2$  nanotrubicové struktury pomocí anodické oxidace. Ta se jeví jako velmi vhodná metoda, neboť umožňuje zrychlenou adhezi a diferenciaci osteoblastů a vykazuje silné spojení s kostí, neboť nanotrubicová struktura vrůstá kolmo do základního materiálu. Struktura podporuje růst hydroxyapatitu, který hraje důležitou roli při osteointegraci. [1] Nanotrubice zvyšují kontaktní plochu a buňky tak mají možnost vytvořit hustou strukturu na povrchu materiálu. Průměr trubek se pohybuje od desítek až po stovky nanometrů a podstatně ovlivňuje interakci s kostními buňkami. Nejvyšší stupeň adheze osteoblastů však nastal dle studie při průměru 30 nm. [21] Kvůli riziku zanesení bakteriální infekce na povrch, bylo navrženo vyplnění nanotrubic léčivem, které by potlačovalo zánětlivý proces. Ukázalo se, že výplň trubek antibiotikem gentamicinem snižuje adhezi bakterií a zároveň zvyšuje diferenciaci osteoblastů. [22]

Mezi nejčastěji užívané techniky úprav patří pískování, což je technika, která vede ke vzniku porózní vrstvy díky srážkám s mikroskopickými částicemi. Pro pískování se používají nejčastěji částice oxidu titaničitého, oxidu hlinitého či uhlíkatu vápenatého. Další užívanou metodou je chemické leptání, které rozrušuje přirozenou vrstvu oxidu na povrchu kovu a umožňuje například pomocí silných kyselin vytvořit síť nano-prohlubní na titanovém povrchu.

Elektrochemické metody spočívají v ponoření implantátu do roztoku elektrolytu a propojení s elektrickým obvodem. Do těchto metod spadá anodizace (také anodická oxidace). Ta spočívá ve vytvoření porózního povrchu pomocí oxidové vrstvy, která zvyšuje korozivzdornost. Bylo prokázáno, že nanostrukturovaný povrch vytvořený anodizací zvyšuje navázání a proliferaci osteoblastů. Napětí a stejnosměrný proud jsou používány k zesílení oxidové vrstvy na povrchu implantátu. Mimo potahování povrchu vrstvou oxidu se používá i vrstva karbonu ve formě nanokrystalického diamantu (diamond-like carbon (DLC)). Tato vrstva dělá povrch více biokompatibilnější a do jisté míry brání vytvoření vazivové vrstvy. DLC povrch se vyznačuje vysokou odolností vůči opotřebení a korozi, chemickou inertností a biokompatibilitou. [2]

### 1.2.5 Kmenové buňky a stavba kosti

Významnou roli hraje při osteointegraci chování kmenových buněk, které je potřeba diferencovat do osteoblastů a zajistit jejich adhezi na implantát. Kmenové buňky jsou primární nediferencované buňky, které mají schopnost diferencovat se na jakýkoliv jiný typ buněk. To znamená, že mají schopnost vytvářet nové buňky a opravovat poškozené nebo opotřebované části orgánů a tkání v těle. Zároveň mohou obnovovat i

samy sebe. Kmenové buňky dělíme podle jejich diferenčního potenciálu na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a progenitorové. Totipotentní buňky mají schopnost se přeměnit na jakýkoli typ buněk jedince. Pluripotentní se mohou diferencovat do všech tří zárodečných listů, ektodermu, endodermu a mesodermu, tedy do jakékoliv buňky lidského těla, ne však do buňky totipotentní. Buňky multipotentní se diferencují pouze do buněk příbuzných danému typu buňky a progenitorové se přeměňují pouze na jediný typ buněk, ale je jim ponechána schopnost sebeobnovy. Mezi buňky multipotentní patří mezenchymální kmenové buňky (MSC), které mají schopnost sebeobnovy a zároveň diferenciaci do osteoblastů, které jsou klíčové při stavbě kosti. [23] Pro správné uchycení implantátu v kostní tkáni, je zapotřebí zajistit co možná největší adhezi a proliferaci osteoblastů na povrchu implantovaného materiálu.

Samotná kostní tkáň se skládá z buněk a mezibuněčné hmoty. Osteoblasty jsou buňky, které vytvářejí základní kostní hmotu (matrix), osteocyty jsou buňky obklopené základní kostní hmotou, kterou již dále netvoří a zároveň se podílejí na regulaci hladiny vápníku. Osteoklasty jsou buňky zodpovědné za odbourávání kostní hmoty. Posledním typem buněk jsou osteoprogenitorové, které jsou součástí okostice a nitrookostice. Mezibuněčná hmota je složena z organické složky (kolagenní fibrily a amorfni hmota) a složky anorganické (fosforečnan vápenatý, hydroxyapatit a uhličitán vápenatý). Kostní tkáň můžeme rozdělit na fibrilární a lamelární kost. Kost fibrilární je tvořena nepravidelně uspořádanými kolagenními vlákny a vyskytuje se během vývoje kostí. V dospělosti pak převládá lamelární kost, která je uspořádána do plochých plášťových vrstev (lamel) nebo do válcovitých soustav (osteonů). Povrchová vrstva kosti je tvořena hutnou kostní tkání a vnitřní systém je vytvořen z trámčité neboli spongiózní kostní tkáně. Při zavádění implantátu hraje důležitou roli právě kvalita kosti, tzn. její hustota. [24]

### **1.2.6 Interakce na povrchu substrátu**

Jakmile je biomateriál implantován do těla, přichází do přímého styku s tělními tekutinami, které obsahují různé typy buněk, iontů a molekul jako proteiny, polysacharidy a enzymy. První molekula, která přichází do styku s povrchem v řádech nanosekund, je molekula vody. Po hydrataci dochází na povrchu k proteinové adsorpci (např. fibronektinu a vitronektinu), která trvá obvykle sekundy až hodiny. Při adsorpci dochází k takzvanému Vormanovu efektu, což znamená, že proteiny navázané na povrch jsou nahrazovány jinými proteiny, které mají vyšší afinitu k povrchu. Následně dochází k adhezi buněk, které však neadherují na samotný povrch, ale na již vytvořenou adsorbovanou vrstvu proteinů. Dochází k diferenciaci a růstu buněk, děje se tak obvykle v minutách až dnech. Buňky komunikují nepřímo s povrchem skrze vrstvu adsorbovaných proteinů, které fungují jako prostředník mezi povrchovými vlastnostmi materiálu a buněčnými receptory. Adheze buněk je ovlivněna interakcemi mezi proteiny extracelulární hmoty, proteiny buněčné membrány a proteiny cytoskeletu, povrchovou chemickou strukturou a topografií povrchu. Tyto proteiny se váží na membránové

receptory-integriny, které doručují signál regulující růst, adhezi, diferenciaci či smrt buňky. Integriny vnímají extracelulární hmotu a povrch materiálu a účastní se procesů jako je tvorba tkáně, buněčná diferenciacie či imunitní a zánětlivá reakce. Tyto interakce ve výsledku ovlivní, zda dojde k začlenění do tkáně nebo vytvoření vazivové vrstvy. [25]

### 1.3 Cíle práce

Cílem práce je charakterizovat a srovnat titanové substráty s různou povrchovou úpravou z hlediska vlivu drsnosti a smáčivosti na adhezi kmenových buněk a následnou osteointegraci. Smáčivost charakterizovaných povrchů je hodnocena na základě velikosti kontaktního úhlu přisedlé kapky. Drsnost titanových substrátů je určena ze snímků, získaných pomocí skenovací elektronové mikroskopie.

Dalším cílem práce je navrhnout a vyrobit kultivační komoru pro násadu statických pokusů, aby nedocházelo k natečení buněčné suspenze mimo substrát. Tuto komoru je nutné navrhnout tak, aby všechny její části byly sterilizovatelné a netoxické pro buňky. Tato vlastnost má být ověřena při primárních buněčných pokusech. Vliv povrchových vlastností substrátu na proliferaci kmenových buněk má být hodnocen na základě statických buněčných experimentů, kdy bude hodnocen počet buněk.

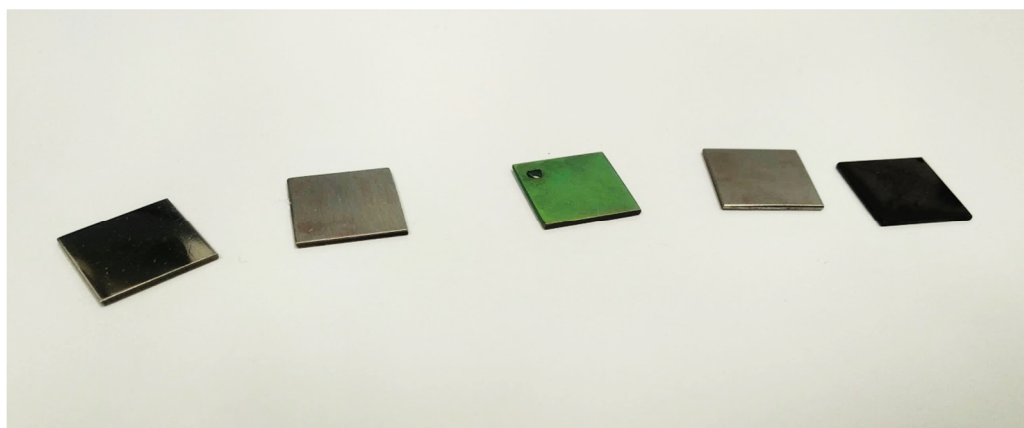
## 2 Metody

### 2.1 Studované typy materiálů

V této práci byly studovány titanové substráty dodané firmou ProSpon (ČR, Kladno) s následujícími povrchovými úpravami (viz Obr. 2.1):

- Leštěný
- Pískovaný
- Kartáčovaný
- DLC
- Anodizovaný

Jako kontrolní povrch bylo použito krycí sklo používané jako standard při buněčných experimentech. Všechny varianty byly dále studovány s plazmovou úpravou i bez ní.



**Obr. 2.1:** Studované typy titanů v pořadí L, K, A, P, D. Foto: autor.

Substráty byly nasnímány skenovacím elektronovým mikroskopem a z obrazových dat byly změřeny parametry drsnosti. Následně byla změřena smáčivost na jednotlivých typech povrchů i s plazmovou úpravou i bez ní. Poté proběhla kultivace buněk v navržené kultivační komoře na jednotlivých typech substrátů. Jednotlivé metody jsou popsány v následujících podkapitolách.

## 2.2 Skenovací elektronový mikroskop (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie je jedna z běžných metod, která se používá k zobrazení povrchové struktury. Umožňuje vytvářet snímky v rozměrech nanometrů. Hlavní výhodou SEM je jednoduché použití a údržba. Mikroskopie je založena na principu úzkého vysokoenergetického paprsku elektronů, který je generován zahříváním wolframového vlákna. Paprsek je zaostřen na povrch zkoumaného vzorku pomocí elektromagnetických čoček a po řádcích skenuje daný povrch. Pomocí detektoru jsou pak snímány sekundární elektrony putující od vzorku a v počítači vznikne výsledný obraz. Aby však bylo možné použít tuto metodu, je potřeba, aby byl vzorek vodivý. [2]

Tímto způsobem bylo nasnímáno i výše uvedených pět zkoumaných titanových neoplazmovaných povrchů při urychlovacím napětí 30 kV a zvětšení 200x a 1000x. Ze získaných dat byla následně určena povrchová drsnost jednotlivých vzorků.

## 2.3 Plazmování

Plazmování je úprava povrchu pomocí ionizovaného plynu, který je složen z iontů a elektronů a vykazuje kolektivní chování. Při plazmování se nemění struktura materiálu, ale dojde pouze ke změně povrchových vlastností. Při této metodě vznikají aktivní částice průchodem plynu plazmovým výbojem. Na povrch se naváží nové funkční skupiny a dojde ke změně povrchové energie, která může mít vliv na povrchové vlastnosti např. smáčivost či přilnavost k jiným materiálům. Pomocí plazmového efektu lze povrch očistit od nečistot, leptat, aktivovat či vytvářet na něm vrstvy.

Úprava povrchů plazmováním probíhala v plazmovacím přístroji značky DIENER ZEPTO, viz Obr. 2.2. Celkem bylo oplazmováno všech pět vzorků titanů a kontrolní sklíčko. Na oplazmovaných površích byla změřena smáčivost a probíhala na nich kultivace buněk.

Použité nastavení:

- Výkon plazmy  $P=60$  W
- Průtok vzduchu  $Q=0,75$  l/hod
- Doba plazmování  $t=20$  min



Obr. 2.2: Plazmovací systém DIENER ZEPTO. Foto: autor.

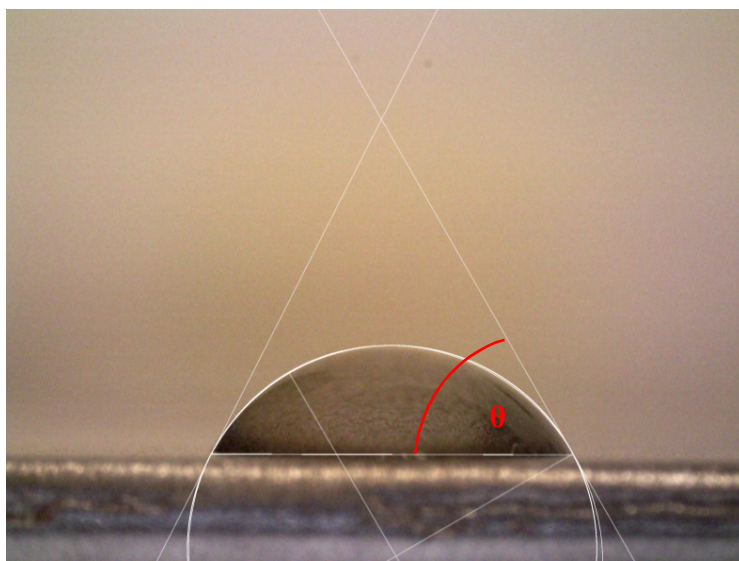
## 2.4 Měření smáčivosti

Když se umístí kapka vody či jiné kapaliny na pevný vzorek, je rozloha plochy, kterou kapka zaujme na povrchu dána právě smáčivostí. Ta se určuje pomocí kontaktního úhlu ( $\theta$ ), jehož velikost nám udává míru přilnavosti kapky k povrchu. Kontaktní úhel je úhel, který svírá tečna k povrchu kapky, vedená v bodě styku kapky s rozhraním. Může nabývat hodnot od  $0^\circ$  (povrch je dokonale smáčivý) do  $180^\circ$  (povrch je dokonale nesmáčivý). Povrchy, jejichž kontaktní úhel je nižší než  $30^\circ$  označujeme jako hydrofilní, zatímco povrchy, jejichž kontaktní úhel je větší než  $90^\circ$  označujeme jako hydrofobní. Povrchy, které mají kontaktní úhel mezi těmito velikostmi označujeme jako mírně smáčivé. [8]

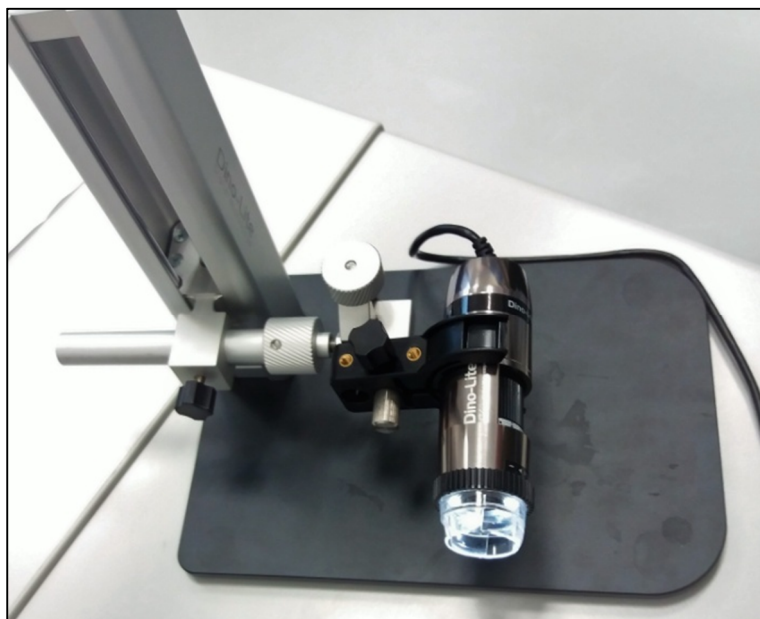
Měření kontaktního úhlu bylo provedeno na pěti titanových destičkách s různými úpravami povrchu, přičemž bylo využito navíc sklíčka jako kontrolního povrchu. Úhel byl určován na površích plazmovaných i neplazmovaných. Na povrchy byla mikropipetou odměřena kapka o objemu  $5 \mu\text{l}$  a pomocí digitálního mikroskopu Dino-Lite vyfotografována. Pro každý jednotlivý povrch proběhlo osm měření, z nichž byly určeny průměry, standardní odchylky a analýza rozptylu. Ke snímání byl využit systém Dino-Lite, viz Obr.2.3. Kontaktní úhel byl dále určen softwarem ImageJ, viz Obr.2.4.

Použité parametry:

- Objem kapky  $V=5 \mu\text{l}$
- Zvětšení mikroskopu  $Z=25,5$



**Obr. 2.3:** Měření kontaktního úhlu pomocí softwaru ImageJ. Foto: autor.



**Obr. 2.4:** Mikroskopický systém Dino-Lite. Foto: autor.



## 2.5 Měření drsnosti

Dle obecné definice je drsnost funkce jakosti povrchu, tedy odpor proti smýkání jiného tělesa. Jedná se o geometrickou technickou veličinu, definovanou jako souhrn nerovností s relativně malými vzdálenostmi. Vlnitost povrchu se však do drsnosti nezahrnuje. Aby bylo možné oddělit vlnitost od drsnosti, používá se filtr Cut-off (mezí vlnová délka) pro toto oddělení. [26]

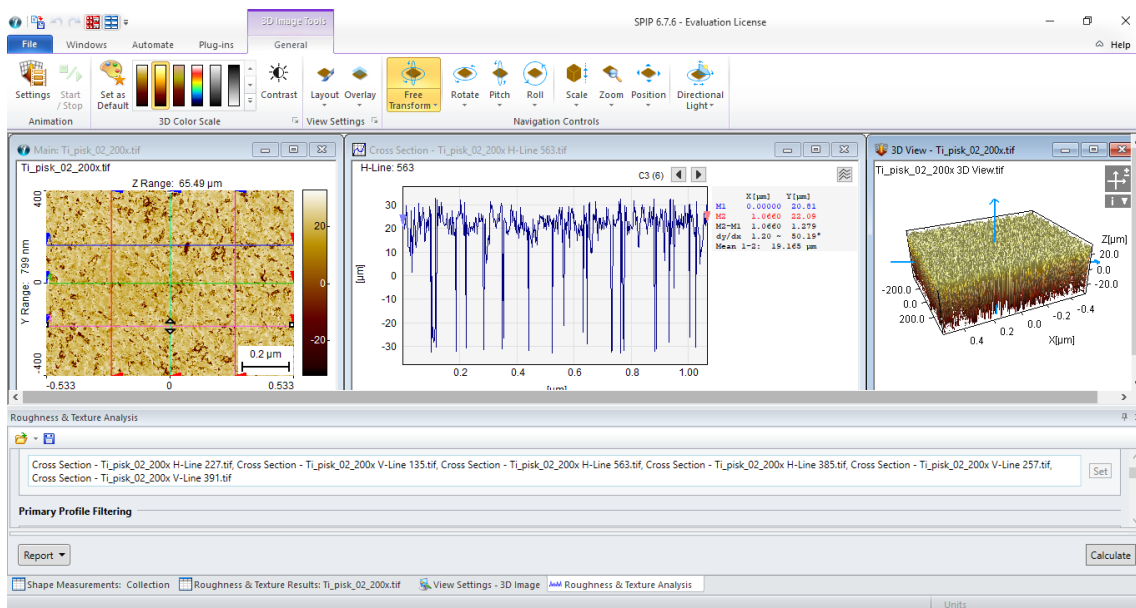
Drsnost substrátů byla měřena na snímcích, pořízených SEM při zvětšení 200x a 1000x. Jednotlivé parametry byly určeny pomocí softwaru SPIP verze 6.7.6 (Obr. 2.5). Měřeny byly parametry profilu (2D) – R-parametry a parametry oblasti (3D) – S-parametry. U R – parametrů bylo zvoleno rovnoměrně deset profilů jednoho povrchu, ze kterých byl určen průměr.

### Měřené R-parametry

- $R_a$  ( $\mu\text{m}$ ) – průměrná aritmetická úchylka profilu je aritmetický průměr absolutních hodnot výšek od střední čáry profilu.
- $R_q$  ( $\mu\text{m}$ ) – průměrná kvadratická úchylka profilu je kvadratický průměr absolutních hodnot výšek od střední čáry profilu.
- $R_z$  ( $\mu\text{m}$ ) – největší výška profilu je rozdíl maximální a minimální výšky základní délky profilu.
- $R_t$  ( $\mu\text{m}$ ) – celková výška profilu je rozdíl maximální a minimální výšky celkové délky profilu.
- $R_{sm}$  ( $\mu\text{m}$ ) – průměrná šířka prvku profilu je aritmetický průměr prvků profilu. [27]

### Měřené S-parametry

- $S_a$  ( $\mu\text{m}$ ) – průměrná aritmetická výška povrchu je aritmetický průměr absolutních hodnot výšek od střední hladiny povrchu.
- $S_q$  ( $\mu\text{m}$ ) – průměrná kvadratická výška povrchu je kvadratický průměr absolutních hodnot výšek od střední hladiny povrchu.
- $S_{sk}$  (-) – šikmost povrchu vyjadřuje asymetrii distribučního histogramu.
- $S_{ku}$  (-) – špičatost povrchu vyjadřuje koncentraci vrcholů na dané ploše.
- $S_y$  ( $\mu\text{m}$ ) – maximální výška je rozdíl maximální a minimální výšky na zkoumané ploše.
- $S_{ds}$  ( $1/\mu\text{m}^2$ ) – hustota vrcholů je počet lokálních maxim na jednotku plochy.
- $S_{dr}$  (%) – poměrná rozvinutá styková plocha vyjadřuje přírůstek mezistranové plochy k celkové ploše. [27]

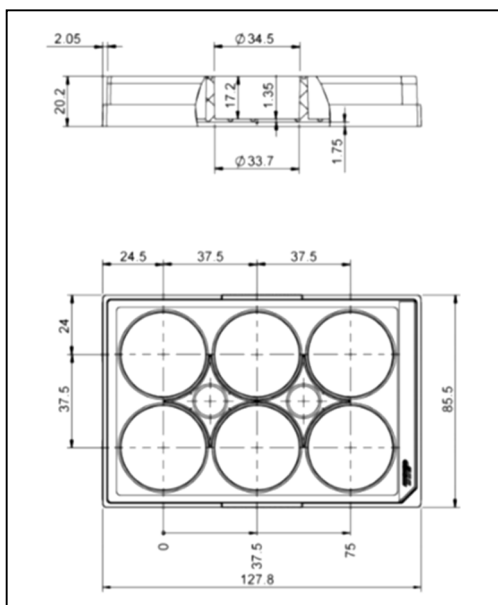


**Obr. 2.5:** Softwarové prostředí SPIP 6.7.6. Foto: autor.

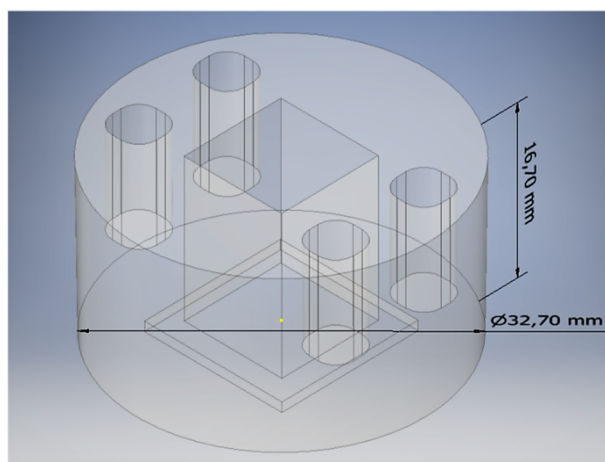
## 2.6 Návrh kultivační vložky a komory

Pro první buněčný pokus byla navržena kultivační vložka tak, aby se dala vložit do šestijamkové kultivační desky firmy Techno Plastic Products AG, viz Obr. 2.6. Vložka měla plnit účel stabilizace titanového substrátu a zároveň bránit natečení buněčné suspenze mimo substrát. Proto bylo zapotřebí vytvořit takovou vložku, která bude těsně doléhat do jamky a zároveň na titanový substrát. Pro snadnější uchycení a umístění vložky do jamky, byly vytvořeny otvory pro uchopení pinzetou ve svrchní části vložky. Vložka byla vyrobena pomocí technologie 3D tisku z materiálu ABS, který je biokompatibilní, sterilizovatelný a tedy netoxický k buňkám. Na rozdíl od následně navržené komory se navržená vložka skládala z jediného kusu a byla tak jednodušší na výrobu i následné použití.

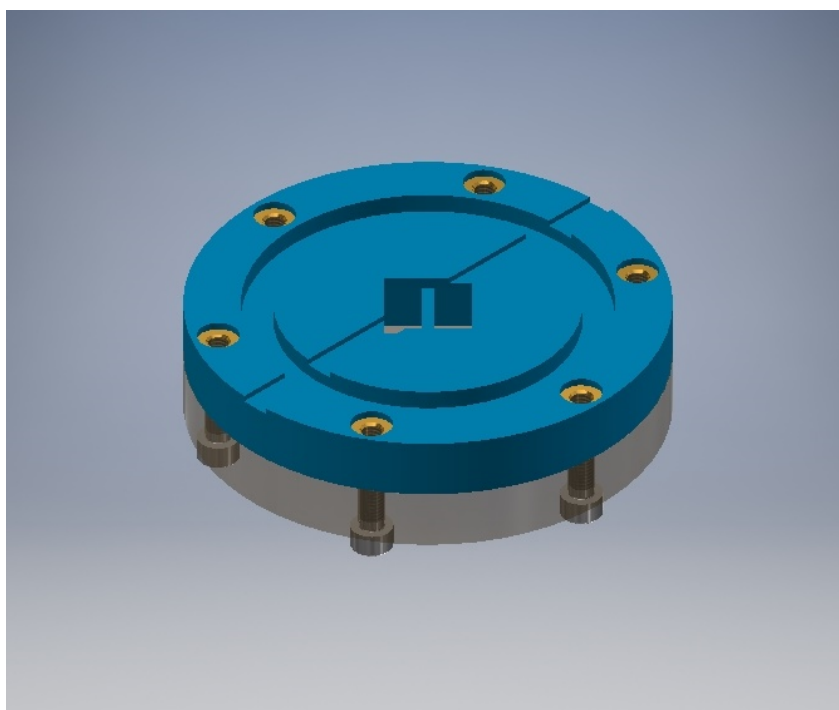
Pro další buněčné pokusy byla navržena kultivační komora, která se již skládá z vrchní a spodní části, které se dají sešroubovat k sobě. Titanový substrát lze umístit přímo mezi ně, a je tak více stabilizován. Veprostřed průduchu určeného k nanášení se nachází přepážka, která umožňuje nanést na jeden substrát dva vzorky (například dva typy buněk), tedy je možné stimulovat dva typy vzorků za stejných podmínek. Návrhy obou kultivačních prostředků probíhaly v softwaru Autodesk Inventor, viz Obr. 2.7 a Obr. 2.8 a technické výkresy 1 a 2 v příloze A.



**Obr. 2.6:** Parametry kultivační desky.  
Zdroj: [36] Číselné hodnoty jsou uvedeny v (mm).



**Obr. 2.7:** Návrh kultivační vložky v softwaru Autodesk Inventor. Foto: autor.



**Obr. 2.8:** Návrh kultivační komory v softwaru Autodesk Inventor. Foto: autor.

## 2.7 Kultivace buněk

Kultivace probíhala na deseti různých površích. Povrchy byly před primárními pokusy 30 minut sterilizovány 96% etanolem. V následujících experimentech byly substráty nejprve vyčištěny v 0,4M hydrogenuhličitanu sodném při teplotě 30 °C po dobu 10 min, následně opláchnuty v destilované vodě a poté vysterilizovány v autoklávu po dobu 15 min. Jako buňky byly nasazeny lidské MSC a ASC izolované z prasete (prASC). Celkem byly nasazeny buňky do čtyř dvanáctijamkových kultivačních desek (do dvou desek ASC a do dvou desek prASC). Každá z desek obsahovala šest neoplazmovaných povrchů (leštěný, pískovaný, kartáčovaný, DLC, anodizovaný a kontrolní sklo) a šest stejných oplazmovaných povrchů.

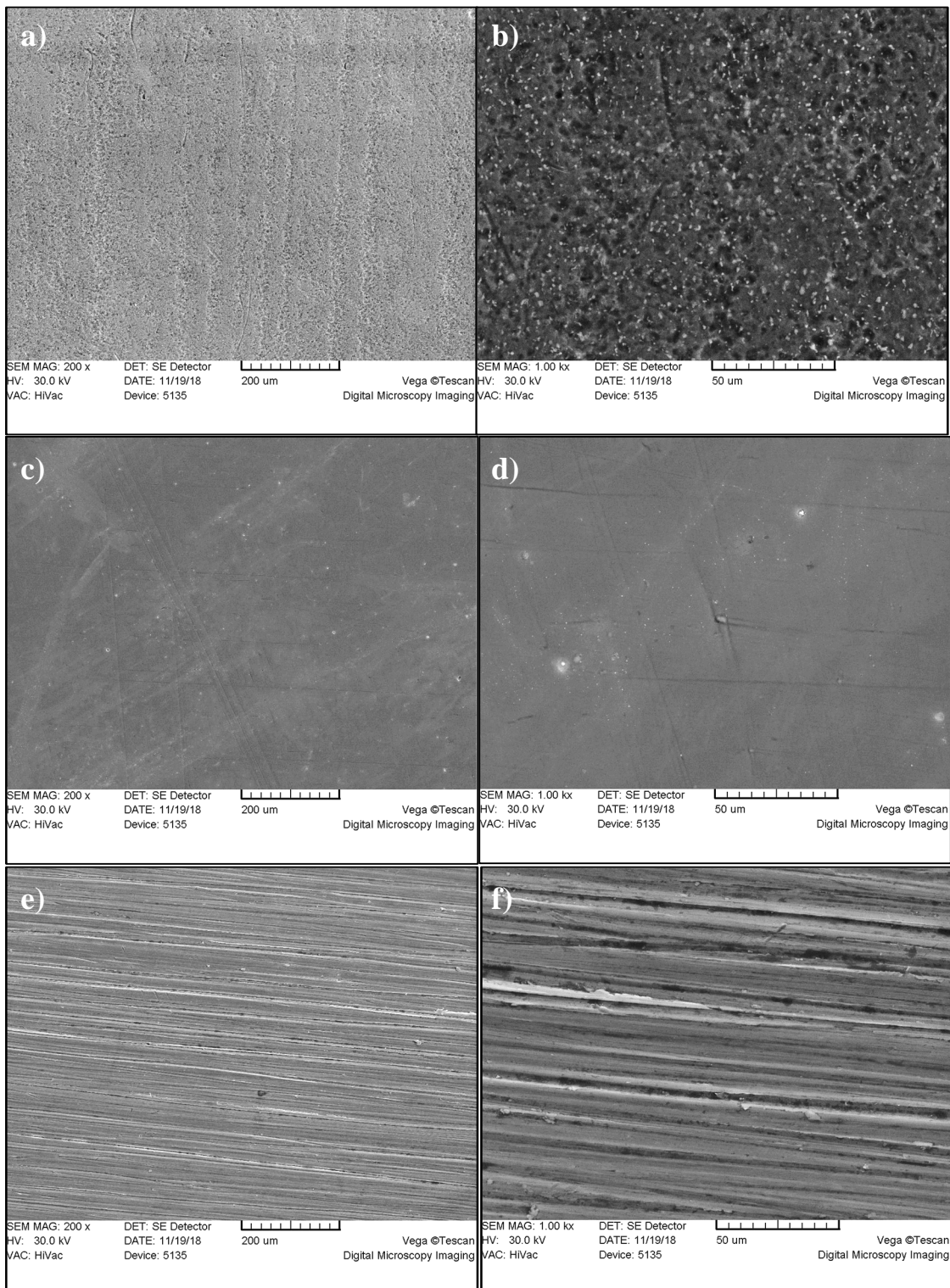
Na tyto jednotlivé povrchy byly aplikovány kmenové buňky v hustotě 70 000 buněk/cm<sup>2</sup>. U MSC byla použita třetí pasáž buněk, u prASC druhá pasáž. Pokusy probíhaly za statických podmínek, jako kultivační médium bylo použito DMEM s přísadkou osteogenních faktorů, tj. DMEM + 10% fetální bovinní sérum, 1% gentamycin, 50 µg/ml kyselina askorbová, 10nM dexamethasone, 10 mM beta-glycerolfosfát. Buňky byly kultivovány po dobu 7 dnů.

Po kultivaci byly všechny vzorky zafixovány metanolem a dále byla nabarvena jádra a cytoskelet barvivy DAPI a phalloidin. Poté byly povrchy nasnímány fluorescenčním mikroskopem. Z jednotlivých snímků byl určen počet buněk na jednotlivých substrátech.

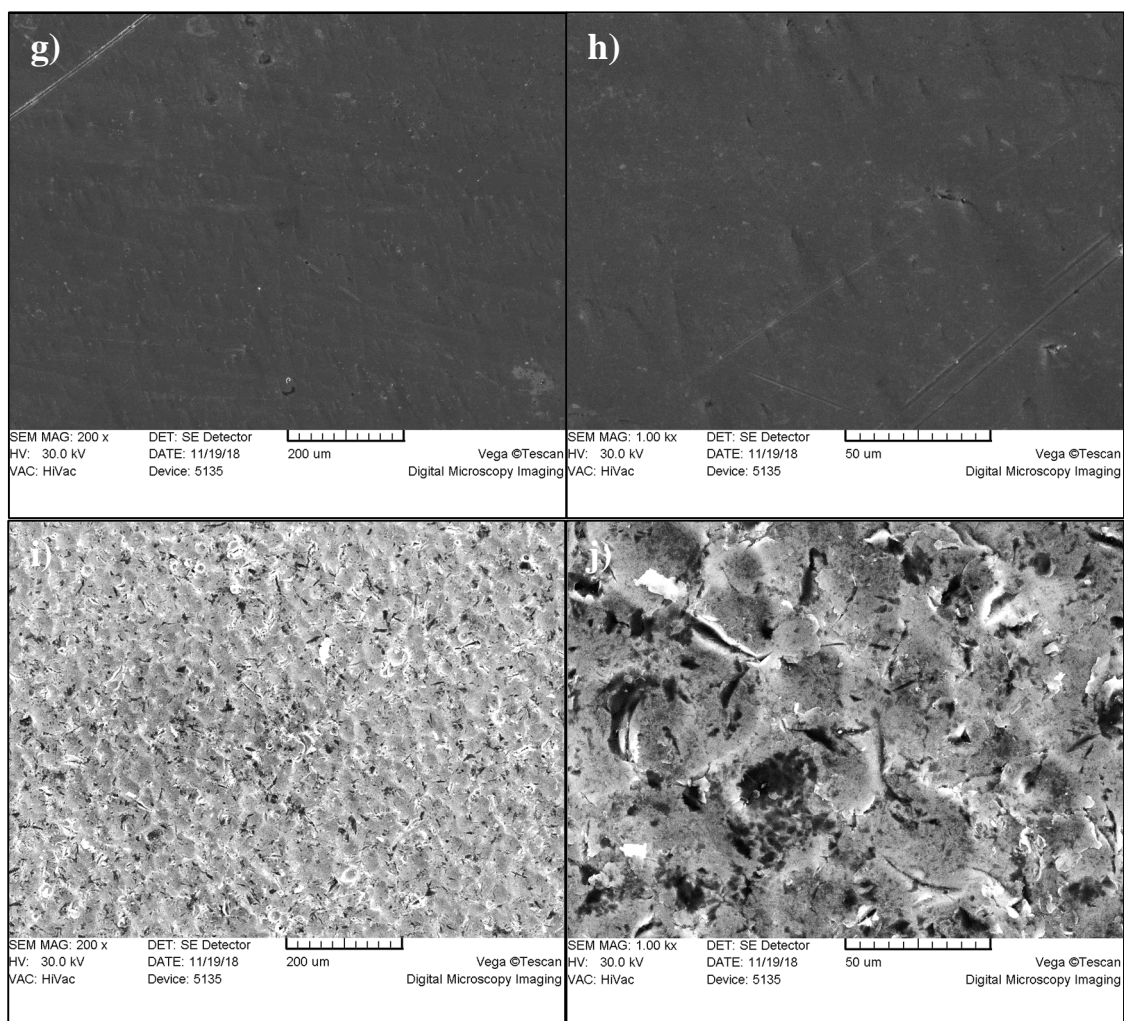
# 3 Výsledky

## 3.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Pomocí SEM byly vyfoceny povrchy při zvětšení 200x a 1000x, viz Obr. 3.1 a 3.2.



**Obr 3.1:** Snímky pořízené SEM: a) Anodizovaný (200x), b) Anodizovaný (1000x), c) DLC (200x), d) DLC (1000x), e) Kartáčovaný (200x), f) Kartáčovaný (1000x). Foto: Ing. Jana Štěpanovská.



**Obr 3.2:** g) Leštěný (200x), h) Leštěný (1000x), i) Pískovaný (200x), j) Pískovaný (1000x).  
Foto: Ing. Jana Štěpanovská.

## 3.2 Měření povrchové drsnosti

Na zkoumaných površích byly naměřeny plošné S – parametry a profilové R – parametry. V následujících tabulkách jsou uvedeny tyto hodnoty pro zvětšení 200x a 1000x, viz Tab. 3.1 až Tab. 3.4.

**Tabulka 3.1:** Plošné parametry drsnosti při zvětšení 200x.

Povrch	<i>S – parametry</i>						
	Sa (μm)	Sq (μm)	Ssk (-)	Sku (-)	Sy (μm)	Sds (1/μm <sup>2</sup> )	Sdr (%)
A	2,74	4,89	-5,73	61,80	66,43	0,05	1202,60
D	0,69	0,98	-5,52	316,90	65,29	0,05	55,90
K	2,28	4,37	-6,17	72,30	65,77	0,04	570,30
P	7,64	13,27	-2,79	10,30	66,19	0,04	5970,60
L	0,50	0,77	-2,32	320,10	65,30	0,05	32,60

A = anodizovaný povrch, D = povrch s DLC úpravou, K = kartáčovaný povrch, P = pískovaný povrch, L = leštěný povrch; (stejně i u následujících tabulek).

**Tabulka 3.2:** Plošné parametry drsnosti při zvětšení 1000x.

Povrch	<i>S – parametry</i>						
	Sa (μm)	Sq (μm)	Ssk (-)	Sku (-)	Sy (μm)	Sds (1/μm <sup>2</sup> )	Sdr (%)
A	2,16	2,91	0,76	6,80	65,35	1,02	3964,00
D	0,63	0,95	-7,35	402,60	65,04	1,44	1051,60
K	2,30	3,22	-0,94	24,90	65,52	1,06	2849,30
P	5,49	8,98	-2,96	15,80	66,24	1,15	48347,00
L	0,55	0,72	0,37	5,60	22,87	1,40	748,40

Následují výsledky profilových R – parametrů drsnosti jednotlivých substrátů při zvětšení 200x a 1000x, viz Tab. 3.3 a Tab. 3.4.

**Tabulka 3.3:** Profilové parametry drsnosti při zvětšení 200x.

Povrch	<i>R – parametry</i>				
	Ra (μm)	Rq (μm)	Rz (μm)	Rt (μm)	Rsm (μm)
A	2,81	5,08	36,98	62,58	30,36
D	0,61	0,97	5,84	14,19	35,90
K	2,14	3,79	21,25	45,48	37,23
P	7,28	12,44	60,91	70,33	40,97
L	0,46	0,66	4,42	7,20	25,59

**Tabulka 3.4:** Profilové parametry drsnosti při zvětšení 1000x.

Povrch	<i>R – parametry</i>				
	Ra (μm)	Rq (μm)	Rz (μm)	Rt (μm)	Rsm (μm)
A	2,18	2,84	14,20	18,68	5,44
D	0,57	0,77	4,42	7,35	3,82
K	1,85	2,91	13,54	27,36	8,70
P	4,42	7,42	39,08	64,15	8,58
L	0,54	0,69	3,72	5,46	4,24

V následující tabulce 3.5 jsou seřazeny titanové povrchy dle naměřených hodnot Ra a Sa z tabulek 3.1 až 3.4 od nejdrsnějšího po nejméně drsný.

**Tabulka 3.5:** Seřazení povrchů dle změřených parametrů drsnosti.

Drsnost	Ra (200x)	Ra (1000x)	Sa (200x)	Sa (1000x)
1	P	P	P	P
2	A	A	A	K
3	K	K	K	A
4	D	D	D	D
5	L	L	L	L



### 3.3 Měření kontaktního úhlu

Smáčivost byla určena pomocí měření kontaktního úhlu na všech studovaných površích oplazmovaných i neoplazmovaných. V následující tabulce jsou předloženy naměřené kontaktní úhly pro jednotlivé povrchy, viz Tab. 3.6. V tabulce 3.7 jsou tyto povrchy seřazeny dle velikosti kontaktního úhlu od nejvíce smáčivého po nejméně smáčivý povrch.

**Tabulka 3.6:** Kontaktní úhly měřené na různých površích s/bez oplazmování.

Povrch	Kontaktní úhel (°)					
	L	D	P	A	K	KS
Neplazm.	65,6±5,5	67,5±4,8	69,3±6,0	79,4±6,1	79,5±4,8	78,2±2,9
Plazm.	19,3±3,0	16,4±1,8	19,7±2,3	13,5±3,8	21,9±4,1	20,6±1,9

Data byla měřena pro každý povrch 8krát a jsou uvedena jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.

**Tabulka 3.7:** Seřazení povrchů dle velikosti kontaktního úhlu.

Smáčivost	Neoplazmované	Plazmované
1	L	A
2	D	D
3	P	L
4	KS	P
5	A	KS
6	K	K

Naměřená data byla podrobena testu normality a F-testu shody rozptylů. Následně byla provedena analýza rozptylu (viz Tab. 3.8 a Tab. 3.9) na hladině významnosti 5 %. Dle nulové hypotézy jsou střední hodnoty všech výběrů stejné. Alternativní hypotéza říká, že se střední hodnoty výběrů liší.

**Tabulka 3.8:** Faktor a analýza rozptylu pro neoplazmované povrchy.

Faktor						
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl		
L	8	525.10	65.64	29.87		
D	8	539.80	67.48	22.59		
P	8	554.40	69.30	36.41		
A	8	634.90	79.36	37.64		
K	8	635.60	79.45	23.03		
KS	8	625.50	78.19	8.35		

ANOVA						
Zdroj variability	Součet čtverců	Rozdíl	Průměrný čtverec	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	1656.67	5	331.33	12.59	1.70E-07	2.44
Všechny výběry	1105.16	42	26.31			
Celkem	2761.83	47				

**Tabulka 3.9:** Faktor a analýza rozptylu pro oplazmované povrchy.

Faktor						
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl		
PA	8	107.60	13.45	14.43		
PD	8	131.20	16.40	3.19		
PL	8	154.60	19.33	9.11		
PP	8	157.40	19.68	5.18		
PS	8	164.80	20.60	3.60		
PK	8	174.90	21.86	16.75		

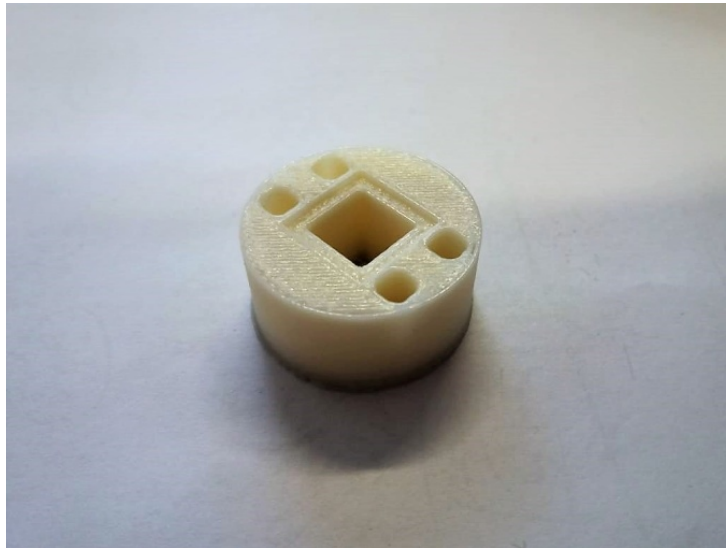
  

ANOVA						
Zdroj variability	Součet čtverců	Rozdíl	Průměrný čtverec	F	Hodnota P	F kritické
Mezi výběry	381.39	5	76.28	8.76	9.41E-06	2.44
Všechny výběry	365.85	42	8.71			
Celkem	747.24	47				

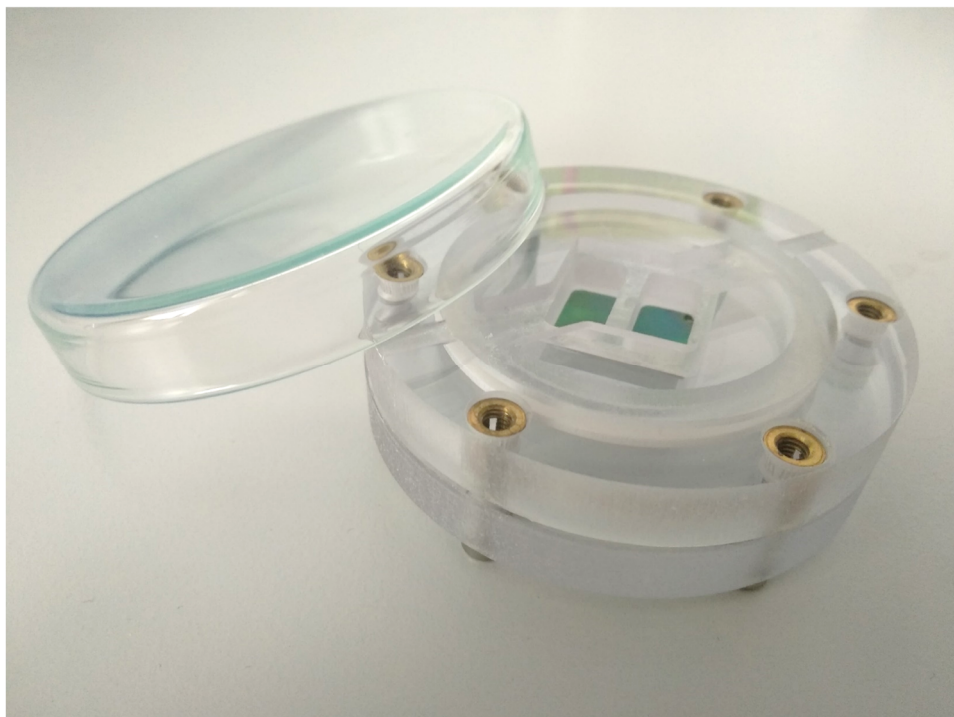
Analýza rozptylu vyhodnotila v obou případech, že se střední hodnoty výběrů liší. F kritické bylo v obou případech nižší než F. Lze tedy konstatovat, že na hladině významnosti 5 % zamítáme nulovou hypotézu, a přijímáme alternativní, tedy že velikost kontaktního úhlu závisí na povrchové úpravě titanového substrátu.

### 3.4 Kultivační vložka a komora

Kultivační vložka byla navržena dle rozměrů tak, aby pasovala do šestijamkové kultivační desky. Dle návrhu byla vložka vytisknuta, viz Obr. 3.3. Pro další buněčné pokusy byla navržena komora (Obr. 3.4), která byla následně ověřena při kultivaci.



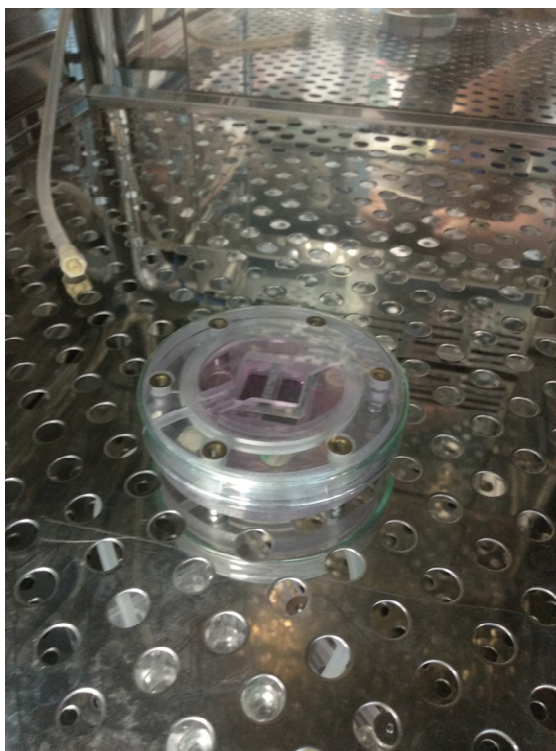
**Obr 3.3:** Vytiskřená kultivační vložka. Foto: autor.



**Obr 3.4:** Vytiskřená kultivační komora. Foto: autor.

### 3.5 Kultivace buněk

Kultivace probíhala za statických podmínek v navržené komoře (viz Obr. 3.5) Po experimentu byly jádra buněk a cytoskelet nabarveny a vyfoceny při desetinásobném zvětšení (viz Obr. 3.6, Obr. 3.7, Obr. 3.8, Obr. 3.9). Z průměru šesti snímků byly spočteny buňky pro jednotlivé povrchy na zorné pole (viz Tab. 3.10 a Tab. 3.11).



**Obrázek 3.5:** Titanový substrát při kultivaci v komoře. Foto: autor.

**Tabulka 3.10:** Počet buněk prASC naměřený na jednotlivých vzorcích.

Povrch	A	D	K	L	P	KS
Plazm.	377,2±16,8	238,8±39,4	333,2±43,0	369,8±40,5	314,0±21,4	299,3±42,1
Neplazm.	303,0±29,7	388,2±29,8	373,8±38,7	310,0±21,6	278,5±31,2	319,0±18,9

**Tabulka 3.11:** Počet buněk MSC naměřený na jednotlivých vzorcích.

Povrch	A	D	K	L	P	KS
Plazm.	80,5±30,2	235,5±34,7	55,17±34,9	259,0±39,4	246,2±34,4	253,8±26,2
Neplazm.	143,8±28,7	357,5±41,3	154,8±38,1	184,5±43,4	240,3±34,0	232,2±29,2

Naměřená data byla podrobena testu normality a F-testu shody rozptylů. Následně byla provedena analýza rozptylu (viz Tab. 3.12 a Tab. 3.13) na hladině významnosti 5 %. Dle nulové hypotézy jsou střední hodnoty všech výběrů stejné. Alternativní hypotéza říká, že se střední hodnoty výběrů liší

**Tabulka 3.12:** Faktor a analýza rozptylu pro buňky prASC.

Faktor				
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl
AN	6	1818.00	303.00	881.60
AP	6	2263.00	377.17	280.57
DN	6	2329.00	388.17	887.77
DP	6	1433.00	238.83	1550.97
KN	6	2243.00	373.83	1496.17
KP	6	1999.00	333.17	1850.57
LN	6	1860.00	310.00	468.40
LP	6	2219.00	369.83	1643.37
PN	6	1671.00	278.50	974.70
PP	6	1884.00	314.00	458.40
PS	6	1796.00	299.33	1775.07
NS	6	1914.00	319.00	358.80

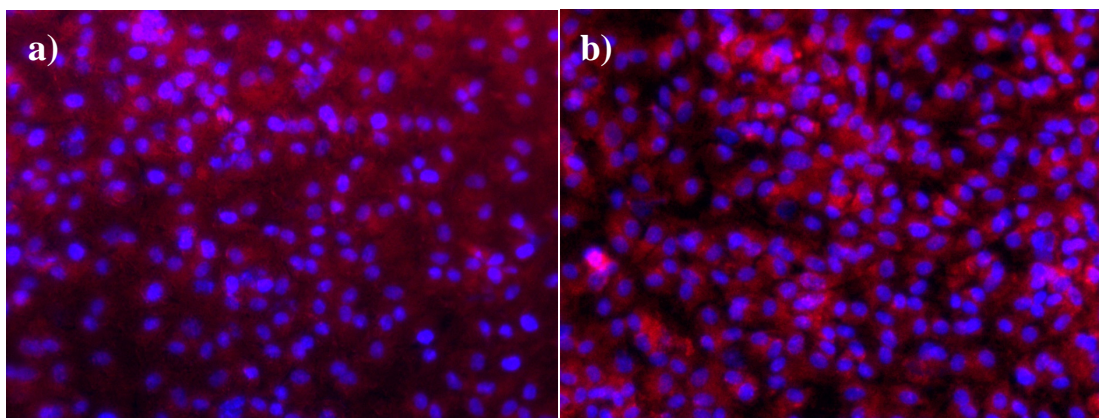
ANOVA						
Zdroj variability	Součet čtverců	Rozdíl	Průměrný čtverec	F	Hodnota P	F kritické
Mezi výběry	133695.49	11	12154.14	11.55	3.61E-11	1.95
Všechny výběry	63131.83	60	1052.20			
Celkem	196827.32	71				

**Tabulka 3.13:** Faktor a analýza rozptylu pro buňky MSC.

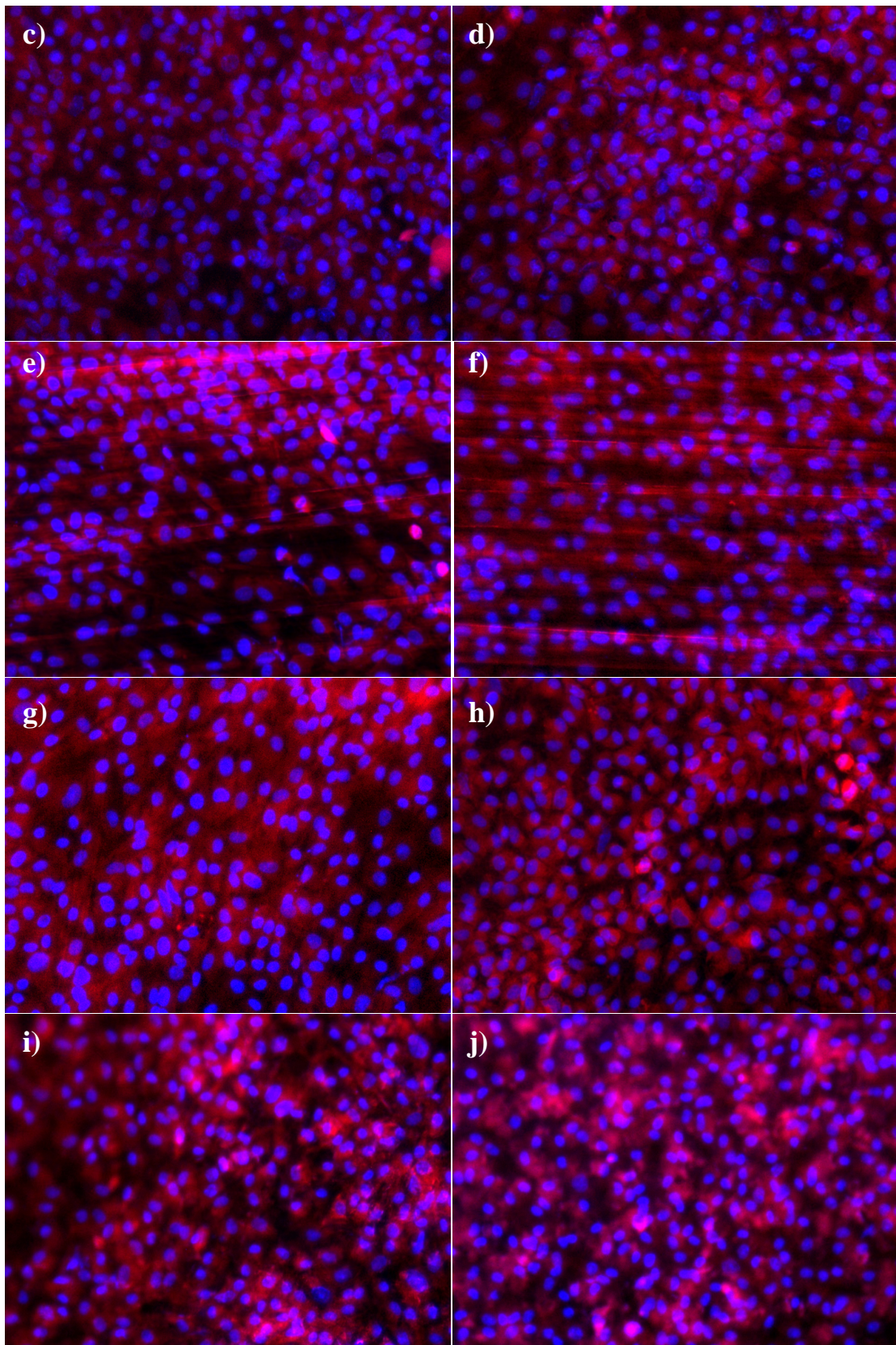
Faktor				
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl
AN	6	863.00	143.83	821.37
AP	6	483.00	80.50	915.50
DN	6	2145.00	357.50	1707.50
DP	6	1413.00	235.50	1205.90
KN	6	929.00	154.83	1448.17
KP	6	331.00	55.17	1214.57
LN	6	1107.00	184.50	1883.90
LP	6	1551.00	258.50	1556.30
PN	6	1477.00	246.17	1181.77
PP	6	1442.00	240.33	1157.87
PS	6	1523.00	253.83	684.97
NS	6	1393.00	232.17	850.97

ANOVA						
Zdroj variability	Součet čtverců	Rozdíl	Průměrný čtverec	F	Hodnota P	F kritické
Mezi výběry	466311.82	11	42391.98	34.77	6.17E-22	1.95
Všechny výběry	73143.83	60	1219.06			
Celkem	539455.65	71				

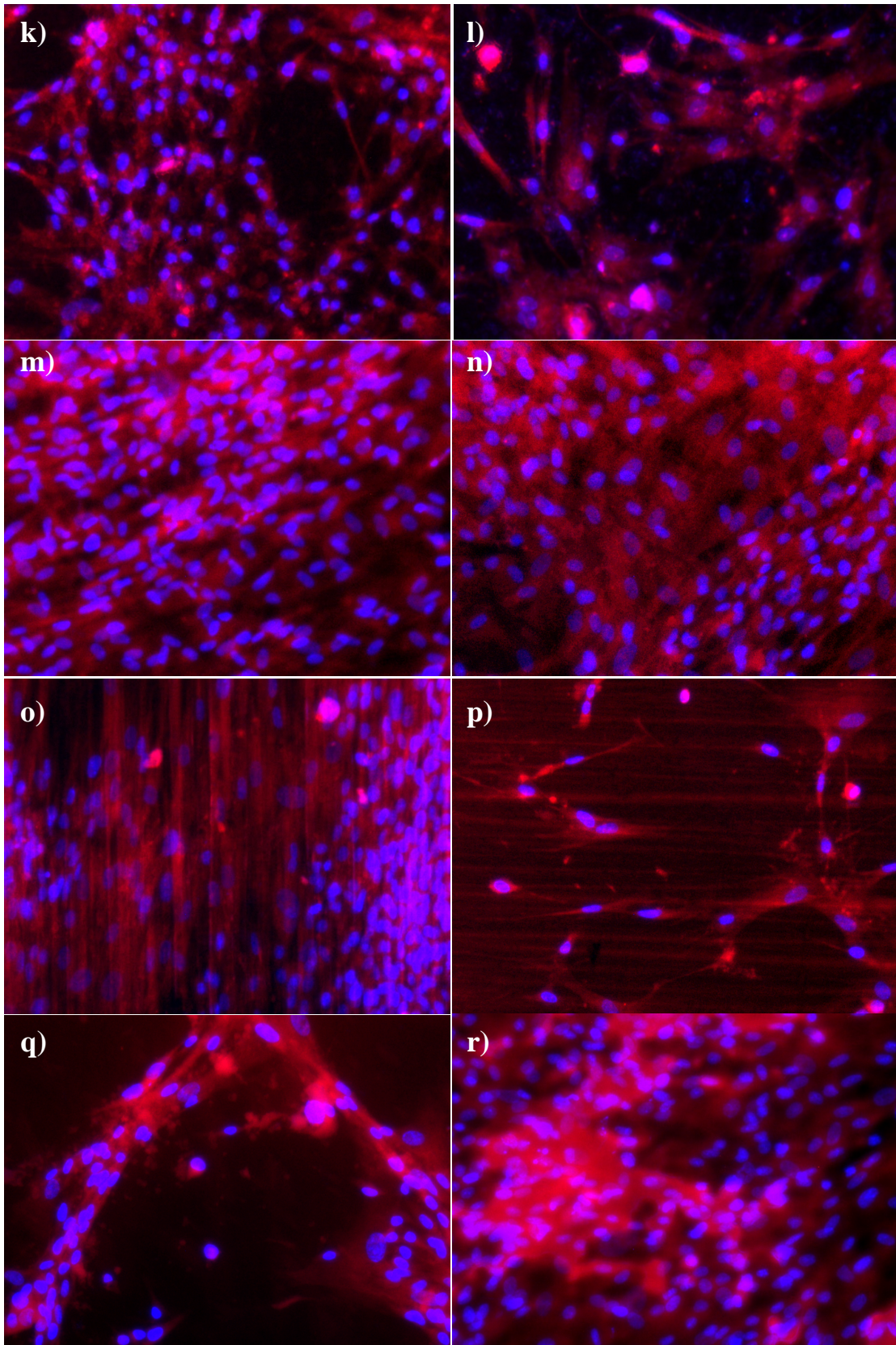
Analýza rozptylu vyhodnotila v obou případech, že se střední hodnoty výběrů liší. F kritické bylo v obou případech nižší než F. Lze tedy konstatovat, že na hladině významnosti 5 % zamítáme nulovou hypotézu, a přijímáme alternativní, tedy že velikost počtu buněk závisí na povrchové úpravě titanového substrátu.



**Obr 3.6:** Buňky prASC na povrchu: a) anodizovaném neplazmovaném, b) anodizovaném plazmovaném. Foto: Ing. Jana Štěpanovská.

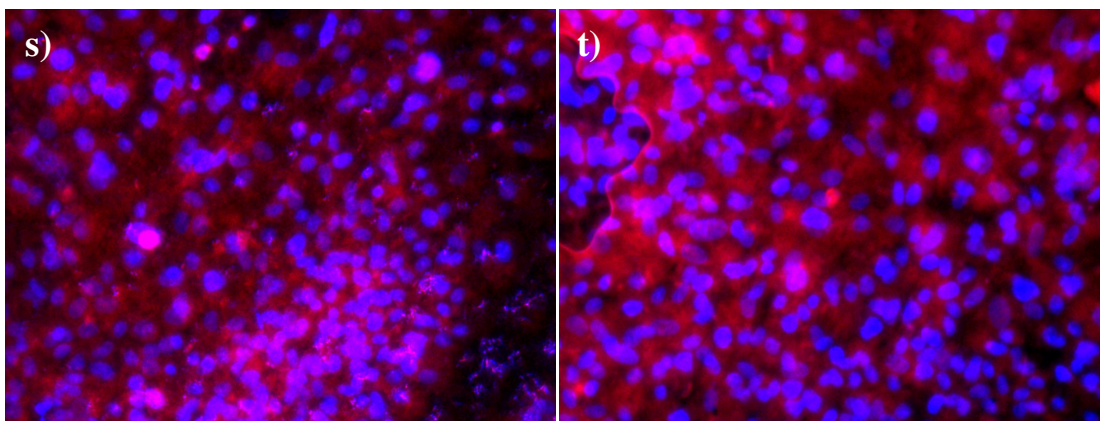


**Obr 3.7:** Buňky prASC na povrchu: c) DLC neplazmovaném, d) DLC plazmovaném, e) kartáčovaném neplazmovaném, f) kartáčovaném plazmovaném, g) leštěném neplazmovaném, h) leštěném plazmovaném, i) pískovaném neplazmovaném, j) pískovaném plazmovaném. Foto: Ing. Jana Štěpanovská.



**Obr 3.8:** Buňky MSC na povrchu: k) anodizovaném neplazmovaném, l) anodizovaném plazmovaném, m) DLC neplazmovaném, n) DLC plazmovaném, o) kartáčovaném neplazmovaném, p) kartáčovaném plazmovaném, q) leštěném neplazmovaném, r) leštěném plazmovaném. Foto: Ing. Jana Štěpanovská.





**Obr 3.9:** Buňky MSC na povrchu: s) pískovaném neplazmovaném, t) pískovaném plazmovaném. Foto: Ing. Jana Štěpanovská.

## 4 Diskuse

Hlavním výsledkem bakalářské práce jsou zjištěné hodnoty smáčivosti a drsnosti pro jednotlivé titanové substráty, navržená kultivační vložka a kultivační komora, provedené buněčné experimenty a jejich vyhodnocení.

Z výsledků měření smáčivosti v tabulce 3.6 je patrné, že nejvíce smáčivým neplazmovaným povrchem je povrch leštěný. Dalším zjištěním je, že po plazmové úpravě se povrchy stávají více hydrofilnějšími, což je způsobeno zvýšením povrchové energie plazmovou úpravou. Při srovnání povrchů plazmovaných a neplazmovaných můžeme konstatovat, že v obou případech zůstala zachována posloupnost, že DLC povrch je více hydrofilnější než povrch pískovaný, a ten je zase více hydrofilnější než kartáčovaný. Ve srovnání s kontrolním sklem, byla většina povrchů hydrofilnější než toto sklo. V obou případech byl hydrofobnější než sklo povrch kartáčovaný.

V několika studiích jsou učiněny závěry, že hydrofilní povrchy vykazují lepší buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci než povrchy málo smáčivé. [16] [10] Například ve studii z roku 2003 byla zaznamenána na titanových substrátech *in vivo* větší buněčná aktivita a diferenciace na hydrofilním povrchu než na hydrofobním. [28] Nejlépe však osteoblasty adherují a proliferují na mírně až vysoce smáčivém povrchu. [16] Dle výsledků této práce byla zaznamenána větší proliferace na leštěném plazmovaném povrchu a pískovaném plazmovaném povrchu než na stejných površích neplazmovaných. U ostatních povrchů buňky vykazovaly větší proliferaci spíše na neplazmovaných, které jsou méně hydrofilnější.

Dle výsledků (viz tabulku 3.5) z měření drsnosti jednoznačně vyplývá, že pískovaný povrch je nejdrsnější. Anodizovaný povrch se jeví o něco méně drsný, následuje kartáčovaný a DLC povrch. Nejméně drsný je povrch leštěný. Z tabulek 3.1 až 3.4 je patrné, že hodnoty drsnosti  $R_a$  a  $S_a$  se v závislosti na zvětšení mikroskopu mírně odlišují. Seřazení substrátů dle drsnosti se však výrazně nemění.

Jak ukázalo mnoho studií, drsnost povrchu ovlivňuje buněčnou proliferaci a diferenciaci. Studie z roku 1999 ukázala, že na povrchu s hodnotami  $R_a=0,5 \mu\text{m}$  byla zvýšená buněčná proliferace než na površích s hodnotami nad  $4 \mu\text{m}$ . [29] Toto zjištění by se mohlo shodovat s výsledky této práce, kdy na neplazmovaném povrchu DLC s hodnotami drsnosti  $R_a=0,6 \mu\text{m}$  byla oproti ostatním povrchům zaznamenána také nejvyšší proliferace.

Ve práci z roku 1996 [30] byl počet buněk nepřímo úměrný drsnosti povrchu. Nejhladší povrch, měl výrazně vyšší počet buněk než plastový kontrolní povrch. Zatímco hrubší povrchy měly počet buněk nižší než kontrolní plast.

V této práci bylo sklo bylo použito jako kontrolní povrch a počet buněk MSC byl na tomto povrchu hned po DLC povrchu největší. Naopak při pokusu s prASC byl počet buněk na kontrolním skle mezi ostatními povrchy jeden z nejmenších.

Povrchová úprava anodizací, vykazuje dle studie [31] zlepšení počátečního připojení buněk a schopnost proliferace. Tuto tendenci můžeme vidět i u buněk prASC na anodizovaném plazmovaném povrchu, kdy proliferace byla na tomto povrchu druhá největší. Naopak u buněk MSC byla proliferace na anodizovaných površích jedna z nejmenších.

Jiná studie srovnává kartáčované a pískované titanové povrchy. Z jejich výsledků je zřejmé, že kartáčované povrchy poskytly větší buněčnou adhezi a proliferaci osteoblastů než pískované povrchy. [32] I v této práci se pro prASC jeví kartáčované povrchy jako lepší pro proliferaci než pískované. Nicméně pro MSC byly z hlediska počtu buněk lepší pískované povrchy než kartáčované

Na leštěných površích byla pozorována zvýšená proliferace na plazmovaných površích více než na neplazmovaných. K podobnému závěru došla i studie, kdy byl zkoumán vliv plazmové úpravy na buněčnou adhezi. Adheze byla větší na površích upravených plazmou. [33]

Je však třeba poznamenat, že i když výsledky této práce ukazují tyto tendence, bylo by nutné zvětšit velikost vzorku, aby se dosáhlo přesvědčivé statistické síly.

Mezi drsností povrchu a jeho smáčivostí nelze na základě uvedených výsledků definovat žádný vztah. Za povšimnutí stojí pouze fakt, že povrchy leštěný a DLC (spíše hladší) jsou více hydrofilní než povrch pískovaný a kartáčovaný (spíše drsnější).

Na neplazmovaném povrchu DLC byl zaznamenán nejvyšší počet buněk a tento povrch byl mezi ostatními povrchy vyhodnocen jako povrch se střední drsností ( $0,6 \mu\text{m}$ ) a střední smáčivostí ( $67,5^\circ$ ). Vhodnost DLC povrchu jako implantát podporují i některé studie: [34] nebo [35], kde byl tento povrch zkoumán in vitro i in vivo.

Při prvním buněčném experimentu nebyla použita navržená vložka, neboť se ukázalo, že hustota ABS, ze kterého jsou vložky vyrobeny, je nižší než hustota média a vložky tak v jamce plavaly. To je způsobené tím, že při tisku výrobku na 3D tiskárně se užívá vnitřní struktura s dutinami pro ušetření výrobního času a materiálu, viz obrázek 4.1.



**Obrázek 4.1:** Vnitřní struktura vymodelovaného prvku. Foto: autor.

To však nebránilo provedení tohoto experimentu, kdy byly buněčné suspenze nasazeny přímo na substrát a část buněk tedy rostla i mimo substrát na dně kultivační jamky. Zároveň se v tomto pokusu vyskytly problémy s kontaminací vzorků, která nejspíš vznikla nedokonalou sterilizací titanových substrátů. Použitá sterilizace lihem tak nejspíše nebyla dostatečná a bylo tedy nutné navrhnout jinou metodu čištění a sterilizace, která zajistí biokompatibilitu vzorků k buňkám.

V následujícím experimentu byly již titanové substráty vyčištěny pomocí hydrogenuhličitanu vápenatého a vyklávkovány. Tato metoda se následně ukázala jako účinná, neboť vzorky nebyly již kontaminovány a na všech vzorcích rostly buňky bez problému.

Srovnáme-li pokusy MSC a prASC, byla proliferace v obou případech největší na neplazmovaném DLC povrchu. Z tabulek 3.10 a 3.11 je také vidět, že záleží na typu kmenových buněk, neboť proliferace se na stejném povrchu pro MSC a prASC liší. Na viabilitu buněk na vzorcích má velký vliv jejich původ. Jako potenciálně vhodnější se na první pohled jeví MSC, neboť jde o buňky, které jsou získávané přímo z pupečnicků novorozenců. Buňky prASC jsou získávané izolací kmenových buněk z tuku mladých jedinců prasete domácího. Navzdory všem předpokladům se již při statickém rozpěstování buněk jeví prASC mnohem vitálněji než MSC, neboť jejich růst a dělení probíhá mnohem rychleji, což odpovídalo i výsledkům z titanových substrátů. Tento předpoklad nelze přímo porovnat s výsledky z jiných článků, neboť zdroj buněk se mezi články liší.

## 5 Závěr

V této práci bylo charakterizováno a srovnáno celkem deset povrchových úprav titanových substrátů z hlediska vlivu povrchových vlastností na adhezi kmenových buněk. U substrátů byla určena hydrofilita a následně pomocí elektronové skenovací mikroskopie určeny povrchové i profilové parametry drsnosti titanových substrátů. Pro buněčné experimenty na titanových substrátech byla navržena a vyrobena kultivační vložka a následně kultivační komora.

Povrch pískovaný byl vyhodnocen jako nejdrsnější, naopak leštěný povrch jako nejméně drsný. Nejvíce smáčivým povrchem byl neplazmovaný leštěný a plazmovaný anodizovaný. Smáčivost se ukázala jako veličina, která do jisté míry ovlivňuje proliferaci buněk. Plazmovou úpravou došlo ke zvýšení smáčivosti na všech substrátech, nicméně ne všechny oplazmované substráty byly pro buňky vhodnější než jejich neoplazmované protějšky. Odezva buněk na různé povrchy se lišila v závislosti na typu buněk. Lépe však na površích rostly prASC. Podle dosavadních výsledků buněčných experimentů na titanových substrátech se jeví jako nejlepší povrch ze studovaných povrchů pro oba typy buněk DLC povrch bez plazmové úpravy, na kterém bylo spočteno nejvíce buněk, a který je zároveň mírně smáčivý a patří mezi mikrodrsné povrchy.

## Seznam použité literatury

- [1] MORAVEC, Hynek, Jaroslav FOJT, Vladimír FILIP a Luděk JOSKA. MODIFIKACE POVRCHU TITANU PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE. *Chemické Listy*. 2014, **108**(1), 40-45.
- [2] *Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials* [online]. Elsevier, 2015 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1016/C2014-0-02668-8. ISBN 9781782423034. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/cvut/detail.action?docID=2008286>
- [3] PÍŠKA, Miroslav a Aleš POLZER. Kostní implantáty na míru - prodlužme si mládí. *Strojírenství & Zdravotnictví* [online]. b.r., **2012** [cit. 2019-02-24]. Dostupné z: <https://www.mmspektrum.com/clanek/kostni-implantaty-na-miru-prodluzme-si-mladi.html>
- [4] QU, Chengjuan, Salla KAITAINEN, Heikki KRÖGER, Reijo LAPPALAINEN a Mikko LAMMI. Behavior of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Various Titanium-Based Coatings. *Materials*. 2016, **9**(10). DOI: 10.3390/ma9100827. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/9/10/827>
- [5] NEOH, Koon, Xuefeng HU, Dong ZHENG a En KANG. Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces. *Biomaterials* [online]. 2012, **33**(10), 2813-2822 [cit. 2018-11-22]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.018. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212000373>
- [6] DLUHOŠ, Luděk. Nanostrukturní titan – nový materiál pro dentální implantáty. *ČESKÁ STOMATOLOGIE* [online]. 2006, **106**(3), 6 [cit. 2019-02-27]. Dostupné z: [http://www.timplant.cz/public/files/text/clanekcs\\_cs.pdf](http://www.timplant.cz/public/files/text/clanekcs_cs.pdf)
- [7] NIINOMI, Mitsuo. Recent metallic materials for biomedical applications. *Metallurgical and Materials Transactions A* [online]. 2002, **33**(3), 477-486 [cit. 2019-02-28]. DOI: 10.1007/s11661-002-0109-2. ISSN 1073-5623. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11661-002-0109-2>
- [8] AGRAWAL, C. Mauli. *Introduction to biomaterials: basic theory with engineering applications*. New York: Cambridge University Press, 2014. Cambridge texts in biomedical engineering. ISBN 978-052-1116-909.

- [9] DAVIES, John E. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* [online]. 2007, **28**(34), 5058-5067 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.049. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207005856>
- [10] CHANG, Hsin-I a Yiwei WANG. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials* [online]. InTech, 2011 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.5772/21983. ISBN 978-953-307-663-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering-cells-and-biomaterials/cell-responses-to-surface-and-architecture-of-tissue-engineering-scaffolds>
- [11] LOSSDÖRFER, S., Z. SCHWARTZ, L. WANG, C. LOHMANN, J. TURNER, M. WIELAND, D. COCHRAN a B. BOYAN. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2004, **70**(3), 361-369 [cit. 2018-11-24]. DOI: 10.1002/jbm.a.30025. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30025>
- [12] SCHNEIDER, G.B., H. PERINPANAYAGAM, M. CLEGG, R. ZAHARIAS, D. SEABOLD, J. KELLER a C. STANFORD. Implant Surface Roughness Affects Osteoblast Gene Expression. *Journal of Dental Research* [online]. 2017, **82**(5), 372-376 [cit. 2018-11-24]. DOI: 10.1177/154405910308200509. ISSN 0022-0345. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/154405910308200509>
- [13] GORANSSON, Anna a Ann WENNERBERG. Bone Formation at Titanium Implants Prepared with Iso- and Anisotropic Surfaces of Similar Roughness: An in Vivo Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* [online]. 2005, **7**(1), 17-23 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1111/j.1708-8208.2005.tb00042.x. ISSN 1523-0899. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1708-8208.2005.tb00042.x>
- [14] MOZTARZADEH, O. *VYHODNOCENÍ OSTEointegrace NANO-TITANOVÝCH IMPLANTÁTŮ* [online]. Praha: Karolinum, 2015 [cit. 2018-11-24]. ISSN 0551-1038. Dostupné z: [https://www.cupress.cuni.cz/ink2\\_stat/dload.jsp?prezMat=88004](https://www.cupress.cuni.cz/ink2_stat/dload.jsp?prezMat=88004)
- [15] ANTONOV, Boris, Ivan BOCHEV, Milena MOURDJEVA, Plamen KINOV, Lubomir TZVETANOV, Ivan SHEITANOV a Stanimir KYURKCHIEV. *Porous Coated Titanium Implants do Not Inhibit Mesenchymal Stem Cells Proliferation and Osteogenic Differentiation* [online]. 2014, **27**(6), 4290-4293 [cit. 2018-11-24]. DOI: 10.5504/BBEQ.2013.0100. ISSN 1310-2818. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.5504/BBEQ.2013.0100>

- [16] ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* [online]. 2000, **21**(7), 667-681 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00242-2. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961299002422>
- [17] KAITAINEN, Salla, Anssi MÄHÖNEN, Reijo LAPPALAINEN, Heikki KRÖGER, Mikko J LAMMI a Chengjuan QU. TiO<sub>2</sub> coating promotes human mesenchymal stem cell proliferation without the loss of their capacity for chondrogenic differentiation. *Biofabrication*. 2013, **5**(2). DOI: 10.1088/1758-5082/5/2/025009. ISSN 1758-5082. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1758-5090/5/i=2/a=025009?key=crossref.03e8f376a976c5337dd2de947d63a802>
- [18] LOGAN, Niall, Anas SHERIF, Alison CROSS, Simon COLLINS, Alison TRAYNOR, Laurent BOZEC, Ivan PARKIN a Peter BRETT. TiO<sub>2</sub>-coated CoCrMo: Improving the osteogenic differentiation and adhesion of mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015, **103**(3), 1208-1217. DOI: 10.1002/jbm.a.35264. ISSN 15493296. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.35264>
- [19] FROSCH, K.-H., I. SONDERGELD, K. DRESING et al. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *Journal of Orthopaedic Research* [online]. 2003, **21**(2), 213-223 [cit. 2018-12-08]. DOI: 10.1016/S0736-0266(02)00143-2. ISSN 0736-0266. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0736-0266\(02\)00143-2](http://doi.wiley.com/10.1016/S0736-0266(02)00143-2)
- [20] KIM, Hae-Won, Young-Hag KOH, Long-Hao LI, Sook LEE a Hyoun-Ee KIM. Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol-gel method. *Biomaterials*. 2004, **25**(13), 2533-2538. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.041. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203007774>
- [21] BRAMMER, Karla, Seunghan OH, Christine COBB, Lars BJURSTEN, Henri HEYDE a Sungho JIN. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface. *Acta Biomaterialia* [online]. 2009, **5**(8), 3215-3223 [cit. 2018-12-08]. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.05.008. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706109002104>
- [22] POPAT, Ketul, Matthew ELTGROTH, Thomas LATEMPA, Craig GRIMES a Tejal DESAI. Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials* [online]. 2007, **28**(32), 4880-4888 [cit. 2018-12-08]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.037. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296120700556X>



- [23] ČEDÍKOVÁ, Miroslava. *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů* [online]. Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, 2013 [cit. 2018-11-23]. Dostupné z: [http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/On-line\\_atlas\\_kmenovych\\_bunek.pdf](http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/On-line_atlas_kmenovych_bunek.pdf)
- [24] HUDÁK, Radovan a David KACHLÍK. *Memorix anatomie*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-712-5.
- [25] PLANELL, Josep A., Melba NAVARRO, George ALTANKOV, Conrado APARICIO, Elisabeth ENGEL, Javier GIL, Maria Pau GINEBRA a Damien LACROIX. Materials Surface Effects on Biological Interactions. *Advances in Regenerative Medicine: Role of Nanotechnology, and Engineering Principles* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010, , 233-252 [cit. 2019-04-15]. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. DOI: 10.1007/978-90-481-8790-4\_12. ISBN 978-90-481-8788-1. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-8790-4\\_12](http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-8790-4_12)
- [26] *Drsnost povrchů a rychlé děje v objektivu vysokorychlostního kamerového systému* [online]. 2012, , 16 [cit. 2018-12-26]. Dostupné z: <http://int.spsou-ub.cz/ccv/projekty/vzdelavanipedagogu/dokumenty/skripta/kurz11.pdf>
- [27] *SPIP Classic Roughness Parameters for Images* [online]. b.r. [cit. 2018-12-26]. Dostupné z: [http://www.imagemet.com/WebHelp6/Default.htm#RoughnessParameters/Roughness\\_Parameters.htm](http://www.imagemet.com/WebHelp6/Default.htm#RoughnessParameters/Roughness_Parameters.htm)
- [28] ERIKSSON, Cecilia, Håkan NYGREN a Karin OHLSON. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(19), 4759-4766 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.12.006. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203011554>
- [29] LOHMAN, C. Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> through regulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity and activation of protein kinase A. *Journal of Biomedical Materials* [online]. b.r., **1999**(47) [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-4636%28199911%2947%3A2%3C139%3A%3AAID-JBM4%3E3.0.CO%3B2-2>
- [30] KIESWETTER, K. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *Journal of Biomedical Materials* [online]. 1996, **32** [cit. 2019-05-07]. Dostupné z:

[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199609\)32:1%3C55::AID-JBM7%3E3.0.CO;2-O](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-4636(199609)32:1%3C55::AID-JBM7%3E3.0.CO;2-O)

- [31] PAE, a AHRAN. Osteoblast-like Cell Attachment and Proliferation on Turned, Blasted, and Anodized Titanium Surfaces. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* [online]. 2011, (26) [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=08822786&AN=64484635&h=BbNBtClCrI0H%2fqKy6Gts cRIUGl0HzI3UtF6ePtXhhUcMG4m%2fuYh7fNlwGij5eNrmuWypFOJB1ek%2fpRE%2f8dtRMg%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrINotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d08822786%26AN%3d64484635>
- [32] JAYARAMAN, Mythili. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* [online]. 2004, (25) [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203005714>
- [33] DA SILVA, . Osteoblastlike Cell Adhesion on Titanium Surfaces Modified by Plasma Nitriding. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* [online]. 2011, (26) [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=08822786&asa=Y&AN=65994662&h=DbANiF20Mc%2b%2fKXQM9Ui1YmK1uRlc5OxpD%2fG1THOHvIWuUpubhgKer%2b5gm6bIKPeqWnr5ZqyQfA5LHxXMunDp2w%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrINotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d08822786%26asa%3dY%26AN%3d65994662>
- [34] DU, C., X.W. SU, F.Z. CUI a X.D. ZHU. Morphological behaviour of osteoblasts on diamond-like carbon coating and amorphous C–N film in organ culture. *Biomaterials* [online]. 1998, **19**(7-9), 651-658 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1016/S0142-9612(97)00159-2. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961297001592>
- [35] ALLEN, Matthew. In vitro and in vivo investigations into the biocompatibility of diamond-like carbon (DLC) coatings for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials* [online]. 2002 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1097-4636%282001%2958%3A3%3C319%3A%3AAID-JBM1024%3E3.0.CO%3B2-F>

[36] *Home of tissue culture TPP* [online]. b.r. [cit. 2018-12-26]. Dostupné z:  
[https://www.tpp.ch/page/produkte/09\\_zellkultur\\_testplatte.php](https://www.tpp.ch/page/produkte/09_zellkultur_testplatte.php)

# Seznam příloh

Příloha A: Technické výkresy

Příloha B: Obsah přiloženého CD

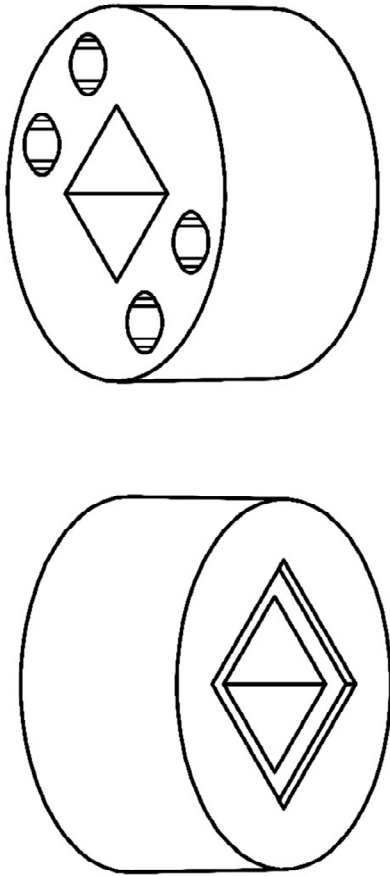
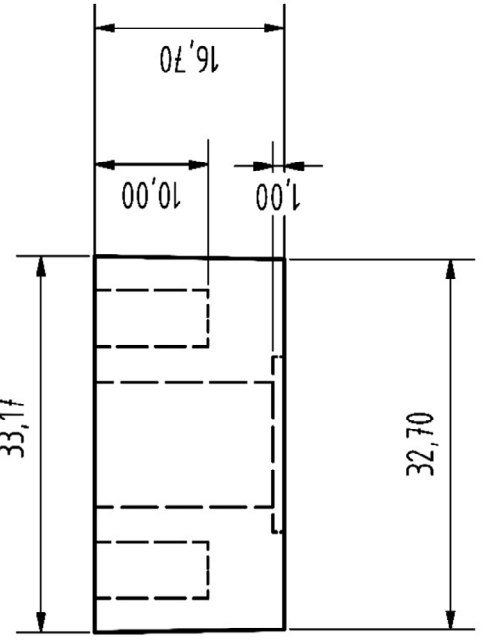
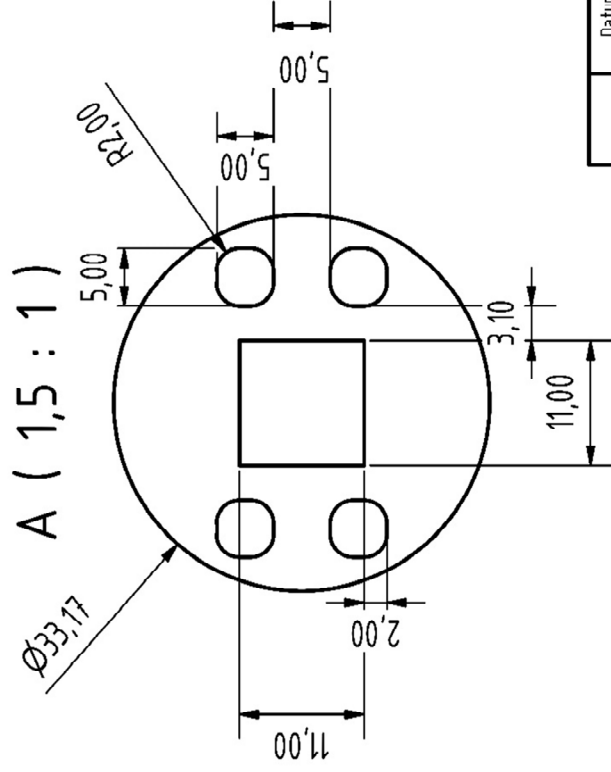
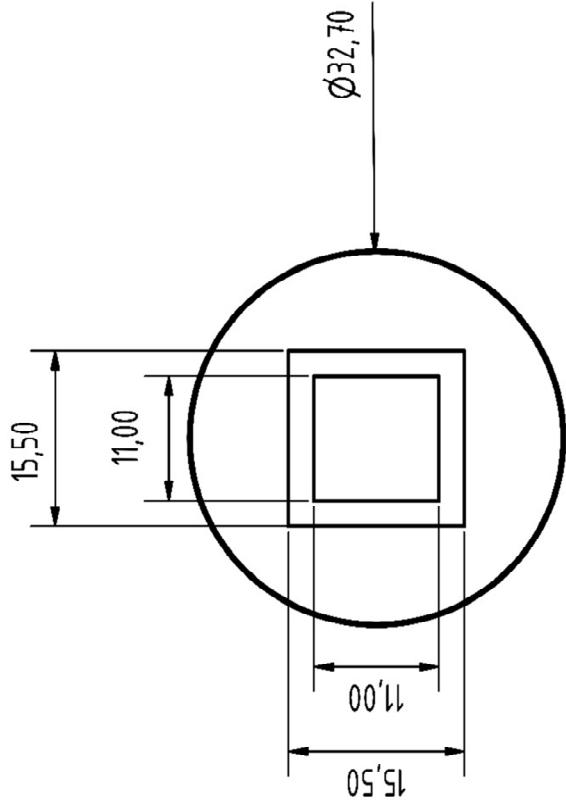
# **Příloha A: Technické výkresy**

1 Kultivační vložka

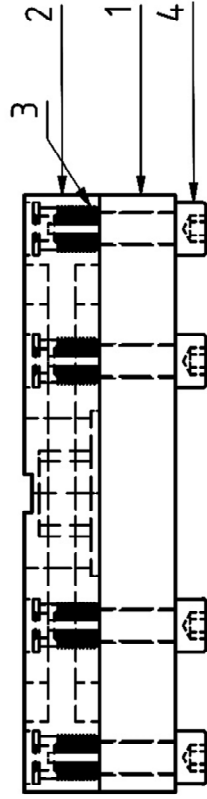
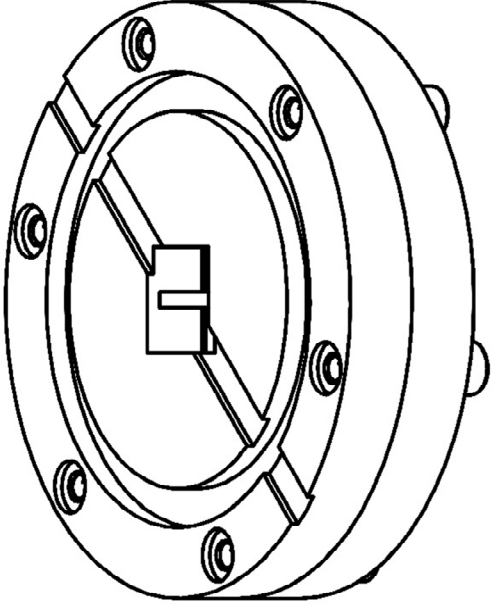
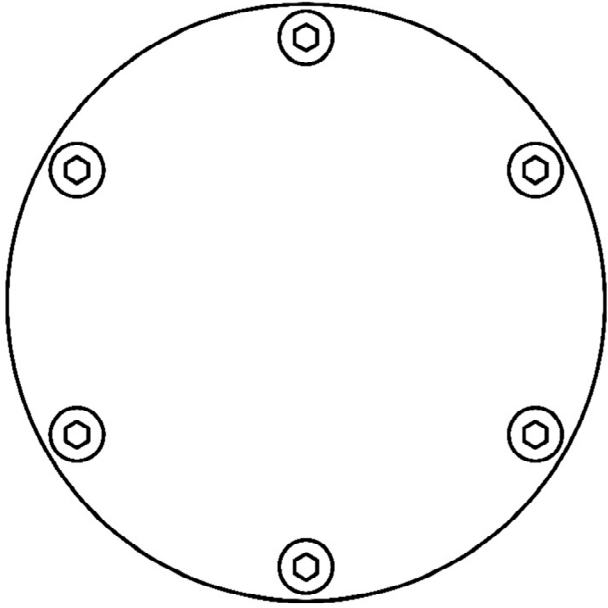
2 Kultivační komora

2a Spodní část

2b Svrchní část



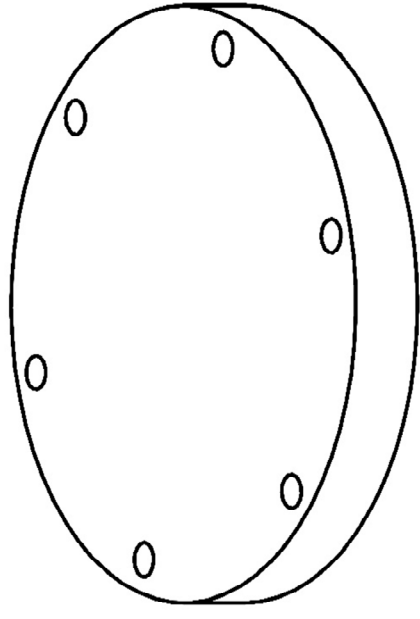
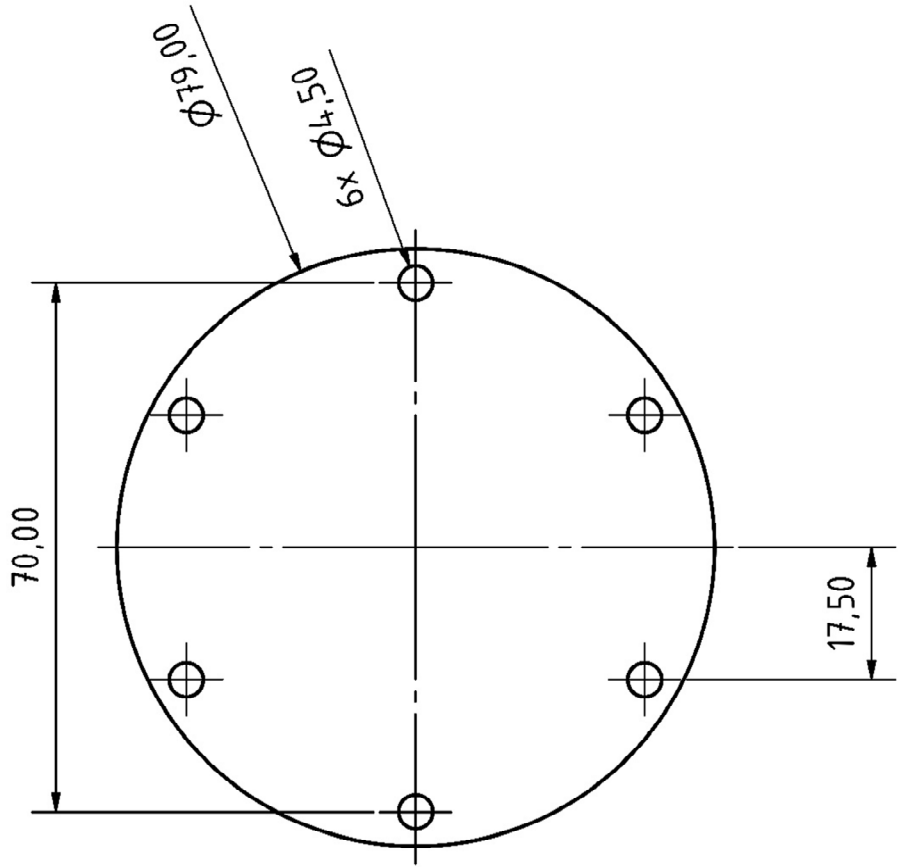
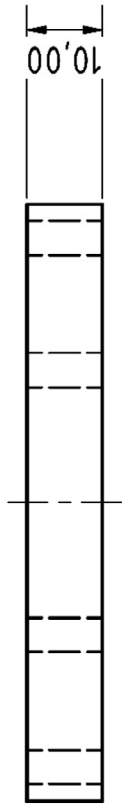
ČVUT FBMI		Kultivační vložka	
Datum	Jméno	1	1,5 : 1
18. 4. 2019	František Zima		A4
22. 4. 2019	Ing. Štěpánovská Jana		
22. 4. 2019	Ing. Štěpánovská Jana		



KUSOVNÍK

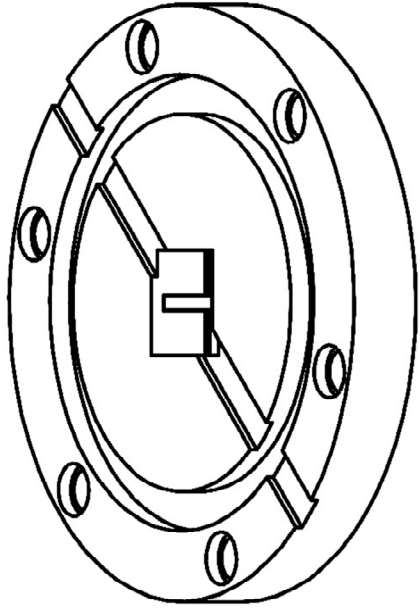
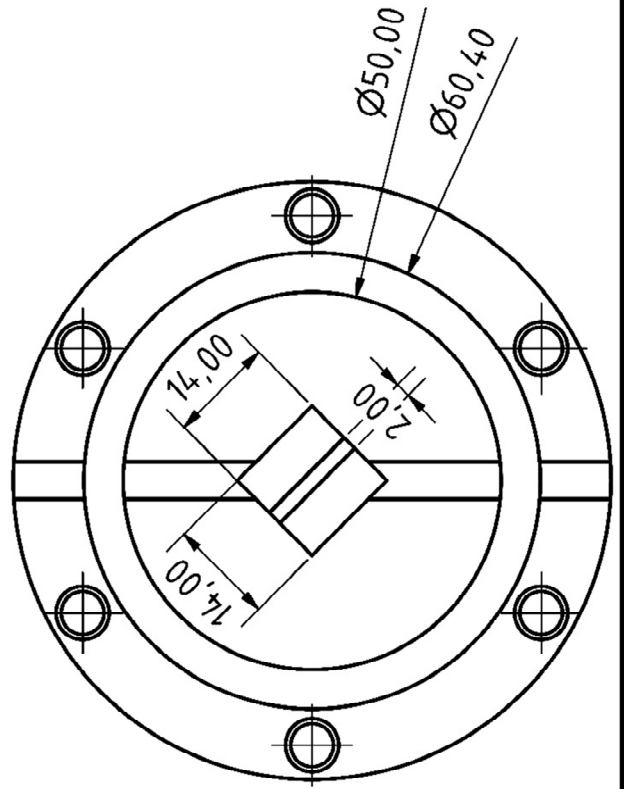
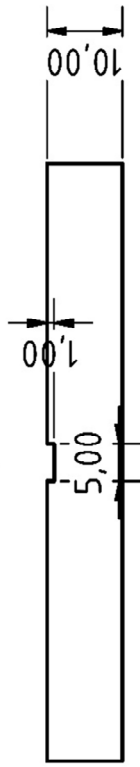
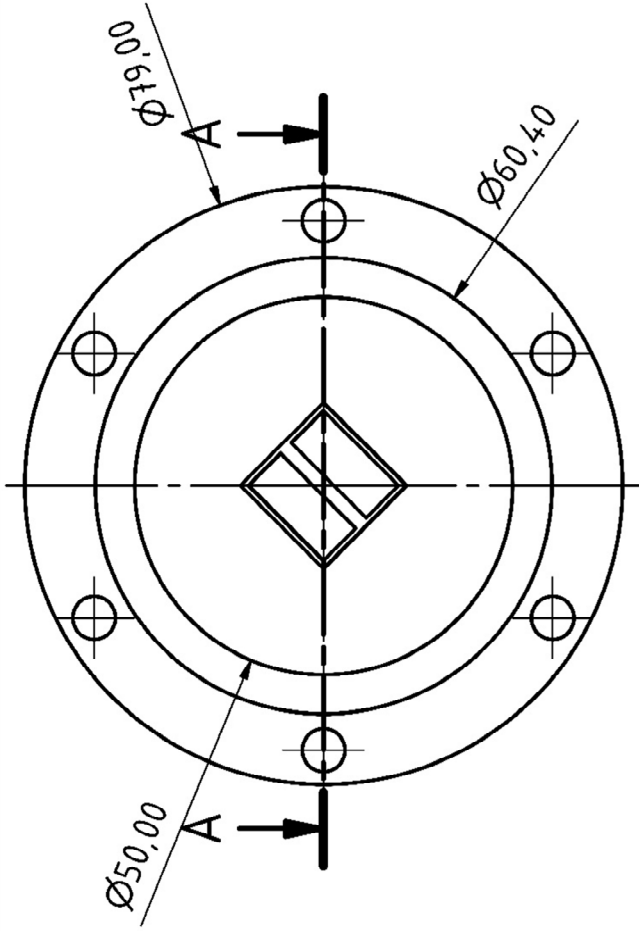
POLOŽKA	KS	ČÍSLO SOUČÁSTI
1	1	Spodní část
2	1	Svrchní část
3	6	Závitová vložka
4	6	Šroub DIN 912 - M4 x 16

ČVUT		FBMI	
Nakreslen	Datum	Jméno	
18. 4. 2019	18. 4. 2019	František Zima	
Kontrola	22. 4. 2019	Ing. Štěpanovská Jana	
Schválil	22. 4. 2019	Ing. Štěpanovská Jana	
Kultivační komora			2
			1:1 A4

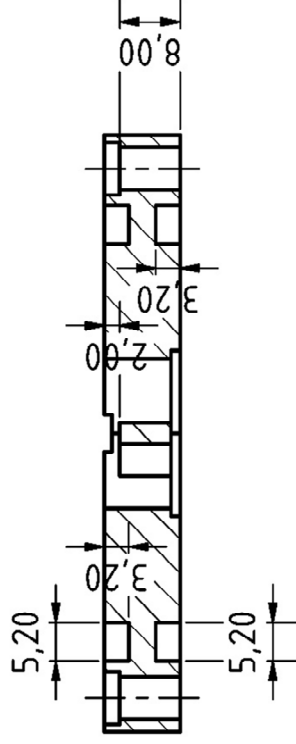


ČVUT		FBMI	
Nakreslen	22. 4. 2019	Jméno	František Zima
Kontrola	22. 4. 2019		Ing. Štěpánovská Jana
Schválil	22. 4. 2019		Ing. Štěpánovská Jana
Spodní část			2a
			1 : 1 A4





A-A (1:1)



ČVUT		FBMI	
Datum	Jméno		
22. 4. 2019	František Zima		
22. 4. 2019	Ing. Štěpánovská Jana		
22. 4. 2019	Ing. Štěpánovská Jana		
Svrchní část		2b	1:1 A4

## **Příloha B: Obsah přiloženého CD**

Klíčová slova (čj i aj)

Abstrakt česky

Abstrakt anglicky

Naskenované zadání bakalářské práce

Kompletní bakalářská práce