



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE TiO_2 NANOTRUBIČEK
DEKOROVANÝCH STŘÍBREM PRO BIOMEDICÍNSKÉ
ÚČELY**

FABRICATION AND CHARACTERISATION OF SILVER DECORATED TiO_2 NANOTUBES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

SEMESTRÁLNÍ PRÁCE

SEMESTRAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ondřej Bílek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.

BRNO 2017

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Bc. Ondřej Bílek

ID: 155564

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Příprava a charakterizace TiO₂ nanotrubiček dekorovaných stříbrem pro biomedicínské účely

POKyny PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Provedte literární rešerši přípravy, charakterizaci a využití TiO₂ a Ag-TiO₂ nanostrukturovaných povrchů pro biomedicínské účely. 2) Navrhněte a připravte TiO₂ nanotrubičky dekorované Ag nanočásticemi, s různou koncentrací Ag-NPs, pomocí anodické oxidace, popř. připravte tyto struktury za použití metodiky vedoucí k vyplnění trubiček stříbrem. 3) Provedte SEM charakterizaci připravených nanostruktur a zhodnoťte vyrobené struktury. 4) Provedte antibakteriální testy vyrobených nanostruktur a zhodnoťte vliv koncentrace stříbra na antibakteriální vlastnosti. 5) Studujte vliv Ag-TiO₂ nanostruktur na adhezi MG63 buněk. 6) Provedte diskusi získaných výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost řešení.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] VISAI, L. et al. Titanium oxide antibacterial surfaces in biomedical devices. Int J Artif Organs 2011; 34 (9): 929-946.

[2] ZHENG Y. et al. Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface. International Journal of Nanomedicine 2012;7 875–884

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci, na téma „Příprava a charakterizace TiO₂ nanotrubiček dekorovaných stříbrem pro biomedicínské účely“, jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně, dne _____

.....

Bc. Ondřej Bílek

PODĚKOVÁNÍ

Velice rád bych poděkoval vedoucí své diplomové práce Mgr. Zdence Fohlerové, Ph.D., a to hlavně za trpělivost, cenné rady, metodickou a odbornou pomoc poskytnutou při vypracovávání této diplomové práce a za veškerý čas vynaložený za účelem mé diplomové práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Kateřině Přikrylové za veškerý čas, který strávila u elektronového mikroskopu pořizováním snímků mých vzorků. Na závěr bych rád poděkoval své rodině, a to hlavně za poskytnutí zázemí a dlouhodobou podporu při studiích.

V Brně, dne _____

.....

Bc. Ondřej Bílek

Experimentální část této diplomové práce byla realizována na výzkumné infrastruktuře
vybudované v rámci projektu CZ.1.05/2.1.00/03.0072
Centrum senzorických, informačních a komunikačních systémů (SIX)
operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace.

BÍLEK, O. *Příprava a charakterizace TiO_2 nanotrubiček dekorovaných stříbrem pro biomedicínské účely*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 66 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce shrnuje poznatky z oblastí syntézy, charakterizace a využití nanotrubiček z oxidu titaničitého a jeho kombinace s nanočásticemi stříbra pro biomedicínské účely. Součástí práce jsou i základní protokoly práce s buněčnými kulturami a bakteriemi. Praktická část této diplomové práce se zaměřuje především na syntézu tubulárních struktur z oxidu titaničitého pomocí anodické oxidace 500nm titanové vrstvy a následné dekorování nanotrubiček stříbrem pomocí elektrodpozice. Závěr praktické části je věnován testování antibakteriálních vlastností nového materiálu a zkoumání vlivu množství elektrodponovaného stříbra na adhezi MG-63 buněk. Vlastnosti nového povrchu jsou vždy porovnávány s referenčním vzorkem, který je tvořen nanotrubičkami z oxidu titaničitého bez stříbra.

KLÍČOVÁ SLOVA

TiO₂, NANOTRUBIČKY, Ag NANOČÁSTICE, ANODICKÁ OXIDACE, ELEKTRODEPOZICE, ADHEZE, ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA

SUMMARY

This diploma thesis summarizes knowledge from the fields of synthesis, characterization and application of titanium dioxide nanotubes and its combination with silver nanoparticles for biomedical purposes. Basic protocols of working with cell cultures and bacteria are also included. Experimental part of this diploma thesis focuses mainly on the synthesis of tubular structures made of titanium dioxide via anodic oxidation of 500nm titanium layer and their subsequent decoration with silver by electrodeposition. Last section of the experimental part is devoted to testing of antibacterial properties of the new material and examining the effect of different silver concentrations on the adhesion of MG-63 cells. All results are compared to reference samples consisting of titanium dioxide nanotubes without silver.

KEYWORDS

TiO₂, NANOTUBES, Ag NANOPARTICLES, ANODIC OXIDATION, ELECTRODEPOSITION, ADHESION, ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Obsah

Úvod.....	9
I. Teoretická část.....	11
1. Význam TiO ₂ a Ag-TiO ₂ nanostrukturovaných povrchů pro biomedicínu	11
1.1. Oxid titaničitý	11
1.2. Stříbrné nanočástice	13
1.3. Interakce buňky s nanostrukturovaným povrchem	13
1.4. Biomedicínské aplikace	15
2. Příprava TiO ₂ nanotrubiček.....	19
2.1. Hydrotermální syntéza	19
2.2. Sol-gelová syntéza	19
2.3. ALD (Atomic Layer Deposition).....	20
2.4. Anodická oxidace.....	20
3. Funkcionalizace TiO ₂ nanotrubiček.....	24
3.1. Doping.....	24
3.2. Dekorace a plnění	25
3.3. Sebeuspořádané monovrstvy	26
3.4. Modifikace růstovými faktory	26
3.5. Modifikace plazmou	27
3.6. Modifikace UV zářením	27
4. Charakterizace nanostrukturovaných povrchů.....	28
4.1. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	28
4.2. Kontaktní úhel.....	29
4.3. Testování antimikrobiální aktivity	31
4.4. Testování biokompatibility	33
5. Práce s bakteriemi a buněčnými kulturami.....	36
5.1. Kultivace bakterií.....	36
5.2. Kultivace MG-63 buněk	36
II. CÍLE PRÁCE.....	39
III. PRAKTICKÁ ČÁST	40

6. Materiál a použité metody	40
6.1. Anodická oxidace.....	40
6.2. Elektrodepozice stříbra	41
6.3. Testování antibakteriální aktivity	41
6.4. Adheze MG-63 buněk.....	42
7. Výsledky a diskuze	43
7.1. Syntéza nanotrubiček.....	43
7.2. Dekorace nanotrubiček stříbrem.....	45
7.3. Testování antibakteriální aktivity	51
7.4. Adheze MG-63 buněk.....	54
8. Závěr	58
9. Seznam zkratk.....	59
10. Seznam literatury	60

Úvod

V souvislosti s rozvojem a inovací nových, ale i stávajících technologií, je kladen značný důraz na používané materiály. Hojně diskutovaným tématem poslední doby jsou materiály skládající se ze strukturních jednotek, které alespoň jedním ze svých rozměrů nepřekračují meze nanosvěta, tedy velikost 100 nm. Takovéto materiály jsou často nositeli vlastností, které jsou pro daný materiál v makrosvětě netypické. A právě to je dělá atraktivními pro využití v různých odvětvích, jako je například medicína, genové inženýrství, elektronika, či ekologie. Příkladem těchto materiálů může být například v této diplomové práci diskutovaný nanostrukturovaný oxid titaničitý, nebo nanostříbro. ^[1, 2, 3]

Prvním z výše zmíněných nanomateriálů s velmi širokým potenciálem využití je díky svým vlastnostem oxid titaničitý (TiO_2). Jedná se o k prostředí šetrnou sloučeninu s vysokou odolností vůči korozi, která je známá především pro své samočistící schopnosti. Projevuje však další významné vlastnosti. Lze jej využít ve fotovoltaických článcích ^[4], projevuje tzv. "antifogging" efekt (zabraňuje srážení vody) ^[5], může být elektrochromní (mění barvu při nabití elektrinou) ^[6], je až výjimečně biokompatibilní, a podobně jako oxidy jiných kovů působí mikrobicidně. ^[7] Své využití nalézá například v podobě chytrých povrchů (smart surface coating), popřípadě biomedicínských opláštění (např. úprava povrchu implantátů - biomedical coating). ^[3, 8]

Druhým zmíněným, velice známým a široce rozšířeným nanomateriálem, je stříbro. Stříbro v podobě nanočástic (Ag-NPs) působí mikrobicidně, a to nespecificky na rozličné druhy bakterií a hub. Uvnitř lidského těla je stabilní a navíc je pro mikroorganismy těžké vytvořit si rezistenci. Ag-NPs jsou dále schopny působit protizánětlivě, a urychlovat hojení, své uplatnění tedy nalézají i v regenerativní medicíně. Při vyšších dávkách však vyvstává problém - Ag-NPs negativně ovlivňují buňky - jsou cytotoxické. ^[9; 10]

Zvláštní výsadu v potenciálních uplatněních mají medicínské aplikace, nebo přesněji řečeno aplikace implantační. Vzhledem k běžně akceptovanému uspěchanému životnímu stylu se stále častěji setkáváme s poškozením těla různých původů. Tělesné náhrady a opravy, a to ať už se jedná o implantabilní zařízení, jako jsou například kardiostimulátory, nebo o díky degenerativním onemocněním stále významnější náhrady poškozených tvrdých, či měkkých tkání, jsou v populaci stále běžnější. A právě proto je na jejich rozvoj a inovaci v posledních letech kladen značný důraz.

Titan samotný je používán jako materiál pro implantáty díky svým vyhovujícím vlastnostem, jako jsou vhodná tvrdost, tažnost, pevnost v tahu, nízký modul pružnosti, a schopnost odolávat korozi. Poslední vlastnost je dána právě přirozeným výskytem TiO_2 vrstvy, která na povrchu titanových implantátů vzniká, dojde-li k jejich kontaktu se vzduchem. Ta stejná vrstva má na svědomí také biokompatibilitu titanových implantátů. Bylo však prokázáno, že tato několik nanometrů silná vrstva TiO_2 není v případě implantátů

z dlouhodobého hlediska dostačující. Zvláště u slitin titanu s hliníkem a vanadem dochází v průběhu času k uvolňování částic kovů, které mohou na organismus působit negativně. Proto se vývoj v oblasti titanových implantátů směřuje k povrchovým modifikacím projevujícím dlouhodobě vyšší stálost. Jednou ze struktur, která, mimo jiné, tuto výhodu přináší, jsou nanotrubičky oxidu titaničitého (TiO_2 -NTs).^[11-13,14,15]

TiO_2 -NTs by však mohly přinášet výhod více. Oproti hladkému povrchu je očekávaná snadnější a lepší oseointegrace, lepší adheze a zvýšená aktivita a proliferace okolních buněk – především osteoblasty jsou silně ovlivňovány nanostrukturovaností povrchů. Polootevřený tvar nanotrubiček se pak hodí například k cílenému uvolňování léčiv.^[8, 16,17]

Při zkombinování těchto dvou materiálů, tedy při použití vhodné koncentrace Ag-NPs k dekorování TiO_2 -NTs, by mohlo dojít k vylepšení antibakteriálních vlastností materiálu při zachování biokompatibility TiO_2 . V případě úspěchu by nový materiál našel uplatnění především v podobě povrchových modifikací moderních implantátů se zvýšenou schopností boje s infekcí, uvolňování nežádoucích kovů z použitých slitin a zvýšenou šancí pro ujetí implantátu.^[13,14]

Cílem této diplomové práce je tento materiál nasyntetizovat, otestovat jeho antimikrobiální a biokompatibilní vlastnosti, a následně je srovnat se vzorkem čistých TiO_2 -NTs.

I. Teoretická část

1. Význam TiO_2 a Ag-TiO_2 nanostrukturovaných povrchů pro biomedicínu

Při vybírání materiálů pro biomedicínské aplikace je velice důležité zaměřit se na jejich požadované vlastnosti, a to v závislosti na konkrétní aplikaci. Jednou z nejdůležitějších vlastností pro aplikaci v medicíně je jejich biokompatibilita – tedy jak se daný materiál projevuje při kontaktu s fyziologickým prostředím. Jedná se především o buňky, k nim vztaženou otázku, do jaké míry jsou materiál schopny tolerovat, a tělní tekutiny – především z hlediska stability a schopnosti odolávat v tomto prostředí korozi. To vše je dáno interakcemi, které mezi povrchem daného materiálu a fyziologickým prostředím probíhají. Ty jsou určeny mimo jiné hlavně chemickým složením, smáčivostí a strukturovaností povrchu.^[12]

Chemické složení nám určuje, zda materiál bude cytotoxický, pokud ano tak do jaké míry. V případě vnitřních aplikací je důležitá i stabilita (ideálně dlouhodobá) ve fyziologickém prostředí. Mezi mechanické vlastnosti materiálu, které je potřeba zvažovat pro konkrétní aplikace pak patří především jejich tvrdost, pevnost v tahu, pevnost, pružnost a modul pružnosti v tahu.^[12]

Poměrně velkou roli při těchto aplikacích hraje morfologie a drsnost styčné plochy materiálu. V praxi můžeme narazit na povrchy hladké, nanopórní, ale taky například nanotrubičky, nanotyčinky, nebo nanotečky a jiné. Nejen, že každá z těchto podob projevuje při kontaktu s buňkami jinak – i v rámci jedné morfologie (např. nanotrubičky) hrají ve výsledné aplikaci velikou roli konkrétní rozměry tvořených nanostruktur (např. jejich průměr). V případě experimentu provedeného LAN, M. Y. et al.^[13] bylo například prokázáno, že průměr TiO_2 -NTs dekorovaných stříbrem (Ag-TiO_2 -NTs) hraje značnou roli v jejich antibakteriální aktivitě.^[11,13,18]

1.1. Oxid titaničitý

Zaměříme-li se na materiály používané při náhradách tvrdých tkání, zjistíme, že jejich historie sahá dále, než si myslíme. První implantáty v podobě umělých zubů byly nalezeny již v době cca 1000 let před naším letopočtem ve starém Egyptě. Materiál tehdy používaný však byl značně primitivní – jednalo se především o opracovaný kámen, nebo slonovinu. Od této doby jsme se naštěstí značně posunuli vpřed, a vyvinuli nové, lepší, modernější materiály – polymery, keramiky, kovy a jejich slitiny, a jako poslední – kompozity uhlíku, nebo tvořené některou kombinací předchozích možností.^[19,20]

Mezi dnes používané materiály se řadí například polymery (jako například polymethylmetakrylát, nebo polytetrafluorethylen), jejichž strukturu, a tím i vlastnosti, lze

relativně snadno měnit. Zároveň jsou jejich vlastnosti při výrobě snadno reprodukovatelné. Tyto materiály však mají svá úskalí – jejich mechanické vlastnosti nemusí být vždy pro aplikace vyhovující, adheze na ně nemusí být dostačující, a mohou vyvolávat nechtěné imunitní reakce. ^[19,20]

Druhou skupinou materiálů, se kterými se lze setkat jsou implantáty keramické. V jejich případě narazíme na bioinertní keramiky z oxidů hliníku, titanu, zirkonia, nebo bioaktivní keramiky fosfátu vápenatého (např. hydroxyapatit), či skelné keramiky. ^[19,20]

Třetí skupinou používaných materiálů jsou kovy a jejich slitiny, které projevují dostatečně biokompatibilní vlastnosti. Mezi moderní, v praxi používané materiály tvořené kovy patří například chirurgická ocel, zlato, slitiny kobaltu s chromem, nebo například titan. ^[19,20]

Titan a jeho slitiny jsou, díky svým vhodným vlastnostem, používány v téměř 40 % implantátů dnešní medicíny. V případě jeho slitin však narážíme na závažný problém – obsahují-li slitiny například hliník, nebo vanad, postupem času může docházet k narušení povrchové vrstvy TiO_2 a nechtěnému uvolňování těchto kovů do okolních tkání, což může vést k jejich poškození. Právě z těchto důvodů je vyvíjena snaha o povrchové úpravy implantátů za účelem širší a stabilnější biokompatibilní vrstvy. ^[8, 11-13, 19-24]

Bylo prokázáno, že nanostrukturované povrchy na bázi TiO_2 jsou materiály pro buňky vhodné. Pozornost upoutává především podoba nanotrubiček. Jak již bylo zmíněno v úvodu, podobně jako oxidy jiných kovů i TiO_2 projevuje antibakteriální vlastnosti. V podobě nanotrubiček, které jsou při velikosti do cca 100nm schopny napodobovat strukturu kostí, pak stimuluje buněčnou adhezi, proliferaci ale i diferenciaci buněk, a přispívá tedy k rychlejší integraci implantátů a zároveň snižuje šanci jejich odmítnutí. ^[8, 11-13, 17, 21-26]

Ve prospěch výše zmíněných vlastností TiO_2 -NTs vypovídá například experiment provedený OH, S. et al. ^[17], v jehož průběhu bylo zjištěno, že osteoblasty pěstované na povrchu TiO_2 -NTs v porovnání s hladkým Ti několikrát rychleji přilnuly k povrchu a začaly tvořit filopodia prorůstající dotubulární struktury. Pro porovnání, v případě hladkého Ti trvalo viditelné přilnutí cca 12 hodin, zatímco v případě TiO_2 -NTs pouhé dvě hodiny. Po dalších 48 hodinách inkubace byly pořízeny snímky a bylo prokázáno, že TiO_2 -NTs povrch značně urychluje adhezi, a z dlouhodobého hlediska také proliferaci osteoblastů. ^[17]

TiO_2 -NTs svou polootevřenou podobou lákají k dalším modifikacím. Naskýtá se myšlenka na náplň v podobě léčiv, či hormonů, s postupným uvolňováním. Další možností by mohlo být jejich vyplnění, nebo dekoraci jinými nanočásticemi, jako například stříbrem (viz dále), či selenem (léčba rakoviny kostí). ^[8, 11, 13, 21, 22, 23, 27,24]

1.2. Stříbrné nanočástice

Materiály obsahující nanostříbro se dnes využívají široké škále medicínských aplikací. Asi nejdůležitějšími vlastnostmi stříbrných nanočástic, na kterých je jejich používání založeno, jsou jeho nespecifické mikrobicidní, hojivé a protizánětlivé účinky. Konkrétní využití můžeme najít například v regenerativní medicíně, kdy v případě léčby popálenin a ran urychlují regeneraci kůže a brání rány před infekcí. Podíl nanočástic se přidává i do kostního cementu používaného při výměnách kolenního či kyčelního kloubu. Nanočástice stříbra v medicíně však nalezneme i v podobě povrchových úprav katetrů, či implantabilních medicínských zařízení. Zásadní problém, se kterým se však při aplikaci nanostříbra medicína potýká, je jeho cytotoxicita při velkých dávkách, a proto je před konkrétní aplikací potřeba nalézt optimální koncentraci, při které jsou jeho požadované účinky zachovány a zároveň nepůsobí negativně na okolní tkáň. ^[9,10]

Ideou za spojením těchto dvou výše zmíněných materiálů v nový – titanové nanotrubičky dekorované stříbrem (Ag-TiO₂-NTs) je vylepšení antibakteriálních vlastností výsledného materiálu při zachování, nebo dokonce vylepšení^[13] biokompatibility nanostrukturovaného TiO₂. Potenciální využití tohoto materiálu by spočívalo především v implantologii, kdy by se snížilo riziko infekce, a zároveň by se urychlila oseointegrace implantátů. ^[8, 13, 14,15]

1.3. Interakce buňky s nanostrukturovaným povrchem

Dojde-li ke kontaktu buňky s nanostrukturovaným povrchem, který je biokompatibilní, buňka na povrch adhezuje, následně se rozprostře, a jsou-li vhodné podmínky, začne dále proliferovat. Cílem aplikace nového materiálu však není jen zajištění adheze a proliferace, ale zajištění následovně další bioaktivity buňky. V případě aplikace tohoto materiálu by jeho účinek byl cílen na kostní buňky zajišťující oseointegraci potenciálního implantátu - osteoblasty. Jejich funkčnost značí především aktivita alkalické fosfatázy, následná kalcifikace a produkce dalšího kostního matrix. V průběhu jejich životního cyklu se však stává, že je buňka obklopena svou vlastní vyprodukovanou kostní matrix a stává se z ní osteocyt – zralá kostní buňka neprodukující další kostní matrix. ^[28,29]

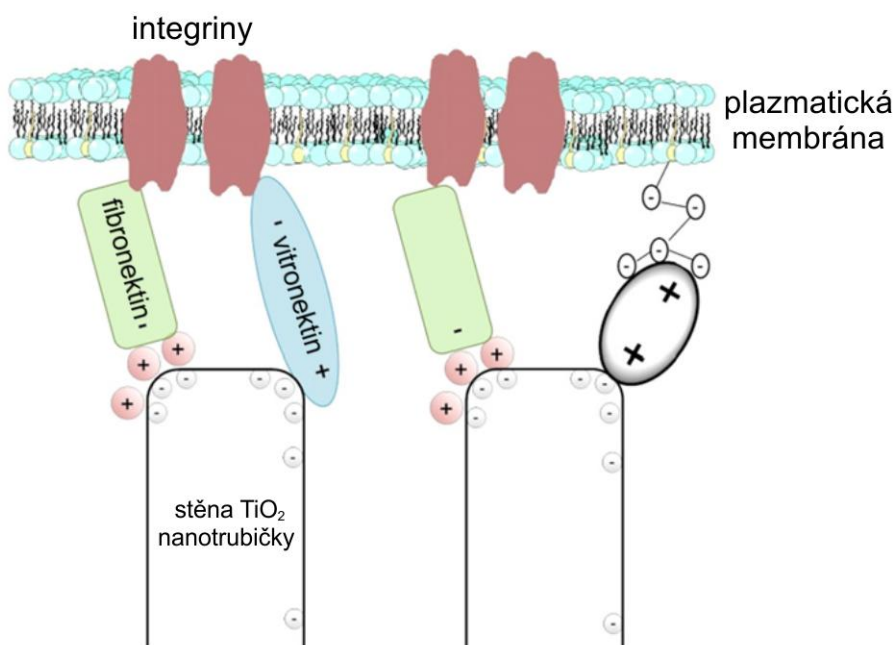
Adheze

O potenciální adhezi buňky – a v případě úspěchu zároveň o její rychlosti - rozhodují především proteiny mezibuněčné hmoty, které se vážou na povrchy materiálů. Do této skupiny proteinů patří například fibronectin, vitronectin, kolagen nebo také laminin. Adsorpce zmíněných proteinů na daný povrch je ovlivněna jeho vlastnostmi - především jeho smáčivostí, morfologií a drsností. V případě, že vlastnosti povrchu byly vyhovující a došlo

k úspěšnému navázání těchto proteinů na daný povrch, samotné buňky se na tyto proteinové řetězce naváží pomocí svých integrinových receptorů. Ty vyhledají specifická místa jejich aminokyselinových sekvencí, se kterými se propojí. Schématické znázornění vazby buňky na TiO₂-NTs je zobrazeno na obrázku č.1. [28]

Jak již bylo zmíněno, značnou roli při adhezi buněk hraje morfologie povrchů, na kterých adheze probíhá. Bylo prokázáno, že při experimentech s polymerními povrchy vykazovaly epiteliální buňky (CHO a MDCK) silnější adhezi na nanotyčinky o menších průměrech - a to i v případě měkkých materiálů, na něž se v případě hladkých povrchů buňky vázaly pouze velice slabě. [30]

Změříme-li se na vliv smáčivosti a drsnosti povrchů, zjistíme, že buňky projevují zvýšenou adhezi v případě drsnějších hydrofilnějších povrchů. V případě experimentu [31], kdy byla pro přesnou kontrolu drsnosti použita úprava povrchu CF₄ plazmou, a smáčivost povrchu byla upravena O₂ plazmou, bylo zjištěno, že adheze dosáhla maxima v případě vysoce hydrofobního povrchu (úhel smáčivosti < 10°) s drsností okolo 11 nm.



Obrázek 1: Znázornění adheze buňky na TiO₂-NTs, převzato z [32]

Proliferace

V případě, že úspěšně došlo k dobré adhezi buněk na testovaný povrch, buňky dále rostou a dělí se – proliferují. I rychlost a úspěšnost proliferace je však ovlivňována různorodými faktory, stejně jako jejich adheze. [33]

Zkoumání vlivu nanostrukturovaných povrchů na proliferaci osteoblastů je věnováno značné úsilí. Například bylo zjištěno, že v případě TiO₂-NTs s menšími průměry (okolo 25

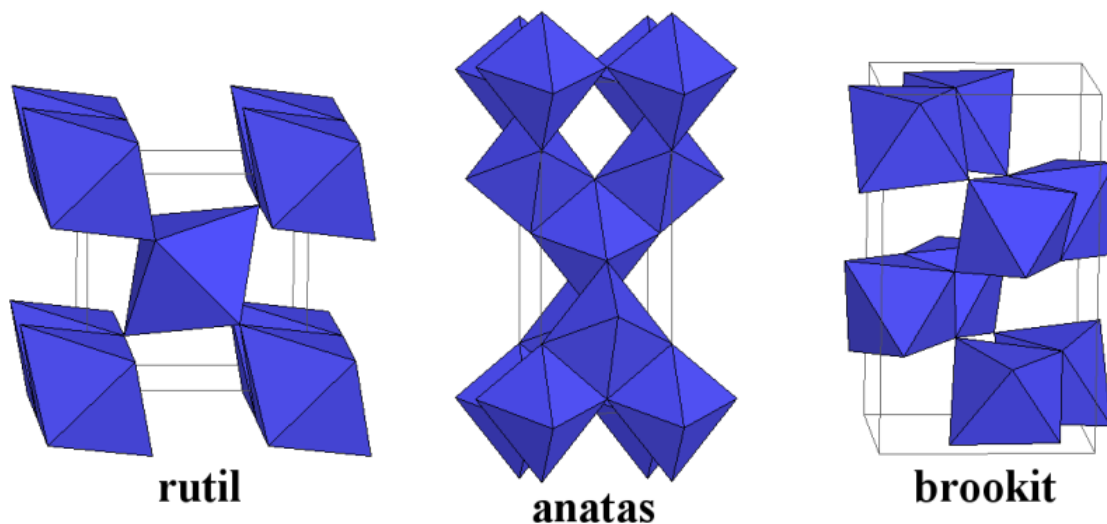
nm) dochází ke zvýšení proliferační aktivity fibroblastů.^[13] V jiné studii byl zkoumán vliv kulatých titanových nanočástic velikostí 50 – 125 nm. Takto upravený povrch výrazně zlepšil buněčnou adhezi ale i proliferaci, a to bez negativního vlivu na jejich diferenciaci.^[34] Další studie zkoumala kulaté nanočástice TiO₂ modifikované hydroxyapatitem v podobě nanotyčinek o délce 50-100 nm při průměru 20-30 nm. Tyto kompozitní nanostruktury proliferaci také významně podpořily.^[35] Jelikož je provedených studií hodně, a bylo by nad rámec této práce shrnout všechny, poslední zmíněná studie zkoumala in vivo, ale také in vitro, proliferaci buněk na strukturách v podobě nanolistů.^[36] I v tomto případě byla odezva buněk na přítomnost nanostruktur pozitivní, především v oblasti zvýšené adheze, proliferace, ale také diferenciaci. Obecně lze dle dostupných zdrojů říct, že nanostrukturovanost povrchů má na proliferaci osteoblastů veskrze pozitivní efekt.^[37]

1.4. Biomedicínské aplikace

Dentální a ortopedické implantáty

Náhrady tvrdých tkání, ať už v podobě kloubů, kostí, nebo zubů, jsou oblastí, se kterou se moderní medicína běžně potýká. Ať jsou zdrojem jejich poškození degenerativní onemocnění, nebo traumatické poškození, důležité je, že je potřeba je nahradit. Jak již bylo zmíněno, zhruba 40 % implantátů je dnes tvořeno titanem, nebo jeho slitinami. Neustálým rizikem je však potenciální infekce, či chabé ujetí implantátu, které v nejhorších případech mohou vést až k jeho vyjmutí. Bohužel, v případech jako jsou kyčelní, nebo kolenní náhrady se jedná o značný problém, jelikož po zákroku není možné kloub vrátit do původního stavu. Navíc se v případě cizorodého tělesa, jako je implantát, tělo není schopno na jeho povrchu vytvořeného bakteriálního biofilmu zbavit, a to ani s pomocí prostředků jako jsou klasická antibiotika.^[17, 32]

Jak již bylo zmíněno, nanostrukturované povrchy mohou na ujetí implantátů pozitivní vliv. TiO₂-NTs v porovnání s hladkým titanem vykazují zrychlenou adhezi a zvýšenou proliferaci osteoblastů, a umožňují tak vytvoření silnější a rychlejší vazby mezi kostí a implantátem. Obecně však platí, že pro implantační aplikace nemusíme být omezeni pouze na TiO₂-NTs – může se jednat o pouze pórézní povrch, nanotyčinky, nanotečky, či jakoukoliv jinou variant nanostruktur. Vliv na výsledné vlastnosti však nemusí mít pouze samotná struktura nanomateriálu – i v rámci jedné struktury (např. 50nm TiO₂-NTs) lze sledovat rozdíly v rámci jednotlivých krystalických podob – rutilu, anatasu, nebo brookitu (obr.2). V případě amorfního TiO₂ jej lze žháním převádět v jednotlivých podobách. Pro anatas jsou typické teploty 400-800 °C, vyšší teploty pak vedou k tvoření rutilu. Obě podoby jsou však pouze metastabilní a v průběhu času dochází k jejich přeměně na brookit. Nejvyšší antibakteriální aktivitu projevuje podoba anatasu^[17,32,38-40]



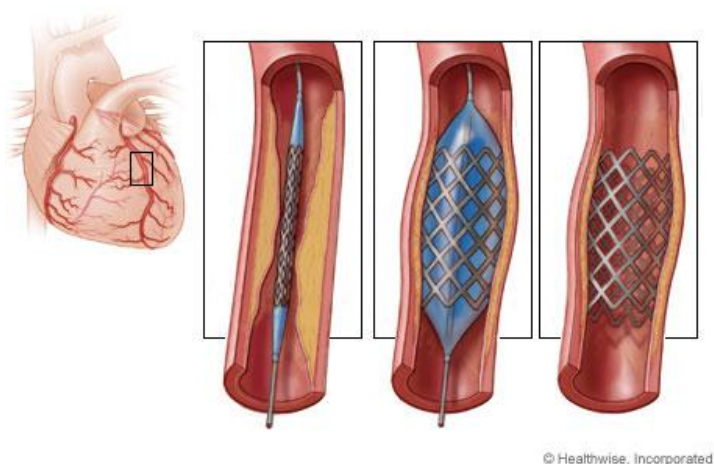
Obrázek 2: Schématické znázornění krystalové mřížky rutilu, anatasu a brookitu, převzato z [38]

Stenty – močový měchýř

V případě poškození výstelky močového měchýře a močových cest často dochází ke zhoršení imunity těchto částí. Tento problém je dnes možné řešit pomocí zavedení vhodného stentu. Potenciálním rizikem tohoto zákroku je však infekce, či poškození tkáně. Stenty potažené TiO_2 -NTs by se tomuto riziku mohly efektivně vyhnout vytvořením monovrstvy urotheliálních buněk na povrchu stentu. Tato vrstva buněk by zabránila interakcím mezi stentem a bakteriemi, ale i imunitními buňkami.^[32,41]

Stenty – cévy

V případě cévních stentů zásadním rizikem není infekce, ale možné zneprůchodnění cévy v důsledku krevní sraženiny. V případě modifikace povrchu stentu $\text{TiO}_2\text{-NTs}$ lze upravit vlastnosti stentu a zvýšit jeho antitrombogenní účinky. Na obrázku 3 je zobrazeno zavádění stentu do zúžené cévy.^[42]



Obrázek 3: Aplikace cévního stentu, převzato z [43]

Terapeutické využití

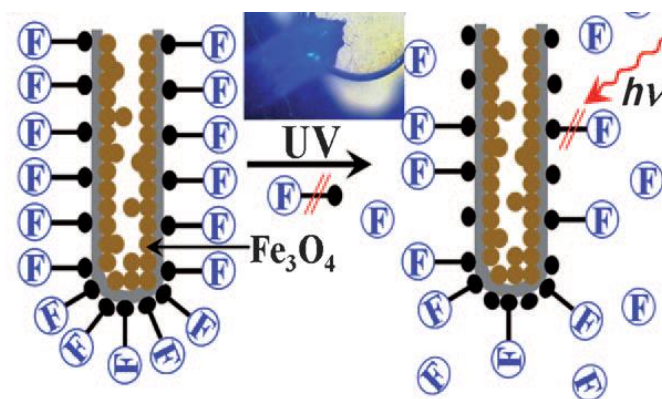
Existují různé přístupy pro využití $\text{TiO}_2\text{-NTs}$ jako terapeutického prostředku. Jednou z možností je například vyplnění trubiček Fe_3O_4 s následnou možností magnetického navádění do cílených míst, kde lze pomocí fotokatalytického jevu cíleně ničit rakovinné buňky. Druhou možností je vpravit do organismu $\text{TiO}_2\text{-NTs}$ uzavřené hydrofobním „víčkem“, které zabraňuje míšení obsahu s tělesnými tekutinami, dokud není odstraněno fotokatalytickou reakcí. Jasnou nevýhodou pro aplikace spoléhající na fotokatalytický jev je nezbytnost přímého kontaktu s UV světlem, i když jak je napsáno dále, i toto znevýhodnění se lze do jisté míry odstranit.^[8, 11, 24, 32]

Fotokatalytický jev

Fotokatalytický jev, který je asi nejznámější aplikací nanostruktur oxidu titaničitého, by mohl najít využití v podobě samočištění medicínského vybavení a zázemí. Využit jej ale lze i k účelům terapeutickým, a to ať už v podobě cíleného uvolňování léčiv, nebo k cílené destrukci rakovinných buněk.^[8, 11, 13, 21, 22, 23, 24, 27]

Jeho podstatou je, že v kombinaci s vodou při ozáření UV světlem vytváří silně reaktivní radikály O^{2-} a $\text{OH}^\cdot$, které jsou schopny rozložit prakticky jakoukoliv organickou sloučeninu na oxid uhličitý a vodu. Pro zvýšení účinnosti a umožnění spuštění reakce i viditelným světlem je však potřeba vhodně $\text{TiO}_2\text{-NTs}$ modifikovat (například N-doping). Pro terapeutické využití, například při léčbě rakoviny, je pak atraktivní fotokatalytický jev

vyvolaný RTG, či elektricky indukovaný. Na obrázku 4 je schématicky znázorněno využití tohoto jevu pro terapeutické účely. [8, 11,24]



Obrázek 4: Schéma využití TiO_2 -NTs pro terapii pomocí fotokatalytického jevu, převzato z [8]

Antibakteriální aktivita

Bakteriální infekce implantabilních zařízení, jako jsou například kardiostimulátory, se díky rozšíření antimikrobiální rezistence a tvorbě biofilmu stávají stále větším problémem. Bylo však prokázáno, že je-li povrch těchto zařízení potažen TiO_2 -NTs vhodného průměru, je možné riziko této infekce snížit. Nejvyšší antibakteriální aktivitu projevuje krystalická podoba anatasu. [40] V případě že by toto opatření nebylo dostačující, je možné tyto nanotrubičky modifikovat vhodnou antimikrobiální látkou a zabránit tak potenciální tvorbě biofilmu. Příkladem této aplikace by mohlo být jejich dekorování nanočásticemi stříbra, které je předmětem této diplomové práce. [32] Další variantou pro navýšení antibakteriálních účinků TiO_2 -NTs je jejich dekorace nanočásticemi oxidu zinečnatého (ZnO). Takto upravený povrch projevuje značně zvýšené antibakteriální účinky, a to při zachování pozitivních účinků na proliferaci kmenových buněk. [44] Pozornost upoutávají také TiO_2 -NTs dekorované nanočásticemi selenu. Selen v lidském těle brání oxidativnímu poškození tkání a podílí se na kontrole zánětlivých reakcí, především díky regulaci chování makrofágů. Takto nanostrukturovaný povrch se projevuje především inhibičními účinky ovlivňujícími bakteriální růst a proliferaci makrofágů. [45] Antibakteriální aktivitu lze ale ovlivnit i jednodušší cestou – vyplněním titanových nanotrubiček antibiotiky. V případě experimentu POPAT, K. C. et al [46] byly trubičky naplněny gentamicinem rozpuštěným ve fosfátovém pufru. Takto připravené TiO_2 -NTs úspěšně potlačily adhezi a proliferaci bakterií, a zároveň podpořily jak adhezi, tak proliferaci v porovnání s čistě titanovými povrchy. [46]

2. Příprava TiO₂ nanotrubiček

K přípravě TiO₂-NTs lze použít různé metody - například anodickou oxidaci (elektrochemická anodizace), sol-gelové metody, „Atomic layer deposition“ (ALD), či hydro/solvotermální metody. Metody lze také systematicky dělit podle toho, jestli jsou při jednotlivých přístupech používány šablony (templáty), či nikoliv. ^[8]

2.1. Hydrotermální syntéza

Hydrotermální syntéza TiO₂-NTs je považována za jednoduchou metodu sloužící k výrobě TiO₂-NTs ve větším měřítku s možností modifikací jejich vlastností. Její zásadní nevýhodou je časová náročnost, a problém se získáním jednotné velikosti výsledných nanotrubiček. ^[8,47]

Při hydrotermální syntéze je TiO₂ prášek rozpuštěn ve vysoce koncentrovaném vodném roztoku NaOH. Tato směs je v autoklávu při teplotách okolo 110-150 °C přeměněna do podoby TiO₂-NTs. Výsledné struktury jsou následně promývány vhodným rozpouštědlem, či vhodným kyselým roztokem, a následně žíhány, nebo sušeny.

2.2. Sol-gelová syntéza

Syntézu pomocí sol-gel metody lze obecně popsat jako metodu založenou na hydroxylaci a následné kondenzaci prekurzorů za vytvoření tzv. solu. Následně probíhá kondenzace a polymerace za vzniku gelu. Ten je tepelně zpracován a výsledkem tohoto zpracování jsou nanomateriály. ^[8]

V případě TiO₂-NTs můžeme sol-gel syntézu rozdělit na základní dva přístupy, přičemž oba využívají pro tvorbu nanotrubiček templáty. První tzv. „metoda přímých templátů“ využívá jako šablony pro nově vzniklé nanotrubičky již existující nanoútvary (např. Al₂O₃, či uhlíkové nanotrubičky). Příkladem tohoto přístupu by mohla být výroba TiO₂-NTs provedená pomocí vytvoření a zachycení TiO₂ solu v nanoporézním Al₂O₃ templátu (po zachycení je celek tepelně zpracován a následně je templát odstraněn). ^[8, 48,49]

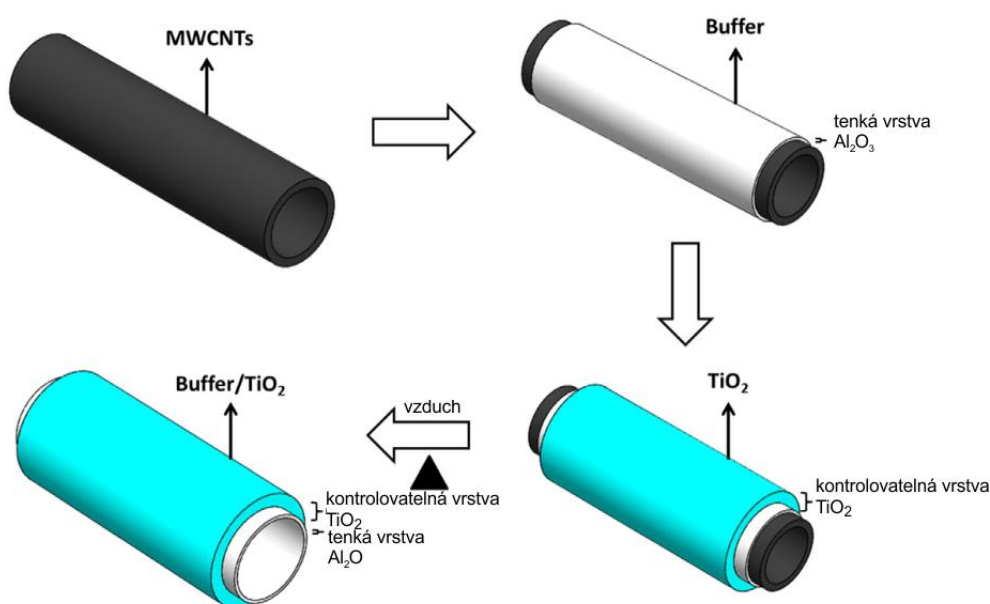
Druhý přístup pak využívá organických templátů, na jejichž povrchu jsou nanotrubičky vytvářeny. Templáty používané při této variantě jsou specifické pro syntetizované částice. ^[8, 48,49]

2.3. ALD (Atomic Layer Deposition)

Princip ALD je založen na nanášení jednotlivých vrstev na atomární úrovni na povrchy templátů (šablon) z vhodného materiálu (např. víceštěnné uhlíkové nanotrubičky – MWCNT, či porézní Al_2O_3). Samotné nanotrubičky jsou pak vytvářeny v průběhu cyklů skládajících se z celkem tří cyklicky se opakujících částí:

1. vystavení šablony prekurzoru TiO_2 (např. TiCl_4)
2. promývání
3. hydrolýza.

Po dokončení růstu nanotrubiček je možné trubičky od povrchu, na němž byly vytvořeny, oddělit. Velikost nanotrubiček je přímo regulována počtem cyklů ALD. Schématické znázornění cyklu je zobrazeno na obrázku č. 5. ^[8,50]



Obrázek 5: Příklad použití ALD pro syntézu TiO_2 -NTs., převzato z [50]

Obrázek 6 je schématickým znázorněním postupu růstu TiO_2 -NTs na templátu tvořeném uhlíkovými nanotrubičkami, které byly pro lepší růst TiO_2 potaženy tenkým filmem z Al_2O_3 sloužícím jako buffer. Uhlíkové nanotrubičky byly odstraněny pomocí horkého vzduchu. ^[8,50]

2.4. Anodická oxidace

Anodická oxidace je díky své rychlosti a univerzálnosti velice žádoucí metodou pro využití v praxi. Pomocí nastavených parametrů procesu anodizace a vhodně zvoleného

anodizačního roztoku lze relativně snadně ovládat průměr a délku výsledných TiO₂-NTs, a to téměř na jakémkoliv povrchu. [2, 3, 8, 15,51]

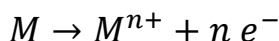
TiO₂-NTs jsou při laboratorní anodizaci vytvářeny z tenkých vrstev titanu, a to buď v podobě fólií, nebo waferů potažených titanem. Aby TiO₂-NTs mohly být tvořeny, je třeba vhodně zvolit elektrolyt jako anodizační roztok - důležité je jeho složení. Chceme-li dlouhé homogenní TiO₂-NTs bez prasklin, jako základ pro elektrolyt jsou vhodné organické sloučeniny jako například kyselina octová, či etylenglykol. Použijeme-li jako základ etylenglykol. Musíme jej dále obohatit o fluoridové ionty (0,1 - 1 wt%) a malé množství vody (0-2 vol%). V případě nedostatku vody, či fluoridových iontů je výsledkem anodizace pouze nanoporézní povrch. [2, 3, 8, 15,51]

Výsledný průměr TiO₂-NTs závisí na velikosti přiloženého anodizačního napětí. To se v případě organických roztoků pohybuje mezi 5-150 V. [2, 3,8]

Pro délku trubiček je určujícím faktorem délka anodizace. S delší dobou anodizace rostou delší TiO₂-NTs, ale velice důležitým faktorem je i pH použitého elektrolytu – při nižším pH rostou trubičky rychleji, ale kvůli vysoké rozpustnosti je problematické syntetizovat trubičky delší než 300 nm. Čím blíže je pH elektrolytu k neutrálním až mírně zásaditým hodnotám, tím menší problém je syntetizovat i několik mikrometrů dlouhé nanotrubičky, avšak vždy na úkor mnohem delších anodizačních časů. [8,52]

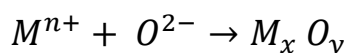
V případě použití elektrolytu na bázi etylenglykolu, fluoridu amonného (NH₄F) a vody (H₂O) se dle prvního zdroje PRIKRYLOVA, K. et al. [3] jako nejlepší směs pro elektrolyt na základě provedeného experimentu jeví etylenglykol s 2 vol% H₂O a 1,2 wt% NH₄F. Je-li anodizace prováděna pod napětím 20V, výsledkem jsou TiO₂-NTs o průměru cca 50nm. ESFANDIARI, N. et al. [13] uvádí jako optimální hodnotu elektrolyt na základě etylenglykolu s 0,3 wt% NH₄F a 2 wt% H₂O při přiloženém napětí 10-30V, podle požadované velikosti TiO₂-NTs.

Metoda samotná je založena na následujícím principu – v případě, že je kov v elektrochemické konfiguraci vystaven dostatečnému anodickému napětí ve vhodném elektrolytu, je spouštěna oxidační reakce (rovnice 1): [3,8]



Rovnice 1: obecná rovnice tvorby iontů kovu

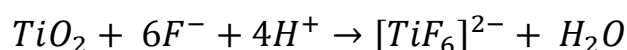
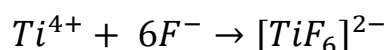
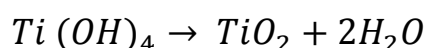
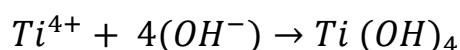
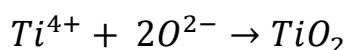
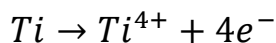
V zásadě se tedy děje následující - nově získaný kov iontu Mⁿ⁺ je postupně rozpouštěn v daném elektrolytu. Nově získaný iont Mⁿ⁺ však může reagovat s kyslíkem O²⁻ poskytnutým H₂O v roztoku, a může se stát, že nově získaný oxid M_xO_y není v daném elektrolytu rozpustný. (rovnice 2). [3,8]



Rovnice 2: obecná rekombinace iontu kovu s kyslíkem

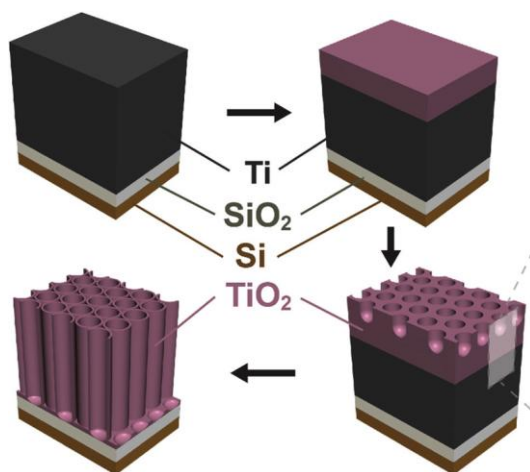
Za specifických, naprosto přesně daných podmínek se pak může stát, že dochází k pomyslné soutěži mezi rozpouštěním kovu a tvorbou oxidu daného kovu. Právě tehdy může docházet k růstu samouspořádaných TiO₂-NTs. [3,8]

Samotný proces anodické oxidace titanu vypadá následovně:



Rovnice 3: Rovnice vyjadřující děje probíhající při anodizaci.

Jak je patrné z rovnic 3, při anodizaci dochází k oxidaci titanu na Ti⁴⁺. Ten nadále reaguje s kyslíkem a hydroxidovou skupinou poskytnutou H₂O přítomnou v elektrolytu (rozpad H₂O na OH a O²⁻ je způsoben přítomností elektrického pole). Při reakci s kyslíkem vzniká přímo oxid titaničitý, zatímco při reakci s hydroxidovou skupinou vzniká hydroxid titaničitý, který je teprve následně přeměněn na oxid titaničitý. Takto vzniklý oxid titaničitý však reaguje s fluorem a vzniká ve vodě rozpustný komplex [TiF₆]²⁻. [3,8]

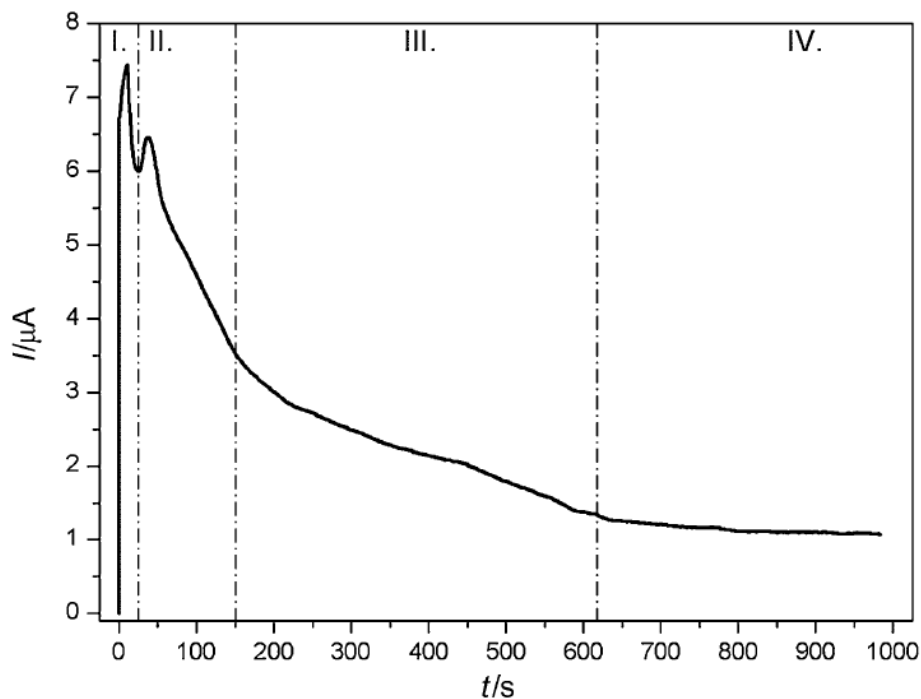


Obrázek 6: Schéma naznačující průběh anodizace s postupným prorůstáním TiO₂-NTs, převzato z [3]

Zaměříme-li se na fyzický průběh anodizace, postup je zhruba následující – na počátku je zoxidován povrch titanu na primární oxid. Fluoridové ionty následně začnou vlivem elektrického pole vytvářet drobné nerovnosti (póry) na povrchu oxidové vrstvy a dojde k vytvoření vrstvy bohaté na F⁻ na rozhraní Ti-TiO₂. Rozpouštění TiO₂ probíhá především na místech kde je elektrické pole silnější (blíže dnu nanotrubičky, resp. počátečního

póru). Takto postupně dochází k prorůstání TiO_2 -NTs z původně vytvořených pórů až dokud původní kov není celý zoxidován a přeměněn na TiO_2 -NTs, či dokud není reakce přerušena (viz Obrázek 6). [3,8]

Na obrázku 7 je znázorněn charakteristický průběh proudu při anodizaci.



Obrázek 7: Průběh proudu při anodizaci v závislosti na čase. Fáze I. odpovídá tvorbě primární oxidové vrstvy fáze II. odpovídá přechodnému zvýšení vodivosti způsobenému rozpouštěním TiO_2 díky fluoridovým iontům. Fáze III. pak odpovídá postupnému prorůstání TiO_2 -NTs. Finální fáze IV. znamená, že je veškerý titan zoxidován, téměř žádný proud již neprotéká. Převzato z [3]

3. Funkcionalizace TiO₂ nanotrubiček

Pro určité aplikace (např. implantologii) je vhodné TiO₂-NTs pro vylepšení jejich vlastností v určité oblasti modifikovat jinými látkami – ať už například stříbrem v podobě nanočástic, nebo pomocí proteinů, peptidů, protilátek, či sebeuspořádaných monovrstev. Při zanášení částic do nanotrubiček rozlišujeme základní dva přístupy: doping (znázorněn na obrázku č. 8), kdy se snažíme nový elektricky aktivní prvek či sloučeninu zavést do vzniklé (či vznikající) mřížky, a dekoraci (popř. plnění), kdy je cílem jiné nanočástice umístit na povrch, či dovnitř nanotrubiček.^[8, 53,54]

3.1. Doping

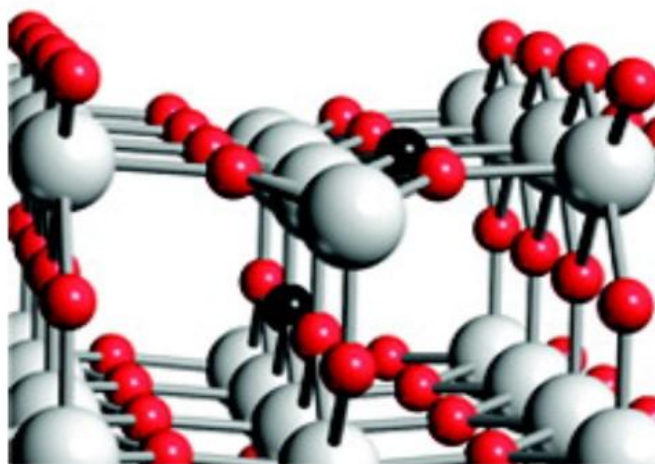
Existuje hned několik přístupů sloužících k dopingu TiO₂-NTs. Mezi nejčastěji používané metody patří následující čtyři:

První metoda je založena na ošetření rostoucích či již kompletních TiO₂-NTs roztokem či taveninou přidávané látky. Nejčastěji je uplatňována při tvorbě TiO₂-NTs hydrotermální, nebo sol-gel metodou.^[8, 53,54]

Druhá metoda je založena na tepelném ošetření, popřípadě syntéze v plynné atmosféře s obsahem přidávané látky. Nejčastěji je používána pro doping nanočástic uhlíku, nebo dusíku. Samotný proces pak probíhá například v močovíně, oxidu uhelnatém, nebo acetylénu.^[8, 53,54]

Třetí metoda je založená na vysokoenergetické implantaci iontů. Jedná se o spolehlivou metodu dopingů téměř jakýchkoliv částic. Její nevýhodou je však často nehomogenní distribuce dopovaných částic, a je možné že při vysokoenergetické implantaci iontů dojde k narušení tubulární struktury. Přesto se jedná o velice efektivní metodu.^[8, 53,54]

Čtvrtá a poslední metoda je typická pro TiO₂-NTs vytvářené pouze anodizační cestou. Buďto je možné přidat sloučeninu, kterou chceme TiO₂-NTs ošetřit, do elektrolytu používaného při anodizaci, nebo je možné použít místo čistého kovu (titanu) vhodnou slitinu sloužící jako substrát. Použijeme-li slitinu, výsledné nanotrubičky mohou obsahovat různé oxidy.^[8, 53,54]

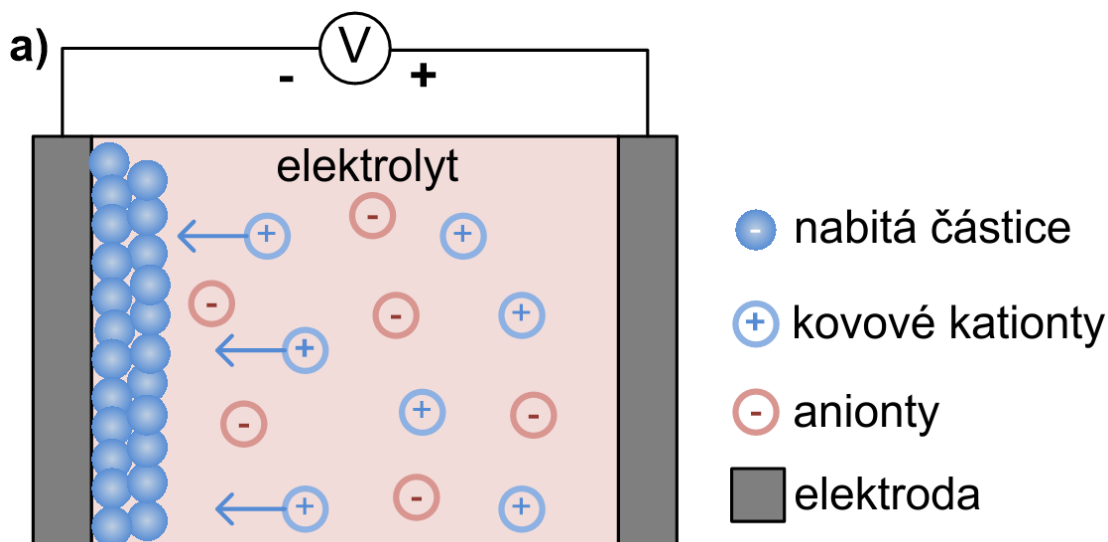


Obrázek 8: Znázornění inkorporace dopovaných částic uhlíku do mřížky TiO_2 -NTs, převzato z [55]

3.2. Dekorace a plnění

Chceme-li TiO_2 -NTs dekorovat, či vyplnit dalším materiálem, naskýtá se hned několik metod. Relativně jednoduchou, účinnou a univerzální metodou je například elektrodpozice. Reálně se ale můžeme setkat i s dekorací pomocí pomalé hydrolyzy prekurzorů, popřípadě s UV asistovanou fotokatalytickou depozicí stříbra, dekorací pomocí odpařování stříbra elektronovým paprskem^[13], nebo s elektrochemickou depozicí kvantových teček.^[8, 13, 15]

Elektrodpozice je první zmíněnou metodou. Jedná se o metodu, která je v případě TiO_2 -NTs značně znesnadněna n-polovodičovou povahou TiO_2 . Stěny TiO_2 -NTs mají vysokou vodivost, a tím pádem k depozici dochází především na povrchu, nikoliv uvnitř nanotrubiček, což znamená, že nedochází k jejich úplnému vyplnění. Tento efekt lze částečně omezit, je-li nejdříve proveden redukující self-doping na TiO_2 -NTs. Tím dojde ke vzniku Ti^{3+} vrstvy, která umožňuje postupné plnění. Samotná depozice pak probíhá na základě redukování kovu rozpuštěného v elektrolytu stejnosměrným proudem. Zjednodušené znázornění elektrodpozice je zobrazeno v na obrázku č.9.^[53, 54]



Obrázek 9: Zjednodušené znázornění elektrodepozice, vzorek je představován zápornou elektrodou (katodou), převzato z [56]

Dekorace hydrolýzou prekurzorů je druhou zmíněnou metodou. Jako prekurzory mohou sloužit například TiCl_4 či WCl_5 (pro dekoraci TiO_2 , resp. WO_3). Podmínkou však je, že reakce musí být dostatečně pomalá, aby docházelo k postupnému zachycování nanočástic oxidů.^[54]

UV asistovaná dekorace stříbrem probíhá následovně – dekorované TiO_2 -NTs jsou ponořeny do AgNO_3 , následně lehce promyty deionizovanou vodou, vloženy do čistého etanolu a vystaveny UV záření. To způsobí vysrážení stříbra na TiO_2 -NTs.^[15]

3.3. Sebeuspořádané monovrstvy

Sebeuspořádané monovrstvy (SAM) jsou vysoce uspořádané struktury, na něž se mohou snadno vázat molekuly. Jelikož jsou jejich stavební jednotky tvořeny z organických částí, lze je využít pro cílenou úpravu povrchových vlastností, například na kovových površích, nebo jejich oxidech. Nejvíce prozkoumané SAM systémy jsou alkanové thiohy na zlatě, alkylfosfáty a fosfonáty na oxidech kovů a SAM vytvořené silanizací na křemíku a dalších oxidech.^[32]

3.4. Modifikace růstovými faktory

Modifikace materiálů růstovými faktory využívá právě výše zmíněných SAM. Působí skrze zvýšenou diferenciaci kmenových buněk. Mezi používané růstové faktory patří například BMP-2, epidermální růstové faktory nebo vaskulární endoteliální růstové faktory.^[32]

3.5. Modifikace plazmou

Modifikace polymerací pomocí plazmy je považována za čistou, jednoduchou a flexibilní metodu povrchové modifikace s možností cílené změny povrchových vlastností pomocí funkčních skupin jako jsou skupina aminová, karboxylová, hydroxylová, epoxy a aldehydová. Příkladem této modifikace může být využití allylaminu jako prekurzoru pro vytvoření povrchu s aminoskupinami.^[32]

3.6. Modifikace UV zářením

Pomocí UV záření lze ovlivnit především smáčivost povrchu, a tím i jeho bioaktivitu. Hydrofilnější povrchy jsou pro adhezi buněk vhodnější. Platí, že čím déle je povrch UV záření vystaven, tím hydrofilnějším se stává – přičemž na výsledný stav má vliv také vlnová délka použitého UV záření.^[57]

4. Charakterizace nanostrukturovaných povrchů

K charakterizaci nově vytvořených nanostrukturovaných povrchů lze využívat značné množství technik a metod. Záleží vždy na dostupných prostředcích a parametrech, které o našem nanopovrchu potřebujeme získat. ^[21,58]

Informace o struktuře povrchu a morfologii nanostruktur nám poskytuje například skenovací elektronová mikroskopie (SEM), či transmisní elektronová mikroskopie (TEM), nebo transmisní skenovací elektronová mikroskopie (STEM). ^[58]

Jelikož bylo prokázáno, že důležitým faktorem určujícím interakci kostních buněk s implantáty je smáčivost jejich povrchů, důležitou charakteristikou nových materiálů je kontaktní úhel. ^[11, 22, 58, 59]

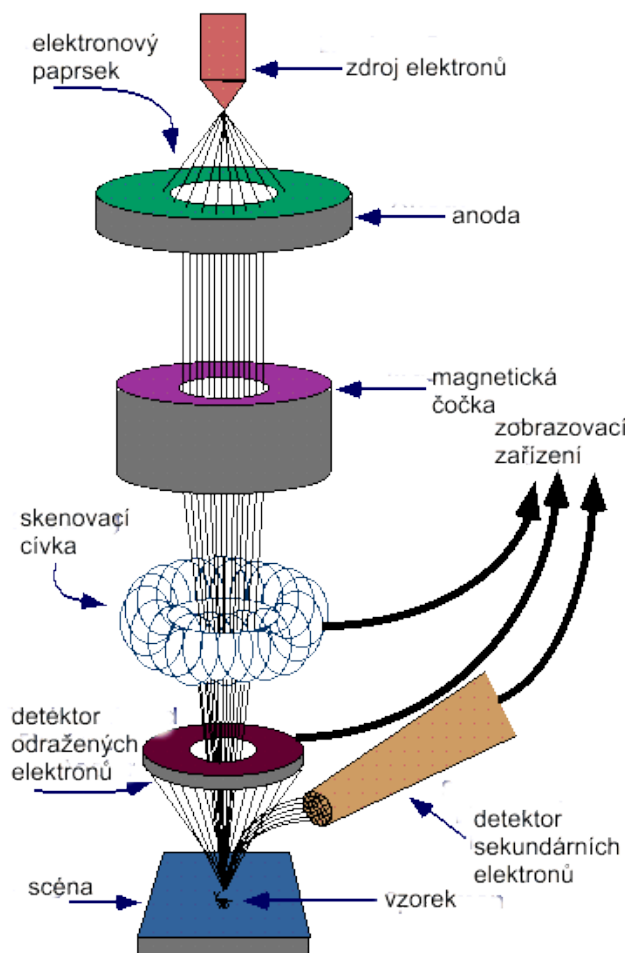
Informaci o chemickém složení vzorku nám může poskytnout například energetická dispersní spektroskopie (EDS), UV-VIS spektroskopie, či Ramanova spektrometrie, nebo FTIR. Informace o krystalické struktuře a velikosti nám pak může poskytnout například rentgenová difrakce. V následujících podkapitolách se budeme blíže věnovat některým z těchto metod. ^[58]

4.1. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronový mikroskop je přístroj svým principem velice podobný klasickému optickému mikroskopu. Jedná se o zařízení zobrazující s vysokým rozlišením a přiblížením objekty ve vakuu pomocí proudu elektronů, místo fotonů. ^[58,59,60,61]

Princip samotného zobrazování je následující - elektrony opouštějící zdroj jsou urychleny přiloženým napětím v řádech až stovek kilovoltů směrem k anodě. Následně jsou fokusovány pomocí magnetické čočky a zaměřeny na konkrétní bod vzorku pomocí skenovacích cívek. Tyto cívky slouží k postupnému skenování vzorku bod po bodu (viz obrázek 10). ^[58,59,60,61]

Jak již bylo zmíněno, proces zobrazování pomocí elektronů probíhá ve vakuu. Aby vzorky mohly být zobrazovány, je třeba je vhodně upravit. Ze vzorků musí být odstraněna veškerá voda a musí být zajištěna jejich vodivost. V případě že se jedná o materiály vodivé (např. kovy), není třeba provádět žádné modifikace. V případě nevodivých vzorků je třeba je potáhnout tenkou vodivou vrstvou, tvořenou například zlatem, nebo paladiem. ^[58,59,60,61]



Obrázek 10: Zjednodušené schéma elektronového mikroskopu, převzato z [59]

Při kontaktu elektronu se vzorkem může docházet k několika různým interakcím. Část elektronů se od vzorku odrazí, část může projít a část předá svou energii. Při předání energie dochází k vyražení sekundárních elektronů s nižší energií, než má primární svazek, popřípadě může dojít k uvolnění augerova elektronu, emisi rentgenového záření, či dokonce k emisi fotonů (katodoluminiscence). Při charakterizaci pomocí SEM se pak využívá především elektronů odražených, nebo sekundárních vyražených, případně lze využít charakteristického záření pro analýzu pomocí spektrometrie. [58,59,60,61]

V případě této diplomové práce SEM charakterizace slouží především pro určení morfologie nasyntetizovaných nanotrubiček a zjištění úspěšnosti jejich dekorace.

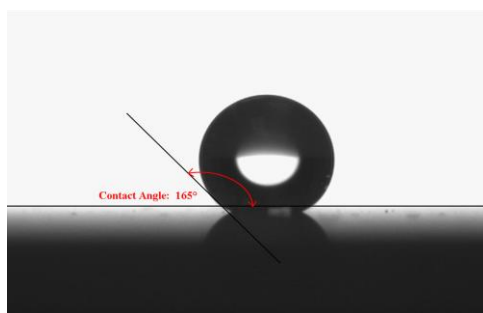
4.2. Kontaktní úhel

Měření kontaktního úhlu slouží ke kvantitativnímu stanovení smáčivosti materiálu, resp. jeho chování při styku s kapalinou. Lze pomocí něj určit chová-li se materiál hydrofóbně, či hydrofilně. Hydrofilní povrchy jsou charakteristické kontaktními úhly menšími

než 90° . V případě hydrofobního povrchu je kontaktní úhel větší než 90° . Čím menší kontaktní úhel materiál má, tím lépe je smáčivý, chová se více hydrofilně. ^[62]

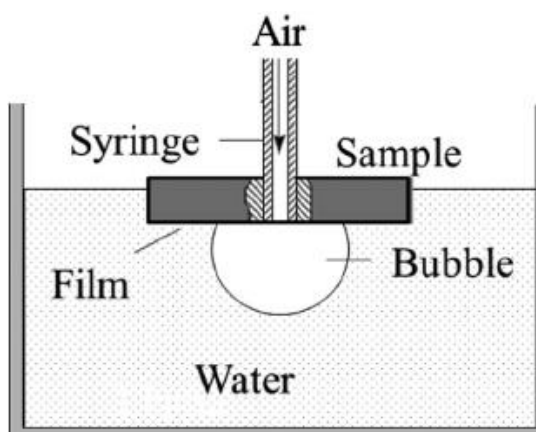
K měření kontaktního úhlů nanostrukturovaných povrchů lze přistupovat několika způsoby. Měření lze provést pomocí teleskop-goniometru, popřípadě lze měření provést pomocí vzduchové bubliny, nebo nakláněné desky. ^[62]

Měření pomocí teleskop-goniometru probíhá následovně – na vzorek umístěný v osvětlené snímací rovině je nakápnuto malé množství kapaliny. Profil kapky je následně nasnímán kamerou, a z přiblíženého snímku rozhraní kapka-povrch lze snadno odečíst kontaktní úhel (obr. 11). ^[62]



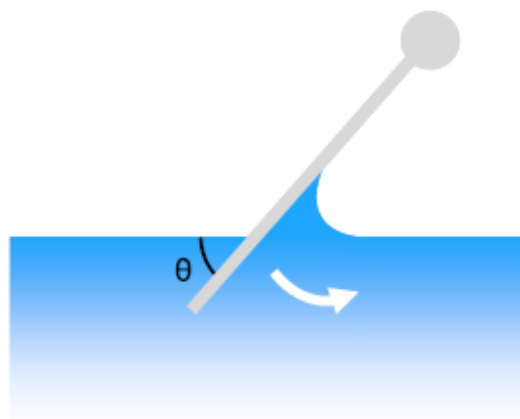
Obrázek 11: Ilustrační obrázek určení kontaktního úhlu, převzato z [63]

V případě měření kontaktního úhlu pomocí vzduchové bubliny je měřený povrch umístěn do kapaliny, a na rozhraní kapalina-povrch je vpravena vzduchová bublina. Měří se pak přímo úhel vytvořený vzduchovou bublinou na měřeném povrchu (obr. 12). ^[62]



Obrázek 12: Metoda měření pomocí vzduchové bubliny, převzato z [64]

Třetí zmíněná metoda, měření pomocí nakláněné desky, přistupuje k měření jiným způsobem. U předchozích dvou metod bylo manipulováno s prostředím (kapalinou, plynem). V případě nakloněné desky se manipuluje s destičkou ze zkoumaného materiálu. Ta je ponořena do kapaliny a nakláněna, až se nalezne úhel, při kterém je na jedné straně destičky hladina kapaliny nezdeformovaná (stejně jako hladina kapaliny bez narušení). Při nalezení tohoto úhlu je destička s kapalinou v kontaktním úhlu. Metoda je vhodná pro měření malých úhlů (obr. 13) ^[62]



Obrázek 13: Metoda nakláněné desky, kontaktní úhel Θ , převzato z [62]

4.3. Testování antimikrobiální aktivity

V případě vývoje nových materiálů pro aplikaci v medicíně je potřeba stanovit, jak se na testovaném povrchu projevují například bakterie, které s ním mohou přijít do styku. K tomu slouží takzvané testy antimikrobiální aktivity, přičemž test se volí podle povahy zkoušeného materiálu. V případě této diplomové práce se jedná o materiál v podobě malé destičky. Povrch testovaného je tedy uveden do kontaktu s bakteriální suspenzí, která je na něm nejčastěji určitou dobu inkubována. Po inkubaci je vzorek opláchnut, adherované bakterie z povrchu uvolněny za pomoci ultrazvuku a takto získaná bakteriální suspenze, jejíž množství bakterií je ovlivněné daným vzorkem, je vhodně naředěna a nanášena na živný substrát, kde je po následujících 24 hodin kultivována. Antibakteriální aktivita daného povrchu je pak nepřímě úměrná množství kolonií, jenž na substrátu vyrostly. Čím vyšší je antibakteriální aktivita materiálu, tím méně je výsledných kolonií. ^[13]

Tuto metodu lze hodnotit buďto relativně - v porovnání s kontrolním vzorkem, nebo absolutně, pokud známe četnost kolonie formujících jednotek (CFU) původní použité suspenze. Tu lze stanovit turbidimetricky pomocí McFarlandových standardů. Jedná se o srovnávací metodu, kdy je zákal bakteriální suspenze srovnán se standardizovanými roztoky s různým podílem BaCl_2 a H_2SO_4 . Tento údaj je pak následně převeden na informaci o počtu CFU – určitý zákal odpovídá určité koncentraci bakterií. ^[65]

V této diplomové práci jsme se však rozhodli tuto metodu modifikovat. Místo nanášení bakteriální suspenze na vzorky jsme ji nanесли na agarové plotny v Petriho miskách. Na takto připravený agar jsme následně vzorky položili a inkubovali. Bakterie, které byly v kontaktu se vzorkem, pak byly zajištěny sejmutím vzorku a vyříznutím styčné plochy na agaru. Tento materiál pak byl umístěn do zkumavek eppendorf společně s 250 μl destilované vody a vortexován pro jejich uvolnění. Kompletní postup modifikované metody je v praktické části v kapitole 6.3.

Kromě této metody existuje široká škála metod zaměřených na materiály určitých typů. V případě testování materiálů, které jsou schopny difundovat do okolního prostředí, a většinou právě na tomto mechanismu je založeno jejich šíření, mezi nejznámější metody patří následující dvě – diskový difuzní test a E-test.

Diskový difuzní test

Diskový difuzní test je založen na nanesení malého disku s testovaným materiálem na agarový disk s nasazeným modelovým organismem. Hodnotí se pak průměr vytvořené inhibiční zóny, ve které bakterie nejsou schopny existovat – jinými slovy, jak moc může látka difundovat, aby stále zůstala účinná. Příklad tohoto testu je uveden na obrázku č.14. ^[66]



Obrázek 14: Ilustrativní vyobrazení diskového difuzního testu, převzato z [66]

E-test

V případě že se nám jedná o zjištění závislosti mezi koncentrací testované látky a velikostí vytvořené inhibiční zóny, vhodnou metodou je takzvaný E-test. V tomto případě je na agarový disk položen proužek obsahující gradientně klesající koncentraci testované látky. Hodnotí se pak vztah mezi velikostí vytvořené difuzní zóny a koncentrací testované látky v daném místě. Příklad tohoto testu je znázorněn na obrázku č. 15.



Obrázek 15: Ilustrativní vyobrazení E-testu, převzato z [67]

4.4. Testování biokompatibility

Pro účely této práce jsme se rozhodli vyhodnotit biokompatibilitu materiálu především pomocí sledování adheze nasazených MG-63 buněk na povrch testovaného materiálu. Ze stavu adherovaných buněk lze usuzovat jak je materiál pro kontakt s buňkami vhodný, a z jejich počtu lze zjistit, jaký vliv má materiál na proliferaci.

Studium adheze

Adhezi lze vyhodnocovat pomocí fluorescenčního značení vhodnými fluorofory, které nám pomohou adherované buňky zobrazit. Příkladem takového značení je například využití kalceinu, který je díky polopropustnosti cytoplazmatické membrány zadržován uvnitř buněk a značí nám životaschopné buňky, a pomocí propidium jodidu, který se váže na nukleové kyseliny a je tedy schopný značit mrtvé buňky. Při kombinaci obou fluoroforů jsme schopni pozorovat jak živé, tak mrtvé buňky, a to na různých emisních vlnových délkách. Tomuto postupu se říká live/dead barvení, a primárně je určené ke stanovení viability buněk. Vzhledem k tomu, že předpokládáme, že adherované buňky mohou být jak živé, tak mrtvé, je tento postup vhodný i pro účely této práce.^[68]

Studium proliferace

Míru proliferace je možné stanovit například pomocí MTT, nebo XTT testu. MTT test je metoda pro stanovení míry proliferace na základě metabolické aktivity, jejíž princip je založen na redukci rozpustného tetrazolium bromidu na formazanový derivát pomocí mitochondriálních enzymů. Po přidání detergentu se barvivo rozpustí, a vzniknou tak vzorky zabarvené do různých odstínů modrofialové barvy, které se následně spektrofotometricky vyhodnotí. XTT test je pak variací na MTT test využívající jiný derivát tetrazoliové soli, s tím rozdílem, že výsledek je přímo rozpustný ve vodě, není tedy potřeba detergentu, a barví do červena.^[69, 70, 71]

Studium adsorpce proteinů na nanostruktury

První metodou pro studium adsorpce proteinů na nanostruktury je metoda vyčerpání roztoku. Jedná se o jednoduchou metodu. V případě, že známe původní koncentraci roztoku daného proteinu, a po kontaktu se vzorkem je tato koncentrace jiná, změna koncentrace je přisuzována adsorpci proteinů na testovaný vzorek. Adsorpce je tedy měřena jako změna absorbance proteinového roztoku. K tomu lze použít například kolorimetrické metody, radioizotopem či fluorescenčně značené proteiny, nebo například absorpci záření v oblasti UV.^[72]

Mezi další metody, které lze pro stanovení adsorpce použít, patří z kategorie technik založených na optických vlastnostech například elipsometrie, reflektometrie s variabilním úhlem, nebo povrchová plasmonová resonance. Všechny tyto metody jsou založeny na

interakcích mezi světlem a adsorbovanou vrstvou proteinů – míra jejich adsorpce je dána změnou v jejich optických vlastnostech zkoumaného vzorku.^[72]

Studium morfologie buněk na nanopovrchích

Morfologii buněk lze posoudit již na základě pozorování optickým mikroskopem. Ne vždy jsou však všechny struktury viditelné, a proto je vhodné jejich zobrazování pomoci, a to například vhodným fluorescenčním značením, nebo zobrazením pomocí elektronové mikroskopie.^[71]

V případě studia morfologie pomocí fluorescenčního značení se zaměřujeme především na vnější struktury. Vhodným postupem je například značení aktinových vláken, které tvoří cytoskelet. Pro toto značení existuje celá řada vhodných komerčních fluoroforů, například Acti-stain 488, 535, 555 nebo 670.^[71,73]

Po jejich aplikaci jsou vlákna zobrazitelná pomocí fluorescenční, nebo laserové konfokální mikroskopie, a my tedy můžeme vyhodnotit tvar buněčného cytoskeletu, a celkový počet fokálních kontaktů, buněčných výběžků.^[71,73]

Další možností je zobrazení morfologie buněk pomocí elektronového mikroskopu. Před použitím této metody je potřeba buňky připravit – musí být fixovány k povrchu a dehydrovány pomocí roztoků etanolu různých koncentrací. Takto upravené vzorky jsou připraveny k zobrazení. Výsledné snímky se hodnotí stejným způsobem, jako fluorescenčně značené – hodnotí se tvar buněk, počet jejich výběžků.^[71]

Měření aktivity alkalické fosfatázy

Alkalická fosfatáza je označení pro skupinu enzymů podílejících se na hydrolytickém štěpení esterů kyseliny fosforečné. V případě kostních buněk se podílí především na zabudovávání Ca^{2+} iontů do jejich struktury. Měření aktivity alkalické fosfatázy se provádí na základě sledování optické změny v absorpci světla způsobené štěpením p-nitrofenylfosfátu na 4-nitrofenol a fosfát. Absorbance, měřená při 405 nm, je pak ovlivněna množstvím uvolněného 4-nitrofenolu, které je úměrné aktivitě alkalické fosfatázy.^[74]

Diferenciace kmenových mezenchymálních buněk

V případě implantačních aplikací může být důležitým faktorem, jaký vliv má nový materiál na diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk. Tyto buňky se mohou dále diferencovat do osteoblastů, nebo také chondrocytů. Jejich interakce s testovaným povrchem nám tedy může poskytnout důležité informace pro implantační aplikace. Možností jak tyto vlastnosti otestovat je kultivovat buňky na testovaném povrchu, a při dalším pasážování je přesadit do média stimulujícího chondrogenezi. Ve výsledku se pak hodnotí pelety

kultivované v chondrogenním médiu v porovnání s pelety kultivovanými v médiu klasickém.^[75]

Studium kalcifikace

Ke studiu kalcifikace je možné použít absorpční spektrofotometrii. Proces je založen na využití vhodného barviva – například Alizarin Red – a jeho následné inkubaci testovaných buňkách. Zhruba po 30 minutách je roztok odstraněn a na jeho místo je nanesen další roztok, ve kterém je barvivo rozpustné. Zhruba 10 minut trvá, než se z buněk barvivo uvolní. Ke stanovení míry kalcifikace se změří absorbance výsledného roztoku.^[76]

5. Práce s bakteriemi a buněčnými kulturami

5.1. Kultivace bakterií

Bakterie jsou, co se týče kultivace, poměrně odolné, nenáročné organismy. Jako takovým jim stačí pouze dostatečná vlhkost a substrát s dostatkem živin (N,C), pro jejich reprodukci. Substráty mohou být buďto tekuté, mezi které patří například masopeptonová voda, či bujón, nebo pevné. Mezi používané pevné substráty patří například základní živný agar. Ten je složen pouze z agaru obohaceného pro bujón a často se používá jako základ pro další substráty. Další používanou variantou jsou krevní, nebo čokoládový agar. V obou případech se jedná o agar obohacený o beraní krvinky. V případě krevního, jsou však přidány k chladnoucemu agaru, zatímco v případě čokoládového jsou přidávány do horkého, který způsobí hemolýzu a čokoládové zabarvení.^[77,78]

Mezi nejpoužívanější substráty pro kultivaci bakterií patří i Luria-Bertani (LB) agar. Jedná se o pevný substrát složený z agaru, tryptonu jako zdroje peptidů, kvasnicového extraktu, jako zdroje stopových prvků a vitamínů, a chloridu sodného, zdroje sodných jontů. Recept v původním znění obsahoval navíc ještě glukózu, která byla v aktuálních receptech odstraněna.^[79]

Při kultivaci bakterií je důležité mít na vědomí, že každá bakterie pro svou životaschopnost může vyžadovat mírně jiné, specifické podmínky, jako například atmosféru o určitém podílu plynů, nebo složení substrátu. Obecně však platí, že bakterie jsou poměrně odolné organismy, které je možné kultivovat i za relativně běžných podmínek. Bakterie *E. Coli*, která je využívána v této diplomové práci, je možné kultivovat za běžných pokojových teplot, ovšem pro vyšší efektivitu a rychlejší výsledky se doporučuje optimální teplota 37 °C.^[77, 78]

5.2. Kultivace MG-63 buněk

MG-63 jsou buněčnou linií získanou z osteosarkomu – tedy z nádoru kostí. Přestože se jedná o nádorovou linii, zachovaly si své vlastnosti, díky kterým je možné je využít jako modelové buňky pro zkoumání interakcí s potenciálními kostními implantáty.^[80]

Buňky musí být kultivovány v prostředí, které obsahuje dostatek živin, potřebných pro jejich existenci. V tomto médiu jsou buňky skladovány v kultivačních lahvích v inkubátoru při 37 °C a v 5% CO₂ v okolní atmosféře. Jelikož se však buňky neustále množí, a nezbytné jejich koncentraci udržet v rozumných mezích, je potřeba je, stejně jako ostatní buňky, pravidelně pasážovat. Tato potřeba je umocněna faktem, že jelikož se jedná o nádorovou linii, buňky postrádají schopnost kontaktní inhibice jejich další reprodukce.^[80]

Protokol používaný pro pasážování buněk^[81,82]

1. Ověření dostatečné konfluence buněk pod mikroskopem.
2. Ohřev nového média a 0,25% trypsinu/EDTA v 37°C vodní lázni
3. Přesun kultivační lahve do flowboxu, další práce probíhá za sterilních podmínek.
4. Odstranění použitého média z kultivačních lahví.
5. Opláchnutí buněk fosfátovým pufrem a následné odsátí pufru.
6. Nanesení trypsinu na povrch buněk pro jejich odloučení v množství, aby byly rovnoměrně pokryty.
7. Přesun kultivační lahve do inkubátoru na cca 5 minut, nebo do jejich odloučení od povrchu.
8. Vyjmutí kultivační lahve z inkubátoru, poklepání lahví o tvrdý povrch nebo ruku pro uvolnění buněk z jejího povrchu.
9. Kontrola resuspendování buněk pod mikroskopem.
10. Přidání média k suspenzi pro zastavení dalšího štěpení.
11. Přesun suspenze do centrifugační zkumavky a její centrifugace - 5 minut při 1000 otáčkách za minutu. Volba počtu otáček a doby centrifugace se může dle použitého typu buněk mírně lišit.
12. Napipetování nového média do nové kultivační lahve.
13. Odstranění supernatantu z centrifugované zkumavky
14. Resuspendování buněk ve vhodném množství nového média.
15. Spočítání buněk v nově vytvořené suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky.
16. Napipetování buněčné suspenze do předem připravených kultivačních lahví s novým médiem ve vhodném poměru (např. 1:2, 1:3) v závislosti na potřebě a rychlosti růstu.
17. Rozmíchání suspenze v lahvi pomocí jemného třepání a přesun buněk do inkubátoru.

Pro případ, že s buňkami experiment v dohledné době neplánujeme, ale v budoucnu je budeme chtít využít, je důležité znát postupy pro jejich dlouhodobé uchovávání a tím spojený rozmrazování a zmrazování.

Protokol používaný pro zmrazování buněk^[83,84]

1. Příprava zmrazovacího média. Médium je skladováno při 2-8 °C.
2. Odloučení buněk od povrchu postupem používaným při pasážování. Resuspendování buněk.
3. Stanovení počtu buněk ve výsledné suspenzi. Podle tohoto množství odebrání správného množství zmrazovacího média.
4. Centrifugace suspenze buněk. Po centrifugaci odstranění supernatantu.
5. Resuspenze buněk v chladném zmrazovacím médiu.
6. Nadávkování buněčné suspenze do ampulek určených pro kryogenické uskladnění.
7. Zmrazení buněk v zmrazovacím zařízení s kontrolovaným řízením teploty s teplotním skokem -1 °C za minutu. Alternativou tohoto procesu je uložení ampulek v izopropanolové komoře při -80 °C přes noc.
8. Přemístění zmražených buněk do tekutého dusíku a jejich skladování v plynné fázi nad tekutým dusíkem do dalšího použití.

Protokol používaný pro rozmrazování buněk^[71,72]

1. Přesun ampulky se zmraženými buňkami do vodní lázně o teplotě 37 °C.
2. Rychlé rozmrazení buněk vířením ampulky ve vodní lázni.
3. Přesun ampulky z vodní lázně do flowboxu. Další práce pokračuje za sterilních podmínek.
4. Obsah ampulky napipetujte do větší nádoby společně s vhodným kultivačním médiem.
5. Centrifugace suspenze buněk při cca 200 x g 5-10 minut. Tento parametr záleží na konkrétním druhu buněk.
6. Kontrola barvy a zakalení supernatantu. V případě že je čirý, jeho odstranění.
7. Resuspendování buněk v kultivačním médiu a přemístění do kultivační lahve.
8. Vložení kultivační lahve do inkubátoru s pro kultivaci vhodným prostředím.

II. CÍLE PRÁCE

1. Návrh, příprava a charakterizace povrchu tvořeného TiO_2 nanotrubičkami dekorovanými stříbrnými nanočásticemi
2. Testování vlivu množství stříbra na antibakteriální vlastnosti nově vytvořeného materiálu
3. Testování vlivu množství stříbra na biokompatibilitu vytvořených nanopovrchů u MG-63 buněk a jejich srovnání s TiO_2 nanotrubičkami bez stříbra

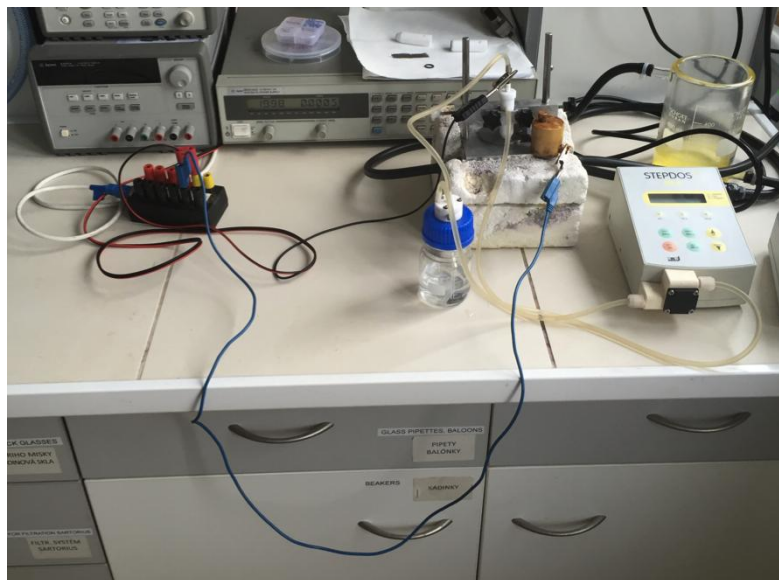
III. PRAKTICKÁ ČÁST

6. Materiál a použité metody

6.1. Anodická oxidace

TiO₂-NTs byly syntetizovány pomocí anodické oxidace, a to na křemíkových waferech, na něž byla naprášena 500nm vrstva titanu. Anodizace probíhala v dvouelektrodovém zapojení zachyceném na obrázku 16. Jako elektrolyt posloužil roztok na organické bázi složený konkrétně z ethylenglykolu (*čistý, Penta, CZ*) s 1,2 wt% NH₄F (*Riedel-de Hoën*) a 2 vol% ultračisté miliporované vody (*Millipore Corp., USA, 18,2 MΩ*). Roztok při syntéze vedené za pokojové teploty necirkuloval.

V průběhu diplomové práce byly trubičky nejdříve syntetizovány za následujících parametrů: náběžná rampa 1V/s, maximální napětí 20V, doba syntézy 1500 s. ^[2,3] Tímto procesem byly vytvářeny nanotrubičky o vnitřním průměru cca 50 nm.



Obrázek 16: Zapojení použité pro anodizaci.

Následně však došlo k poruše stroje, pomocí kterého byl na křemíkový wafer naprašován titan. Po jeho opravě a výrobě nových waferů za stejných podmínek z neznámých důvodů nebyla vytvářena uspořádaná tubulární struktura, nýbrž pouze nanopórní povrch, a proto bylo potřeba parametry upravit. A to následovně – byla zachována náběžná rampa 1 V/s, maximální napětí však bylo sníženo na 15 V, doba syntézy se při těchto parametrech pohybovala okolo 1200 s. Takto vytvořené nanotrubičky měly průměr cca 50-70 nm. Po syntéze byly vzorky vždy pořádně opláchnuty miliporovanou vodou a osušeny proudem vzduchu.

Před dalším použitím byly takto vytvořené TiO₂-NTs vyžihány, převedeny z amorfni do krystalické podoby, a to nejdříve s teplotní rampou 3 °C za minutu, až do maximální teploty 450 °C, při které byly vzorky drženy po dobu 1 hodiny. Po výše zmíněných komplikacích však při tomto procesu vznikaly v textuře TiO₂-NTs praskliny, a proto byla upravena teplotní rampa použitá při žihání, a to na 1 °C za minutu. Po této úpravě se praskliny vyskytovaly méně.

6.2. Elektrodepozice stříbra

Pro pulzní elektrodepozici stříbra byl připraven roztok na bázi kyanidu. Ten byl namíchán v celkovém množství 100 ml ze 100 ml ultračisté miliporované vody (*Millipore Corp., USA, 18,2 MΩ*), 8 g KCN a 0,75 g K[Ag(CN)₂].^[3,85]

Elektrodepozice samotná probíhala ve stejném zapojení jako anodizace, tedy dvoelektrodovým, a bez cirkulace elektrolytu, avšak s menší anodizací hlavou (menší plocha). Postupně byly zkoušeny různé parametry elektrodepozice, jako například průchozí proud (1 mA až 8 mA), šířka samotného pulzu (300 ms až 2,5 s), či počet opakování cyklů (1 až 8). Jediným zachovaným parametrem v průběhu všech testů byla délka periody jednoho cyklu, která byla stanovena na 3 s.

Vzorky Ag-TiO₂-NTs byly před dalším použitím řádně vyčištěny etanolem, opláchnuty miliporovanou vodou, osušeny proudem vzduchu a 15 minut sterilizovány pomocí UV lampy.

6.3. Testování antibakteriální aktivity

Antibakteriální aktivita nově nasyntetizovaného materiálu byla ověřována v Petriho miskách na agarových plotnách. Co se týče použitých bakterií, pro testování byly zvoleny Dh5-α bakterie E. Coli.

Plotny byly připraveny z 4,5 g agaru (Sigma), 1 g extraktu z kvasnic (Sigma), 2 g chloridu sodného (Sigma), 2 g tryptonu (Fluka Analytical) a 200 ml destilované vody. Všechny přísady byly při pokojové teplotě smíchány, a následně v kádince obalené alobalem vloženy do autoklávu. Po zhruba hodině byl program autoklávu ukončen a hustý roztok byl nadávkován do jednotlivých Petriho misek, a to tak, že v každé samostatné „půlmisce“ bylo 25 ml.

Samotný antibakteriální test byl prováděn následovně: bakterie byly nanесeny na agarové plotny a následně danou dobu (3 nebo 24 h) inkubovány při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky z plátů společně s bakteriemi na povrchu agaru pod vzorkem sejmuty a přesunuty do zkumavek eppendorf společně s 250 µl destilované vody. Aby se bakterie z povrchu vzorků

uvolnily, směs byla vortexována 2x po dobu 5 s. Tímto byla získána bakteriální suspenze s množstvím bakterií ovlivněným jednotlivými vzorky.

Takto získaná suspenze byla vhodně naředěna daným množstvím vody a následně v objemu 200 µl nanесena na nové agarové plotny, kde byla inkubována 24 hodin při 37 °C.

Po 24 hodinách byly Petriho misky vyjmuty, vyfoceny a kolonie bakterií spočítány.

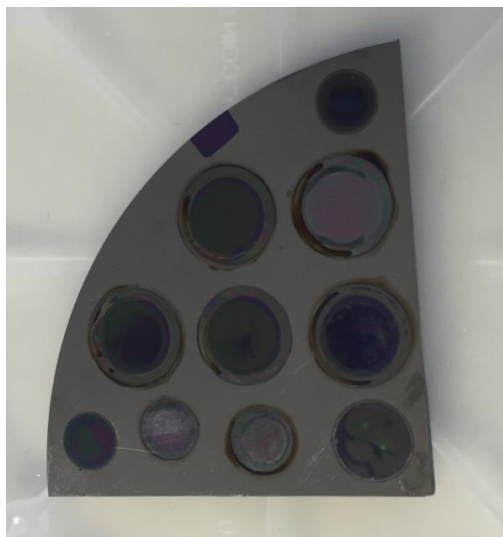
6.4. Adheze MG-63 buněk

V případě této diplomové práce byla adheze sledována pomocí fluorescenčního mikroskopu. Buňky byly nejdříve kultivovány v kultivačních lahvích v DMEM médiu (Sigma Aldrich) s 10 % FBS, 2 mM L-glutaminu, 100 U/ml penicilinu a 100 U/ml streptomycinu s 5 % CO₂ při 37 °C. Před nanесením na vzorky bylo provedeno pasážování buněk, tedy, jak již bylo zmíněno výše, jejich odštěpení od povrchu kultivační lahve pomocí trypsinu/EDTA a rozmíchání v novém médiu. Takto vytvořená suspenze byla nanесena na povrch tvořený Ag-TiO₂-NTs s buněčnou hustotou 5×10^3 a následně opět vložena do inkubátoru s 5 % CO₂ při 37 °C. Po 24 hodinách byly vzorky barveny 15 minut pomocí roztoku s 2 µM kalceinu-AM a 1,5 µM propidium jodidu v PBS. Po barvení byly vzorky promyty PBS, vyfoceny fluorescenčním mikroskopem a adherované buňky na jednotlivých vzorcích byly spočítány.

7. Výsledky a diskuze

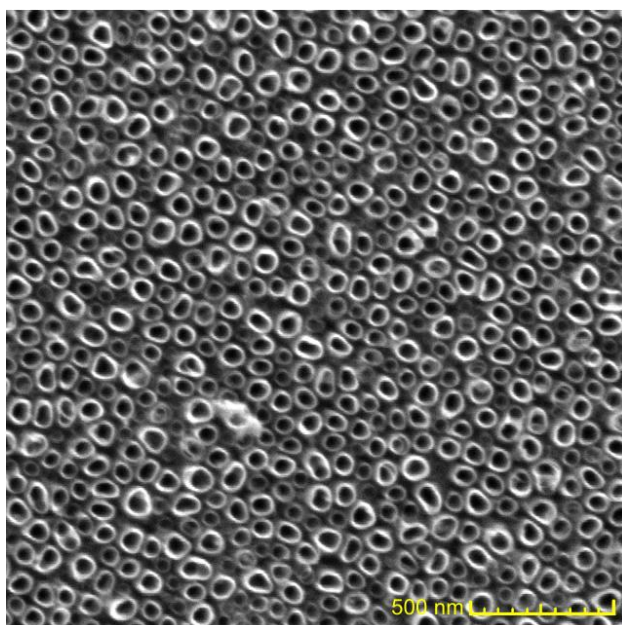
7.1. Syntéza nanotrubiček

Syntéza TiO_2 -NTs probíhala anodickou oxidací s parametry, jenž jsou zapsány výše v kapitole „materiál a metody“. Na obrázku 17 je zachycen makroskopický snímek $\frac{1}{4}$ waferu. Plocha uvnitř „zelených kruhů“ je tvořena TiO_2 -NTs.

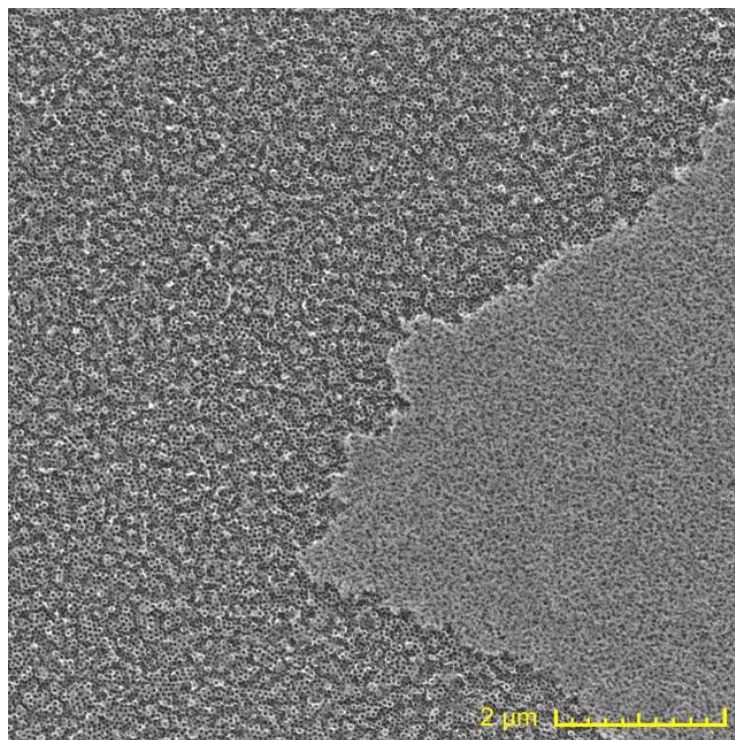


Obrázek 17: $\frac{1}{4}$ waferu s výsledky anodizace

Sledovaný průběh proudu v závislosti na čase odpovídal teoretickým předpokladům, a dle všeho tedy docházelo k formaci tubulární struktury. Přítomnost nanotrubiček byla ověřena pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Následně byly struktury vyfotografovány. Výsledek lze vidět níže na obrázku 18. ^[2,3]



Obrázek 18: Výsledek syntézy TiO_2 nanotrubiček



Obrázek 19: Nasyntetizované nanotrubičky

V případě špatně namíchaného roztoku s nedostatkem F^- iontů, z důvodu špatné navážky, docházelo k nedokonalému prorůstání trubiček a místy byl vzorek potažen porézní vrstvou TiO_2 (obr. 19).

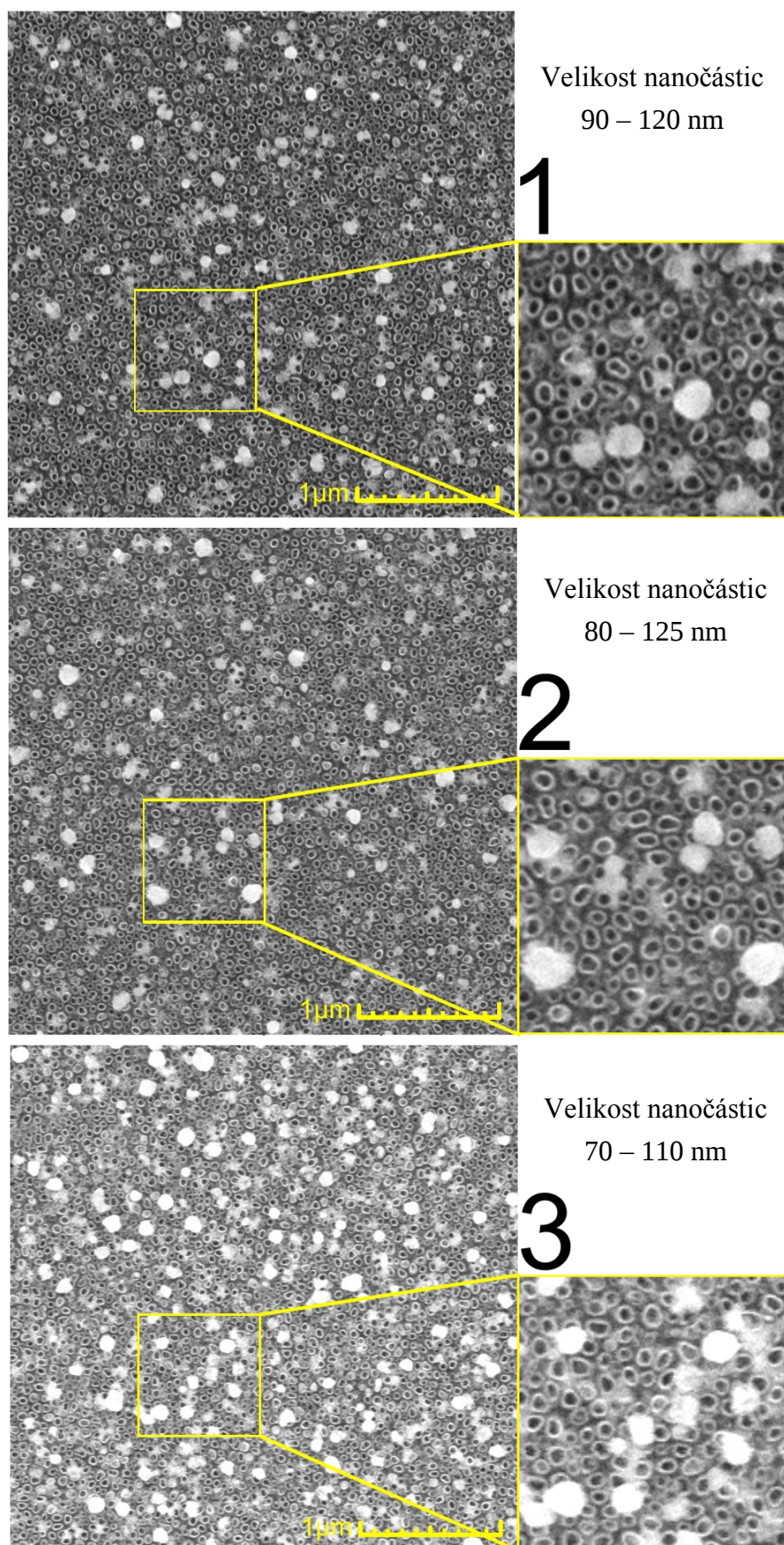
Na snímcích pořízených rastrovacím elektronovým mikroskopem jsou vidět TiO_2 -NTs. Se správným roztokem byly TiO_2 -NTs o průměru cca 50-70 nm homogenní po celé ploše vzorku. Snímky byly pořízeny před žíháním vzorků.

7.2. Dekorace nanotrubiček stříbrem

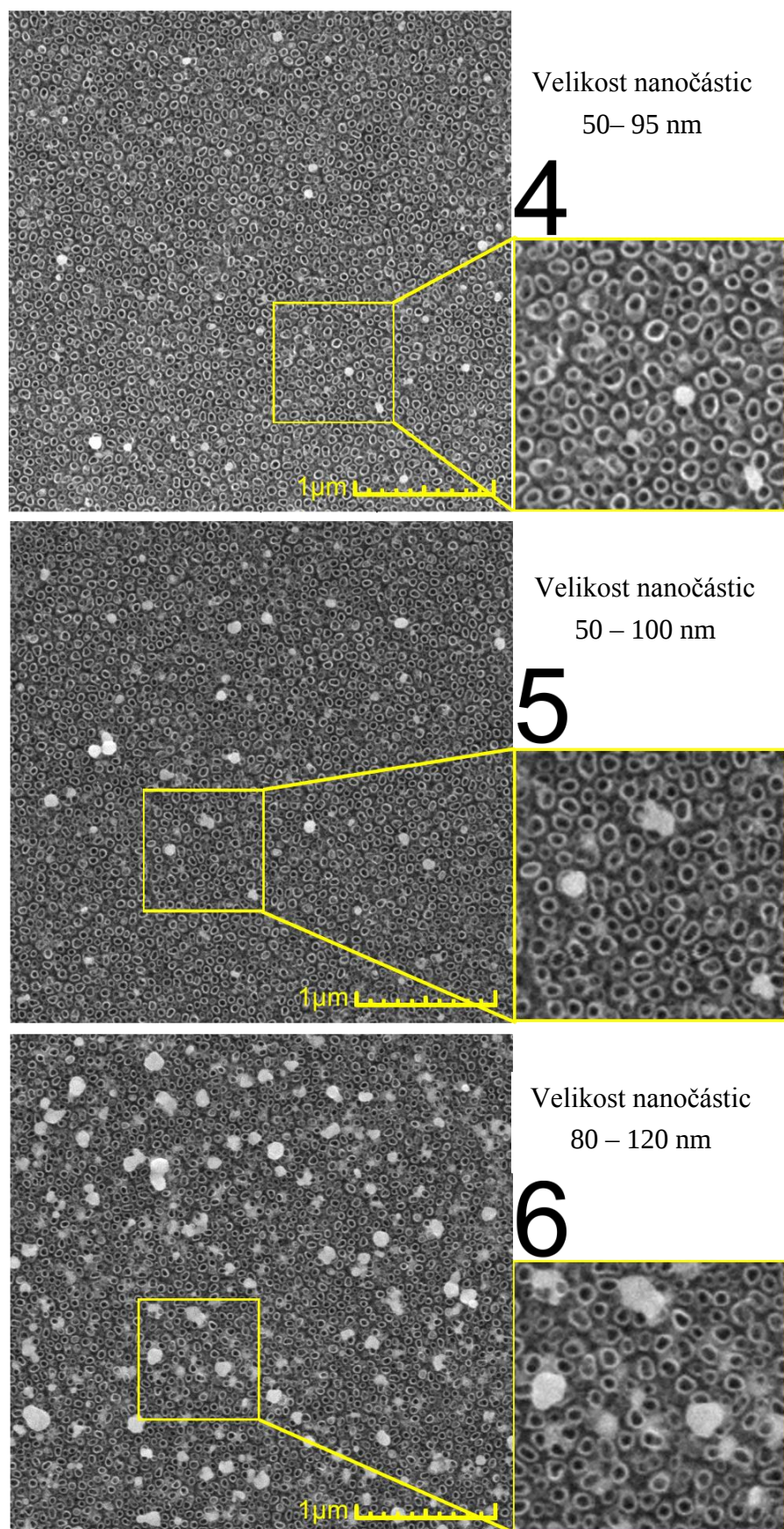
Po úspěšné syntéze TiO₂-NTs, a jejich vyžihání, byly prováděny pokusy o jejich dekoraci stříbrem pomocí elektrodpozice. ^[53,24] Vzorek s TiO₂-NTs byl umístěn pod anodizační hlavu, která byla připojena na pulzní generátor skrz relé, vyplněna depozičním roztokem. Následně byl na každý vzorek aplikován proudový pulz o požadované velikosti, délce a počtu cyklů. Parametry pulzů použitých při posledním experimentu, na základě kterého došlo k finálnímu stanovení postupu pro depozici nízkého, středního a vysokého množství stříbra byly zapsány do tabulky 1. Fotografie jednotlivých vzorků pořízených pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu jsou k dispozici na následujících obrázcích (obr. 20 až 23).

Tabulka 1: Záznam použitých parametrů z experimentu elektrodpozice stříbra

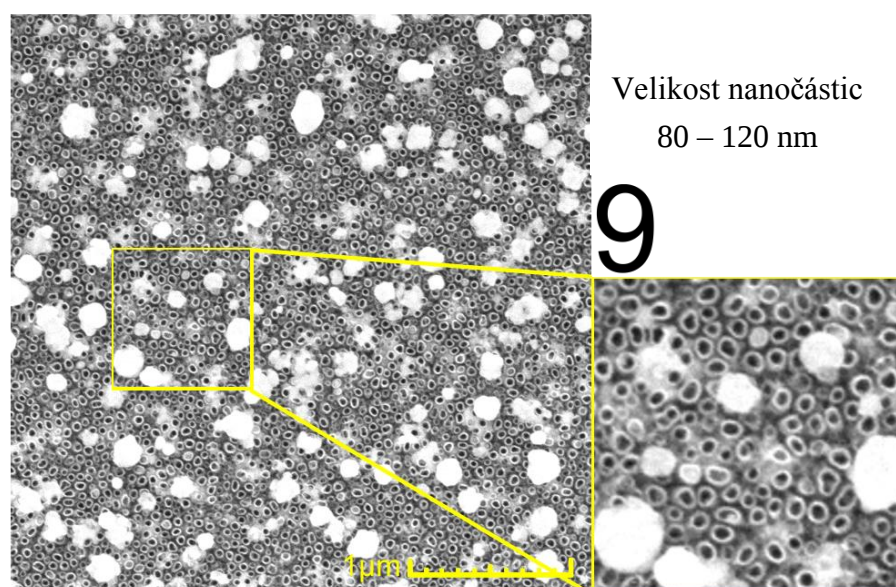
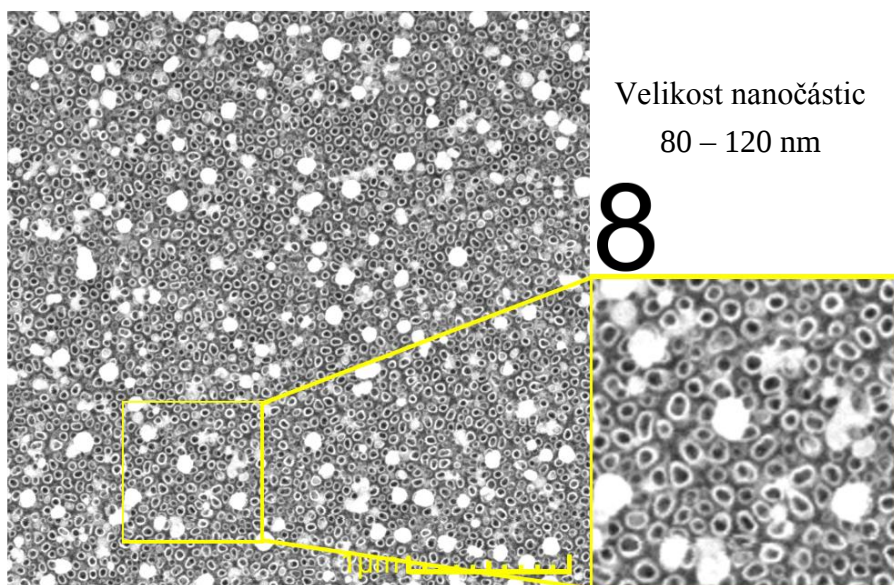
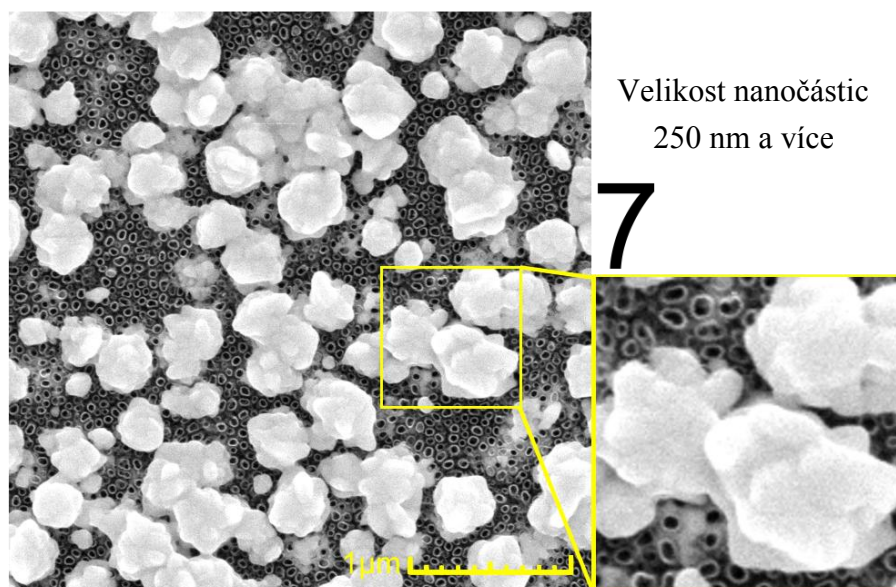
ID	Velikost [mA]	Délka [ms]	Počet cyklů	Cirkulace roztoku	Výsledná koncentrace stříbra, popis
1	1	750	2	Ne	Střední, nanočástice malé, rozložení homogenní po celé ploše
2	1	1250	2	Ne	Střední, nanočástice různých velikostí, rozložení nehomogenní
3	1	2250	2	Ne	Vysoká, rozložení homogenní po celé ploše
4	1	1250	1	Ne	Nízká, rozložení homogenní po celé ploše
5	1	500	2	Ne	Nízká, rozložení homogenní po celé ploše
6	1	500	3	Ne	Střední, nanočástice různých velikostí, rozložení homogenní
7	8	2000	2	Ano	Vysoká, částice příliš velké, nehomogenní
8	1	300	3	Ne	Vysoká, rozložení homogenní po celé ploše
9	8	300	4	Ano	Vysoká, částice různých velikostí, příliš velké, nehomogenní
10	1	300	4	Ne	Střední, nanočástice různých velikostí, rozložení nehomogenní



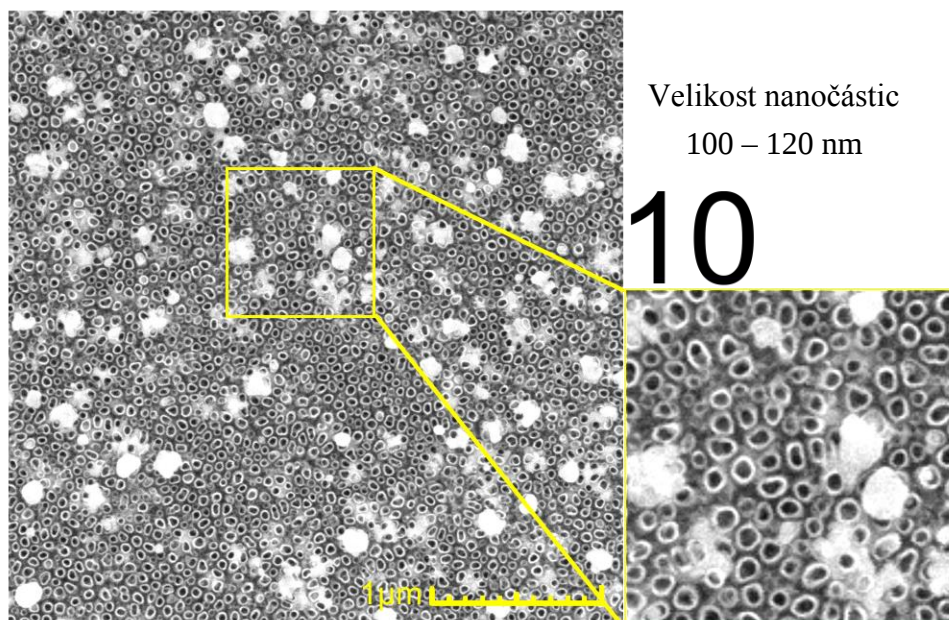
Obrázek 20: Výsledky pokusu o elektrodpozici stříbra - vzorky č. 1, 2 a 3, přibližně 50 000x, kompletní zorné pole (vlevo) výřez pro zobrazení morfologie syntetizovaného materiálu (vpravo)



Obrázek 21: Výsledky pokusu o elektrodepozici stříbra - vzorky č 4, 5 a 6, přibližně 50 000x, kompletní zorné pole (vlevo) výřez pro zobrazení morfologie syntetizovaného materiálu (vpravo)



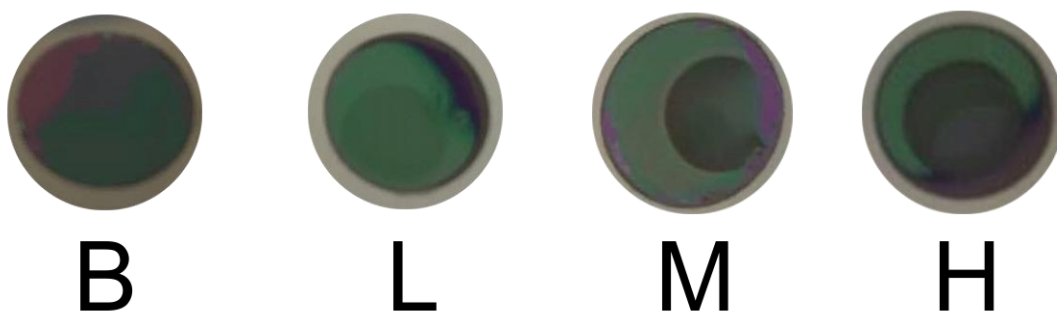
Obrázek 22: Výsledky pokusu o elektrodpozici stříbra - vzorky č 7, 8 a 9, přibližní 50 000x, kompletní zorné pole (vlevo) výřez pro zobrazení morfologie syntetizovaného materiálu (vpravo)



Obrázek 23: Výsledky pokusu o elektrodepozici stříbra - vzorek č 10, přibližně 50 000x, kompletní zorné pole (vlevo) výřez pro zobrazení morfologie syntetizovaného materiálu (vpravo)

Na základě optického zhodnocení snímků na předchozích obrázcích byly pro další testování vybrány vzorky s nízkou, střední a vysokou koncentrací stříbra, tvořenou menšími nanočásticemi, vždy s homogenním pokrytím na celé deponované ploše. Jmenovitě se jednalo o vzorky č. 4 pro nejnižší koncentraci (L), č. 1 pro střední koncentraci (M), a č. 3 pro koncentraci nejvyšší (H).

Na obrázku 27 jsou na fotografiích zachyceny makroskopické fotografie vzorků Ag-TiO₂-NTs. Z těchto makroskopických snímků je poznat, že množství deponovaného stříbra se zde opticky projevuje jako ztmavnutí na dané ploše.



Obrázek 24: fotografie vzorků s jednotlivými koncentracemi stříbra, kontrolní vzorek (B), nízká koncentrace (L), střední koncentrace (M) a vysoká koncentrace (H)

Na pořízených snímcích deponovaných vzorků je vidět, že vyšší proudy mají tendenci tvořit na povrchu vzorků větší nanočástice. Dále z výsledků vyplývá, že v případě, že není aktivní cirkulace, již menší proudy jsou schopny tvořit na povrchu TiO₂-NTs stříbrné nanočástice. Za účelem testování byl pokus se vzorkem č. 6 zopakován s cirkulujícím

elektrolytem. Výsledek byl velice rozdílný – na povrchu nebyly žádné pozorovatelné nanočástice. Zdá se tedy, že cirkulace elektrolytu má na formaci nanočástic stříbra značný vliv. Dále si na snímcích můžeme všimnout, že velikost vytvořených částic není jednotná. V rámci jedné depozice jsou vytvářeny částice různých velikostí, a to v poměrně velkém rozsahu (v desítkách nm). Z tohoto hlediska by bylo vhodné při dalších optimalizacích kvantitativně vyhodnotit reálné množství stříbra deponovaného na vzorek, například pomocí EDS. Vytvořené částice navíc v některých případech tvoří shluky, což může ovlivňovat jejich funkci.

V případě dalšího vývoje tohoto materiálu by bylo vhodné dále optimalizovat proces elektrodpozice takovým způsobem, aby rozsah velikostí tvořených nanočástic byl co nejmenší, a vytvořené částice se neshlukovaly.

Dle poznatků z průběhu všech experimentů má na formaci nanočástic největší vliv celkový náboj, jenž projde vzorkem za daný čas.

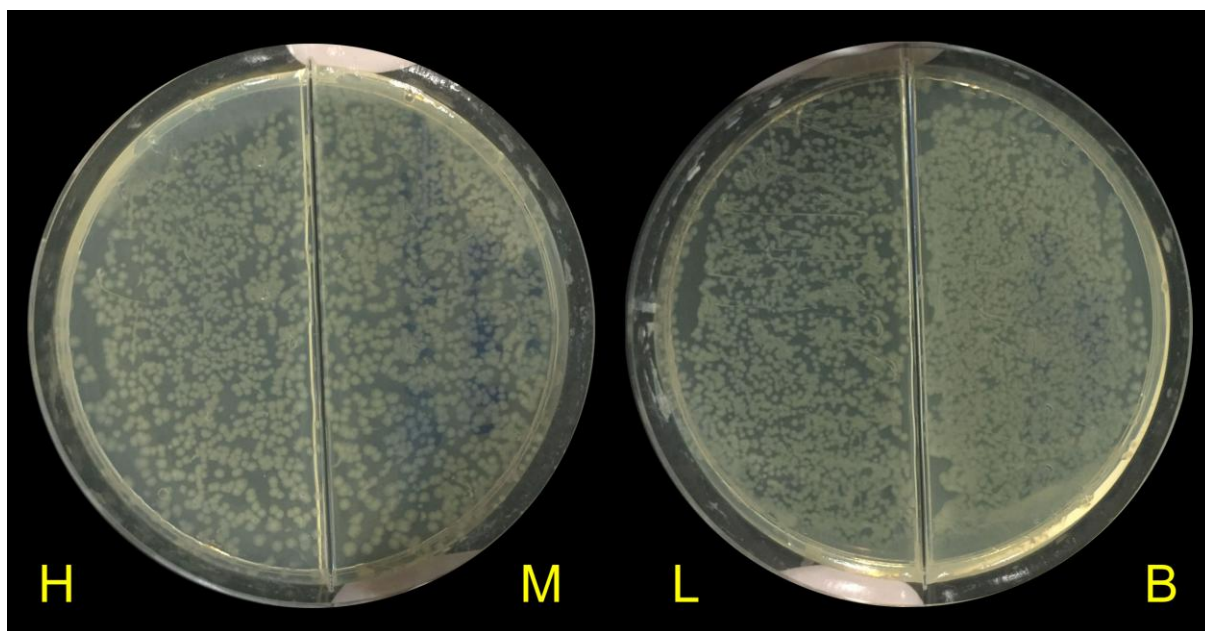
7.3. Testování antibakteriální aktivity

Testy antibakteriální aktivity probíhaly podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.

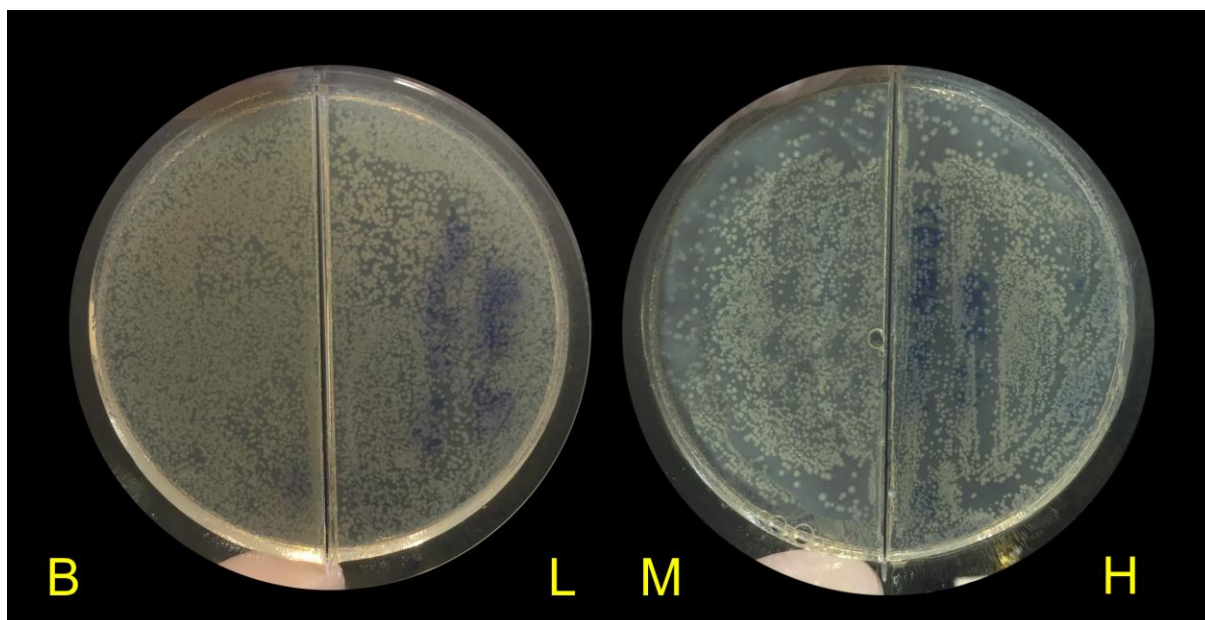
V případě experimentu na obrázku 25 byly bakterie v kontaktu se vzorkem po dobu 3h a výsledná bakteriální suspenze ředěna 200x. V případě experimentu zobrazeného na obrázku 26 byly bakterie v kontaktu se vzorkem po dobu 24h a výsledná bakteriální suspenze byla ředěna 2000X. Toto ředění bylo použito z čistě praktických důvodů – experiment byl úspěšně proveden až na podruhé, při zachování stejného ředění jako u experimentu s 3h expozicí výsledné kolonie bohužel nebylo možno spočítat – miska byla příliš hustě porostlá koloniemi bakterií. Vzhledem k tomu, že je však porovnávána změna proti kontrolnímu vzorku, a nikoliv absolutní četnost, bylo možné experiment i s vyšším ředěním zopakovat při zachování stejných časů.

Z níže uvedených snímků na obrázcích 25 a 26 je již opticky patrné, že s rostoucí koncentrací stříbra se snižuje počet kolonií bakterií na povrchu agarového plátu.

Kolonie bakterií zachycené na fotografiích byly manuálně spočítány, a následně zapsány do tabulek 2 a 3. Výsledky byly společně se spojnicí trendu vyneseny do grafu, který je zobrazen na obrázku č. 27.



Obrázek 25: fotografie Petriho misek s kultivovanými bakteriemi odpovídající vzorku bez stříbra (B), nízké (L), střední (M) a vysoké (H) koncentraci stříbra po 3h kontaktu se vzorky



Obrázek 26: fotografie Petriho misek s kultivovanými bakteriemi odpovídající vzorku bez stříbra (B), nízké (L), střední (M) a vysoké (H) koncentraci stříbra po 24h kontaktu se vzorky

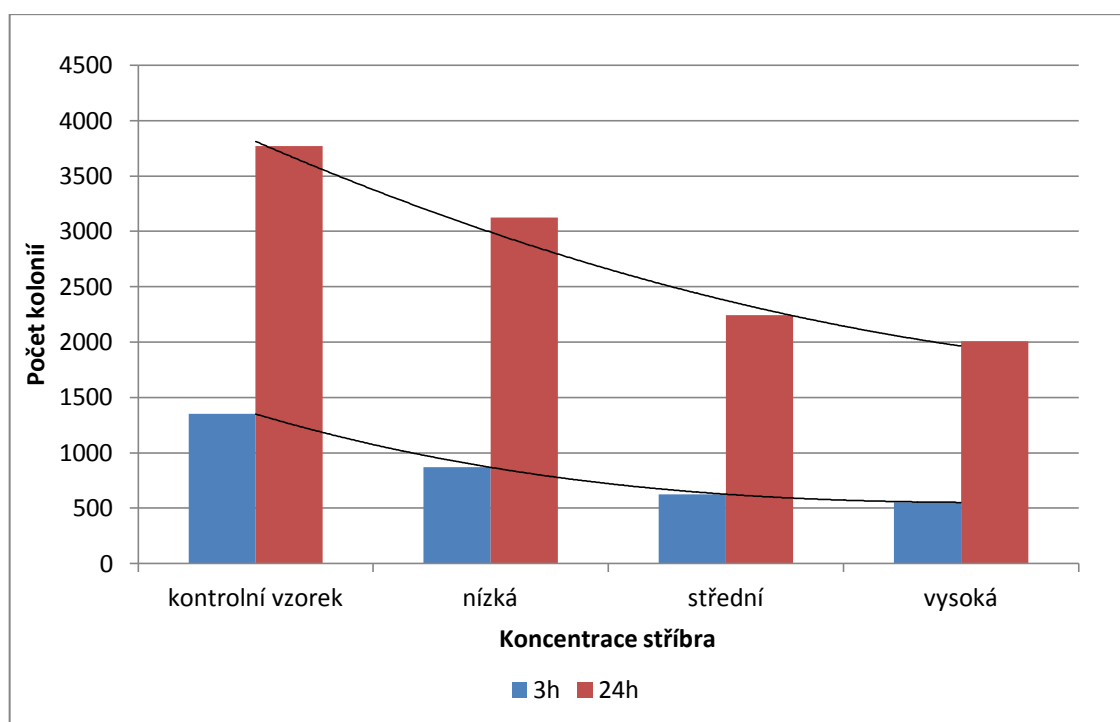
Z grafu vytvořeného z počtů spočítaných kolonií a v něm zaneseném vyobrazení trendu se potvrdilo, že s rostoucí koncentrací stříbra se snižuje počet kolonií. V případě nejvyšší koncentrace stříbra byla v porovnání s kontrolním vzorkem jejich četnost snížena přibližně na polovinu. Zároveň však z experimentů vyplývá, že přestože v porovnání s kontrolním vzorkem ke zvýšení antibakteriální aktivity dochází, antibakteriální účinek nového materiálu k úplnému zastavení růstu bakterií nestačí.

Tabulka 2: Počet kolonií na agarovém plátu po 3h inkubaci bakterií v kontaktu se vzorkem a 24 hodinách růstu, včetně procentuálního srovnání proti kontrolnímu vzorku

Koncentrace stříbra	Abs. Četnost	%
Kontrolní vzorek	1350	100
Nízká	868	64,3
Střední	626	46,4
Vysoká	552	40,9

Tabulka 3: Počet kolonií na agarovém plátu po 24h inkubaci bakterií v kontaktu se vzorkem a 24 hodinách růstu, včetně procentuálního srovnání proti kontrolnímu vzorku

Koncentrace stříbra	Abs. Četnost	%
Kontrolní vzorek	3768	100
Nízká	3124	80,3
Střední	2216	58,8
Vysoká	1928	51,2

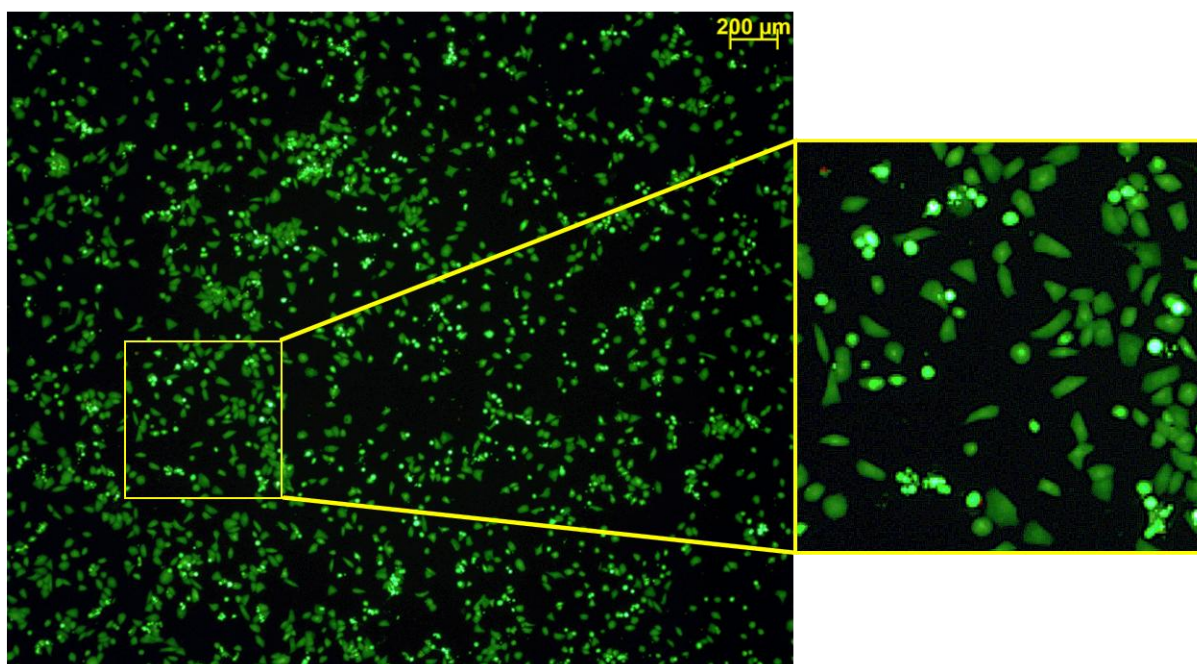


Obrázek 27: Grafické znázornění závislosti mezi množstvím deponovaného stříbra a výsledným množstvím kolonií.

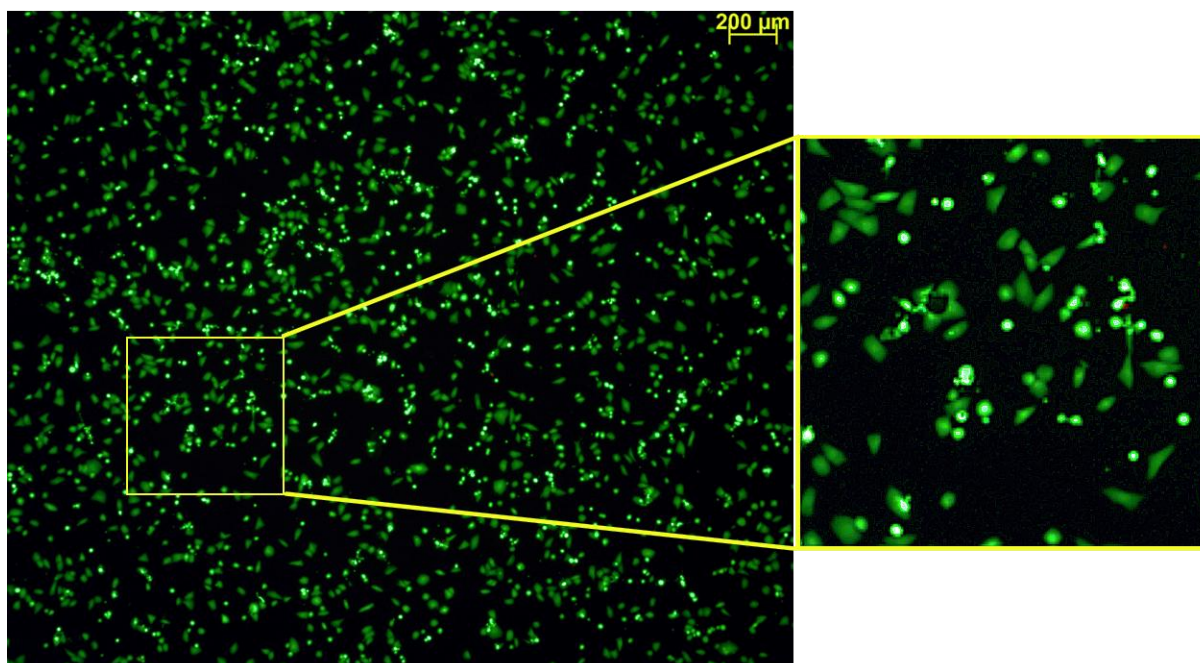
Z hlediska antibakteriální aktivity tedy již při nízké koncentraci stříbra dochází ke znatelnému zvýšení antibakteriálních účinků. V porovnání s experimentem provedeným DAS, K. et al.^[86], ve kterém je hlášeno 99% zabitých bakterií, je však i nejvyšší koncentrace méně účinná. To může být způsobeno nižší koncentrací stříbra, velikostí nanočástic, ale i jinou testovanou bakterií. Ne všechny bakterie jsou totiž stejně odolné.^[86]

7.4. Adheze MG-63 buněk

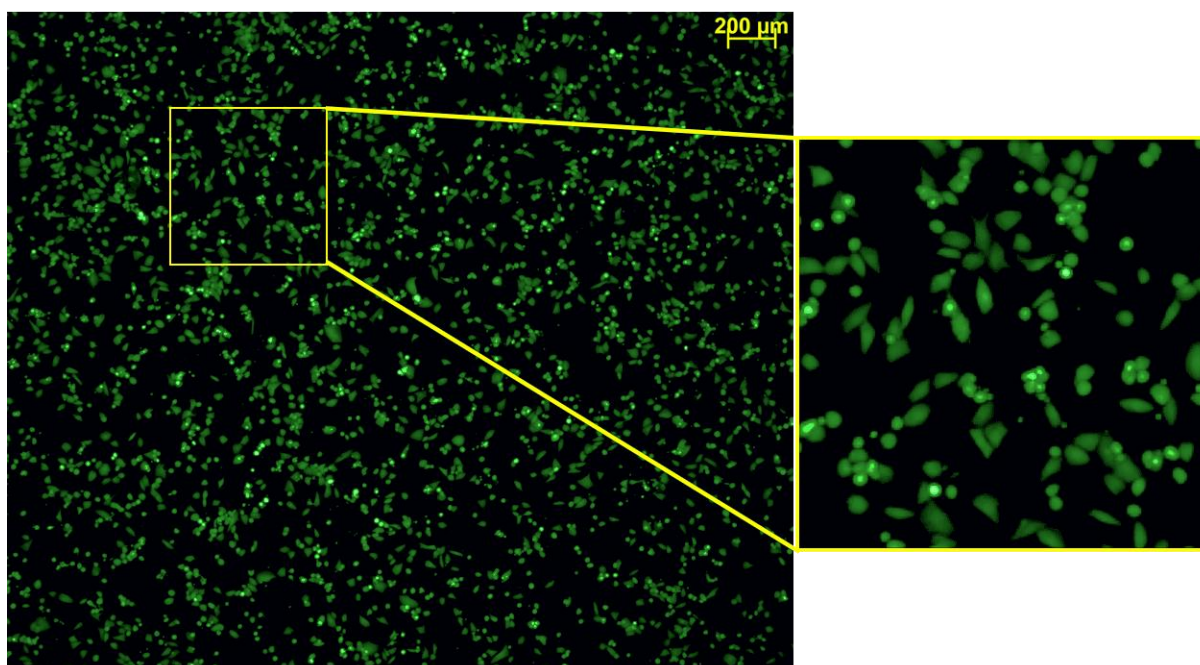
Z pořízených snímků buněk je očividné, že kontakt buněk s nasyntetizovaným povrchem ovlivňuje jejich počet, ale také morfologii. Na snímcích, jenž jsou na obrázcích 28-30, lze vidět buňky s morfologií zploštělou, která poukazuje na dobrou adhezi buněk na povrch, ale také buňky zakulacené, které mohou značit adhezi zhoršenou. Po spočítání proběhla kvantitativní analýza, jejíž výsledky byly zapsány do tabulky č.4. Nejlepší poměr mezi buňkami zploštělými a zakulacenými měl vzorek kontrolní. Vynecháme-li jej, a zaměříme se pouze na vzorky dekorované stříbrem, nejlepší poměr byl u vzorku s nízkou koncentrací stříbra. Oprostíme-li se však od tohoto poměru, a zaměříme se na absolutní četnosti, zjistíme, že největší počet adherovaných buněk byl na vzorku s nejvyšší koncentrací stříbra.



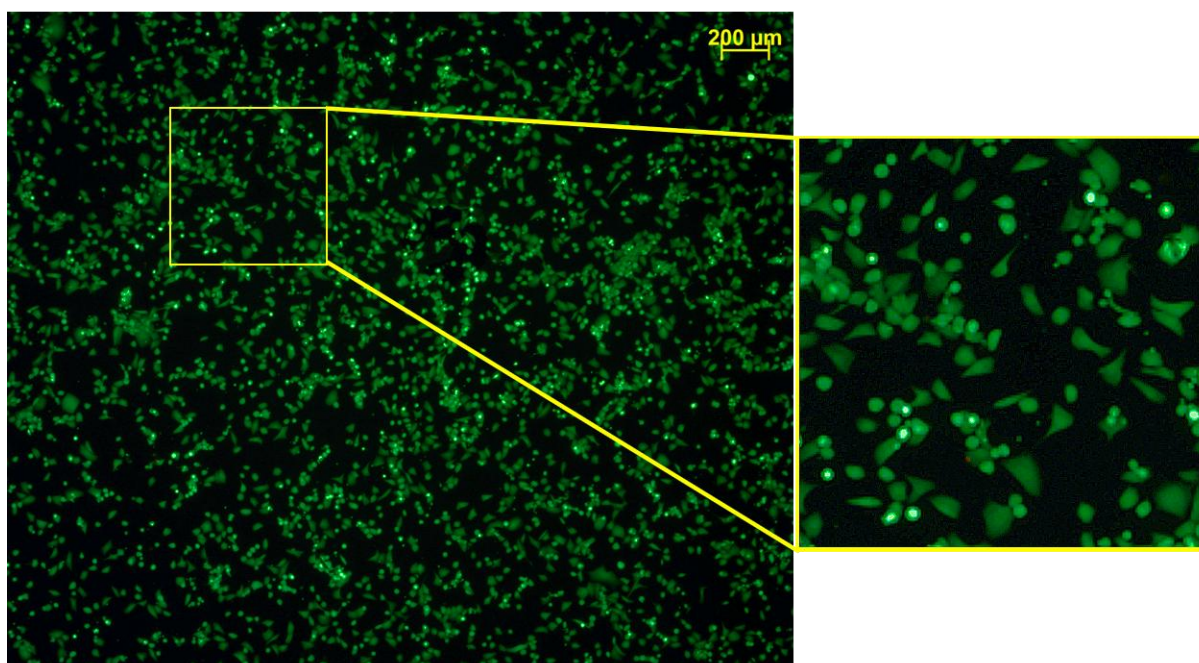
Obrázek 28: snímek použitý pro vyhodnocení adheze MG-63 buněk na kontrolní vzorek (blank), 5x zoom, kompletní zorné pole (vlevo) výřez pro zobrazení morfologie buněk (vpravo)



Obrázek 29: snímek použitý pro vyhodnocení adheze MG-63 buněk na vzorek s nejnižší koncentrací stříbra (low), 5x zoom, kompletní zorné pole (vlevo), výřez pro zobrazení morfologie buněk (vpravo)



Obrázek 30: snímek použitý pro vyhodnocení adheze MG-63 buněk na vzorek se střední koncentrací stříbra (medium), 5x zoom, kompletní zorné pole (vlevo), výřez pro zobrazení morfologie buněk (vpravo)



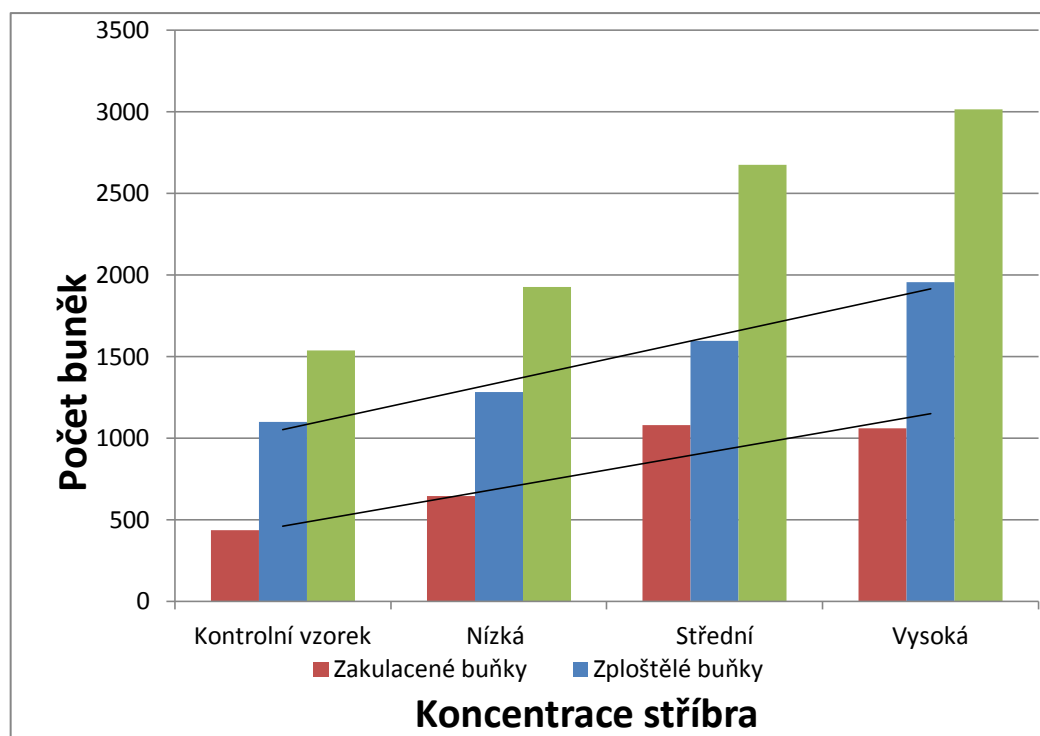
Obrázek 31: snímek použitý pro vyhodnocení adheze MG-63 buněk na vzorek s nejvyšší koncentrací stříbra (high), 5x zoom, kompletní zorné pole (vlevo), výřez pro zobrazení morfologie buněk (vpravo)

Z grafu uvedeného na obrázku 32 to pak vypadá, že vztah mezi množstvím deponovaného stříbra a absolutním počtem buněk je lineárně rostoucí. Toto zjištění je v rozporu s teoretickými předpoklady, kdy bylo očekáváno, že s rostoucí koncentrací deponovaného stříbra bude buněk ubývat, jelikož je ve vyšších koncentracích cytotoxické. Je možné, že použité koncentrace stříbra toxické byly, ale počet umírajících buněk byl převršen množstvím nových buněk, způsobeným zesílením proliferační činnosti přítomností TiO_2 -NTs.

Vztah mezi počty zakulacených a zploštělých buněk je dle grafu s největší pravděpodobností lineární – zobrazené trendy se zdají být téměř rovnoběžné.

Tabulka 4: Tabulka s výslednými počty spočítaných buněk, včetně obou morfologických kategorií a poměru mezi jejich počty.

Koncentrace stříbra - >	Kontrolní vzorek	Nízká	Střední	Vysoká
Zploštělé buňky	1100	1283	1595	1956
Zakulacené buňky	436	643	1080	1058
Celkem	1536	1926	2675	3014
Poměr	2,52:1	2:1	1,48:1	1,85:1



Obrázek 32: Graf s absolutními četnostmi spočítaných buněk a zobrazením trendů vývoje počtů buněk s jednotlivými morfologiemi.

V porovnání s dříve provedenými experimenty byly výsledky značně rozdílné. V experimentu provedeném LAN, M. Y. et al.^[13] byla zjištěna při velikosti nanotrubiček jak 50 nm, tak 100 nm, snížená adheze a proliferační aktivita. V kontrastu s tímto předpokladem naše výsledky potvrzují opačný trend – s rostoucím množstvím stříbra se počet buněk i při velikosti nanotrubiček 50-70nm zvyšuje. Stude ZHENG, Y. et al.^[87] pak uvádí, že Ag-TiO₂-NTs povrch projevuje pozitivní efekt na adhezi osteoblastů, ale také na další funkce, jako například syntéza alkalické fosfatázy, kalcifikaci a sekreci kolagenu, aniž by negativně ovlivnil činnost osteoblastů.^[87] Zároveň se zdá, že byl splněn teoretický předpoklad - vzhledem k délce nanotrubiček (500 nm) bylo sledováno snížené rozprostírání buněk, které se projevovalo zvýšením podílu zploštělých buněk.^[88]

Z hlediska použitelnosti nasyntetizovaného materiálu je třeba říci, že i když antibakteriální aktivita byla nejvyšší v případě vzorku s nejvyšší koncentrací stříbra, z hlediska interakce s buňkami tato možnost nejvíce ideální. Přestože byl s rostoucím množstvím stříbra sledován nárůst v celkovém množství buněk, přibývá také buněk zakulacených, což může být způsobeno právě cytotoxicitou stříbra. Proto by bylo v rámci využitelnosti počet zakulacených buněk minimalizovat a použít koncentraci stříbra nízkou, která nemá antibakteriální účinky na tak vysoké úrovni, avšak v porovnání s kontrolním vzorkem jsou stále znatelné, a jejich vliv na adhezi buněk se nejvíce až tak silný. Bylo by také vhodné všechny vzorky otestovat z hlediska dlouhodobé viability buněk, případně si ověřit výsledky testů adheze na větším souboru dat s větším množstvím opakování, a to především kvůli reprodukovatelnosti výsledků.

8. Závěr

Teoretická část této diplomové práce byla věnována především možnostem syntézy, dekorace, charakterizace a potenciálního využití TiO_2 a Ag-TiO_2 nanostrukturovaných povrchů v biomedicínských aplikacích. Její závěrečná část je věnována práci s bakteriemi, buněčnými kulturami a obsahuje protokoly zahrnující základní postupy některých úkonů.

Experimentální část této práce se pak zabývá syntézou TiO_2 -NTs pomocí anodické oxidace, jejich následnou dekorací stříbrem pomocí procesu elektrodepozice a testování tohoto materiálu z hlediska biokompatibility a antibakteriální aktivity.

Elektrodepozice byla optimalizována v průběhu experimentů, dokud nebyl úspěšně získán gradient množství deponovaného stříbra, který by byl z hlediska rovnoměrnosti pokrytí a velikosti stříbrných nanočástic použitelný. Parametry, jenž se osvědčily jako nejlepší byly: pro nejnižší koncentraci jeden pulz o délce 1250 ms při proudu 1mA, pro střední koncentraci dva pulzy o délce 750 ms při proudu 1mA, a pro nejvyšší koncentraci jeden pulz o délce 2250 ms při proudu 1mA.

Při antibakteriálních testech byl nejúspěšnější vzorek s největším množstvím stříbra. V porovnání s kontrolním vzorkem bylo napočítáno při experimentu s expozicí trvající 3h cca 41 % a při experimentu s 24h expozicí cca 51% bakteriálních kolonií.

Na závěr byla otestována biokompatibilita nově nasyntetizovaného materiálu. Bylo zjištěno, že materiál ovlivňuje jak morfologii, tak i počet buněk. Největší absolutní četnost buněk po 24h inkubaci projevil vzorek s nejvyšší koncentrací stříbra – téměř dvojnásobek v porovnání s kontrolním vzorkem. Vzorek s nejnižší koncentrací stříbra pak měl nejlepší poměr mezi buňkami zploštělými – dobře adherovanými, a buňkami zakulacenými.

Nově nasyntetizovaný materiál tedy do jisté míry projevil předpokládané vlastnosti – zlepšenou antibakteriální aktivitu a do jisté míry i zvýšené množství dobře adherovaných buněk – což je pozitivní co se týče jeho využitelnosti. Z hlediska zkoušení by však bylo vhodné podniknout celou řadu dalších testů - zopakovat testy adheze, podniknout testy proliferace a další biologické aktivity, a otestovat dlouhodobou stabilitu a cytotoxicitu materiálu uvnitř fyziologického prostředí lidského těla. Také by bylo vhodné otestovat dlouhodobou viabilitu buněk na nasyntetizovaném materiálu.

Před tímto testováním by ale bylo potřeba dále optimalizovat elektrodepozici stříbra, zaměřit se především na zamezení shlukování stříbrných nanočástic a sjednotit jejich výslednou velikost.

9. Seznam zkratek

TiO₂ - oxid titaničitý

TiO₂-NTs - nanotrubičky oxidu titaničitého

Ag-TiO₂-NTs - nanotrubičky oxidu titaničitého dekorované stříbrem

Ag-NPs - stříbrné nanočástice

CHO - epitelální vaječnickové buňky čínského křečka

MDCK - Madin-Darbyho epitelální ledvinné buňky

ALD - „atomic layer deposition“, atomová vrstevová depozice

Al₂O₃ - oxid hlinitý

TiCl₄ - Chlorid titaničitý

NH₄F - fluorid amonný

H₂O - voda

AgNO₃ - dusičnan stříbrný

SAM - sebeuspořádané monovrstvy

BMP-2 - kostní morfogenetický protein 2

SEM - rastrovací/skenovací elektronová mikroskopie

TEM - transmisní elektronová mikroskopie

EDS - energetická dispersní spektroskopie

FTIR - infračervená spektroskopie s Fourierova transformací

CFU - kolonie formující jednotka

BaCl₂- chlorid barnatý

H₂SO₄ - kyselina sírová

MTT - 3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid

PBS – fosfátový pufr

10. Seznam literatury

- [1] BOYSEN, E. Nanoparticles Applications and Uses. [online]. 12-22 [cit. 12-22 2016]. Dostupné z: <<http://www.understandingnano.com/nanoparticles.html>>.
- [2] PŘIKRYLOVÁ, K. a DRBOHLAVOVÁ, J. Influence of anodization parameters on morphology of titania nanotubes. *Proceedings of the 22nd Conference STUDENT EEICT 2016*.
- [3] PRIKRYLOVA, K. et al. Fabrication of highly ordered short free-standing titania nanotubes. *Monatshefte Fur Chemie*, 2016, sv. 147, č. 5, s. 943-949. ISSN 0026-9247.
- [4] FRANK, A. J. et al. Electrons in nanostructured TiO₂ solar cells: transport, recombination and photovoltaic properties. *Coordination Chemistry Reviews*, 2004, sv. 248, č. 13-14, s. 1165-1179. ISSN 0010-8545.
- [5] LAI, Y. K. et al. Transparent superhydrophobic/superhydrophilic TiO₂-based coatings for self-cleaning and anti-fogging. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, sv. 22, č. 15, s. 7420-7426. ISSN 0959-9428.
- [6] DINH, N. N. et al. Electrochromic properties of TiO₂ anatase thin films prepared by a dipping sol-gel method. *Thin Solid Films*, 2003, sv. 423, č. 1, s. 70-76. ISSN 0040-6090.
- [7] HORIE, M. a FUJITA, K. Toxicity of Metal Oxides Nanoparticles. 2011. *Advances in Molecular Toxicology*.
- [8] ROY, P. et al. TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, sv. 50, č. 13, s. 2904-2939. ISSN 1433-7851.
- [9] CHALOUPKA, K. et al. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 2010, sv. 28, č. 11, s. 580-588. ISSN 0167-7799.
- [10] PRABHU, S. a POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2012, sv. 2, č. 1, s. 32. ISSN 2228-5326.
- [11] LE GUEHENNEC, L. et al. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomaterialia*, 2008, sv. 4, č. 3, s. 535-543. ISSN 1742-7061.
- [12] GEETHA, M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Progress in Materials Science*, 2009, sv. 54, č. 3, s. 397-425. ISSN 0079-6425.
- [13] LAN, M. Y. et al. Both Enhanced Biocompatibility and Antibacterial Activity in Ag-Decorated TiO₂ Nanotubes. *Plos One*, 2013, sv. 8, č. 10, s. 8. ISSN 1932-6203.

- [14] MEI, S. L. et al. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials*, 2014, sv. 35, č. 14, s. 4255-4265. ISSN 0142-9612.
- [15] ESFANDIARI, N. et al. Size tuning of Ag-decorated TiO₂ nanotube arrays for improved bactericidal capacity of orthopedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014, sv. 102, č. 8, s. 2625-2635. ISSN 1549-3296.
- [16] GITTENS, R. A. et al. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants. *Acta Biomaterialia*, 2014, sv. 10, č. 8, s. 3363-3371. ISSN 1742-7061.
- [17] OH, S. et al. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, sv. 78A, č. 1, s. 97-103. ISSN 1549-3296.
- [18] BRAMMER, K. S. et al. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomaterialia*, 2009, sv. 5, č. 8, s. 3215-3223. ISSN 1742-7061.
- [19] SAINI, M. et al. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*, 2015, sv. 3, č. 1, s. 52-57. ISSN 2307-8960.
- [20] ANANTH, H. et al. A Review on Biomaterials in Dental Implantology. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 2015, sv. 11, č. 3, s. 113-120. ISSN 1550-9702 1555-2810.
- [21] ERIKSSON, C. et al. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials*, 2004, sv. 25, č. 19, s. 4759-4766. ISSN 0142-9612.
- [22] SHIN, D. H. et al. Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces. *Nanotechnology*, 2011, sv. 22, č. 31, s. 7. ISSN 0957-4484.
- [23] TRAN, P. a WEBSTER, T. J. Enhanced osteoblast adhesion on nanostructured selenium compacts for anti-cancer orthopedic applications. *Int J Nanomedicine*, 2008, sv. 3, č. 3, s. 391-396. ISSN 1176-9114 (Print) 1176-9114.
- [24] GULATI, K. et al. Drug-releasing nano-engineered titanium implants: therapeutic efficacy in 3D cell culture model, controlled release and stability. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2016, sv. 69, s. 831-840. ISSN 0928-4931.
- [25] MORAVEC, H. et al. Modification of Titanium Surface for Medical Applications. *Chemicke Listy*, 2014, sv. 108, č. 1, s. 40-45. ISSN 0009-2770.

- [26] NOVAES JR, A. B. et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian Dental Journal*, 2010, sv. 21, s. 471-481. ISSN 0103-6440.
- [27] DRNOVSEK, N. et al. The properties of bioactive TiO₂ coatings on Ti-based implants. *Surface & Coatings Technology*, 2012, sv. 209, s. 177-183. ISSN 0257-8972.
- [28] BAČÁKOVÁ, L. et al. Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering. *Physiological Research*, 2004, sv. 53, č. SUPPL. 1, s. S35-S45.
- [29] CAETANO-LOPES, J. et al. Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatológica portuguesa*, 2006, sv. 32, č. 2, s. 103-110. ISSN 0303-464X.
- [30] KUO, C. W. et al. Investigation of size-dependent cell adhesion on nanostructured interfaces. *Journal of Nanobiotechnology*, 2014, sv. 12, s. 54. ISSN 1477-3155.
- [31] YANG, S. Y. et al. Enhanced adhesion of osteoblastic cells on polystyrene films by independent control of surface topography and wettability. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, sv. 33, č. 3, s. 1689-1695. ISSN 0928-4931.
- [32] KULKARNI, M. et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*, 2015, sv. 26, č. 6, s. 062002. ISSN 0957-4484.
- [33] VANDROVCOVÁ, M. a BAČÁKOVÁ, L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiological Research*, 2011, sv. 60, č. 3, s. 403-417.
- [34] TETÈ, S. et al. Influence of Novel Nano-Titanium Implant Surface on Human Osteoblast Behavior and Growth. *Implant Dentistry*, 2010, sv. 19, č. 6, s. 520-531. ISSN 1056-6163.
- [35] DIMITRIEVSKA, S. et al. Titania-hydroxyapatite nanocomposite coatings support human mesenchymal stem cells osteogenic differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2011, sv. 98, č. 4, s. 576-588. ISSN 1552-4965.
- [36] ZHANG, W. et al. Biofunctionalization of a titanium surface with a nano-sawtooth structure regulates the behavior of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*, 2012, sv. 7, s. 4459-4472. ISSN 1176-9114 1178-2013.
- [37] GOLDMAN, M. et al. Titanium Surfaces with Nanostructures Influence on Osteoblasts Proliferation: a Systematic Review. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 2014, sv. 5, č. 3, s. e1. ISSN 2029-283X.
- [38] SMYTH, J., R. TiO₂ Group. [online]. University of Colorado, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <<http://ruby.colorado.edu/~smyth/min/tio2.html>>.

- [39] BAKRI, A. et al. *Effect of annealing temperature of titanium dioxide thin films on structural and electrical properties*. AIP Conference Proceedings. AIP Publishing, 0735414521.
- [40] LI, H. et al. Antibacterial activity of TiO₂ nanotubes: Influence of crystal phase, morphology and Ag deposition. *Applied Surface Science*, 2013, sv. 284, s. 179-183. ISSN 0169-4332.
- [41] ALPASLAN, E. et al. Anodized 20 nm diameter nanotubular titanium for improved bladder stent applications. *Int J Nanomedicine*, 2011, sv. 6, s. 219-225. ISSN 1176-9114 1178-2013.
- [42] LIU, X. et al. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2004, sv. 47, č. 3–4, s. 49-121. ISSN 0927-796X.
- [43] Angioplasty for Heart Attack and Unstable Angina. [online]. MyHealth.Alberta.ca, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <<https://myhealth.alberta.ca/Health/tests-treatments/Pages/conditions.aspx?hwid=tx4303>>.
- [44] LIU, W. et al. Synthesis of TiO₂ nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. *Nanoscale*, 2014, sv. 6, č. 15, s. 9050-9062.
- [45] LIU, W. et al. Selenium nanoparticles incorporated into titania nanotubes inhibit bacterial growth and macrophage proliferation. *Nanoscale*, 2016, sv. 8, č. 34, s. 15783-15794.
- [46] POPAT, K. C. et al. Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials*, 2007, sv. 28, č. 32, s. 4880-4888. ISSN 0142-9612.
- [47] LIU, N. et al. A review on TiO₂-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: Formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications. *Catalysis Today*, 2014, sv. 225, s. 34-51. ISSN 0920-5861.
- [48] ANASTASESCU, C. et al. *1D Oxide Nanostructures Obtained by Sol-Gel and Hydrothermal Methods*. Springer International Publishing, 2016. s. ISBN 9783319329864.
- [49] BAVYKIN, D. V. a WALSH, F. C. *Titanate and Titania Nanotubes: Synthesis, Properties and Applications*. Royal Society of Chemistry, 2010. s. ISBN 9781847559104.

- [50] BORBON-NUNEZ, H. A. et al. Fabrication of hollow TiO₂ nanotubes through atomic layer deposition and MWCNT templates. *Powder Technology*, 2017, sv. 308, s. 249-257. ISSN 0032-5910.
- [51] MINAGAR, S. et al. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomaterialia*, 2012, sv. 8, č. 8, s. 2875-2888. ISSN 1742-7061.
- [52] SREEKANTAN, S. et al. Influence of electrolyte pH on TiO₂ nanotube formation by Ti anodization. *Journal of Alloys and Compounds*, 2009, sv. 485, č. 1, s. 478-483. ISSN 0925-8388.
- [53] MACAK, J. M. et al. Filling of TiO₂ nanotubes by self-doping and electrodeposition. *Advanced Materials*, 2007, sv. 19, č. 19, s. 3027-+. ISSN 0935-9648.
- [54] NAH, Y. C. et al. Doped TiO₂ and TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Chemphyschem*, 2010, sv. 11, č. 13, s. 2698-2713. ISSN 1439-4235.
- [55] GRACIANI, J. et al. Carbon Doping of the TiO₂ (110) Rutile Surface. A Theoretical Study Based on DFT. *Chemistry of Materials*, 2009, sv. 21, č. 8, s. 1431-1438. ISSN 0897-4756.
- [56] SANTOS, L. et al. Electrodeposition of WO₃ Nanoparticles for Sensing Applications. In ALIOFKHAZRAEI, M. *Electroplating of Nanostructures*. Rijeka: InTech, 2015, s. Ch. 02.
- [57] AITA, H. et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials*, 2009, sv. 30, č. 6, s. 1015-1025. ISSN 0142-9612.
- [58] MYHRA, S. a RIVIÈRE, J. C. *Characterization of Nanostructures*. Taylor & Francis, 2012. s. ISBN 9781439854150.
- [59] Scanning Electron Microscope. [online]. Purdue University, [cit. Dostupné z: <<https://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm>>].
- [60] ŠAFÁŘOVÁ, K. *Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie* [online prezentace]. Olomouc: Výzkumné centrum nanomateriálů, Univerzita Palackého, [cit. 2016-12-20] Dostupné z: <http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_sem.pdf>].
- [61] MALÍNSKÝ, M., SHÁNĚL, O., *Úvod do Elektronové mikroskopie* [online prezentace]. Přednáška předmětu FMZT, FEI, [cit. 2016-12-20] FEI - Úvod do Elektronové mikroskopie
- [62] YUAN, Y. a LEE, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. In BRACCO, G. a HOLST, B. *Surface Science Techniques*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, s. 3-34.

- [63] *Laurel Products* [online]. [cit. 2017-01-03]. Dostupné z: <http://laurelproducts.com/wp-content/uploads/2013/08/Contact-Angle-165-Unsintered.png>
- [64] FRENZEL, R. et al. Polyelectrolytes to promote adhesive bonds of laser-structured aluminium. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2015, sv. 61, s. 35-45. ISSN 0143-7496.
- [65] SUTTON, S. Measurement of Microbial Cells by Optical Density.
- [66] BALOUIRI, M. et al. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, sv. 6, č. 2, s. 71-79. ISSN 2095-1779.
- [67] Etest®. [online]. BIOMERIEUX INDUSTRY, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <http://www.biomerieux-industry.com/veterinary-diagnostics/etestr>.
- [68] Live/Dead Cell Double Staining Kit. [online]. Sigma-Aldrich, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/04511?lang=en®ion=CZ>.
- [69] Cell Proliferation Kit I (MTT) [online]. Sigma-Aldrich, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=en®ion=CZ>.
- [70] Cell Proliferation Kit II (XTT) [online]. Sigma-Aldrich, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465015001?lang=en®ion=CZ>.
- [71] YANG, C.-Y. et al. Cell adhesion, morphology and biochemistry on nano-topographic oxidized silicon surfaces. *Eur Cell Mater*, 2010, sv. 20, s. 415-430.
- [72] HLADY, V. et al. Methods for Studying Protein Adsorption. *Methods in enzymology*, 1999, sv. 309, s. 402-429. ISSN 0076-6879 1557-7988.
- [73] Actin Staining Techniques. [online]. Cytoskeleton, Inc., [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <http://www.cytoskeleton.com/actin-staining-techniques>.
- [74] Stanovení aktivity alkalické fosfatázy v séru. [online]. 3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA Univerzita Karlova, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: [http://nas.lf3.cuni.cz/materialy/CVSE1M0001/navody_alp\(4f984545d52b9\).pdf](http://nas.lf3.cuni.cz/materialy/CVSE1M0001/navody_alp(4f984545d52b9).pdf).
- [75] KAITAINEN, S. et al. TiO₂ coating promotes human mesenchymal stem cell proliferation without the loss of their capacity for chondrogenic differentiation. *Biofabrication*, 2013, sv. 5, č. 2, s. 025009. ISSN 1758-5090.
- [76] Calcification Evaluation Set. [online]. COSMO, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: https://www.cosmobio.com/contents/calcification_evaluation_set.html.

- [77] SMÍŠEK, J. Kultivace bakterií na pevných půdách. [online]. Ústav Lékařské Mikrobiologie 3.LF Univerzity Karlovy, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/vseob/P1v/kultivace_vs_tisk.pdf>.
- [78] Cultivation Media for Bacteria. [online]. Virtual Interactive Bacteriology Laboratory Michigan State University, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <<http://learn.chm.msu.edu/vibl/content/differential/>>.
- [79] LURIA, S. E. a BURROUS, J. W. HYBRIDIZATION BETWEEN ESCHERICHIA COLI AND SHIGELLA. *Journal of Bacteriology*, 1957, sv. 74, č. 4, s. 461-476. ISSN 0021-9193 1098-5530.
- [80] PAUTKE, C. et al. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*, 2004, sv. 24, č. 6, s. 3743-3748.
- [81] Cell Passage. [online]. Rice University Bioengineering Educational Initiative, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <<http://www.ruf.rice.edu/~bioewhit/labs/bioe342/docs/cell%20passage.htm>>.
- [82] Cell culture basics. [online]. Vanderbilt Institute for Integrative Biosystems Research and Education, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <<https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>>.
- [83] Freezing Cells. [online]. ThermoFisher SCIENTIFIC, [cit. 7.5. 2017]. Dostupné z: <<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/freezing-cells.html#4>>.
- [84] PICOT, J. *Human Cell Culture Protocols*. Humana Press, 2005. s. ISBN 9781592598618.
- [85] SCHLESINGER, M. *Electroless and electrodeposition of silver*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2010. s.
- [86] DAS, K. et al. Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2008, sv. 87, č. 2, s. 455-460. ISSN 1552-4981.
- [87] ZHENG, Y. et al. Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface. *Int J Nanomedicine*, 2012, sv. 7, č. 7, s. 875-884.
- [88] SJÖSTRÖM, T. et al. Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 2009, sv. 5, č. 5, s. 1433-1441. ISSN 1742-7061.