



STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Interakce buněk s plazmochemicky upravenými povrchy

AUTOR Renata Zajíčková
ŠKOLA Gymnázium Matyáše Lercha, Brno, Žižkova
 55 616 00
KRAJ Jihomoravský
ŠKOLITEL doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.
OBOR 02 - Fyzika

Brno 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma Interakce buněk s plazmochemicky upravenými povrchy jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Lenky Zajíčkové, Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 15. 3. 2014

Podpis:



MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Kotlářská 267/2, 611 37 Brno



Jihomoravský kraj



Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. Mgr. Lence Zajíčkové, Ph.D. za poskytnutou pomoc a vedení mé práce. Zároveň bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Jiřině Medalové, Ph.D. za cenné rady při práci v laboratoři a v neposlední řadě bych chtěla poděkovat Dr. Antonu Manahkov, Ph.D., Mgr. Adrianu Stoica za přípravu a poskytnutí povrchů a Marii Landové za pomoc při kultivaci buněk.

Mé poděkování rovněž patří Jihomoravskému kraji a JCM za nejen finanční podporu, díky níž bylo možné tuto práci realizovat.

Anotace

Moderní společnost požaduje stále efektivnější metody ošetřování zranění a léčby i diagnostiky nemocí. Tyto požadavky iniciují vývoj nových materiálů pro náhradní tkáň, implantáty nebo biosenzory. Jednou z technologií, které otevírají nové možnosti v materiálovém inženýrství včetně oblasti bioaplikací a biomateriálů jsou plazmové technologie. Vrstvy studované v této práci jsou vytvářeny pomocí metody plazmochemické depozice z plynné fáze (plasma enhanced chemical vapour deposition - PECVD). Zdrojem energie potřebné pro disociaci molekul je zde plazma, respektive horké elektrony. Metodou PECVD je možné vytvořit celou škálu vrstev s různým složením, strukturou a tedy i vlastnostmi. Vrstvy se využívají pro modifikaci povrchů, přičemž teplota depozice může být rovna i pokojové teplotě a tyto povrchové úpravy jsou tedy použitelné i pro teplocitlivé polymery.

PECVD může nabídnout povrchy tvořené stabilními funkčními skupinami, které jsou vázány kovalentními vazbami. Povrchové funkční skupiny mohou být použity pro imobilizaci proteinů s biologickými funkcemi a samozřejmě tedy ovlivňují i interakci buněk s modifikovanými povrchy. Z hlediska bioaplikací jsou důležité povrchy bohaté na stabilní aminové nebo karboxylové skupiny, ale je nutné vzít v úvahu i další faktory jako např. strukturu povrchu. V rámci této práce jsme v nízkotlakém vysokofrekvenčním výboji připravovali plazmochemickou depozicí tvrdé uhlíkové vrstvy (diamond like carbon - DLC) a plazmové polymery bohaté na aminové skupiny. Na těchto vrstvách byla testována jejich interakce s buňkami C2C12 myšího kosterního myoblastu.

Kultivace buněk probíhá ve vodných roztocích. Buňky se přichytnou na povrch a mohou se diferencovat. Vzhledem k tomuto postupu bylo potřeba testovat připravené povrchy na stabilitu ve vodném prostředí. Vzorky vrstev byly namáčené po dobu 48 hodin. Jak DLC vrstvy, tak polymery s aminovými skupinami byly před zahájením kultivací stabilizovány, aby se ve vodném roztoku neměnila struktura povrchu.

Buňky jsou nasazeny na kultivační skla nebo plastové misky, které jsou pokryty povrchy připravenými v plazmatu. Kultivace buněk probíhá během 24 hodin. Po té se odebrá medium, ve kterém volně plavou nepřichytnuté buňky, a počet buněk se kvalifikuje na přístroji Accuri C6. Buňky, které byly na povrchu navázané, se uvolní pomocí trypsinu a opět se kvalifikuje jejich počet. Počty buněk jsou následně porovnávány s počty buněk získanými při referenčním experimentu s nemodifikovaným povrchem

Klíčová slova

plazma, polymery, plazmochemická depozice, buněčná kultura C2C12, kultivace

Abstract

Modern society requires more effective methods to treat injuries and diagnostic diseases. These requests initiate development of new materials for artificial tissues, implants or biosensors. One of the technologies that open new possibilities in material engineering for bioapplications and biomaterials are plasma technologies. Surfaces studied in this work were prepared by plasma enhanced chemical vapour deposition - PECVD. Within this method, the source of energy for dissociation of molecules is plasma or more precisely hot electrons. PECVD allows many types of surface modifications although the temperature of the substrate can be kept close to the room temperature. Therefore, plasma coatings can be used for heat-sensitive polymers.

The method PECVD can also offer surfaces that are created by stable functional groups which are bound by covalent bonds. These functional groups can be used for immobilization of proteins with biological functions and it can also affect interaction of cells with modification surfaces. For the bioapplications, the important surfaces are surfaces rich on amine or carboxylic groups. However, there are some other factors that have to be considered, such as the structure of the surfaces.

In this work we prepared, in low pressure high frequency discharge, diamond like carbon (DLC) films and plasma polymers with amine groups. These surfaces were then used for investigation of interaction with cells C2C12 mice myoblast. The cultivation of cells involved aqueous solutions and, therefore, the surfaces have been tested on the stability in water. Surfaces were immersed in water for 48 hours and before the cultivation experiments both, DLC and amine coatings, were optimized for the best stability.

Cells were seed on cultivation glasses or plastic dishes that have been coated plasma deposited films mentioned above. The cultivations were carried out for 24 hours. Then, the media was collected and the cells detached by trypsin were counted using flow cytometr Accuri C6. The numbers of cells on the coated surfaces and on unmodified, control, samples were compared.

Keywords

plasma, polymers, plasma enhanced chemical vapour deposition, cell line C2C12, cultivation

Obsah

1	ÚVOD	1
1.1	PLAZMOVÉ MODIFIKACE MATERIÁLŮ	1
1.1.1	<i>Plazma</i>	1
1.1.2	<i>Plazmové úpravy povrchové vrstvy polymerů</i>	2
1.1.3	<i>Plazmochemická depozice z plynné fáze</i>	4
1.1.4	<i>Uhlíkové a aminové vrstvy</i>	7
1.2	DLC JAKO BIOMATERIÁL	8
1.3	KULTIVACE BUNĚK	8
2	EXPERIMENT	10
2.1	DEPOZICE TVRDÝCH UHLÍKOVÝCH VRSTEV	10
2.2	DEPOZICE PLAZMOVÝCH POLYMERŮ OBSAHUJÍCÍ AMINOVÉ SKUPINY	11
2.3	STUDIE DIFERENCIACE BUNĚK.....	14
2.3.1	<i>Pasážování a vysívání buněk</i>	14
2.3.2	<i>Materiál pro kultivace buněk</i>	17
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	18
3.1	TEST STABILITY DLC, DLC:SiO _x A AMINOVÝCH VRSTEV.....	18
3.1.1	<i>DLC vrstvy na vzduchu</i>	18
3.1.2	<i>DLC a DLC:SiO_x ve vodném prostředí</i>	19
3.1.3	<i>Stabilita aminových vrstev ve vodném roztoku</i>	20
3.2	VÝSLEDKY KULTIVACE	20
3.2.1	<i>Proliferace buněk na tvrdých uhlíkových vrstvách</i>	20
3.2.2	<i>Proliferace buněk na aminových površích</i>	24
4	ZÁVĚR	28
5	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	30
6	POUŽITÁ LITERATURA	31
7	PŘÍLOHY	33
7.1	TABULKY DEPOZIC.....	33

1 Úvod

1.1 Plazmové modifikace materiálů

Vlastnosti materiálů se odvíjejí od jejich chemického složení, vnitřní struktury, drsnosti povrchu, volné povrchové energie apod. Polymery se úspěšně používají v mnoha oblastech a nahrazují zde klasické materiály jako sklo, kovy, dřevo a papír, protože jsou levné, lehké, flexibilní a lisováním je možné jednoduše vyrobit i složitější tvary. Povrch polymerů ovšem často nemá vlastnosti vhodné pro požadované aplikace a je nutné upravit jeho fyzikální a chemické vlastnosti. Chemické úpravy se staly již velmi důležitou součástí průmyslové výroby polymerů. Hlavní výhodou je fakt, že úprava je omezena přímo na povrchovou vrstvu a nemění se vlastnosti daného polymeru. Tloušťka upravené vrstvy se v tomto případě omezuje na několik desítek nanometrů. Z širšího hlediska se ovšem mezi povrchové modifikace dá započítat i depozice tenkých vrstev, pomocí které nanášíme na původní materiál vrstvy o tloušťce desítek až stovek nanometrů. Čistě chemické metody modifikace materiálů lze nahradit plazmochemickými. V tomto případě vkládáme materiály do elektrických výbojů v plynech. Podle již uvedené klasifikace povrchových modifikací lze reakce plazmatu s polymery rozdělit na dva základní směry: úprava povrchu materiálu pomocí plazmatu (angl. plasma treatment) a plazmochemická depozice nového materiálu ve formě tenké vrstvy (angl. plasma enhanced chemical vapour deposition - PECVD). Speciálním případech depozice tenkých vrstev je pak plazmová polymerizace.

1.1.1 Plazma

Plazma je jedním ze čtyř skupenství hmoty, které vzniká, jestliže plynu dodáme dostatečné množství energie. Díky energii, kterou můžeme dodávat ve formě tepla, energetického (ionizujícího) záření nebo urychlováním nabitých částic (především elektronů) v elektrickém poli, dochází k ionizaci plynu a tedy vzniku páru elektron - kladný iont. Jestliže bude v plynu dostatečné množství nabitých částic, může jít o plazma. Plazma je tedy ionizovaný plyn, který musí splňovat určitá kritéria. Pro porozumění těmto kritériím je nutné zavést několik veličin charakteristických pro plazma, Debyova délka λ_D a plazmová frekvence ω_p :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k T}{e^2 m}} \qquad \omega_p = \sqrt{\frac{n e^2}{\epsilon_0 m}}$$

kde n je hustota elektronů, m hmotnost elektronů, k Boltzmannova konstanta, T teplota a ϵ_0 permitivita vakua.

Dále potřebujeme zavést pojem srážkové frekvence ν_{en} tedy frekvence mezi srážkami elektronů s neutrály, která odpovídá převrácené hodnotě průměrného doby mezi těmito srážkami.

Pro plazma o velikosti L musí platit, že:

$$\lambda_D \ll L$$

$$n \lambda_D^3 \gg 1$$

$$\omega_p \gg \nu_{en}$$

Elektrony je možné efektivně urychlit elektrickým polem, protože v porovnání s ionty jsou mnohem lehčí. V laboratorním plazmatu mají elektrony mnohem větší teplotu než zbylé částice plynu, a proto jde o systém, který není v termodynamické rovnováze. Proto pak můžeme v plazmatu rozlišovat několik různých teplot (rotační, vibrační, elektronová). Pro určení základních vlastností plazmatu je nejdůležitější teplota elektronů [Lieberman, 1994].

1.1.2 Plazmové úpravy povrchové vrstvy polymerů

Jedná se o povrchové reakce, kdy plynné reaktanty vytvářené v plazmatu reagují s povrchem polymeru a může dojít k odprašování, chemickému leptání, zesíťování nebo k vytváření povrchových funkčních skupin. Procesy plazmových povrchových úprav rozdělujeme podle typu směsi, v níž zapalujeme elektrický výboj [Chan, 1996]:

- inertní plyny,

- směsi obsahující kyslík,
- směsi obsahující dusík,
- směsi obsahující fluor.

V inertním plazmatu se využívá efektů spojených s bombardováním povrchů energetickými ionty. Mezi nejpoužívanější inertní plyny patří argon pro jeho relativně nízkou cenu. Inertní ionty jsou urychleny vysokým elektrickým polem v blízkosti povrchu, který chceme modifikovat, na energie stovek eV a při jejich dopadu dochází k přenosu této vysoké energie (energie kovalentní vazby mezi dvěma atomy je pouze několik eV) na atomy pevné látky. Díky tomu vzniká tzv. kolizní kaskáda a část atomů z postižené oblasti opouští povrch pevné látky. Tomuto procesu se říká odprašování materiálu. Jde o čistě fyzikální proces, kterým můžeme zplyňovat pevné látky (např. kovové terče) nebo čistit povrchy pevných látek. Zpracování polymerních povrchů v inertním plazmatu má svoje specifika, protože se většinou nepoužívá vysoký výkon a energie iontů, jako např. při rozprašování kovových terčů. Typicky jsou polymery vystaveny působení plazmatu vzácných plynů po dobu několika minut. Tato expozice je dostatečná pro oddělení vodíku a k vytvoření volných radikálů na nebo poblíž povrchu, které následně reagují a vytváří sítě a nenasycené skupiny s rozštěpenými vazbami. Plazma také odstraňuje lehké molekuly materiálu nebo je převádí na těžké molekuly pomocí síťových reakcí. Výsledně se tedy jedná o odstranění slabě vázaných krátkých molekulárních řetězců [Hansen, 1966, Schonhorn 1967]. Kromě rozprašování materiálu je tedy důležitým procesem zesíťování polymeru a vytváření volných povrchových vazeb. To způsobuje fyzické změny jako je například zlepšení adheze následně připravených vrstev.

Plazma s obsahem kyslíku je nejčastěji využívána pro modifikaci povrchu polymeru. Kyslíková plazma totiž dokáže reagovat s velkou škálou polymerů a produkovat mnoho typů kyslíkových funkčních skupin, včetně C-O, C=O, O-C=O, C-O-O a CO₃ na površích. Při tomto typu plazmy se dějí dva děje zároveň. Jedná se o leptání povrchu polymeru díky reakci atomů kyslíku a vodíku, tím vznikají reaktivní produkty. Dále se jedná o tvoření kyslíkových funkčních skupin na povrchu polymeru díky reakci aktivních částic z plazmatu a povrchovými atomy. Rovnováha těchto dvou procesů záleží na parametrech experimentu [Chan, 1996]. Takto upravené polymery vykazují zvýšenou smáčivost, dobrou adhezi k dalším materiálům a zlepšení adheze a proliferace (dělení) buněk.

Plazma obsahující dusík se používá pro vytvoření povrchových funkčních skupin s obsahem dusíku, zejména aminových skupin. To vede ke zvýšení smáčivosti, potisknu-

telnosti, vazebnosti a biokompatibility povrchů polymeru. Aminové skupiny se například dodávají na povrch vláken polyetylenu pro zlepšení vazebné síly mezi vlákny a epoxidovou pryskyřicí, která se snadno kovalentně váže na aminové skupiny [Chappel, 1991]. Bylo také prokázáno, že aminové skupiny na vrstvách polymerů při použití čpavkového plazmatu zlepšují buněčnou přilnavost [Nakayama, 1988]. Plazma obsahující amoniak a dusík se používá pro vytváření míst s aminovými skupinami pro imobilizaci heparinu na mnoha druzích polymerních povrchů [Clark, 1977].

V případě plazmatu obsahujícího směs fluoru mohou zároveň probíhat povrchové reakce a plazmová polymerace. Která z těchto reakcí převládá, záleží na podmínkách a parametrech daného experimentu. CF_x radikály hrají důležitou roli jakožto polymerační jednotky, leptadla SiO_2 a také při izotropním leptání vzhledem ke své chemické povaze. Atomy halogenů, hlavně fluor a chlor, jsou majoritními činiteli v tomto ději pro mnoho typů materiálů. Ionty a elektrony mohou ovlivnit povrchové procesy a přispívat k aktivaci reakcí a jejich anizotropii [Chan, 1996].

1.1.3 Plazmochemická depozice z plynné fáze

Plazmochemickou depozicí připravujeme tenké vrstvy na substrátu pomocí chemických reakcí iniciovaných v plazmatu elektrického výboje. Jde vlastně o modifikaci chemické metody depozice tenkých vrstev z plynné fáze (CVD - chemical vapour deposition), při níž plynné reaktanty reagují na povrchu substrátu za zvýšené teploty a vytvářejí pevnou látku za vzniku plynných vedlejších produktů. Při průběhu CVD procesu probíhají jak homogenní, tak heterogenní chemické reakce. Homogenní reakce, které jsou nežádoucí, probíhají v plynné fázi během transportu reaktantů k povrchu. K desorpci vedlejších produktů reakce dochází po transportu reaktantů do blízkosti povrchu substrátu a jejich difuzi těsně nad povrchem.

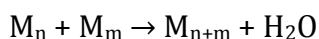
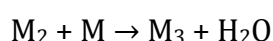
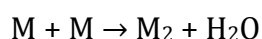
Plazma vnáší do termálního CVD procesu další procesy a depozice probíhá v silně nerovnovážném systému. Mezi procesy v plazmatu totiž patří ionizace, excitace, disociace, rekombinace, záchyt, v nichž hrají podstatnou roli elektrony s energií v jednotkách elektronvoltů (1 eV je přibližně 11 600 K), tedy s teplotou značně převyšující obvyklé teploty chemických reakcí. Díky reakcím s elektrony a případně s energetickými metastabilními atomy dochází k rozpadu původních reaktantů na celou řadu reaktivních radikálů ještě v plynné fázi. Proto je v PECVD velmi těžké popsat průběh reakce pomocí nějakého jednoduchého reakčního schématu. Dalším specifickým metodou PECVD je pří-

tomnost kladně nabitých iontů, které jsou urychlovány ve stěnových vrstvách a bombardují rostoucí vrstvu.

K zapálení elektrického výboje v depoziční směsi lze využít jak stejnosměrné, tak střídavé napětí, které se používá častěji. Generátory střídavého napětí pracují na různých frekvencích a z hlediska rozdělení elektrických výbojů uvažujeme oblast nízkých, rádiových a mikrovlnných frekvencí. V technologických aplikacích se velmi často využívá kapacitně vázaný radiofrekvenční výboj (capacitively coupled discharge).

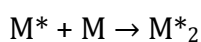
Konkrétním případem PECVD procesu je plazmová polymerizace, při kterém vznikne na povrchu substrátu tenká polymerní organická vrstva. Plazmová polymerizace není typem polymerizace, ale jde o úplně nový technologický proces. Na rozdíl od klasických polymerů plazmové polymery nejsou tvořeny dlouhými řetězci opakujících se jednotek. Přesto je ale důležité popsat procesy klasické polymerizace a na tomto základě porozumět procesům plazmové polymerizace. Při plazmové polymeraci jsou nastaveny mírnější podmínky v plazmatu, tzn. nižší výkony a menší napětí na stěnových vrstvách z toho důvodu, aby dopadající ionty neničili polymerní strukturu vznikající vrstvy.

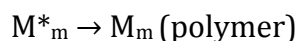
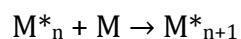
Klasická polymerizace může být klasifikována do dvou základních skupin podle mechanismů růstu daných reakcí. Jedná se o polykondenzaci a řetězcovou polymerizaci. U polykondenzace se polymer tvoří postupně se opakujícími stejnými reakcemi. Obecně se dá tato polymerizace zapsat jako:



Kde M je monomer, a M_i jsou vznikající molekuly [Yasuda, 1985].

V řetězcové polymerizaci se naopak tvoří dlouhý řetězec řadou po sobě následujících kroků, které probíhají ve velmi krátkém časovém úseku (obvykle se jedná řádově o zlomek sekundy). V tomto případě polymerizace jsou produktem pouze polymery a středně velké molekuly se nadají izolovat. V případě, kdy je řetězec nesoucí volný radikál vyjádřen jako M^* a monomer jako M, pak můžeme řetězcovou reakci zapsat jako:





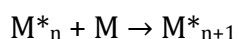
[Yasuda, 1985]

Typickým případem řetězcové polymerizace je adiční polymerizace, která se může schematicky zapsat takto:

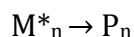
Iniciace



Propagace



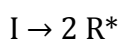
Terminace



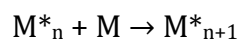
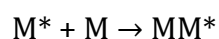
Celá tato reakce je přenášena pomocí řetězcových reakcí reaktivních částic M^* . Podle typu reaktivních částic pak můžeme adiční polymerizaci klasifikovat jako katalytickou, ionizační, radikálovou či jinou polymerizaci [Yasuda, 1985].

Dalším typem polymerizace je radikálová polymerizace. Podle mnoha studií je zřejmé, že volné radikály velmi často reagují v plazmových podmínkách při tvorbě polymeru. Základní reakce radikálové polymerizace mohou být předvedeny na následujícím příkladu, kde M je monomer, I je iniciace, P je polymer a A je „přenašeč náboje“ (chain transfer agent). Symboly s hvězdičkou označují radikály:

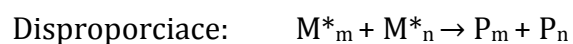
Iniciace



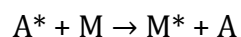
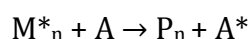
Propagace



Terminace



Přesmyk řetězce



Klasická polymerizace je založena na molekulárním procesu, během něhož jen velmi zřídka dojde k přestavbě atomů uvnitř monomeru, a vyžaduje, aby monomer obsahoval alespoň jednu vícenásobnou vazbu. Výhodou plazmové polymerace je to, že monomer nemusí obsahovat žádné násobné vazby a také to, že z jednoho monomeru lze vytvořit celou řadu plazmových polymerů, jejichž vlastnosti závisí na parametrech plazmatu.

1.1.4 Uhlíkové a aminové vrstvy

Jedním z typem vrstev, které se pro povrchové úpravy využívají, již delší dobu, jsou diamantu podobné uhlíkové vrstvy (diamond like carbon - DLC). Tyto vrstvy jsou amorfní a skládají se z uhlíku a případně vodíku. Uhlík může být vázán buď v sp^3 nebo sp^2 konfiguraci, přičemž sp^3 konfigurace je 3D vazebná struktura diamantu a sp^2 je planární vazebná struktura grafitu. Díky 3D kovalentně vázané struktuře je diamant velmi tvrdým materiálem (cca 100 GPa), zatímco slabé van der Waalovi vazby mezi grafitovými roviny způsobují nízkou tvrdost grafitu. DLC vrstvy jsou vytvořené uhlíkem především v sp^3 konfiguraci a jejich vlastnosti závisí na poměru sp^3/sp^2 vazeb a procentu obsahu vodíku. DLC vrstvy jsou tvrdé vrstvy (minimálně 17 GPa), které jsou chemicky inertní, proto dobře odolávají korozi [Grill, 1994]. Díky svým vlastnostem se stále zkoumají i možnosti jejich uplatnění v oblasti biomateriálů. Jejich nevýhodou je, že na povrchu neobsahují žádné funkční skupiny, které zajišťují bioaktivitu.

Mezi bioaktivní funkční skupiny patří aminové nebo karboxylové skupiny, které je možné nanést na povrch krátkou aktivací v plazmatu příslušné směsi nebo využít možnosti depozice tenkých vrstev obsahujících tyto skupiny. Druhá varianta má výhodu větší koncentrace funkčních skupin, které mohou difundovat i z objemu vrstev. Vrstvy s

aminovými nebo karboxylovými skupinami jsou připravovány plazmovou polymerizací a otázkou současného výzkumu je volba vhodného monomeru a podmínek depozice.

1.2 DLC jako biomateriál

Je mnoho druhů implantátů, které se používají pro lidské tělo, jako např. kolenní nebo kyčelní klouby. Tyto materiály jsou pak vystaveny prostředí tělu vlastnímu a musí spolupracovat s tělními buňkami a roztoky. Zároveň je možné, že začnou podléhat korozi díky tělním roztokům, které obsahují 1% NaCl. Aby implantáty splnily svou funkci, je potřeba, aby nezpůsobily v těle infekci nebo otravu krve. Zároveň je potřeba, aby se předešlo nekontrolovanému růstu buněk, či aby si zachovaly svou integritu uvnitř těla. V některých případech je však výhodné, když implantáty reagují s biologickým prostředím, jako např. při podpoře růstu kostních buněk.

Pokrytím takovýchto implantátů ochrannými vrstvami se pak může problém s korozi či jinými výše zmíněnými problémy zmírnit nebo dokonce vyřešit. Zároveň takto upravené implantáty mívají delší životnost. Biokompatibilní studie DLC vrstev pak byly prováděny in vitro, tedy ve skle, kde se na tyto vrstvy nanášely různá životní prostředí, jako např. makrofágy, buňky fibroblastů nebo osteoblastů. V případě interakce makrofágu s DLC povrchy se ukázalo, že vrstvy nezpůsobují žádné zánětové reakce buněk [Thompson, 1991]. Stejně tak experimenty s buňkami tkání obklopujících klouby, neprokázaly, že by vrstvy způsobily jakoukoliv toxicitu daného prostředí [Allen, 1994]. Jak již bylo zmíněno, DLC vrstvy je možno použít i pro kostní tkáň, kde je naopak potřeba jejich interakce s tělním prostředím. Kostní buňky se totiž musí přichytit a začít se proliferovat (růst) na povrchu implantátu. Bylo zjištěno, že buňky fibroblastů i osteoblastů mají dobrou přilnavost vůči DLC povrchům, a že se osteoblastům dobře daří i proliferace [Du, 1998; Cui 2000]. Z tohoto důvodu tedy lze předpokládat, že se bude dařit osteoblastům i na implantátům potaženým DLC vrstvou [Grill, 2003].

1.3 Kultivace buněk

V případě přípravy biomateriálů je nutné testovat jejich biokompatibilitu. Ideálním testem je interakce buněk s povrchy biomateriálů pomocí kultivačních testů. V této práci jsme pracovali s buněčnou linií C2C12 myšního myoblastu. Tato linie je adherentní, což znamená, že buňky rostou přichyceny k podkladu a zároveň se jedná o imortalizované

buňky. Jsou nesmrtelné, tvoří nádory a jejich růst závisí na kontaktu s podložkou (anchorage-dependent) [Alberts, 2014].

Kultivace probíhá za určitých podmínek. Jedná se o fyzikální, chemické a biologické faktory, které lze regulovat za běžných laboratorních podmínek. Základním fyzikálním faktorem je správná teplota, která vychází z teploty organismu, z kterého byly buňky izolovány. Pro naši linii se optimální teplota pohybuje kolem 37°C.

Mezi chemické faktory řadíme tzv. média, respektive jejich komponenty, v kterých buňky rostou. Důležité jsou však i plyny, které média obklopují nebo jsou v nich rozpuštěny. Média musí být složena z velmi kvalitních komponentů a s minimem nežádoucích příměsí. Základem je voda a v ní jsou rozpuštěné anorganické soli. Ty jsou zdrojem nezbytných iontů a ovlivňují hladinu pH, které by se mělo pohybovat v rozsahu 7,2 - 7,4. Ionty zajišťují i vhodný osmotický tlak, tzv. osmopolaritu (optimum je 280-320 mOsmol/L). Nejvýznamnější a nejčastější ionty vyskytující se v médiích jsou: Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, HCO₃⁻. Aby buňky mohly správně růst, jsou potřeba jisté esenciální látky přítomné v médiích. Ty musí obsahovat sacharidy (hlavně glukózu jakožto zdroj energie), aminokyseliny (esenciální i neesenciální), vitamíny a stopové prvky. Vzhledem k našemu savčímu typu buněk obsahuje médium i insulin (příjem glukózy), transferin (příjem železa), selen (nezbytný pro funkci oxidačně-redukčních enzymů). Médium může obsahovat i další doplňující látky jako jsou např.: lipidy, steroidní látky, hormony, peptidy, proteiny, extracelulární matrix, nukleosidy aj. Mnohé z těchto látek je možno nahradit tzv. sérem (5-20%). Významnými doplňky jsou ochranné látky, a to 2-β-merkaptóetanol (snižuje oxidativní stres a může sloužit i jako zdroj síry) a antibiotika (ochrana proti mikroorganismům) [Lesko, 1975].

Z hlediska biologických faktorů je potřeba dbát na čistotu kultury, tzv. sterility, a předejít tak růstu jiné buněčné linie, plísním, kvasinkám, bakteriím a virům.

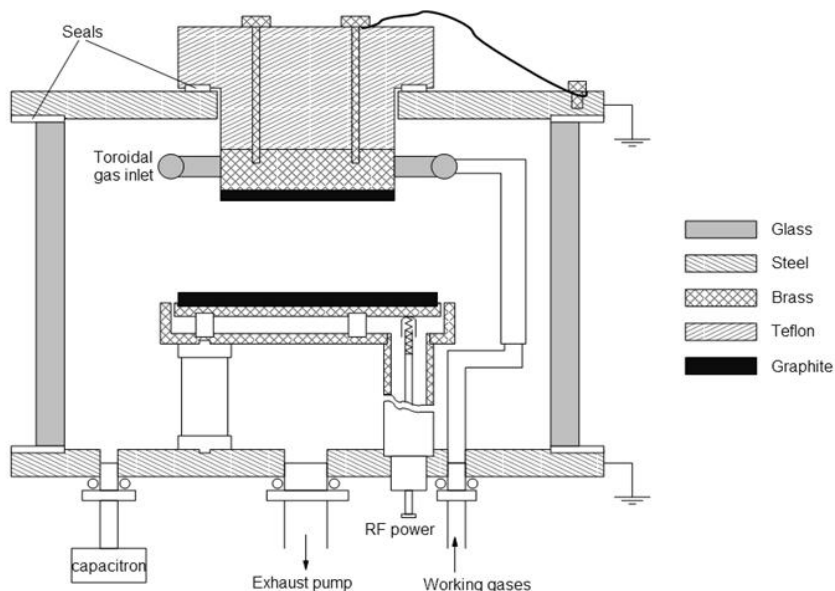
2 Experiment

2.1 Depozice tvrdých uhlíkových vrstev

Plazmochemická depozice tvrdých uhlíkových vrstev byla prováděna v nízkotlakém vysokofrekvenčním výboji v aparatuře s horizontálně orientovanými paralelními elektrodami o průměru 148 mm, jejíž schéma je (viz obr. 2.1) a fotka (viz obr. 2.2) Aparatura byla čerpána rotační vývěvou. Výboj byl zapálen pomocí vysokofrekvenčního generátoru na frekvenci 13,56 MHz. Substráty ležely na spodní vysokofrekvenční elektrodě, na které bylo buzeno záporné předpětí. Toto předpětí se využívalo pro zvýšení bombardu depozované vrstvy ionty plynu a čištění substrátu před depozicí. Horní elektroda byla uzemněná. Jako substrát byla využívána tenká sklíčka, kultivační plastové misky a křemíkové destičky. Depozice probíhala při celkovém tlaku 7-36 Pa, výkonu 50 W a předpětí -100 až -400 V. Postup depozice probíhal následovně:

- Vyčerpání na minimální tlak (cca 4 Pa)
- Proplachování reaktoru argonem pro odstranění zbytkového plynu
- Nastavení pracovního tlaku pro čištění vzorků v argonovém plazmatu na 35-36 Pa
- Zapálení argonového výboje o výkonu 50 W s předpětím -200 V nebo 100 W s předpětím -300 V pro čištění vzorků argonovými ionty po dobu 5 min
- Vypnutí výboje a při stálém proudění argonu přidávání prekurzoru, v tomto případě metan (DLC) nebo metan s hexametyldisiloxanem (DLC:SiO_x)
- Nastavení pracovního tlaku depozice pomocí škrtecího ventilu
- Zapálení výboje, nastavení výkonu a minimalizování odraženého výkonu
- Zastavení průtoku prekurzoru po ukončení depozice a postupné navýšování tlaku na atmosferický
- Vyjmutí vzorků z reaktoru po jejich vychladnutí

Podrobnější informace ke konkrétním vzorkům jsou uvedeny v tabulce depozic 7.1.



Obrázek 2.1: Schéma aparatury pro depozici tvrdých uhlíkových vrstev



Obrázek 2.2: Fotografie aparatury.

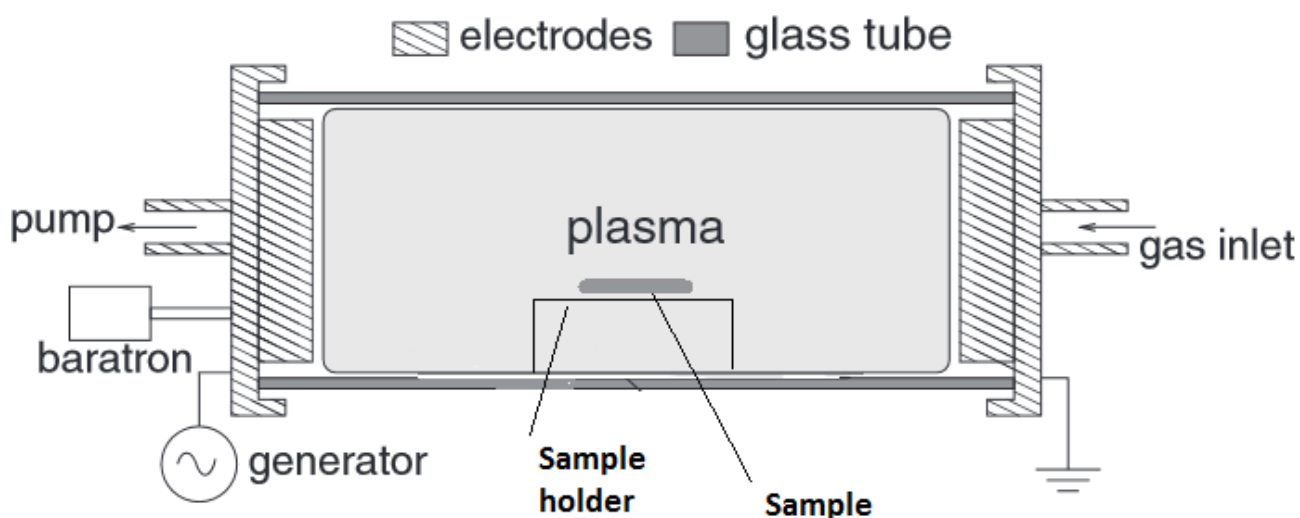
2.2 Depozice plazmových polymerů obsahující aminové skupiny

Depozice plazmových polymerů obsahující cyklopropylamin byla prováděna v nízkotlakém vysokofrekvenčním (13,56 MHz) pulzním výboji v aparatuře, jejíž schéma je na obrázku 2.3 a fotka na obr. 2.4. Aparatura obsahuje vertikálně orientované paralelní hliníkové elektrody, má v průměru 8 cm, na délku 18,5 cm a je čerpána rotační vývěvou. Jako substrát byla využívána tenká sklíčka, kultivační plastové misky a křemíkové destičky. Substráty jsou uloženy 5 cm od vysokofrekvenční (vf.) elektrody a 4 cm od dna aparatury, tedy na plovoucím potenciálu o maximálním napětí 15 V. Depozice probíhala při cel-

kovém tlaku 20 Pa, výkonu 20 W a průtoku argonu 20 sccm. Frekvence opakování pulzů byla 500 Hz a střída 33 %. To odpovídalo době zapnutí výboje 660 μ s a vypnutí výboje 1340 μ s. Postup depozice probíhal následovně:

- Vyčerpání na minimální tlak (cca 4 Pa)
- Proplachování reaktoru argonem pro odstranění zbytkového plynu, při výkonu
- Nastavení pracovního tlaku pro čištění vzorků v argonovém plazmatu na 120 Pa
- Zapálení argonového výboje o výkonu 50 W pro čištění vzorků argonovými ionty po dobu 10 min
- Vypnutí výboje a při stálém proudění argonu přidávání prekursoru, v tomto případě cyklopropylaminu
- Nastavení pracovního tlaku depozice pomocí škrtkového ventilu
- Zapálení výboje, nastavení výkonu a minimalizování odraženého výkonu
- Zastavení průtoku prekursoru po ukončení depozice a postupné navýšování tlaku na atmosferický
- Odebrání vzorků z reaktoru po jejich vychladnutí

Podrobnější informace ke konkrétním vzorkům jsou uvedeny v tabulce 7.2 a teoretický průběh reakce na obrázku 2.5.

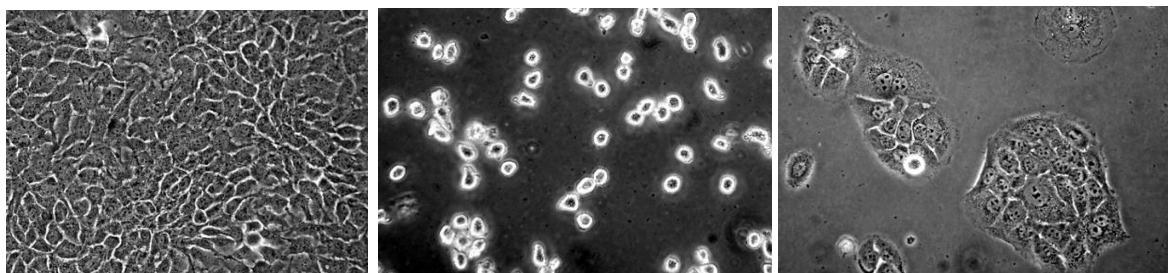


Obrázek 2.3: Schéma aparatury pro depozici polymerů obsahující aminové skupiny

2.3 Studie diferenciace buněk

2.3.1 Pasážování a vysívání buněk

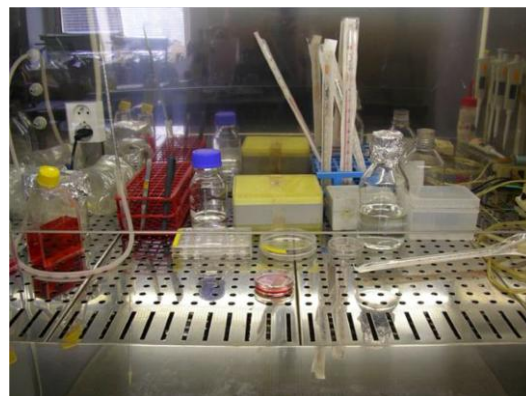
Vzhledem k proliferaci (dělení) buněk a vyčerpání živin z média je potřeba buňky pasážovat, tedy je periodicky ředit. Jedná se o odběr části buněk, jejich smísení s novým médiem a následné přenesení na další kultivační misku. Pasážování se dělá trypsinizací, neboli enzymatickým rozvolněním (viz obr. 2.6). Jde o rutinu, která se musí každé tři dny opakovat, aby buňky měly neustále dostatek živin a místa. Tímto se udržuje daná kultura při životě. Naše buněčná linie byla pasážovaná zhruba 100x než jsme začali s experimenty na povrchích. Je ovšem nutné podotknout, že ne všechny kultury přežijí toliko pasážování.



Obrázek 2.6: Trypsinizační proces: confluentní buňky (100 %) → enzymatické štěpení → nová pasáž (confluence ~ 20 %)

Protokol na pasážování:

- ve flow-boxu (laminární box-viz obr. 2.7) se odsaje médium odsávací pipetou, přidá se PBS (fosfátový pufr) - na opláchnutí a znovu se odsaje
- přidá se trypsin a po 5 minutách se zneutralizuje stejným objemem nového média
- pipetou se odebere rozesuspendovaná směs buněk, trypsinu a média a kvantitativně se převede na novou připravenou misku s novým médiem
- tato malá část buněk se znovu začne dělit a spotřebovávat živiny → po 3 dnech se proces opakuje



Obrázek 2.7: Flow-box v laboratorním prostředí.

My jsme pasážování využívali na vysívání buněk na naše povrchy, kam přišel vždy přesně 1 ml roztoku. To odpovídá zhruba 400 000 buněk na misku. Misky s povrchy se nejdříve vložily do flow-boxu se zapnutým UV na 30 min, aby se zlikvidovala veškerá kontaminace. Následně se do nich daly buňky, které se přichytily a začaly se diferencovat, a po 1 dni inkubace se sklídily a spočítaly na průtokovém cytometru. Celý průběh kultivace buněk pomocí trypsinizační metody je uveden v následujícím protokolu:

- dezinfekce povrchů pomocí UV záření po dobu 45 min
- oddělení buněk od kultivační misky pomocí trypsinu (200 000 buněk na 0,5 ml kultivačního média)
- vysazení buněk do kultivačních misek s připravenými vrstvami a do referenčních kultivačních misek
- 1 denní inkubace buněk v inkubátoru (viz obr. 2.8)
- odebrání média do zkumavek a vložení na led
- opláchnutí buněk pod PBS (fosfátový pufr)
- oddělení buněk pomocí 400 μ l trypsinu v inkubátoru o teplotě 37,7°C a době cca 10 minut
- neutralizace pomocí média 600 μ l a přepipetování buněk do sady zkumavek následně uložených na led

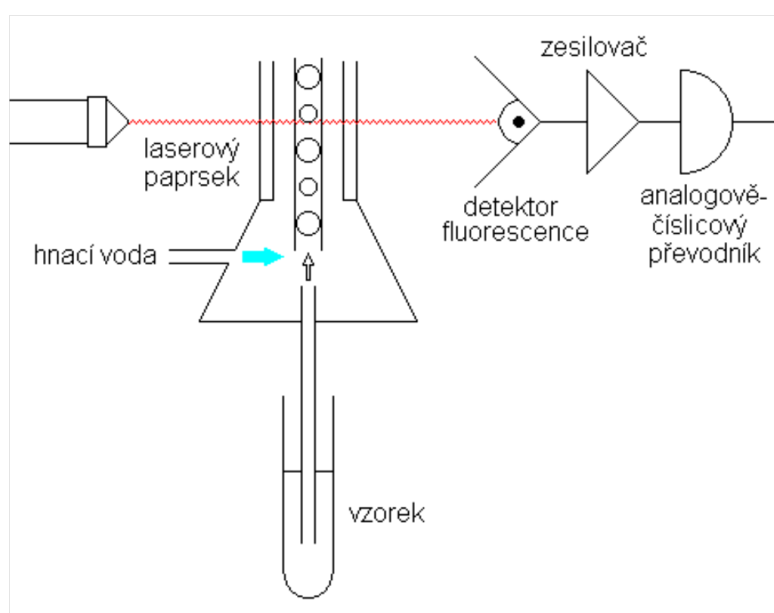
- kvalifikace buněk na průtokovém cytometru Accuri C6 (viz obrázek 2.9 a 2.10) a porovnání výsledků s počty buněk získanými při referenčním experimentu s nemodifikovaným povrchem



Obrázek 2.8: Inkubátor i s náhledem dovnitř.



Obrázek 2.9: Průtokový cytometr Accuri C6.



Obrázek 2.10: Schéma průtokového cytometru.

2.3.2 Materiál pro kultivace buněk

Pro studii diferenciacie buněk byly nejprve využívány kultivační sklíčka, která se vkládala do kultivačních jamkových desek (viz obr. 2.11). Velkou výhodou zde byla možnost připravit větší množství sklíček při jedné depozici. Po vložení do jamkových desek a zalití médiem však v roztoku plavala, takže se buňky přichytávaly i z druhé strany, kde neměly dostatek místa a živin. Z tohoto důvodu docházelo k systematické chybě, kterou jsme zkoušeli optimalizovat použitím gelu, ale ani to nebylo úspěšné a proto se muselo od tohoto typu experimentu odstoupit. Dále se tedy pracovalo pouze s kultivačními plastovými miskami (viz obr. 2.12), kde se tento problém nevyskytuje. Nevýhodou je však velikost misek, kterých se do aparatury vejde maximálně 3 kusy. V budoucnu by však mohl být vyřešen i tento problém, protože se bude moci využívat aparatura o průměru elektrody 420 mm.



Obrázek 2.11: kultivační jamkové desky



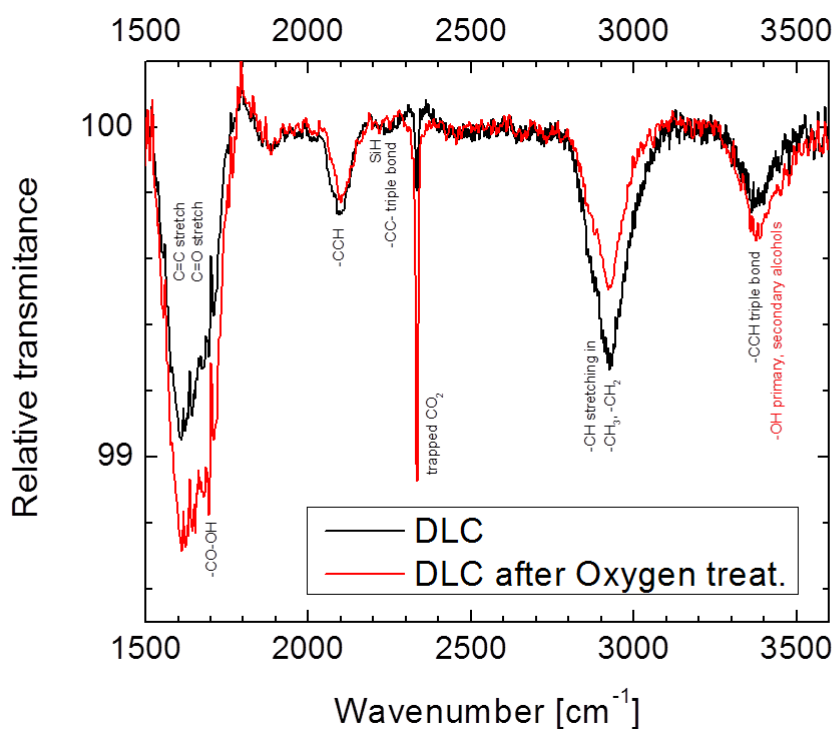
Obrázek 2.12: kultivační plastová miska

3 Výsledky a diskuze

3.1 Test stability DLC, DLC:SiO_x a aminových vrstev

3.1.1 DLC vrstvy na vzduchu

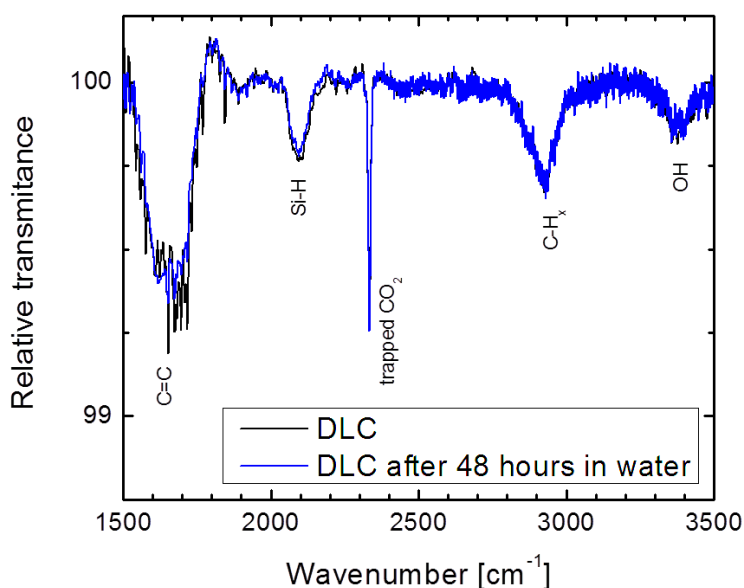
Základem bylo zjistit, zda vrstvy vydrží delší pobyt na vzduchu, tedy vystaveny atmosféře obsahující kyslík. Z tohoto důvodu byly vrstvy zkoumány pomocí infračervené spektroskopie. Tato metoda umožňuje identifikovat chemické vazby ve vrstvě (viz graf 3.1). Tento test neprokázal žádné změny vazeb na površích (v rámci experimentálních chyb) v porovnání s dalšími vzorky, jak na skle, tak na plastových miskách. Je tedy velmi pravděpodobné, že vystavení povrchů kyslíku, nemá na adhezi buněk žádný význam.



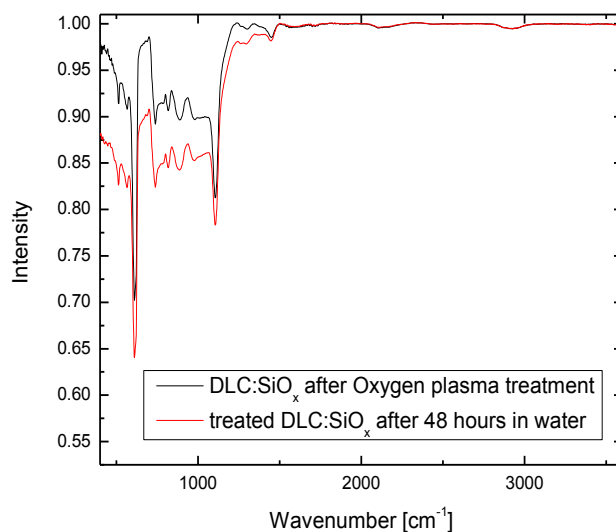
Graf 3.1: Test stability vazeb DLC povrchů na vzduchu

3.1.2 DLC a DLC:SiO_x ve vodném prostředí

Vzhledem k průběhu kultivace buněk na vytvořených površích, bylo nutno ověřit, zda namáčení povrchů nebude mít výrazný vliv na jejich strukturu. Proto byly povrchy namáčeny v destilované vodě po dobu 48 hodin. Tento test stability ve vodném prostředí proběhl v pořádku u obou typů vrstev. Nevyskytly se žádné změny v tloušťce, adhezi nebo v morfologii vrstev, viz grafy 3.2 a 3.3.



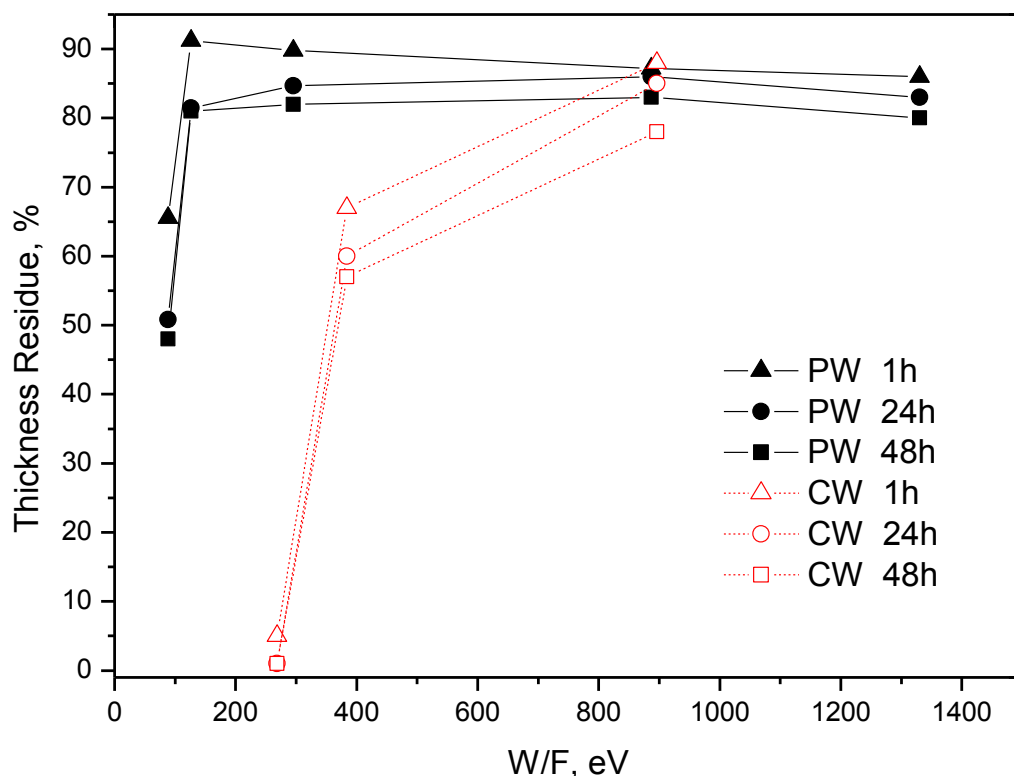
Graf 3.3: Test stability vrstev DLC ve vodném prostředí



Graf 3.2: Test stability vrstev DLC:SiO_x ve vodném prostředí

3.1.3 Stabilita aminových vrstev ve vodném roztoku

Test stability aminových vrstev jasně dokazuje (graf 3.4), že při dodání vyšší energie monomerům pomocí zvýšení vf. výkonu, se povrch stává stabilnějším. Stejně tak jsou stabilnější povrchy připravené v nízkotlakém vysokofrekvenčním pulzním výboji. Podrobnější výsledky jsou uvedeny v článku Manahkov, 2014.



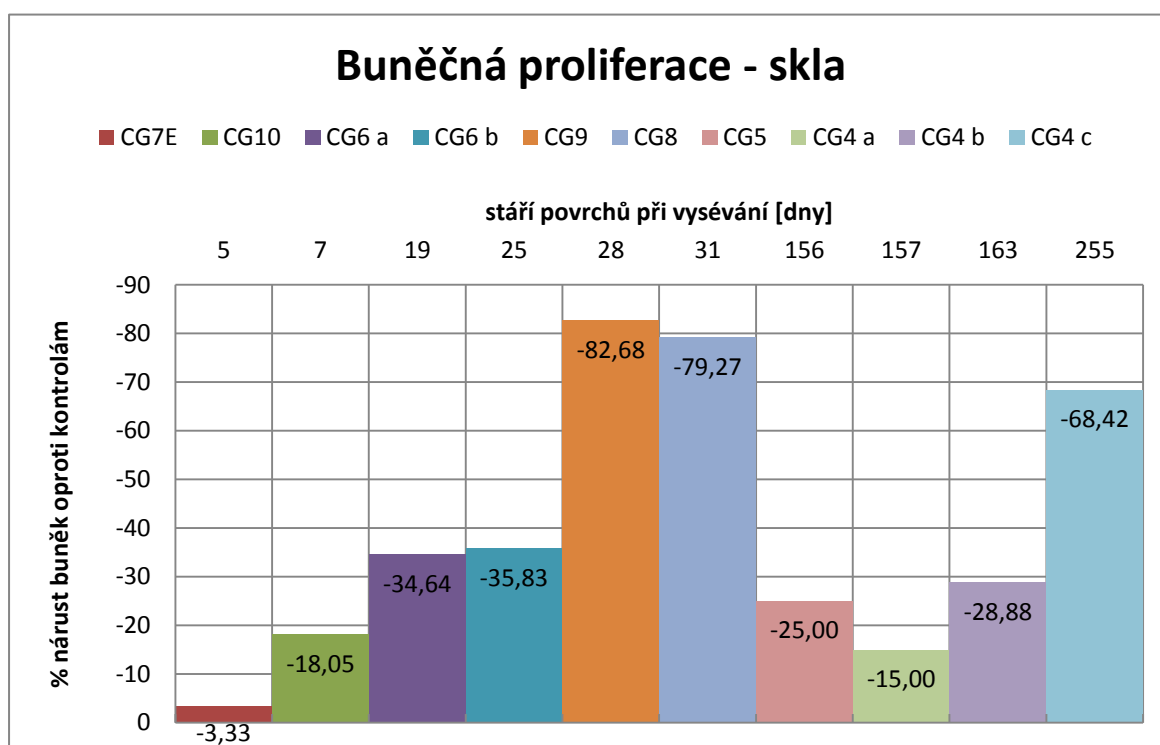
Graf 3.4: : Test stability aminových vrstev ve vodném prostředí, kde černé křivky jsou vrstvy připravené v pulzním výboji a červené křivky jsou pro vrstvy připravené v kontinuálním výboji.

3.2 Výsledky kultivace

3.2.1 Proliferace buněk na tvrdých uhlíkových vrstvách

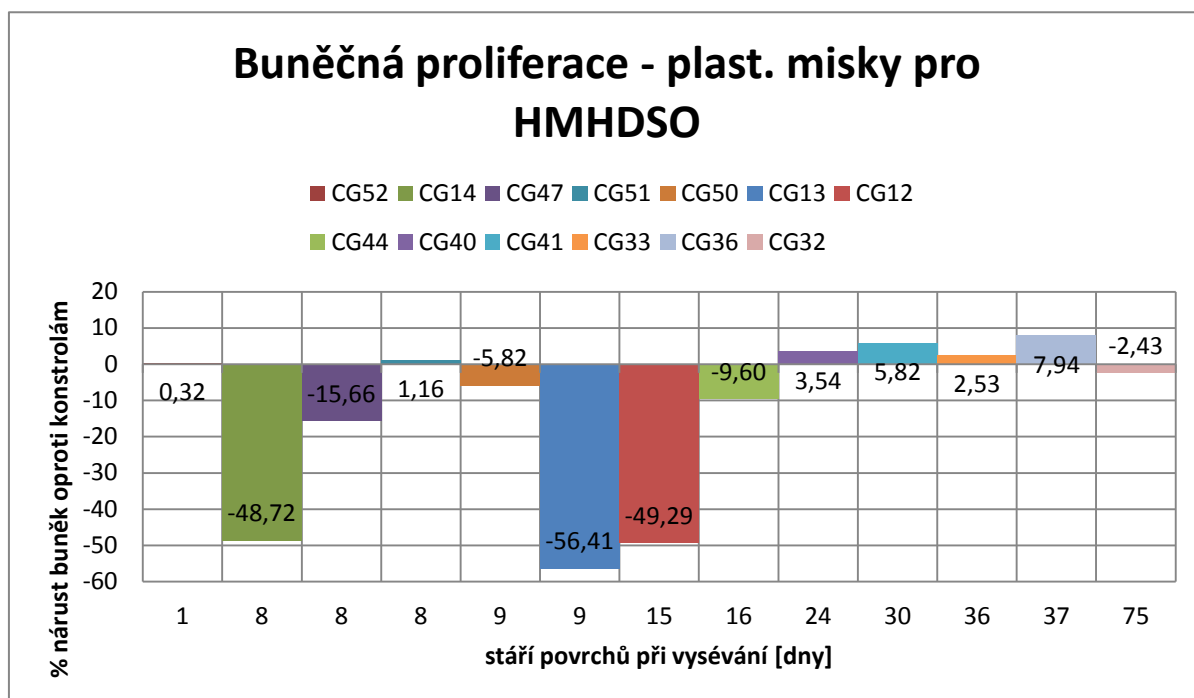
Pro kultivace jsme nejdříve používaly kultivační sklíčka, kterých se do reaktoru vešlo hodně, ovšem vzhledem k začínajícímu výzkumu byly tyto povrchy využity až několik měsíců po jejich depozici. Hned po prvním experimentu jsme zjistily, že se buňky přichy-

távají i z druhé strany sklíček, tedy že kultivační sklíčka plavou v médiu. Z tohoto důvodu byl použit gel pro podporu sklíček zůstat u dna, ale ani tento způsob nebyl efektivní a proto nebylo možné mít přesný údaj o proliferaci buněk na daném povrchu. Vzhledem k našemu typu experimentu, tedy že jsme využívali trypsinizační metodu, jsme nemohli se sklíčky nadále pracovat a museli jsme přejít ke kultivačním miskám. I tak jsme ovšem dostali zajímavé hodnoty závislé na stáří povrchů při vysévání (všechny hodnoty však lze brát pouze orientačně.). Podle grafu 3.5 je patrné, že nejmenší pokles proliferace buněk oproti kontrolním vzorkům měly nové povrchy. Se stářím se buňkám na površích dařilo hůře, ale překvapivě kolem 150 dne byl znovu pokles menší. V tomto raném stádiu našeho výzkumu byla trypsinizace u všech vzorků kolem 10 min.



Graf 3.5: Výsledky kultivace DLC vrstev na kultivačních sklíčkách. Na svislé ose je znázorněn pokles v procentech oproti kontrolním vzorkům a na vodorovné ose je zaznačen počet dní od depozice ke kultivaci.

Pro přehlednost, byly experimenty na plastových miskách rozděleny na DLC vrstvy a DLC:SiO_x. Vzorků s metanem bylo vytvořeno řádově dvojnásobek a kromě změny prekurzoru, zde nebyl žádný výraznější rozdíl v průběhu depozice.



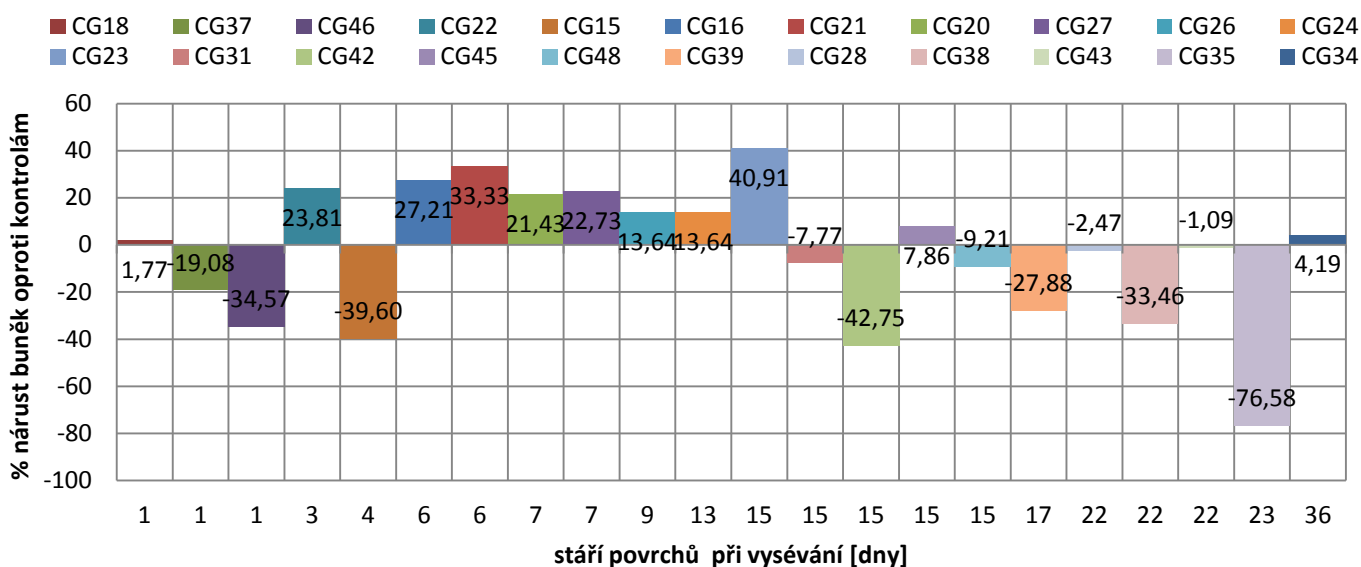
Graf 3.6: Graf pro buněčnou proliferaci na plastových miskách s použitím prekurzoru HMHDSO. Na svislé ose je znázorněn nárůst buněk oproti kontrolám.

Při využití hexametyldisiloxanu jako prekurzoru byla trypsinizace na substrátech prováděna od 15 do 20 min. Buňky neměly problém se odpojit od povrchů a nejlépe se jim dařilo na površích starých mezi 20 až 40 dnem, viz graf 3.6. Pokud srovnáme rozdíly depozice po 8 dnech, je možné, že CG14 má tak velký pokles kvůli vyššímu průtoku prekurzoru HMHDSO (1,5 sccm). Na rozdíl od toho rozdíl mezi CG47 a CG51 si nedokážeme vysvětlit, protože všechny podmínky depozice i stáří povrchů se shodují. Dalším dobře viditelným rozdílem jsou vzorky CG50 a CG13. U vzorku CG50 byl čas depozice 10 min, průtok CH₄ 1,4 sccm a průtok HMHDSO 0,4 sccm. Na rozdíl od toho, u CG13 trvala depozice pouze 1 min, průtok CH₄ byl 0,8 sccm a průtok HMHDSO 1,5 sccm. Z obou typů srovnání je tedy možno usuzovat, že vyšší průtok HMHDSO negativně ovlivňuje proliferaci buněk na daných površích. To stejné potvrzují i vzorky s nárůstem buněk oproti kontrolám (CG40, CG41, CG33, CG36). Nejvíce se dařilo buňkám na povrchu CG36 a CG41. U obou je průtok CH₄ výrazně vyšší než průtok HMHDSO. Na jejich rozdíl v hodnotách pak může mít vliv délka depozice, která byla 7 a 10 min. Stejně tak tomu je nejspíš i u vzorků CG33 a CG40, kde se buňkám hůře dařilo na povrchu CG33 (délka depozice = 210 min).

V případě, kdy byl prekurzor pouze metan, byl zpozorován nárůst buněk oproti kontrolám po 6-13 dnech depozice. Povrchy staré 15 dnů mají velmi širokou škálu hod-

not, a proto nebylo možné je započítat do výhodných dnů kultivace, viz graf 3.7. Pokud se podíváme na podmínky depozice u vzorků starých 6-13 dní, je zde možno vysledovat trend, podle kterého se jejich hodnoty nejspíše odvíjejí. Tímto trendem je doba depozice, kdy například u vzorků CG16 (25 min) a CG21 (20) můžeme vidět rozdíl v podobě 6,12 % i přes jinak stejné depoziční podmínky. U povrchů starých 7 dní, kde byly povrchy vystaveny depozici 45 min (CG20) a 20 min (CG27) je rozdíl menší (1,3 %). Vzorky CG26 a CG24 mají sice stejné procentuální hodnoty a jiné doby depozice, ale stejně tak se liší jejich stáří. Podle 5 vzorků starých 15 dní, je možné vidět, že ne jen čas má nejspíš vliv na proliferaci buněk. Můžeme pozorovat, že se buňkám nejlépe dařilo na povrchu CG23 (15 min depozice) a nejhůře na povrchu CG42 (30 min depozice), ale vzorky CG31, CG45 a CG48 měly stejný depoziční čas (20 min) a jejich hodnoty se přesto liší. Proto je pravděpodobné, že se musí brát v úvahu i předpětí či jiné faktory.

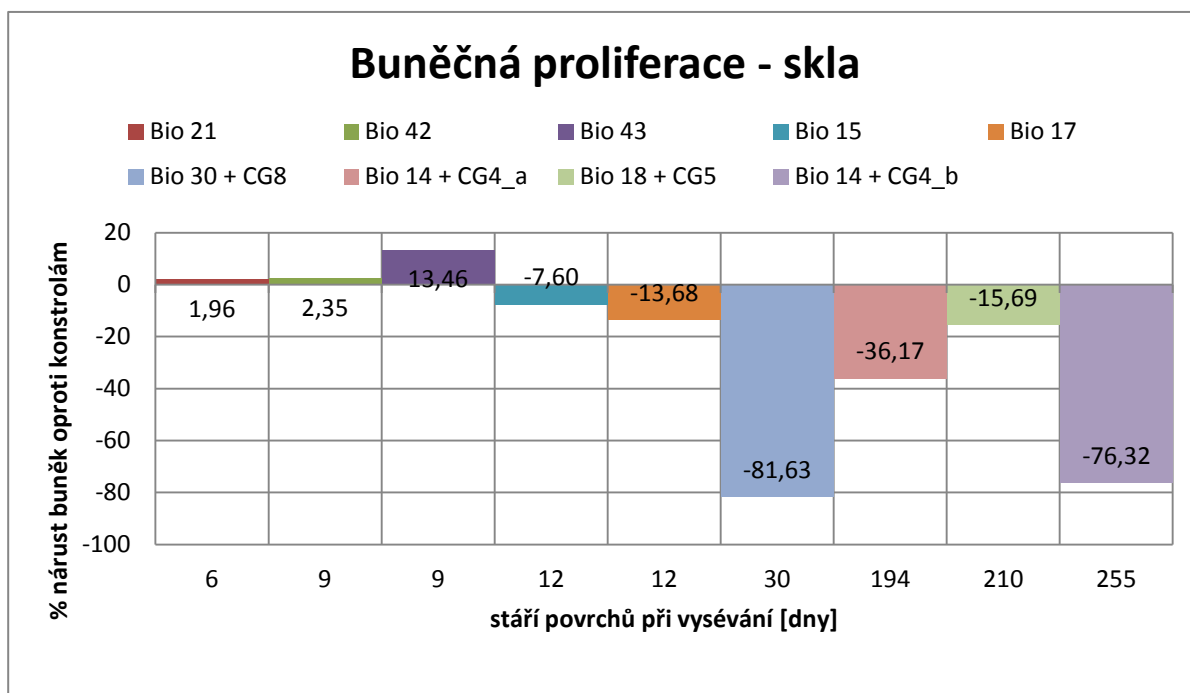
Buněčná proliferace - plast. misky s CH4



Graf 3.7: Graf pro buněčnou proliferaci na plastových miskách s použitím prekurzoru CH4.

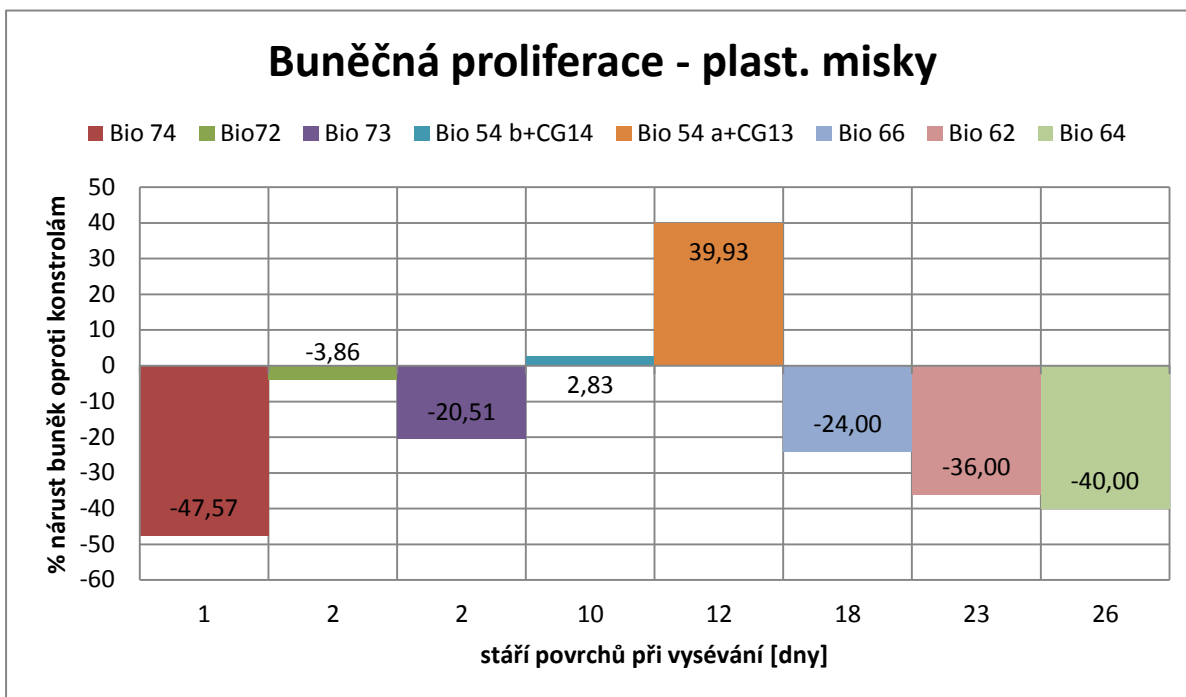
3.2.2 Proliferace buněk na aminových površích

I vrstvy nesoucí aminové skupiny byly nejprve pořizovány na kultivačních sklíčkách a tedy se zde vyskytoval stejný problém jako u DLC vrstev. Všechny výsledky kultivací na sklíčkách lze tedy brát pouze orientačně. Zároveň byla některá sklíčka vystavena dvěma depozicím, nejprve DLC a na ni plazmové polymery obsahující aminové skupiny. Čtyři vzorky dvojvrstev můžeme vidět na grafu 3.8. Zároveň je z grafu patrné, že nárůst buněk oproti kontrolním vzorkům vykazují pouze povrchy staré do jednoho týdne.



Graf 3.8: Graf znázorňující buněčnou proliferaci na vzorcích s aminovým povrchem.

Při práci s kultivačními miskami, se sice snížil počet vzorků se stejnými depozičními podmínkami, ale odstranila se systematická chyba a výsledky měření tak více odpovídají skutečnosti. Veškerá data jsou zobrazena v grafu 3.9. Proliferaci buněk na samotných aminových vrstvách nedokážeme uspokojivě vysvětlit, protože při každém experimentu se buňky chovaly jinak. Už jen výsledky z povrch starých 2 dny (Bio72 a Bio73), kdy byly všechny depoziční podmínky stejné, nedokážeme nijak vysvětlit. Pokud jde o povrchy i s DLC vrstvou, tam se můžeme obrátit spíše k depozičním podmínkám DLC vrstev, které vnáší trochu světla do daných výsledků. Je možné, že zde hraje roli jak čas deposice CG14 (15 min) a CG13 (3 min), tak průtok HMHDSO - CG14 (1,5 sccm) a CG13 (0,7 sccm). Na zbylé aminové povrchy má nejspíše vliv stáří daných povrchů. Co je ovšem patrné, že se lépe daří buňkám na površích s již existujícím povrchem DLC, kde je nárůst buněk i 40 %. Pro všechny pouze aminové povrchy jsme spíše zaznamenali pokles.



Graf 3.9: Graf pro buněčnou proliferaci s aminovými povrchy na plastových miskách.

Vzhledem k problémům s větší adhezí vůči buňkám, musela být prodloužena trypsinizace na 30-40 min. U kontrolních vzorků se trypsinizace pohybovala od 15-20 min. Vzhledem k špatnému oddělování buněk od povrchů byla vyzkoušena řada metod, jak trypsinizaci zkrátit a tím zamezit náhodnému odumírání již oddělených buněk. K tomuto účelu posloužil experiment s povrchy Bio 75, Bio 76 a Bio 77:

- Pro každou kultivační misku Bio byla vytvořena kontrola, tedy se pracovalo s 12 miskami. Pro zaručení jasnějších výsledků, byla trypsinizace rozdělena po 3 vzorcích a stejně tak se měnilo proplachování PBS. Vzorky Bio75(a,b) a Bio76(a) byly propláchnuty pouze jednou pomocí PBS, jak je napsáno v protokolu. Následně byly podrobeny trypsinizaci po dobu 50 min a zneutralizovány médiem v momentě odchlípnutí všech buněk. Pro vzorky Bio75 byl procentuální pokles buněk oproti kontrolám 45,45 %, pro Bio75(a) o trochu méně a to 35,07 %. Druhá sada, tedy Bio76(b) a Bio77(a,b) byly propláchnuty 2x PBS a trypsin na ně působil 25 min. U kontrolních vzorků pouze 15 min. Zde byl pokles u Bio76(b) 40,54 % a u Bio77 32,29 %. Bohužel při kontrole pod mikroskopem bylo zjištěno, že na těchto vzorcích byly stále přichytnuté buňky na povrchu a tedy se jejich počty nemohou započítávat do statistik. Nicméně jsme zjistili, že pobyt buněk v trypsinu nijak zvlášť neovlivňuje

jejich úbytek, protože u kontrol s 50 min trypsinizací byl průměr buněk 148/ μ l a u 15 min trypsinizace 144/ μ l. Vše je přehledně znázorněno v tabulce 3.1.

vzorek	proplach v PBS	počet buněk/1 μ l	délka trypsinizace	průměr buněk/1 μ l	% nárůst buněk oproti kontrolám
kontroly:					
Bio75 a	1x	150	50 min	148,5	
Bio75 b		147			
Bio76 a		134		141	
Bio76 b	1x	148	15 min		
Bio77 a		153		144	
Bio77 b		135			
povrchy:					
Bio75 a	1x	82	50 min	81	-45,4545455
Bio75 b		80			
Bio76 a		87		87,5	- 35,0746269
Bio76 b	2x	88	25 min		- 40,5405405
Bio77 a		112		97,5	-32,2916667
Bio77 b		83			

Tabulka 3.1: Experiment ze dne 29. 11. 2013

4 Závěr

V práci byly testovány čtyři typy povrchů (DLC, DLC:SiO_x, polymery s aminovými skupinami a dvojvrstva DLC s aminovými polymery) na biokompabilitu. Nejdříve byly provedeny testy na stabilitu daných povrchů, jak na vzduchu, tak ve vodném roztoku. A následně byly tyto připravené povrchy využity pro kultivaci buněk C2C12 myšího myoblastu. Získané výsledky lze shrnout do několika následujících bodů:

- Při pobytu DLC vrstev na vzduchu nebyly prokázány žádné změny struktury povrchu v porovnání s dalšími vzorky, jak na skle, tak na plastových miskách. Je tedy velmi pravděpodobné, že vystavení povrchů kyslíku, nemá na adhezi buněk žádný význam. Ani namáčení vrstev DLC a DLC:SiO_x po dobu 48 hodin v destilované vodě neměl žádný vliv na morfologii povrchů.
- Stabilita ve vodném roztoku polymerů s aminovými skupinami byla velmi ovlivněna množstvím dodané energie monomerům pomocí zvýšení vysokofrekvenčního výkonu a zároveň byly stabilnější povrchy připravené v pulzním výboji. Všechny kultivace proběhly na stabilních površích.
- Buňky byly sčítány pomocí tzv. trypsinizační metody, což zahrnuje počítání buněk na průtokovém cytometru Accuri C6. Po experimentálních pokusech bylo zjištěno, že z tohoto důvodu není možné dále využívat kultivační sklíčka, protože hodnoty jsou součtem buněk jak na připravených površích, tak z druhé strany sklíček. Hodnoty z těchto experimentů jsou tedy pouze orientační, vzhledem k dané systematické chybě.
- Povrchy DLC na plastových miskách zaznamenaly nejlepší proliferaci buněk při stáří 6-13 dnů a zároveň při kratší době depozice metanu. Kromě stáří povrchů a času depozice však při proliferaci hrají roli i jiné faktory, které se zatím nepodařilo identifikovat. Z tohoto důvodu je potřeba provádět další experimenty s povrchy se stejnými depozičními podmínkami a stejnou dobou mezi depozicí a vyséváním buněk. Vzhledem k nadcházející možnosti využívat aparaturu o průměru elektrody 420 mm bude možné v budoucnu tyto plány uskutečnit.

- U DLC:SiO_x povrchů byla trypsinizace na substrátech prováděna od 15 do 20 min a nejlépe se buňkám dařilo na površích starých mezi 20 až 40 dnem. Proliferaci buněk ovšem taky velmi ovlivnil průtok prekurzorů, kdy byla zaznamenána lepší proliferace u povrchů s nižším průtokem hexametyldisiloxanu a vyšším průtokem metanu.
- Povrchy s aminovými skupinami nešlo dostatečně statisticky porovnat, vzhledem k jejich zvláštní interakci s buňkami. Jediný stálý trend je lepší proliferace buněk na dvojvrstvách (DLC+aminové skupiny), který je nejspíš způsoben přítomností vrstvy DLC. Zde můžeme vidět i nárůst 40 % oproti kontrolním vzorkům. U samotných aminových vrstev byl zaznamenán spíše pokles.

5 Seznam použitých zkratek

PECVD - " plasma enhanced chemical vapour deposition" (plazmochemická depozice materiálu ve formě tenké vrstvy)

CVD - "chemical vapour deposition" (depozice tenkých vrstev z plynné fáze)

vf. - vysokofrekvenční

C2C12 - buněčná linie myšního myoblastu

DLC - "diamond like carbon" (diamantu podobné uhlíkové vrstvy)

DLC:SiO_x - diamantu podobné uhlíkové vrstvy s příměsí hexametyldisiloxanu

HMHDSO - hexametyldisiloxan

PBS - "phosphate buffered saline" (pufrovaný solný roztok)

6 Použitá literatura

Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Essential cell biology, Fourth edition, Garland Science, Taylor & Francis group, ISBN 9780815344551 (2014)

Lieberman M.A., Lichtenberg A.J., Principles of plasma discharges and materials processing, John Wiley & Sons, Inc., 605 Third Avenue, New York, NY 10158-0012 (1994)

Chan C.-M., Ko, T.-M., Hiraoka H., Polymer surface modification by plasmas and photons, Surface Science Reports 24 1-54, 1996.

Hansen R.H. and Schonhorn H., J. Polym. Sci. B 4 (1966) 203.

Schonhorn H. and Hansen R.H., J. Appl. Polym. Sci. 11 (1967) 1461.

Chappel P.J.C., Brown J.R., George G.A. and Willis H.A., Surf. Inetr. Anal. 17 (1991) 143.

Clark D.T. and Dilks A., J. Appl. Polym. Sci. Polym. Sci. 15 (1977) 2321.

Nakayama Y., Takahagi T., Soeda F., Hatada K., Nagaoka S., Suzuki J. and Ishitani A., J. Polym. Sci. A 26 (1988) 559.

Yasuda H.K., Plasma polymerization, Elsevier Science, 9780323139458, 1985.

Grill A., Meyerson B. S., Development and status of diamondlike carbon, in: K.E. Spear, J.P. Dismukes (Eds.), Synthetic Diamond: Emerging CVD Science and Technology, Wiley, New York, 1994.

Grill A., Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials—an overview, T.J. Watson Research Center, Yorktown Heights, NY 10598, USA , 2003.

Thompson L.A., F.C. Law, N. Rushton, J. Franks, Biomaterials 12 (1991) 37.

Allen M., F. Law, N. Rushton, Neil, Clin. Mater. 17 (1994) 1.

Du C., X.W. Su, F.Z. Cui, X.D. Zhu, Biomaterials 19 (1998) 651.

Cui F.Z., D.J. Li, Surf. Coat. Technol. 131 (2000) 481.

Lesko, J. a kol.: Práce tkanivovýmikulturami, Bratislava, Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied 1975, s. 212.

Manakov A., L. Zajíčková,* M. Eliáš, J. Čechal, J. Polčák, J. Hnilica, Š. Bittnerová, D. Nečas, Optimization of Cyclopropylamine Plasma Polymerization Towards Enhanced Layer Stability in Contact with Water, DOI: 10.1002/ppap.201300177 (2014)

7 Přílohy

7.1 Tabulky depozic

Tabulka 7.1: Seznam vzorků depozice tvrdých uhlíkových vrstev. Všechny hodnoty jsou pouze deponiční podmínky, bez hodnot jednotlivých úprav ("treatments").

název	P [W]	p [Pa]	předpětí [V]	čas [min]	Q (H) [sccm]	Q (Ar) [sccm]	Q (CH ₄) [sccm]	Q (HMHD-SO) [sccm]	substrát pro kultivaci	počet	datum depozice
CG 4	50	14,5	-366	12			1,4		sklíčka	11	20.1.
CG 5	50	15,3	-350	16			1,4		sklíčka	11	21.1.
CG 6	50	16,4	-270	5			0,8	1,4	sklíčka	12	28.6.
CG 7	50	14,6	-382	25			1,4		sklíčka	10	18.7.
CG 8	10	13,1	-130	4			0,8	0,8	sklíčka	13	29.7.
CG 9	50	14,4	-363	15			1,4		sklíčka	4	31.7.
CG 10	50	16	-344	4			1,4	0,9	sklíčka	4	8.8.
CG 11	50	13,2	-248	1			0,8	0,7	plast. misky	3	28.8.
CG 12	50	13,4	-239	3			0,8	0,7	plast. misky	3	29.8.
CG 13	50	15,3	-148	1			0,8	1,5	plast. misky	3	4.9.
CG 14	50	9,8	-273	15			0,8	1,5	plast. misky	3	5.9.
CG 15	50	17	-284	10	1,4		0,8		plast. misky	3	11.9.
CG 16	50	14,4	-259	25			1,4		plast. misky	3	11.9.
CG 18	50	14,2	-251	25			1,4		plast. misky	3	16.9.
CG 20	50	14,6	-262	45			1,4		plast. misky	3	10.10.
CG 21	50	14,3	-258	20			1,4		plast. misky	2	11.10.
CG 22	50	14,9	-246	15			1,4		plast. misky	2	14.10.
CG 23	50	14,5	-240	15			1,4		plast. misky	2	15.10.

CG 24	50	15,7	-240	3,5			1,4	0,4	plast. misky	2	17.10.
CG 26	50	15,4	-235	7			1,4	0,4	plast. misky	2	21.10.
CG 27	50	14,5	-183	20			1,4		plast. misky	2	23.10.
CG 28	50	14,2	-215	20			1,4		plast. misky	3	24.10.
CG 31	50	14,4	-280	20			1,4		plast. misky	3	31.10.
CG 32	50	15,3	-263	7			1,4	0,4	plast. misky	3	6.10.
CG 33	50	16,2	-252	210			0,8	0,7	plast. misky	3	7.11.
CG 34	50	14	-279	20			1,4		plast. misky	3	11.11.
CG 35	50	16,8	-147	30	1,4		0,8		plast. misky	3	13.11.
CG 36	50	15,3	-100	7			1,4	0,4	plast. misky	3	13.11.
CG 37	50	14,6	-92	20			1,4		plast. misky	3	14.11.
CG 38	50	17	-283	33	1,4		0,8		plast. misky	3	14.11.
CG 39	50	17	-286	45	1,4		1,4		plast. misky	3	19.11.
CG 40	50	16,3	-252	7			0,8	0,7	plast. misky	3	19.11.
CG 41	50	15,3	-265	10			1,4	0,4	plast. misky	3	20.11.
CG 42	50	16,9	-264	30	1,4		1,4		plast. misky	3	21.11.
CG 43	50	14,1	-267	20			1,4		plast. misky	3	25.11.
CG 44	50	16,2	-239	8			0,8	0,7	plast. misky	3	27.11.
CG 45	50	14,4	-284	20			1,4		plast. misky	3	2.12.
CG 46	50	17,2	-257	31	1,4		1,4		plast. misky	3	5.12.
CG 47	50	16,2	-212	9			0,8	0,7	plast. misky	3	5.12.
CG 48	50	172	-269	20	1,4		1,4		plast. misky	3	5.12.
CG 50	50	15,3	-269	10			1,4	0,4	plast. misky	3	11.12.

CG 51	50	16,1	-253	9			0,8	0,7	plast. misky	3	12.12.
CG 52	50	15,5	-211	10			1,4	0,4	plast. misky	3	19.12.

Tabulka 7.2: Seznam vzorků depozice plazmových polymerů obsahující aminové skupiny.

název	P [W]	p [Pa]	čas [min]	Q (mono-mer) [sccm]	na DLC	substrát pro kultivaci	počet	datum depozice
Bio-14	20	16	3	0,7	CG4	kulatá sklíčka	4	20.6.2013
Bio-15b	20	16	20	0,7		kulatá sklíčka	4	21.6.2013
Bio17-b	20	16	15	0,3	CG4	kulatá sklíčka	4	24.6.2013
Bio18-a	20	16	3	0,7	CG5	kulatá sklíčka	4	1.7.2013
Bio21-a	20	22	5	0,7		kulatá sklíčka	4	17.7.2013
Bio30-a	20	22	3	0,7	CG8	kulatá sklíčka	4	1.8.2013
Bio42	20	15	5	0,3		plast. misky	2	9.8.2013
Bio43	20	20	5	0,7		plast. misky	2	9.8.2013
Bio54	20	17,4	3	0,7	CG13,14	plast. misky	2	10.9.2013
Bio62	20	5,8	5	0,7		plast. misky	2	15.10.2013
Bio64	20	5	5	0,7		plast. misky	2	22.10.2013
Bio66	20	5,6	5	0,7		plast. misky	2	29.10.2013
Bio69	20	5,6	5	0,7		plast. misky	2	5.11.2013
Bio72	20	5,6	5	0,7		plast. misky	2	19.11.2013
Bio73	20	5,6	5	0,7		plast. misky	2	19.11.2013
Bio74	20	5,6	5	0,7		plast. misky	2	20.11.2013
Bio75	20	5,9	5	0,7		plast. misky	2	26.11.2013
Bio76	20	5,8	5	0,7		plast. misky	2	26.11.2013
Bio77	20	5,7	5	0,7		plast. misky	2	26.11.2013