



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Posouzení biokompatibility tenkých vrstev nanesených metodou PVD napařování elektrickým obloukem a jejich funkcionalizace

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály
Autor práce: **Bc. Adéla Coufalová**
Vedoucí práce: Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Biocompatibility assessment of thin layers deposited by PVD evaporation arc and their functionalization

Master thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942T002 – Nanomaterials
Author: **Bc. Adéla Coufalová**
Supervisor: Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Coufalová**
Osobní číslo: **M16000157**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Posouzení biokompatibility tenkých vrstev nanosených
metodou PVD napařování elektrickým obloukem a jejich
funkcionalizace**
Zadávací katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

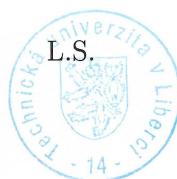
1. Vypracování odborných rešerší na téma: možnosti využití a aplikace tenkých vrstev; charakterizace nanopovrchů (drsnost, měrný povrch, využití mikroskopie, vliv parametrů depozice na vlastnosti tenkých vrstev aj.); možnosti nanostruktur a jejich využití v biologických aplikacích; možnosti funkcionalizace tenkých vrstev.
2. Návrh uspořádání laboratorního experimentu (selektce vhodné bakteriální nebo tkáňové populace, výběr vhodných metodik měření, volba vhodné funkcionalizace).
3. Provedení experimentu, naměření fyzikálně-chemických a biologických parametrů (hodnocení povrchu materiálu pomocí AFM a SEM, hodnocení růstu či aktivity bakteriálních nebo tkáňových populací bez/v kontaktu s nanostrukturami apod.).
4. Posouzení vhodnosti nanostruktur pro bakteriální nebo tkáňové populace (proliferace/restrikce), zhodnocení změny povrchové struktury (destrukce materiálu apod.), posouzení vlivu funkcionalizace na fyzikálně-chemické a biologické parametry vrstvy.
5. Zhodnocení dosažených výsledků včetně popisu využití v reálné praxi.

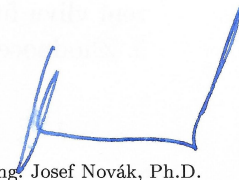
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **40 - 60 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:

- [1] VASEASHTA, A. K., MIHAILESCU, I. N.: **Functionalized Nanoscale Materials, Devices and Systems. Springer Science & Business Media, ISBN 978-1-4020-8903-9, 2008.**
[2] SUTARIYA, V. B., PATHAK, Y.: **Biointeractions of Nanomaterials. CRC Press, ISBN 978-1-4665-8238-5, 2014.**
[3] NAZARPOUR, S.: **Thin Films and Coatings in Biology. Springer Science & Business Media, ISBN 978-94-007-2592-8, 2013.**
[4] REDDY B.: **Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites, ISBN 978-953-307-202-9**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Konzultant diplomové práce: **Ing. Totka Bakalová, Ph.D.**
Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie
a inovace
Ostatní konzultanti: **Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Mgr. Petra Rosická
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Ing. Miroslava Rysová
Datum zadání diplomové práce: **19. října 2017**
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2018**


prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan




Ing. Josef Novák, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 19. října 2017

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucí diplomové práce a konzultanty.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 14. 5. 2018

Podpis: Coufalová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala mé vedoucí Ing. Lucii Svobodové Ph.D. za odborné rady a vstřícnost po celou dobu zpracovávání mé diplomové práce. Velké poděkování za odbornou pomoc patří také Ing. Totce Bakalové Ph.D.

Za pomoc při jednotlivých modifikacích a analýzách vzorků, které probíhaly na mnoha pracovištích, děkuji Doc. Ing. Petru Exnarovi CSc., Ing. Pavlu Kejzlarovi Ph.D., Ing. Lukáši Voleskému, Ing. Václavu Procházkovi a Ing. Miroslavě Rysové.

Zvláštní poděkování patří mé rodině a přítelovi za neustálou podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Tato práce se zabývá vhodností tenkých vrstev karbonitrid titanu (TiCN) a karbonitrid chromu (CrCN) nanesených na nerezové oceli ČSN 10088-1 1.4404 pro biologické aplikace a funkcionalizací těchto tenkých vrstev. Prvním krokem diplomové práce byla volba různých modifikací, které by měly zajistit menší adhezi bakteriálních buněk k povrchu materiálu. Byla zvolena fotolitografická modifikace, potažení vzorků sol-gelem a úprava povrchu dvěma druhy plazmatu (argonovým a kyslíkovým). Fotolitografická úprava i metoda sol-gel byly v kombinaci se zkoumanými vrstvami vyhodnoceny jako nevhodné pro biomedicínské aplikace a v dalších krocích byly zkoumány především modifikace argonovým a kyslíkovým plazmatem.

U vzorků byly porovnávány fyzikálně-chemické vlastnosti před a po plazmatické modifikaci povrchů. Byly sledovány především vlastnosti, které mají vliv na adhezi bakterií, tedy povrchová energie, drsnost a chemické složení povrchu. Dále byla měřena interakce mezi povrchem a bakteriálními kmeny *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Vzhledem k potenciálnímu využití tenkých vrstev TiCN a CrCN pro biomedicínské aplikace byly vzorky podrobeny testům cytotoxicity pomocí myších fibroblastů 3T3.

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit vliv jednotlivých antiadhezivních modifikací na fyzikálně-chemické vlastnosti, bakteriální interakci a cytotoxicitu povrchů tenkých vrstev TiCN a CrCN. Nejvýznamnější vliv na adhezi gramnegativního kmene *Escherichia coli* měla povrchová energie. Čím více byl vzorek hydrofilní, tím méně bakterií se na jeho povrchu po hodinovém kontaktu vzorku s bakteriální suspenzí uchýtilo. Hydrofilního povrchu bylo v největší míře dosaženo díky modifikaci kyslíkovým plazmatem. U grampozitivního kmene *Staphylococcus aureus* bylo možné pozorovat souvislost mezi adhezí buněk a plošnou drsností povrchu. Čím větší hodnota plošné drsnosti byla u vzorku naměřena, tím méně bakterií na daný povrch adherovalo. Plošná drsnost povrchu se lehce zvýšila po použití obou druhů plazmatu, avšak pouze u pěti vzorků ze sedmi studovaných. Pomocí testů cytotoxicity byly vzorky před i po modifikaci vyhodnoceny jako biokompatibilní.

Klíčová slova

tenké vrstvy, implantáty, biokompatibilita, modifikace, plazma

Abstract

This diploma thesis deals with the evaluation of thin layers of titanium carbonitride (TiCN) and chromium carbonitride (CrCN) coated on stainless steel ČSN 10088-1 1.4404 and their functionalization. The first step was the choice of various modifications which should ensure less adhesion of bacterial cells to the surface of the material. Photolithographic modification, sol-gel coating and surface treatment with two types of plasma (argon and oxygen) were selected. Both photolithography and sol-gel were evaluated as insufficiently resistant for biomedical applications in combination with the studied layers.

The physicochemical properties of samples were studied before and after plasma modification of the surfaces. In particular, properties that influence the adhesion of bacteria (surface energy, roughness and chemical composition of the surface) have been studied. The effect of the surface properties on bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was observed. Due to the potential use of thin films of TiCN and CrCN for biomedical applications, the samples were subjected to test of cytotoxicity using 3T3 mouse fibroblasts.

The aim of the diploma thesis was to evaluate the influence of individual anti-adhesive modifications on physicochemical properties, bacterial interaction and cytotoxicity of thin layers TiCN and CrCN. The surface energy had the most significant effect on the adhesion of the gram-negative strain *E. coli*. Lower number of bacterial cells adhered on hydrophilic samples. The hydrophilic surface was most extensively achieved due to oxygen plasma modification. The gram-positive strain of *S. aureus* was affected by surface roughness. The higher the surface roughness value of the sample, the less the bacteria adhered to the surface. Surface roughness slightly increased after the use of both plasma types, but only on five samples out of the seven. Using cytotoxicity assays, samples were evaluated as biocompatible.

Key words

thin layers, implants, biocompatibility, modifications, plasma

Obsah

Seznam obrázků, grafů a tabulek	10
Seznam použitých symbolů a zkratk	12
ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1. Tenké vrstvy	15
1.2. Biokompatibilní tenké vrstvy	16
1.2.1. Biokompatibilita	16
1.2.2. Nerezová ocel	17
1.2.3. Kovové tenké vrstvy	17
1.2.4. Keramické tenké vrstvy	19
1.2.5. Uhlíkové tenké vrstvy	20
1.3. Současné využití tenkých vrstev pro biomedicínské aplikace	21
1.3.1. Tenké vrstvy v ortopedických aplikacích	21
1.3.2. Tenké vrstvy pro zubní implantáty	21
1.3.3. Biosenzory na bázi tenkých vrstev	22
1.3.4. Tenké vrstvy jako elektrody v neurovědě	22
1.4. Bakterie	23
1.4.1. Struktura bakteriálních buněk	23
1.4.2. Tvar a uspořádání bakterií	24
1.4.3. Bakteriální kmeny použité v praktické části	25
1.5. Adheze bakterií k povrchu	27
1.5.1. Fyzikálně-chemické teorie popisující adhezi bakterií	27
1.5.2. Faktory ovlivňující adhezi bakterií	29
1.6. Úpravy regulující adhezi na povrch	30
1.6.1. Potažení polymerem	30
1.6.2. Změna topografie povrchu	30

1.6.3.	Nanesení vrstvy metodou sol-gel	30
1.6.4.	Úprava povrchu plazmatem.....	31
1.6.5.	Fotolitografie	31
2.	MATERIÁLY A METODY	32
2.1.	Popis studovaných vzorků	32
2.2.	Modifikace vzorků.....	34
2.3.	Měření fyzikálně-chemických parametrů vrstev	37
2.4.	Měření bakteriální interakce s tenkými vrstvami	40
2.5.	Měření cytotoxicity vzorků.....	42
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
3.1.	Fotolitografická modifikace.....	44
3.2.	Modifikace metodou sol-gel	46
3.3.	Vliv modifikace plazmatem na fyzikálně-chemické vlastnosti	48
3.3.1.	Povrchová energie	48
3.3.2.	Drsnost povrchu.....	49
3.3.3.	Chemické složení povrchu	50
3.4.	Vliv modifikace plazmatem na mikrobiologickou interakci	53
3.4.1.	Mikrobiální interakce – <i>Escherichia coli</i>	55
3.4.2.	Mikrobiální interakce – <i>Staphylococcus aureus</i>	56
3.5.	Vliv modifikace na cytotoxicitu tenkých vrstev	59
	ZÁVĚR	60
	Použitá literatura	61
	Přílohy.....	68

Seznam obrázků, grafů a tabulek

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Struktura bakteriální buňky.....	23
Obrázek 2: Tvary bakterií.....	24
Obrázek 3: Snímek <i>Escherichia coli</i> z elektronového mikroskopu.....	25
Obrázek 4: Snímek bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> z elektronového mikroskopu	26
Obrázek 5: Porovnání ireverzibilní fáze dvoukrokové a jednokrokové adheze	27
Obrázek 6: Rozměr vzorků.....	32
Obrázek 7: Schéma a ilustrační snímek z elektronového mikroskopu	34
Obrázek 8: Náčrt plochy vzorku pokryté sol-gelem.....	35
Obrázek 9: Chemické vzorce hlavních složek použitého sol-gelu	35
Obrázek 10: Síly působící na kapku kapaliny umístěné na pevný povrch	37
Obrázek 11: Fotografie kapky. Stanovení úhlu smáčivosti pomocí tří bodů.....	37
Obrázek 12: Hrot profilometru umístěný nad vzorkem.....	38
Obrázek 13: Princip výpočtu hodnoty průměrné drsnosti S_a (OLYMPUS, 2017).	38
Obrázek 14: 3D profil povrchu vzorku CrCN-1 získaný pomocí metody AFM.....	38
Obrázek 15: Příklad výstupních dat z Energiově Disperzní Spektroskopie.....	39
Obrázek 16: Měření kontaktního úhlu před modifikací a ihned po kyslíkové	44
Obrázek 17: Vrstva sol-gelu před a po mikrobiologických testech.....	46
Obrázek 18: Překryv piků chromu a kyslíku.....	52
Obrázek 19: Fotodokumentace desítkového ředění metody KTJ.....	53
Obrázek 20: Fotodokumentace rozdílných výsledků interakce povrchu s bakteriemi ...	53
Obrázek 21: Povrch vzorku po hodinové interakci s bakteriální suspenzí.....	54

Seznam grafů

Graf 1: Naměřený kontaktní úhel před modifikací a po kyslíkové terminaci.....	44
Graf 2: Naměřený kontaktní úhel vody před a po vodíkové terminaci.....	45
Graf 3: Kontaktní úhel u jednotlivých povrchů.....	48
Graf 4: Plošná drsnost povrchů.....	49
Graf 5: Počet KTJ uchycených na povrch vzorku (<i>Escherichia coli</i>)	55
Graf 6: Počet KTJ uchycených na povrch vzorku (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	57
Graf 7: Cytotoxicita vzorků.....	59

Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení nerezové oceli ČSN 10088-1 1.4404.	17
Tabulka 2: Vzhled jednotlivých vzorků.....	32
Tabulka 3: Parametry depozice jednotlivých vrstev.....	33
Tabulka 4: Zkrácené označování jednotlivých modifikací.....	43
Tabulka 5: Chemické složení povrchu vzorků po modifikaci sol-gelem	47
Tabulka 6: Chemické složení povrchu vzorků před modifikací.....	51
Tabulka 7: Chemické složení povrchu po modifikaci argonovým plazmatem.	51
Tabulka 8: Chemické složení povrchu po modifikaci kyslíkovým plazmatem.....	51

Seznam použitých symbolů a zkratek

θ	kontaktní úhel
γ_{SL}	mezifázová energie mezi pevnou látkou a kapalinou
γ_{SG}	mezifázová energie mezi pevnou látkou a plynnou fází
γ_{LG}	mezifázové energii mezi kapalnou a plynnou fází
AFM	Atomy Force Microscopy (mikroskopie atomárních sil)
CCM	Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)
CrCN	karbonitrid chromu
CVD	Chemical Vapor Deposition (chemická depozice z plynné fáze)
ČSN	Československá Státní Norma ¹
DNA	Deoxyribonucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDLVO	Extended Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
EDS	Energiově Disperzní Spektroskopie
G ⁻	gramnegativní
G ⁺	grampozitivní
ISO	International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)
KTJ	kolonie tvořící jednotky

¹ Po osamostatnění České republiky bylo označení ČSN zachováno.

MS	Magnetron Sputtering (magnetronové rozprašování)
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid
NCD	Nano-Crystalline Diamond (nanokrystalický diamant)
PA CVD	Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition (chemická depozice z plynné fáze podporovaná plazmatem)
pH	Potential of Hydrogen (potenciál vodíku)
PVD	Physical Vapour Deposition (fyzikální depozice z plynné fáze)
RF PACVD	Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition (radiofrekvenční chemická depozice z par podporovaná plazmatem)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S _a	plošná drsnost povrchu
sccm	Standard Cubic Centimeters per Minute (kubický centimetr za minutu)
SEM	Scanning Electron Microscope (skenovací elektronová mikroskopie)
TiCN	karbonitrid titanu

ÚVOD

Často využívaným materiálem pro biomedicínské aplikace, například k výrobě tělních implantátů, je nerezová ocel ČSN 10088-1 1.4404, která vyniká svými mechanickými vlastnostmi. Po implantaci do těla, však může ocel vykazovat cytotoxické účinky z důvodu uvolňování iontů železa, chromu a niklu. Nánosem biokompatibilní tenké vrstvy na ocelový implantát je docíleno zachování potřebných mechanických vlastností komponentu a zároveň je dosaženo potřebných chemických a biologických vlastností povrchu (Zink 2013). Jako alternativa k dnes již běžně využívaným tenkým vrstvám DLC (diamond-like carbon) jsou zkoumány uhlíkové vrstvy s přidavkem různých kovů (například vrstvy karbonitrid titanové (TiCN) nebo karbonitrid chromové (CrCN)), které jsou chemicky inertní a zároveň vykazují vysokou tvrdost a odolnost proti opotřebení (Bakalova et al. 2016a).

Přetrvávajícím problémem i po nánosu tenké vrstvy na implantát je uchycení bakteriálních buněk na povrch implantátu v průběhu operace (Cristina et al. 2016; Dapunt et al. 2016). Existuje mnoho antibakteriálních úprav, které jsou založeny na přítomnosti molekul způsobujících zahubení bakterií. V případě využití tohoto typu antibakteriálních úprav na tělní implantáty však často dochází k poškození tkání pacienta. V případě tělních implantátů je proto nežádoucí už pouhé uchycení bakterií na povrchu a přistupuje se k takovým úpravám, které působí antiadhezivně vůči bakteriálním kmenům.

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci „Posouzení vhodnosti uhlíkové nanostruktury pro kolonizaci bakteriální populací“ (Coufalová 2016), která se zabývala tenkými vrstvami TiCN. Cílem bakalářské práce bylo určení vlastností povrchů, které mají vliv na adhezi bakterií kmene *Escherichia coli* a odhalení spojitosti mezi takovými vlastnostmi povrchu a parametry při nanášení vrstvy.

Cílem diplomové práce je rozšířit studii o testy s dalším bakteriálním kmenem a kromě TiCN vrstev podrobit testům také vrstvy CrCN. Na základě poznatků z bakalářské práce, kdy adhezi bakterií nejvíce ovlivňovala hydrofobicita povrchu, jsou zkoumány modifikace omezující adhezi bakterií k povrchu vzorků. U modifikovaných vzorků je porovnávána změna fyzikálně-chemických vlastností povrchu a vyhodnocována bakteriální interakce s povrchem. Vzhledem k potenciálnímu využívání tenkých vrstev TiCN a CrCN pro biomedicínské aplikace jsou u vzorků provedeny testy cytotoxicity.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Tenké vrstvy

Tenká vrstva je definována jako útvar, jehož tloušťka je zanedbatelná vůči ostatním dvěma rozměrům. Za tenké vrstvy můžeme považovat vrstvy o tloušťkách v rozsahu od jedné atomární vrstvy až do několika desítek mikrometrů. Vrstva připravená na povrchu nějakého substrátu je omezena dvěma rozhraními, přičemž rozhraní s vnějším prostředím nazýváme povrch (Eckertová 1973).

Tenká vrstva obvykle mění fyzikální, mechanické i chemické vlastnosti substrátu. Nános tenké vrstvy se využívá pro zvýšení užitečných vlastností, např. tvrdosti, odolnosti proti opotřebení, zabránění korozi a dalším nežádoucím chemickým reakcím. Pomocí nánosu tenké vrstvy se mění také elektrické a optické vlastnosti substrátu. Díky tomu nalézají tenké vrstvy uplatnění například v elektrotechnice, strojírenství, optice či medicíně (Sedláček 1992; Blažek 2015).

Tenké vrstvy jsou vytvářeny pomocí depozice využívající atomy, ionty a molekuly ve formě par. Metody dělíme podle principu na chemické depozice z par (Chemical Vapor Deposition – CVD), fyzikální depozice z par (Physical Vapor Deposition – PVD) (Ohring 2002) a metody chemické za iniciace plazmy (PA CVD nebo PE CVD). Více o metodách přípravy tenkých vrstev a o systému substrát-vrstva pojednává bakalářská práce (Coufalová 2016), na kterou tato diplomová práce navazuje. V následujících kapitolách bude kladen důraz spíše na biokompatibilní tenké vrstvy a jejich konkrétní aplikace.

1.2. Biokompatibilní tenké vrstvy

Tenké vrstvy nalézají mnohé uplatnění v biologických a biomedicínských aplikacích jako jsou například implantáty, stenty nebo systémy pro podávání léků. Při těchto aplikacích dochází ke kontaktu tenké vrstvy s buňkami a tkáněmi a je tedy nutné dbát na biokompatibilitu použité vrstvy (Zink 2013).

1.2.1. Biokompatibilita

Biokompatibilita dle Williams (2008) je: *„schopnost biomateriálu plnit požadovanou funkci s ohledem na lékařskou terapii, aniž by vyvolala jakékoliv nežádoucí lokální nebo systémové účinky u příjemce této terapie, ale vytvářela nejvhodnější prospěšnou buněčnou nebo tkáňovou odpověď a optimalizovala výkonnost této terapie“*. Biokompatibilní materiály se na základě interakce s živou tkání dělí dále na biotolerantní, bioinertní a bioaktivní (Lemons 2013).

Biotolerantní materiál

Z dlouhodobého hlediska jsou tyto materiály pro biomedicínské aplikace nevhodné, jelikož mohou podléhat korozi. Ionty materiálu se mohou uvolňovat a přecházet do tkáně. Mohou působit toxicky, iritačně nebo senzibilizačně. Biotolerantní materiály jsou zhotovovány například z kobaltových slitin či korozi-vzdorné oceli (Klusák 2010).

Bioinertní materiál

Bioinertní materiály jsou tkání zcela akceptovány, nedochází k chemickým reakcím a nevznikají žádné vazivové vrstvy. Dochází ke kontaktní osteogenezi (osseointegraci). Do bioinertního materiálu zahrnujeme např. titan, titanové slitiny, tantal nebo uhlíkové materiály. Tyto materiály vyhovují jak biokompatibilitou, tak mechanickými vlastnostmi (Klusák 2010).

Bioaktivní materiál

Bioaktivní materiál má schopnost se spojovat s tkání. Z materiálu se uvolňují fosfatové a kalciové ionty, a díky nim dochází k osteogenezi a ke kompletní biointegraci. Pro tento materiál se nejčastěji používá hydroxyapatitová keramika, fosfatová keramika, bioaktivní sklokeramika a bioaktivní titan (Klusák 2010).

1.2.2. Nerezová ocel

Substrátem pro nános biokompatibilních tenkých vrstev je velmi často nerezová ocel jakožto nerezavějící cenově dostupný materiál s dobrými mechanickými vlastnostmi. Nerezová ocel vyniká lomovou houževnatostí a pro lékařské účely se nejčastěji používá nerezová ocel ČSN 10088-1 1.4404 s obsahem prvků uvedeným v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení nerezové oceli ČSN 10088-1 1.4404.

	C	Cr	Ni	Mn	Mo	Si	S	P	Fe
hm %	0,025	17,50	13,00	1,06	2,66	0,60	0,008	0,023	65,12

Pro snížení cytotoxických účinků je nutné zabránit uvolňování kovových iontů železa, chromu a niklu. Dusíková oxidace vykazuje úspěšnou pasivaci povrchu, avšak odolnost vůči korozi je i po pasivaci nižší než u titanu (Shih et al. 2004). Přesto, že je nerezová ocel ČSN 10088-1 1.4404 schválena pro použití *in vivo*, často způsobuje záněty, a proto je věnována pozornost především vývoji nových pasivačních technik a nánosů bioaktivních povlaků (Rondelli et al. 2005).

1.2.3. Kovové tenké vrstvy

Největší uplatnění nalézají kovy při stabilizaci zlomenin či náhradách kloubů. Biokompatibilita těchto materiálů je určena především rezistencí vůči korozi, jelikož uvolňování kovových iontů může způsobit těžké záněty i šokové syndromy. Uvolňování iontů je většinou zamezeno pomocí zoxidované vrstvy na povrchu, která pasivuje materiál a vytváří ochrannou vrstvu mezi materiálem a lidským organismem. K biokompatibilním patří titanové, stříbrné, zlaté, platinové a další slitiny (Zink 2013).

Titan a titanové slitiny

Titan je odolný proti korozi za obvyklých fyziologických podmínek a díky tomu je hojně využíván pro biomedicínská zařízení. *In vivo* testy s různými typy buněk vykazují u titanu problémy především v dlouhodobém horizontu (Liua et al. 2004). Hladké titanové povrchy nepodporují osteokondukci a tak se využívá různých povrchových úprav (plazmování, rozprašování, leptání či anodická oxidace), které zvyšují drsnost povrchu v řádu mikrometrů (Bächle a Kohal 2005). Vrstva oxidu titaničitého na povrchu zvyšuje biokompatibilitu materiálu. Tepelná povrchová úprava poté zvyšuje tloušťku této oxi-

dové vrstvy a snižuje tak možný vznik zánětlivých procesů (Bruni et al. 2005). Nitrid titanu se často využívá k povlakování nerezové oceli pro zlepšení odolnosti proti opotřebení (Paschoal et al. 2003).

Stříbro

Tenké vrstvy stříbra jsou využívány především díky svým antimikrobiálním účinkům pro snížení rizika infekcí a zánětů po implantaci. Existují však studie hovořící o změně růstu a zpomalení proliferace lidských buněk při kontaktu se stříbrem (Wataha et al. 2000; Kraft et al. 2000). Pro využití antimikrobiální aktivity stříbra a zároveň zabránění negativní reakce s buňkami jsou voleny tenké vrstvy o tloušťce 2 μm s obsahem stříbra o koncentraci maximálně 9 %. Tyto vrstvy nevykazují žádné cytotoxické účinky a zároveň je značně omezena tvorba biofilmu na jejich povrchu (Ewald et al. 2006).

Zlato

Zlato vykazuje extrémní odolnost proti korozi ve fyziologickém prostředí. Cena zlata je však vysoká pro použití k výrobě ortopedických a zubních implantátů, a tak jsou často využívány pouze tenké filmy obsahující zlato (například slitina platiny a zlata) (Kastrati et al. 2000). In vitro testy stentů se zlatým povlakem vykazují sníženou aktivitu trombocytů, což je důležité pro snížení trombotických rizik. Přesto jsou stenty se zlatou povrchovou úpravou využívány pro léčbu koronárních onemocnění méně než ocelové či nitinolové stenty, které jsou levnější a vykazují lepší hemokompatibilitu (Edelman et al. 2001).

Platina

Platina a její slitiny vykazují vysokou pevnost v tahu, inertnost a odolnost proti korozi. Studie ukazují, že titanové náhrady potažené tenkou vrstvou platiny inhibují kalcifikaci, což má význam pro mnoho ortopedických aplikací (Itakura et al. 1989). Díky vodivosti jsou tenké vrstvy na bázi platiny využívány také jako elektroluminiscenční materiál pro neuronová zařízení, kardiostimulátory, implantované defibrilátory, pomůcky pro naslouchání a další (Cowley a Woodward 2011).

1.2.4. Keramické tenké vrstvy

Keramické tenké filmy jsou velmi křehké a nemohou tak být vystaveny vysokému mechanickému zatížení. Mohou však vykazovat dobrou odolnost proti korozi a zlepšit tak biologickou účinnost povrchů. Keramika využívaná v medicíně se dělí do tří skupin: resorbovatelná (např. fosforečnan vápenatý), bioaktivní (např. hydroxyapatit) a bioinertní keramika (např. oxidy) (Nazarpour 2014).

Fosforečnan vápenatý

Fosforečnan vápenatý vyniká kompozitní podobností s kostní hmotou. Keramika nemůže nést velké zatížení, a proto se využívá spíše ve formě tenkých filmů nanesených na titanové implantáty, kde podporuje fixaci a proliferaci osteogenních buněk. Omezujícími faktory pro aplikaci fosforečnanu vápenatého *in vivo* je především nízká mechanická odolnost a pevnost v tahu (Heness a Ben-Nissan 2003).

Hydroxyapatit

Hydroxyapatit je bioaktivní keramika se složením podobným lidské kosti a je proto nejčastěji používaným povlakem pro biomedicínské implantáty. Hydroxyapatit podporuje účinnou fixaci implantátu a zároveň vznik vazby mezi implantátem a kostí krátce po operaci. Nevýhodou je nízká pevnost v tahu, která bývá řešena kombinací tenké vrstvy hydroxyapatitu s kovovým implantátem (Nelea et al. 2002).

Oxid hlinitý

Oxid hlinitý je bioinertní materiál s nízkou povrchovou drsností, vysokou tvrdostí i lomovou houževnatostí. Ložiska potažená oxidem hlinitým mají dobré kluzné vlastnosti a vykazují nízké opotřebení. Díky těmto vlastnostem jsou často využívány pro celkovou náhradu kyčle (Fu et al. 2011). Oxid hlinitý nevykazuje cytotoxické účinky a je dobře zavedeným biokompatibilním materiálem (Berbecaru et al. 2009).

Oxid zirkoničitý

Oxid zirkoničitý je bioinertní keramika vykazující vysokou pevnost a odolnost proti korozi a opotřebení. Tento materiál je často využíván pro zubní implantáty. Oxid zirkoničitý nevyvolává cytotoxické ani zánětlivé procesy a byla prokázána menší akumulace bakterií na jeho povrchu, než je tomu například u titanu (Gomes a Montero 2011).

1.2.5. Uhlíkové tenké vrstvy

Tenké filmy na bázi uhlíku jsou často využívány pro povlakování biomedicínských zařízení, jelikož se skládají pouze z biokompatibilních prvků (C, N, H apod.), které nepůsobují cytotoxický účinek v důsledku koroze.

Diamond-like carbon (DLC)

DLC je druh amorfního uhlíku. Je to chemicky inertní materiál s vysokou odolností proti korozi, významnou tvrdostí a nízkým součinitelem tření. Od počátku 90. let je řešena i biokompatibilita DLC tenkých vrstev. Fibroblasty naočkované na DLC vykazují dobrou proliferaci a zároveň nejsou přítomny žádné známky cytotoxicity či zánětů. Hodnocení *in vivo* ukazuje dobré přijetí titanových a ocelových implantátů pokrytých DLC tenkou vrstvou při kontaktu s kostní, svalovou i kardiovaskulární tkání. Zajímavým směrem je také dopování DLC vrstev (například mědí) pro antibakteriální účinky materiálu (Hauert 2003).

Karbonitridy

Karbonitridy mají podobné mechanické vlastnosti jako DLC vrstvy, a tak by měly vyhovovat požadavkům pro lékařské aplikace. Byla provedena pozorování morfologie fibroblastů připojených na karbonitridy. Fibroblasty neprokazovaly morfologické změny a zároveň nebyly pozorovány žádné známky cytotoxicity (Berbecaru et al. 2009). Hodnocení *in vitro* a *in vivo* ve větším rozsahu prozatím chybí a je předmětem současných studií (Wang et al. 2017).

Krystalický diamant

Výhodou krystalického diamantu je možnost ovlivňovat rozměr zrn od mikrometrických až po nanometrické rozměry. Díky tomu napodobují tenké vrstvy nanokrystalického diamantu povrchovou drsnost kosti. Studie *in vitro* prokázaly, že proliferace lidských osteoblastů je zvýšena na diamantu s nanometrickými zrny mnohem více, než na diamantu se submikronovým povrchem (Amaral et al. 2009). Neutrální kmenové buňky nasazené na vodíkem terminovaný ultra-nanokrystalinický diamant spontánně podstupují neuronovou diferenciaci. Tato vlastnost zvyšuje potenciál pro budoucí využití v neuronových mikroelektronických zařízeních (Xiao et al. 2006).

1.3. Současné využití tenkých vrstev pro biomedicínské aplikace

1.3.1. Tenké vrstvy v ortopedických aplikacích

Největším přínosem tenkých vrstev pro ortopedické aplikace je schopnost spojit kovové implantáty s kostí a vytvořit bariéru mezi kovovým implantátem a lidským organismem. Důležitými parametry pro požadovanou osseointegraci je velikost pórů, koeficient tření a modul pružnosti. V počátku byly využívány tradiční povlaky (např. vlákenné kovové sítě nebo plazmové sprejování titanu), které vykazovaly různá omezení včetně relativně vysokých modulů pružnosti, nízkého koeficientu tření a střední pórovitosti (Matassi et al. 2013).

Pro ortopedické aplikace se proto začaly více využívat kovové povlaky se speciální pórovitou strukturou. Uplatňují se na implantáty kyčlí, kolen, ramen i páteře (Higuera et al. 2005; Sinclair et al. 2012; Kamath et al. 2012; Fernández-Fairen et al. 2012). Tento nový druh povlaků vytváří povrch implantátu strukturou velmi podobný pórovité kosti. To umožňuje rychlou biologickou fixaci na rozdíl od tzv. cementovaných implantátů. Kost prorůstá do porézní struktury, což může zvýšit dlouhodobou funkci implantátů. Tento druh povlaků poskytuje vysokou objemovou pórovitost (60 – 80 %), nízký modul pružnosti a mnohdy větší odolnost proti adhezi bakterií. Jedním z nejvyužívanějších prvků pro tvorbu pórovité kovové struktury je tantal (Oh a Pandher 2010).

1.3.2. Tenké vrstvy pro zubní implantáty

U zubních implantátů dochází ke kritickým interakcím na rozhraní mezi povrchem kovu a sousedními měkkými i tvrdými tkáněmi. Povrchová morfologie, energie a chemie povrchu ovlivňují reakce buněk a následnou regeneraci tkání. Přistupuje se proto k různým metodám podporujícím kostní osseointegraci a zároveň hojení okolní tkáně. Na povrch implantátů jsou kovalentně navazovány bioaktivní složky (proteiny, extracelulární matrix, růstové faktory, peptidy, a další) a je sledován jejich vliv na *in vivo* výsledky, osseointegraci i antimikrobiální chování materiálu.

Hojně využívaným materiálem pro povlakování zubních implantátů je titan díky nízkému výskytu traumatu a více jak 90% úspěšnosti implantátu i po 15 let od implantace (Lindquist et al. 1996; Schwartz-Arad et al. 2005). Titan sám o sobě však nevyvolává žádné specifické pozitivní reakce okolní tkáně, které by přispěly k hojení kosti.

Proto je přístupováno k modifikacím drsnosti a hydrofilicity povrchu. Zvyšující se drsnost povrchu ovlivňuje další důležité fyzikálně-chemické vlastnosti. Například zvyšuje povrchovou energii, která má silný dopad na interakci kovu s okolním biologickým systémem (Rupp et al. 2006).

1.3.3. Biosenzory na bázi tenkých vrstev

Princip biosenzorů je založen na adsorpci biologické molekuly, která je následně detekována na citlivém povrchu. Tímto povrchem může být tenký film modifikovaný určitým receptorem. Tenký film působí jako optický, mechanický, magnetický nebo elektrický převodník, který přeměňuje signál rozpoznávaného biologického analytu do jiného měřitelného signálu. Tenké filmy mohou být vyrobeny z organických nebo anorganických materiálů, jako jsou kovy, sklo, polymery, křemík nebo oxidy kovů (Newman a Setford 2006).

Výhodou biosenzorů vyrobených z tenkých vrstev je citlivost, rychlá odezva, snadné použití a nízké náklady. Všechny tyto vlastnosti jsou úzce spjaty s tloušťkami filmů používaných při výrobě snímače. Dnes je zkoumána miniaturizace snímačů z milimetrových rozměrů na nanometry. Biosenzory se vyvíjejí pro různé aplikace (např. pro detekci patogenů, toxinů, DNA či monitorování glukózy) (Li et al. 2010).

1.3.4. Tenké vrstvy jako elektrody v neurovědě

Neurální elektrody jsou základní nástroje, které se běžně používají v klinických aplikacích k léčbě různých neurodegenerativních onemocnění. Některé terapie se zdají být slibnou cestou k obnově funkce neuronů. Jedná se o použití růstových faktorů, kmenových buněk nebo funkční elektrické stimulace. Všechny tyto metody by měly být uskutečnitelné pomocí nervových implantátů. Pracuje se na elektrodách, které by stimulovaly neurony a zaznamenávaly jejich komunikaci, ale tento výzkum je ve velmi raném stádiu (Vincent a Feldman 2002).

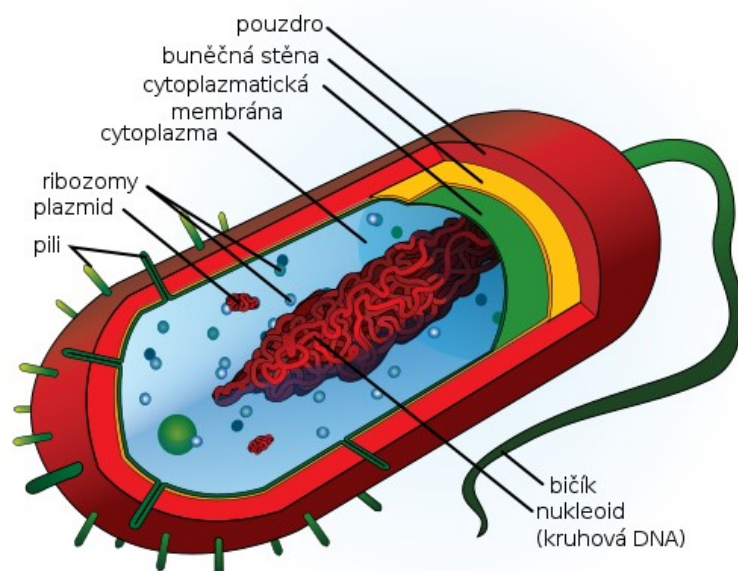
Díky pokrokům v mikrotechnologiích a v oblasti tenkých vrstev je možno dosáhnout vysokého prostorového rozlišení. Často se používají povlakové materiály, jako je nitrid titanu nebo oxid železitý. Tyto povlaky zlepšují elektromechanické vlastnosti a snižují náklady. Rovněž je možné ovlivnit vlastnosti filmu, jako je poréznost, krystalická struktura a drsnost povrchu fólie pomocí regulace parametrů depozice, a tím ovlivnit i vlastnosti nervových implantátů (Tehovnik et al. 2006).

1.4. Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy o rozměrech v řádu mikrometrů, které tvoří jednu ze tří základních domén v systému organismů (společně s archaee a eukaryoty). Bakterie mají několik společných základních charakteristik, avšak dílčí odlišné vlastnosti jim umožňují obývat půdu, vodu, vzduch i lidské tělo (Němec a Matoulková 2015).

1.4.1. Struktura bakteriálních buněk

Prokaryotická buňka je menší a stavebně jednodušší než buňka eukaryotická. Struktura bakteriální buňky je znázorněna na obrázku 1. Buněčné nepravé jádro, tzv. nukleoid, obsahuje jednu molekulu DNA a není ohraničeno jadernou membránou. Buněčná stěna tvoří obal bakterie a je složena především z peptidoglykanů, bílkovin, liposacharidů a fosfolipidů. Cytoplazmatická membrána se skládá z fosfolipidové polopropustné dvouvrstvy a zajišťuje regulaci látek uvnitř buňky. Vodný roztok cytoplazmy obsahuje enzymy, meziprodukty metabolismu i ionty a vyplňuje celou buňku. Hlavní funkcí ribozomů je syntéza bílkovin. Plazmidy jsou cirkulárně uzavřené molekuly DNA. Některé buňky mohou mít další struktury jako kapsulu (pouzdro zvyšující odolnost), bičíky (útvary umožňující pohyb), fimbrie (vlákna umožňující adhezi na povrch) nebo inkluze (zásobní látky pro bakterii) (Sandle 2016).

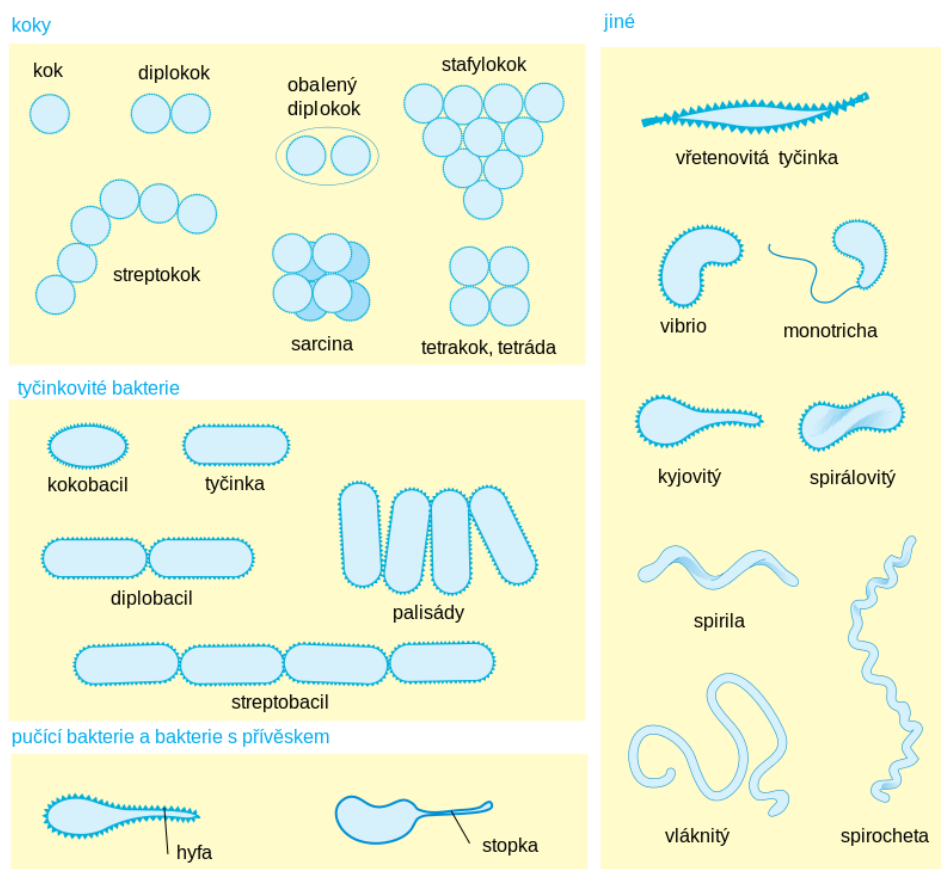


Obrázek 1: Struktura bakteriální buňky (www.wikiskripta.cz 2018).

Některé bakteriální rody mohou v případě zhoršujících se podmínek vytvářet spory. Spora (klidové stádium, ve kterém může bakterie přežít navzdory nepříznivým vnějším podmínkám; je charakterizována nulovým metabolismem) jsou vysoce odolné proti vysychání, účinku chemických látek nebo působení vysokých teplot (Kubišta 2000).

1.4.2. Tvar a uspořádání bakterií

Tvar bakteriální buňky je charakteristickým znakem bakterií. Jaké tvary jsou u bakterií rozlišovány, je znázorněno na obrázku 2. Uspořádání bakterií je určeno v průběhu buněčného dělení, kdy dochází ke spojení více bakterií.



Obrázek 2: Tvary bakterií (www.is.muni.cz 2018).

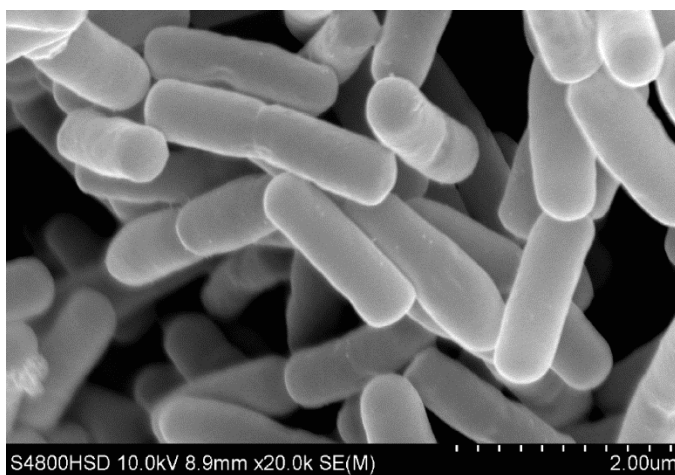
1.4.3. Bakteriální kmeny použité v praktické části

Escherichia coli

Tyčinkovitá bakterie *E. coli* dosahuje délky 2 – 3 μm a šířky 0,6 μm . Jedná se o fakultativně anaerobní bakterii, která pro přísun energie využívá respirační i kvasný metabolismus (Schindler 2009). *E. coli* se pohybuje pomocí bičíků, které jsou složeny z proteinů bohatých na lysin. Dále se na povrchu bakterie nalézají dva typy fimbrií. Fimbrie prvního typu umožňuje bakterii přichytit se na epitel hostitele a následně jej kolonizovat. Druhý typ fimbrií hraje důležitou úlohu při konjugaci (Schindler 2014). Některé druhy jsou schopny tvořit polysacharidové slizovité obaly a při stresových podmínkách polysacharidové kapsule. *E. coli* patří mezi gramnegativní bakterie, jelikož se její buněčná stěna skládá z tenké vrstvy peptidoglykanů (Klaban 2018).

E. coli je součástí střevní mikroflóry teplotokrevných živočichů i lidského organismu. Podílí se na tvorbě vitamínu K a brání vniknutí patogenů. Zároveň však mohou některé kmeny způsobovat onemocnění močových cest či průjmové infekce, jedná se proto o podmíněně patogenní mikroorganismus (Votava 2006).

Tato bakterie je schopná růst v širokém rozmezí teplot od 8 do 48°C a při pH6 – pH8. Optimální teplota je však 37°C, kdy dosahuje generační doba *E. coli* dvaceti minut. *Escherichia coli* slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie (Šilhánková 2008).



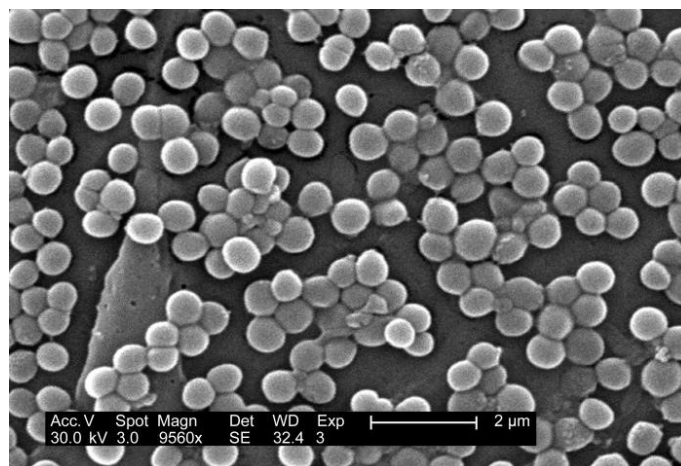
Obrázek 3: Snímek *Escherichia coli* z elektronového mikroskopu (Lv et al. 2014).

Staphylococcus aureus

Bakterie *S. aureus* má kokovitý tvar a dosahuje průměru 0,7 – 0,9 μm. Stafylokoky jsou až na výjimky fakultativně anaerobní nepohyblivé bakterie tvořící páry, řetízky a shluky tvaru hroznů. Buněčná stěna stafylokoků obsahuje peptidoglykan, kyselinu teichoovou a specifický protein, který slouží k adhezi na sliznice a rány. *S. aureus* patří mezi grampozitivní bakterie a netvoří spory (Votava 2006).

S. aureus se vyskytuje běžně jako součást kožní mikroflóry, aniž by způsoboval komplikace. Může však dojít k projevu patogenity tohoto kmene, která vede k mnoha různým onemocněním zahrnující kožní záněty, nekrotizující pneumonie, syndrom toxického šoku i život ohrožující sepsy spojené se selháváním orgánů. Velkým problémem je rezistence bakterie *S. aureus* vůči penicilinu a dalším antimikrobiálním látkám (Sandle 2016).

S. aureus roste v rozsahu teplot od 7 do 48 °C. Optimální teplota je opět 37 °C (Šilhánková 2008).



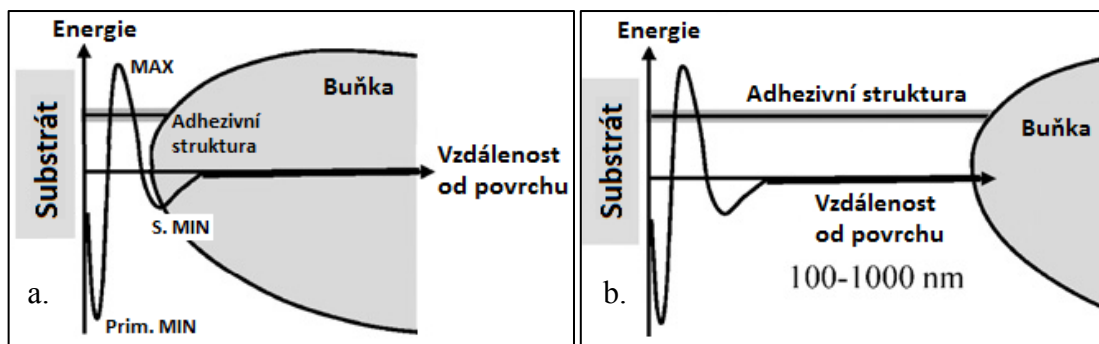
Obrázek 4: Snímek bakterie *Staphylococcus aureus* z elektronového mikroskopu (Vos et al. 2011).

1.5. Adheze bakterií k povrchu

Při interakci bakteriální buňky s povrchem může docházet buď k jednokrokové nebo k dvoukrokové adhezi. Jejich porovnání je znázorněno na obrázku 5.

Při dvoukrokové adhezi se jedná o okamžitou reverzibilní a následně ireverzibilní adhezi. Prvotní fáze je řízena van der Waalsovými přitažlivými silami, elektrostatickými silami a hydrofobní interakcí (Garrido et al. 2014). Systém směřuje k energetickému minimu a velký význam mají fyzikálně-chemické vlastnosti buňky, substrátu i okolního roztoku. Průběh reverzibilní adheze je popisován třemi teoriemi: termodynamickou, DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) a rozšířenou EDLVO teorií (Perni et al. 2014). Ireverzibilní adheze nastává obvykle po několika hodinách, když bakteriální buňka překoná energetickou bariéru a uchytí se na povrch pomocí povrchových struktur buňky. Překonání energetické bariéry lze docílit pomocí aktivního či Brownova pohybu (Bayouduh et al. 2009).

Při jednokrokové adhezi se jedná o okamžitou ireverzibilní adhezi, ke které dochází v případě, že má buňka k dispozici množství specifických adhezních struktur (např. pili). Adheze probíhá na velkou vzdálenost a buňka tak není nijak ovlivněna energetickou bariérou.



Obrázek 5: Porovnání (a.) ireverzibilní fáze dvoukrokové adheze a (b.) jednokrokové adheze (převzato a upraveno (Hori a Matsumoto 2010)).

1.5.1. Fyzikálně-chemické teorie popisující adhezi bakterií

Teorie vycházejí ze snahy všech systémů o dosažení energetického minima a jejich výsledkem jsou energetické křivky znázorňující závislost interakční energie na vzdálenosti buňky od povrchu (Perni et al. 2014).

DLVO teorie

DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) teorie říká, že adhezní energie je sumou van der Waalsových přitažlivých sil a odpuzivých sil elektrické dvojvrstvy (Jan van Oss 2008). Velikost van der Waalsových sil je dána velikostí buňky, vzdáleností od substrátu, povrchovou energií a dielektrickými vlastnostmi. Síly elektrické dvojvrstvy vychází z Coulombových interakcí mezi nabitými molekulami. Velikost elektrické dvojvrstvy je přímo úměrná povrchovému náboji a její energie roste s rostoucím povrchovým potenciálem, teplotou a dielektrickou konstantou roztoku. Vliv náboje na adhezi je ovlivněn pH a iontovou silou (Hermansson 1999).

Předpověď pomocí DLVO není zcela přesná, jelikož tato teorie nezapočítává vliv hydrofobních ani sterických interakcí (Bayoudh et al. 2009)

Termodynamická teorie

Termodynamický přístup vysvětluje zvýšenou adhezi hydrofobních bakterií na hydrofobní povrchy a hydrofilních bakterií na hydrofilní povrchy. Předpověď je založena na bilanci volné energie fázového rozhraní. Termodynamický přístup zahrnuje hydrofobní a hydrofilní interakce avšak obsahuje nedostatečný popis elektrostatických interakcí (Hori a Matsumoto 2010).

EDLVO teorie

Teorie DLVO byla rozšířena na tzv. EDLVO teorii zahrnutím interakce Lewisových kyselin a bází. V závislosti na vlastnostech povrchu vznikají buď přitažlivé hydrofobní interakce, nebo nastává odpuzivý efekt hydratace. Vliv těchto interakcí se nemusí vždy projevit, kvůli povrchovým útvarům bakterie, díky kterým se nemusí dostatečně přiblížit k povrchu (Bayoudh et al. 2009).

Předpověď adheze pomocí EDLVO je zatím nejpřesnější, ale může být zkruslena například proudem kapaliny či hrubostí povrchu. Díky teoriím popisujícím bakteriální adhezi je možné měnit parametry tak, aby adhezi buněk pozastavily či naopak urychlily (Jan van Oss 2008).

1.5.2. Faktory ovlivňující adhezi bakterií

Bakalářská práce, na kterou tato diplomová práce navazuje, pojednává o vlivu topografie a hydrofobicity povrchu na adhezi bakterií. Dále zmiňuje environmentální faktory ovlivňující vznik a růst biofilmu jako je teplota, pH a množství kyslíku (Coufalová 2016; Bakalova et al. 2016b). Zde bude teorie rozšířena o vliv povrchového náboje bakterií a vliv energie povrchu na adhezi buňky.

Vliv povrchového náboje bakterií

Adheze mikroorganismů k pevným povrchům má spojitost s povrchovým nábojem buněk. Povrchový náboj bakterií pochází z ionizace karboxylových a fosfátových skupin a z adsorpce iontů z roztoku. Kromě toho přispívají k celkovému náboji i další makromolekuly, které jsou přítomné v buněčné stěně a membránách, například: proteiny, fosfolipidy, kyselina teichová, kyselina teichuronová a lipopolysacharidy (Poortinga et al. 2002).

Elektrické vlastnosti bakteriálních buněk mohou být charakterizovány zeta potenciálem, který působí na rozhraní mezi povrchem částice a okolní kapalinou v koloidním systému. Určení zeta potenciálu patří k nejjednodušším a nejpřímějším metodám pro charakterizování náboje na povrchu částice. Obecně lze říci, že gramnegativní bakterie mají nižší zeta potenciál než bakterie grampozitivní. Například gramnegativnímu bakteriálnímu kmeni *Escherichia coli* odpovídá zeta potenciál -49 mV, kdežto grampozitivnímu kmeni *Staphylococcus aureus* odpovídá -31,7 mV (Kłodzińska et al. 2010).

Vliv povrchové energie na bakteriální adhezi

V mnoha studiích byla zkoumána adheze bakterií k povrchům s různou povrchovou energií. Některé výzkumy ukázaly, že adheze bakterií klesá s klesající povrchovou energií substrátu. Existuje však i řada článků s protichůdnými výsledky, kdy se bakteriální adheze snížila se zvyšující se povrchovou energií substrátu. Vyplývá tedy, že adheze bakterií se může jak snížit, tak i zvýšit se zvyšující se povrchovou energií substrátu v závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech bakterií, substrátu i roztoku (Bakker et al. 2003; Liu a Zhao 2005).

1.6. Úpravy regulující adhezi na povrch

Antibakteriální povrchy jsou často založeny na přítomnosti molekuly, která způsobuje smrt bakterií. Pokud je však taková úprava využívána na implantáty určené pro implantaci do lidského těla, bývá často spojena s rizikem poškození tkání pacienta. Pro některé aplikace je proto velmi nežádoucí už pouhé uchycení bakterií na povrchu. V takovém případě se přistupuje k antiadhezivním úpravám daných materiálů.

1.6.1. Potažení polymerem

Mezi často využívané metody patří pokrytí povrchu antiadhezivním polymerem, který je elektroneutrální a zároveň hydrofilní. Dochází k hydrataci polymeru a energetická náročnost vyvázání molekuly vody následně brání adhezi proteinů, a tím i navázání bakterií. Některé bakterie však proteiny k adhezi nevyužívají. Například grampozitivní *Staphylococcus epidermidis* adhezuje prostřednictvím polysacharidů a extracelulární DNA, které pronikají i do vrstvy polymeru (Zeng et al. 2015).

1.6.2. Změna topografie povrchu

Vhodný hydrofobní povrch lze vytvořit změnou topografie povrchu. Tzv. efekt lotosového květu spočívá ve vytvoření dvoustupňové hrubosti. Na povrchu jsou vytvořena zrna o velikosti 10–20 μm na nichž je vytvořen druhý stupeň nerovnosti o velikosti menší než 200 nm. Takto vytvořený povrch získává velký kontaktní úhel, čímž se stává superhydrofobním. Bylo však zjištěno, že tento povrch selektivně snižuje adhezi tyčinkovitých bakterií, ale neovlivňuje adhezi bakterií kokovitých (Fadeeva et al. 2011).

1.6.3. Nanesení vrstvy metodou sol-gel

Metoda sol-gel je založena na přípravě koloidní suspenze (solu), která je převedena na viskózní gel a následně na pevný materiál. Sol-gel metody jsou používány pro přípravu anorganických oxidických materiálů a syntézu organicko-anorganických kompozitních materiálů, které nelze získat jinými metodami (Pierre 2013).

Antiadhezivní úpravou může být nanos hydrofobní vrstvy metodou sol-gel. Přidáním nanočástic (např. stříbrných, měďných apod.), získává superhydrofobní povrch také antibakteriální vlastnosti. V neutrálním pH je tento povrch stabilní, ale v silně kyselém či zásaditém prostředí má omezenou živostnost v řádu týdnů. (Heinonen et al. 2014).

1.6.4. Úprava povrchu plazmatem

Plazma jsou molekuly ionizovaného plynu v různém stupni ionizace. Plazma lze vytvořit elektromagneticky, mikrovlnami i teplotně a dle způsobu vzniku má pak různé vlastnosti. U nízkotlakého výboje se pracuje ve vakuu a volbou dalších podmínek lze modifikovat povrch materiálu (např. zvýšit či snížit jeho smáčivost, čistit, sterilizovat, či modifikovat povrch před dalšími úpravami). Ošetření plazmatem způsobí vznik reaktivních skupin na povrchu. Argonové či heliové plazma vytváří volné radikály, plazma kyslíkové vytvoří skupiny OH^- , ROO^- , CO^- , COO^- , plazma z dusíku či amoniaku zase skupinu NH_2^- . Tímto způsobem lze modifikovat kovy, slitiny, plasty a umělá i přírodní vlákna (Kugel et al. 2011; Heinonen et al. 2014).

1.6.5. Fotolitografie








Vytvoření antiadhezního povrchu může být dosaženo také pomocí litografického nanášení substrátu na podklad. Metodu, kdy je na povrch nanášen fotoaktivní polymer (fotorezist), nazýváme fotolitografií. Po ozáření přes masku je polymer odstraněn a vzniká negativní obraz použité masky. Hydrofobního chování se obvykle dosahuje speciální strukturou na povrchu, změnou povrchové energie, zvýšením hrubosti povrchu, polarizací vazeb na povrchu, nebo přímo změnou těchto vazeb (Bhushan et al. 2009; Roach et al. 2008). Vzorok je možné terminovat kyslíkem nebo vodíkem pro dosažení rozdílných výsledků. Bylo například pozorováno chování osteoblastů a kmenových buněk při kontaktu s povrchem upraveným kyslíkovou a vodíkovou terminací. Ukázalo se, že kyslíková terminace je pro adhezi buňkami značně upřednostňována oproti terminaci vodíkové (Brož 2017; Rezek et al. 2009).

2. MATERIÁLY A METODY

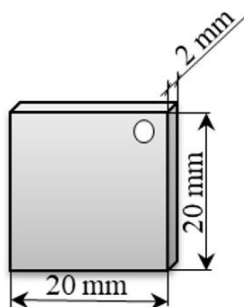
2.1. Popis studovaných vzorků

V rámci této diplomové práce bylo testováno sedm vzorků. Tři vzorky karbonitrid titanových tenkých vrstev a tři vzorky tenkých vrstev karbonitrid chromových nadeponovaných na nerezové oceli ČSN 10088-1 1.4404. Pro porovnání byl testován také vzorek samotné nerezové oceli stejného typu. Vlastnosti nerezové oceli ČSN 10088-1 1.4404 jsou popsány v kapitole 1.2.2. *Nerezová ocel (str. 17)*. Vzhled vzorků a jejich značení je zaznamenáno v tabulce 2.

Tabulka 2: Vzhled jednotlivých vzorků.

Nerezová ocel ČSN 10088-1 1.4404	Ocel		
			
Karbonitrid titanové vrstvy TiCN	TiCN-1	TiCN-2	TiCN-3
			
Karbonitrid chromové vrstvy CrCN	CrCN-1	CrCN-2	CrCN-3
			

Rozměry vzorků jsou uvedeny v náčrtu na obrázku 6.



Obrázek 6: Rozměr vzorků.

Příprava substrátu

Jako substrát pro depozici tenkých vrstev karbonitrid titanu (TiCN) a karbonitrid chromu (CrCN) byla zvolena nerezová ocel ČSN 10088-1 1.4404. Vzorky byly nejprve leštěny pomocí přístroje METASERV 3000 za využití papíru o hrubosti 1200. Následně byl vzorek leštěn na semišovém plátně pomocí diamantové pasty s částicemi o velikosti 3 μm . Po ukončení procesu leštění byly vzorky nerezové oceli ošetřeny lihem.

Depozice vrstev

Samotná depozice proběhla za použití metody PVD napařování elektrickým obloukem (Cathodic Arc Plasma Deposition). Celkem bylo připraveno osm vzorků s tenkou vrstvou TiCN a osm vzorků s tenkou vrstvou CrCN. Vrstvy byly nanášeny při různém poměru plynů, napětí, proudu i času depozice (Petkov et al. 2018). Pro účely této diplomové práce byly vybrány tři vzorky TiCN a tři vzorky CrCN, které byly nanášeny při stejné hodnotě napětí -40 V a proudu 85 A. Doba depozice byla u všech šesti zvolených vrstev 120 minut. Jedinými proměnnými parametry tedy zůstaly poměr plynů a tlak v komoře, které jsou uvedeny v tabulce 3. Vliv depozice na vlastnosti spojené s buněčnou interakcí byly předmětem zkoumání v práci (Coufalová 2016; Bakalova et al. 2016a), na které tato diplomová práce navazuje a právě na základě výsledků zmíněných prací, byly zvoleny vzorky s následujícími parametry depozice.

Tabulka 3: Parametry depozice jednotlivých vrstev.

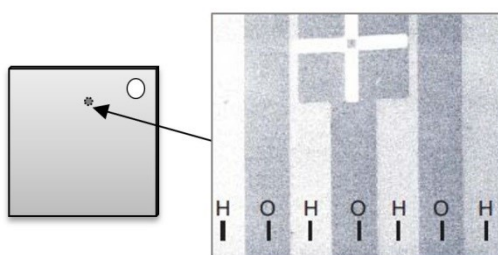
	Vzorek					
	TiCN-1	TiCN -2	TiCN -3	CrCN-1	CrCN -2	CrCN -3
Průtok C₂H₂ [%]	5,8	11,1	17,7	5,8	11,1	17,7
Průtok N₂ [%]	94,2	88,9	82,3	94,2	88,9	82,3
Tlak v komoře p [Pa]	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	1,5

2.2. Modifikace vzorků

Na základě literární rešerše byly zvoleny čtyři různé modifikace zkoumaných povrchů, které by měly zajistit antiadhezivní chování vzhledem k bakteriální populaci. Vzorky byly modifikovány pomocí sol-gelu, kyslíkového a argonového plazmatu a metodou fotolitografie. Před každou z modifikací byly vzorky očištěny acetonem a vystaveny teplotě 120 °C po dobu 30 minut pomocí přístroje Venticell (BMT Medical Technology) za účelem zbavení vzorků organických i anorganických nečistot.

Fotolitografie

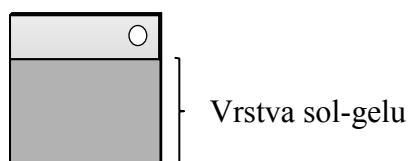
Pro docílení antiadhezivního povrchu byla zvolena fotolitografie. Tato modifikace byla provedena na Fyzikálním ústavu Akademie věd v Praze. Pomocí pozitivního foto-rezistu P1215 (micro resist technology GmbH, Německo) byly na povrchu vzorků vytvořeny mikroskopické vzory o šířce 60 μm. V horní části vzorku byl vytvořen křížek tenkou vrstvou zlata sloužící jako značka pro rozlišení uspořádání proužků. Vzorky byly terminovány vodíkem po dobu 30 minut v komoře při teplotě 360 °C a tlaku 30 mbar. Poté byly vrstvy s fotolitografickou maskou o velikosti 20x20 mm (velikost vzorku) ošetřeny ve vysokofrekvenční kyslíkové plazmě (s výkonem 300 W, po dobu 10 minut). Obrázek 7 zobrazuje ilustrační snímek z elektronového mikroskopu SEM při použití stejné metody na vrstvě nanokrystalického diamantu s 200 μm širokými proužky (v našem případě 60 μm) zakončenými střídavě vodíkem a kyslíkem. Světlé proužky odpovídají vodíkovému povrchu díky jeho nízké elektronové afinitě. Křížek v horní části obrázku je tvořen tenkou vrstvou zlata a slouží jako značka pro rozlišení uspořádání proužků.



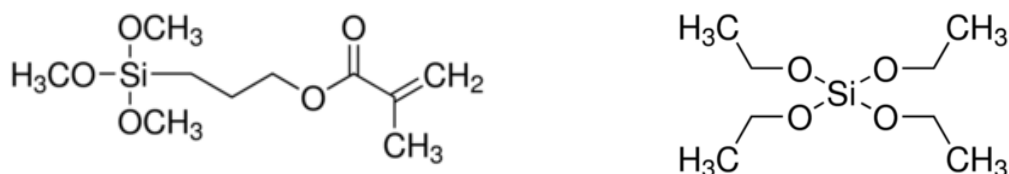
Obrázek 7: Schéma a ilustrační snímek z elektronového mikroskopu SEM při použití stejné metody (převzato a upraveno z (Rezek et al. 2011)).

Sol-gel

Sol-gel s označením AD30 byl na vzorky nanesen metodou zvanou dip-coating. Sol AD30 je výchozí sol pro přípravu nanovrstev na bázi 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu a tetraethoxysilanu (obrázek 9) a je modifikován vázanými kationty stříbra, mědi a zinku (po 2 hm. % na výslednou hmotnost vrstvy). Sol byl připraven metodou sol-gel v izopropylalkoholu za kyselé katalýzy HNO_3 pro polykondenzaci křemičité sítě a dibenzoylperoxidu pro polymeraci methakrylátové sítě. Vzorek byl připevněn ke spouštěcímu zařízení (cca 3 mm od okraje). Pomocí tohoto zařízení byly 3/4 vzorku ponořeny do sol-gelu (obrázek 8) a po 30 vteřinách byl vzorek vytažen konstantní rychlostí 6 cm/min. Vzorky byly ponechány třicet minut při laboratorní teplotě. Následně byly umístěny na dvě hodiny do pece vytemperované na 150 °C pro zajištění termální fixace sol-gelu. Předpokládaná tloušťka konečné organicko-anorganické nanovrstvy je 80 až 150 nm. Složení solu je chráněno patenty CZ 303 250, CZ 303 861, WO 2013174356 a EP 2852630 (Šlamborová et al. 2013).



Obrázek 8: Náčrt plochy vzorku pokryté sol-gelem.



Obrázek 9: Chemické vzorce hlavních složek použitého sol-gelu 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu a tetraethoxysilanu.

Plazma

Byly zvoleny dva druhy úpravy pomocí plazmatu. První modifikace byla provedena v argonovém plazmatu, které mění morfologii odleptáváním povrchu upravovaného vzorku v řádech nanometrů. Argon patří mezi inertní neboli netečné plyny, nedochází tedy v průběhu modifikace k žádnému navazování skupin na povrch vzorku. Jako další modifikace bylo zvoleno plazma kyslíkové. Pokud plazma obsahuje reaktivní plyny,

jako je například právě kyslík, jsou částice tohoto plynu schopny reagovat s povrchem substrátu, a tím dají vzniknout novým funkčním skupinám (Matějček 2016). Vzorky byly plazmatu vystaveny v depoziční komoře typu RF PACVD/MS (Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition Magnetron Sputtering). Parametry leptání byly totožné pro oba druhy plazmatu. Průtok plynů 10 sccm, tlak v komoře 4 Pa, napětí U_B bylo nastaveno na -900 V a vzorky byly leptány po dobu 10 minut.

2.3. Měření fyzikálně-chemických parametrů vrstev

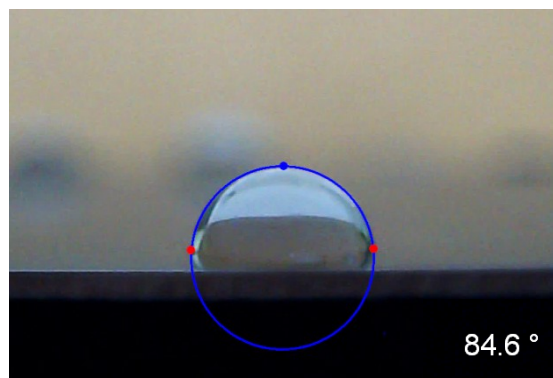
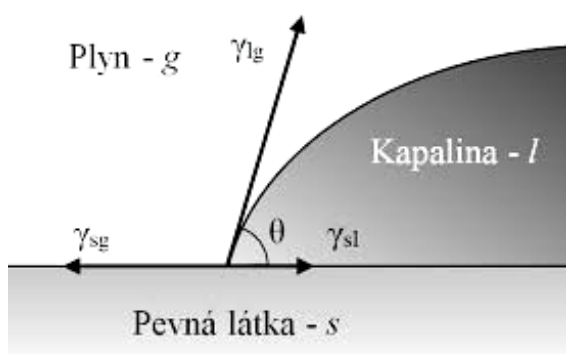
Povrchová energie

Test smáčivosti byl proveden pomocí přístroje Surface Energy Evaluation System (See System). Na každý vzorek byla aplikována kapka destilované vody o objemu 3,5 μl . Tvar kapky závisí na hodnotách tří mezifázových energií: mezifázové energii mezi pevnou látkou a kapalinou γ_{SL} , mezifázové energii mezi pevnou látkou a plynnou fází γ_{SG} a mezifázové energii mezi kapalnou a plynnou fází γ_{LG} (obrázek 10). Ustaví se rovnováha a kapka zaujme tvar charakterizovaný určitým kontaktním úhlem smáčení θ . Vztah mezi úhlem smáčení θ a jednotlivými mezifázovými energiemi je dán Youngovou rovnicí.

Youngova rovnice (Giridhar et al. 2017):

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SG} - \gamma_{LG} \cdot \cos \theta$$

Pomocí kamery byla kapka po kontaktu s povrchem vyfotografována (obrázek 11). Po označení tří bodů na snímku, byl vyhodnocen kontaktní úhel. Průměrný kontaktní úhel byl vypočítáván z deseti měření na každém vzorku (viz. str. 48).



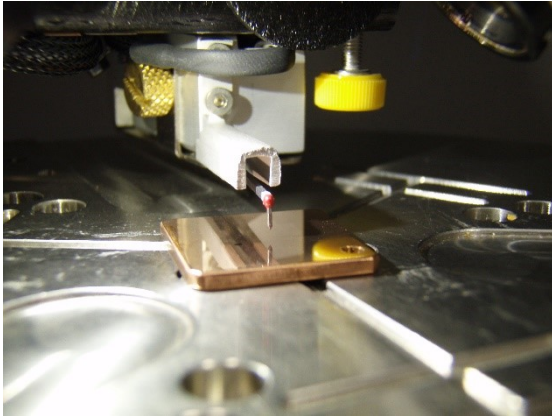
Obrázek 10: Síly působící na kapku kapaliny umístěné na pevný povrch (Žižková 2016).

Obrázek 11: Fotografie kapky. Stanovení úhlu smáčivosti pomocí tří bodů.

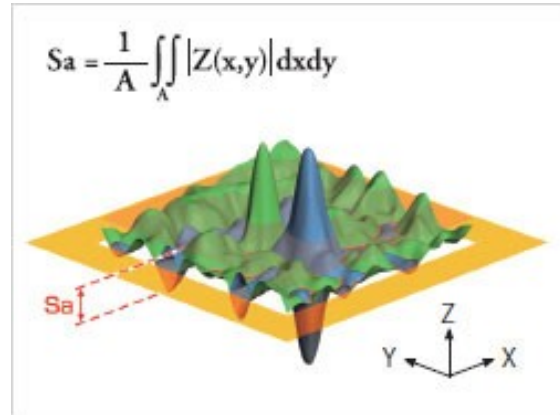
Drsnost povrchu

Průměrná drsnost povrchu S_a (obrázek 13) byla vyhodnocena dle normy ISO 25178 pomocí mechanického profilometru DektakXT™ (obrázek 12). Hrot s rádiem zaokrouhlení 2 μm byl tažen rychlostí 100 $\mu\text{m/s}$ po povrchu vzorku s přítláčnou silou 10 mg.

Byla skenována plocha 600 x 600 μm. Naměřená data byla následně zpracována v softwaru Vision 64.

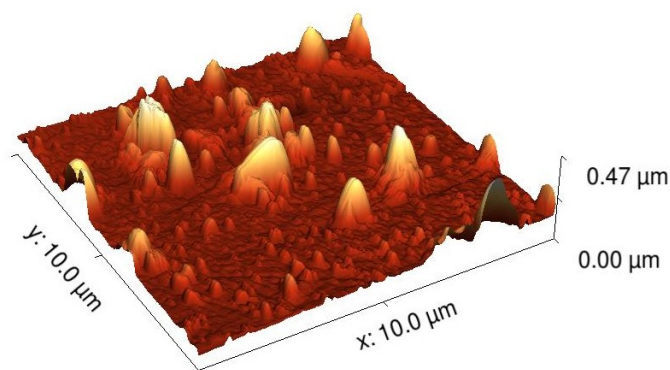


Obrázek 12: Hrot profilometru umístěný nad vzorkem.



Obrázek 13: Princip výpočtu hodnoty průměrné drsnosti S_a (OLYMPUS, 2017).

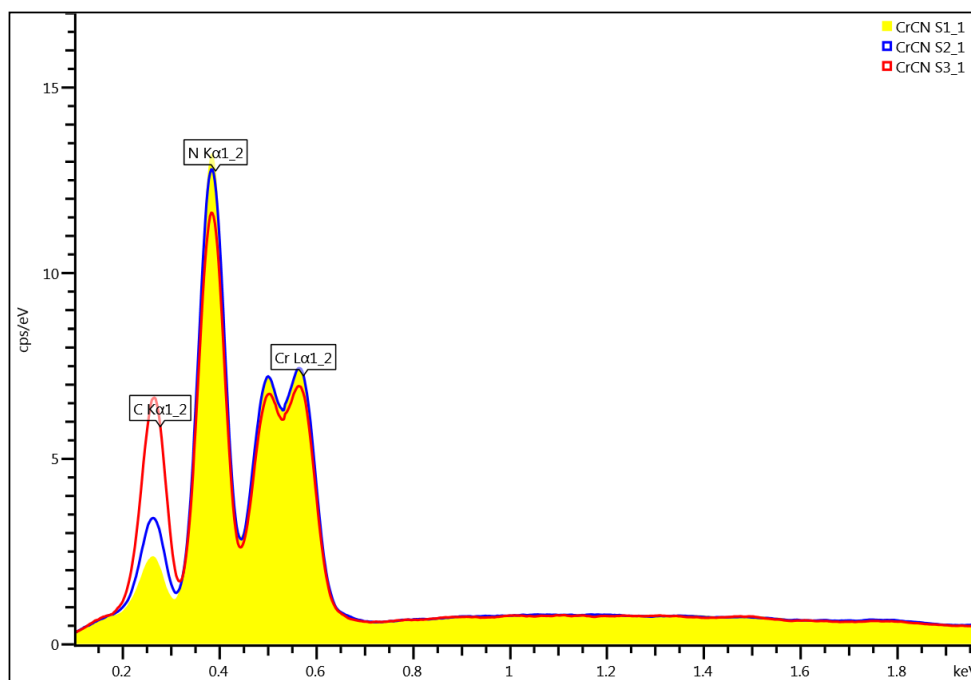
Poloměr zaokrouhlení hrotu u mechanického profilometru byl nedostačující pro registraci menších nerovností, proto pro kvalitnější vyhodnocení drsnosti povrchu byla zvolena přesnější metoda s rozlišením v řádu nanometrů. Jedná se o mikroskopii atomárních sil, při které byl využit přístroj JPK Nanowizard 3 a naměřená data byla následně zpracována v softwaru Gwyddion 2.40. Zvolen byl tzv. kontaktní režim. Na naskenování plochy 10 x 10 μm v rozlišení 512 x 512 pixelů byl zvolen cantilever značky Silicon SPM sensor o tloušťce hrotu 10 nm. Vyhodnocení plošné drsnosti je uvedeno v grafu na straně 49. Na obrázku 14 je ukázka 3D profilu vzorku CrCN-1 před modifikací. Profily ostatních vzorků jsou zařazeny v příloze této práce.



Obrázek 14: 3D profil povrchu vzorku CrCN-1 získaný pomocí metody AFM.

Chemické složení povrchu

Chemického složení povrchu bylo stanoveno pomocí analýzy EDS (Energiově Disperzní Spektroskopie) Oxford X-Max 20, která je součástí rastrovacího elektronového mikroskopu Carl Zeiss ULTRA. Při studiu tenkých vrstev bylo použito napětí 7 kV, při studiu vzorku samostatné oceli bez nanesené tenké vrstvy bylo napětí navýšeno na 15 kV. Livetime byl zvolen 50 s a pracovní vzdálenost 8,5 mm. Akvizice spekter byla prováděna z plochy cca 12 x 9 μm na třech náhodných místech u každého ze vzorků. Obsahy jednotlivých prvků v atomárních procentech jsou uvedeny v tabulkách 6 – 8 (str. 51). Obrázek 15 je příkladem výstupních dat z Energiově Disperzní Spektroskopie. Na obrázku jsou (zleva) viditelné píky pro uhlík, dusík a chrom pro jednotlivé vzorky před modifikací. Žlutá plocha značí vzorek CrCN-1, modrá křivka náleží vzorku CrCN-2 a červená vzorku CrCN-3.



Obrázek 15: Příklad výstupních dat z Energiově Disperzní Spektroskopie.

2.4. Měření bakteriální interakce s tenkými vrstvami

Výběr testovaných mikroorganismů

Na základě literární rešerše, která předpokládá rozdílné chování gramnegativních (G^-) a grampozitivních (G^+) bakterií k povrchu materiálu v důsledku rozdílného zeta potenciálu, bylo snahou zvolit jeden gramnegativní a jeden grampozitivní kmen takový, aby se navzájem lišily i dalšími vlastnostmi, např. tvarem. Zároveň byly hledány kmeny běžně atakující lidský organismus. Jako gramnegativní zástupce byla zvolena bakterie *Escherichia coli*, která je tyčinkovitého tvaru a jako druhý testovaný kmen byl zvolen *Staphylococcus aureus* kokovitého tvaru. Oba tyto kmeny jsou v hojné míře využívány jako modelové organismy právě pro biologické testy v medicíně i biotechnologiích (Du et al. 2007).

Sterilizace použitého materiálu

Během zvolených testů mikrobiologické interakce byly využívány různé druhy skleněného laboratorního nádobí (skleněné lahve s uzávěrem (fisherbrand), kádinky, zkumavky) a kovové pinzety. Tyto pomůcky byly před testy sterilizovány při teplotě 170 °C po dobu dvou hodin pomocí sterilizátoru Venticell (BMT Medical Technology). Dále bylo při testech využito mnoho jednorázových plastových pomůcek, jako jsou centrifugační zkumavky, špičky a Petriho misky, které jsou sterilizovány již u výrobce.

Testované vzorky byly očištěny navlhčenou buničinou v acetonu a sterilizovány pomocí Venticell (BMT Medical Technology) při teplotě 120 °C po dobu 30 minut.

Příprava bakteriálního inokula

Bakterie *Escherichia coli* (označení kmene CCM č. 3954) byla z pevného živného média naočkována pomocí plamenem opálené mikrobiologické kličky do kádinky s fyziologickým roztokem. Naočkování probíhá pomocí roztírání buněčné kultury o stěnu kádinky. Následně byl pomocí spektrofotometru kontrolován zákal pro určení koncentrace bakterií v připravovaném roztoku. Roztok byl naředěn fyziologickým roztokem na požadovanou koncentraci 10^7 CFU/ml.

Postup při přípravě inokula bakterie *Staphylococcus aureus* (označení kmene CCM č. 3953) byl totožný. Pouze byl do fyziologického roztoku navíc přidán Bovin Serum Albumin v množství 0,15 g na 100 ml.

Kultivační stanovení počtu životaschopných buněk

Pro stanovení množství bakterií, které se za jednu hodinu kontaktu vzorku s bakteriální suspenzí přichytí na povrch daného vzorku, byla zvolena metoda kultivace mikroorganismů a následného počítání kolonií vyrostlých na agarových plotnách. Metoda vychází z empiricky ověřeného předpokladu, že z jedné životaschopné buňky (buňka musí být také schopna se množit) vyrůstá 1 kolonie.

Do sterilních skleněných lahví o objemu 100 ml s uzávěrem bylo pipetou Eppendorf pipetováno 10 ml bakteriální suspenze a do každé byl následně vložen jeden ze vzorků, a to tak, aby celý objem vzorku byl ponořen v kapalině. Bakterie byly ponechány v kontaktu s povrchem 60 minut při teplotě 37 °C v inkubátoru Incucell BMT Medical Technology. Vzorek byl následně vyndán sterilní pinzetou z bakteriální suspenze, opláchnut 2 ml fyziologického roztoku z každé strany a vložen do plastové centrifugační zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml s 15 ml fyziologického roztoku. Zkumavky se vzorky byly vloženy na třepačku Heidolph unimax X1010 a třepány 30 minut při 250 otáčkách za minutu. Bylo použito desítkové ředění do třetího řádu, které slouží k dosažení počítatelného množství bakteriálních kolonií. Za počítatelné množství se obecně považuje počet do 300 kolonií na jedné petriho misce. Zároveň byl odebírán 1 ml z každého ředění do Petriho misky. Následně byl tento objem inokula zalit potřebným množstvím vytemperovaného agaru (max. na 42 °C) a obsah misky byl důkladně promíchán krouživými pohyby. Po ztuhnutí byly misky uloženy k inkubaci po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C (inkubátor Incucell BMT Medical Technology). Po uplynutí této doby byl vyhodnocen počet kolonií (grafy 5 a 6, str. 55 a 57). Celé měření bylo provedeno v triplikátu.

Ověření postupu „vytřepání bakterií z povrchu“

Bakterie byly počítány ze suspenze fyziologického roztoku, do které byl vzorek 30 minut vytřepáván při 250 otáčkách za minutu. Bylo tedy nutné ověřit, že při takto zvolených podmínkách byly do fyziologického roztoku vytřepány všechny mikroorganismy a žádné z nich (nebo jen minimální množství) nezůstaly i po vytřepání uchyceny na povrchu vzorku, což by velmi zkreslilo výsledky. Hodnocení povrchu bylo provedeno pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu Carl Zeiss ULTRA Plus za využití sekundárních elektronů. Bylo zvoleno zvětšení 10 000x a napětí 2 kV pro vzorek s bakteriemi a 7,5 kV pro vzorek bez bakterií.

2.5. Měření cytotoxicity vzorků

Cytotoxicita studovaných vzorků byla měřena pomocí testu, který je založen na redukci žluté tetrazoliové soli MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid) na formazan, který má formu fialových krystalků. Tato reakce probíhá na mitochondriální membráně vlivem mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk. Počet živých buněk odpovídá množství redukovaného MTT.

Vzorky byly před zahájením testů sterilizovány při 120 °C po dobu jedné hodiny. Eluát byl ze vzorků vyluhován po dobu 24 h v 6-jamkovém valu, každý vzorek ve 3,5 ml media. Testy probíhaly in vitro na modelové buněčné linii myších fibroblastů 3T3 při počtu zhruba 40 tisíc buněk na jednu jamku při 50% proliferaci. Eluát byl rozdělen po 1 ml do 24-jamkového valu spolu s buněčnou, negativní, pozitivní a médiovou kontrolou. Do každé jamky bylo přidáno 320 µl MTT a následně byly jamky inkubovány při 37 °C po dobu dvou hodin. Po této době bylo MTT z jamek odsáto a přidáno 640 µl isopropylalkoholu. Jamky byly následně na 10 minut umístěny na třepačku, kde se formazanové krystalky působením isopropylalkoholu rozpustily a následně se spektrofotometricky stanovila hodnota absorbance roztoku. Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 570 a 650 nm. Výsledná absorbance byla získána jako rozdíl absorbancí při 570 a 650 nm a procentuálně porovnána s buněčnou kontrolou. Výsledky jsou uvedeny ve formě grafu (graf 7, str. 59).

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole jsou vyhodnoceny a diskutovány výsledky jednotlivých měření, která vždy probíhala na vzorcích bez modifikace a následně na vzorcích, které prošly úpravami popsány v kapitole 2.2. *Modifikace vzorku*. Z fyzikálně-chemických vlastností byla sledována povrchová energie, drsnost a chemické složení povrchu. Následně byly provedeny testy mikrobiální interakce s povrchem, a to s gramnegativním kmenem bakterií *Escherichia coli* a grampozitivním kmenem bakterií *Staphylococcus aureus*. Na závěr byly provedeny testy cytotoxicity na modelové buněčné linii myších fibroblastů 3T3.

Všechna měření probíhala vždy minimálně v triplicátu. Pro lepší přehlednost jsou v tabulkách uváděny pouze průměry naměřených hodnot a směrodatná odchylka výsledků je znázorněna v grafech chybovou úsečkou. Směrodatná odchylka byla počítána dle vztahu:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$$

kde x jsou naměřené hodnoty, \bar{x} jejich aritmetický průměr a n počet měření.

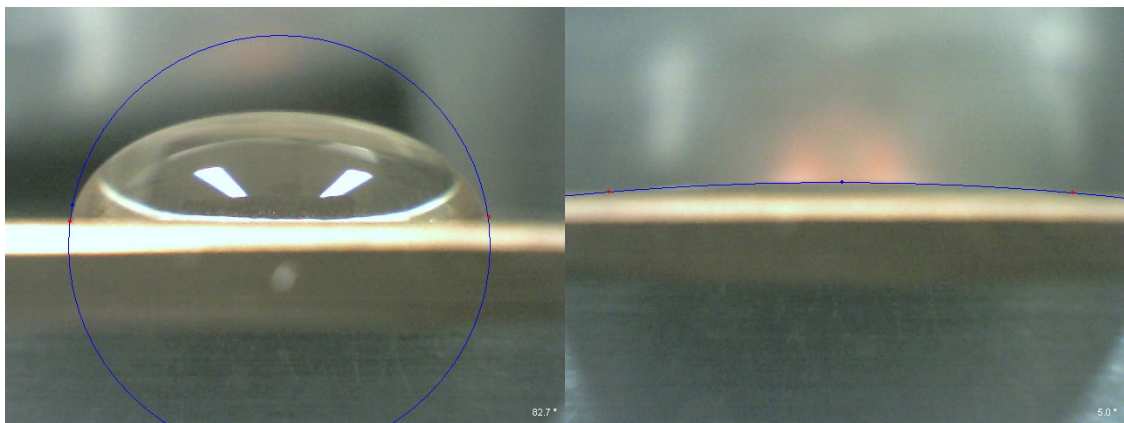
V práci je zvoleno také vyjádření výsledků pomocí grafů pro lepší znázornění rozdílu mezi jednotlivými modifikacemi. Tabulky s konkrétními hodnotami jsou součástí přílohy. V tabulce 4 je zaznačeno zkrácené označování jednotlivých modifikací a jejich barevné vyjádření v grafech.

Tabulka 4: Zkrácené označování jednotlivých modifikací a barevné zastoupení v grafech

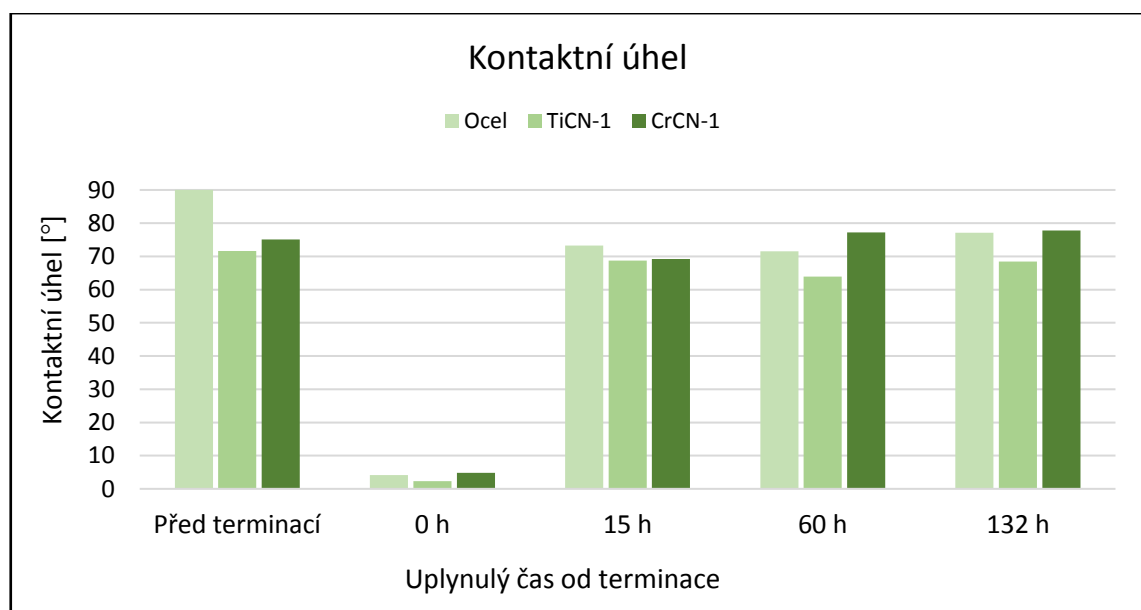
	Zkratka	Barva
Vzorek před modifikací	Před modifikací	šedá
Modifikace fotolitografií	Fotolitografie	zelená
Modifikace sol-gelem	Sol-gel	hnědá
Modifikace argonovým plazmatem	Plazma Ar	žlutá
Modifikace kyslíkovým plazmatem	Plazma O ₂	modrá

3.1. Fotolitografická modifikace

Fotolitografická úprava byla prováděna na Fyzikálním ústavu Akademie věd v Praze. Hydrogenace a následná terminace vodíkem byla provedena na vzorcích TiCN-1, CrCN-1 a oceli. Byl měřen kontaktní úhel vody před modifikací, ihned po modifikaci a poté v časech 15, 60 a 132 h. Ihned po modifikaci vykazovala terminace silně hydrofilizující účinek (obrázek 16). Avšak již po 15 hodinách se navracely původní vlastnosti povrchu vzorku. Naměřené kontaktní úhly ve stanovených časech jsou uvedeny v grafu 1.



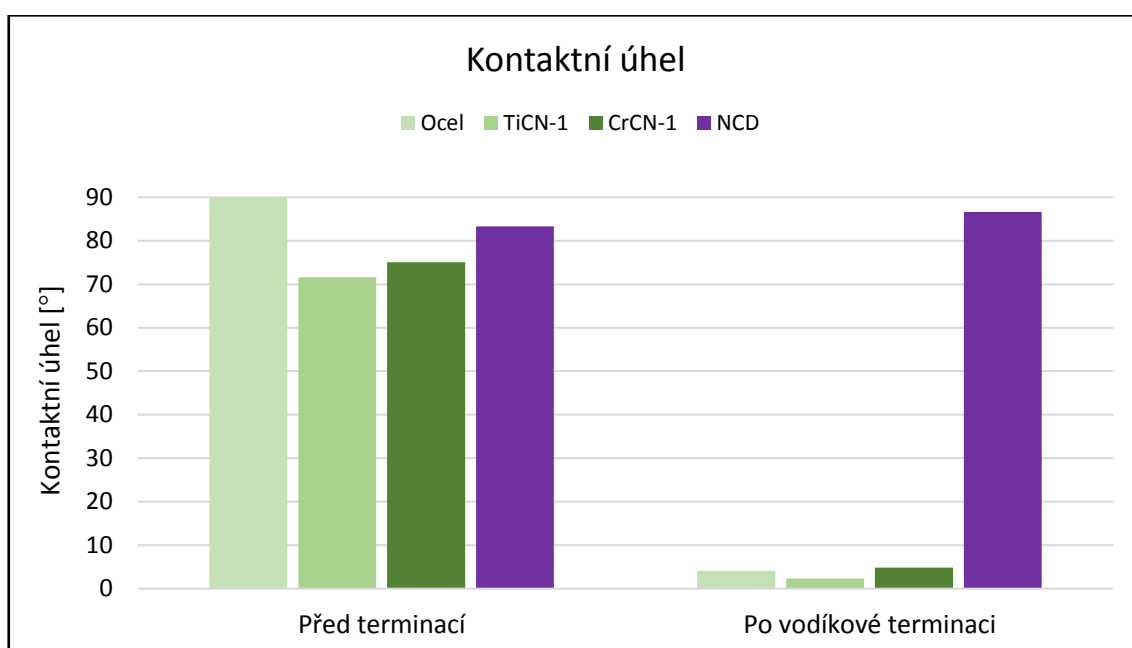
Obrázek 16: Měření kontaktního úhlu před modifikací a ihned po kyslíkové terminaci (vzorek TiCN-1).



Graf 1: Naměřený kontaktní úhel před modifikací a v určitých časech po kyslíkové terminaci.

Z důvodu krátkodobého účinku této modifikace v řádu hodin, nebylo možné provést následná měření (na TUL) tak, aby výsledky odrážely účinek modifikace.

Pro možnost porovnání naměřených dat s literaturou uváděnými výsledky fotolitografické modifikace na tenkých vrstvách diamantu (Rezek et al. 2011), byl zároveň se vzorky oceli, TiCN-1 a CrCN-1 modifikován i vzorek nanokrystalického diamantu (NCD). Porovnání naměřených kontaktních úhlů ihned po vodíkové terminaci ukazuje, že vytvoření hydrofilních kyslíkově terminovaných a hydrofobních vodíkem terminovaných pásků by nebylo možné. Po modifikaci vodíkem, prokazovaly vrstvy TiCN a CrCN hydrofilní chování na rozdíl od vzorků NCD (graf 2).



Graf 2: Naměřený kontaktní úhel vody před a po vodíkové terminaci.

3.2. Modifikace metodou sol-gel

Z důvodu nedostatečné odolnosti byla z měření vyřazena i modifikace sol-gelem. Po testech bakteriální interakce, kdy byly vzorky v kontaktu s bakteriální suspenzí po dobu jedné hodiny, následně vytřepávány do fyziologického roztoku a mechanicky očištěny buničinou namočenou v acetonu, byla vrstva sol-gelu viditelně poškozena (obrázek 17). Jelikož literatura dokládá vysokou odolnost těchto hybridních vrstev proti otěru a to až 150 cyklů při zatížení 650 g, je možné, že vzorky byly před nánosem sol-gelu špatně očištěny či odmaštěny a proto nedošlo ke správnému přilnutí vrstvy sol-gel na povrch vzorků. Jiným vysvětlením by mohlo být, že vrstva převážně složená z 3-(trimethoxysilyl) propylmethakrylátu a tetraethoxysilanu je částečně rozpustná v některé z kapalin, se kterou přišla během mikrobiálních testů do styku (aceton, fyziologický roztok). Literatura však uvádí, že hybridní vrstvy 3-(trimethoxysilyl) propylmethakrylátu a tetraethoxysilanu jsou odolné vůči acetonu (Šlamborová et al. 2013). Vrstva není rozpustná ve vodě, neměla by tedy být pravděpodobně narušena ani působením fyziologického roztoku (0,9% vodný roztok NaCl).



Obrázek 17: Vrstva sol-gelu před a po mikrobiologických testech.

Nepřítomnost sol-gelové vrstvy po provedení mikrobiologických testů dokládá i stanovení chemického složení povrchu pomocí metody EDS (tabulka 5).

Při předpokládané tloušťce vrstvy sol-gelu 80 až 150 nm, by množství křemíku vzhledem k hlavním složkám (obrázek 9) mělo být vyšší než 2 %, která byla u vzorků maximálně detekována. Také procento kyslíku by mělo být vyšší. Ani ostatní prvky přítomné v sol-gelu (stříbro, měď a zinek) nebyly metodou EDS detekovány u žádného z testovaných vzorků. Ve složení povrchu CrCN vrstev se objevila stopová množství sodíku a chloru, která byla při vyhodnocení ze spektra eliminována, jelikož se jednalo o pozůstatek fyziologického roztoku, který byl používán na vytřepávání bakterií i opla-

chy vzorků. Kyslík se do pórů vrstev ukládá při otevření komory těsně po procesu povlakování.

Tabulka 5: Chemické složení povrchu vzorků po modifikaci sol-gelem a následných testech bakteriální interakce.

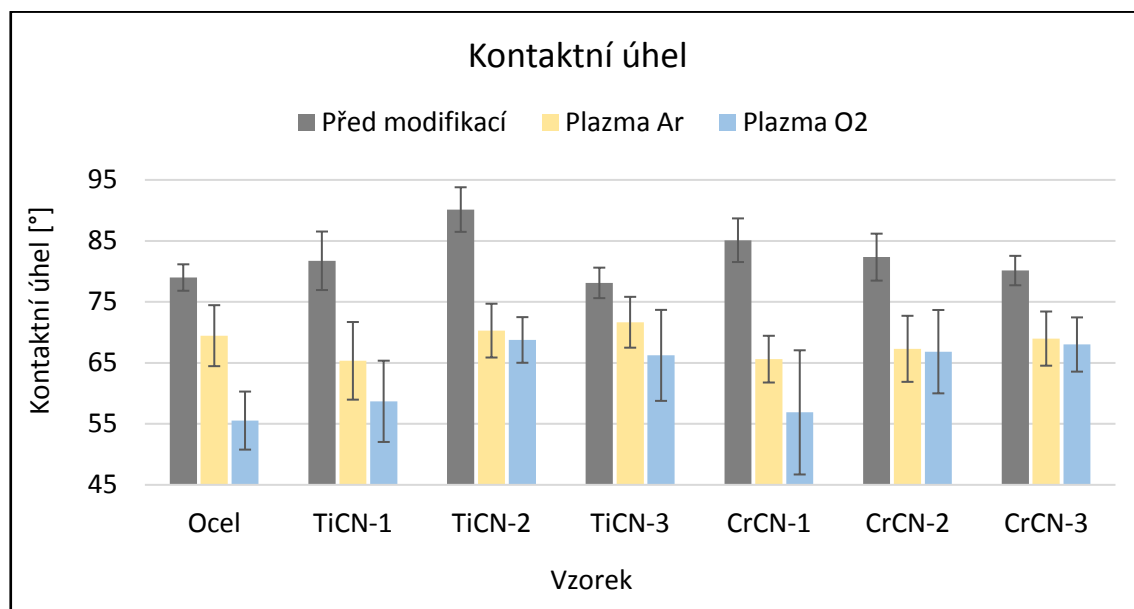
[%]	Detekované prvky – modifikace sol-gel					
	C	N	O	Si	Ti	Cr
TiCN-1	7,5	41,5	2,5	0,3	48,2	
TiCN-2	8,5	42,0	1,9	0,1	47,5	
TiCN-3	12,3	36,9	1,9	0,1	48,8	
CrCN-1	11,7	37,0	4,3	1,3		45,7
CrCN-2	18,5	33,6	6,7	2,0		39,2
CrCN-3	25,2	30,2	6,1	2,0		36,5

Vrstva sol-gelu nanosená na samotnou ocel i na ocel s tenkými vrstvami TiCN a CrCN se tedy prokázala jako nedostatečně odolná proti otěru či působení vodného prostředí.

3.3. Vliv modifikace plazmatem na fyzikálně-chemické vlastnosti tenkých vrstev

3.3.1. Povrchová energie

Kontaktní úhel vody byl u každého vzorku naměřen desetkrát. Průměrné hodnoty těchto měření jsou znázorněny v grafu 3. Je-li kontaktní úhel vody na vzorku větší než 90° , nazývá se látka hydrofobní. Naopak čím více se kontaktní úhel blíží nule, tím je vzorek hydrofilnější. Před modifikací se kontaktní úhel pohyboval u všech testovaných vzorků v průměru kolem 82° . Takové vzorky tedy spadaly do kategorie lehce hydrofilních materiálů. Po modifikaci argonovým plazmatem se kontaktní úhel vody u všech vzorků snížil na hodnotu v průměru okolo 68° . Kyslíkové plazma modifikovalo vzorky na ještě více hydrofilní a kontaktní úhel vody se pohyboval od 56° do 69° .



Graf 3: Kontaktní úhel u jednotlivých povrchů.

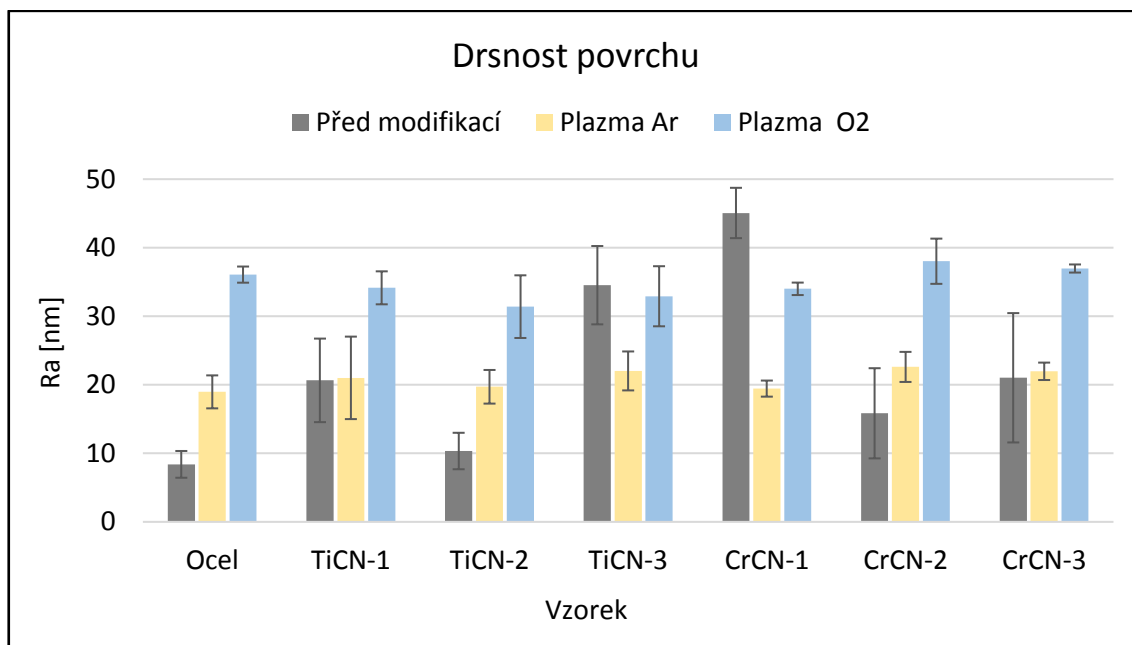
Řada výzkumů (Avram et al. 2008) se zabývá plazmatickou úpravou materiálů (především polymerů) za účelem snížení či zvýšení jejich povrchové energie. Úpravě titanových implantátů se věnuje například Queiroz a spol. ve své studii, která dokládá zvýšení hydrofilnosti právě pomocí argonového plazmatu (Queiroz et al. 2014). Na základě naměřených dat v této práci lze říci, že argonové plazma má hydrofilizující účinek i na tenké vrstvy TiCN a CrCN nanesené na nerezové oceli.

Kyslíkové plazma je u kovových materiálů zmiňováno nejčastěji v souvislosti s čištěním povrchů. Zvýšení hydrofilnosti pomocí kyslíkového plazmatu bylo prokázáno například u titanových vzorků (Yamamura et al. 2015).

Námi naměřená data pro TiCN i CrCN tenké vrstvy ukazují, že kyslíkové plazma mělo větší hydrofilizující účinek než plazma argonové, což je v souladu s literaturou. Peng uvádí zvýšení hydrofilnosti studovaných kovových vzorků po úpravě plazmatem na základě měření povrchové energie. Po úpravě argonovým plazmatem se povrchová energie zvýšila o 201,4 %, po působení kyslíkovým plazmatem o 232,2 %. Po působení kyslíkového plazmatu měl vzorek vyšší povrchovou energii, což znamená, že se zvýšila jeho hydrofilnost (Peng 2014).

3.3.2. Drsnost povrchu

Před modifikací se drsnost povrchu vzorků lišila v řádu desítek nanometrů. Mezi nejméně a nejvíce drsným povrchem byl rozdíl plošné drsnosti 36,7 nm. Nejdrsnější povrch vykazovaly vzorky TiCN-3 a CrCN-1. Průměrné plošné drsnosti povrchu jednotlivých vzorků jsou uvedeny v grafu 4. Pro možnost posouzení morfologie jednotlivých povrchů byly vytvořeny 3D profily, které jsou zařazeny v příloze této práce.



Graf 4: Plošná drsnost povrchů.

Po modifikaci kyslíkovým plazmatem se plošná drsnost povrchu pohybovala okolo hodnoty 35 nm. Úprava argonovým i kyslíkovým plazmatem má za následek odleptávání materiálu. Tento proces neprobíhá zcela symetricky, což vede u většiny vzorků ke zvýšení hrubosti materiálu v řádu nanometrů. Avšak u vzorků TiCN-3 a CrCN-1 došlo ke snížení plošné drsnosti povrchu. Působení argonového plazmatu bylo studováno například na titanových vzorcích. Střední drsnost povrchu se v této studii zvýšila z 27 nm na 110 nm (Queiroz et al. 2014).

V literatuře byl studován přímo rozdíl mezi působením argonového a kyslíkového plazmatu na drsnost kovových vzorků. Po 180 vteřinách působení argonového plazmatu byl ve studii pozorován nárůst drsnosti o 22 % (z 1,18 na 1,45 nm). Po působení kyslíkovým plazmatem byl nárůst plošné drsnosti 11 % (z 1,18 na 1,31 nm) (Peng 2014). U námi studovaných vzorků, u kterých se po působení plazmatu drsnost zvýšila, byl procentuální nárůst u argonového plazmatu v průměru o 53 % a u kyslíkového plazmatu v průměru o 163 %.

3.3.3. Chemické složení povrchu

Chemické složení povrchu bylo stanoveno pomocí Energiově Disperzní Spektroskopie. Pro kalkulaci koncentrací byl využit K-alfa přechod. V tabulkách 6 – 8 jsou procentuální zastoupení jednotlivých prvků před modifikací a po modifikaci argonovým a kyslíkovým plazmatem.

U vrstev před i po modifikaci byl detekován dusík, uhlík, a kyslík. Dále byl detekován titan u vrstev TiCN a chrom u vrstev CrCN. Kvantifikace kyslíku u vzorků CrCN-1, CrCN-2 a CrCN-3 mohla být zkreslena kvůli překryvu píků chromu a kyslíku (tzv. overlapu), který je zobrazen na obrázku 18. Kyslík je u všech vrstev následkem ukládání kyslíku do pórů vrstev, při otevření komory těsně po procesu povlakování. Plazma neměla dle očekávání významný vliv na koncentraci prvků na povrchu vzorků.

Tabulka 6: Chemické složení povrchu vzorků před modifikací.

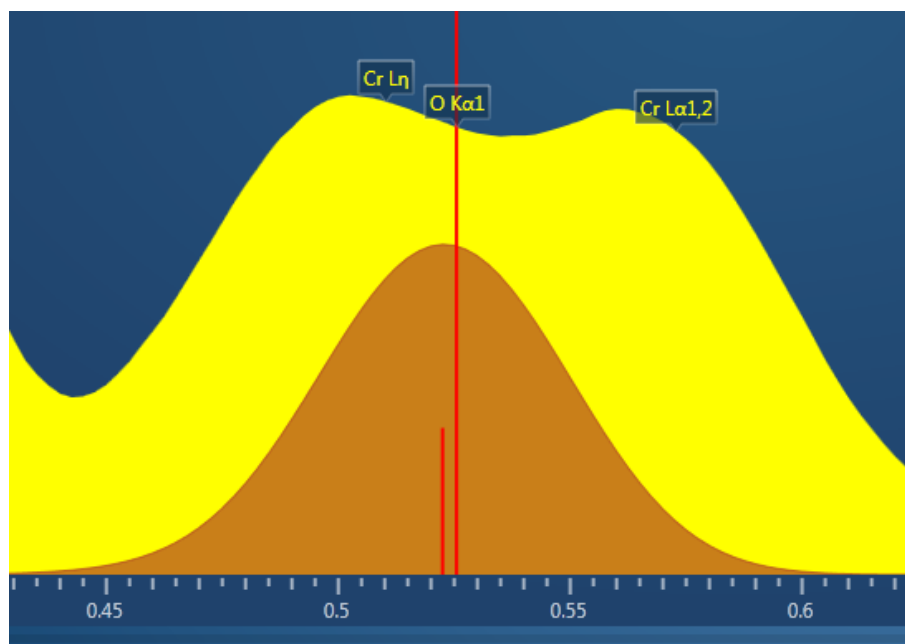
[%]	Detekované prvky – modifikace sol-gel				
	C	N	O	Ti	Cr
TiCN-1	6,1	41,8	2,0	50,2	
TiCN-2	9,0	44,1	2,4	44,6	
TiCN-3	14,4	34,8	1,7	49,2	
CrCN-1	4,9	40,0	0,1		55,0
CrCN-2	8,2	38,6	0,1		53,0
CrCN-3	17,7	34,7	0,6		47,0

Tabulka 7: Chemické složení povrchu po modifikaci argonovým plazmatem.

[%]	Detekované prvky – modifikace plazma Ar				
	C	N	O	Ti	Cr
TiCN-1	6,7	41,4	4,6	47,3	
TiCN-2	7,2	40,6	4,2	48,1	
TiCN-3	12,6	35,5	4,4	47,6	
CrCN-1	4,3	41,2	2,6		51,8
CrCN-2	7,4	38,0	2,5		52,1
CrCN-3	16,9	34,5	2,8		45,8

Tabulka 8: Chemické složení povrchu po modifikaci kyslíkovým plazmatem.

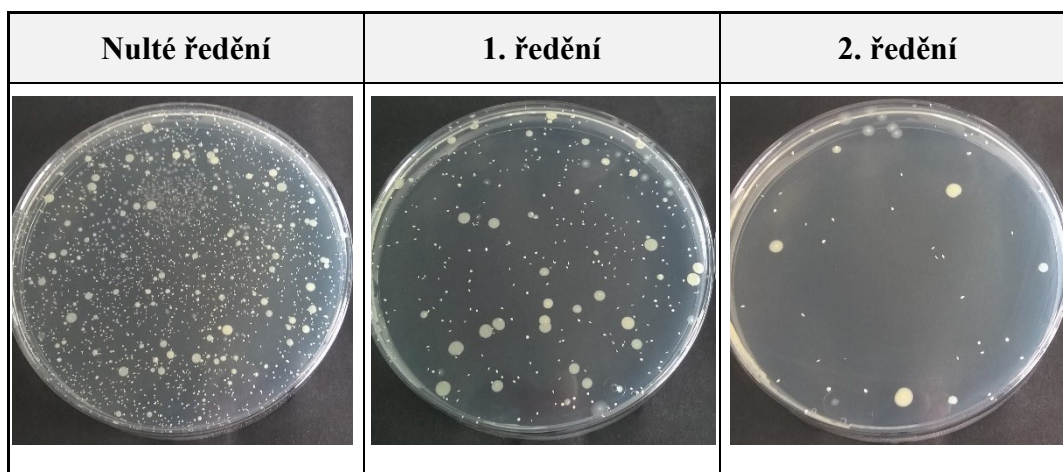
[%]	Detekované prvky – modifikace plazma O ₂				
	C	N	O	Ti	Cr
TiCN-1	6,5	42,3	4,1	47,1	
TiCN-2	8,4	38,8	3,9	49,0	
TiCN-3	13,8	35,0	4,0	47,2	
CrCN-1	4,1	40,3	2,5		53,1
CrCN-2	6,5	39,0	2,4		52,1
CrCN-3	21,5	32,8	2,9		42,8



Obrázek 18: Překryv píků chromu a kyslíku.

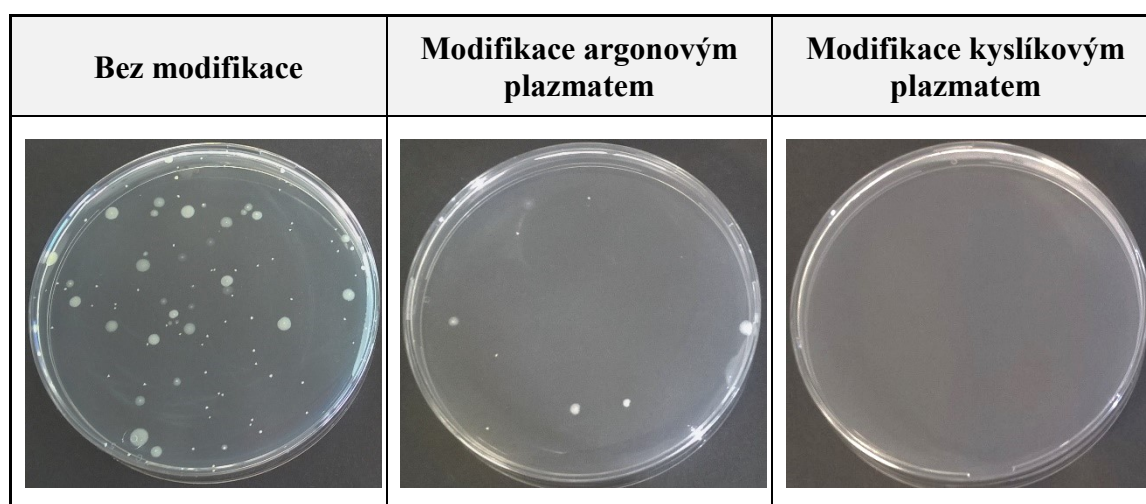
3.4. Vliv modifikace plazmatem na mikrobiologickou interakci s tenkými vrstvami

Obrázek 19 zobrazuje výsledek desítkového ředění. Pro ilustraci byly zvoleny výsledky ze vzorku TiCN-3 při testování bakterie *Staphylococcus aureus*.



Obrázek 19: Fotodokumentace desítkového ředění metody KTJ pro vzorek TiCN-3 v interakci s bakteriemi *Staphylococcus aureus*.

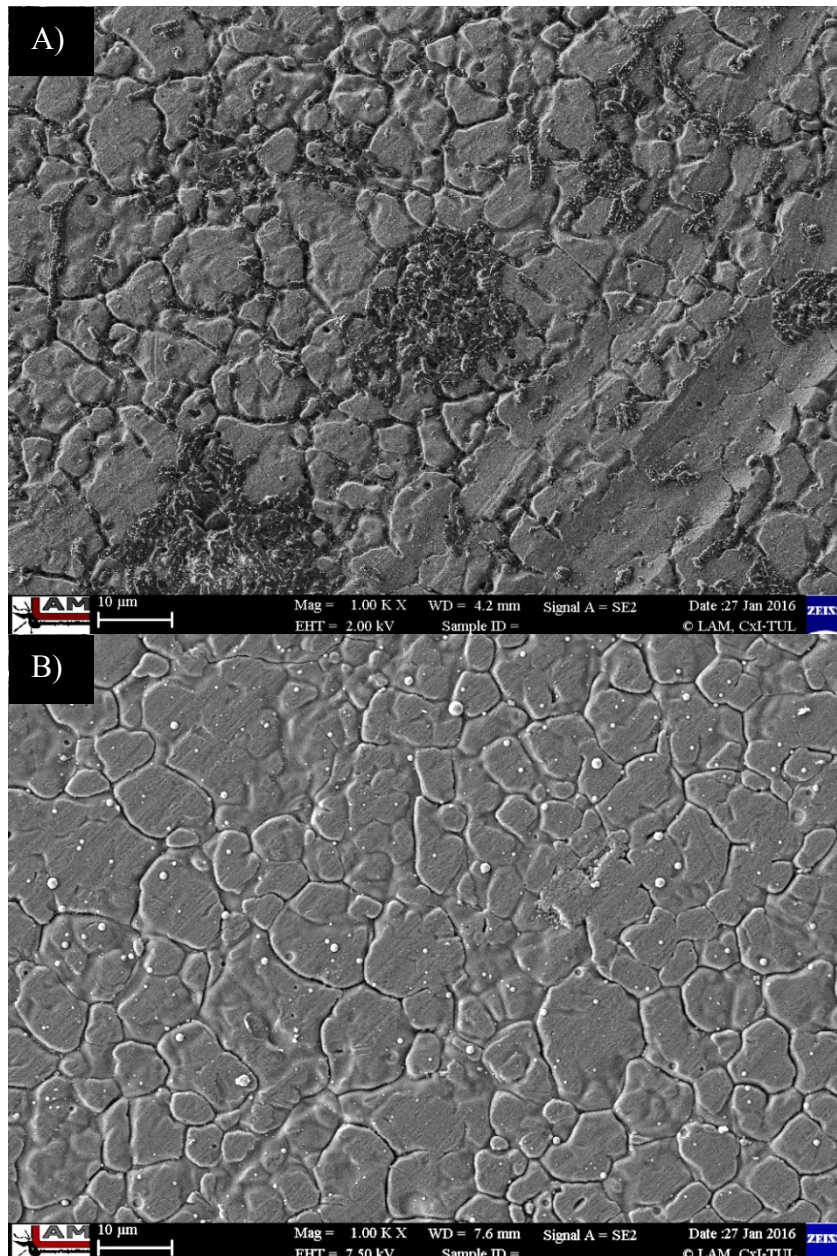
Obrázek 20 ilustruje různý počet bakteriálních kolonií na tomtéž vzorku při různých modifikacích povrchu. Jedná se opět o výsledky ze vzorku TiCN-3, tentokrát s bakterií *Escherichia coli*. Všechny snímky zaznamenávají nulté ředění.



Obrázek 20: Fotodokumentace rozdílných výsledků interakce povrchu s bakteriemi *Escherichia coli* při různých modifikacích.

Ověření postupu „vytřepání bakterií z povrchu“

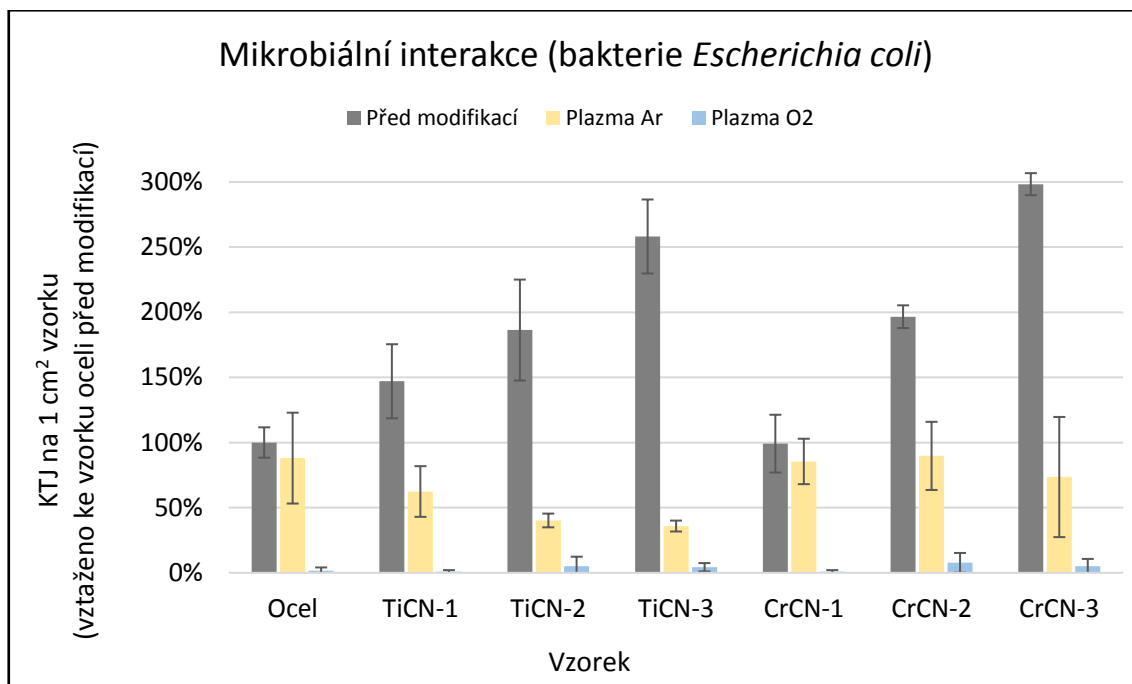
Pro ověření správného vytřepání bakterií uchycených na povrch vzorku byla použita skenovací elektronová mikroskopie. Obrázek 21 zobrazuje povrch vzorku po 24 hodinové interakci s bakteriální suspenzí před a po vytřepávání do fyziologického roztoku. Před vytřepáním jsou viditelné přichycené bakterie k povrchu. Po vytřepání nebyla znatelná přítomnost bakterií, ale na některých místech byly viditelné světle zobrazené krystalky soli pocházející z fyziologického roztoku.



Obrázek 21: Povrch vzorku po hodinové interakci s bakteriální suspenzí A) před vytřepáním do fyziologického roztoku a B) po následném vytřepání do fyziologického roztoku.

3.4.1. Mikrobiální interakce – *Escherichia coli*

Počet gramnegativních bakterií *Escherichia coli* uchycených na povrch vzorku byl vyhodnocován pomocí metody kultivačního stanovení počtu životaschopných buněk. Výsledky jsou zobrazeny v grafu 5.



Graf 5: Počet KTJ uchycených na povrch vzorku po jedné hodině interakce s bakteriální suspenzí *Escherichia coli*.

Počet bakterií u nemodifikovaných vzorků se téměř lineárně zvyšoval od vzorku TiCN-1 ke vzorku TiCN-3 a stejně tak od vzorku CrCN-1 ke vzorku CrCN-3. U vzorku CrCN-3 bylo napočítáno až 120 kolonie tvořících jednotek (KTJ) na 1 cm² vzorku. Tento jev by mohl souviset s poměrem plynů při depozici tenkých vrstev. Čím vyšší byl průtok acetyleny (C₂H₂), tím vyšší byl počet uchycených bakterií během jedné hodiny na povrchy testovaných vzorků před modifikací. Po modifikaci argonovým plazmatem klesl počet přichycených bakterií u všech testovaných vzorků. U vzorku TiCN-3 byl naměřen pokles až o 86 % oproti hodnotě nemodifikovaného vzorku. Nejmenší pokles nastal u vzorku oceli, a to o 12 %. Na povrch se po modifikaci argonovým plazmatem uchytilo během hodinové interakce maximálně 35 kolonie tvořících jednotek na 1 cm², a to u vzorku CrCN-1. Po modifikaci kyslíkovým plazmatem nastal u pěti vzorků pokles o více jak 98 % vzhledem k hodnotám nemodifikovaných vzorků. Na povrch se po

modifikaci argonovým plazmatem uchytily během hodinové interakce maximálně 3 kolonie tvořící jednotky na 1 cm², a to u vzorku CrCN-2.

Počty bakterií uchycených na povrchu vzorku velmi úzce souvisely s hydrofilitou daného povrchu. Čím hydrofilnější byla daná modifikace, tím méně bakterií se na takto modifikovaný vzorek uchytilo, protože povrch gramnegativní bakterie *Escherichia coli* je hydrofobní. Povrchové vlastnosti mikrobiálních buněk, jsou dány širokou škálou struktur na jejich povrchu a jedním z hlavních mechanismů, který hydrofobnost podporuje, je uvolňování vezikul z vnější membrány. Hydrofobní interakce jsou nejsilnější nekovalentní, neelektrostatické síly, a proto zásadním způsobem určují schopnost adheze buněk k povrchu (Krasowska a Sigler 2014).

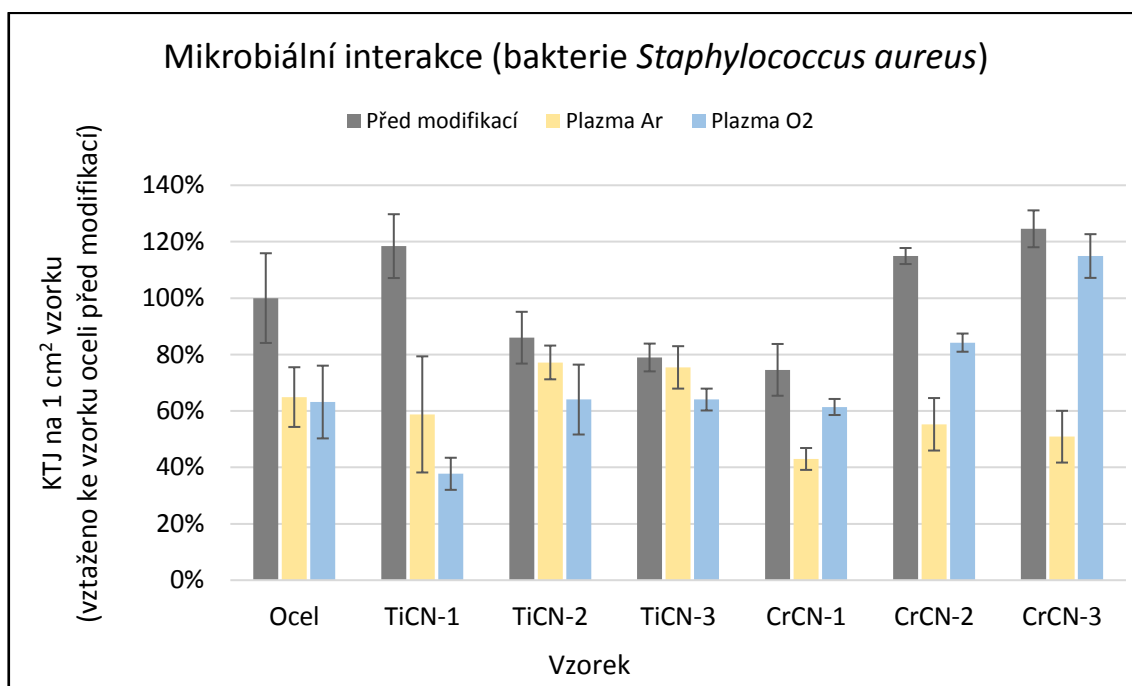
Vyšší přilnavost kmene *Escherichia coli* k hydrofobním povrchům na rozdíl od hydrofilních, potvrzuje mnoho studií. O zvýšení adheze *E. coli* k povrchu po hydrofobní modifikaci hovoří například Thang Vo, který dokládá, že při zvýšení kontaktního úhlu z 44,7° na 72,6° se zvýšil počet buněk adherovaných na povrch o 53 % (Vo a Lee 2017). O nízké adhezi tohoto kmene k povrchům hydrofilním hovoří Bei Jiang, v jehož studii modifikace pomocí D-tyrosinu vedla k větší hydrofilnosti a zároveň k prokazatelnému snížení adheze *E. coli* k povrchu vzorků (Jiang et al. 2017). Některé starší studie shrnují obecně vliv hydrofobnosti povrchu na gramnegativní a grampozitivní bakterie (Mazumder et al. 2010; van Loosdrecht et al. 1987). Větší přilnavost gramnegativních bakterií (*Alcaligenes denitrificans*) k hydrofobnějším povrchům a zároveň grampozitivních bakterií (*Staphylococcus epidermis*) k povrchům hydrofilním dokládá také studie portugalské Univerzity of Minho (Oliveira et al. 2004).

3.4.2. Mikrobiální interakce – *Staphylococcus aureus*

Počet grampozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* uchycených na povrch vzorku byl opět vyhodnocován pomocí metody kultivačního stanovení počtu životaschopných buněk. Výsledky jsou zobrazeny v grafu 6.

Počet kolonie tvořících jednotek uchycených na povrch vzorků byl obecně mnohem vyšší než u bakterie *Escherichia coli*. Tyto dva bakteriální kmeny však nelze v počtu kolonií porovnávat mezi sebou, jelikož každá z bakterií má jiný životní cyklus a průběh růstové křivky buněčné kultury. Do bakteriální suspenze *S. Aurea* byl přidáván albumin, který má vliv na růst bakterií a který do suspenze bakterií *E. coli* přidáván nebyl. Důle-

žitou informací je procentuální pokles počtu přichycených kolonie tvořících jednotek v rámci jednoho kmene vzhledem k různým modifikacím.



Graf 6: Počet KTJ uchycených na povrch vzorku po jedné hodině interakce s bakteriální suspenzí *Staphylococcus aureus*.

Počet bakterií u nemodifikovaných vzorků klesal od vzorku TiCN-1 ke vzorku TiCN-3 a naopak rostl od vzorku CrCN-1 ke vzorku CrCN-3. Nejvíce kolonie tvořících jednotek bylo proto napočítáno na vzorcích TiCN-1 a CrCN-3, a to 4500 respektive 4733 KTJ na 1 cm² vzorku. Naopak nejméně kolonie tvořících jednotek bylo napočítáno na vzorku CrCN-1, a to 2833 KTJ na 1 cm². Po modifikaci argonovým plazmatem klesl počet přichycených bakterií opět u všech testovaných vzorků. Největší pokles nastal u vzorku CrCN-3, a to o 59 % oproti hodnotě nemodifikovaného vzorku. Nejmenší pokles nastal u vzorku TiCN-3, a to pouze o 4 %. Také modifikace kyslíkovým plazmatem snížila počet přichycených bakterií k povrchu u všech vzorků. Největší pokles (68 %) nastal u vzorku TiCN-1. Nejmenší pokles (18 %) nastal u vzorku CrCN-1.

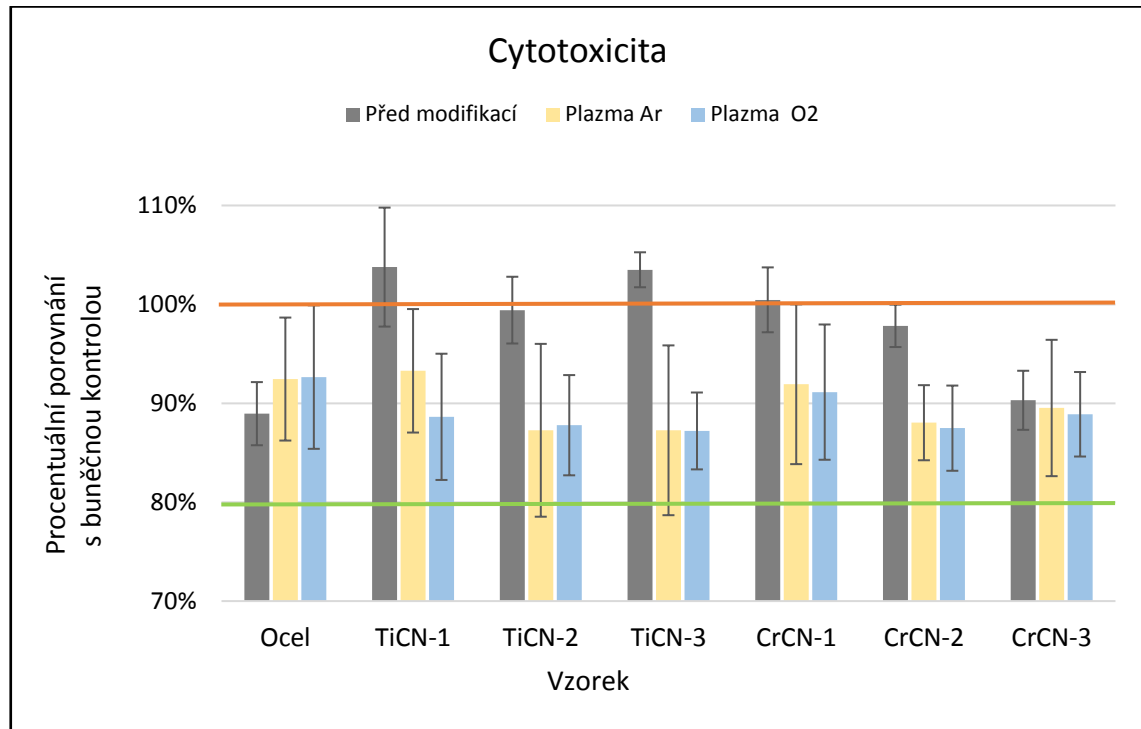
U TiCN vrstev byla obecně účinnější metoda modifikace kyslíkovým plazmatem, kdežto u CrCN vrstev omezila bakteriální adhezi více modifikace plazmatem argonovým. Na vzorek oceli působily obě modifikace velmi podobně a snížily počet bakterií *S. aureus* uchycených na povrch vzorku v průměru o 36 %.

Povrch bakterie *Staphylococcus aureus* je hydrofilní (Bruinsma et al. 2001), a proto zde nelze hovořit o hydrofobní interakci. O dobré přilnavosti grampozitivních bakterií k povrchům hydrofilním hovoří studie portugalské Univerzity of Minho (Oliveira et al. 2004). U tohoto bakteriálního kmene neměla žádná z fyzikálně-chemických vlastností tak zřejmý efekt, jako tomu bylo u bakteriálního kmene *E. coli*. Přesto bylo možné pozorovat souvislost mezi plošnou drsností a počtem uchycených bakterií na povrch vzorku. Čím větší hodnota plošné drsnosti byla u vzorku naměřena, tím méně bakterií na daný povrch adherovalo. V literatuře jsou popisovány různé vlivy plošné drsnosti na adhezi kmene *S. aureus*. Některé studie dokládají vyšší přilnavost k drsnějším povrchům (Azelmad et al. 2017). Ve studii se Azelmad zabýval povrchy s plošnou drsností od 5 do 20 nm, kdy počet adherovaných bakterií lineárně rostl se zvyšující se drsností. Naopak o redukci bakterií *S. aureus* se zvyšující se drsností hovoří studie (Bruinsma et al. 2001).

U TiCN vrstev byla obecně účinnější metoda modifikace kyslíkovým plazmatem, kdežto u CrCN vrstev omezila bakteriální adhezi více modifikace plazmatem argonovým. Na vzorek oceli působily obě modifikace velmi podobně a snížily počet bakterií *S. aureus* uchycených na povrch vzorku v průměru o 36 %.

3.5. Vliv modifikace na cytotoxicitu tenkých vrstev

Na závěr byla ověřena cytotoxicita studovaných vzorků před modifikací i po modifikaci argonovým a kyslíkovým plazmatem pomocí testu MTT. V grafu 7 jsou uvedeny výsledky jednotlivých testů vztažené ke kontrole (hodnoty kontroly odpovídají v grafu hodnotě 100 % a jsou znázorněny zelenou linkou).



Graf 7: Cytotoxicita vzorků. Výsledky buněčné kontroly odpovídají v grafu hodnotě 100 % (zelená linka). Nad hodnotu 80 % jsou vzorky považovány za biokompatibilní (oranžová linka).

Nad hodnotu 80 % jsou vzorky považovány za biokompatibilní (Swar et al. 2017). Obě modifikace lehce zvýšily cytotoxicitu tenkých vrstev v porovnání se vzorky před modifikací, pouze u vzorku oceli došlo ke zlepšení biokompatibility. Přesto všechny vzorky i po modifikaci přesahují hodnotu 87 % a mohou být tedy označeny jako biokompatibilní (z hlediska hodnocení cytotoxicity s buněčnou linií myších fibroblastů 3T3).

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provedení různých antiadhezivních modifikací a následné vyhodnocení jejich vlivu na fyzikálně-chemické vlastnosti, bakteriální interakci a cytotoxicitu povrchů tenkých vrstev TiCN a CrCN nanesených na nerezové oceli. Celkem byly provedeny čtyři modifikace. Vzorky po fotolitografické modifikaci nebylo možné testovat z důvodu krátkodobého účinku a z důvodu nedostatečné otěruvzdornosti byla z měření vyřazena i provedená modifikace sol-gelem.

Po modifikaci argonovým a kyslíkovým plazmatem došlo u všech vzorků ke zvýšení povrchové energie a u většiny vzorků také ke zvýšení plošné drsnosti. Zvýšení hydrofilnosti mělo za následek významný pokles adheze tyčinkovitého zástupce gramnegativního kmene *Escherichia coli*. Také u kokovitého zástupce grampozitivního kmene *Staphylococcus aureus* byl po modifikaci plazmatem pozorován pokles bakteriální interakce. U této bakterie lze tento jev na základě literární rešerše přičítat spíše zvýšení plošné drsnosti u modifikovaných vzorků. Na TiCN vrstvy působila vzhledem ke kmeni *S. aureus* více antiadhezivně modifikace kyslíkovým plazmatem, kdežto u CrCN vrstev omezila bakteriální adhezi tohoto kmene více modifikace plazmatem argonovým.

Dle provedených testů se plazmatická modifikace jevila účinnější pro kmen *E. coli* a na základě literární rešerše lze tento jev zobecnit i pro další gramnegativní kmeny. Pro zabránění adheze *S. aureus* (a jemu podobných bakteriálních kmenů) by bylo vhodnější volit jiné metody modifikace, které způsobí výraznější nárůst plošné drsnosti.

Všechny studované vzorky byly vyhodnoceny jako biokompatibilní. Bylo potvrzeno zvýšení biokompatibility oceli po nanesení tenkých vrstev TiCN a CrCN.

Tato diplomová práce naplnila většinu cílů, které byly stanoveny jako vhodné pokračování v závěru práce bakalářské. Studie byla rozšířena o další bakteriální kmen a kromě TiCN byl testován i další typ tenkých vrstev. Dále byly studovány různé možnosti antiadhezivní modifikace a proběhlo i plánované měření cytotoxicity vrstev.

Dalším vhodným pokračováním této práce by bylo provedení testů adheze tkáňových buněk v dlouhodobějším časovém horizontu, což je důležitým parametrem tělních implantátů. Testována by měla být také trvanlivost plazmatických modifikací a jejich vliv na další typy bakteriálních kmenů.

Použitá literatura

AMARAL, M., P. S. GOMES, M. A. LOPES, J. D. SANTOS, R. F. SILVA a M. H. FERNANDES, 2009. Cytotoxicity evaluation of nanocrystalline diamond coatings by fibroblast cell cultures. *Acta Biomaterialia* [online]. **5**(2), 755–763. ISSN 1878-7568. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2008.08.015

AVRAM, Andrei, Marioara AVRAM, Adina BRAGARU, Andrei GHIU a Ciprian ILIESCU, 2008. Plasma Surface Modification for Selective Hydrophobic Control. *Romanian Journal of Information Science and Technology*. **11**, 409–422.

AZELMAD, K., F. HAMADI, R. MIMOUNI, K. AMZIL, H. LATRACHE, M. MABROUKI a A. EL BOULANI, 2017. Adhesion of Staphylococcus aureus and Staphylococcus xylosus to materials commonly found in catering and domestic kitchens. *Food Control* [online]. **73**, 156–163. ISSN 0956-7135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2016.07.044

BÄCHLE, Maria a Ralf KOHAL, 2005. *A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells* [online]. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0501.2004.01054.x

BAKALOVA, Totka, Nikolay PETKOV, Tomáš BLAŽEK, Pavel KEJZLAR, Petr LOUDA a Lukáš VOLESKÝ, 2016a. Influence of parameters of the coating process on the mechanical and tribological properties of the thin films. *Defect and Diffusion Forum* [online]. **368**, 59–63. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/DDF.368.59

BAKALOVA, Totka, Lucie SVOBODOVÁ (KŘIKLAVOVÁ, Adéla COUFALOVÁ, Nikolay PETKOV, Petr LOUDA a Lukáš VOLESKÝ, 2016b. Biocompatibility of surfaces of thin films TiCN. *Defect and Diffusion Forum* [online]. **368**, 64–68. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/DDF.368.64

BAKKER, Dewi P, Frank M HUIJS, Joop DE VRIES, Job W KLIJNSTRA, Henk J BUSSCHER a Henny C VAN DER MEI, 2003. Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **32**(3), 179–190. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/S0927-7765(03)00159-0

BAYOUDH, Sonia, Ali OTHMANE, Laurence MORA a Hamed BEN OUADA, 2009. Assessing bacterial adhesion using DLVO and XDLVO theories and the jet impingement technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **73**(1), 1–9. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.04.030

BERBECARU, C., H. V. ALEXANDRU, Adelina IANCULESCU, A. POPESCU, G. SOCOL, F. SIMA a Ion MIHAILESCU, 2009. Bioglass thin films for biomimetic implants. *Applied Surface Science* [online]. **255**(10), Laser and Plasma in Micro- and Nano-Scale Materials Processing and Diagnostics, 5476–5479. ISSN 0169-4332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2008.08.020

BHUSHAN, Bharat, Yong Chae JUNG a Kerstin KOCH, 2009. Micro-, nano- and hierarchical structures for superhydrophobicity, self-cleaning and low adhesion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. **367**(1894), 1631–1672. ISSN 1364-503X, 1471-2962. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2009.0014

BLAŽEK, Tomáš, 2015. *Studium vlastností tenkých vrstev a jejich aplikace v medicíně*. 2015. B.m.: Diplomová práce, Technická univerzita Liberec, Vedoucí práce: prof. Ing Petr Louda, CSc.

BROŽ, Antonín, 2017. *Dizertační Práce: Adheze, růst a diferenciaci osteoblastů a kmenových stromálních buněk na povrchu biokompatibilních nanomateriálů* [online]. 2017. B.m.: Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká Fakulta. Dostupné z: Vedoucí: doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.

BRUINSMA, G. M., H. C. VAN DER MEI a H. J. BUSSCHER, 2001. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* [online]. **22**(24), Ophthalmic Special Issue, 3217–3224. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(01)00159-4

BRUNI, S., M. MARTINESI, M. STIO, C. TREVES, T. BACCI a F. BORGIOLI, 2005. Effects of surface treatment of Ti-6Al-4V titanium alloy on biocompatibility in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Acta biomaterialia* [online]. **1**(2), 223–234. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2004.11.001

COUFALOVÁ, Adéla, 2016. *Posouzení vhodnosti uhlíkové nanostruktury pro kolonizaci bakteriální populací*. 2016. B.m.: Bakalářská práce, Technická univerzita v Liberci, Vedoucí práce: Ing. Petra Rosická.

COWLEY, Alison a Brian WOODWARD*, 2011. A Healthy Future: Platinum in Medical Applications. *Platinum Metals Review* [online]. **55**(2), 98–107. Dostupné z: doi:10.1595/147106711X566816

CRISTINA, M. SARTINY a E. SHINCA, 2016. Operating room environment and surgical site infections in arthroplasty procedures. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. **57**(3), E142–E148. ISSN 1121-2233.

DAPUNT, Ulrike, Stephanie RADZUWEIT-MIHALJEVIC, Burkhard LEHNER, Gertrud Maria HAENSCH a Volker EWERBECK, 2016. Bacterial Infection and Implant Loosening in Hip and Knee Arthroplasty: Evaluation of 209 Cases. *Materials* [online]. **9**(11). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma9110871

DU, Liangwei, Hong JIANG, Xiaohua LIU a Erkang WANG, 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by Escherichia coli DH5 α and its application on direct electrochemistry of hemoglobin. *Electrochemistry Communications* [online]. **9**(5), 1165–1170 [vid. 2016-03-10]. ISSN 1388-2481. Dostupné z: doi:10.1016/j.elecom.2007.01.007

ECKERTOVÁ, Ludmila, 1973. *Fyzika tenkých vrstev*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury.

EDELMAN, E. R., P. SEIFERT, A. GROOTHUIS, A. MORSS, D. BORNSTEIN a C. ROGERS, 2001. Gold-coated NIR stents in porcine coronary arteries. *Circulation*. **103**(3), 429–434. ISSN 1524-4539.

EWALD, Andrea, Susanne K GLÜCKERMANN, Roger THULL a Uwe GBURECK, 2006. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *BioMedical Engineering OnLine* [online]. **5**, 22. ISSN 1475-925X. Dostupné z: doi:10.1186/1475-925X-5-22

FADEEVA, Elena, Vi Khanh TRUONG, Meike STIESCH, Boris N. CHICHKOV, Russell J. CRAWFORD, James WANG a Elena P. IVANOVA, 2011. Bacterial retention on superhydrophobic titanium surfaces fabricated by femtosecond laser ablation. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* [online]. **27**(6), 3012–3019. ISSN 1520-5827. Dostupné z: doi:10.1021/la104607g

FERNÁNDEZ-FAIREN, Mariano, Antonio MURCIA, Roberto IGLESIAS, Pablo SEVILLA, José Maria MANERO a Francisco Javier GIL, 2012. Analysis of tantalum implants used for avascular necrosis of the femoral head: a review of five retrieved specimens. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* [online]. **10**(1), 29–36. ISSN 2280-8000. Dostupné z: doi:10.5301/JABFM.2012.9273

FU, Qiang, Eduardo SAIZ, Mohamed N. RAHAMAN a Antoni P. TOMSIA, 2011. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials Science and Engineering: C* [online]. **31**(7), 1245–1256. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2011.04.022

GARRIDO, Krizel D., Ronna Jane S. PALACIOS, Chaeyoung LEE a Seoktae KANG, 2014. Impact of conditioning film on the initial adhesion of E. coli on polysulfone ultrafiltration membrane. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. **20**(4), 1438–1443. ISSN 1226-086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2013.07.029

GIRIDHAR, Gurram, R. K. N. R. MANEPALLI a Gudimamilla APPARAO, 2017. Chapter 8 - Contact Angle Measurement Techniques for Nanomaterials. In: Sabu THOMAS, Raju THOMAS, Ajesh K. ZACHARIAH a Raghendra Kumar MISHRA, ed. *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* [online]. B.m.: Elsevier, Micro and Nano Technologies, s. 173–195. ISBN 978-0-323-46139-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-46139-9.00008-6

GOMES, Ana-Luís a Javier MONTERO, 2011. Zirconia implant abutments: a review. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*. **16**(1), e50-55. ISSN 1698-6946.

HAUERT, R., 2003. A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diamond and Related Materials* [online]. **12**(3), 13th European Conference on Diamond, Diamond-Like Materials, Carbon Nanotubes, Nitrides and Silicon Carbide, 583–589. ISSN 0925-9635.

HEINONEN, Saara, Elina HUTTUNEN-SAAIRIVIRTA, Juha-Pekka NIKKANEN, Mari RAULIO, Outi PRIHA, Jarmo LAAKSO, Erna STORGÅRDS a Erkki LEVÄNEN, 2014. Antibacterial properties and chemical stability of superhydrophobic silver-containing surface produced by sol–gel route. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. **453**, 149–161. ISSN 0927-7757.

HENESS, Greg a Besim BEN-NISSAN, 2003. Innovative Bioceramics. *Mater Forum*. **27**.

HERMANSSON, Malte, 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **14**(1), 105–119. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/S0927-7765(99)00029-6

HIGUERA, Carlos A., Nozomu INOUE, Jonathan S. LIM, Renwen ZHANG, Nena DIMAANO, Frank J. FRASSICA a Edmund Y. S. CHAO, 2005. Tendon reattachment to a metallic implant using an allogenic bone plate augmented with rhOP-1 vs. autogenous cancellous bone and marrow in a canine model. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* [online]. **23**(5), 1091–1099. ISSN 0736-0266. Dostupné z: doi:10.1016/j.orthres.2005.01.017

HORI, Katsutoshi a Shinya MATSUMOTO, 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* [online]. **48**(3), Invited Review Issue 2010, 424–434. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2009.11.014

ITAKURA, Yoshinobu, Tokuji TAJIMA, Shinobu OHOKE, Junji MATSUZAWA, Hiroko SUDO a Shigehisa YAMAMOTO, 1989. Osteocompatibility of platinum-plated titanium assessed in vitro. *Biomaterials* [online]. **10**(7), 489–493. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(89)90091-4

JAN VAN OSS, Carel, 2008. Chapter Five The interfacial tension/free energy of interaction between water and identical condensed-phase entities, i, immersed in water, w. *Interface Science and Technology* [online]. **16**. Dostupné z: doi:10.1016/S1573-4285(08)00205-6

JIANG, Bei-Bei, Xue-Fei SUN, Lin WANG, Si-Yu WANG, Ru-Dong LIU a Shu-Guang WANG, 2017. Polyethersulfone membranes modified with D-tyrosine for biofouling mitigation: Synergistic effect of surface hydrophilicity and anti-microbial properties. *Chemical Engineering Journal* [online]. **311**, 135–142. ISSN 1385-8947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2016.11.088

KAMATH, Atul F., Albert O. GEE, Charles L. NELSON, Jonathan P. GARINO, Paul A. LOTKE a Gwo-Chin LEE, 2012. Porous tantalum patellar components in revision total knee arthroplasty minimum 5-year follow-up. *The Journal of Arthroplasty* [online]. **27**(1), 82–87. ISSN 1532-8406. Dostupné z: doi:10.1016/j.arth.2011.04.024

KASTRATI, A., A. SCHÖMIG, J. DIRSCHINGER, J. MEHILLI, N. VON WELSER, J. PACHE, H. SCHÜHLEN, T. SCHILLING, C. SCHMITT a F. J. NEUMANN, 2000. Increased risk of restenosis after placement of gold-coated stents: results of a randomized trial comparing gold-coated with uncoated steel stents in patients with coronary artery disease. *Circulation*. **101**(21), 2478–2483. ISSN 1524-4539.

KLABAN, Vladimír, 2018. *Obecná a environmentální mikrobiologie: fascinující, neuvěřitelný a tajemný svět mikrobů v přírodním prostředí*. Hradec Králové: Gaudeamus. ISBN 978-80-7435-673-5.

KLODZIŃSKA, Ewa, Michał SZUMSKI, Ewelina DZIUBAKIEWICZ, Katarzyna HRYNKIEWICZ, Ewa SKWAREK, Władysław JANUSZ a Bogusław BUSZEWSKI, 2010. Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. *Electrophoresis* [online]. **31**, 1590–6.

KLUSÁK, Ondřej, 2010. Biokompatibilní materiály na bázi kovů a jejich využití [online]. [vid. 2018-03-18]. Dostupné z: <http://dspace.lib.vutbr.cz/xmlui/handle/11012/15635>

KRAFT, C. N., M. HANSIS, S. ARENS, M. D. MENGER a B. VOLLMAR, 2000. Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *Journal of Biomedical Materials Research*. **49**(2), 192–199. ISSN 0021-9304.

KRASOWSKA, Anna a Karel SIGLER, 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **4**. ISSN 2235-2988. Dostupné z: [doi:10.3389/fcimb.2014.00112](https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112)

KUBIŠTA, Václav, 2000. *Obecná biologie: úvodní učební text biologie pro 1. ročník gymnázií*. B.m.: Fortuna. ISBN 978-80-7168-714-6.

KUGEL, Alex, Shane STAFSLIEN a Bret J. CHISHOLM, 2011. Antimicrobial coatings produced by “tethering” biocides to the coating matrix: A comprehensive review. *Progress in Organic Coatings* [online]. **72**(3), 222–252. ISSN 0300-9440. Dostupné z: [doi:10.1016/j.porgcoat.2011.07.004](https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2011.07.004)

LEMONS, Jack E., 2013. Chapter I.1.1 - Introduction: Properties of Materials: The Palette of the Biomaterials Engineer. In: *Biomaterials Science (Third Edition)* [online]. B.m.: Academic Press, s. 5. ISBN 978-0-12-374626-9. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00001-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00001-2)

LI, Wei, Bernd KABIUS a Orlando AUCIELLO, 2010. Science and technology of biocompatible thin films for implantable biomedical devices. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* [online]. **2010**, 6237–6242. ISSN 1557-170X.

LINDQUIST, L. W., G. E. CARLSSON a T. JEMT, 1996. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clinical Oral Implants Research*. **7**(4), 329–336. ISSN 0905-7161.

LIU, Y. a Q. ZHAO, 2005. Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophysical Chemistry* [online]. **117**(1), 39–45. ISSN 0301-4622. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bpc.2005.04.015](https://doi.org/10.1016/j.bpc.2005.04.015)

LIUA, Xuanyong, Paul K. CHUB a Chuanxian DINGA, 2004. *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*.

LV, Yinfeng, Jiajun WANG, He GAO, Zeyun WANG, Na DONG, Qingquan MA a Anshan SHAN, 2014. Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential α -Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36. *PLOS ONE* [online]. **9**(1), e86364. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0086364](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086364)

MATASSI, Fabrizio, Alessandra BOTTI, Luigi SIRLEO, Christian CARULLI a Massimo INNOCENTI, 2013. Porous metal for orthopedics implants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. **10**(2), 111–115. ISSN 1724-8914.

MATĚJČEK, Jan, 2016. *Plazmová modifikace materiálů pro medicínské účely*. 2016. B.m.: Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Pedagogická fakulta Katedra aplikované fyziky a techniky, Vedoucí práce: Ing. Marta Horáková, Ph.D.

MAZUMDER, Sonal, Joseph O. FALKINHAM, Andrea M. DIETRICH a Ishwar K. PURI, 2010. Role of hydrophobicity in bacterial adherence to carbon nanostructures and biofilm formation. *Biofouling* [online]. **26**(3), 333–339. ISSN 1029-2454. Dostupné z: [doi:10.1080/08927010903531491](https://doi.org/10.1080/08927010903531491)

NAZARPOUR, Soroush, ed., 2014. *Thin Films and Coatings in Biology* [online]. B.m.: Springer Netherlands. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering [vid. 2018-03-18]. ISBN 978-94-007-2591-1. Dostupné z: [//www.springer.com/us/book/9789400725911](http://www.springer.com/us/book/9789400725911)

NELEA, V, H PELLETIER, D MÜLLER, N BROLL, P MILLE, C RISTOSCU a I. N MI-HAILESCU, 2002. Mechanical properties improvement of pulsed laser-deposited hydroxyapatite thin films by high energy ion-beam implantation. *Applied Surface Science* [online]. **186**(1), Dostupné z: doi:10.1016/S0169-4332(01)00754-1

NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ, 2015. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova Univerzita. ISBN 978-80-210-7923-6.

NEWMAN, Jeffrey D. a Steven J. SETFORD, 2006. Enzymatic biosensors. *Molecular Biotechnology* [online]. **32**(3), 249–268. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1385/MB:32:3:249

OH, Kwang-Jun a Dilbans Singh PANDHER, 2010. A new mode of clinical failure of porous tantalum rod. *Indian Journal of Orthopaedics* [online]. **44**(4), 464–467. ISSN 0019-5413. Dostupné z: doi:10.4103/0019-5413.69322

OHRING, Milton, 2002. Chapter 1 - A Review of Materials Science. In: *Materials Science of Thin Films (Second Edition)* [online]. San Diego: Academic Press, s. 1–56 [vid. 2016-02-26]. ISBN 978-0-12-524975-1. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125249751500045>

OLIVEIRA, R, Joana AZEREDO, Pilar TEIXEIRA a A P. FONSECA, 2004. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion.

PASCHOAL, André Luís, Everaldo Carlos VANÂNCIO, Lauralice de Campos Franceschini CANALE, Orivaldo Lopes DA SILVA, Domingos HUERTA-VILCA a Artur de Jesus MOTHEO, 2003. Metallic biomaterials TiN-coated: corrosion analysis and biocompatibility. *Artificial Organs*. **27**(5), 461–464. ISSN 0160-564X.

PENG, Hui Yuen, 2014. Comparison of Argon and Oxygen Plasma Treatments on LED Chip Bond Pad for Wire Bond Application. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. **Volume 5**. ISSN 2229-5518.

PERNI, Stefano, Emily Callard PREEDY a Polina PROKOPOVICH, 2014. Success and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. **206**, Manuel G. Velarde, 265–274. ISSN 0001-8686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2013.11.008

PETKOV, Nikolay, Totka BAKALOVA, Hristo BAHCHEDZHIEV, Petr LOUDA, Pavel KEJ-ZLAR, Pavla CAPKOVÁ, Martin KORMUNDA a Petr RYŠÁNEK, 2018. Cathodic Arc Deposition of TiCN Coatings - Influence of the C₂H₂/N₂ Ratio on the Structure and Coating Properties. *Journal of Nano Research* [online]. **51**, 78–91. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/JNanoR.51.78

PIERRE, Alain C., 2013. *Introduction to Sol-Gel Processing*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 978-1-4615-5659-6.

POORTINGA, Albert T., Rolf BOS, Willem NORDE a Henk J. BUSSCHER, 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports* [online]. **47**(1), 1–32. ISSN 0167-5729. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-5729(02)00032-8

QUEIROZ, Jana Dara Freires de, 2014. Surface modification by argon plasma treatment improves antioxidant defense ability of CHO-k1 cells on titanium surfaces. *Toxicology in Vitro*. **28**(3), 381–387. ISSN 0887-2333.

REZEK, Bohuslav, Ukraintsev EGOR, Marie KRÁTKÁ, Alexander KROMKA, Antonín BROŽ a Marie KALBACOVA, 2011. Biomedicínské aplikace diamantových vrstev. *Czechoslovak Journal of Physics*.

REZEK, Bohuslav, Lenka MICHALÍKOVÁ, Egor UKRAINTSEV, Alexander KROMKA a Marie KALBACOVA, 2009. Micro-pattern guided adhesion of osteoblasts on diamond surfaces. *Sensors (Basel, Switzerland)* [online]. **9**(5), 3549–3562. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s90503549

ROACH, Paul, Neil J. SHIRTCLIFFE a Michael I. NEWTON, 2008. Progress in superhydrophobic surface development. *Soft Matter* [online]. **4**(2), 224–240. ISSN 1744-6848. Dostupné z: doi:10.1039/B712575P

RONDELLI, G., P. TORRICELLI, M. FINI a R. GIARDINO, 2005. In vitro corrosion study by EIS of a nickel-free stainless steel for orthopaedic applications. *Biomaterials* [online]. **26**(7), 739–744. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.012

RUPP, F., L. SCHEIDELER, N. OLSHANSKA, M. DE WILD, M. WIELAND, 2006. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* [online]. **76**(2), 323–334. ISSN 1549-3296.

SANDLE, Tim, 2016. 2 - Microbiology and pharmaceuticals. In: *Pharmaceutical Microbiology* [online]. Oxford: Woodhead Publishing, s. 15–23. ISBN 978-0-08-100022-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100022-9.00002-5

SEDLÁČEK, Vladimír, 1992. *Povrchy a povlaky kovů*. B.m.: Praha, ČVUT.

SHIH, Chun-Che, Chun-Ming SHIH, Yea-Yang SU, Lin Hui Julie SU, Mau-Song CHANG a Shing-Jong LIN, 2004. Effect of surface oxide properties on corrosion resistance of 316L stainless steel for biomedical applications. *Corrosion Science* [online]. **46**(2), 427–441. ISSN 0010-938X. Dostupné z: doi:10.1016/S0010-938X(03)00148-3

SCHINDLER, 2009. *Mikrobiologie*. Praha: Grada.

SCHINDLER, Jiří, 2014. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů*. B.m.: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-4771-2.

SCHWARTZ-ARAD, Devorah, Nomi KIDRON a Eran DOLEV, 2005. A long-term study of implants supporting overdentures as a model for implant success. *Journal of Periodontology* [online]. **76**(9), 1431–1435. ISSN 0022-3492. Dostupné z: doi:10.1902/jop.2005.76.9.1431

SINCLAIR, Sarina K., Gina J. KONZ, John M. DAWSON, Richard T. EPPERSON a Roy D. BLOEBAUM, 2012. Host bone response to polyetheretherketone versus porous tantalum implants for cervical spinal fusion in a goat model. *Spine* [online]. **37**(10), E571-580. ISSN 1528-1159.

SWAR, Sumita, Veronika ZAJÍCOVÁ, Miroslava RYSOVÁ, Irena LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOŘOVÁ, Lukáš VOLESKÝ a Ivan STIBOR, 2017. Biocompatible surface modification of poly(ethylene terephthalate) focused on pathogenic bacteria: Promising prospects in biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **134**(26). ISSN 1097-4628.

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1703-1.

ŠLAMBOŘOVÁ, Irena, Veronika ZAJÍCOVÁ, Petr EXNAR a Ivan STIBOR, 2013. Antibakteriální vrstva působící proti patogenním bakteriím, zejména proti bakteriálnímu kmeni MRSA, a způsob vytvoření této vrstvy. Technická univerzita v Liberci, 303861. 29. květen 2013.

ŠŇUPÁREK, Petr, 2016. *Drsnost povrchu* [online]. 2016. B.m.: VŠB-TU Ostrava, Fakulta elektrotechniky a informatiky Katedra elektrických strojů a přístrojů – KAT 453. [vid. 2016-04-28].

TEHOVNIK, E. J., A. S. TOLIAS, F. SULTAN, W. M. SLOCUM a N. K. LOGOTHETIS, 2006. Direct and indirect activation of cortical neurons by electrical microstimulation. *Journal of Neurophysiology* [online]. **96**(2), 512–521. ISSN 0022-3077. Dostupné z: doi:10.1152/jn.00126.2006

TŮMOVÁ, Štěpánka, Petr LOUDA a Zbigniew ROZEK, 2007. *Uhlíkové vrstvy a jejich aplikace v medicíně. Jemná mechanika a optika*. 3. ISBN 0447-6441.

VAN LOOSDRECHT, M C, J LYKLEMA, W NORDE, G SCHRAA a A J ZEHNDER, 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**(8), 1898–1901. ISSN 0099-2240.

VINCENT, Andrea M. a Eva L. FELDMAN, 2002. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. **12**(4), 193–197. ISSN 1096-6374.

VO, Duc-Thang a Cheng-Kang LEE, 2017. Cells capture and antimicrobial effect of hydrophobically modified chitosan coating on *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* [online]. **164**, 109–117. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2017.01.093

VOS, Paul, George GARRITY, Dorothy JONES, Noel R. KRIEG, Wolfgang LUDWIG, Fred A. RAINEY, Karl-Heinz SCHLEIFER a William B. WHITMAN, 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 978-0-387-68489-5.

VOTAVA, Miroslav, 2006. *Lékařská mikrobiologie speciální*. B.m.: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.

WANG, Lu, Qirong XIONG, Fei XIAO a Hongwei DUAN, 2017. 2D nanomaterials based electrochemical biosensors for cancer diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. **89**, 2D Materials in Biosensors & Bioelectronics, 136–151. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2016.06.011

WATAHA, J. C., P. E. LOCKWOOD a A. SCHEDULE, 2000. Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures. *Journal of Biomedical Materials Research*. **52**(2), 360–364. ISSN 0021-9304.

WWW.IS.MUNI.CZ, 2018. *Tvary bakteriálních buněk* [online]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/pozorovani_mikroorganizmu.html

WWW.WIKISKRIPTA.CZ, 2018. *Struktura bakterií* [online]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Struktura_bakteri%C3%AD

XIAO, Xingcheng, Jian WANG, Chao LIU, John A. CARLISLE, Brian MECH, 2006. In vitro and in vivo evaluation of ultrananocrystalline diamond for coating of implantable retinal microchips. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. **77**(2), 273–281. ISSN 1552-4973.

YAMAMURA, Keisuke, Tadashi MIURA, I. KOU, Takashi MURAMATSU, 2015. Influence of various superhydrophilic treatments of titanium on the initial attachment, proliferation, and differentiation of osteoblast-like cells. *Dental Materials Journal* [online]. **34**(1), 120–127. ISSN 1881-1361.

ZENG, Guanghong, Ryosuke OGAKI a Rikke L. MEYER, 2015. Non-proteinaceous bacterial adhesins challenge the antifouling properties of polymer brush coatings. *Acta Biomaterialia* [online]. **24**, 64–73. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2015.05.037

ZINK, Mareike, 2013. Biocompatibility of Thin Films. In: *Thin Films and Coatings in Biology* [online]. B.m.: Springer, Dordrecht, Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering, s. 11–67 [vid. 2018-03-18]. ISBN 978-94-007-2591-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-2592-8_2

Přílohy

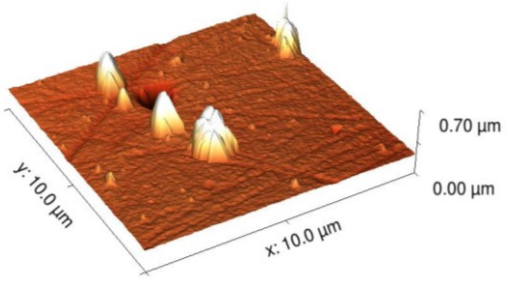
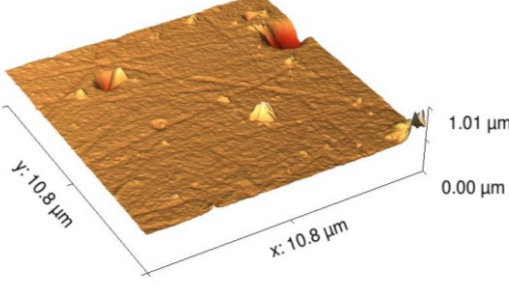
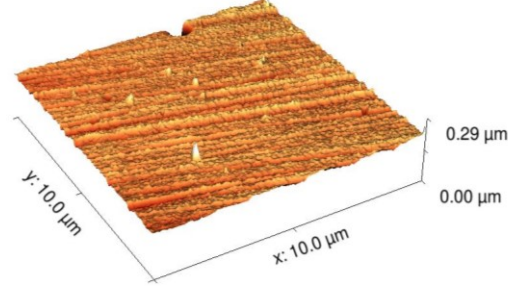
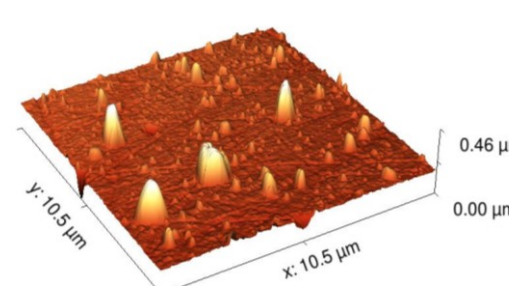
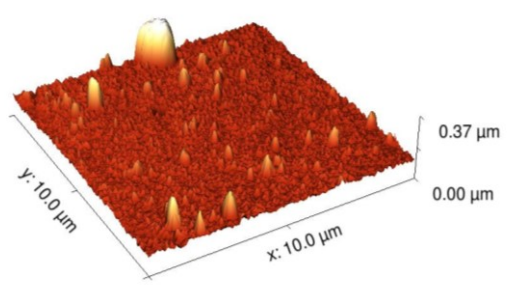
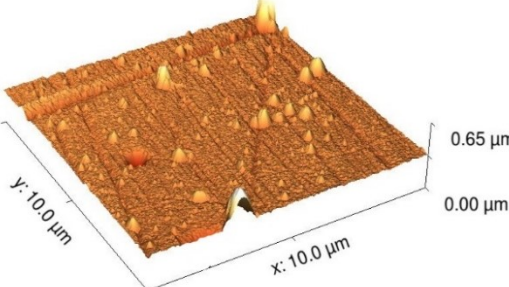
Příloha A: 3D modely povrchů	69
Příloha B: Výsledky měření fyzikálně-chemických parametrů vrstev	70
Příloha C: Výsledky měření bakteriální interakce s tenkými vrstvami	71
Příloha D: Obsah přiloženého CD	71

Seznam tabulek

Tabulka A1: 3D modely povrchů vytvořené pomocí mikroskopie atomárních sil.....	69
Tabulka B1: Kontaktní úhel u jednotlivých povrchů.....	70
Tabulka B2: Plošná drsnost povrchů.	70
Tabulka C1: Počet KTJ adherovaných na 1 cm ² povrchu vzorku (<i>E. coli</i>).	71
Tabulka C2: Počet KTJ adherovaných na 1 cm ² povrchu vzorku (<i>S. aureus</i>).....	71

Příloha A: 3D modely povrchů

Tabulka A1: 3D modely povrchů vytvořené pomocí mikroskopie atomárních sil.
Data byla naměřena na mikroskopu JPK Nanowizard 3. Naměřená data byla následně zpracována v softwaru Gwyddion 2.40.

TiCN-1	TiCN-2
	
TiCN-3	CrCN-1
	
CrCN-2	CrCN-3
	

Příloha B: Výsledky měření fyzikálně-chemických parametrů vrstev

Tabulka B1: Kontaktní úhel jednotlivých povrchů.

Vypočítané průměry a směrodatné odchylky na základě deseti měření.

[°]	Vzorek						
	Ocel	TiCN-1	TiCN-2	TiCN-3	CrCN-1	CrCN-2	CrCN-3
Před modifikací	78,99	81,74	82,14	78,11	85,11	82,33	80,13
Směr. odch.	2,17	4,79	3,66	2,50	3,58	3,85	2,41
Plazma Ar	69,46	65,33	70,29	71,66	65,61	67,30	68,98
Směr. odch.	5,00	6,36	4,41	4,17	3,83	5,41	4,44
Plazma O₂	55,54	58,69	68,76	66,23	56,88	66,84	68,01
Směr. odch.	4,76	6,66	3,74	7,46	10,18	6,84	4,44

Tabulka B2: Plošná drsnost povrchů.

Vypočítané průměry a směrodatné odchylky na základě tří měření.

[nm]	Vzorek						
	Ocel	TiCN-1	TiCN-2	TiCN-3	CrCN-1	CrCN-2	CrCN-3
Před modifikací	8,39	20,64	10,33	34,53	45,07	15,84	21,02
Směr. odch.	1,95	6,09	2,66	5,71	3,67	6,58	9,44
Plazma Ar	18,97	21,01	19,71	22,02	19,44	22,61	21,97
Směr. odch.	2,40	6,02	2,45	2,84	1,17	2,19	1,27
Plazma O₂	36,08	34,15	31,40	32,92	34,00	38,03	36,96
Směr. odch.	1,18	2,41	4,57	4,38	0,91	3,30	0,59

Příloha C: Výsledky měření bakteriální interakce s tenkými vrstvami

Tabulka C1: Počet KTJ adherovaných na 1 cm² povrchu vzorku po 1 h kontaktu s bakteriální suspenzí *Escherichia coli*.

Vypočítané průměry a směrodatné odchylky na základě tří měření.

KTJ	Vzorek						
	Ocel	TiCN-1	TiCN-2	TiCN-3	CrCN-1	CrCN-2	CrCN-3
Před modifikací	49,67	28,67	42,33	51,33	34,00	36,67	46,00
Směr. odch.	6,13	3,40	6,55	4,11	3,56	7,41	3,74
Plazma Ar	34,33	24,33	15,67	14,00	33,33	35,00	28,67
Směr. odch.	13,60	7,59	2,05	1,63	6,80	10,20	17,99
Plazma O₂	0,67	0,33	2,00	1,67	0,33	3,00	2,00
Směr. odch.	0,94	0,47	2,83	1,25	0,47	2,94	2,16

Tabulka C2: Počet KTJ adherovaných na 1 cm² povrchu vzorku po 1 h kontaktu s bakteriální suspenzí *Staphylococcus aureus*.

Vypočítané průměry a směrodatné odchylky na základě tří měření.

KTJ	Vzorek						
	Ocel	TiCN-1	TiCN-2	TiCN-3	CrCN-1	CrCN-2	CrCN-3
Před modifikací	2433	3633	2900	3167	1300	1333	1667
Směr. odch.	227	455	442	356	255	356	268
Plazma Ar	2467	2233	2933	2867	1633	2100	1933
Směr. odch.	402	782	227	286	147	354	349
Plazma O₂	2400	1433	2433	2433	2333	3200	4367
Směr. odch.	490	216	471	147	108	122	294

Příloha D: Obsah příloženého CD

text diplomové práce

- diplomova_prace_2018_Adela_Coufalova.pdf
- diplomova_prace_2018_Adela_Coufalova.doc