

Exosomy

Markéta Mullerová

Bakalářská práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

*

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Markéta Müllerová**
Osobní číslo: **T19646**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Exosomy**

Zásady pro vypracování

Studentka se seznámí s problematikou izolace, charakterizace a především významu exosomů. Zaměří se především na exosomy produkované kmenovými buňkami.

V praktické části provede experimenty vedoucí k ustanovení protokolu pro izolaci exosomů a stanovení jejich vlivu na chování eukaryotických buněk.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.
- [2] ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.
- [3] DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Martina Martínková**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- Že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožé.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Povrchy biomateriálů hrají důležitou roli při adhezi a následné proliferaci buněk. V této práci byly modifikovány čtyři různé povrchy za pomoci želatiny a bovinního sérového albuminu za účelem zkoumání vlivu povrchu na proliferaci a viabilitu buněk. Současně byla provedena izolace exosomů za pomoci komerčního kitu, které byly následně použity jako další modifikační složka. Vliv povrchů na viabilitu buněk myších fibroblastů byl vyhodnocen fluorescenčním mikroskopem a metodou MTT.

Klíčová slova: modifikace povrchu, exosomy, sérový albumin, želatina

ABSTRACT

Biomaterial surfaces play an important role in cell adhesion and subsequent proliferation. In this work, four different surfaces were modified with gelatin and bovine serum albumin to investigate the effect of the surface on cell proliferation and viability. At the same time, the exosomes were isolated by a commercial isolation kit, which were subsequently used as another modification component. The effect of surfaces on the viability of mouse fibroblast cells was evaluated by fluorescence microscopy and MTT method.

Keywords: surface modification, exosomes, serum albumin, gelatine

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

OBSAH

ÚVOD	9
I.TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BIOMATERIÁLY	11
1.1 TYPY MATERIÁLŮ	12
1.1.1 Keramika.....	12
1.1.2 Polymery	13
1.1.3 Kovy a kovové slitiny	13
2 MODIFIKACE POVRCHU	15
2.1 MODIFIKACE POVRCHU TENKÝMI FILMY	15
2.1.1 Chemické metody	15
2.1.2 Fyzikální metody	17
2.2 MODIFIKACE POVRCHU BIOPOLYMERŮ	19
2.2.1 Biopolymery	19
2.2.2 Želatina	20
2.2.3 Sérový albumin	20
3 EXOSOMY	22
3.1 BIOGENEZE	22
3.2 SLOŽENÍ EXOSOMŮ	23
3.2.1 Složení obalu exosomů	23
3.2.2 Obsah exosomů.....	24
3.3 IZOLACE EXOSOMŮ	25
3.3.1 Diferenciální ultracentrifugace	25
3.3.2 Ultrafiltrace	27
3.3.3 Srážení exosomů na bázi polymeru	28
3.3.4 Imunoafinitní zachycení exosomů	28
3.4 APLIKACE EXOSOMŮ	29
3.4.1 Exosomy jako biomarkery	29
3.4.2 Exosomy jako distributory léčiv	29
II.PRAKTICKÁ ČÁST	31
4 CYTO-KOMPATIBILITA MATERIÁLŮ	32
4.1 BUNĚČNÁ KULTURA A KULTIVAČNÍ MÉDIUM	32
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	32
4.3 EXPERIMENT	32
4.3.1 Kultivace a trypsinizace.....	33
4.3.2 Příprava vzorků.....	33
4.3.3 Barvení a fixace buněk	34
4.3.4 Test MTT	35
4.4 IZOLACE EXOSOMŮ	35
4.4.1 Příprava vzorku.....	35
4.4.2 Izolace exosomů	35
5 VÝSLEDKY	37

5.1	VYHODNOCENÍ ADHEZE FLUORESCENČNÍM MIKROSKOPEM	37
5.2	VYHODNOCENÍ PROLIFERACE FLUORESCENČNÍM MIKROSKOPEM PO 48HODINÁCH	38
5.3	VYHODNOCENÍ PROLIFERACE FLUORESCENČNÍM MIKROSKOPEM PO 96 HODINÁCH 40	
5.4	VYHODNOCENÍ MTT PO 96 HODINÁCH PROLIFERACE	42
5.5	IZOLACE EXOSOMŮ	42
	DISKUZE	46
	ZÁVĚR	47
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	52
	SEZNAM OBRÁZKŮ	53
	SEZNAM GRAFŮ	54
	SEZNAM TABULEK.....	55

ÚVOD

V oblasti biomateriálů dochází k neustálému vývoji. Biomateriály jsou hojně využívány v oblasti medicíny. Velmi důležitou roli u biomateriálů hrají jejich povrchy, kde dochází k interakci s buňkami/tkáněmi. Pro dobré přijetí biomateriálu hostitelským systémem, jsou především důležité povrchové vlastnosti jako je například topografie povrchu a povrchové napětí. Dalšími důležitými faktory biomateriálů je biokompatibilita, bioadheze a biointerakce buněk s povrchem. Pro docílení co nejideálnějších podmínek pro buněčnou viabilitu a interakci s biomateriály mohou být povrchy materiálů modifikovány. Pomocí povrchových modifikací lze dosáhnout optimálního nastavení vlastností, které jsou vyžadovány pro konkrétní aplikaci. Jednou z nejčastěji používaných povrchových úprav je modifikace tenkým filmem, kdy mohou být použity například různé biopolymery, které dodají materiálu potřebnou bioaktivitu. Dále mohou být pro úpravu povrchu materiálu použity například exosomy, které jsou skvělé pro využití v medicíně hned z několika důvodů. Exosomy jsou produkovány jak prokaryotickými, tak eukaryotickými buňkami. V lidském těle je můžeme kromě buněk nalézt také v tělních tekutinách, jako je například mateřské mléko, krev sliny nebo moč. Exosomy obsahují nukleové kyseliny a mají ve svém obalu specifické proteiny, díky kterým mohou působit jako biomarkery různých onemocnění. Další zajímavou vlastností je to, že dokáží zprostředkovávat mezibuněčnou komunikaci díky tomu, že přenášejí svůj biologicky aktivní obsah ve formě nukleových kyselin do vzdálených buněk a tím se podílejí na změnách genové exprese v cílových buňkách.

V praktické části této práce je popsána studie srovnávající buněčnou adhezi a proliferaci na různých typech povrchu bez a s povrchovými úpravami.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁLY

Biomateriály jsou syntetické materiály, které lze použít v lékařských aplikacích k nahrazení části živého systému, k fungování v těsném kontaktu s živou tkání. Nebo jako aplikační systém pro léčivo [1]. Biomateriál je určen k interakci na rozhraní biologických systémů. Poprvé byly biomateriály definovány v roce 1974 jako systematicky a farmakologicky inertní látky určené k implantaci nebo začlenění do živého systému. S pokrokem vědy se tato definice měnila až do roku 1986, kdy byla Evropskou společností pro biomateriály zavedena definice nová [2][3].

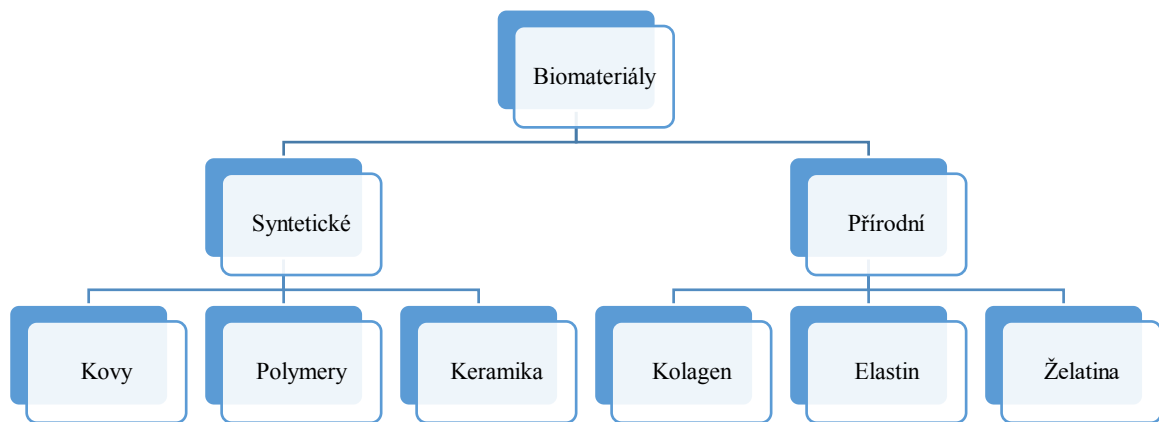
„Biomateriály jsou neživotaschopné materiály, používané v lékařských zařízeních, určené k interakci s biologickými systémy“ [2].

Tato definice byla využívána v době, kdy byly biomateriály v medicíně používány především k léčbě či nahrazení tkání, aniž by bylo zapříčiněno nepříznivé reakci tkáně hostitele. V průběhu let se však začaly biomateriály využívat i jiným způsobem než jen jako implantované materiály, například jako systémy na podávání léků, jako zobrazovací kontrastní činidla nebo při konstrukcích tkáňového inženýrství. Z tohoto důvodu vznikla v roce 2018 upravená definice [4].

„Materiál navržený tak, aby získal formu, která může prostřednictvím interakcí s živými systémy řídit průběh jakéhokoli terapeutického nebo diagnostického postupu.“ [4].

Biomateriál musí být biokompatibilní, tzn. že by měl být přívětivý k biologickému systému a nezpůsobovat systému žádné škody, jak na buněčné úrovni, tak i na úrovni celého systému. Zároveň by měl biokompatibilní materiál vyvolat vhodnou odezvu hostitele nebo by měl být schopen vykonávat funkci ve specifické aplikaci bez přítomnosti nežádoucích reakcí [1].

Tyto materiály lze roztrždit podle několika kritérií. Za prvé, můžeme biomateriály posuzovat z hlediska krystalické struktury, na materiály krystalické, semikrystalické a amorfní. Za druhé, lze biomateriály klasifikovat na základě jejich původu, na přírodní a syntetické materiály. Toto rozdělení je vyobrazeno na obrázku 1. Za třetí, můžeme zvážit klasifikaci dle druhu použitého materiálů jako polymery, kovy, keramiku a kompozity. Ve třetím případě je role biomateriálů řízena interakcí mezi materiálem a tělem hostitele, konkrétně vlivem prostředí těla na materiál a vlivem materiálu na tělo [3],[1].



Obrázek 1. Schéma rozdělení biomateriálů

1.1 Typy materiálů

1.1.1 Keramika

Jedná se o pevný materiál charakteristický pro své iontové vazby nebo jejich kombinaci s vazbami kovalentními. Keramika může být krystalické nebo amorfní povahy. Vzhledem k typu jejich vazeb, je keramika velmi obtížně deformovatelná a má nízkou tažnost. Obecně lze říci, že jde o extrémně tvrdý a křehký materiál, který má dobrou odolnost vůči teple a je dobrým izolantem elektrického náboje. Jako biomateriál se nejčastěji používá na kloubní protézy, korunky pro zubní implantáty a srdeční chlopně [2]. Mezi materiály, ze kterých se keramické biomateriály vyrábí, spadají například tzv. alumina (Al_2O_3), zirkonia (ZrO_2) nebo různé formy uhlíků. Další oblastí je tzv. resorbovatelná keramika, která degraduje po implantaci do hostitele a je nahrazena endogenními tkáněmi. Téměř všechny bioresorbovatelné keramiky jsou variacemi fosforečnanu vápenatého. Fosforečnan vápenatý byl syntetizován a používá se pro výrobu různých forem implantátů, stejně jako pro pevné nebo porézní povlaky na jiných implantátech. Fosforečnan vápenatý může krystalizovat, v závislosti na poměru vápníku a fosforu, vlhkosti a teplotě, na soli, jako je hydroxyapatit a β -whitlockit. Obě tyto formy jsou vysoce biokompatibilní, hydroxyapatit se navíc přirozeně vyskytuje v přírodních kompozitech, což může být například dentin či zubní sklovina a jsou primární anorganickou složkou kostí [3],[5]. Další z variací je β -

trikalciumpfosfát, neboli TCP, který poskytuje větší stabilitu a má vlastnosti osteokondukce a progresivní absorpce v procesu novotvorby kosti [6].

1.1.2 Polymery

Polymery jsou organické materiály s dlouhými molekulárními řetězci, které jsou vzájemně propojeny převážně kovalentními vazbami. Polymery mohou být krystalické, amorfní nebo kombinací obou. Tyto materiály jsou dobře deformovatelné a tvárné, avšak ve srovnání s keramikou a kovy, mají nízký modul pružnosti. Dalšími výhodami polymerních biomateriálů v porovnání s kovovými a keramickými materiály je snadná výroba různých forem materiálu (vlákna, fólie, latex atd.), dále snadná sekundární zpracovatelnost, cenová dostupnost a požadované mechanické a fyzikální vlastnosti. V posledních letech se jejich obliba v biomateriálech rapidně zvýšila a jsou používány jako stehy, polymethylenmethakrylát je součástí kardiostimulátorů jako krevní pumpa, dále to mohou být také fixační dlahy a šrouby, kontaktní čočky a další [2],[3]. Velmi významnou roli v biomateriálech hraje například polyethylen s ultravysokou molekulovou hmotností (UHMWPE), ze kterého jsou vyráběny endoprotézy kolen a kloubů obecně. U téměř 80 % endoprotéz kyčelního kloubu se používá UHMWPE jako acetabulární miska kloubující tvrdou hlavici femuru [7]. Široce rozšířené jsou i biologicky odbouratelné polymery, jako je polylaktid (PLA), polyglykolid (PGA), poly(glykolid-ko-laktid) (PLGA) a tak podobně. PLA, PGA a PLGA jsou bioresorbovatelné polyestery patřící do skupiny poly- α -hydroxykyselin a degradují nespecifickým hydrolytickým štěpením jejich esterových vazeb. Například hydrolýzou PLA vzniká kyselina mléčná, která je vedlejším produktem anaerobního metabolismu v lidském těle a je začleněna do cyklu trikarboxylových kyselin, kdy je z těla vyloučena jako oxid uhličitý a voda [3]. Zajímavým polymerem je díky svým vlastnostem, jako je netoxičita, biokompatibilita, optická transparentnost, chemicky inertní povaha, dobrá elasticita a snadná zpracovatelnost, například i polydimethylsiloxan (PDMS), který má široké využití v mikrofluidních biosenzorových zařízeních, bioanalytické chemii a nebo při aplikacích umělé rohovky [8].

1.1.3 Kovy a kovové slitiny

Kovy jsou využívány ve zdravotnických zařízeních jako biomateriály jednak pro jejich vynikající elektrickou vodivost, ale především pro své mechanické vlastnosti. Protože kovy obsahují volné elektrony, které působí zároveň jako vazebná síla, mohou velmi rychle přenášet elektrický náboj i tepelnou energii. Některé kovy se používají jako pasivní náhrady

tvrdých tkání, jako jsou totální kyčelní a kolenní endoprotézy, dále při zlomeninách jako vnější a vnitřní fixátory ve formě kostních dlah a šroubů, spinální fixační zařízení a zubní implantáty, a to především díky svým mechanickým vlastnostem a odolnosti proti korozi. Při výrobě kovových biomateriálů se používají hlavně nerezové oceli a slitiny kobaltu a titanu [9],[3]. Implantáty na bázi kobaltu jsou více odolné mechanickému opotřebení ve srovnání se slitinami titanu. Z tohoto důvodu jsou slitiny kobaltu používány v umělých kyčelních kloubech, kde je přímý kontakt mezi hlavicí femuru a kostí, což může vést časem k opotřebení materiálu. Tyto slitiny obsahují značné množství niklu, díky čemuž jsou lépe slévatelné a zpracovatelné, avšak nevýhodou může být alergizující účinek této sloučeniny [9],[10]. Titan má výbornou biokompatibilitu a je vysoce odolný vůči korozi ve fyziologickém prostředí, a to hlavně díky stabilní tenké vrstvě oxidu titaničitého, který se na povrchu titanu spontánně tvoří. Přítomnost této oxidové vrstvy podporuje integraci buněk což umožňuje silnější kontakt mezi implantáty na bázi Ti a tkáněmi ve srovnání například s ocelí. Co se týče čistého titanu, komerčně se využívá pro aplikace endoseálních zubních implantátů [11],[12]. Ke zvýšení mechanické pevnosti Ti se využívá metody legování. Mezi takto upravený Ti spadá i nejvíce používaná slitina Ti-6Al-4V, která obsahuje příměs hliníku a vanadu, díky čemuž nabízí lepší pevnostní profil ve srovnání s čistým titanem a to bez výrazných vlivů na ostatní vlastnosti [10].

2 MODIFIKACE POVRCHU

Povrch biomateriálu je prvním místem, kde dochází ke kontaktu mezi biologickou a materiálovou částí, proto se zde odehrává i většina biologických reakcí. Biologické reakce jsou ovlivněny jednak chemickými vlastnostmi, ale i strukturou povrchu. Pokud biomateriál nemá vhodné povrchové vlastnosti (jako je např. povrchová energie, funkční skupiny na povrchu nebo topografie), jeho aplikovatelnost v reálném systému klesá. S vývojem nových biomateriálů bývá modifikace vybraných mechanických a biologických vlastností biomateriálů, které by vyhovovaly specifickým potřebám při dané aplikaci, méně časově náročnější a ekonomičtější [13]. Z tohoto důvodu se modifikují právě vrchní vrstvy materiálu. Povrchy materiálů lze různě modifikovat a tím zároveň optimalizovat jejich biokompatibilitu a biointerakci. Cílem je zachovat klíčové fyzikální vlastnosti a zároveň upravit vnější povrch tak, aby pozitivně ovlivnil biointerakci. Kromě toho, může modifikace povrchu například imobilizovat biomolekuly či zabránit nespecifické interakci nebo adsorpci biomolekul.

Povrchové úpravy lze rozdělit do dvou kategorií:

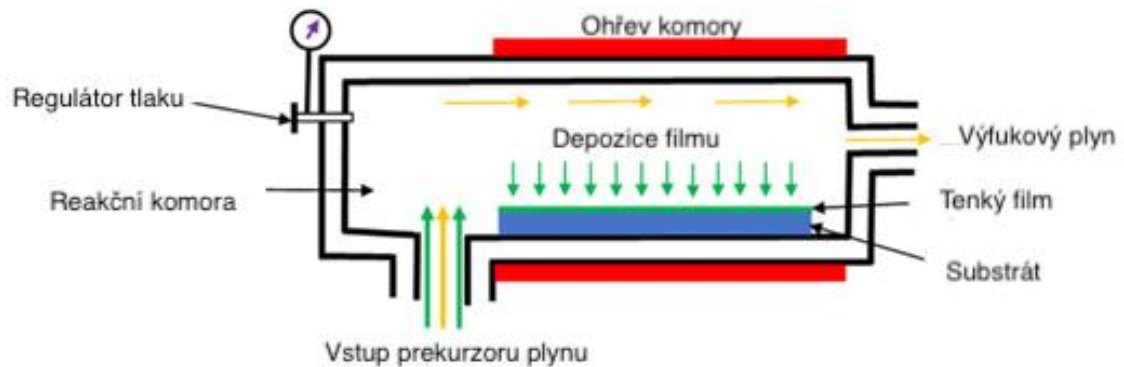
- a) Chemická nebo fyzikální změna atomů nebo molekul na povrchu (např. leptání)
- b) Coating povrchu materiálem s jiným složením (povlakem rozpouštědla, nanesením tenkého filmu, radiačním roubováním nebo plazmováním) [14]

2.1 Modifikace povrchu tenkými filmy

Nanášení tenkých filmů nebo povlaků je účinnou technikou v povrchové úpravě materiálů a v inženýrství. Metody depozice tenkých vrstev lze rozdělit podle povahy procesu na fyzikální a chemické. Chemické metody zahrnují depozice z plynné či kapalné fáze, zatímco fyzikální metody obvykle zahrnují odpařování, naprašování a stříkání [13].

2.1.1 Chemické metody

Chemické depozice kategorizujeme dle fáze prekursoru na pokovování, Langmuir-Blodgettova nanášecí technika, spin coating, chemická depozice z plynné fáze, plazmová polymerace a ponořování. Obecné schéma pro chemické metody je zobrazeno na obrázku 2 [15].



Obrázek 2. Schéma chemického potahování tenkých filmů. Převzato a upraveno z [15].

Pokovování

Pokovování označuje proces povrchového pokrytí substrátu za pomoci částic kovu, díky čemuž upraví povrch na elektricky vodivý. Běžně se používají kapalné prekurzory, nejčastěji roztok vody se solí. Sůl v roztoku by měla být vyrobena z kovu, který se má ukládat na povrch vzorku. Galvanické pokovování je komerčně nejdůležitější proces pokovování. Při galvanizačních technikách musí být ionty kovu pravidelně doplňovány, když jsou vytahovány z roztoku v lázni. Typickou aplikací galvanického pokovování je vytváření mincí a medailí používaných pro peníze a trofeje ve většině zemí [15].

Chemická depozice z plynné fáze zesílená plazmou

Tato metoda patří mezi dobře známé depozice tenkých vrstev, která využívá chemické reakce prekurzorů v plynné fázi. Je zapotřebí zvýšené teploty v průběhu nanášení, což značně omezuje typy substrátu, které lze použít. Kromě teploty jsou do systému dodávány fotony a plazma. Chemická depozice z plynné fáze zesílená plazmou, je technika, kdy se místo tepelné energie používá plazma, která se využívá primárně k aktivaci iontů a radikálů v chemických reakcích. Výhodou této metody oproti klasické tepelné chemické depozici plynem je nižší teplota, která umožňuje nanášení vrstev na substráty citlivé na zvýšenou teplotu. V biomedicínských aplikacích jsou používány především tenké filmy na bázi křemíku, jako je amorfni křemík, karbid křemíku či nitrid křemíku.[13]

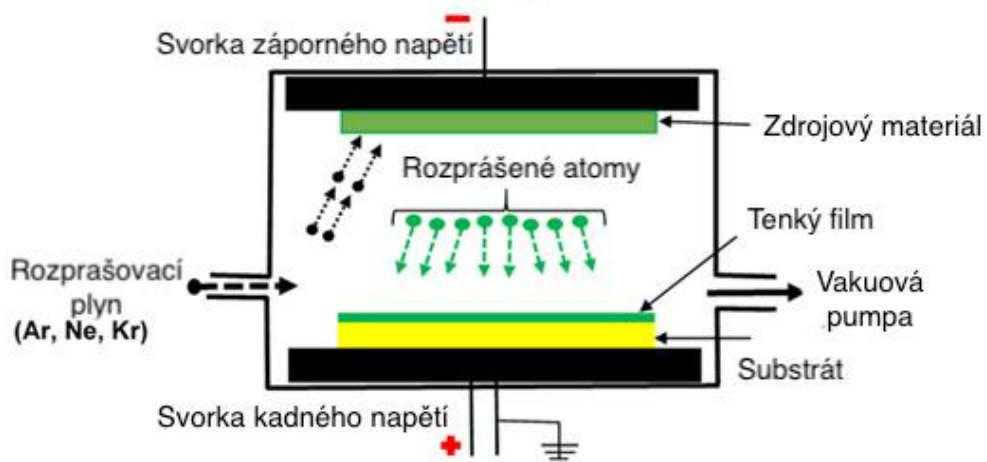
Plazmová polymerace

Plazmová polymerace zahrnuje fragmentaci s následnou depozicí organických prekurzorů a monomerů. Plynný organický monomer se přivádí do reakční komory buď samostatně nebo s nosným plynem, jako je argon nebo helium. Zde vytváří plazmu a rekombinuje se na povrchu tak, aby se dosáhlo tenkého filmu. Plazmové polymery neobsahují řetězce

s pravidelně se opakujícími jednotkami, ale mají tendence tvořit rozvětvenou nebo zesíťovanou síť, díky čemuž mohou mít mechanické vlastnosti a dobrou adhezi k většině substrátů [13].

2.1.2 Fyzikální metody

Fyzikální metody nanášení povlaků se běžně nazývají fyzikální napařování (PVD). PVD je proces, při kterém se materiály převádějí z pevné fáze do plynné fáze a poté se vrací do tenkovrstvé pevné fáze. Tenkovrstvá pevná látka se ukládá na povrch substrátu. Substrát je strategicky umístěn tak, aby přitahoval energetické částice. Také substráty mají nižší energii, aby umožnily kondenzaci odpařených částic, a díky tomu na nich vytvořily tenké pevné filmy. Nanášecí komora je udržována ve vakuu, aby se umožnil volný pohyb odpařených částic. PVD se komerčně používá v několika oblastech, včetně výroby tenkovrstvých solárních panelů, hliníkové polyethylentereftalátové fólie pro balení potravin a balónek a řezných nástrojů potažených nitridem titanu pro obrábění kovů. Obrázek 3. ukazuje schéma typického způsobu fyzického nanášení.[15]



Obrázek 3. Schéma fyzikálního napařování tenkého filmu. Převzato a upraveno z [15].

Mezi fyzikální metody spadá depozice katodickým obloukem, pulzní laserová depozice, napařovací depozice, elektrohydrodynamická depozice, metoda sol-gel nebo spray coating. Následující podkapitoly budou zaměřeny pouze na nejčastěji používané metody a sice sol-gel metoda a spray coating [15].

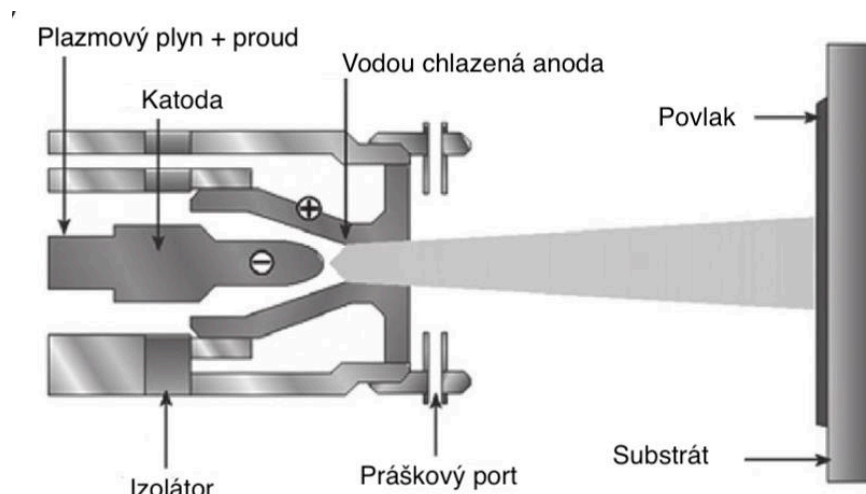
Sol-gel metoda

Technologie sol-gel existuje již od poloviny 19. století [16]. Jedná se o metodu pro přípravu tenkých oxidových filmů a kompozitních filmů obsahující oxid. Byly popsány jak oxidy, tak

různé typy organicko-anorganických hybridních filmů. Oxidy i hybridní filmy jsou obvykle amorfní při běžné teplotě, ale některé oxidy lze zahřátím převést na krystalickou fázi [17]. Proces se skládá ze tří částí (1) příprava roztoku prekurzoru, (2) depozice solu na substrát a (3) tepelné zpracování pro zhuštění. Prekurzory jsou běžné alkoxidy kovů v organických rozpouštědlech nebo kovové soli ve vhodných roztocích. Kromě lepší kontroly chemického složení a mikrostruktury filmů nabízí metoda sol-gel výhody oproti jiným povlakům tenkým filmem, včetně přípravy homogenních filmů, jednodušší vybavení a nižší náklady [13]. Ačkoliv se metoda sol-gel v některých zdrojích uvádí jako chemická metodou, jako je tomu například ve článku Optical properties of CdSe nanoparticle film prepared by chemical deposition and sol-gel methods od autora E. Lifshitz, my zůstaneme u zařazení ve fyzikálních metodách podle zdroje [13].

Spray coating

Spray coating můžeme dělit na dvě metody (1) konvenční metoda studeného nástřiku a (2) termické nástřiky. Metoda tepelného nástřiku se používá k nanášení kovových i nekovových povlaků. Tepelný nástřik funguje na bázi roztavených nebo poloroztavených částic, které jsou urychlovány a poháněny směrem k povrchu a nástřikují na substrát vysokou rychlostí za účelem přípravy povlaků o tloušťce 0,5-2 mm. Při dopadu na povrch se vytvoří vazba mezi povrchem a částicí a vytvoří se laminární struktura [18]. Podle zdrojů ohřevu pro roztavení částic dělíme tepelné nástřiky na nástřik plamenem, elektrickým obloukem, plazmou a nástřik detonační pistolí. Technika plazmového nástřiku je nejběžnější metodou. Vysoká energie vysokofrekvenčního elektrického oblouku je zažehnuta mezi katodou a anodou pomocí plynu tvořícího plazmu (Ar, He, H₂), taje a rozprašuje částice na substrát vysokou rychlostí. Částice poté podléhají tvorbě rozstříku, jeho vrstvení a vytváření povlaku, než se zploští a ztuhnou na substrátu. Schématické znázornění plazmového nástřiku je uvedeno na obrázku 4. Plazmový nástřik je vhodnou metodou pro nanášení biokeramických povlaků, mohou zlepšovat bioaktivitu a osteokonduktivitu materiálu [13].



Obrázek 4. Plazmový nástřík. Převzato a upraveno z [13]

2.2 Modifikace povrchu biopolymerů

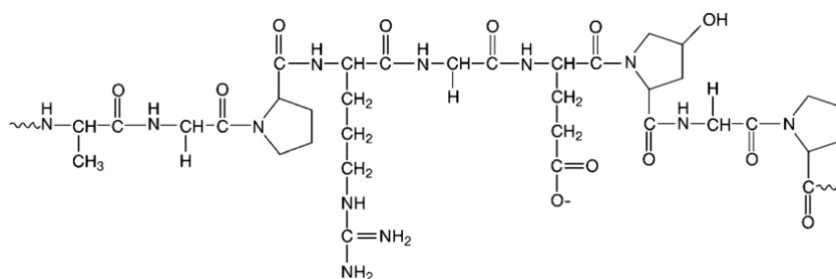
2.2.1 Biopolymery

Biopolymery jsou produkovány živými organismy, které jsou tvořeny monomerními jednotkami, jako jsou nukleové kyseliny, sacharidy a aminokyseliny buď s lineárně strukturovanými nebo rozvětvenými molekulami[19]. Přírodní polymery jsou obecně považovány za biologicky odbouratelné, biokompatibilní a netoxické. Jejich výrobní proces je ekologický a ekonomický, zároveň jsou hojně a snadno dostupné a mohou podléhat chemické modifikaci. Přírodní polymery však vykazují určitá omezení, jako je mikrobiální kontaminace, variace mezi jednotlivými šaržemi a potíže s izolací a čištěním [20]. U některých biopolymerů (např. chitosan, celulóza, pektin,...) bylo identifikováno, že mají elektronovou a iontovou vodivost, a proto byly označeny jako elektroaktivní biopolymery (EABP) [21]. Biopolymery lze do značné míry klasifikovat z hlediska různých segregčních kritérií. Podle jejich biologické rozložitelnosti se dělí na biodegradovatelné a biologicky nerozložitelné biopolymery, přičemž podle původu je lze klasifikovat jako vyrobené z přírodních zdrojů a fosilních paliv. Podobně se na základě teplotní odezvy dělí na elastomery, termoplasty a termosety. Na základě jejich složení se dělí do tří skupin, a to na směsi, lamináty a kompozity. Jedním z převážně sledovaných klasifikačních kritérií biopolymerů je zdroj surovin, podle kterého je lze seskupit do tří typů, a to přírodní, syntetické a mikrobiální biopolymery. Na základě své chemické struktury jsou přírodní polymery klasifikovány do tří tříd, jako jsou polysacharidy, proteiny a polyestery. Mezi běžné biopolymery na bázi proteinů patří albumin, želatina, legumin, které se běžně používají pro přípravu nano-strukturovaných molekul pro dodávání léčiv díky jejich

výhodám. Tyto výhody jsou například minimální velikost, dlouhodobá stabilita a bioadhezivní vlastnosti [19].

2.2.2 Želatina

Želatina (obrázek 5.) je jedním z nejuniverzálnějších přirozeně se vyskytujících biopolymerů. Lze ji rozdělit do dvou typů, tj. na typy A a B, které jsou určeny předúpravou během procesu výroby želatiny. Je to polyelektrolyt s čistým nábojem závislým na typu želatiny a pH prostředí. Složením se jedná o bílkovinný hydrokoloid získaný částečnou hydrolýzou kolagenu. Zatímco kolagen je nerozpustný ve vodě, želatina se snadno rozpustí ve vodě po zahřátí na teploty nad denaturační teplotou nativního kolagenu. Želatina je heterogenní směs jednovláknových nebo vícevláknových polypeptidů, z nichž každý má prodlouženou konformaci levotočivé prolinové šroubovice a obsahuje 300 až 4000 aminokyselin. Má široké využití v potravinářských výrobcích a farmaceutických dávkových formách. Želatinu lze vyrábět jak ze savců, tak z rybích zdrojů, ale fyzikální vlastnosti těchto želatin jsou odlišné. Přírodní želatiny nebo rekombinantní želatiny jsou upraveny tak, aby zlepšily výkonnost produktu, čímž se rozšířila jejich použitelnost v biologii a medicíně. Díky své biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a nízké antigenicitě želatiny ve fyziologickém prostředí z ní činí také atraktivní možnost pro tkáňové inženýrství, krytí ran či chirurgická adheziva [22],[23],[20].



Obrázek 5. Chemický vzorec želatiny

2.2.3 Sérový albumin

Sérový albumin (SA) se řadí do rodiny homologních proteinů vyznačujících se charakteristickými strukturálními rysy a vlastnostmi, díky kterým dokáží vázat ligand. Monomery hovězích sérových albuminů (BSA) se podobně jako monomery jiných sérových albuminů spojují v dimery, vyššími oligomery nebo agregáty. Tvorba oligomerní proteinové struktury určuje a reguluje funkci proteinu a zlepšuje stabilitu proteinu. Monomery a oligomery jsou za fyziologických podmínek v dynamické rovnováze. Na druhé straně se může objevit nežádoucí oligomerizace a agregace během zmrazování, rozmrazování,

skladování vzorků atd. Lidský sérový albumin (HSA) je nejhojnějším proteinem v krevní plazmě. Jedná se o monomerní vícedoménovou makromolekulu, představující hlavní determinantu plazmatického onkotického tlaku. SA je hlavním modulátorem distribuce tekutin mezi tělesnými kompartmenty. Sérový albumin vykazuje mimořádnou schopnost na sebe vázat ligandy a poskytuje nosiče pro mnoho endogenních a exogenních sloučenin. Zároveň je hlavním nosičem mastných kyselin (MK), ovlivňuje farmakokinetiku mnoha léků, zajišťuje metabolickou modifikaci některých ligandů, zneškodňuje potenciální toxiny, představuje většinu antioxidační kapacity lidské plazmy a může mít pseudo-enzymatické vlastnosti. HSA je i cenným biomarkerem mnoha nemocí, včetně rakoviny, revmatoidní artritidy, ischemie, postmenopauzální obezity, závažné akutní reakce štěpu proti hostiteli a nemocí, které vyžadují monitorování glykemické kontroly. Kromě toho je HSA široce klinicky využíván k léčbě několika onemocnění, včetně hypovolemie, šoku, popálenin, chirurgické ztráty krve, traumatu, krvácení, kardiopulmonálního bypassu, syndromu akutní respirační tísně, hemodialýzy, akutního selhání jater, chronického onemocnění jater, nutriční podpory, resuscitace, a hypoalbuminémie. Albuminy nacházejí uplatnění také v biotechnologiích a biofarmaceutice. Například se jedná o funkce jako je transport O_2 , nanodistribuce, zachycování ligandů, fúzní proteiny, implantovatelné biomateriály, chirurgická lepidla, sealanty atd. Sérové albuminy se používají jako pomocná látka pro vakcíny nebo terapeutické proteinové léky a jako doplněk buněčného kultivačního média. Sérové albuminy mají vysoký stupeň homologie [24],[25].

3 EXOSOMY

Exosomy jsou extracelulární vezikuly vnitrobuněčného původu, produkované prokaryotickými i eukaryotickými buňkami [26]. V lidském těle mohou být exosomy produkovány všemi dosud zkoumanými typy buněk [27]. Přirozeně se vyskytují v tělních tekutinách včetně krve, slin, moči, epididymální tekutiny, plodové vody, maligních a pleurálních výpotků ascitu, bronchoalveolární laváže, synoviální tekutiny a mateřského mléka [28]. Jejich velikosti se pohybují v rozmezí od 30nm do 150nm [26]. Exozomy jsou uzavřeny lipidovou dvojvrstvou membránou, obsahující fosfatidylserin, aby chránily obsah před degradací enzymy. Díky této schopnosti exozomů, chránit svůj obsah před pohlcením fagocyty, jsou vhodné pro zprostředkování mezi-buněčné komunikace. Podílí se tak na řízení řady procesů včetně zánětu, angiogeneze, imunitních reakcí, koagulace a regenerace neuronů [29].

3.1 Biogeneze

Molekulární složky v exozomech pocházejí z různých buněčných kompartmentů, jako jsou Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, plazmatické membrány, jádro a cytosol. Mitochondriální proteiny se na biogenezi exosomů nepodílejí [30]. Exosomy jsou generovány vchlípením endosomální membrány za vzniku intracelulárních multivesikulárních kompartmentů, zvaných také jako multivezikulární tělíska (MVB) [29]. Následkem invaginace pozdních endozomálních membrán je tvorba intraluminálních váčků (ILV) v rámci velkých MVB [27]. Během tohoto procesu jsou určité proteiny začleněny do invaginační membrány, zatímco cytosolické složky jsou pohlceny a uzavřeny v ILV. Většina ILV se uvolňuje do extracelulárního prostoru po fúzi s plazmatickou membránou [30]. ILV, které nesplynou s plazmatickou membránou, jsou transportovány do lysozomů za účelem degradace.

Princip ubikvitinace

Ubikvitin je polypeptid o 76 aminokyselinách, který je typicky připojen k proteinům prostřednictvím izopeptidových vazeb mezi karboxylovým koncem ubikvitinu a aminoskupinou lysinových postranních řetězců na cílových proteinech. Ubikvitinace je reversibilní proces spadající do postranslačních modifikací, kdy se přidávají molekuly ubikvitinu k lysinovým zbytkům proteinu, díky čemuž dokážou odštěpit ubikvitin od modifikovaných zbytků proteinu. Po ubikvitinaci je většina proteinů zacílená na proteozom 26S za účelem jejich degradace [31],[32],[33]. Exozomy také obsahují ubikvitinované

proteiny, což naznačuje, že podskupina ubikvitinovaných cytoplazmatických proteinů je aktivně začleněna do dráhy MVB [34]. Třídění ubikvitinovaných proteinů na MVB je zprostředkováno řadou proteinů zapojených do vakuolárního třídění proteinů (VPS), nazývaných endosomální třídící komplex požadovaný pro transport ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) a je z velké části zapojen do biogeneze exosomů [35][36]. ESCRT obsahuje čtyři hlavní komplexy 0, I, II, III a další asociované proteiny, které jsou zodpovědné za akumulaci a třídění molekul směřovaných do ILV, a tudíž se podílejí na vzniku MVB, odštěpení ILV i sekreci exosomů. ESCRT 0 se skládá ze dvou podjednotek a sice ze substrátu tyrosinkinázy regulovaný růstovým faktorem hepatocytů (Hrs) a molekuly adaptéru transdukující signál $\frac{1}{2}$ (STAM1/2). Obě podjednotky na sebe vážou ubikvitin a poskytují další modul cílení, který podporuje jejich vazbu na endosomy [36]. Na endosomech vstupují ubikvitinované membránové proteiny do dráhy MVB, zatímco neubikvitinované proteiny jsou recyklovány zpět do plazmatické membrány nebo do Golgiho komplexu. Proteiny TSG101 jsou součástí ESCRT-I, tvoří komplexy s ubikvitinovanými nákladními proteiny a tím se aktivuje ESCRT-II. V důsledku toho jsou pak sekvenovány proteiny MVB, deubikvitinační enzym je aktivován k odstranění ubikvitinu z proteinu před tříděním do ILV. Molekuly, které inhibují komplex ESCRT, mohou zároveň zabránit uvolňování exosomů [37]. Tvorba exozomů navzdory inhibici složek ESCRT poukazuje na existenci dráhy, která je nezávislá na ESCRT a může zahrnovat tetraspaniny, proteiny tepelného šoku (HSP), ceramidy, cholesterol a kyseliny fosfatidové [38].

3.2 Složení exosomů

3.2.1 Složení obalu exosomů

Exosomy jsou obklopeny lipidovou dvojvrstvou s charakteristickými a buněčně specifickými membránovými proteiny. Povrch exosomů obsahuje několik různých buněčně specifických proteinů, jako jsou tetraspaniny, adhezní molekuly (jako integriny) a receptory. Rozdíl povrchových molekul určuje specifčnost zacílení exosomů-recipientních buněk [39]. Ve srovnání s jinými typy membrán mají membrány exosomů vysoký poměr proteinů a lipidů. Lipidová fáze exozomálních membrán je obohacena o sfingomyelin, cholesterol a nenasycené druhy fosfatidylcholinu a fosfatidylethanolaminu, které zajišťují vysokou tuhost membrány [30]. Kromě toho mohou lipidy také hrát roli při třídění specifických proteinů do exozomů [39]. Membránové proteiny exosomů jsou klíčovou složkou při

mezibuněčné komunikace, protože mohou zapojit receptory recipientních buněk k indukci intracelulární signalizace a z tohoto důvodu je složení exosomů rozhodujícím určujícím faktorem jejich účinků [40].

3.2.2 Obsah exosomů

Složení exosomů je velmi podobné se složením jejich mateřských buněk. V porovnání s mateřskými buňkami jsou exosomy navíc obohaceny o proteiny tetraspaniny (CD9, CD37, CD53, CD63), které se účastní buněčných penetrací, invazí a fúzí a zvyšují exosomální uvolňování. Dále jsou obohaceny o cytoskeletární proteiny, proteiny tepelného šoku (Hsp 70 a 90) jako součást stresové reakce, které jsou zapojeny do vazby antigenu; proteiny zodpovědné za membránový transport (Rab2, Rab7, flotillin a annexin), které se podílejí na přenosu MVB a sekreci exosomů, a obsahují i některé markery endosomové membrány, jako jsou Alix a Tsg 101[41][30][39]. Kromě proteinů a lipidů jsou exosomy bohaté na nukleové kyseliny, především na RNA. Exosomální RNA hraje velkou roli při regulaci genové exprese[42]. Exosomy obsahují významné množství mikro RNA (miRNA¹), ribozomální RNA (rRNA²), mediátorové RNA (mRNA³), ale také dlouhé nekódující RNA (LncRNA⁴), cirkulární RNA (circRNA⁵) a některé typy DNA[37]. Třída malých nekódujících RNA je zastoupena miRNA o své typické délce 20-25 nukleotidů. miRNA jsou jedním z nejběžnějších druhů RNA v exozomech a hrají důležitou roli v řadě biologických procesů včetně exocytózy, hematopoézy a angiogeneze, stejně jako buněčné komunikace prostřednictvím exosomů [43]. miRNA působí také jako posttranslační represory mRNA mají roli i v proliferaci a apoptóze. Případná dysfunkce miRNA může vyvolat různé patologické procesy. Exosomální miRNA lze použít jako biomarkery u řady onemocnění, např. u kardiovaskulární onemocnění [44]. LncRNA jsou série nekódujících RNA o délce 200 nukleotidů, které mohou soutěžit s miRNA o vazebné místo mRNA nebo působit spolu s miRNA na regulaci exprese genu. Další z nekódujících RNA je circRNA, která je tvořena reverzním spojením s kovalentně uzavřeným jednovláknovým kruhem. circRNA se mohou vázat na miRNA a tím zmírnit inhibici miRNA na cílové mRNA a následně i zvýšit úroveň exprese cílových genů [42]. Složení obalu i obsahu exosomů je vyobrazeno na obrázku 7.

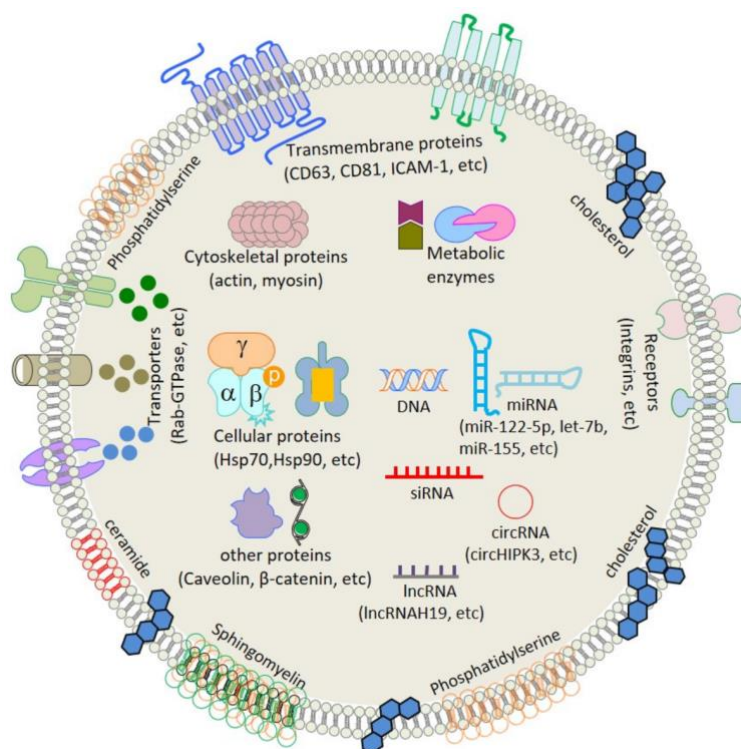
¹ miRNA – malé nekódující RNA, které se podílejí na regulaci exprese mRNA

² rRNA – ribozomální RNA, která se podílí na tvorbě ribosomů

³ mRNA – mediátorová jednovláknová RNA, která vzniká při transkripci DNA a slouží jako předpis pro tvorbu bílkovin

⁴ LncRNA – dlouhé nekódující RNA podílejí se na regulaci transkripce

⁵ circRNA – kruhová RNA, kovalentně uzavřená ve spojitou smyčku



Obrázek 6. Stavba obalu a jádra exosomů. Převzato z [45]

3.3 Izolace exosomů

Výběr izolační techniky závisí na biologické tekutině, ze které jsou exosomy izolovány. Aby vybraná izolační technika byla účinná, měla by být schopná koncentrovat exosomální signál a zároveň zabránit kontaminaci jinými molekulami, jako jsou nevezikulární proteinové agregáty a lipoproteiny. Například krevní plazma obsahuje lipoproteiny o vysoké a nízké hustotě, které jsou velmi podobné exosomům, jak svou velikostí, tak i hustotou. Z tohoto důvodu je izolace exosomů konvenčními metodami velmi obtížná. V současné době se k purifikaci a izolaci exosomů z biologických tekutin i z buněčných kultur *in vitro* používají různé techniky. Mezi tyto techniky patří ultracentrifugace, filtrace, vylučovací chromatografie, srážení na bázi polymerů a další. Standardizovaná metoda, která by umožňovala důkladně izolovat neporušené exosomy s vysokým výtěžkem a čistotou, doposud nebyla vynalezena[29].

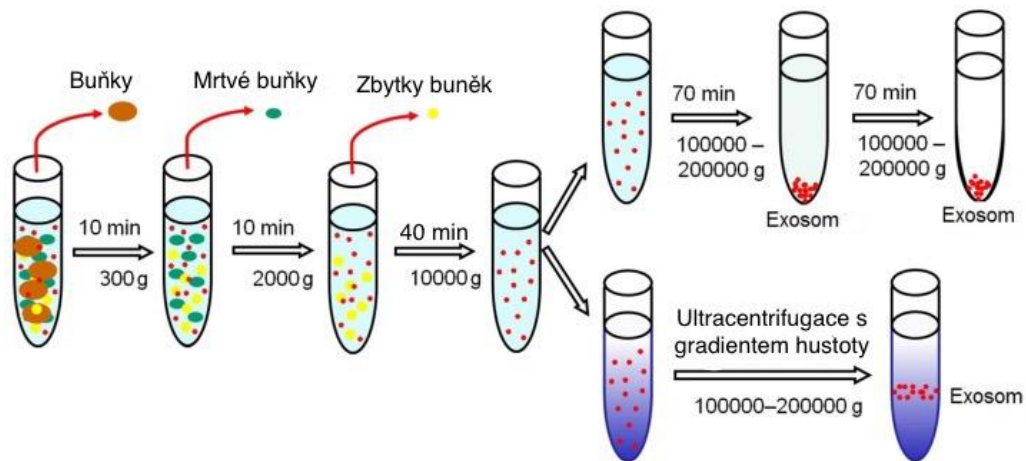
3.3.1 Diferenciální ultracentrifugace

Ultracentrifugace byla poprvé použita k izolaci exosomů z retikulocytárního kultivačního média Rose M. Johnstone v roce 1987[46]. Jedná se o nejzákladnější a zároveň nejpoužívanější izolační metodu. Existují dva typy ultracentrifugace – analytická a preparativní ultracentrifugace. Na zkoumání fyzikálně-chemických vlastností částicových

materiálů a molekulárních interakcí polymerních materiálů se používá analytická centrifugace. Pokud jde o izolaci exosomů, hraje důležitou část preparativní ultracentrifugace, protože má za úkol frakcionování malých bio-částic, jako jsou viry, bakterie, subcelulární organely a extracelulární váčky. Metoda je založena na postupném oddělování extracelulárních složek fluidního vzorku na základě hustoty, velikosti a tvaru za použití odstředivých sil. Ultracentrifugace se skládá ze série centrifugačních cyklů různých odstředivých sil a dob trvání cyklů. Před začátkem samotné izolace nastává tzv. krok čištění, na bázi nízkootáčkového odstředování při 300g po dobu 10 minut, který slouží k eliminaci odumřelých buněk a objemných apoptických zbytků. Následující kroky se mohou v rámci použití lišit, ale většinou zahrnují otáčení o vyšších rychlostech. Například při odstraňování nečistot se používá odstředování v rozmezí od 1 000 g do 3 000 g po dobu 10 minut, k odstranění velkých částic se pak používají otáčky kolem 20 000 g po dobu 40 minut. Ke konečnému vysrážení exosomů se pak používá vysokorychlostní odstředování 100 000 g po dobu 2 hodin. Tato metoda je nevhodná pro použití vzorků o malých objemech, vhodná je zejména pro vysokoobjemové vzorky. U ultracentrifugace nehrozí nebezpečí kontaminace dalšími izolačními činidly, avšak je časově náročná a v důsledku vysokorychlostní centrifugace může dojít k poškození exosomů [29][47][48]. K poskytnutí čistšího výtěžku, bez srážení proteinů a nukleových kyselin asociovaných s exosomy, je možno po posledním kroku ultracentrifugace provést navazující purifikační techniku zvanou centrifugace na sacharózovém gradientu [29].

3.3.1.1 Ultracentrifugace s gradientem hustoty

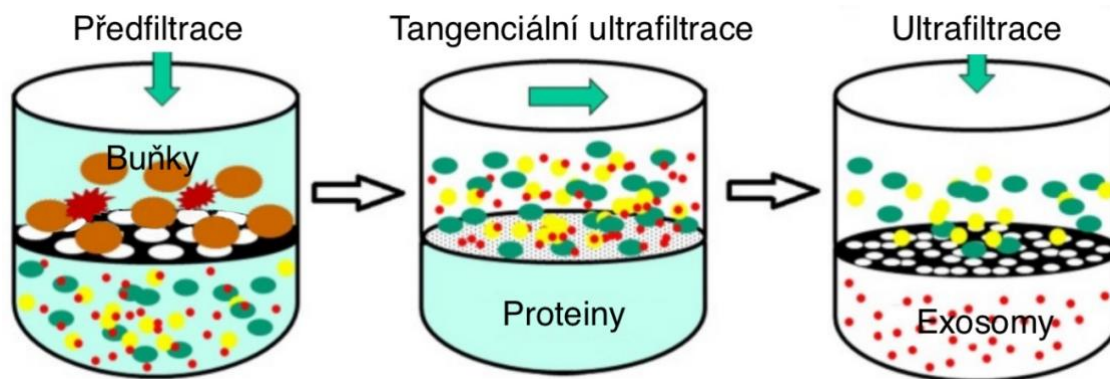
Separace exosomů u této metody zahrnuje přidavek vzorku na povrch biokompatibilního média s odlišnou hustotou. Tímto médiem může být například sacharóza či jodoxinol. Toto médium pokrývá rozsah hustoty částic vzorku, proto se při určité odstředivé síle složky vzorku usadí ve své isodenzní zóně, což exosomům umožní separaci od ostatních složek vzorku. V porovnání s klasickou ultracentrifugací má tato metoda vyšší čistotu výtěžku [29]. Schématické znázornění ultracentrifugace je uvedeno na obrázku 8.



Obrázek 7. Schéma ultracentrifugace a následný gradient hustoty exosomů. Převzato z [47]

3.3.2 Ultrafiltrace

Ultrafiltrace může sloužit k samotné izolaci exosomů nebo jako doplňková technika k ultracentrifugaci, k oddělení velkých mikrosomů a exosomů. Tato technika funguje na principu použití ultrajemné nanomembrány, kdy se molekuly s různými mezními molekulovými hmotnostmi rozdělují na základě velikosti. Větší částice jsou odstraněny použitím filtrů s většími průměry pórů, přičemž zůstane relativně bohatý exosomální filtrát. V současné době se používají dvě ultrafiltrační zařízení, a sice tandemový konfigurovaný mikrofiltr, s definovanými velikostními limity vyloučení kolem 20–200 nm, a sekvenční ultrafiltrace. Tato technika umožňuje třídění konkrétních podskupin malých extracelulárních vezikulů, včetně exosomů, s definovanými velikostmi částic na základě velikosti filtru. Velkým nedostatkem této metody je potenciální zanesení membrány, což může vést ke ztrátě vzorku, a tedy ke zkrácení životnosti použitých membrán. Pro minimalizaci potenciálního ucpaní filtrů se používají filtrační techniky s tečným průtokem, kdy proud proudí rovnoběžně s čelem membrány a díky tomuto je membrána vystavena síle rovnoběžného proudění a je konstantně proplachována. V důsledku použití smykového napětí by mohlo dojít k poškození exosomů a navíc i ke kontaminaci volně plovoucími peptidy, jako je albumin a alfa-1-antitrypsin. Z těchto důvodů je lepší metodu kombinovat s jinými technikami. Schéma metody ultrafiltrace lze vidět na obrázku 9 [29].



Obrázek 8. Schéma ultrafiltrace exosomů. Převzato a upraveno z [47]

3.3.3 Srážení exosomů na bázi polymeru

Srážení exosomů je metoda hojně využívaná v komerčních izolačních kitech. Na tomto principu fungují například Total Exosome Isolation Kit od Thermo Fisher Scientific nebo Exo spin od Cell Guidance systém.[29] Služí k separaci exosomů změnou jejich rozpustnosti nebo disperzibility. Princip metody se zakládá na polymeru, který dokáže vyloučit vodu. Takovým polymerem je např. polyethylenglykol, který váže vodu a vysází v roztoku další méně rozpustné částice, jako mohou být právě exosomy. Vysrážené částice lze poté izolovat nízkorychlostní centrifugací nebo filtrací. Tato metoda poskytuje vysoké exozomální výtěžky s dobře udržovanou strukturou, je jednoduchá a rychlá. Hlavní nevýhodou je srážení jiných neexozomálních kontaminantů, jako jsou proteinové agregáty, EV a extracelulární proteiny, což lze minimalizovat úpravou vzorku filtrací či ultracentrifugací [29].

3.3.4 Imunoafinitní zachycení exosomů

Technika využívá přítomnosti specifických membránových proteinů a receptorů na povrchu exosomů k jejich izolaci na základě imunoafinitních interakcí. Jedná se především o integrální membránové proteiny jako jsou například CD9, CD63, CD81, CD82, a dále pak annexin, RAB5 a protein programované buněčné smrti 6. Proti těmto povrchovým markerům jsou imobilizovány protilátky na magnetických kuličkách, destičkách nebo na chromatografické stacionární fázi za účelem získání specifických exosomů. Magnetické kuličky mohou být účinnější než destička s jamkami, protože poskytují větší povrch. I přesto, že je čistota získaných exosomů vysoká, jejich výtěžek je poměrně nízký, z důvodu zachycení pouze exosomů rozpoznávaných danou protilátkou. Při využití této techniky je potřeba malého souboru vzorků, navíc má oproti ultracentrifugaci vyšší výtěžek RNA [29],[49].

3.4 Aplikace exosomů

3.4.1 Exosomy jako biomarkery

Molekulární obsah exosomů odráží původ a patofyziologické podmínky mateřských buněk, z čehož vyplývá že jsou exosomální markery vysoce specifická a citlivá metoda, která by mohla potenciálně nahradit invazivní biopsie. Vzhledem k malému objemu vzorku, specifické biologické informaci a silné permeabilitě skrze bariéry tělesné tkáně, činí tyto biomarkery velmi atraktivní pro klinické diagnostické aplikace. Exosomy jsou užitečným diagnostickým prostředkem jak pro aplikace in vivo, tak i in vitro. Kromě nukleových kyselin exosomů bylo zjištěno, že by jejich proteiny mohly být potenciálními biomarkery celé řady patologických stavů, včetně rakoviny ale také pro nerakovinné onemocnění různých orgánů, jako je nervový systém, kardiovaskulární systém, ledviny, játra či plíce [50],[51].

3.4.2 Exosomy jako distributory léčiv

Exosomy jsou aktivně zkoumány jako terapeutická činidla, buď sama o sobě, nebo jako transportní vehikula pro dodávání léčiv nebo vakcín. Mohou být použity jako terapeutické vehikulum pro dodávání léčiv do cílových buněk, protože jsou malé, netoxické, neimunogenní a přirozené pro člověka. Jejich membránové složení je podobné složení buněčných membrán těla a mají dlouhou životnost v systému krevního oběhu, protože jsou chráněny před degradací ribonukleázami. Exosomy mohou zprostředkovat přenos genetického materiálu prostřednictvím interakce povrchových adhezních proteinů. Díky svým amfifilním vlastnostem mohou nést jak hydrofobní, tak hydrofilní molekuly [43]. Tato vlastnost může vést k modifikovaným biologickým aktivitám recipientních buněk. Mimo to lze získat exosomy z tkání nebo tělních tekutin, a to s vynikající buněčnou distribucí a biokompatibilitou příjemce, díky čemuž je umožněno snížené odbourávání mononukleárními fagocyty. V posledních letech rostoucí počet studií odhalil, že mohou být použity jako biologické vezikuly pro účinné dodávání biologických léčiv přes různé biologické bariéry do cílových buněk. Do exosomů lze enkapsulovat různé terapeutické materiály, jako je krátká interferující RNA (siRNA), anti-miRNA, rekombinantní proteiny a protizánětlivé léky. Látky můžeme do exosomů zapouzdřit různými způsoby: izolací exosomů z dárcovských buněk a následná inkorporace terapeutických činidel; zapouzdření terapeutických činidel do exosomů již při jejich izolaci nebo transfekcí dárcovských buněk DNA, která kóduje lék, a je následně exprimována do exosomu. Takto připravené exosomy

jsou pak schopny doručit léčivo přes hematoencefalopatickou bariéru a udělit aktivní biologický účinek na cílené buňky [41].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CYTO-KOMPATIBILITA MATERIÁLŮ

Cílem praktické části bakalářské práce bylo stanovení a porovnání buněčné viability a studium buněčné interakce na různých materiálech. Pro testování byly zvoleny čtyři typy biomateriálů (tkáňový plastik, bakteriální plastik, kov a sklo) bez a s povrchovou modifikací pomocí biopolymerů (jako je například sérový albumin a želatina). Dalším cílem byla izolace exosomů z bezbuněčného média, které se dají též použít pro povrchové modifikace. Povrchové úpravy pomocí exosomů a stanovení jejich vlivu na chování eukaryotických buněk byly provedeny v rámci preliminární studie. Nicméně, výsledky nebyly dostatečně reprezentativní, a proto je naplánováno v experimentech pokračovat.

4.1 Buněčná kultura a kultivační médium

V tomto experimentu byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, USA). Buněčná linie byla kultivována v inkubátoru za stálé relativní vlhkosti 90 %, za teploty 37 °C a 5% koncentraci CO₂. Ke kultivaci buněk bylo zvoleno médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)(PAA Laboratories GmbH, Austria) obsahující telecí sérum (BioSera, France) o koncentraci 10 %. Do média bylo přidány také antibiotika Penicillin/Streptomycin v koncentraci 100 µg/ml.

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Během tohoto experimentu byl používán inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific, USA), dále laminární box s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP (Thermo Scientific, USA), centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo), centrifuga Multifuge™ X1 Centrifuge Series (Thermo Scientific, USA), vortex, tkáňový plastik (TPP, Švýcarsko), bakteriální plastik, krycí sklíčka, titanové destičky, automatické pipety a mikropipety (Eppendorf, Německo).

4.3 Experiment

V následujících podkapitolách jsou uvedeny jednotlivé kroky provedeného experimentu, které byly potřebné k pozorování adheze a proliferace buněk NIH/3T3 na jednotlivých površích materiálů s jejich povrchovými modifikacemi a kroky potřebné k izolaci exosomů z bezbuněčného média.

4.3.1 Kultivace a trypsinizace

Buňky NIH/3T3 byly kultivovány v kultivační nádobě (T75) do 80 % konfluency, která byla zkontrolována pomocí mikroskopu. Kultivační nádoba s buňkami byla asepticky přenesena do laminárního boxu, kde došlo k dalšímu zpracování buněk. Z nádoby bylo opatrně odsáto kultivační médium, aby nedošlo k poškození naadherovaných buněk. Následně byly buňky propláchnuty 15 ml PBS (Phosphate buffer saline), z důvodu odstranění zbytků média, a pufr byl odsán. Do kultivační nádoby bylo přidáno 7,5 ml trypsinu, který zapříčinil uvolnění buněk od povrchu a zároveň uvolnění vazeb mezi jednotlivými buňkami. Kultivační nádoba s trypsinem byla umístěna do inkubátoru na dobu 7 minut. Uvolnění buněk bylo zkontrolováno mikroskopem a poté byl trypsin zneutralizován 7,5 ml média. Roztok buněk, trypsinu a média byl odpipetován a přenesen do zkumavky, která byla následně vložena do předem vytemperované centrifugy na 37 °C. Buňky byly odstředovány po dobu 3 minut při 1100 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl ze zkumavky odsán supernatant a buňky usazené na dně byly rozpipetovány v 1 ml média. Ze zkumavky bylo odebráno 800 µl suspenze, která byla smíchána s 80 ml média, díky čemuž jsme získali z původní koncentrace 2×10^7 buněk/ml, koncentraci 2×10^5 buněk/ml média. Takto připravené buňky byly dále využity pro další testování.

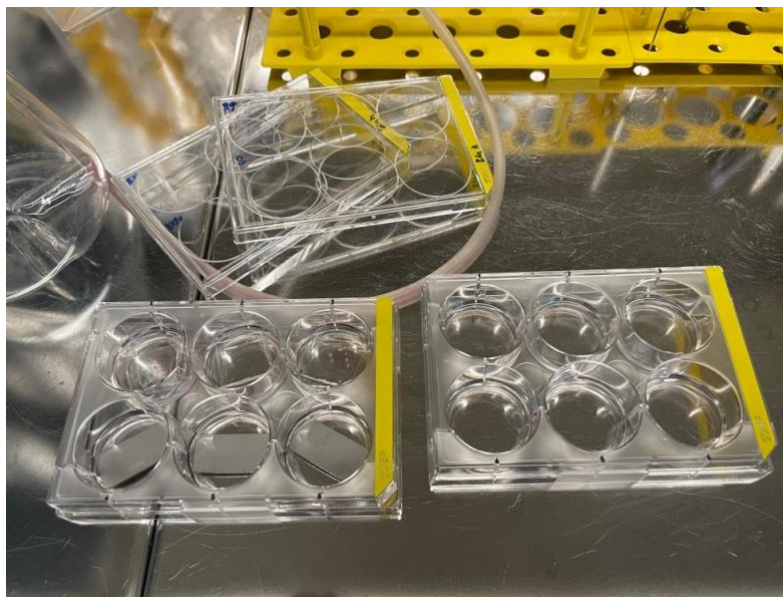
4.3.2 Příprava vzorků

Plata z tkáňového plastiku byla opatřena vzorky s různými typy povrchů. Jednalo se o povrchy typu kov (titanové destičky), bakteriální plastik (polystyren), tkáňový plastik a sklo (krycí sklíčka do mikroskopu). Plata byla rozdělena pro další testování, a sice 4 plata na vyhodnocení MTT po 96 hodinách (jeden povrch na jednom platu), 2 plata na adhezi po 2 hodinách, 2 plata na proliferaci po 48 hodinách a 4 plata na proliferaci po 96 hodinách.

Sklo	Sklo	Sklo
Tkáňový plastik	Tkáňový plastik	Tkáňový plastik

Kov	Kov	Kov
Bakterial. Plastik	Bakterial. Plastik	Bakterial. Plastik

Tabulka 1. Schéma rozložení vzorků na 2 šesti-jamkových platech



Obrázek 9. Připravená šesti-jamková plata na adhezi se vzorky 4 povrchů

Na každém platě byly povrchy 2 jamek upraveny sérovým albuminem, 2 jamky sloužily jako referenční vzorek a 2 jamky byly upraveny 1% želatinou.

Schéma šesti-jamkového plata pro všechny vzorky (plata)		
Sérový albumin	Nemodifikovaný povrch	Želatina
Sérový albumin	Nemodifikovaný povrch	Želatina

Tabulka 2. Schéma rozložení látek na modifikaci povrchů pro všechna plata

Nejprve byla mikropipetou nanесena 1% želatina a sérový albumin v množství cca 700 μl po celé ploše vzorku. Želatina i albumin byly na vzorcích ponechány po dobu 30 min a poté byly odsáty za pomoci vakuové odsávačky, díky čemuž na vzorcích vznikl tenký film. Upravené povrchy byly před dalším pokryvem ponechány 15 minut odstát a následně bylo na každý povrch dávkováno 1000 μl buněčné suspenze. Po 2 hodinách bylo k buňkám přidáno 1000 μl média, buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem a byla vyhodnocena adheze.

4.3.3 Barvení a fixace buněk

Buňky byly zafixovány a nabarveny po 2hodinové adhezi, dále pak po 48hodinové proliferaci a po 96hodinové proliferaci. Nejprve bylo z jamek odsáto médium a poté byly

buňky 15 minut fixovány 4% formaldehydem. Po uplynutí doby byly jamky odsáty a propláchnuty 1 ml PBS. PBS byl odsán a poté bylo do jamek napipetován roztok 0,5% Triton X-100, který působil po dobu 5 minut a poté byl odsán. Následně byla každá jamka 3x propláchnuta 1 ml PBS, a nakonec byly do každé jamky přidány 2 ml PBS. Do takto připravených jamek byla přidána barviva, ActinRed na obarvení cytoskeletů buněk (1 kapka na ml pufru) a Hoechst (10 μ l na ml pufru), který prostupuje do jádra a váže se na DNA. Barviva byla na vzorcích ponechána ve tmě po dobu 30 minut a po uplynutí byl obsah jamek opět odsán. V posledním kroku byl do jamek přidán 1 ml PBS. Morfologie buněk byla pozorována fluorescenčním mikroskopem.

4.3.4 Test MTT

Test MTT se používá pro stanovení buněčné životaschopnosti a proliferace buněk. Podstata testu MTT spočívá v schopnosti živých buněk redukovat, pomocí mitochondriálních dehydrogenáz, vodou rozpustné tetrazolové barvivo o žluté barvě [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid] na fialový formazan. Přesnost testu MTT závisí na úplné solubilizaci formazanu a stabilitě barevného roztoku [52]. Roztok MTT se přidává k buňkám a následně se nechá v inkubátoru kultivovat po dobu 4-8 hodin. Po této době dojde k odsátí roztoku v jamkách a přidání rozpouštědla (DMSO), které rozpustí fialové krystaly formazanu. Poté se za pomoci spektrofotometrické metody stanoví viabilita buněk na základě měření absorbance při vlnové délce 570 nm.

4.4 Izolace exosomů

Exosomy byly izolovány z bezbuněčného média buněk NIH/3T3 za pomoci kitu Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media) (Thermo Scientific, USA).

4.4.1 Příprava vzorku

Z kultivační nádoby (T75), kde byly kultivovány buňky NIH/3T3, bylo pipetou odebráno médium bez buněk a převedeno do zkumavky. Zkumavka byla vložena do centrifugy po dobu 30 minut na rychlost 2000xg, aby došlo k odstranění buněk a nečistot z média. Vzniklý supernatant byl přenesen do nové zkumavky, aniž by se narušil sediment.

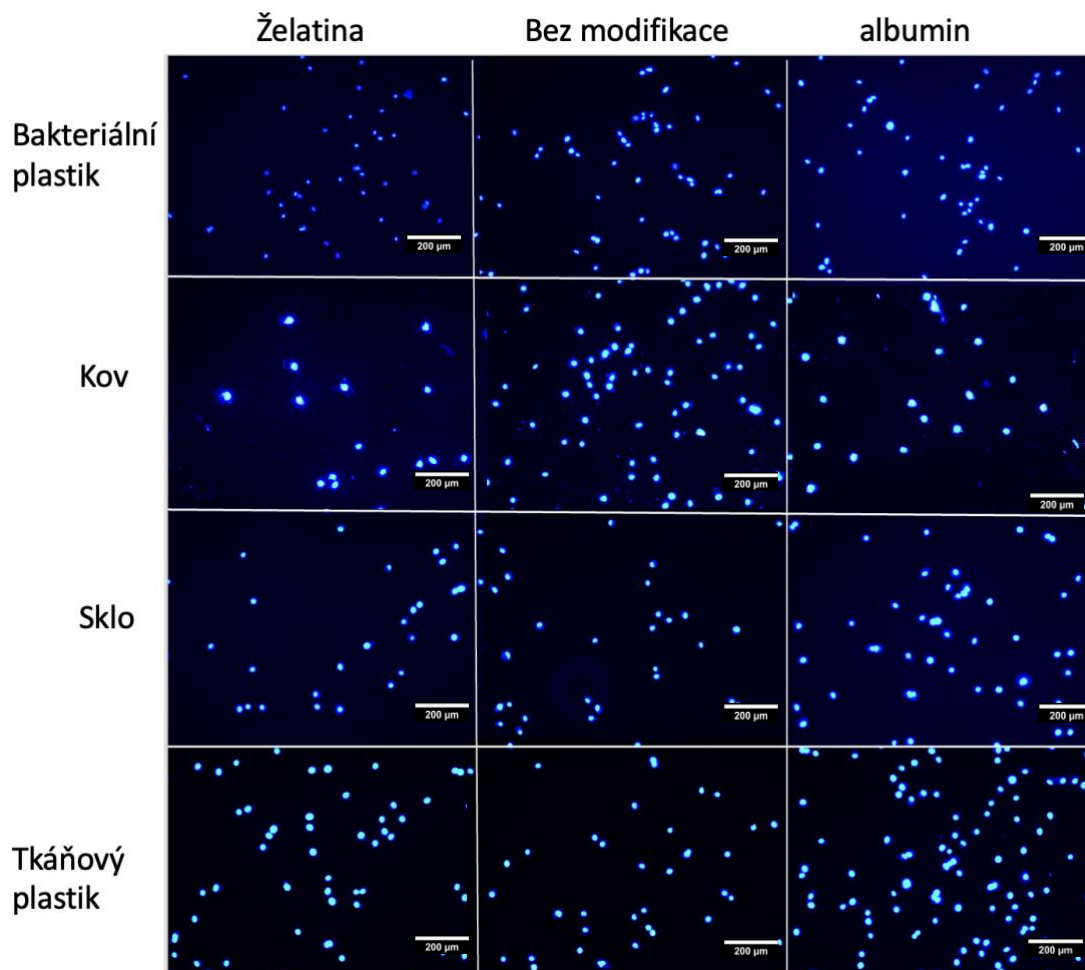
4.4.2 Izolace exosomů

Ze zkumavky bylo odebráno 25 ml média a k tomuto médiu byl přidán 1ml činidla z izolačního kitu. Roztok bezbuněčného média a činidla byl promíchán za pomoci vortexu.

Vzorky byly inkubovány v lednici přes noc při teplotě 6 °C. Po dokončení inkubace byl vzorek odstředován po dobu 1 hodiny, za teploty 2 °C a rychlosti 10 000xg na ultracentrifuze. Po odstředění byl odstraněn supernatant. Vzniklý sediment na dně zkumavky, obsahující exosomy, byl resuspendován v pufru o objemu 10 ml média/ 500 µl PBS.

5 VÝSLEDKY

5.1 Vyhodnocení adheze fluorescenčním mikroskopem



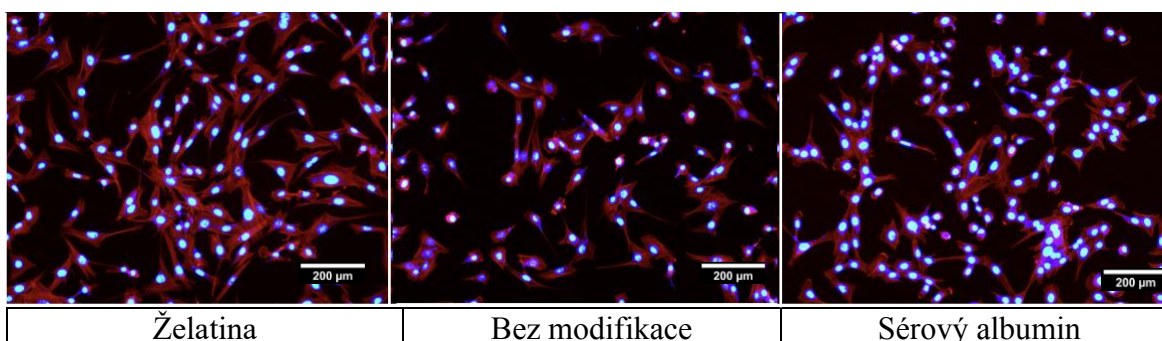
Obrázek 10. Adheze vzorků na všech površích

Na obrázku 11. lze vidět jádra zafixovaných adherovaných buněk, jaderná DNA byla obarvena pomocí barviva Hoechst. Vyhodnocení adheze bylo provedeno po 2 hodinách od nanesení buněk na jednotlivé povrchy. Buňky naadherovaly úspěšně na všechny vzorky. Výraznější adheze proběhla u vzorku tkáňového plastiku potaženého vrstvičkou sérového albuminu a u vzorku kovu bez modifikace. Nejméně buněk naadherovalo na vzorek kovu potaženého želatinou.

5.2 Vyhodnocení proliferace fluorescenčním mikroskopem po 48hodinách

Buňky proliferovaly v inkubátoru po dobu 48 za teploty 37 °C a 5 % koncentraci CO₂, poté byly zafixovány a byla jim obarvená jaderná DNA (modře) a buněčný cytoskelet (červeně) a vyfoceny fluorescenčním mikroskopem.

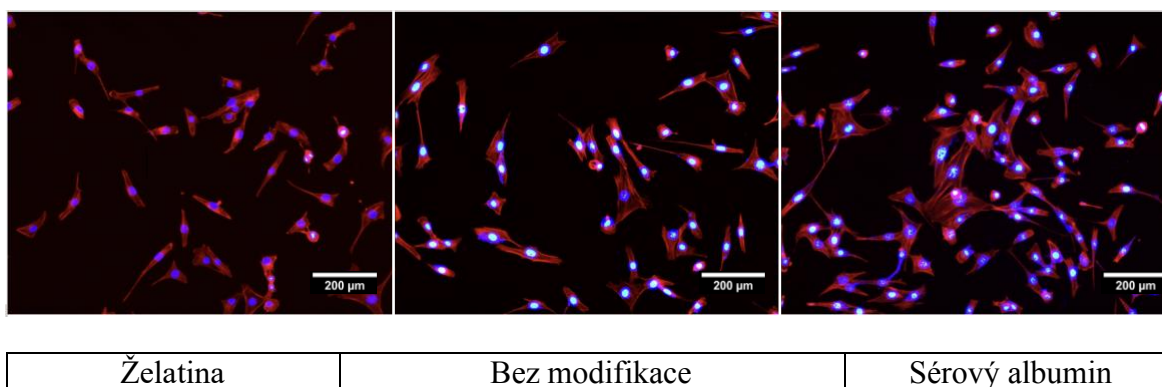
Tkáňový plastík



Obrázek 11. Proliferace buněk po 48 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na tkáňovém plastiku

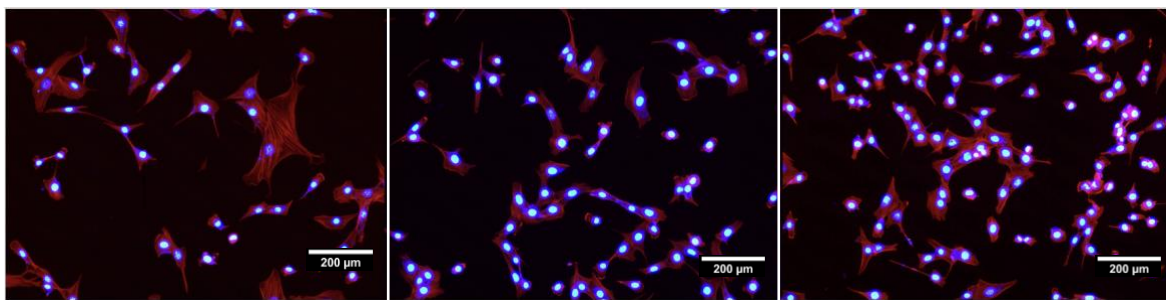
Největší koncentrace buněk se nacházela na vzorku tkáňového plastiku pokrytého tenkou vrstvičkou želatiny (obrázek 12 vlevo), oproti tomu nejmenší koncentrace buněk byla na vzorku tkáňového plastiku bez modifikace (obrázek 12 uprostřed).

Bakteriální plastík



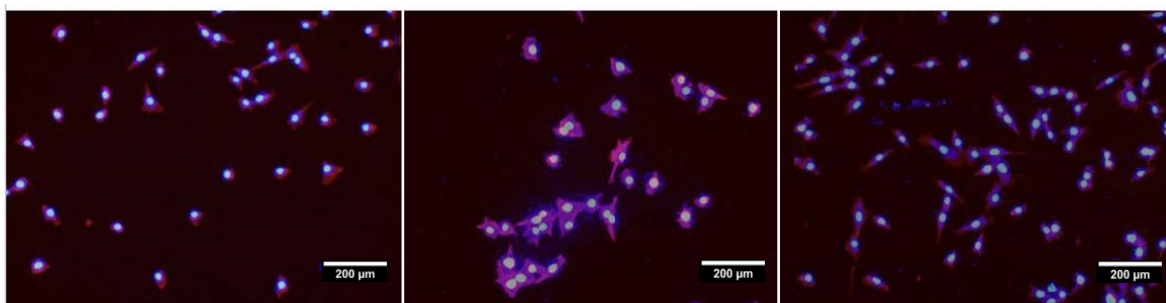
Obrázek 12. Proliferace buněk po 48 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na bakteriálním plastiku

Největší koncentrace buněk se nacházela na vzorku bakteriálního plastiku pokrytého tenkou vrstvičkou sérového albuminu (obrázek 13 vpravo). Při porovnání vzorků bakteriálního plastiku pokrytého želatinou (obrázek 13 vlevo) a povrchu bez modifikace (obrázek 13 uprostřed), počet buněk byl velmi podobný. Nicméně, kvantitativní analýza buněčné proliferace pomocí testu MTT po 96 hodinách tento fakt nepodpořila.

Sklo

Želatina	Bez modifikace	Sérový albumin
----------	----------------	----------------

Obrázek 13. Proliferace buněk po 48 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na skle. Na skle bez modifikace povrchu (obrázek 14 uprostřed) a na vzorku skla pokrytého želatinou (obrázek 14 vlevo), byla koncentrace buněk nižší než na vzorku skla s upraveným povrchem tenkou vrstvou sérového albuminu (obrázek 14 vpravo). Nárůst buněk byl na všech typech povrchu rovnoměrný.

Kov

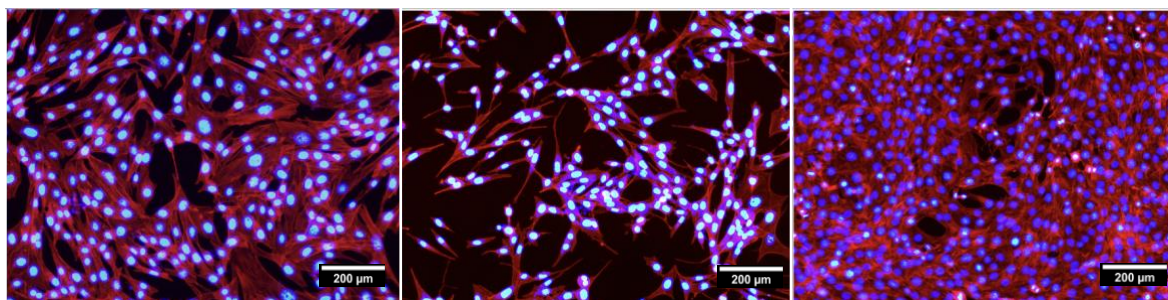
Želatina	Bez modifikace	Sérový albumin
----------	----------------	----------------

Obrázek 14. Proliferace buněk po 48 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na kovu. Focení kovu bylo z důvodu netransparentnosti vzorku komplikované, což má vliv na kvalitu fotografií a celkové kvalitativní vyhodnocení. Povrch kovu, který byl upravený tenkou vrstvou sérového albuminu, obsahoval nejvíce buněk v porovnání s povrchem modifikovaným želatinou a povrchem bez modifikace. Povrch bez modifikace vykazoval buněk nejméně. Buňky na povrchu bez modifikace (obr. 15 uprostřed) se více shlukovaly a jejich distribuce po povrchu nebyla rovnoměrná. Buněčná morfologie ve všech třech případech povrchu kovu byla méně vláknitá a typický trojúhelníkový tvar byl zachován méně než například u tkáňového plastiku, který lze na obrázku 12.

5.3 Vyhodnocení proliferace fluorescenčním mikroskopem po 96 hodinách

Buňky proliferovaly 96 hodin v inkubátoru za určitých podmínek, poté byly zafixovány, obarveny buněčná jádra a cytoskelet buněk a vyfoceny za pomoci fluorescenčního mikroskopu.

Tkáňový plastik

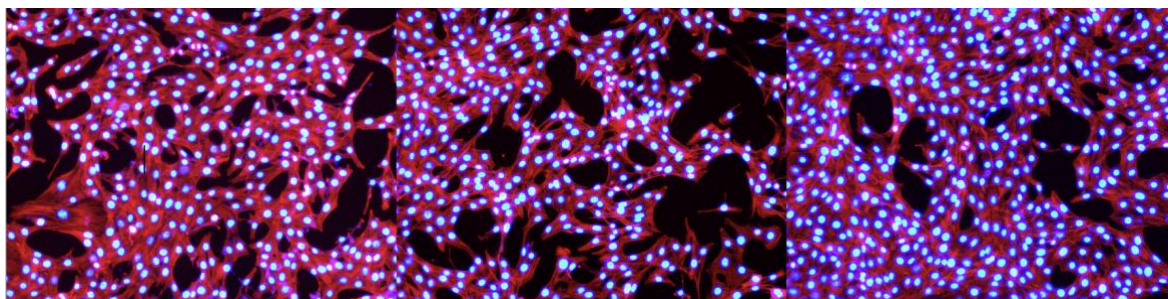


Želatina	Bez modifikace	Sérový albumin
----------	----------------	----------------

Obrázek 15. Proliferace buněk po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na tkáňovém plastiku

Modifikované povrchy tkáňového plastiku sérovým albuminem (obrázek 16 vpravo) obsahovaly značně více buněk oproti povrchům bez modifikace (obrázek 16 uprostřed). Porovnání modifikovaného povrchu sérovým albuminem s modifikovaným povrchem želatinou (obrázek 16 vlevo), sérový albumin vykazoval značně více buněk. Buňky byly rovnoměrně porostlé a měly typický trojúhelníkový tvar na všech typech povrchu.

Sklo

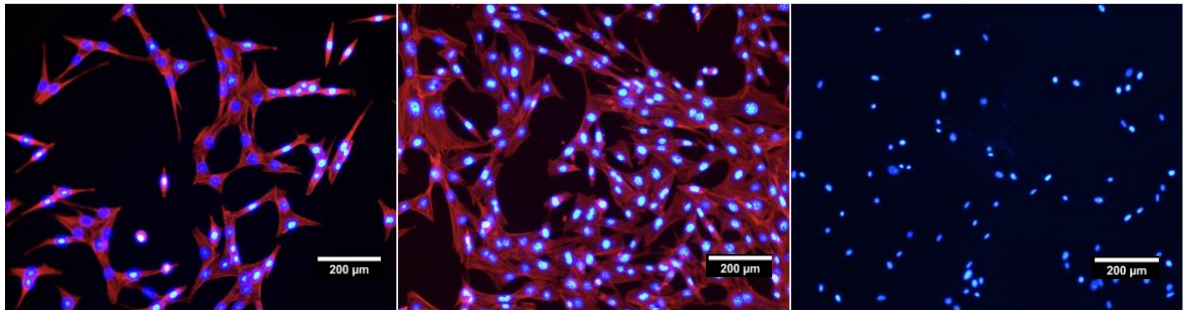


Želatina	Bez modifikace	Sérový albumin
----------	----------------	----------------

Obrázek 16. Proliferace buněk po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na skle. Modifikovaný povrch skla sérovým albuminem (obrázek 17 vlevo), obsahoval značně více buněk oproti povrchu bez modifikace. V porovnání modifikovaného povrchu sérovým albuminem s povrchem modifikovaným želatinou (obrázek 17 vpravo), sérový albumin

vykazoval podobné výsledky. Buňky měly svoji typickou vláknitou strukturu i morfologický tvar u všech povrchů.

Bakteriální plastik

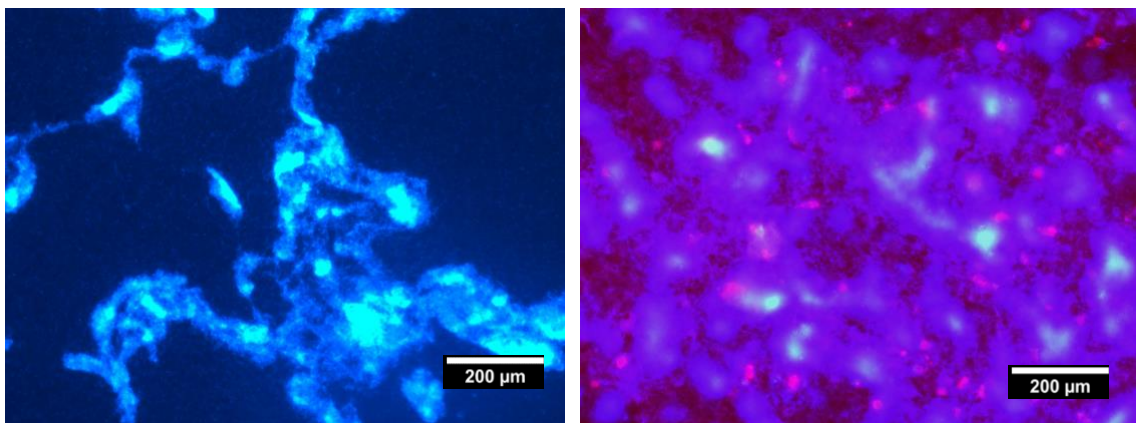


Želatina	Bez modifikace	Sérový albumin
----------	----------------	----------------

Obrázek 17. Proliferace buněk po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na bakteriálním plastiku

Na nemodifikovaném povrchu (obrázek 18 uprostřed) došlo ke značně vyšší proliferaci buněk než na bakteriálním plastiku modifikovaném želatinou a sérovým albuminem (obrázek 18 vlevo a vpravo). Při pokusu nedošlo k nabarvení cytoskeletu buněk nanesené na sérový albumin, tudíž není možné porovnávat morfologii buněk, protože není viditelný cytoskelet. Z tohoto důvodu není možné ani srovnání s povrchy bakteriálního plastiku bez modifikace a s modifikovaným povrchem želatinou.

Kov



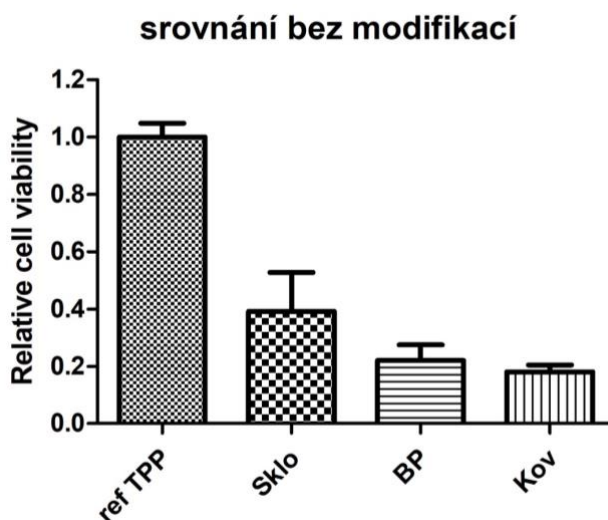
Kov modifikovaný sérovým albuminem -nabarvená jádra buněk barvivem Hoechst	Kov modifikovaný sérovým albuminem -nabarvená jádra a cytoskelet buněk
---	---

Obrázek 18. Proliferace buněk po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na kově

Vyhodnocení na kovových vzorcích po 96 hodinách nebylo možné, jelikož se jádra buněk rozpadly a buňky nepřežily ani na modifikovaném a ani nedomodifikovaném povrchu. Na obrázku č. 19 můžeme pozorovat rozpadlá buněčná jádra na povrchu kovu modifikovaného sérovým albuminem. Vzhledem ke skutečnosti, že byly jádra rozpadlá na všech površích, je přiložená pouze ilustrační fotografie z povrchu modifikovaného sérovým albuminem.

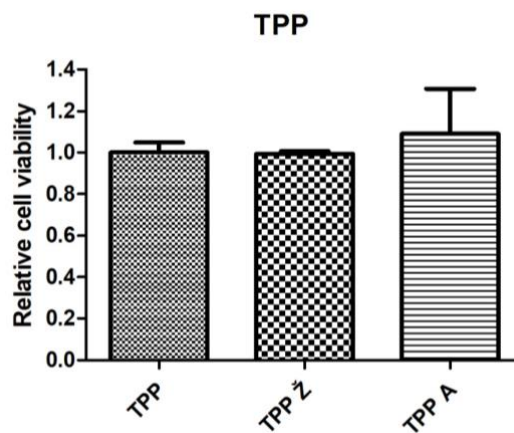
5.4 Vyhodnocení MTT po 96 hodinách proliferace

Z naměřených hodnot absorbance metodou MTT byly vyhotoveny grafy pro kvantitativní porovnání jednotlivých povrchů a jejich modifikací. MTT bylo provedeno po 96 hodinách proliferace buněk.



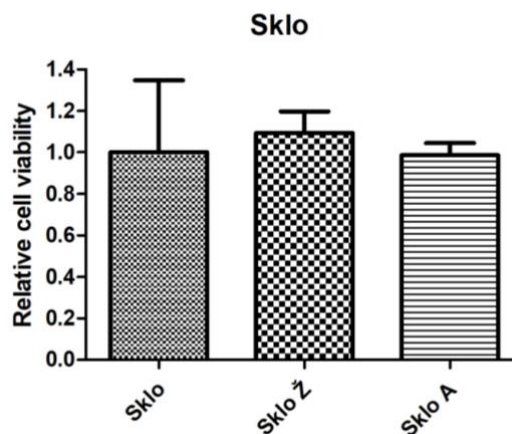
Graf 1. Srovnání relativní buněčné viability s nedomodifikovaných povrchů

Na grafu 1. můžeme vidět srovnání všech čtyř materiálů bez modifikace povrchu. Největší nárůst byl očekávaný na tkáňovém plastiku, který je speciálně upravený pro co nejlepší adhezi a proliferaci buněk a jak lze z grafu vyčíst, toto tvrzení můžeme potvrdit. Tkáňový nedomodifikovaný plastik byl zároveň vedený i jako referenční vzorek. Nejmenší nárůst buněk proběhl u vzorku kovu a bakteriálního plastiku, kde mohla hrát roli obtížná manipulace se vzorky. Hodnoty buněčné viability v případě u skla, nedosahovaly ani polovičních hodnot oproti tkáňovému plastiku.

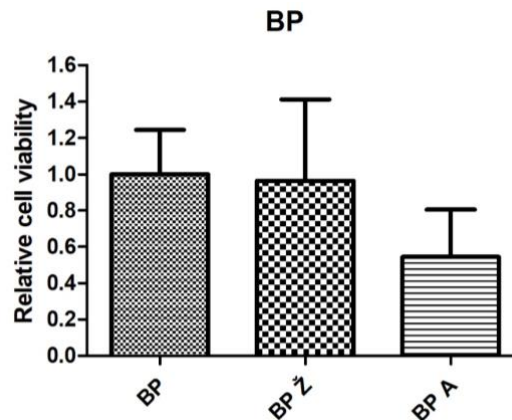


Graf 2. Srovnání relativní buněčné viability modifikovaných a nemodifikovaných povrchů na tkáňovém plastiku

Z grafu 2. lze vyčíst, že největší proliferace buněk nastala na povrchu tkáňového plastiku, který byl modifikován sérovým albuminem. Povrch modifikovaný želatinou a povrch bez modifikace vykazoval stejné hodnoty.

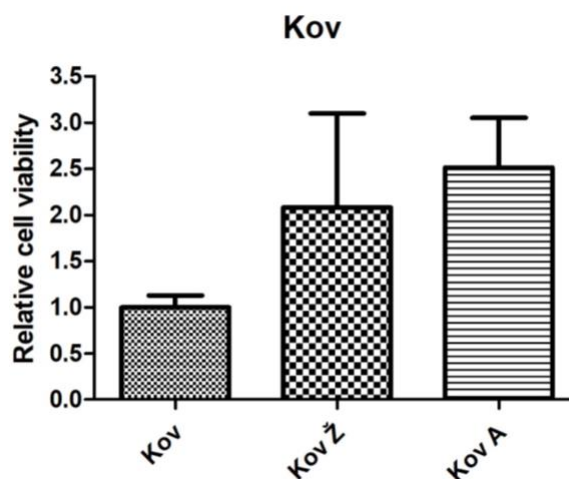


Graf 3. Buněčná viabilita na modifikovaných a nemodifikovaných povrchů na skle
Do 3. grafu byly vyneseny hodnoty buněčné životaschopnosti na skle s nemodifikovaným povrchem a povrchem s modifikací za pomoci tenkého filmu. Z grafu 3. lze vyčíst, že největší nárůst buněk nastal na povrchu skla upraveném želatinou. Hodnoty povrchu modifikového sérovým albuminem a povrchu bez modifikace byly velmi blízké.



Graf 4. Buněčná viabilita na modifikovaných a nemodifikovaných površích na bakteriálním plastiku

V grafu 4. lze vidět hodnoty viability pro proliferaci buněk na bakteriálním plastiku. U těchto dat jsou mírně vyšší odchylky, které mohly být zapříčiněny manipulací se vzorky během výzkumu. Z grafu můžeme vyčíst, že nejmenší nárůst buněk byl na povrchu upraveném sérovým albuminem, zatímco hodnoty povrchu modifikované želatinou se přibližují hodnotám povrchu bez modifikace. Lze říci, že modifikace povrchu neměla na proliferaci pozitivní vliv, v případě sérového albuminu spíše vliv negativní, což je opačný efekt než lze dohledat v dostupné literatuře. Nicméně, se jedná o statisticky nevýznamný rozdíl.



Graf 5. Buněčná viabilita na modifikovaných a nemodifikovaných površích na kovu
Do 5. grafu jsou naneseny hodnoty viability na nemodifikovaném kovu a kovu s modifikacemi. Z grafu lze vyčíst, že hodnoty modifikovaných povrchů byly jednou tak velké oproti povrchu bez modifikace. Největší nárůst buněk vykazoval povrch kovu modifikovaný sérovým albuminem.

5.5 Izolace exosomů

Exosomy se podařilo úspěšně vyizolovat z bezbuněčného média buněk NIH/3T3. Interakce exosomů s eukaryotickými buňkami a možné využití exosomů jako modifikátorů povrchu bylo provedeno v rámci preliminární studie, avšak z důvodu nereprezentativních výsledků je naplánováno v experimentech pokračovat.

DISKUZE

Cílem této práce bylo porovnat interakci buněk s různými materiály a jejich povrchy modifikovanými biopolymery. Adheze buněk, která byla vyhodnocena po 2 hodinách od nanesení buněk na vzorek, se prokázala pozitivní pro všechny materiály a jejich modifikace. Adheze proběhla bez výraznějších odchylek u všech vzorků, větší koncentrace buněk byla pouze na vzorku tkáňového plastiku potaženého sérovým albuminem a nejmenší koncentrace na vzorku kovu potaženého želatinou. Z výsledků MTT provedeného po 96 hodinách proliferace jasně vyšlo, že nejvhodnějším materiálem bez modifikovaného povrchu pro proliferaci buněk je tkáňový plastik, který je k těmto účelům přímo určený, zatímco nejméně vhodnou variantou při vyhodnocení byl kov ve formě titanových destiček. Z výsledků grafů 2,3 a 5, při vyhodnocení metody MTT můžeme usoudit, že albumin zvyšuje buněčnou viabilitu a jeví se jako vhodná varianta pro modifikaci povrchu tenkým filmem. Modifikace povrchu želatinou se prokázala jako účinná pouze na povrchu skla a kovu. U tkáňového a bakteriálního plastiku výsledky nebyly negativní nýbrž shodné s povrchy bez modifikace. Při kvalitativním vyhodnocení fluorescenčním mikroskopem po 48 hodinách nebyly příliš znatelné rozdíly mezi tkáňovým plastikiem, sklem a bakteriálním plastikiem. Rozdíl nastal u povrchu kovu jak modifikovaného, tak nemodifikovaného, kdy byly koncentrace buněk znatelně menší než na již zmíněných površích tkáňového plastiku, skla a bakteriálního plastiku. Při vyhodnocení fluorescenčním mikroskopem po 96 hodinách byly rozdíly mezi modifikovanými a nemodifikovanými povrchy znatelnější. Značný nárůst buněk nastal na povrchu skla a tkáňového plastiku s oběma biopolymery, které jej modifikovaly, ve srovnání s povrchem bez modifikace. Přesný opak nastal u vzorku bakteriálního plastiku, kde byl největší počet buněk na nemodifikovaném povrchu. Vyhodnocení fluorescenčním mikroskopem po 96 hodinách nebylo možné provést u kovu, z důvodu rozpadu buněčných jader, ale z výsledků metody MTT byl prokázán značný nárůst na modifikovaných površích. V porovnání MTT a proliferace po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem se výsledky shodovaly pouze u tkáňového plastiku. U bakteriálního plastiku nebylo možné metody srovnat z důvodu chybějící fotografie cytoskeletu na modifikovaném povrchu sérovým albuminem.

ZÁVĚR

Pro buněčnou viabilitu je klíčové, aby povrchy materiálu byly co nejvíce cyto-kompatibilní, proto v praktické části byly studovány interakce buněk s materiály. Nejprve byly povrchy materiálu potaženy tenkou vrstvou biopolymeru a poté na ně byly nasazeny buňky linie myších fibroblastů. Výsledky byly vyhodnoceny kvalitativně i kvantitativně. Viabilita buněk byla vyhodnocena metodou MTT, morfologie a nárůst buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Všechny vzorky, jak s povrchovými úpravami, tak bez nich byly vyhodnoceny jako bioadherentní a schopny následné proliferace buněk. Povrchovými modifikacemi použitím sérového albuminu se nám podařilo zvýšit buněčnou viabilitu u tkáňového plastiku, u kovu a v menší míře i u skla. Povrchy modifikované želatinou zvýšily viabilitu buněk pouze u povrchu kovu a v menší míře i skla. Nejvhodnějším materiálem pro buněčnou adhezi a jejich následnou proliferaci můžeme označit tkáňový plastik s modifikací sérovým albuminem, což se prokázalo jak metodou MTT, tak i kvalitativně fluorescenčním mikroskopem. Dále byly z bezbuněčného média izolovány exosomy komerčním kitem značky Thermofisher. Izolace proběhla úspěšně, též byla provedena preliminární studie navázání exosomů na povrch biomateriálu, avšak výsledky nebyly relevantní, proto se budeme i v následující studii zabývat povrchovými úpravami pomocí exosomů a stanovením jejich vlivu na chování eukaryotických buněk.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BANDHYOPADHYA, Amit a Susmita BOSE, ed. *Characterization of biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-415800-9.
- [2] AGRAWAL, C. Mauli, ed. *Introduction to biomaterials: basic theory with engineering applications*. New York: Cambridge University Press, 2014. Cambridge texts in biomedical engineering. ISBN 978-0-521-11690-9.
- [3] WONG, Joyce Y., Joseph D. BRONZINO a Donald R. PETERSON, ed. *Biomaterials: principles and practices*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2013. ISBN 978-1-4398-7251-2.
- [4] GHASEMI-MOBARAKEH, Laleh, Davood KOLAHREEZ, Seeram RAMAKRISHNA a David WILLIAMS. Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering* [online]. 2019, **10**, 45–50. ISSN 24684511. Dostupné z: doi:10.1016/j.cobme.2019.02.004
- [5] LANGSTAFF, S. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization. *Biomaterials* [online]. 1999, **20**(18), 1727–1741. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(99)00086-1
- [6] FROTA, R., Va. SILVA-JUNIOR, M. TEIXEIRA, Ap. VERAS-SOBRAL, E. SILVA, Mm. FONSECA-DA SILVEIRA a Ac. ARAGAO-NETO. Histological evaluation of bone repair using beta-Tricalcium Phosphate. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* [online]. 2011, e190–e194. ISSN 16986946. Dostupné z: doi:10.4317/medoral.16.e190
- [7] RENÒ, Filippo a Mario CANNAS. UHMWPE and vitamin E bioactivity: An emerging perspective. *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(16), 3039–3043. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.016
- [8] HASAN, Abshar a Lalit M. PANDEY. Review: Polymers, Surface-Modified Polymers, and Self Assembled Monolayers as Surface-Modifying Agents for Biomaterials. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* [online]. 2015, **54**(13), 1358–1378. ISSN 0360-2559, 1525-6111. Dostupné z: doi:10.1080/03602559.2015.1021488
- [9] NIINOMI, Mitsuo. Metallic biomaterials. *Journal of Artificial Organs* [online]. 2008, **11**(3), 105–110. ISSN 1434-7229, 1619-0904. Dostupné z: doi:10.1007/s10047-008-0422-7
- [10] PRASAD, Karthika, Olha BAZAKA, Ming CHUA, Madison ROCHFORD, Liam FEDRICK, Jordan SPOOR, Richard SYMES, Marcus TIEPPO, Cameron COLLINS, Alex CAO, David MARKWELL, Kostya (Ken) OSTRIKOV a Kateryna BAZAKA. Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities. *Materials* [online]. 2017, **10**(8), 884. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma10080884
- [11] GOUTAM, Manish, Chandu GIRIYAPURA, SunilKumar MISHRA a Siddharth GUPTA. Titanium allergy: A literature review. *Indian Journal of Dermatology* [online]. 2014, **59**(6), 630. ISSN 0019-5154. Dostupné z: doi:10.4103/0019-5154.143526
- [12] CASALETTO, M.P, G.M INGO, S KACIULIS, G MATTOGNO, L PANDOLFI a G SCAVIA. Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings. *Applied Surface Science* [online]. 2001, **172**(1–2), 167–177. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-4332(00)00844-8
- [13] TOTALBOOX a TBX. *Thin Film Coatings for Biomaterials and Biomedical Applications*. [online]. B.m.: Elsevier Science, 2016 [vid. 2022-05-06]. ISBN 978-1-78242-476-5. Dostupné z: <http://www.totalboox.com/book/id-4998417334204669799>
- [14] RATNER, Buddy D. Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 1995, **10**(9–10), 797–

804. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/0956-5663(95)99218-A
- [15] MBAM, Stephen Ogbonna, Sunday Emmanuel NWONU, Oluseyi Adewale ORELAJA, Uzoma Samuel NWIGWE a Xiao-Fan GOU. Thin-film coating; historical evolution, conventional deposition technologies, stress-state micro/nano-level measurement/models and prospects projection: a critical review. *Materials Research Express* [online]. 2019, **6**(12), 122001. ISSN 2053-1591. Dostupné z: doi:10.1088/2053-1591/ab52cd
- [16] HENCH, Larry L. a Jon K. WEST. The sol-gel process. *Chemical Reviews* [online]. 1990, **90**(1), 33–72. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/cr00099a003
- [17] MACKENZIE, John D. a Eric P. BESCHER. [No title found]. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* [online]. 2000, **19**(1/3), 23–29. ISSN 09280707. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008701903087
- [18] J.R. DAVIS & ASSOCIATES a ASM INTERNATIONAL, ed. *Handbook of thermal spray technology*. Materials Park, OH: ASM International, 2004. ISBN 978-0-87170-795-6.
- [19] UDAYAKUMAR, Gowthama Prabu, Subbulakshmi MUTHUSAMY, Bharathi SELVAGANESH, N. SIVARAJASEKAR, Krishnamoorthy RAMBABU, Fawzi BANAT, Selvaraju SIVAMANI, Nallusamy SIVAKUMAR, Ahmad HOSSEINI-BANDEGHARAEI a Pau Loke SHOW. Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2021, **9**(4), 105322. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2021.105322
- [20] AHMADY, Amina a Nor Hayati ABU SAMAH. A review: Gelatine as a bioadhesive material for medical and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2021, **608**, 121037. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121037
- [21] GARG, Ashish, Sweta GARG, Manish KUMAR, Suresh KUMAR, Ajay Kumar SHUKLA a Satya Prakash Chand KAUSHIK. Applications of natural polymers in mucoadhesive drug delivery: An overview. *Advance Pharmaceutical Journal* [online]. 2018, **3**(2), 38–42. ISSN 24561436. Dostupné z: doi:10.31024/apj.2018.3.2.1
- [22] KOMMAREDDY, Sushma, Dinesh B. SHENOY a Mansoor M. AMIJI. Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. In: Challa S. S. R. KUMAR, ed. *Nanotechnologies for the Life Sciences* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007 [vid. 2022-04-10], s. ntl0011. ISBN 978-3-527-61041-9. Dostupné z: doi:10.1002/9783527610419.ntl0011
- [23] HAUG, I.J. a K.I. DRAGET. Gelatin. In: *Handbook of Hydrocolloids* [online]. B.m.: Elsevier, 2009 [vid. 2022-04-17], s. 142–163. ISBN 978-1-84569-414-2. Dostupné z: doi:10.1533/9781845695873.142
- [24] FANALI, Gabriella, Alessandra DI MASI, Viviana TREZZA, Maria MARINO, Mauro FASANO a Paolo ASCENZI. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2012, **33**(3), 209–290. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2011.12.002
- [25] ŘÍMÁNKOVÁ, Ludmila, Hana ČERNOCKÁ, Eva TIHLAŘÍKOVÁ, Vilém NEDĚLA a Veronika OSTATNÁ. Chronopotentiometric sensing of native, oligomeric, denatured and aggregated serum albumin at charged surfaces. *Bioelectrochemistry* [online]. 2022, **145**, 108100. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2022.108100
- [26] TKACH, Mercedes a Clotilde THERY. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* [online]. 2016, **164**(6), 1226–1232. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.01.043
- [27] MINCIACCHI, Valentina R., Michael R. FREEMAN a Dolores DI VIZIO. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large

- Oncosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2015, **40**, 41–51. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2015.02.010
- [28] VLASSOV, Alexander V., Susan MAGDALENO, Robert SETTERQUIST a Rick CONRAD. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2012, **1820**(7), 940–948. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017
- [29] ALZHRANI, Ghadi N., Sarah T. ALANAZI, Sumayyah Y. ALSHARIF, Amani M. ALBALAWI, Anwar A. ALSHARIF, Mohamed S. ABDEL-MAKSOUUD a Nehal ELSHERBINY. Exosomes: Isolation, characterization, and biomedical applications. *Cell Biology International* [online]. 2021, **45**(9), 1807–1831. ISSN 1065-6995, 1095-8355. Dostupné z: doi:10.1002/cbin.11620
- [30] RECORD, M. Intercellular communication by exosomes in placenta: A possible role in cell fusion? *Placenta* [online]. 2014, **35**(5), 297–302. ISSN 01434004. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2014.02.009
- [31] FU, Qin a Yang K. XIANG. Trafficking of β -Adrenergic Receptors. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2015 [vid. 2021-12-10], s. 151–188. ISBN 978-0-12-802939-8. Dostupné z: doi:10.1016/bs.pmbts.2015.03.008
- [32] HAYAT, M.A. Overview of Autophagy. In: *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2021-12-10], s. 3–84. ISBN 978-0-12-805421-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805421-5.00001-X
- [33] BARTON, Christopher E., Jennifer A. PIETENPOL a Justin J. MILLER. Tumor Suppressors | p53 Family. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry III* [online]. B.m.: Elsevier, 2021 [vid. 2021-12-10], s. 722–727. ISBN 978-0-12-822040-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819460-7.00258-9
- [34] BUSCHOW, Sonja I., Jolanda M.P. LIEFHEBBER, Richard WUBBOLTS a Willem STOORVOGEL. Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [online]. 2005, **35**(3), 398–403. ISSN 10799796. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcmed.2005.08.005
- [35] TAMAI, Keiichi, Nobuyuki TANAKA, Takashi NAKANO, Eiji KAKAZU, Yasuteru KONDO, Jun INOUE, Masaaki SHIINA, Koji FUKUSHIMA, Tomoaki HOSHINO, Kouichi SANO, Yoshiyuki UENO, Tooru SHIMOSEGAWA a Kazuo SUGAMURA. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2010, **399**(3), 384–390. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.083
- [36] HENNE, William M., Nicholas J. BUCHKOVICH a Scott D. EMR. The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* [online]. 2011, **21**(1), 77–91. ISSN 15345807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2011.05.015
- [37] BARILE, Lucio a Giuseppe VASSALLI. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2017, **174**, 63–78. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.020
- [38] KOWAL, Joanna, Mercedes TKACH a Clotilde THÉRY. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2014, **29**, 116–125. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004
- [39] LI, Xi, Yanan WANG, Qi WANG, Yinping LIU, Wei BAO a Sufang WU. Exosomes in cancer: Small transporters with big functions. *Cancer Letters* [online]. 2018, **435**, 55–65. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2018.07.037
- [40] CHEN, Rui, Xin XU, Yuquan TAO, Zijun QIAN a Yongchun YU. Exosomes in hepatocellular carcinoma: a new horizon. *Cell Communication and Signaling* [online]. 2019,

- 17(1), 1. ISSN 1478-811X. Dostupné z: doi:10.1186/s12964-018-0315-1
- [41] ZHANG, Yuan, Yunfeng LIU, Haiying LIU a Wai Ho TANG. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* [online]. 2019, **9**(1), 19. ISSN 2045-3701. Dostupné z: doi:10.1186/s13578-019-0282-2
- [42] ZHAO, Guiping, Anni ZHOU, Xiao LI, Shengtao ZHU, Yongjun WANG, Shutian ZHANG a Peng LI. The Significance of Exosomal RNAs in the Development, Diagnosis, and Treatment of Gastric Cancer. *Genes* [online]. 2021, **12**(1), 73. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes12010073
- [43] DILSIZ, Nihat. Hallmarks of exosomes. *Future Science OA* [online]. 2022, **8**(1), FSO764. ISSN 2056-5623. Dostupné z: doi:10.2144/fsoa-2021-0102
- [44] SUN, Xian, Jia CHEN a Jilu LANG. Sensitive detection of exosomal MiRNA for cardiovascular diseases with target initiate proximity ligation assay (TIPLA). *Microchemical Journal* [online]. 2020, **158**, 105193. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2020.105193
- [45] JAN, Arif Tasleem, Safikur RAHMAN, Raied BADIERAH, Eun Ju LEE, Ehab H. MATTAR, Elrashdy M. REDWAN a Inho CHOI. Expedition into Exosome Biology: A Perspective of Progress from Discovery to Therapeutic Development. *Cancers* [online]. 2021, **13**(5), 1157. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13051157
- [46] JOHNSTONE, Rm, A BIANCHINI a K TENG. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood* [online]. 1989, **74**(5), 1844–1851. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V74.5.1844.1844
- [47] LI, Pin, Melisa KASLAN, Sze Han LEE, Justin YAO a Zhiqiang GAO. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* [online]. 2017, **7**(3), 789–804. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.18133
- [48] WU, Mengxi, Yingshi OUYANG, Zeyu WANG, Rui ZHANG, Po-Hsun HUANG, Chuyi CHEN, Hui LI, Peng LI, David QUINN, Ming DAO, Subra SURESH, Yoel SADOVSKY a Tony Jun HUANG. Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2017, **114**(40), 10584–10589. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1709210114
- [49] YOUSIF, Ghada, Shahnaz QADRI, Aijaz PARRAY, Naveed AKHTHAR, Ashfaq SHUAIB a Yousef HAIK. Exosomes Derived Neuronal Markers: Immunoaffinity Isolation and Characterization. *NeuroMolecular Medicine* [online]. 2021 [vid. 2021-12-11]. ISSN 1535-1084, 1559-1174. Dostupné z: doi:10.1007/s12017-021-08696-6
- [50] AHEGET, Houssam, Loubna MAZINI, Francisco MARTIN, Boutaina BELQAT, Juan Antonio MARCHAL a Karim BENABDELLAH. Exosomes: Their Role in Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Diseases. *Cancers* [online]. 2020, **13**(1), 84. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13010084
- [51] NATASHA G, Buket GUNDOGAN, Aaron TAN, Yasmin FARHATNIA, Woffles WU, Jayakumar RAJADAS a Alexander M. SEIFALIAN. Exosomes as Immunotheranostic Nanoparticles. *Clinical Therapeutics* [online]. 2014, **36**(6), 820–829. ISSN 01492918. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinthera.2014.04.019
- [52] BENOVOV, Ludmil. Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT Assay. *Microbiology Spectrum* [online]. 2021, **9**(3), e01637-21. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/spectrum.01637-21

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

UHMWPE	Ultra high molecular wight polyethylene
TCP	Trikalciumfosfát
PLA	Polylaktid
PGA	Polyglykolid
PLGA	poly (glykolid-ko-laktid)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PVD	Physical vapor depozition
EABP	Elektronaktivní biopolymery
SA	Sérový albumin
BSA	Bovine serum albumin
HSA	Human serum albumin
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
MK	Mastná kyselina
MVB	Multivesicular body
ILV	Intraluminar vesicle
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
HSP	Heat shock proteins
PBS	Phospate buffer saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Medium

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Schéma rozdělení biomateriálů	12
Obrázek 2. Schéma chemického potahování tenkých filmů. Převzato a upraveno z [15]..	16
Obrázek 3. Schéma fyzikálního nástřiku tenkého filmu. Převzato a upraveno z [15].....	17
Obrázek 4. Plazmový nástřik. Převzato a upraveno z [13]	19
Obrázek 5. Chemický vzorec želatiny	20
Obrázek 7. Stavba obalu a jádra exosomů. Převzato z [45].....	25
Obrázek 8. Schéma ultracentrifugace a následný gradient hustoty exosomů. Převzato z [47]	27
Obrázek 9. Schéma ultrafiltrace exosomů. Převzato a upraveno z [47]	28
Obrázek 10. Připravená šesti-jamková plata na adhezi se vzorky 4 povrchů.....	34
Obrázek 11. Adheze vzorků na všech površích	37
Obrázek 12. Proliferace buněk po 48 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na tkáňovém plastiku	38
Obrázek 13. Proliferace buněk po 48 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na bakteriálním plastiku.....	38
Obrázek 14. Proliferace buněk po 48 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na skle	39
Obrázek 15. Proliferace buněk po 48 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na kovu	39
Obrázek 16. Proliferace buněk po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na tkáňovém plastiku	40
Obrázek 17. Proliferace buněk po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na skle	40
Obrázek 18. Proliferace buněk po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na bakteriálním plastiku.....	41
Obrázek 19. Proliferace buněk po 96 hodinách pod fluorescenčním mikroskopem na Kovu	41

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Srovnání nemodifikovaných povrchů.....	42
Graf 2. Srovnání modifikovaných a nemodifikovaných povrchů na tkáňovém plastiku	43
Graf 3. Srovnání modifikovaných a nemodifikovaných povrchů na skle	43
Graf 4. Srovnání modifikovaných a nemodifikovaných povrchů na bakteriálním plastiku	44
Graf 5. Srovnání modifikovaných a nemodifikovaných povrchů na kovu	44

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Schéma rozložení vzorků na 2 šesti-jamkových platech	33
Tabulka 2. Schéma rozložení látek na modifikaci povrchů pro všechna plata	34