

Optické metody studia adsorpce fibrinogenu a oligodeoxynukleotidů na povrchu titanu a titanových slitin



Vladimír Vetter^{1,2}, Stanislav Hason^{1,2}, Raimo Silvennoinen³, Ladislav Cvrček⁴, Luděk Strašák^{1,2}, Lukáš Fojt^{1,2}

¹ Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Česká republika

² Stomatologické výzkumné centrum, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Komenského nám. 2, 662 43 Brno, Česká republika

³ University of Eastern Finland, Department of Physics and Mathematics, P. O. Box 111, FI-80101, Joensuu, Finsko

⁴ HVM Plazma, spol. s r. o., Na Hutmance 2, 158 00 Praha 5, Česká republika

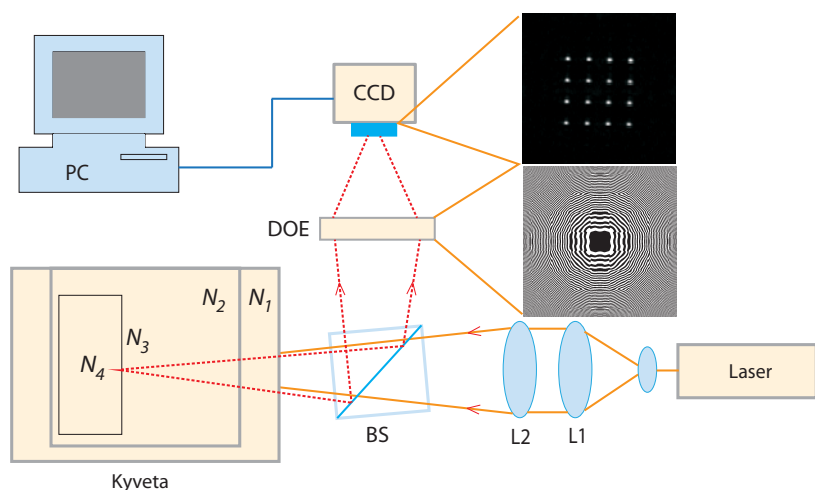
Na titanovém povrchu tvoří fibrinogen silněji adsorbovanou vrstvu s vyšší hustotou uspořádání v porovnání s porézní a slabě adsorbovanou vrstvou albuminu. Fibrinogen se lépe adsorbuje na povrch titanu upravený leštěním a leptáním nežli na povrch pouze leštěný. K silné adsorpci fibrinogenu dochází na povrchu titanu obohaceném v určitém poměru uhlíkem. Nejlépe se fibrinogen adsorboval na povrchu titanu pokrytém uhlovodíkovou vrstvou se složením $Ti_{0,36} - C_{0,57} : H_{0,07}$ a $Ti_{0,08} - C_{0,68} : H_{0,24}$. Takto upravený povrch titanu by tedy splňoval podmínky pro nejlepší oseointegraci. Adsorpce fibrinogenu na titanovou slitinu Ti6Al4V byla slabá, naopak silná byla na slitině TiNbTa, která má také dobré mechanické vlastnosti, pokud jde o výrobu implantátů. Homopyrimidinové oligodeoxynukleotidy (ODN) tvoří na povrchu titanu robustnější vrstvy s vyšší hustotou v porovnání se stejně dlouhými homopurinovými ODN a velice porézními vrstvami dvoušroubovicových fragmentů DNA.

Úvod

Titan je často používán jako „biomateriál“ k náhradě různých tvrdých tkání, například ve stomatologii a ortopedii. Morfologie povrchu implantátu, která může být modifikována různými postupy, ovlivňuje značnou měrou interakce implantátu s okolním prostředím [1–3].

Brzy po implantaci – během několika sekund – je povrch implantátu pokryt filmem adsorbovaných proteinů. Protože většina implantátů přijde během zavádění do styku s krví, je prvotní film tvořen převážně proteiny krevní plazmy. Adsorbovaná proteinová vrstva, pokrývající povrch implantátu, hraje pravděpodobně důležitou roli v pozitivní reakci organismu na titanový implantát. Lidský plazmatický fibrinogen (LPF) je jeden z nejvýznamnějších proteinů, které jsou adsorbovány na povrch titanového implantátu.

Interakce mezi povrchem titanu a molekulami LPF je způsobena kombinací elektrostatických a van der Waalsových sil. Elektrický náboj na povrchu titanu a LPF lze experimentálně měnit. Elektrický náboj LPF závisí na pH, izoelektrický bod LPF je 5,1 až 6,3 [4]. Povrch titanu je hydrofilní a polární, proto přitahuje molekuly vody a ve vodě rozpustné molekuly. LPF je amfifilní s hydrofilními částmi soustředěnými v C konci alfa řetězce, který také nese kladný náboj [5]. Jestliže jsou jak povrch titanu, tak i LPF molekula negativně nabitá, vzájemně se odpuzují. Tloušťka difuzních vrstev sousedících molekul je ovlivňována iontovou silou okolního prostředí. Vysoká iontová síla zmenšuje tloušťku difuzní vrstvy. V prostředí o vysoké iontové síle nejsou proto záporně nabitě molekuly LPF od povrchu titanu tak silně odpuzovány



Obr. 1 Princip měření pomocí DOE (L1, L2 – čočky zaostrující paprsek z laseru na kyvetu se studovaným roztokem; kyveta, komplexní indexy lomu: N_1 – okénko kyvety, N_2 – studovaný roztok, N_3 – povrchová adsorbovaná vrstva, N_4 – titan; BS – dělič svazku; DOE – difrakční optický element; holografická mřížka; CCD – snímací kamera).

jako v prostředí o nízké iontové síle a mohou se dostat do jeho blízkosti.

Sledovali jsme vliv úpravy fyzikálních vlastností povrchu titanu mechanickým broušením, leptáním v kyselinách a plazmovým napařováním uhlíku na adsorpci LPF. Adsorpci LPF jsme sledovali pomocí laserového difrakčního senzoru (diffractive optical element – DOE) a elipsometrie [6–10]. Předpokládáme, že nalezení podmínek povrchové úpravy dentálního implantátu zajišťujících maximální adsorpci LPF pomůže zlepšit průběh oseointegrace a vhojení aplikovaného implantátu. Ukázali jsme, jak lze těmito optickými metodami studovat také adsorpci jednořetězových a dvoušroubovicových oligodeoxynukleotidů na povrchu titanu a jak ovlivňuje adsorpci jejich konformace.

Materiál a metoda

Vzorky titanu a chemikálie

Adsorpce oligonukleotidů a fibrinogenu byla sledována na vzorcích z technicky čistého titanu a titanových slitin Ti6Al4V a TiNbTa, jejichž povrch je buď leštěný nebo pískovaný brusivem o zrnitosti 22, 60 a 120.



Všechny 4 typy povrchů byly pak ještě upraveny leptáním bez povrchové ztráty materiálu a s povrchovou ztrátou materiálu 0,03 mm. Dále jsme sledovali adsorpci fibrinogenu na vzorcích titanu dopovaných uhlíkem pomocí plazmového napařování (*plasma-enhanced chemical vapour deposition*) [9, 11, 12].

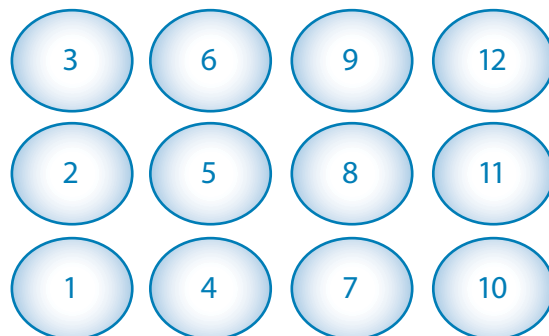
Drsnost povrchu byla měřena pomocí AFM mikroskopu Explorer III (Veeco, Santa Barbara, Kalifornie, USA) v Českém metrologickém ústavu v Brně (Dr. Petr Klapetek).

Lidský plazmatický fibrinogen, frakce I, typ III, byl zakoupen od firmy Sigma a rozpuštěn ve fosfátovém pufru s 0,136 M citrátem sodným, výsledná koncentrace LPF byla 500 nM.

Oligodeoxynukleotidy – homopurinový (AAG)₁₂ a homopyridinový (TTC)₁₂ (36merů, ve kterých se 12krát opakuje sekvence AAG, případně TTC) – byly získány od firmy Thermo Electron (Ulm, Německo) a rozpuštěny v 0,3 M NaCl + 50 mM Na₂HPO₄ (pH 8,3). Koncentrace oligodeoxynukleotidů byla 5 μM. K přípravě dvoušroubovicového duplexu (AAG)₁₂.(TTC)₁₂ byla směs obou jednořetězových 36merů o koncentraci 5 μM zahřata ve vodní lázni na 95 °C a po 1 minutě byla ponechána zvolna chladnout až na pokojovou teplotu.

Optická měření

Princip měření pomocí DOE je znázorněn na obr. 1. Paprsek z laseru o vlnové délce $\lambda = 632,8$ nm je čočkami L1 a L2 zaostrěn na kyvetu se studovaným roztokem (roztok pufru, roztok fibrinogenu nebo roztok ODN), do kterého je ponořen vzorek titanu. Jako N_i jsou označeny komplexní indexy lomu $N_{ik} = n + ik$ jednotlivých prostředí kyvety (n – reálný index lomu, k – index absorpce, extinkční koeficient). N_1 – okénko kyvety, N_2 – studovaný roztok, N_3 – povrchová adsorbovaná vrstva,



Obr. 2 Fotografie kruhových titanových destiček o průměru 10 mm a tloušťce 3 mm s následující povrchovou úpravou:

1. leštěný
2. leštěný, leptaný bez povrchové ztráty materiálu
3. leštěný, leptaný s povrchovou ztrátou materiálu 0,03 mm
4. pískovaný zrnitostí 120
5. pískovaný zrnitostí 120, leptaný bez povrchové ztráty materiálu
6. pískovaný zrnitostí 120, leptaný s povrchovou ztrátou materiálu 0,03 mm
7. pískovaný zrnitostí 60
8. pískovaný zrnitostí 60, leptaný bez povrchové ztráty materiálu
9. pískovaný zrnitostí 60, leptaný s povrchovou ztrátou materiálu 0,03 mm
10. pískovaný zrnitostí 22
11. pískovaný zrnitostí 22, leptaný bez povrchové ztráty materiálu
12. pískovaný zrnitostí 22, leptaný s povrchovou ztrátou materiálu 0,03 mm

N_4 – titan. Paprsek odražený zpět z povrchu dopadá na hranol BS (*beam splitter*), interferuje s dopadajícím paprskem a je veden na holografickou mřížku DOE. Po průchodu mřížkou vzniká interferenční obrazec snímáný CCD kamerou a analyzovaný počítačem PC. Je-li povrch vzorku zcela hladký a nedochází na něm k absorpci nebo rozptylu laserového paprsku, je interferenčním obrazcem 16 (= 4 × 4) jasných ostrých bodů, jak je znázorněno na obr. 1. Čím jsou tyto body méně intenzivní a méně ostré, tím je povrch vzorku drsnější a více absorbuje dopadající paprsek. Analýzou interferenčního obrazce (koherentní výstup DOE) počítač vypočte tzv. optickou drsnost povrchu R_{opt} . [6, 9, 10, 13]. Nekoherentní výstup DOE se zobrazí vně interferenčního obrazce a závisí na komplexní permitivitě povrchové vrstvy $\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon'' = (n + ik)^2$. Mezi permitivitou, indexem lomu a indexem absorpce platí vztahy $\varepsilon' = n^2 - \kappa^2$, $\varepsilon'' = 2n\kappa$.

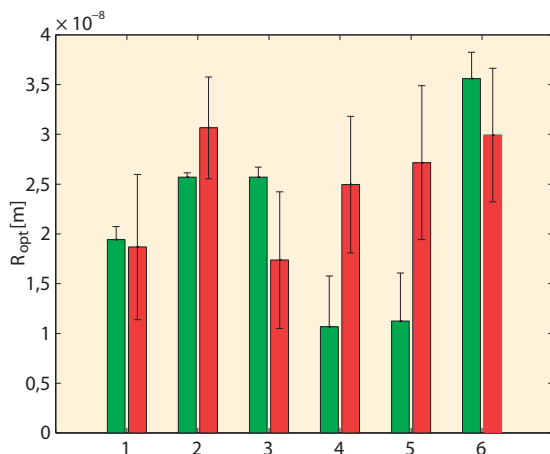
Elipsometrická měření byla uskutečněna na spektroelipsometru Woollam v suchém stavu, po vytažení vzorku z roztoku. Z těchto měření byl stanoven komplexní index lomu N povrchu titanového vzorku a odrazivost (reflektance) $R = |(1 - N)/(1 + N)|^2$. Tloušťku adsorbované vrstvy h lze vypočíst z naměřeného extinkčního koeficientu κ pomocí Lambertova-Beerova zákona:

$$h = -\log(I/I_0)/4\pi\kappa$$

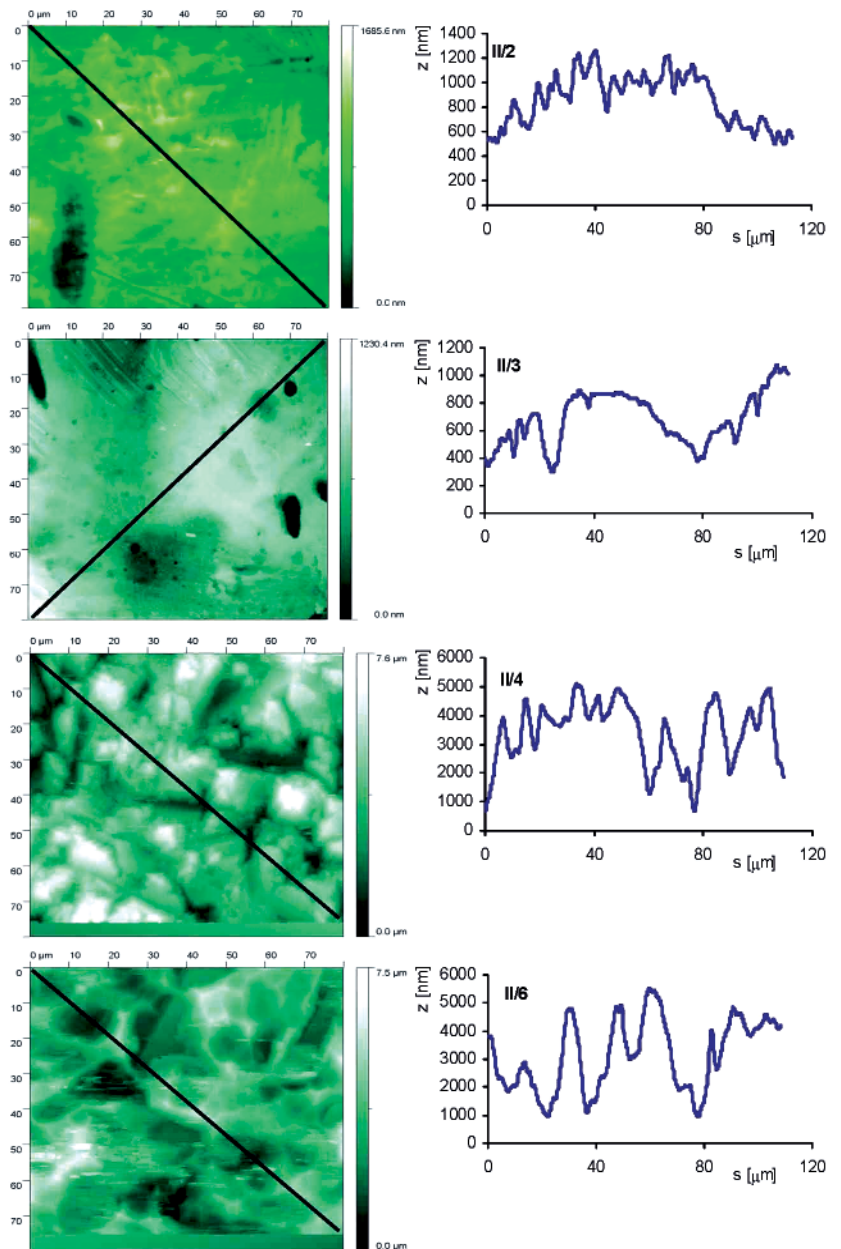
V tomto vztahu I a I_0 jsou intenzity paprsku odraženého z povrchu titanu pokrytého adsorbovanou vrstvou fibrinogenu a z čistého povrchu titanu. Optická měření byla uskutečněna na Ústavu fyziky Eastern Finland University v Joensuu.

Měření drsnosti povrchu pomocí AFM

Na obr. 2 jsou fotografie povrchů jednotlivých vzorků titanu (kruhové destičky o průměru 10 mm a tloušťce 3 mm). Jak povrchová úprava vzorku ovlivňuje drsnost



Obr. 4 Změny optické drsnosti měřené pomocí DOE různých upravených povrchů titanu a uhlovodíkového povlaku dopovaného titanem po adsorpci fibrinogenu. Hodnoty optické drsnosti na svislé ose jsou uváděny v $m \times 10^{-8}$. Světlý sloupec – optická drsnost povrchu titanu ponořeného v pufru. Tmavý sloupec – optická drsnost povrchu titanu ponořeného v roztoku fibrinogenu. Na vodorovné ose jsou titanové povrchy s různou povrchovou úpravou označeny jako: 1 – leštěný, 2 – leštěný a chemicky leptaný, 3 – uhlovodíkový povlak dopovaný titanem v poměru $Ti_{0,81} - C_{0,14} : H_{0,05}$, 4 – v poměru $Ti_{0,36} - C_{0,57} : H_{0,07}$, 5 – v poměru $Ti_{0,08} - C_{0,68} : H_{0,24}$, 6 – v poměru $Ti_{0,00} - C_{1,00}$ (vrstva DLC – *diamond like carbon*). Převzat se svolením z [9].



Obr. 3 AFM vzorku II/2 (leštěný a leptaný bez povrchové ztráty materiálu), II/3 (leštěný a leptaný s povrchovou ztrátou 0,03 mm), II/4 (pískovaný zrnitostí 120) a II/6 (pískovaný zrnitostí 120 a leptaný s povrchovou ztrátou 0,03 mm). Snímek povrchu a jeho profil ve směru úhlopříčky naznačené ve snímku byl měřen pomocí AFM mikroskopu Explorer III (Veeco, Santa Barbara, Kalifornie, USA).

povrchu, je ukázáno na snímcích AFM, obr. 3. Jedná se o vzorky II/2 (leštěný a leptaný bez povrchové ztráty materiálu), II/3 (leštěný a leptaný s povrchovou ztrátou 0,03 mm), II/4 (pískovaný zrnitostí 120) a II/6 (pískovaný zrnitostí 120 a leptaný s povrchovou ztrátou 0,03 mm). Byl stanoven profil povrchu ve směru úhlopříčky vyznačené na AFM snímku. Rozptýl nerovností u vzorku II/2 a II/3 je přibližně 600 nm (osa z na obrázcích profilu), zatímco u vzorku II/4 a II/6 je to téměř desetkrát více, přibližně 5 000 nm.

Adsorpce fibrinogenu na povrchu titanu

Na obr. 4 jsou ukázány výsledky měření optické drsnosti R_{opt} difrakčním optickým elementem DOE různých upravených povrchů titanu zanořených do roztoku pufru (světlý sloupec na obr. 4) a do roztoku fibrinogenu (tmavý sloupec) [9]. Adsorpce fibrinogenu se zvyšuje optická drsnost povrchu. K největšímu zvýšení optické drsnosti došlo u vzorků číslo 2, 4 a 6, tzn. u vzorku

» Morfologie povrchu titanového implantátu ovlivňuje adsorpci bílkovin krevní plasmu na implantát podmiňující úspěšnost jeho vhojení do kosti. «

II/3, jehož povrch byl upraven leštěním a následným leptáním (optická drsnost povrchu vzrostla přibližně o 5 nm) a u vzorků titanu pokrytých uhlovdíkovou vrstvou se složením $\text{Ti}_{0,08} - \text{C}_{0,68} : \text{H}_{0,24}$ a $\text{Ti}_{0,36} - \text{C}_{0,57} : \text{H}_{0,07}$ (optická drsnost vzrostla po adsorpci fibrinogenu přibližně o 17 nm) [14–16]. Takto upravené povrchy by měly být nevhodnější z hlediska oseointegrace titanových implantátů.

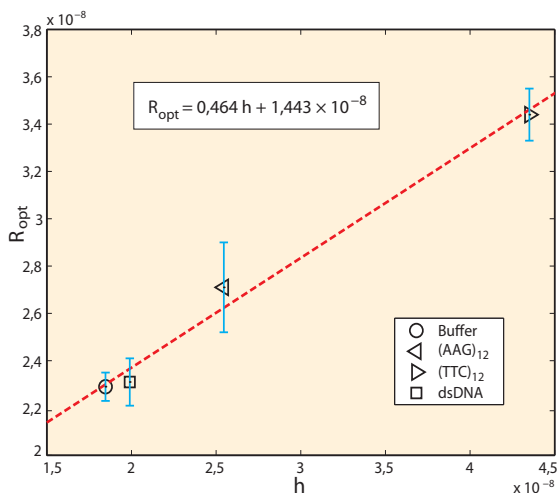
Růst osteoblastů na titanovém povrchu

Sledovali jsme růst lidských osteoblastů na titanových destičkách, vzorek II/1 a II/3. Buněčné linie lidských osteoblastů hFOB 1.19 použité v experimentu byly získány z kolekce American Type Culture Collection (ATCC). Zkoumané titanové destičky byly sterilizovány a umístěny do živného média s buňkami osteoblastů. Kultivace probíhala 6 dnů při 37 °C a 5 % CO_2 . Zjistili jsme, že osteoblasty rostly lépe na povrchu II/3, který byl upraven leštěním a leptáním s povrchovou ztrátou materiálu nežli na povrchu pouze leštěním, II/1, obr. 5. Poměr počtu buněk na povrchu leštěním II/1 k počtu buněk na povrchu leštěním a leptáním II/3 je $0,67 \pm 0,4$. Na leštěném povrchu bylo tedy o 33 % méně osteoblastů nežli na povrchu leštěním a leptáním. Tyto výsledky podpořily náš předpoklad, že úprava povrchu zvýhodňující adsorpci fibrinogenu bude také zvýhodňovat růst osteoblastů a urychlí oseointegraci implantátu. K počítání buněk byla použita Bürkerova komůrka. Na obr. 5 je na svislé ose uveden počet buněk v jednom čtverci Bürkerovy komůrky.

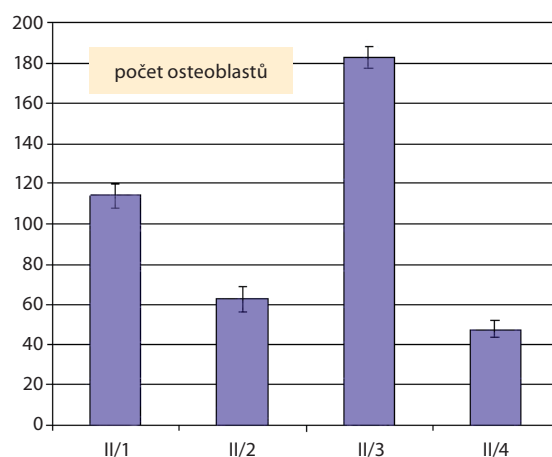
Adsorpce oligonukleotidů na povrchu titanu

a) Optická drsnost a tloušťka adsorbované vrstvy

Pomocí optického difrakčního senzoru (DOE) a elipsometrie jsme sledovali vliv morfologie a drsnosti povrchů titanových vzorků na adsorpci purinového (AAG)₁₂ a pyrimidinového (TTC)₁₂ oligodeoxynukleotidu [17]. Měření koherentního výstupu DOE bylo zjištěno, že k největšímu zvýšení optické drsnosti R_{opt} (na hodnotu přibližně 35 nm) došlo po adsorpci jednořetězového pyrimidinového oligodeoxynukleo-



Obr. 6 Korelace mezi optickou drsností R_{opt} povrchu titanu zanořeného v roztoku oligodeoxynukleotidů stanovenou z koherentního výstupu DOE a tloušťkou adsorbované vrstvy h stanovenou elipsometricky v suchém stavu (po vytažení vzorku titanu z roztoku). Číselné hodnoty na obou osách jsou uváděny v metrech $\times 10^{-8}$. Převzat se svolením z [17].



Obr. 5 Růst osteoblastů na titanových vzorcích s různou povrchovou úpravou: II/1 – povrch leštěný, II/2 – povrch leštěný a leptaný bez povrchové ztráty materiálu, II/3 – povrch leštěný a leptaný s povrchovou ztrátou materiálu 0,03 mm, II/4 – povrch pískovaný zrnitostí 120. Na svislé ose je uveden počet buněk v jednom čtverci Bürkerovy komůrky.

tidu (TTC)₁₂, obr. 6. Elipsometrická měření v suchém stavu ukázala zvýšení tloušťky povrchové vrstvy h na přibližně 44 nm. Po adsorpci jednořetězového purinového deoxynukleotidu (AAG)₁₂ došlo k mnohem menšímu zvýšení optické drsnosti (na hodnotu asi 27 nm), z elipsometrie vyplynula tloušťka povrchové vrstvy h asi 25 nm. Adsorpce dvoušroubovicového oligodeoxynukleotidu (AAG.TTC)₁₂ nevyvolala téměř žádné změny optické drsnosti a tloušťky vrstvy a blížila se hodnotám naměřeným v pufru ($R_{\text{opt}} = 23$ nm, $h = 18$ –20 nm). Z těchto výsledků plyne, že na povrchu titanu se nejlépe adsorbují jednořetězové purinové ODN, zatímco dvojšroubovicové ODN se pravděpodobně na titanovém povrchu za daných experimentálních podmínek buď vůbec neadsorbují, anebo jen v malé míře, která neovlivní optické vlastnosti povrchu.

Zvýšení drsnosti povrchu Ti po adsorpci jednořetězových oligonukleotidů lze připsat tomu, že tyto poměrně flexibilní oligonukleotidy (o šířce 1 nm a délce $36 \times 0,34 = 12,24$ nm) adsorbované na Ti kopírují nerovnosti povrchu a mohou tam vytvářet chaoticky neuspořádané „roštily“ zvyšující drsnost povrchu. Bez aplikace elektrického pole se jednořetězové oligonukleotidy váží na hydrofobní povrch Ti přednostně hydrofobními bazemi. Z našich měření adsorpce oligodeoxynukleotidů (ODN) na Hg plyne, že pyrimidinové ODN se adsorbují více nežli purinové ODN [18]. Podobně lze očekávat, že i na hydrofobní povrch Ti se budou pyrimidinové ODN adsorbovat více nežli purinové a budou více zvyšovat drsnost povrchu nežli purinové ODN.

Aplikace elektrického pole způsobí, že se jednořetězové ODN adsorbují na povrch Ti také elektrostaticky negativními náboji na fosfátových skupinách. Elektrostatická adsorpce je silnější nežli adsorpce van der Waalovými interakcemi uplatňujícími se v předchozím případě.

Malé snížení drsnosti po adsorpci dvoušroubovicových oligonukleotidů (AAG.TTC)₁₂ představujících rigidní tyčky (o průměru 2 nm a délce 12 nm) lze vysvětlit tím, že tyto „klády“ překlenou nerovnosti v povrchu a vyhladí jej.

b) Změny indexu lomu

Z výsledků analýzy nekoherentního výstupu DOE bylo zjištěno, že po adsorpci jednořetězových purinových nebo pyrimidinových ODN se zvýšil index lomu n .

Zvýšení n bylo větší u purinového oligonukleotidu (AAG)₁₂ než u pyrimidinového (TTC)₁₂.

Zvýšení n bylo větší po aplikaci elektrického potenciálu +0,3 V. Po adsorpci dvoušroubovicového oligonukleotidu (AAG.TTC)₁₂ se index lomu n nezměnil, po aplikaci elektrického potenciálu +0,3 V se index lomu zvýšil. Index lomu, případně permitivita povrchové vrstvy je dána polarizovatelností adsorbovaných molekul. Ta je u oligonukleotidů vyšší než u vody. Puriny mají vyšší polarizovatelnost než pyrimidiny (molekuly purinů jsou větší), proto při adsorpci purinových ODN se index lomu zvýší více než při adsorpci pyrimidinových ODN.

Závěr

Adsorpci biomakromolekul na povrchy titanových implantátů lze citlivě detekovat měřením optických vlastností povrchu pomocí difrakčního optického elementu a elipsometrie. Úprava fyzikálních vlastností povrchu může zvýšit adsorpci fibrinogenu na implantát a tím urychlit jeho oseointegraci. Popsanými optickými metodami lze stanovit také vliv konformace oligodeoxynukleotidů na jejich adsorpci na povrch titanu.

Poděkování

Článek vznikl za podpory grantového projektu MŠMT číslo 1M0528 Stomatologické výzkumné centrum, projektu GAČR P205/10/2378 a ústavního projektu AVOZ50040507.

Literatura

- [1] D. L. Cochran: *J. Periodontol.* **70**, 1523 (2000).
- [2] P. M. Brett, J. Harle, V. Salih, R. Mihoc, I. Olsen, F. H. Jones, M. Tonetti: *Bone* **35**, 124 (2004).
- [3] E. Jansoon, P. Tengvall: *Colloid Surf. B* **35**, 45 (2004).
- [4] http://www.haemtech.com/Platelet_Proteins/Fibrinogen.htm
- [5] P. Cacciacosta, A. D. L. Humphris, K. D. Jandt, M. J. Miles.: *Langmuir* **16**, 8167 (2000).



Titanová drúza. Zdroj: Wikipedia



Tyč extrémně čistého (99,995%) krystalického titanu vyrobeného van Arkelovou-de Boerovou metodou; průměr 2,5 cm. Zdroj: Wikipedia

- [6] R. Silvennoinen, K.-E. Peiponen, K. Myller: *Specular Gloss*. Elsevier, Amsterdam 2007, s. 53.
- [7] S. Hasoň, S.-P. Simonaho, R. Silvennoinen, V. Vetterl: *Electrochim. Acta* **48**, 651 (2003).
- [8] S. Hasoň, S.-P. Simonaho, R. Silvennoinen, V. Vetterl: *J. Electroanal. Chem.* **568**, 65 (2004).
- [9] R. Silvennoinen, V. Vetterl, S. Hasoň, H. Tuononen, M. Silvennoinen, K. Myller, L. Cvrček, J. Vaněk, P. Prachár: *Optics Express* **16**, 10130 (2008).
- [10] V. Vetterl, S. Hasoň, H. Tuononen, M. Silvennoinen, K. Myller, J. Vaněk, R. Silvennoinen: *Proc. of SPIE* **7022**, 702203 (2008).
- [11] V. Kulikovskiy, A. Kuzmichev, P. Bohaca, Z. Hubicka, K. Jurek, L. Jastrabik: *Surf. Coat. Technol.* **200**, 620 (2005).
- [12] T. Vitu, T. Polcar, L. Cvrček, R. Novák, J. Vyskočil, A. Cavaleiro: *Surf. Coat. Technol.* **202**, 5790 (2008).
- [13] R. Silvennoinen, S. Hasoň, V. Vetterl: *Technical digest of the Seventh Finnish-Japanese Joint Symposium on Optics in Engineering*, Tampere, Finland, August 2007, s. 101.
- [14] R. Silvennoinen, V. Vetterl, S. Hasoň, M. Silvennoinen, K. Myller, J. Vanek, L. Cvrček: *Proc. SPIE* **7388**, 73881A (2009).
- [15] R. Silvennoinen, V. Vetterl, S. Hasoň, M. Silvennoinen, K. Myller, J. Vaněk, L. Cvrček: *Advances in Optical Technologies* **2010**, DOI: 10.1155/2010/942349 (2010).
- [16] R. Silvennoinen, S. Hasoň, V. Vetterl, N. Penttinen, M. Silvennoinen, K. Myller, P. Černochová, S. Bartáková, P. Prachár, L. Cvrček: *Applied Optics* **49**, 5583 (2010).
- [17] H. Tuononen, M. Silvennoinen, K. Myller, R. Silvennoinen, V. Vetterl, J. Vaněk, S. Hasoň, S. Bartáková: *Proc. OSAV'2008, The 2nd Int. Topical Meeting on Optical Sensing and Artificial Vision*, St. Peterburg, Russia, May 2008, s. 262.
- [18] S. Hasoň, V. Vetterl, M. Foja: *Electrochimica Acta* **53**, 2818 (2008).

» Adsorbovaná vrstva biopolymeru ovlivňuje intenzitu a fázi laserového paprsku odraženého z povrchu titanu. «