

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST 2009/2010

Obor 06 - Zdravotnictví

**Kostní buňky na kompozitech s obsahem
nanočástic nebo mikročástic trikalciemfosfátu
pro regeneraci kostí**

Bone Cells on Composites with Nanoparticles and Microparticles
of Tricalcium Phosphate for Bone Regeneration

Autor: **Petra Vahalová**

Oktáva

Gymnázium

Stará cesta 363

331 01 Plasy

Konzultantka: **Mgr. Elena Filová, Ph.D.**

Fyziologický ústav Akademie věd ČR

Oddělení růstu a diferenciaci buněčných populací

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4

Plasy, 2010
Plzeňský kraj

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Eleny Filové, Ph.D. a v seznamu literatury uvedla veškerou použitou literaturu a další informační zdroje včetně internetu.

V Třemošné dne 28.2. 2010

.....
podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce a konzultantce Mgr. Eleně Filové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a podporu během mé experimentální práce i při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Lucii Bačákové, CSc. za důvěru, poskytnutí možnosti vědeckého bádání a všestrannou podporu. Děkuji rovněž celému kolektivu Oddělení růstu a diferenciacie buněčných populací za poskytnutí vědeckého zázemí. Mé poděkování patří rovněž Ing. Karlu Balíkovi, CSc. a kolektivu z Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů Ústavu struktury a mechaniky hornin AV ČR, Praha za poskytnutí kompozitních materiálů.

Abstrakt

V klinické praxi je často nutné řešit různé druhy poškození kostní tkáně. Vývojem biomateriálů pro kostní náhrady se zabývá interdisciplinární obor regenerativní medicíny, kostní tkáňové inženýrství. V této práci jsme zkoumali vliv kompozitního polymerního materiálu s různou koncentrací (od 0 do 25 objemových % matrice) trikalciumfosfátu ve formě mikročástic nebo nanočástic na chování lidských kostních buněk linie MG 63. Trikalciumfosfát je přirozenou součástí lidské kosti a v polymerní matici má bioaktivní vlastnosti. Hodnotili jsme adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk MG 63 na těchto materiálech během sedmidenní kultivace *in vitro*. Vycházeli jsme hlavně z počtu kostních buněk MG 63 na kompozitech 1., 3. a 7. den kultivace a imunofluorescenčního barvení proteinů beta-aktinu, vinkulinu a osteokalcinu. Koncentrace osteokalcinu, markeru osteogenní diferenciaci, byla měřena metodou enzymatické imunisorbentní eseje. Iniciální adheze MG 63 buněk na kompozitech nebyla ovlivněna velikostí částic trikalciumfosfátu, avšak do určitých mezí rostla se zvyšující se koncentrací trikalciumfosfátu. V následujících dnech byla pozorována vyšší hustota buněk na površích s mikročásticemi ve srovnání s nanočásticemi trikalciumfosfátu. Rostoucí koncentrace trikalciumfosfátu také podporovala proliferaci MG 63 buněk a depozici osteokalcinu. Dobře vyvinutý beta-aktinový cytoskelet a tečkovité fokální adhezní plaky s obsahem vinkulinu byly nalezeny na všech vzorcích nezávisle na koncentraci či velikosti částic trikalciumfosfátu. Jako optimální materiály se jevíly kompozit s 20 % mikročástic a kompozit s 15 % nanočástic trikalciumfosfátu. Výsledky našich experimentů naznačují, že kompozity s obsahem trikalciumfosfátu jsou slibnými materiály pro kostní tkáňové inženýrství a jejich potenciál by měl být ještě dále zkoumán.

Klíčová slova:

Kostní tkáňové inženýrství, kompozitní materiál, trikalciumfosfát, nanostruktura, mikrostruktura

Abstract

In clinical practice, various types of bone tissue damage have to be treated. Bone tissue engineering, an interdisciplinary branch of regenerative medicine, deals with the development of biomaterials for bone replacements. In our study, we investigated the influence of polymer-based composites of various concentrations [0 – 25 % (v/v)] of tricalcium phosphate in the form of nanoparticles or microparticles on the behaviour of human bone MG 63 cells. Tricalcium phosphate is a natural part of human bone; it is bioactive in the polymer-based matrix. We evaluated the adhesion, proliferation and differentiation of MG 63 cells on the composites during seven-day cultivation *in vitro*. The number of MG 63 cells was counted on day one, three, and seven after seeding; in addition, immunofluorescence staining of beta-actin, vinculin and osteocalcin were performed. The concentration of osteocalcin, a marker of osteogenic differentiation, was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay. The initial adhesion of MG 63 cells on composites with tricalcium phosphate was not affected by particle size; however the adhesion increased to a certain extent with increasing concentration of tricalcium phosphate. On days three and seven, we observed higher cell densities on surfaces with micro-sized tricalcium phosphate compared to nano-sized tricalcium phosphate. In addition, the increased concentration of tricalcium phosphate supported proliferation of MG 63 cell and deposition of osteocalcin by them. A well-developed beta-actin cytoskeleton and dot-like vinculin-containing focal adhesion plaques were found on all samples, irrespective of the concentration and the type of tricalcium phosphate. Composites containing 20 % of micro-sized or 15 % of nano-sized tricalcium phosphate appear to be optimal. Our results indicate that composites with tricalcium phosphate are promising materials for bone tissue engineering, and their potential should be investigated further.

Key words:

Bone tissue engineering, composites, tricalcium phosphate, nanostructure, microstructure

Obsah

1. Úvod do problematiky	- 8 -
1.1. Regenerativní medicína	- 8 -
1.2. Tkáňové inženýrství	- 8 -
1.3. Kost.....	- 9 -
1.3.1. Kostní buňky	- 9 -
1.3.1.1. Osteoblasty.....	- 9 -
1.3.1.2. Osteocyty	- 9 -
1.3.1.3. Osteoklasty.....	- 9 -
1.3.2. Kostní matrix.....	- 10 -
1.3.3. Periost a endost.....	- 10 -
1.3.4. Stavba kosti	- 10 -
1.3.5. Vybrané kostní proteiny	- 11 -
1.3.5.1. Kolagen	- 11 -
1.3.5.2. Osteokalcin	- 11 -
1.3.5.3. Vinkulin	- 11 -
1.3.5.4. Aktin	- 12 -
1.4. Vlastnosti materiálů	- 12 -
1.4.1. Vzájemné interakce mezi materiálem a kostními buňkami	- 13 -
1.4.2. Fyzikální a chemické vlastnosti povrchu materiálu ovlivňující buněčnou odpověď	- 13 -
1.4.2.1. Chemické vlastnosti povrchu	- 13 -
1.4.2.2. Fyzikální vlastnosti povrchu	- 13 -
1.5. Materiály pro kostní náhrady	- 14 -
1.5.1. Polymery	- 15 -
1.5.2. Kompozity	- 15 -
1.5.2.1. Vlákna	- 15 -
1.5.2.2. Matrix.....	- 16 -
1.5.2.3. Anorganické částice	- 16 -
2. Cíle práce	- 17 -
3. Metodika	- 18 -
3.1. Výroba kompozitů	- 18 -
3.2. Příprava vzorků.....	- 18 -
3.3. Použitý materiál k testům in vitro.....	- 18 -
3.4. Nasazování buněk.....	- 18 -

3.5. Počítání buněk v Bürkerově komůrce	- 19 -
3.6. Počítání buněk ze zorných polí, růstové křivky, doubling time	- 19 -
3.7. Barvení buněk.....	- 20 -
3.7.1. Ředění barvicích roztoků	- 20 -
3.7.2. Imunofluorescenční barvení buněk	- 21 -
3.8. Příprava lyzátu	- 21 -
3.9. Homogenizace	- 22 -
3.10. Měření koncentrace proteinů kolorimetrickou Lowryho metodou.....	- 22 -
3.11. ELISA (enzymatická imunosorbentní esej).....	- 23 -
3.12. Statistická analýza	- 23 -
4. Výsledky	- 24 -
4.1. Iniciální adheze buněk na materiál	- 24 -
4.2. Proliferace buněk.....	- 24 -
4.3. Imunofluorescenční barvení β -aktinu, vinkulinu a osteokalcinu.....	- 28 -
4.3.1. ELISA – osteokalcin	- 32 -
4.4. Publikace výsledků.....	- 32 -
5. Diskuze	- 33 -
6. Závěr	- 36 -
7. Seznam použité literatury	- 37 -
8. Přílohy.....	- 40 -

1. Úvod do problematiky

1.1. Regenerativní medicína

Ztráta nebo selhání funkce orgánu či části tkáně patří mezi časté, z lékařského hlediska náročné a obvykle i finančně nákladné situace v životě člověka, vedoucí mnohdy ke snížení kvality jeho života a možnosti uplatnění v běžném životě. Současná medicína využívá řadu přístupů, jak chybějící či poškozenou tkáň nahradit (Třesohlavá a Rypáček 2009). Dnes běžnými technikami regenerativní medicíny jsou rekonstrukce tkáně pomocí **autologních** štěpů, jejichž dárce je sám pacient, a **alogenní** tkáňové náhrady, kdy dárce je jiná osoba, tj. jiný jedinec téhož druhu. Autologní buňky vhodného fenotypu jsou odebrány pacientovi, pěstovány v kultuře samotné nebo na vhodném biomateriálu a po namnožení jsou implantovány zpět témuž pacientovi. Například keratinocyty tak mohou být použity jako zdroj pro náhrady kůže, chondrocyty pro chrupavku a osteoblasty pro kost. Tyto buňky jsou v prostředí organismu schopny dále proliferovat, migrovat, diferencovat, produkovat extracelulární matrix, a podílet se tak na regeneraci příslušné tkáně (Parikh 2002).

Xenogenní transplantáty (dárce je jedinec jiného druhu, např. prase), popř. transplantáty alogenní nejsou příliš vhodné kvůli možné pozitivní imunitní odpovědi organismu a následnému odvržení (tj. rejekci) náhrady. Další nevýhodou těchto transplantací je riziko přenosu infekčních onemocnění z dárce na pacienta (Vagaská a kol. 2009). Nicméně i použití autologních transplantátů je často **limitováno**. Největším úskalím této regenerační techniky je omezené množství vhodných autologních tkání pro daný typ rekonstrukce. Často nelze poškozenou tkáň zcela nahradit štěpem z jiné tkáně pacienta, ať už vinou rozsahu poranění, či nedostatku vhodné zdravé tkáně, a je nutné hledat řešení, která by vedla co nejpřirozenější cestou k funkční náhradě. Transplantovaná tkáň je zřídka schopna zcela nahradit funkci tkáně původní a zároveň tato rekonstrukce přináší **rizika** komplikací, jako jsou např. metabolické abnormality, infekce, zhoubné bujení či možnost lidského pochybení (např. možnost záměny autologních buněk). Navíc je získání autologní tkáně spojeno s další zátěží pacienta přídatnou operací.

Další možným zdrojem buněk pro implantaci mohou být **kmenové buňky**. Ty jsou pluripotentní vzhledem k vysokému stupni plasticity a schopnosti diferencovat do mnoha buněčných typů za specifických experimentálních podmínek (Rektorová 2002).

Současné trendy v rekonstrukční medicíně se spíše než na totální umělé náhrady tkáně zaměřují na postupy vedoucí k regeneraci tkáně nebo její náhradě tkání uměle připravenou, cestou tzv. tkáňového inženýrství (Třesohlavá a Rypáček 2009).

1.2. Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který kombinuje inženýrský přístup s poznatky přírodních věd za účelem vývoje biologické náhrady, která by mohla obnovit, zajistit či zlepšit funkci poškozených tkání či orgánů. Jako směr regenerativní medicíny se výrazně rozvinulo na počátku 90. let v reakci na problémy a potřeby klinické medicíny v oblasti náhrad nemocných či poškozených tkání.

Dosažení takového cíle prostřednictvím tkáňového inženýrství v sobě zahrnuje kombinaci živých buněk, v optimálním případě autologních (odebraných od postiženého pacienta), které by zajistily biologickou funkci, a podpůrného materiálu, většinou ve formě trojrozměrné matrice, v anglosaské literatuře nazývané jako „scaffold“. Ta osídlujícím buňkám zajišťuje dočasnou či trvalou podporu pro adhezi, migraci, růst a stimuly pro následné buněčné pochody, např. pro diferenciaci kmenových buněk do buněk zralé tkáně (Třesohlavá a Rypáček 2009). Nové tkáně jsou tvořeny *in vitro* („ve zkumavce“) a následně chirurgicky implantovány do organismu pacienta. Mohou plně nahrazovat původní tkáň nebo stimulovat potřebnou regeneraci poškozené tkáně.

Pro přípravu podpůrných struktur pro tkáňové inženýrství se studují materiály různých vlastností, zejména kovové slitiny, keramika, přírodní a syntetické polymery (Třesohlavá a Rypáček 2009). Při vývoji implantátů je snaha co nejvíce napodobit původní stavbu, chemické složení a mechanické vlastnosti tkáně, v našem případě kosti. Proto se vyvíjejí nejrůznější kompozity, ve kterých se spojují pozitivní vlastnosti jednotlivých složek kompozitu.

1.3. Kost

Kost je jednou z nejtvrdějších tkání v lidském těle a po chrupavce je to nejodolnější tkáň schopná odolávat mechanické zátěži. Kosti tvoří hlavní podíl skeletu dospělého jedince, poskytují oporu měkkým tkáním, chrání životně důležité orgány v dutině lebeční a hrudní a přechovávají ve své dřeni krvetvorný orgán. Slouží též jako zásobárna kalcia, fosfátů a jiných iontů, které mohou být řízeně uvolňovány nebo skladovány tak, aby se neměnilo iontové složení tělních tekutin. Kromě těchto úkolů vytvářejí kosti ještě systém pák, které násobí síly vznikající svalovou kontrakcí a mění je v tělesný pohyb.

Kost je specializovaná pojivová tkáň složená ze zvápenatělé mezibuněčné hmoty – kostní matrix a tří různých typů kostních buněk. Vnitřní i vnější povrch kostí je lemován vrstvou tkáně, nazývané endost, resp. periost, která obsahuje kostní (osteogenní) buňky (Junqueira a kol. 1992).

1.3.1. Kostní buňky

Kostní buňky jsou tří různých typů. Osteocyty sídlí v malých komůrkách (lakunách), zalitých v matrix; osteoblasty vytvářejí organickou složku mezibuněčné hmoty a osteoklasty, obrovské mnohjaderné elementy, vstřebávají a přestavují kostní tkáň (Junqueira a kol. 1992).

1.3.1.1. Osteoblasty

Osteoblasty jsou odpovědné za syntézu organických složek kostní matrix (kolagenu I, proteoglykanů a glykoproteinů) a na jejich přítomnosti je závislé i ukládání anorganických součástí kosti. Neminerální organická kostní hmota se nazývá ossein. Postupně se do kosti ukládají minerály, čímž dochází k zpevnování kosti, ale zároveň ke ztrátě její pružnosti (Jelínek a Zicháček 2005). Osteoblasty se nalézají výhradně na povrchu kosti, seřazené těsně vedle sebe na způsob jednovrstevného epitelu. Mají výběžky, jimiž navazují kontakt s osteoblasty ve svém sousedství, s vnitřním a vnějším povrchem kosti a s krevními cévami procházejícími matrix (Junqueira a kol. 1992).

1.3.1.2. Osteocyty

Jakmile je buňka zalita v novotvořené matrix, začneme osteoblast nazývat osteocytem. Vznikají tak i lakuny (jamky) a kanálky, neboť matrix se vytváří kolem buněčných těl i jejich výběžků. Ve srovnání s osteoblasty mají osteocyty méně organel. Jejich aktivita pomáhá udržovat kostní mezibuněčnou hmotu, proto je jejich zánik následován resorpcí (vstřebáním) matrix.

1.3.1.3. Osteoklasty

Osteoklasty jsou velké (i 100 μm) mnohjaderné (5-50 nebo i více jader) bohatě větvené pohyblivé buňky. Vznikají splýváním krevních monocytů a tvoří tak i součást imunitního systému. Vylučují enzymy (kyselá fosfatáza, kolagenáza), které atakují kostní matrix a uvolňují zvápenatělou základní hmotu, čímž odbourávají kostní tkáň. Enzymaticky vyleptané prolákliny matrix, v nichž leží osteoklasty resorbující kost, se nazývají Howshipovy lakuny.

1.3.2. Kostní matrix

Anorganické látky tvoří okolo 50% suché hmotnosti kosti. Převládá vápník (Ca) a fosfor (P), avšak najdeme zde i hydrogenuhličitan (HCO_3^-), citrát (kyselina citronová; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), hořčík (Mg), draslík (K) a sodík (Na). Vápník a fosfor tvoří krystalky **hydroxyapatitu** ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Dále je ve významném množství přítomen amorfni (nekrystalický) **fosforečnan vápenatý** (trikalciumfosfát; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

Organickou hmotu tvoří kolagen I a amorfni základní hmota, která obsahuje glykosaminoglykany společně s proteiny. Kostní sialoprotein a osteokalcin velmi dobře vážou kalcium a jsou tak důležitým faktorem kalcifikace (vápenatění) kostní matrix. Ostatní tkáň obsahující kolagen I, které nejsou za normálních okolností zvápenatělé, tyto glykoproteiny neobsahují.

Spojení hydroxyapatitu s kolagenními fibrilami zajišťuje kosti charakteristickou tvrdost a pružnost. Odvápněná kost si uchová svůj tvar a získá ohebnost srovnatelnou se šlachou. Původní tvar zůstane zachován i po odstranění látek organického původu, avšak kost se stane křehkou a snadno se láme a tříští (Junqueira a kol. 1992).

1.3.3. Periost a endost

Zevní i vnitřní povrch kosti pokrývá vrstva osteogenních buněk a vaziva, která se nazývá periost, resp. endost. Periost se sestává ze zevní vrstvy kolagenních vláken a fibroblastů. Vnitřní, vícebuněčná vrstva periostu je složena z plochých elementů obdařených schopností mitoticky se dělit a diferencovat v osteoblasty. Tyto osteoprogenitorové buňky mají výraznou úlohu při růstu a reparaci (opravě) kostí. Endost vystýlá vnitřní povrch kostních dutin a skládá se z jediné vrstvy oploštělých osteoprogenitorových buněk a nepatrného množství vaziva. Proto je endost ve srovnání s periostem podstatně tenčí. Hlavní funkce periostu a endostu je výživa kostní tkáňe a nepřetržitá dodávka nových osteoblastů určených k obnově a růstu kosti (Junqueira a kol. 1992).

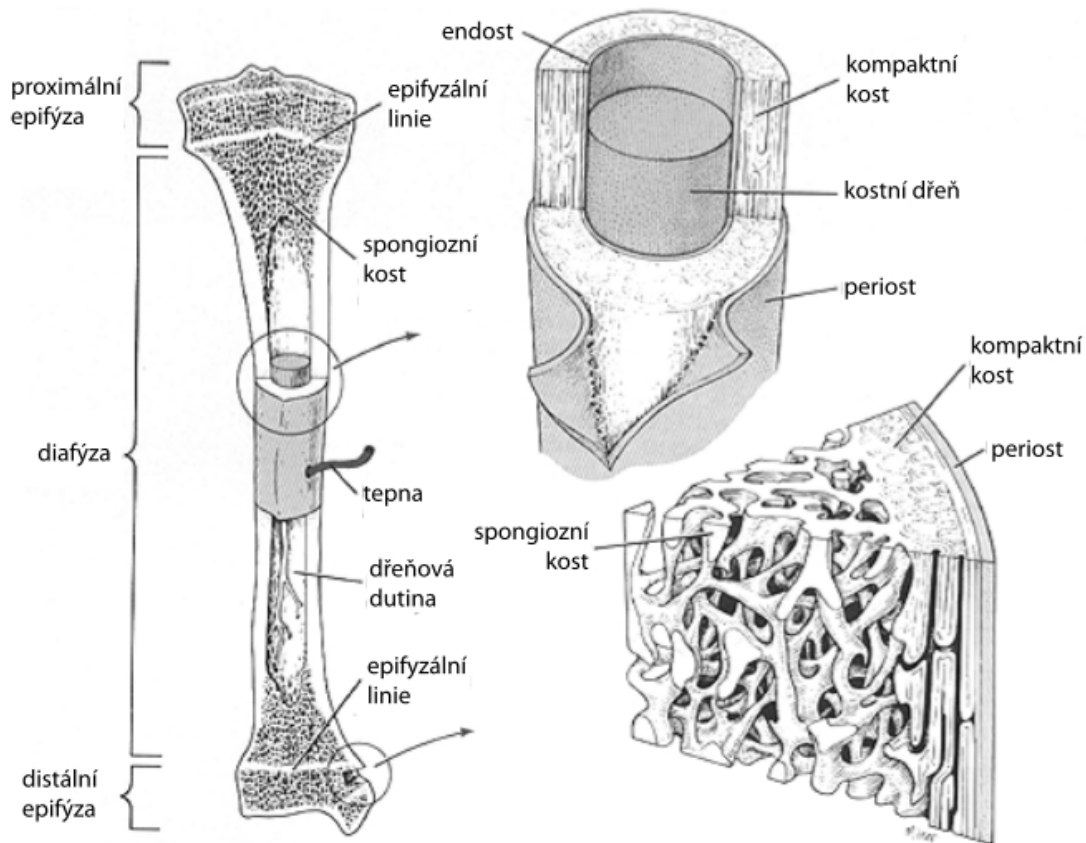
1.3.4. Stavba kosti

Existují dva typy kostní tkáňe: **primární**, nezralá čili vláknitá kost a **sekundární**, zralá neboli lamelózní kost. Primární kost je prvním typem kostní tkáňe, která se objevuje v embryonálním vývoji i při hojení zlomeniny a ostatních reparačních procesech. Je charakterizována náhodným rozložením jemných kolagenních vláken – na rozdíl od organizovaného uspořádání kolagenu v kosti sekundární. Primární kost je dočasná a u dospělých je nahrazena kostí sekundární.

Makroskopické pozorování kosti na příčném řezu ukazuje, že kost se skládá z celistvých úseků bez mezer – odpovídajících **kompaktní kosti** – a oblastí s velkým množstvím navzájem propojených dutinek – tvořených kostí **spongiózní** (Obr. 1). Při mikroskopickém pohledu však zjistíme, že kompaktní kost i trabekuly oddělující dutinky spongiózní kosti mají v zásadě stejnou histologickou strukturu.

Rozšířené konce dlouhých kostí, zvané **epifýzy**, jsou tvořeny spongiózní kostí krytou tenkou vrstvou kosti kompaktní. Válcovitá **diafýza** je téměř úplně složena z kompaktní kosti, s malou příměsí spongiózy na vnitřním povrchu, hraničícím s dřevnou dutinou. Krátké kosti mají obvykle spongiózní jádro obklopené kompaktní. Ploché kosti lebeční klenby jsou tvořeny dvěma lamelami (destičkami) kompakty, oddělenými od sebe vrstvou spongiózní kostní tkáňe, zvané *diploe*.

Dutiny spongiózní kosti a prostor v dialýzách dlouhých kostí (dřevná dutina) obsahují kostní dřev dvojího druhu: *červenou kostní dřev*, ve které se tvoří krvinky; a *žlutou kostní dřev*, obsahující především tukové buňky (Junqueira a kol. 1992).



Obr. 1. Stavba kosti (zdroj: <http://homepage.mac.com/myers/misc/bonefiles/bonestruct.gif>, upraveno).

1.3.5. Vybrané kostní proteiny

1.3.5.1. Kolagen

Kolagen je extracelulární glykoprotein, který je základní stavební hmotou pojivových tkání. Vyznačuje se velkou pevností. Je to nejčastější protein v tkáních savců, přičemž tvoří kolem 40% všech proteinů lidského těla (Campbell a Reece 2008). V současnosti je známo nejméně 27 rozdílných typů kolagenů; až 80-90% kolagenu v organismu je tvořeno fibrilárními kolageny I, II, nebo III. Kolagen I, který je přítomný v kosti, je tvořen molekulami triple-helixu o šířce 50-200 nm (Lodish a kol. 2004) a délce až 300 nm. Tyto molekuly již mimo buňky asociují do fibril a následně do vláken, která jsou dále navzájem spojena pevnými kovalentními vazbami.

1.3.5.2. Osteocalcin

Osteocalcin je glykoprotein extracelulární matrix vylučovaný osteoblasty. Váže vápník a je považován za ukazatel osteogenní diferenciaci. Pro syntézu osteocalcinu je důležitý vitamin K; pokud není osteocalcin aktivován vitaminem K, nemůže dojít k ukládání vápníku v kostech. Osteocalcin podporuje tvorbu buněk tvořící kostní tkáň (osteoblasty) a současně zabráňuje tvorbě buněk, které způsobují úbytek kostní tkáně (osteoklasty) (Vitaminy skupiny K, 2007).

1.3.5.3. Vinkulin

Vinkulin je buněčný protein asociovaný s integrinovými receptory, které zprostředkují adhezi buňky na extracelulární matrix nebo umělý materiál i interakci mezi buňkami navzájem. Vinkulin pomáhá spojovat aktinový cytoskelet s integriny v plazmatické membráně. Jeho molekuly jsou přítomné spolu s integrinovými receptory a dalšími proteiny v tzv. fokálních adhezních placích,

rovněž nazývaných fokální adheze, fokální adhesní komplexy nebo fokální kontakty (Lodish a kol. 2004). Fokální adheze slouží k přenosu signálů mezi buňkou a extracelulární matrix oběma směry. Přenesené signály aktivací mnohých signálních kaskád následně řídí chování buněk, např. přežití buněk, jejich adhezi, proliferaci, migraci, diferenciaci apod.

1.3.5.4. Aktin

Aktin je globulární (makromolekuly zaujímají tvar klubka – globule) strukturální protein, který polymeruje v dlouhá vlákna zvaná mikrofilamenta, tvořící součást cytoskeletu buňky. Je jednou z nejhojnějších intracelulárních bílkovin eukaryotických buněk, tvoří kolem 5 % celkových buněčných proteinů (Nečas a kol. 2000). Aktin má také vysoce konzervativní strukturu (aktin izolovaný z kvasinky a γ -aktin člověka se shodují ve více než 90% aminokyselin). V současnosti jsou známy následující izoformy aktinu: α -aktin 1, 2, 3, přítomný v myofibrilách svalových buněk; β -aktin nacházející se v cytoskeletu a buněčném jádře; je nejvíce rozšířeným aktinem ve většině buněk, má strukturální funkci (výztuž, změna tvaru buňky), rovněž se účastní při migraci buňky a alespoň do jisté míry ho lze považovat za ukazatel vyžralosti buněk, např. u endotelových buněk platí, že fenotypicky vyžralá buňka má dobře vyvinutý beta-aktinový cytoskelet (Podestá a kol. 1997); γ -aktin 1 přítomný např. v stereociliích sluchových buněk a γ -aktin 2 v myofibrilách svalových buněk; účastní se pohybu buněk a ovlivňuje jejich strukturu a integritu (celistvost) (Aktin, 2009).

1.4. Vlastnosti materiálů

Podpurná matrice (scaffold) pro kultivaci tkáně musí splňovat určitá kritéria, jako např. snadnou zpracovatelnost do požadovaného tvaru a velikosti či vhodné mechanické vlastnosti odpovídající aplikaci. Například v případě náhrad cév materiál nesmí prasknout nebo se „odhojit“ z místa, kde byl přišit k živé tkáni, musí být dlouhodobě stabilní a odolávat i výkyvům krevního tlaku. Pro některé aplikace je naopak žádoucí jeho **vstřebatelnost**, v takovém případě hovoříme o biodegradovatelné náhradě, kdy je tvorba tkáně doprovázena degradací (tj. odbouráváním, rozkladem) původní matrice, až dojde k jejímu postupnému vyloučení z těla. V těchto případech je samozřejmě důležitá i povaha degradačních produktů a jejich bezpečnost pro lidský organismus (Třesohlavá a Rypáček 2009). Rychlost degradace by také měla být úměrná rychlosti růstu nové tkáně. Pro zajištění přichycení (adheze) buněk, migrace buněk do nitra materiálu i difúze výživných látek strukturou musí být matrice vysoce porézní s přiměřenou velikostí pórů.

U materiálu se také musí posuzovat jeho **biokompabilita**, tj. snášenlivost materiálu v lidském organismu. Především **nesmí** být pro živý organismus **toxický** a neměl by vyvolávat ani jiné nežádoucí reakce (např. alergické, zánětové, karcinogenní či mutagenní).

Biomateriály mohou být bioinertní nebo bioaktivní. **Bioinertní** materiály (také označované jako biomateriály první generace) vytváří jakýsi neutrální prvek. Jsou navrhovány tak, aby odpovídaly mechanickým vlastnostem nahrazované tkáně a aby nedovolovaly adsorpci proteinů a buněčnou adhezi (přilnavost), za účelem omezení možné negativní imunitní odpovědi (Vagaská a kol. 2009). Bioinertní materiál však nikdy není neutrální dokonale a vždy dochází alespoň k určitým interakcím s organismem. Proto se v dnešní době přechází spíše k vývoji **bioaktivních** materiálů (tzv. biomateriály druhé generace), které by měly vyvolávat specifické žádoucí buněčné reakce jako například **adhezi** (přilnavost buněk k materiálu), **proliferaci** (množení) a **diferenciaci** (diferenciace kmenových buněk, rozruznění buněčných typů, buňka získává vlastnosti daného buněčného typu) buněk. Dochází tak např. k tvorbě nové kostní tkáně, která pevně spojuje implantát s okolní původní tkání (Vagaská a kol. 2009).

1.4.1. Vzájemné interakce mezi materiálem a kostními buňkami

Biomateriál po implantaci do organismu přichází do styku s fyziologickými tekutinami a na svůj povrch adsorbuje proteiny ze séra nebo kultivačního média, např. fibronektin, či vitronektin. Tato vrstva proteinů zprostředkovává buněčnou adhezi a také komunikuje s buňkami prostřednictvím jejich povrchových receptorů - integrinů. Stanovováním určitých proteinů podílejících se na adhezi buňky pak lze posoudit buněčnou odpověď na biomateriál (Thomas a kol. 1997).

1.4.2. Fyzikální a chemické vlastnosti povrchu materiálu ovlivňující buněčnou odpověď

Typ, množství a struktura adsorbovaných proteinů majících silný vliv na buněčnou odpověď závisí hlavně na **vlastnostech povrchu** materiálu. Mezi významné chemické vlastnosti povrchu patří především smáčivost a plošný náboj, mezi fyzikální vlastnosti tuhost, drsnost a reliéf povrchu (Vagaská a kol. 2009).

1.4.2.1. Chemické vlastnosti povrchu

Při zjišťování vlivu chemických vlastností povrchu na adhezi, diferenciaci osteoblastů a mineralizaci matrix byly testovány 4 typy povrchů s různými chemickými funkčními skupinami: nepolární $-CH_3$, neutrálně polární $-OH$ skupina, záporně nabitá $-COOH$ a pozitivně nabitá $-NH_2$ skupina. Nejsilnější adheze byla zjištěna na neutrálně polárním povrchu ($-OH$ skupina), nejnižší na nepolárním hydrofobním povrchu ($-CH_3$), který silně denaturoval adsorbované proteiny. Adheze na površích s $-COOH$ a NH_2 byla přibližně stejná a pohybovala se mezi hodnotami $-OH$ a $-CH_3$. Podobně vyšší diferenciaci osteoblastů a mineralizace matrix byla pozorována na $-NH_2$ a $-OH$ površích, nižší hodnoty v případě $-COOH$ a $-CH_3$ skupin (Keselowsky a kol. 2003). Další studie prokázaly, že buňky preferují pozitivně nabitě povrchy před negativně nabitými (Lee a kol. 1997).

Další významnou chemickou charakteristikou povrchu materiálu je i **smáčivost**. Jako optimální se pro buněčnou adhezi jeví mírně hydrofilní povrchy (Webb a kol. 1998). Na extrémně hydrofilních površích (např. polyetylen glykol) je adsorpce proteinů zprostředkovávající buněčnou adhezi nedostatečná a nestabilní, a tak tyto materiály nemohou zajistit adhezi buněk k povrchu a následně rozptřeni buněk na materiálu (Vagaská a kol. 2009). Hydrofobní povrchy, jak již bylo řečeno výše, způsobují silnou adsorpci proteinů. Ty jsou však adsorbovány v nevhodné konformaci, která snižuje dostupnost jejich specifických vazebných míst pro integrinové receptory buněk. Navíc dochází k preferenční a silné adsorpci albuminu, který je po buňky neadhesivní (Arima a Iwata 2007).

1.4.2.2. Fyzikální vlastnosti povrchu

Dalším faktorem, který ovlivňuje buněčnou adhezi, je **tuhost** substrátu. Pokud je povrch materiálu příliš měkký, např. u polyakrylamidových gelů, není schopný odolat trakčním silám buněk a adherované buňky se nemohou rozprostřít – mají okrouhlý tvar, nevykazují žádnou organizaci cytoskeletu a fokálních adhezí a následně podstupují programovanou smrt - apoptózu (Engler a kol. 2004). Nicméně materiály pro kostní tkáňové inženýrství jsou konstruovány jako nosné, proto bývají dostatečně tuhé a tento faktor nehraje významnou roli.

Také reliéf a drsnost mají významný vliv na adsorpci proteinů a následné chování buněk. Podle míry nepravidelností povrchu můžeme rozlišovat makrodrsnost (nerovnosti o rozměrech 100 μm - milimetry), mikrodrsnost (100 nm – 100 μm) a nanodrsnost (méně než 100 nm). Každá z uvedených úrovní drsnosti má svůj specifický vliv na buňky.

Makrodrsnost se jeví příznivě, protože zlepšuje upevnění implantátu v tkáni a obvykle nebývá negativně vnímána buňkami, např. neomezuje jejich adhezi a rozptřeni. Buňky, nejčastěji

o velikosti 10 - 100 μm (**mikrodrsnost**), jsou přirozeně citlivé k mikrorelífu prostředí (Stevens a George 2005). Bylo zjištěno, že osteoblasty rostoucí na mikrodrsných površích jsou stimulovány směrem k diferenciaci, jak ukázala jejich genová exprese a vyšší stupeň mineralizace v porovnání s buněčným růstem na hladkých površích (Lossdorfer a kol. 2004, Schneider a kol. 2003). Na druhé straně byla pozorována i snížená adheze a proliferace na tomto druhu povrchu (Lossdorfer a kol. 2004), pravděpodobně kvůli faktu, že velikost adhesní plochy buněk je limitována reliéfem povrchu materiálu.

Zatímco přesný efekt mikrodrsnosti na buněčné chování zůstává stále sporný, značná pozornost byla v posledních letech věnována studiu **nanostruktur** (menší než 100 nm) povrchu. Bylo objeveno, že nanostruktura materiálu má příznivý vliv na chování osteoblastů, zahrnující iniciální adhezi, následnou proliferaci a diferenciaci. Přirozené prostředí buňky, extracelulární matrix, je také organizována v nanorozměrech. Skládá se hlavně z kolagenních vláken o tloušťce 50 – 200 nm a anorganických hydroxyapatitových nanokrystalů o velikosti kolem 4 nm (Stevens a George 2005). Proto se vývoj nových, biologicky inspirovaných kompozitů soustředil především na konstruování povrchů s nanodrsností.

Avšak ani mechanismus vlivu nanodrsnosti na buněčné chování není ještě zcela objasněn. U nanostrukturovaných povrchů byla zatím pozorována vyšší adsorpce proteinů extracelulární matrix, selektivní adsorpce určitých typů proteinů či zvýšená bioaktivita adsorbovaných proteinů. Nanoreliéf má také pravděpodobně značný vliv na geometrickou stavbu adsorbovaných proteinů a dostupnost specifických buněčných vazebných domén pro buněčné adhezni receptory (Webster a kol. 2000). Některé studie dokonce ukazují, že pro zvýšenou adhezi osteoblastů hraje nanostruktura významnější roli než chemické vlastnosti povrchu (Price a kol. 2004). Nanostruktury také zvětšují plochu materiálu, čímž mění i rozložení funkčních skupin na povrchu. Více odkryté funkční skupiny pak upravují smáčivost povrchů kompozitů stejného chemického základu (Vagaská a kol. 2009).

1.5. Materiály pro kostní náhrady

Kovy díky své pevnosti jsou vhodné především pro využití v nosných kostních náhradách. Na druhé straně kostní tkáň může před těžkou a tuhou kovovou náhradou ustupovat a může docházet k vymílání kosti a uvolňování náhrady (Wang 2003). Dalším nebezpečím je koroze (následkem působení tělních tekutin) či uvolňování kovových iontů, které ve vyšších koncentracích mají negativní vliv na okolní kostní tkáň (např. snižují tvorbu kostní tkáně) (Park a Kim 2003). Často také dochází k alergickým reakcím, např. na nikl či chrom. Dnes se využívají především kovové slitiny obsahující kobalt, chrom, molybden, nikl nebo titan. Výhodou titanu oproti ostatním zmíněným prvkům je jeho relativně nízká hustota (4530 kg/m^3 při 20°C) (Mikulčák a kol. 2008), a tedy i nižší hmotnost, a relativně vysoká biokompatibilita.

Keramické materiály jsou podobně jako kovy tvrdé, nepružné, biologicky nedegradovatelné a mohou se z nich uvolňovat částice. Další nevýhodou je i jejich křehkost. Na druhé straně se vyznačují vysokou biokompatibilitou, některé látky jsou dokonce i silně bioaktivní, a nedochází u nich ke korozi.

V průběhu druhé světové války, která vyvolala zvýšenou potřebu náhrad tkání, došlo k rozvoji uplatnění **syntetických polymerů** v regenerativní medicíně. Bylo pozorováno, že mnoho pilotů zraněných plastovými úlomky z krytu pilotní kabiny (tehdy vyráběné z polymetylmetakrylátu, PMMA) netrpí chronickou odmítavou reakcí imunitního systému vůči těmto úlomkům. PMMA se následně začal hojně využívat např. pro náhrady částí poškozených lebečních kostí nebo i očních rohovek (Griffith 2000).

Další výhodou **polymerů** je také jejich snadná výroba a možnost přípravy polymeru přímo odpovídajícímu požadované aplikaci. Lze tak připravit např. polymery stabilní, neschopné resorpce, přes částečně vstřebatelné až po plně degradovatelné. Polymerní materiály se také vyznačují nízkou hmotností. Jsou biokompatibilní a nedochází u nich ke korozi či alergickým reakcím. Nicméně jsou příliš málo pevné, aby mohly samostatně nést vyšší hmotnostní zatížení (Vagaská a kol. 2009).

1.5.1. Polymery

Polymer je velká molekula (makromolekula) složená z mnoha opakujících se strukturních jednotek (monomerních jednotek neboli merů, tj. molekul jednoho nebo více druhů atomů nebo skupin), spojených charakteristickými kovalentními chemickými vazbami do dlouhých řetězců. Řetězce mohou být přímé, nerozvětvené (např. polyetylen nebo polybutadien – umělý kaučuk), nebo se mohou větvit (např. přírodní kaučuk či syntetický polystyren). Polymerní látky však nemusí vytvářet pouze lineární řetězce. Mezi jednotlivými řetězci monomerních jednotek mohou vznikat vzájemné chemické vazby, vytvářející plošnou, nebo i prostorovou strukturu molekul polymerů. Počet monomerních jednotek udává polymerační stupeň n , který má hodnotu 10 až 10^6 . Sloučeniny s nízkým polymeračním stupněm nazýváme **oligomery**, s vyšším polymeračním stupněm **polymery** (Griffith 2000).

Polymery typicky vznikají polymerací, tj. chemickou reakcí, při které z jednoduchých molekul (monomerních jednotek) vznikají makromolekuly (polymery), nebo polykondenzací, kde při spojování merů dochází ještě k uvolnění vedlejšího produktu, např. vody. Mohou být také vyrobeny ze směsi dvou a více typů monomerů. Pak hovoříme o kopolymerizaci a vzniklou látku nazýváme **kopolymer** (např. fenolformaldehyd) (Polymer, 2010).

Polymery biologického původu nazýváme **biopolymery** nebo **biomakromolekulární látky** a patří mezi ně např. fibrin, přírodní kaučuk, jantar, hedvábí a z něho vyráběný fibroin, chitosan, celulóza, ale lze sem také zařadit i proteiny (kolagen) a nukleové kyseliny. Mezi nejznámější **syntetické polymery** používané v medicíně patří např. poly(etylen tereftalát) (PET), poly(tetrafluoroetylen), poly(mléčná kyselina), poly(glykolová kyselina), poly(kaprolakton), polyetylen či silikon (Griffith 2000).

1.5.2. Kompozity

Kompozity jsou složené materiály, ve kterých se spojují pozitivní vlastnosti jeho složek. Mechanické vlastnosti kompozitního materiálu nezávisí pouze na **typu** kombinovaných materiálů, ale také na jejich **objemovém podílu** a **tvaru** (hlavně částice a vlákna) (Lakes 2003).

Přírodní kost lze považovat za kolagen-hydroxyapatitový kompozit (Wang 2003). Mezibuněčná hmota kostní tkáně je vyplněna především kolagenovými vlákny (organická složka), poskytujícími pevnost a sloužící jako výztuž, a anorganickými krystalky hydroxyapatitu a jiných fosfátů vápníku, především trikalciemfosfátu. Vědci se inspirovali touto strukturou a při tvorbě nových biomateriálů pro kostní náhrady se zaměřili především na kompozity skládající se z polymerní matrice vyztužené vlákny a obsahující bioaktivní částice (Wang 2003).

V dnešní době se vyvíjejí a testují také kompozity ve formě prostorového trojrozměrného **scaffoldu** („lešení“). Bývají z biodegradovatelných materiálů, které jsou později nahrazeny vrůstající kostní tkání. Růst a dozrávání buněk uvnitř scaffoldu může být stimulován dynamickou buněčnou kultivací v dynamických průtokových nebo rotačních bioreaktorech. Tyto ve srovnání s klasickými statickými buněčnými kultivačními systémy zajišťují lepší zásobování buněk kyslíkem a živinami, rychlejší odstraňování odpadních produktů a poskytují mechanickou stimulaci prospěšnou jejich diferenciaci a fungování (Janssen a kol. 2006). Podobný příznivý efekt na formování kostní tkáně může být také vyvolán užitím elektromagnetických bioreaktorů (Fassina a kol. 2007).

1.5.2.1. Vlákna

Vláknité složky kompozitů navrhované pro kostní náhrady jsou nejčastěji z přírodních nebo syntetických polymerů, bioskla, uhlíku nebo kombinací těchto materiálů. Mezi nejčastěji používané přírodní polymery patří kolagen, želatina, chitosan nebo fibroin, protein vytvářený bourcem morušovým při produkci hedvábí. Syntetické polymery jsou zastoupeny širokou škálou degradovatelných, jako např. polykaprolakton, polylaktid, polyglykolid a jejich kopolymery,

i stabilních polymerů, např. polyfosfazeny (skupina kovoorganických polymerů s vysokou biokompatibilitou, vysokoteplotní stabilitou a nízkoteplotní flexibilitou) a alifatických či aromatických polyamidů, především aramidů. Testování kompozitů s uhlíkovou či polymerní matricí vyztuženou uhlíkovými vlákny ukázalo jejich výborné mechanické vlastnosti a vysokou biokompatibilitu, ale také uvolňování malých částic a úlomků z těchto náhrad (Vagaská a kol. 2009).

1.5.2.2. Matrix

Podobně jako vlákna, také **matrix** umělé kostní náhrady bývá vyrobena z přírodních či umělých polymerů. Zkoumají se např. matrice obsahující želatinu, chitosan, alginát, polylaktidy, hydrogely, materiály se siloxanovým základem, PET, polyamidy a mnoho dalších (Vagaská a kol. 2009). Tyto materiály často ještě bývají kombinovány s anorganickými částicemi, nebo jsou na ně navázány bioaktivní molekuly, jako např. kostní morfogenetický protein-2 (bone morphogenic protein 2, BMP2) či transformující růstový faktor beta-1 (transforming growth factor β 1, TGF β 1) (Jung a kol. 2008, Lilli a kol. 2002).

1.5.2.3. Anorganické částice

Nerozšířenější **částicovou složkou** přírodně inspirovaných kompozitů je **hydroxyapatit (HA)**. Vyznačuje se vysokou biokompatibilitou a bioaktivitou. Je schopný vytvářet silné vazby s kostní tkání a podporovat formování kosti. Kompozity s obsahem HA vykazují stimulační účinky na buněčnou proliferaci (Vagaská a kol. 2006). Bylo také zjištěno, že nanočástice HA jsou schopné zlepšit mechanické vlastnosti kompozitu, např. zvýšit jeho pevnost (Wang a kol. 2002). Tento fakt lze uplatnit především u porézních nosičů („scaffoldů“), které kvůli své nízké pevnosti dosud nemohly být využívány jako implantáty do zátěžových oblastí. Dále byly pozorovány pozitivní účinky nano-HA na vzájemné působení mezi buňkou a biomateriálem (Webster a kol. 2000), např. zvyšovaly biokompatibilitu kompozitu (Kong a kol. 2005). Formování kostní tkáně také pravděpodobně souvisí s možností kontaktu osteoblastů s nanočásticemi HA. Polymerní scaffoldy s odkrytými částicemi HA na svém povrchu totiž vykazovaly vyšší počty buněk a vyšší stupeň diferenciací a mineralizace než buňky rostoucí na tradičních scaffoldech, kde je většina HA částic kryta polymerní matricí (Kim a kol. 2006). Nicméně nejen velikost HA částic, ale také jejich skladba, krystaličnost a tvar mají vliv na chování buněk.

Dalším velmi významným členem kalcium fosfátové skupiny, užívané v kostním tkáňovém inženýrství, je **trikalcium fosfát (TCP)**. Bývá často upřednostňován před krystalky HA kvůli své vysoké míře (rychlosti) rozpustnosti, která podporuje tvorbu nové kostní tkáně v podmínkách *in vivo*, tj. po zavedení do živého organismu (Jensen a kol. 2007). Na druhé straně vyšší rozpustnost TCP může být také spojena s vyšší mírou uvolňování a vyšší lokální koncentrací vápenatých a fosfátových iontů, což může toxicky působit na okolní buňky (John a kol. 2003, Detsch a kol. 2008).

Kromě kalcium fosfátů se zkoumají také jiné anorganické složky zvyšující bioaktivitu umělých kostních náhrad, jako např. uhličitany (uhličitan vápenatý, aj.), fosfáty, křemičitany, sírany (např. síran barnatý), oxidy (oxid hořečnatý, sodný či draselný) nebo molekuly obsahující fluór nebo zirkon (Vagaská a kol. 2009). Podobně jako vlákna a molekuly matrix v kompozitech, také anorganická částicová složka materiálu může obsahovat navázané růstové faktory či jiné látky podporující regeneraci kostní tkáně (Cui a kol. 2008, Ponader a kol. 2008).

2. Cíle práce

Cílem této práce je hodnocení nedegradovatelných kompozitních materiálů složených z dimetylsiloxanové pryskyřice, aramidové sítě a bioaktivní složky, představované nanočásticemi nebo mikročásticemi trikalciumfosfátu, v buněčné kultuře lidských osteoblastů. Tento materiál napodobuje svým složením strukturu kosti, jelikož obsahuje amorfní složku - dimetylsiloxanovou pryskyřici, vláknitou složku - aramidovou tkaninu a bioaktivní částice – trikalciumfosfát (TCP).

Naše hypotéza je, že tyto materiály budou netoxické a budou podporovat adhezi, růst a diferenciaci kostních MG 63.

Cílem práce je:

- 2.1. Najít optimální koncentrace mikro- a nanočástic TCP, které nejlépe podpoří adhezi, růst a diferenciaci lidských kostních MG 63 buněk. Budou testovány koncentrace 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25 % mikro-TCP a nano-TCP v kompozitním materiálu.
- 2.2. Porovnat vliv velikosti částic TCP, tj. mikro-TCP (50-150 μm) a nano-TCP (100 nm) na chování kostních MG 63 buněk.
- 2.3. Na základě výsledků experimentálních testů posoudit vhodnost použití daných kompozitních materiálů pro tkáňové inženýrství kostních náhrad.

3. Metodika

3.1. Výroba kompozitů

Nejprve byla připravena homogenní lisovací směs siloxanové pryskyřice se 2, 5, 10, 15, 20 a 25 objemovými procenty nanočástic (100 nm, NF) a mikročástic (50-150 μm, MF) trikalciumpfosfátu. Ke směsi byla přidána aramidová tkanina tak, aby výsledný kompozit obsahoval kolem 40 objemových procent výztuže. Lisováním byly vytvořeny výsledné kompozity, které před předáním byly ještě očištěny a desinfikovány lihem.

Kompozity byly vyrobeny v Ústavu struktury a mechaniky hornin Akademie věd České republiky, Praha.

3.2. Příprava vzorků

Vzorky jsme nařezali na velikost 1 cm x 1 cm. Nechali jsme je po dobu 30 min sterilizovat v horké páře v autoklávu (121°C, 2-5 ks na každý časový interval) a uložili do 24-jamkové kultivační destičky (TPP, Švýcarsko, kat. č. 92024).

3.3. Použitý materiál k testům in vitro

Připravené vzorky, lidské osteoblastům podobné buňky linie MG 63 (izolované z osteosarkomu třináctiletého chlapce).

3.4. Nasazování buněk

- 1) Opláchnout buňky v kultivační lahvi roztokem PBS¹ (Sigma-Adrich)
- 2) Do lahvičky s buňkami přidat 3 ml trypsinu²/EDTA³ (Sigma-Adrich) a promíchat roztok (mírné naklánění ze strany na stranu)
- 3) Inkubovat cca 3 min při v inkubátoru (37°C, 5% CO₂, nasycená vlhkost vzduchu), dokud se buňky neoddělí ze dna lahvičky
- 4) Přidat asi 3 ml kultivačního media (DMEM⁴, Sigma-Adrich; kat. č. D5648) + 10% FS⁵ (GIBCO, UK, kat. č. 10270-106)
- 5) Centrifugovat buněčnou suspenzi 5 min při 1 000 otáčkách/min

¹ **PBS** = phosphate-buffered saline, fosfátový pufr – 1 tableta rozpuštěná v 200 ml deionizované vody (nevodivá) obsahuje 0,01M fosfátový pufr; 0,0027 M chlorid draselný (KCl) a 0,137 M chlorid sodný (NaCl), pH 7,2 - 7,4; 25°C; slouží k udržování konstantního pH

² **Trypsin** – trávicí enzym dvanáctníku; patří mezi hydrolázy, proteázy, vzniká ve slinivce břišní jako proenzym trypsinogen, v dvanáctníku je enzymaticky aktivován enterokinázou a dříve vzniklými molekulami trypsinu (tzv. autokatalýza), štěpí peptidické vazby na C-terminální straně aminokyselin lysinu a argininu

³ **EDTA** = ethylenediaminetetraacetic acid; [CH₂N(CH₂CO₂H)₂]₂ – polyaminokarboxylová kyselina; chelatační látka vážící dvojmočné kationy (např. vápník), zvyšující účinek trypsinu vyvázáním vápníku, který se podílí na adhezi buněk k povrchu

⁴ **DMEM** = Dulbecco's Modified Eagle's Medium – obměna EMEM (Eagle's minimal Essentials medium) – buněčný kultivační roztok; obsahuje glukózu, aminokyseliny, vitamíny, soli a další látky, jako např. železo a fenolovou červen, která představuje indikátor pH – barví se podle pH

⁵ **FS** = FBS = Fetal bovine serum – část krevní plazmy zbývající po srážení krve (přeměna krevního proteinu fibrinogenu na fibrin), získává se z vyvíjejících se kravích zárodků na jatkách, obsahuje mnoho růstových faktorů a málo protilátek, hlavní součástí FBS je protein albumin

- 6) Odsát supernatant⁶
- 7) K sedimentu přidat 5 ml kultivačního média (DMEM + 10% FS)
- 8) Spočítat populační hustotu (densitu) buněk pomocí Bürkerovy komůrky
- 9) Naředit roztok kultivačním médiem se sérem tak, aby v 1 jamce bylo 15 tisíc buněk/ 1,5 ml DMEM + 10% FS
- 10) Přidat do komůrek se vzorky 1,5 ml naředěné suspenze
- 11) Vzorky s nasazenými buňkami umístit do inkubátoru

3.5. Počítání buněk v Bürkerově komůrce

- 1) Podobně jako v postupu při nasazování buněk trypsinem uvolnit buňky a připravit suspenzi buněk v DMEM médiu.
- 2) Do Bürkerovy komůrky přidat dvě kapky buněčné suspenze a celý preparát pozorovat pod mikroskopem (Olympus IX71, digitální kamera DP71)
- 3) Jedna komůrka obsahuje 2 velké čtverce ohraničené 3 čarami a každý velký čtverec se dále dělí na 9 menších čtverců, rovněž ohraničených 3 čarami
- 4) Při nižší hustotě buněk spočítat všechny buňky ve velkém čtverci a vydělit toto číslo 9 (=> průměrný počet buněk v 1 malém čtverci)
Při vyšší hustotě buněk spočítat buňky alespoň v 6 menších čtvercích (např. umístěných po diagonále) a udělat aritmetický průměr
- 5) Získané číslo vynásobit 10 000 a poté ještě počtem ml získané buněčné suspenze (čímž dostaneme celkový počet buněk)
- 6) Měření 2-3x zopakovat

3.6. Počítání buněk ze zorných polí, růstové křivky, doubling time

- 1) Otevřít si 1 obrázek (zorné pole) s buňkami vyfotografovaný pomocí mikroskopu (objektiv $\times 10$) nejlépe v prohlížeči fotografií (Adobe Photoshop)
- 2) Spočítat počet buněk uvnitř obrázku (celé buňky) + počet buněk dotýkajících se 2 určitých hran (1 kratší, 1 delší)
U většího množství buněk (např. 7. den po nasazení) možno stejným způsobem spočítat počet buněk pouze z $\frac{1}{4}$ obrázku a daný počet vynásobit 4
- 3) Tento postup zopakovat u alespoň 10 zorných polí od stejného vzorku (měřeno z 10 – 17 zorných polí)
- 4) Zjistit koeficient přepočtu z velikosti obrázku na obrazovce na skutečnou velikost (za pomoci měřítka): 7,65 cm na obrazovce odpovídá 200 μm = 0,02 cm => 1 cm na obrazovce odpovídá $\frac{2}{765}$ cm ($\doteq 0,002614$ cm) ve skutečnosti
- 5) Zjistit skutečnou plochu obrázku: velikost obrázku na obrazovce: 32,6 x 24,6 cm = 801,96 cm^2 => skutečná velikost: $801,96 * (\frac{2}{765})^2 \doteq 0,005481 \text{ cm}^2$

Z naměřených hodnot počtů buněk na cm^2 byly zkonstruovány **růstové křivky** a vypočítán tzv. „**doubling time**“, tj. čas potřebný k zdvojnásobení počtu buněk v populaci, a to mezi 1. a 3. dnem a mezi 3. a 7. dnem podle rovnice:

$$t_{PD} = \frac{\log 2 \cdot dt}{\log N - \log N_0}$$

dt = doba kultivace v hodinách; N = počet buněk na konci hodnoceného časového intervalu;
 N_0 = počet buněk na počátku hodnoceného časového intervalu

⁶ **supernatant** - čirá kapalina nad sedimentem

3.7. Barvení buněk

- 1) Vyjmout roztok s buňkami z inkubátoru (v den, kdy chceme zjistit počet buněk po určité době od nasazení)
- 2) Opláchnout buňky roztokem PBS
- 3) Přidat 70% ethanol o teplotě -20°C a nechat působit cca 5 min za účelem tzv. fixace, tj. zachování specifických buněčných struktur v neměnném stavu a prevence odlupování buněk z povrchu materiálu
- 4) Opláchnout buňky roztokem PBS
- 5) Přidat barvicí roztok fluorescenčních barviv Texas Red C_2 -maleimid (barví membránu a cytoplazmu buněk červeně) a Hoechst 33342 (jádra buněk barví modře), nebo barviv Alexa Fluor 488 (barví membránu a cytoplazmu buněk zeleně) a propidium jodid (barví jádra červeně) ve správné koncentraci (Texas Red C_2 -maleimid – 10 ng/ml; Hoechst 33342 – 5 $\mu\text{g/ml}$; Alexa Fluor 488 - 10 $\mu\text{g/ml}$; propidium jodid - 5 $\mu\text{g/ml}$) a necháme působit 1 hod při pokojové teplotě
- 6) Opláchnout buňky roztokem PBS
- 7) Pozorovat buňky fluorescenčním mikroskopem

3.7.1. Ředění barvicích roztoků

Texas Red C_2 – maleimid⁷ (excitační maximum 595 nm, emisní maximum 615 nm; Molecular Probes, Invitrogen, kat. č. T6008):

- 1) 5 mg Texas Red C_2 – maleimidu naředit ve 15 ml DMSO⁸ – zásobní roztok (333 $\mu\text{g/ml}$, skladování při -70°C)
- 2) 150 μl zásobního roztoku naředit do 10 ml PBS (5 $\mu\text{g/ml}$, skladování při -20°C)
- 3) Před barvením 500x naředit v PBS na koncentraci na 10 ng/ml

Hoechst 33342⁹ (excitační maximum 346 nm, emisní maximum 460 nm, Sigma-Aldrich)

- 1) Připravit zásobní roztok Hoechst 33342 naředěného v destilované vodě na koncentraci 1 mg/ml (skladování při -20°C)
- 2) Před použitím rozmrazit a ředit 200x v roztoku Texas Red C_2 – maleimidu nebo v roztoku PBS na koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$

Alexa Fluor 488¹⁰ (excitační maximum 495 nm, emisní maximum 519 nm, Molecular Probes, Invitrogen, kat. č. A30005)

- 1) Připravit zásobní roztok Alexa Fluor 488 naředěného v DMSO¹² na koncentraci 10 mg/ml (skladování při -80°C)
- 2) Před použitím rozmrazit a ředit 1000x v PBS na koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$

Propidium jodid¹¹ (excitační maximum 530 nm, emisní maximum 620 nm PI, Sigma-Aldrich, kat. č. P-4170)

- 1) Připravit zásobní roztok propidium jodidu naředěného v destilované vodě na koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$ (skladování při -20°C)
- 2) Před barvením 40x naředit zásobní roztok propidium jodidu v PBS nebo v roztoku Alexa Fluor 488 na koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$

⁷ **Texas Red C_2 – maleimide** = sulforhodamine 101 acid chloride – červené fluorescenční barvivo reagující s thiolovými skupinami v přítomnosti aminoskupin (při neutrálním pH)

⁸ **DMSO** = Dimethyl sulfoxide, dimethylsulfoxid; $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$

⁹ **Hoechst #33342** – modré fluorescenční barvivo pro barvení DNA, chromozomů a jader, interkaluje (vmežeňuje se) do DNA v oblastech A-T (adenin-thymin)

¹⁰ **Alexa Fluor 488** - azurově zelené fluorescenční barvivo pro barvení buněk, váže se na aminoskupiny na jejich povrchu

¹¹ **Propidium Jodid (PI)** – červené (při vybuzení laserovým paprskem o 488nm) fluorescenční barvivo používané k dobarvování jader mrtvých buněk (neprochází membránou živých buněk)

3.7.2. Imunofluorescenční barvení buněk – proteiny β -aktin, vinkulin a osteokalcin

- 1) Vyjmout vzorky s buňkami z inkubátoru
- 2) Opláchnout buňky roztokem PBS
- 3) Fixovat 70% methanolem o teplotě -20°C a nechat inkubovat cca 5 min při pokojové teplotě
- 4) Opláchnout buňky roztokem PBS
- 5) Přidat 1% albumin¹² + 0,1% Triton X-100¹³ a nechat inkubovat 30 min při pokojové teplotě
- 6) Odsát roztok
- 7) Přidat 1% Tween 20¹⁴ a nechat působit 20 min při pokojové teplotě
- 8) Opláchnout buňky roztokem PBS
- 9) Přidat primární protilátku: monoklonální anti-beta-aktin, myší ascitická tekutina, klon AC-15, (Sigma-Aldrich, kat. č. A-5441, ředěno 1:400), monoklonální anti-vinkulin, myší ascitická tekutina, klon hVIN-1 (Sigma-Aldrich, kat. č. V 9131, ředěno 1:400) a polyklonální králičí anti- osteokalcin (1-49) (lidský) IgG (Peninsula Laboratories Inc., ředěno 1:200), uložit přes noc do chladničky
- 10) 2x opláchnout buňky roztokem PBS s přidavkem 0,05% Tweenu 20
- 11) Přidat sekundární protilátku: v případě monoklonálních myších protilátek byl použit (F(ab')₂ fragment protilátky IgG proti myšimu antigenu, která byla vytvořena v organismu kozy a byla konjugována s Alexa Fluor[®]488, tj. „Alexa Fluor[®]488-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L)“. V případě, že jako primární protilátka byla použita polyklonální protilátka králičí, sekundární protilátkou byl (F(ab')₂ fragment protilátky IgG proti králičímu antigenu, která byla vytvořena v organismu kozy a byla konjugována s Alexa Fluor[®]488, neboli „Alexa Fluor[®]488-conjugated (F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)“. Obě protilátky byly získány od Molecular Probes, kat. č. A11017 nebo A11070 po řadě, a ředěny 1:400. Vzorky byly uloženy ve tmě a inkubovány 1 hod při pokojové teplotě
- 12) 2x opláchnout buňky roztokem PBS a ponechat je ponořené v PBS
- 13) Provést kontrolu barvení – místo primární protilátky použijeme roztok PBS
- 14) Pozorovat fluorescenčním mikroskopem

3.8. Příprava lyzátu

- 1) vyjmout misky s kompozity z inkubátoru (cca 37°C)
- 2) odsát médium (kultivační roztok)
- 3) opláchnout PBS
- 4) přesunout vzorky do čisté kultivační misky
- 5) přidat 10 ml trypsinu, přiklopit misku a uložit zpět do inkubátoru – na cca 10 min trypsin – zajistí oddělení buněk od kompozitu
- 6) vyjmout misky z inkubátoru – promíchat uvolněné buňky s trypsinem (pipetou)
- 7) přemístit do centrifugační zkumavky umístěné v ledu, přidat 1 ml média: DMEM + 10% FS, které vyvazuje trypsin a zároveň ruší náboj – buňky se lépe usazují na dně zkumavky
- 8) vzniklý roztok přepipetovat do centrifugační zkumavky
- 9) přidat trypsin-inhibitor v poměru 1:1 k trypsinu

¹² **Albumin** - jeden z proteinů krevní plazmy, vyskytující se i v dalších tělních tekutinách, jako je tkáňová a mozkomíšní mok. K jeho syntéze dochází v játrech. V těle má mnoho funkcí. Je důležitý hlavně při transportu různých látek krví (např. mastné kyseliny, bilirubin – odpadní produkt při odstraňování starých erytrocytů, minerály, léky či hormony) a pomáhá udržet stálé vnitřní prostředí organismu (stálý osmotický tlak lidské krevní plazmy).

¹³ **Triton X-100** ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$) – neionogenní činidlo s hydrofilní polyethylenoxidovou (= polyethylenglykolovou) skupinou a uhlovodíkovou lipofilní nebo hydrofobní skupinou, které permeabilizuje (zvyšuje propustnost) buněčných membrán.

¹⁴ **Tween 20** - komerční označení pro chemickou látku, která je schválena v EU jako aditivum s charakterem emulgátoru, disperzního činidla či stabilizátoru. V biologické praxi se využívá ke snižování nespecifických vazeb protilátek.

- 10) odebrat vzorek buněčné suspenze z roztoku a spočítat celkový počet buněk pod mikroskopem v Bürkerově komůrce
- 11) buněčnou suspenzi centrifugovat při 4°C 5 min při 1 000 otáčkách/min
- 12) odsát supernatant
- 13) k usazeným buňkám přidat destilovanou vodu na tkáňové kultury tak, aby výsledná koncentrace byla 2 miliony buněk/ml
- 14) promíchat buňky s vodou pipetou – homogenizace roztoku, buňky ve vodě popraskají
- 15) připravenou suspenzi přepipetovat do předem označených ependorfeček po 0,7 ml a utěsnit parafilmem
- 16) umístit přes noc do hlubokomrazicího boxu (-80°C) – další poškozování buněk

3.9. Homogenizace

- 1) vyjmout vzorky z mrazicího boxu a nechat roztát
- 2) umístit je do ledu a postupně homogenizovat ultrazvukem (UP100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Deutschland) 40 s při amplitudě 70%
- 3) uložit do hlubokomrazicího boxu (-80°C)

3.10. Měření koncentrace proteinů kolorimetrickou Lowryho metodou

Podstatou této metody je reakce komplexace Cu^{2+} iontů s peptidovými vazbami v zásaditém prostředí a redukce fosfomolybdatů obsaženého v Folin-Ciocalteu reagentu skrze konjugované boční řetězce aminokyselin tyrosinu a tryptofanu. Vznikající modře zbarvený komplex je spektrofotometricky detekován (500-750 nm) (Lowry a kol. 1951).

Příprava roztoků:

albumin – ze zásobního roztoku albuminu (10 mg/ml) vytvořit různé koncentrace – ředění albuminu v H_2O v poměrech 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 (t.j. 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 μg albuminu na jamku)

Roztok A - NaOH (0,8M) : CTC : SDS (5%) : H_2O = 1 : 1 : 2 : 4

Roztok B – Folin roztok : H_2O = 1 : 3

H_2O = destilovaná voda

1M NaOH = 1 molární hydroxid sodný; tj. molární koncentrace $c_{\text{NaOH}} = 1 \text{ mol/l}$, připraví se tak, že se v 1 l rozpouštědla rozpustí množství látky o hmotnosti rovnající se její molekulové hmotnosti.

CTC obsahuje: 0,1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,2% vinan sodno-draselný + 10% Na_2CO_3

SDS = dodecyl sulfát sodný

Kalibrační křivka albuminu, měření koncentrace proteinů

- 1) zhomogenizovaný lyzát nechat roztát a ponechat v ledové drti
- 2) naředěné koncentrace albuminu a blank (samotná H_2O) napipetovat v triplikátech do 96 jamkové kultivační destičky (NUNC-IMMUNO PLATE, Dánsko)
blank (0 albumin) = 4 μl H_2O + 16 μl NaOH;
albumin = 4 μl albuminu (různé koncentrace) + 16 μl NaOH (1M);
vzorky = 20 μl vzorku + 1,6 μl NaOH (10M)
- 3) do každé jamky 200 μl roztoku A – nechat působit 10 min
- 4) poté přidat 50 μl roztoku B – celou kultivační destičku dát na 30 min do třepačky při 350 otáčkách a 50°C
- 5) měření proteinů na spektrofotometru (VERSAmax Microplate Reader, Molecular Devices) při 690 nm
- 6) sestavit kalibrační křivku, pomocí Microsoft Office EXCEL vypočítat rovnici regresní křivky a vypočítat množství proteinů ve vzorcích

- 7) naředit lyzáty v H₂O na koncentraci proteinů 100 µg/ml
- 8) lyzáty skladovat v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80°C

3.11. ELISA (enzymatická imunosorbentní esej)

- 1) vyjmout lyzáty z hlubokomrazicího boxu (-80°C)
- 2) z lyzátů napipetovat 1, 5, 10, 15, 20, nebo 40 µl do 50 µl destilované H₂O (koncentrace odpovídá 0,1 – 2 µg proteinu/ 50 µl)
- 3) Tři různé koncentrace naředěného lyzátu napipetovat v objemu 50 µl na jamku, každou z nich do 6 jamek
- 4) nechat adsorbovat přes noc
- 5) druhý den odcáknout roztok
- 6) dvakrát propláchnout PBS
- 7) blokující krok: přidat 0,02% roztok želatiny v PBS – 100 µl na 1 jamku – 60 min
- 8) přidat 1% Tweenu 20 v PBS - 100 µl/jamka – 20 min
- 9) opláchnout buňky (100 µl na jamku): 1x PBS + 0,05% Tween 20, 2x Triton X-100, 1x PBS + 0,05% Tween 20
- 10) přidat 50 µl primární protilátky, polyklonálního králičího anti-osteokalcinu (1-49) (lidský) IgG (Peninsula Laboratories Inc., ředěno 1:200) a inkubovat 60 min při pokojové teplotě
- 11) opláchnout buňky (100 µl na jamku): 1x PBS + 0,05% Tween 20, 2x Triton X-100, 1x PBS + 0,05% Tween 20
- 15) přidat sekundární protilátku (F(ab')₂ fragment protilátky IgG proti králičímu antigenu, která byla vytvořena v organismu kozy a byla konjugována s peroxidázou, neboli „peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG“ (Sigma-Aldrich, kat. č. A9169, ředění 1:5000).
- 16) uložit do tmy a nechat inkubovat 45 min při pokojové teplotě
- 12) roztoky najednou odstraníme odcáknutím
- 13) opláchnout buňky (100 µl na jamku): 1x PBS + 0,05% Tween 20, 2x Triton X-100, 1x PBS + 0,05% Tween 20
- 14) přidat chromogen – 100 µl/ 1 komůrku (pokojová teplota)
 - 5 ml orthofenylendiamidihydrochlorid
 - 10 ml 0,1M fosfátového pufru Na₂HPO₄.12 H₂O
 - 17 µl 30% H₂O₂
 Nechat působit ve tmě po cca 20 min (10-30 min)
- 15) Přidat 50 µl 2M H₂SO₄ (1,0066 ml konc. 96% H₂SO₄ + 8,934 ml H₂O)
- 16) měření na přístroji ELISA READER (VERSAmix Microplate Reader, Molecular Devices) při vlnových délkách 490 a 690 nm

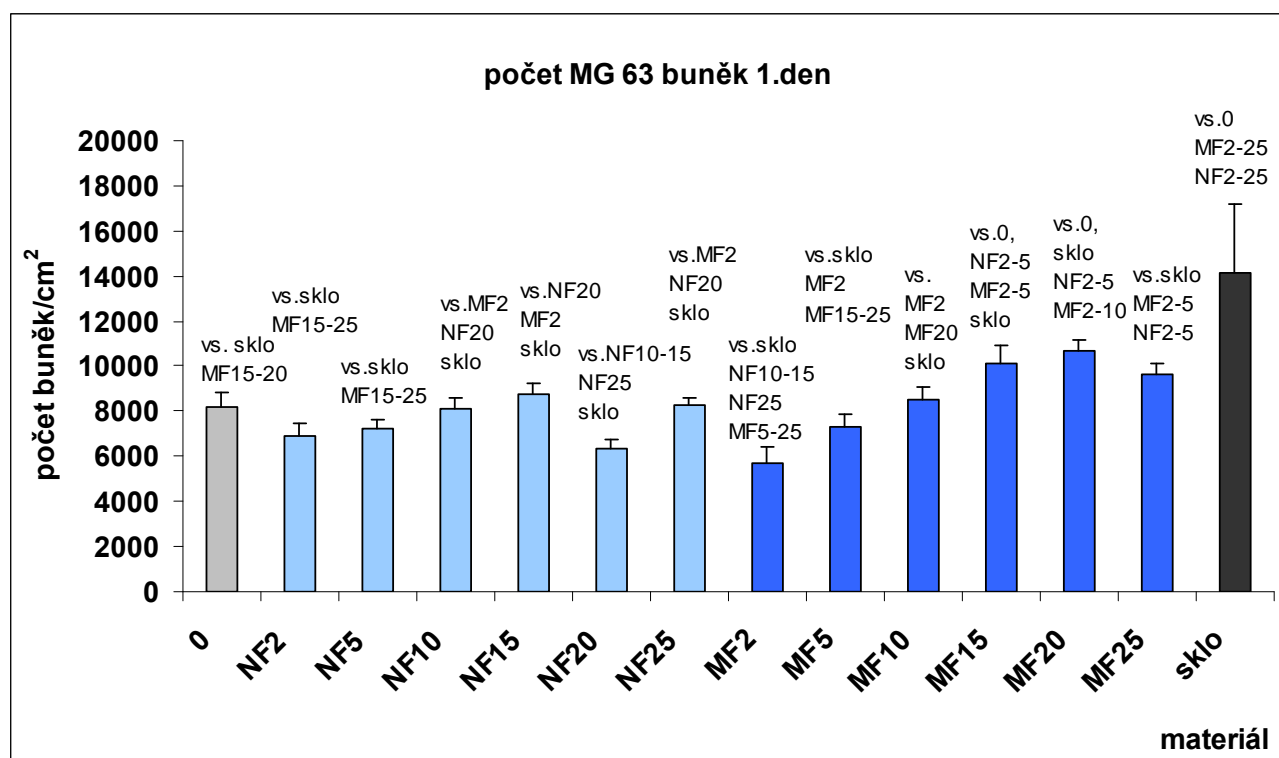
3.12. Statistická analýza

Kvantitativní data byla prezentována jako aritmetický průměr ± SEM (Standard Error of Mean, střední chyba průměru). Na statistické analýzy byl použit program SigmaStat (Jandel Corporation, U.S.A.), postup mnohočetných analýz - jednoparametrická ANOVA se Student-Newman-Keulsovou metodou. Za významnou byla považována hodnota $p \leq 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Iničiální adheze buněk na materiál

Iničiální adheze kostních buněk MG 63 první den po nasazení byla na nano- a mikro-strukturovaných površích nižší než na skle (Obr. 2). U mikročastic TCP jsme zjistili statisticky významnou závislost adheze na koncentraci. S rostoucí koncentrací TCP se adheze zvyšovala, nejvyšší hustota buněk na cm^2 byla zjištěna na kompozitu MF20. U nanočastic TCP byla pozorována nejvyšší adheze na NF15. U kompozitů s nejvyššími koncentracemi mikročastic TCP, tj. MF15-25 byl naměřen vyšší počet iničiálně adherovaných buněk v porovnání s čistým kompozitem, tj. 0 a kompozity s nižšími koncentracemi mikro- a nanočastic TCP, tj. NF2-10 a MF2-10.

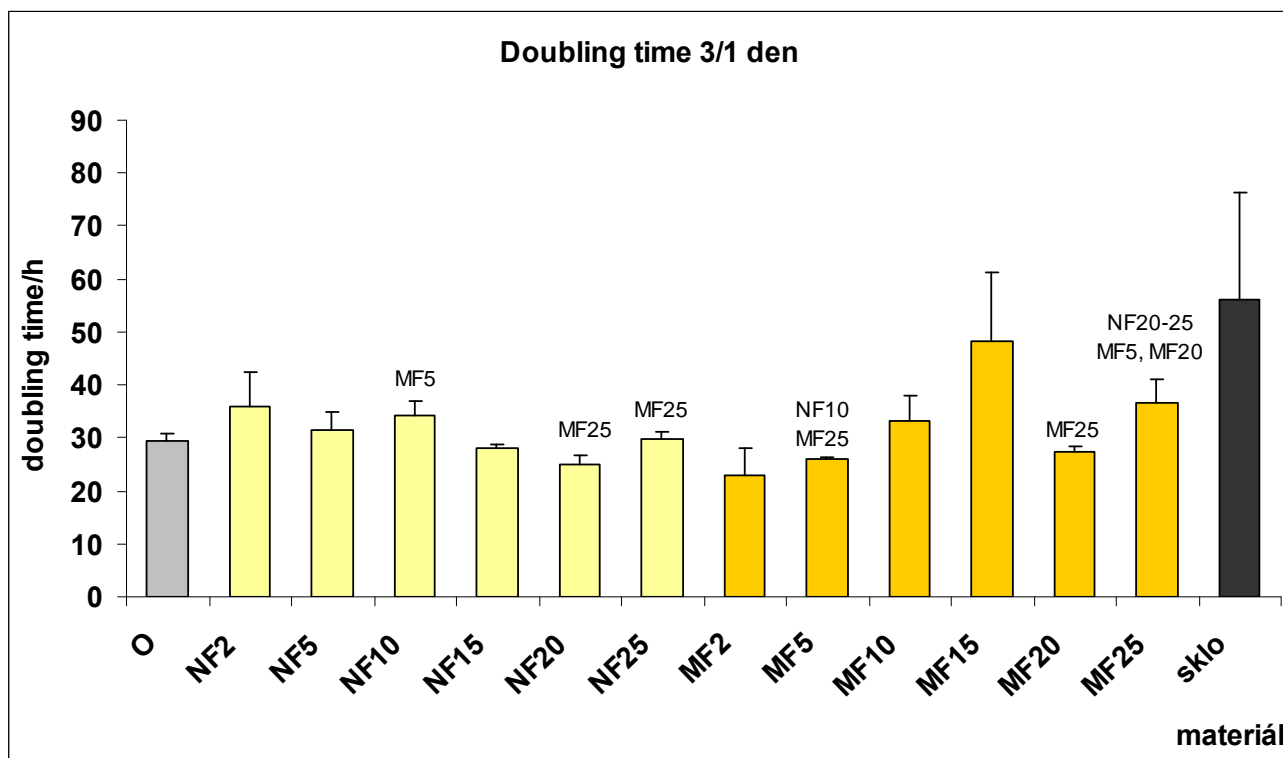


Obr. 2. Počet kostních buněk MG 63 na cm^2 24 hod po nasazení na kompozitech dimetylsiloxanu s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nanočastic (NF), nebo mikročastic (MF) trikalciumpfosfátu (TCP). Nad sloupce jsou vyznačeny vzorky, ve srovnání s nimiž je hodnota daného sloupce statisticky významná. Za statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou považovány hodnoty $p \leq 0,05$.

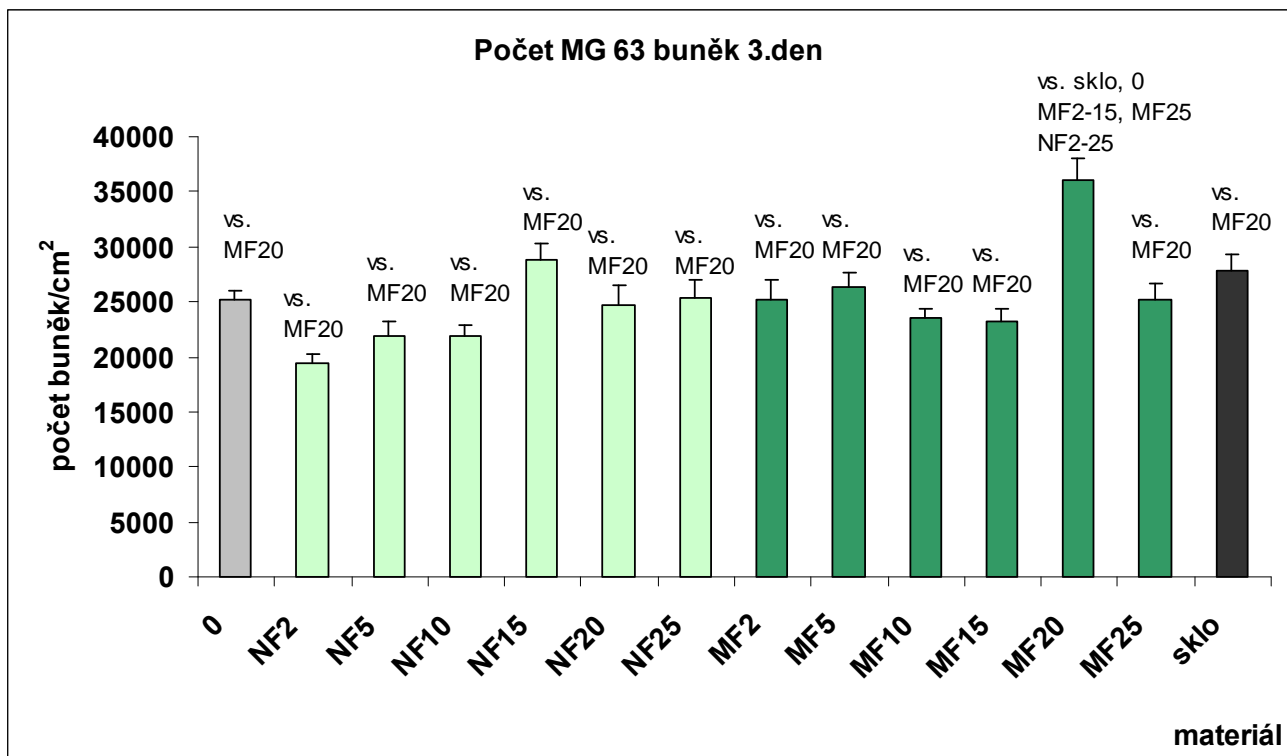
4.2. Proliferace buněk

U buněk na kompozitu MF20 byla naměřena signifikantně kratší doba zdvojnásobení počtu buněk v kultuře („doubling time“) než u kompozitu s nejvyšší koncentrací mikročastic TCP, tj. MF25 (Obr. 3). Třetí den po nasazení byla nejvyšší hustota kostních MG 63 buněk na vzorku MF20 (Obr. 4), hustota buněk na tomto vzorku byla významně vyšší než na všech ostatních vzorcích a kontrolním skle. Mezi kompozity s nanočasticemi TCP nejlépe proliferovaly buňky na vzorku NF15. Nejnižší hustota buněk byla pozorována na NF2. Mezi 3. a 7. dnem byl pozorován nejkratší doubling time, tudíž nejlepší proliferace u buněk na kontrolním skle (Obr. 5). Sedmý den byla na skle také nejvyšší hustota buněk (Obr. 6, 7). U vzorků NF10, NF20, NF25 a MF2, MF5 byla proliferace významně pomalejší (Obr. 5). U kompozitů NF2 a NF5 počet buněk mezi 3. a 7. dnem klesl, proto nebylo možné u nich vypočítat doubling time. Sedmý den bylo na těchto vzorcích také

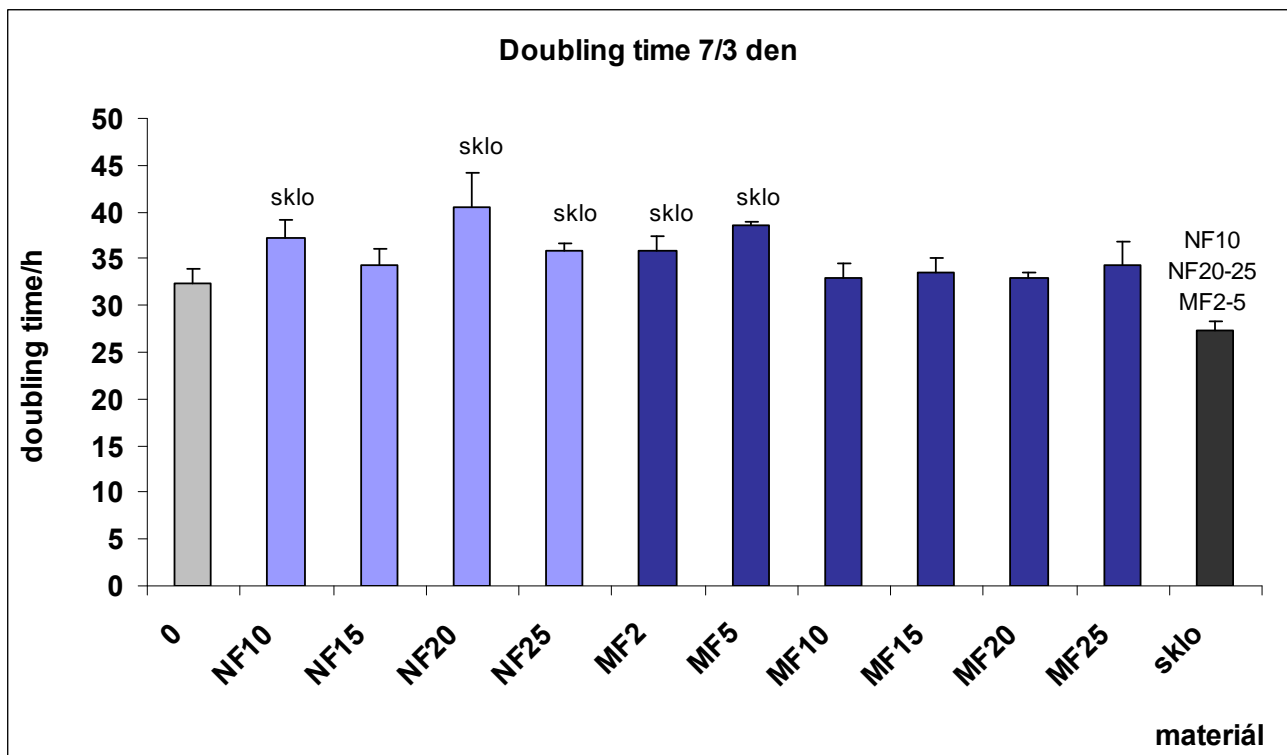
pozorováno nejméně buněk (Obr. 6). U kompozitů s oběma typy TCP částic roste počet buněk s koncentrací částic TCP. Optimální koncentrace u nanočástic je 15% a u mikročástic 20%. Mikročástice TCP podporovaly proliferaci kostních MG 63 buněk více než nanočástice TCP (Obr. 6, 7).



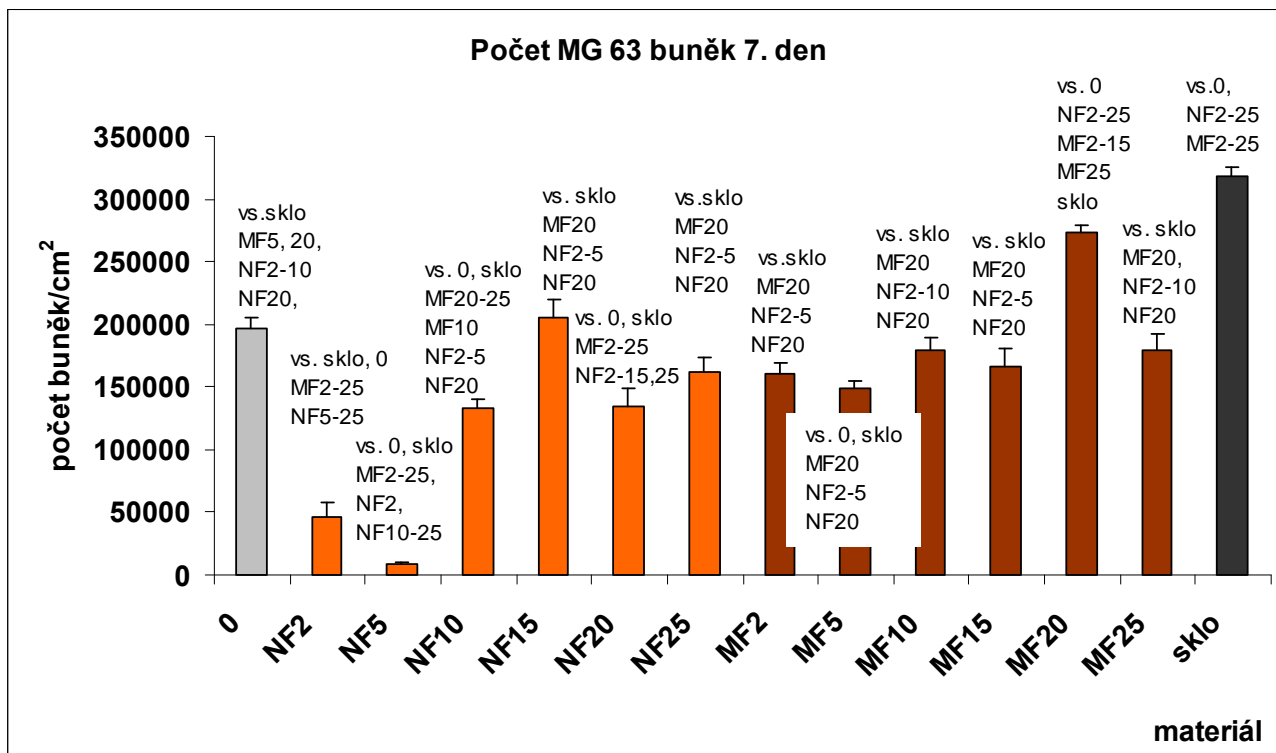
Obr. 3. Doba zdvojnásobení počtu buněk v kultuře („doubling time“) kostních MG 63 buněk na kompozitech dimetylsiloxanu s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nanočástic (NF), nebo mikročástic (MF) trikalciumpfosfátu mezi 1. a 3. dnem. Nad sloupci jsou vyznačeny vzorky, ve srovnání s nimiž je hodnota daného sloupce statisticky významná. Za statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou považovány hodnoty $p \leq 0,05$.



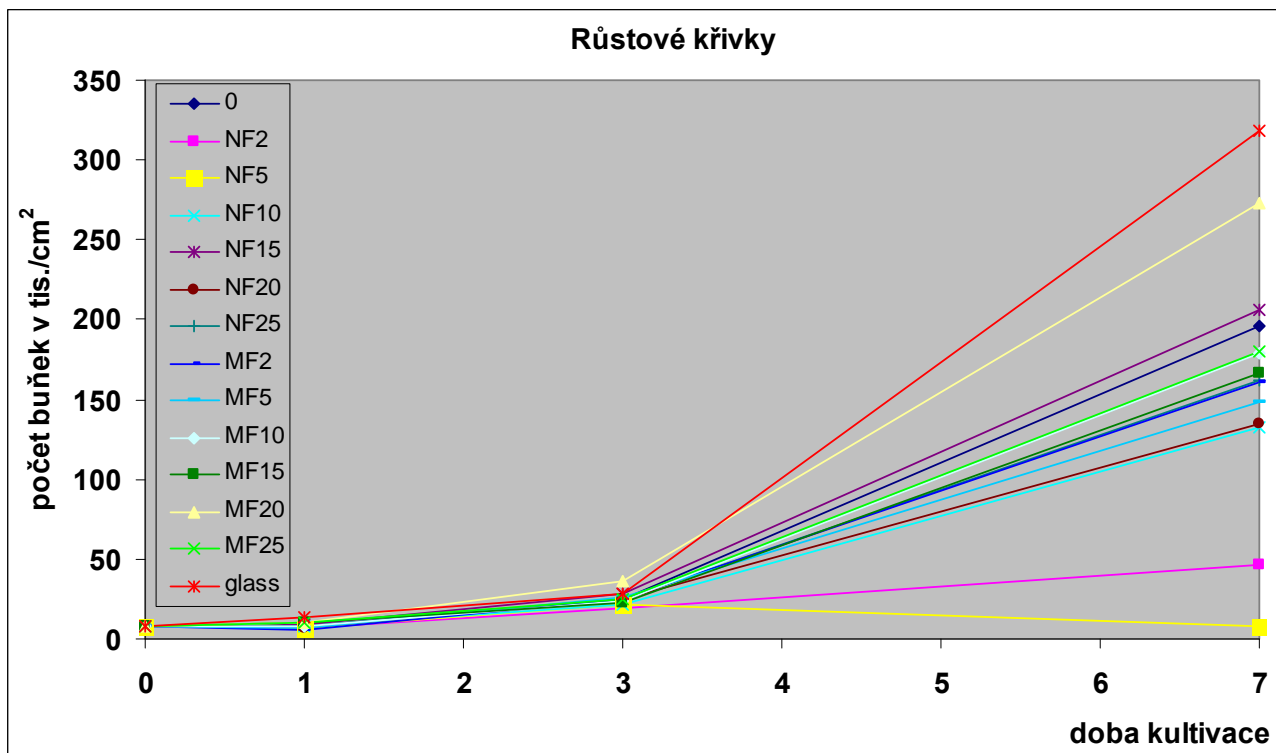
Obr. 4. Počet kostních MG 63 buněk na cm² třetí den po nasazení na kompozitech dimetylsiloxanu s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nanočástic (NF), nebo mikročástic (MF) trikalciumfosfátu. Nad sloupce jsou vyznačeny vzorky, ve srovnání s nimiž je hodnota daného sloupce statisticky významná. Za statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou považovány hodnoty $p \leq 0,05$.



Obr. 5. Doba zdvojnásobení počtu buněk v kultuře („doubling time“) kostních MG 63 buněk na kompozitech dimetylsiloxanu s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nanočástic (NF), nebo mikročástic (MF) trikalciumfosfátu mezi 3. a 7. dnem. Nad sloupce jsou vyznačeny vzorky, ve srovnání s nimiž je hodnota daného sloupce statisticky významná. Za statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou považovány hodnoty $p \leq 0,05$.



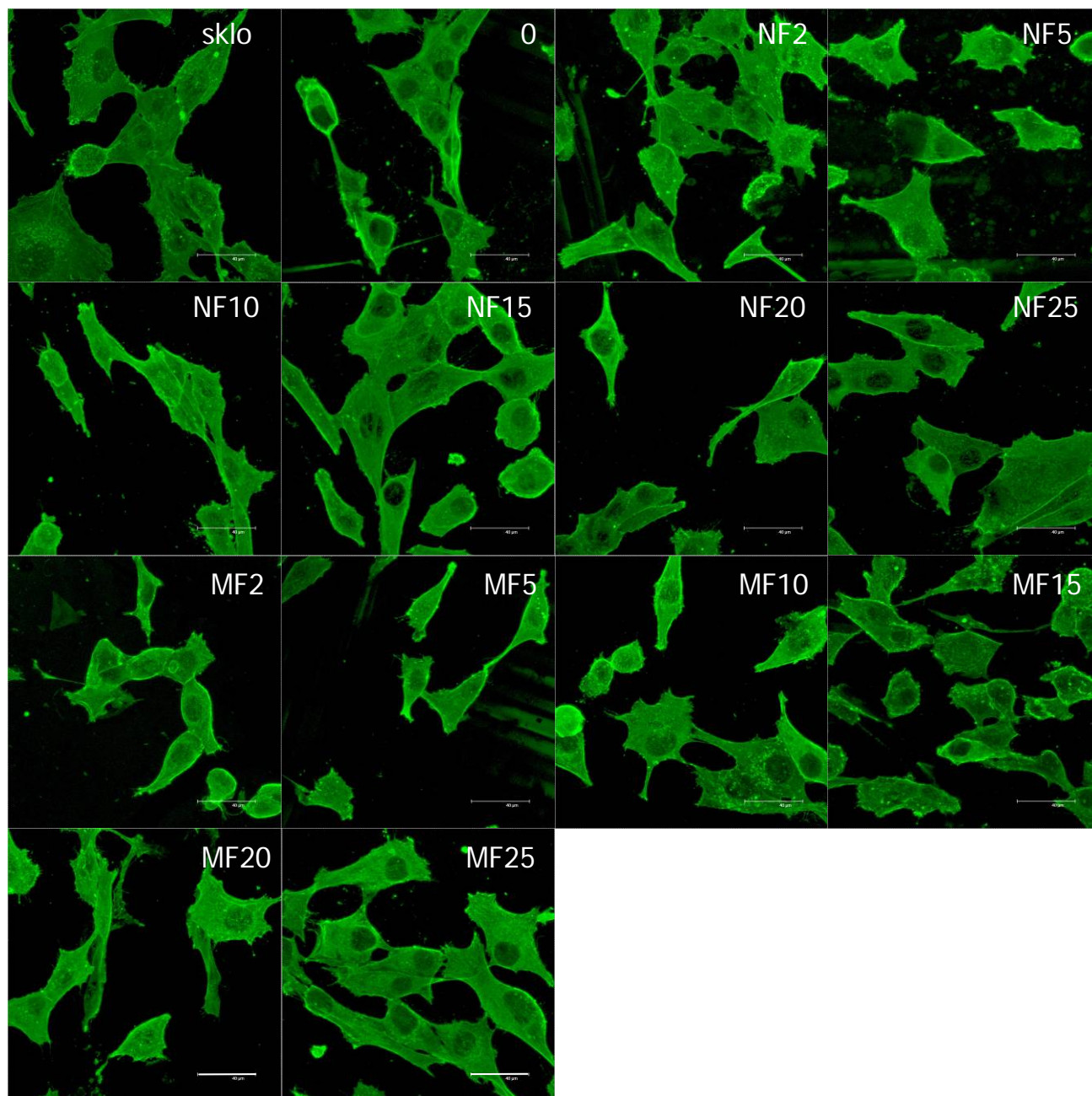
Obr. 6. Počet kostních MG 63 buněk na cm^2 7. den po nasazení na kompozitech dimetylsiloxanu s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nanočástic (NF), nebo mikročástic (MF) trikalciumpfosfátu. Nad sloupce jsou vyznačeny vzorky, ve srovnání s nimiž je hodnota daného sloupce statisticky významná. Za statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou považovány hodnoty $p \leq 0,05$.



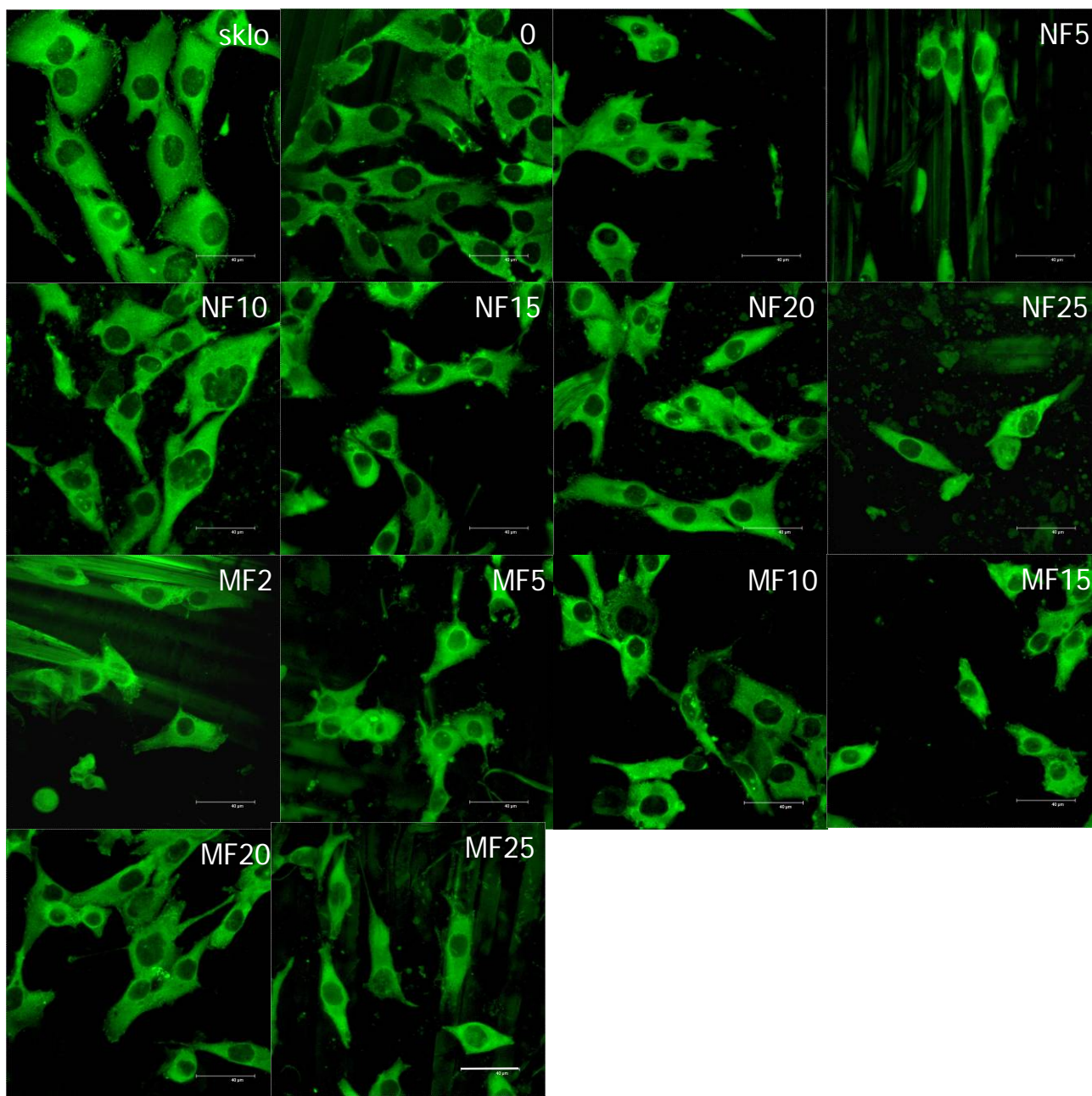
Obr. 7. Růstové křivky kostních MG 63 buněk na kompozitech dimetylsiloxanu s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nanočástic (NF), nebo mikročástic (MF) trikalciumpfosfátu.

4.3. Imunofluorescenční barvení β -aktinu, vinkulinu a osteokalcinu

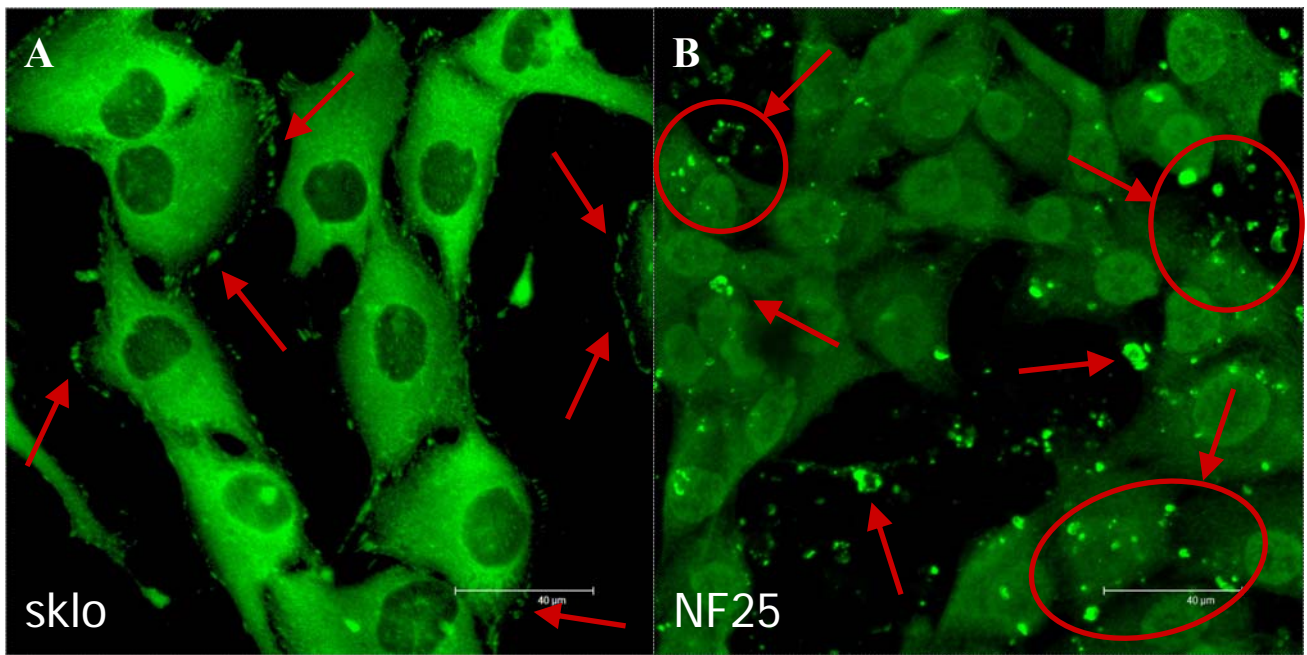
Na všech vzorcích lze pozorovat dobře vyvinutý beta-aktinový cytoskelet buněk MG 63 (Obr. 8). Fokální adhezní plaky s obsahem vinkulinu, proteinu asociovaného s integrinovými receptory, byly též pozorovány na všech vzorcích (Obr. 9). Fokální adheze s obsahem vinkulinu byly drobné, tečkovité a nejčetnější na skle (Obr. 10A). MG 63 buňky na všech vzorcích se pozitivně barvily na osteokalcin, marker osteogenní diferenciace (Obr. 11). U kompozitů s obsahem 15-25% TCP byl osteokalcin pozorován nejen na buňkách, ale i v extracelulární matrix (Obr. 10B). Na kompozitech s nano-TCP byly buňky nejintenzivněji obarveny v okolí jádra, zatímco na mikro-TCP byly buňky silně obarveny v cytoplazmě a na povrchu buňky.



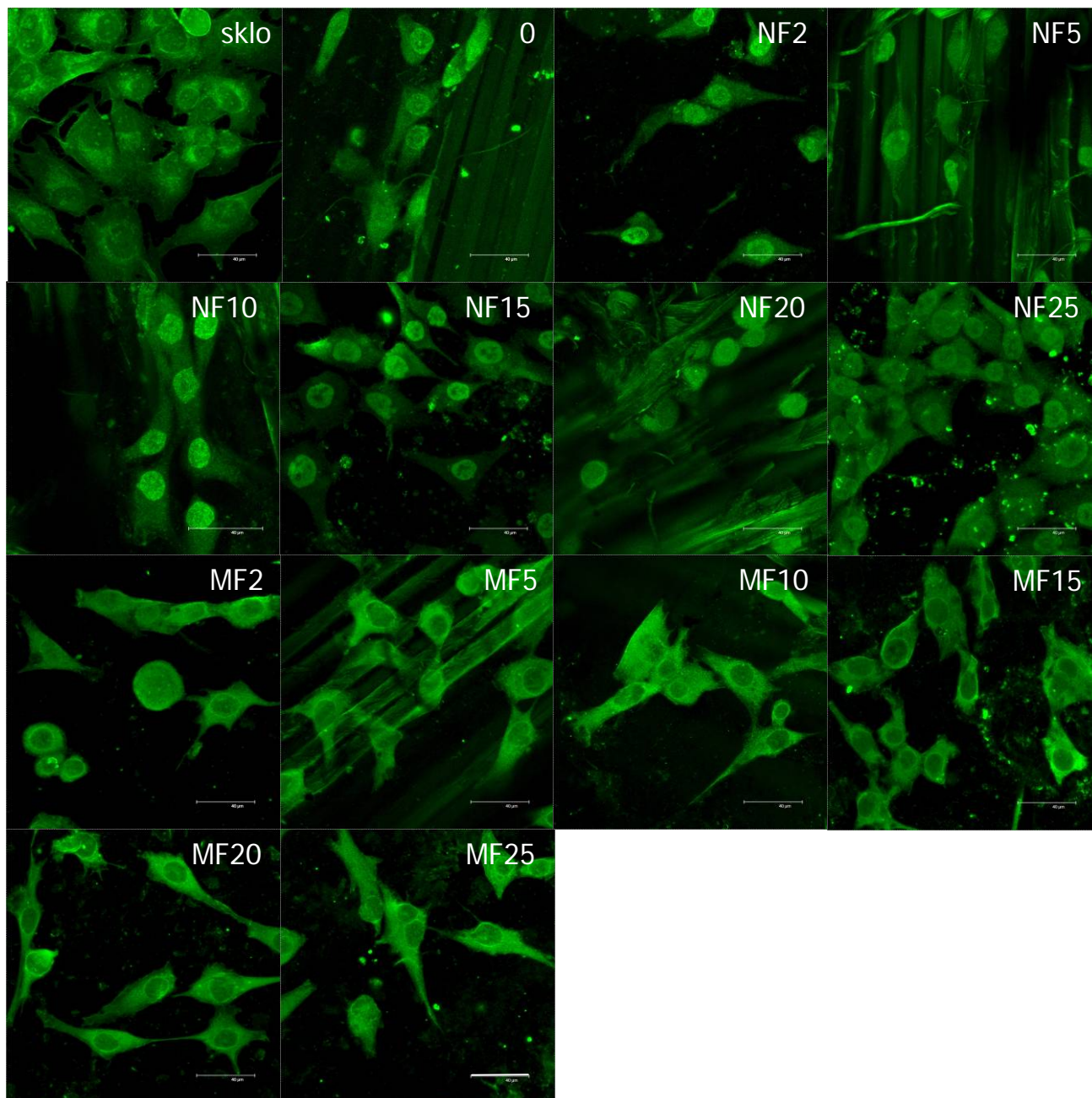
Obr. 8. Imunofluorescenční barvení beta-aktinu u kostních buněk MG 63 na dimetylsiloxanových kompozitech s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nano- a mikročastic trikalciemfosfátu; konfokální mikroskop Leica SP2, obj. $\times 20$, zoom 4 \times , vodní imerze. Měřítko představuje 40 μm .



Obr. 9. Imunofluorescenční barvení vinkulinu u kostních buněk MG 63 na dimetylsiloxanových kompozitech s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nano- a mikročástic trikalciumfosfátu; konfokální mikroskop Leica SP2, obj. $\times 20$, zoom 4 \times , vodní imerze. Měřítka představuje 40 μm .



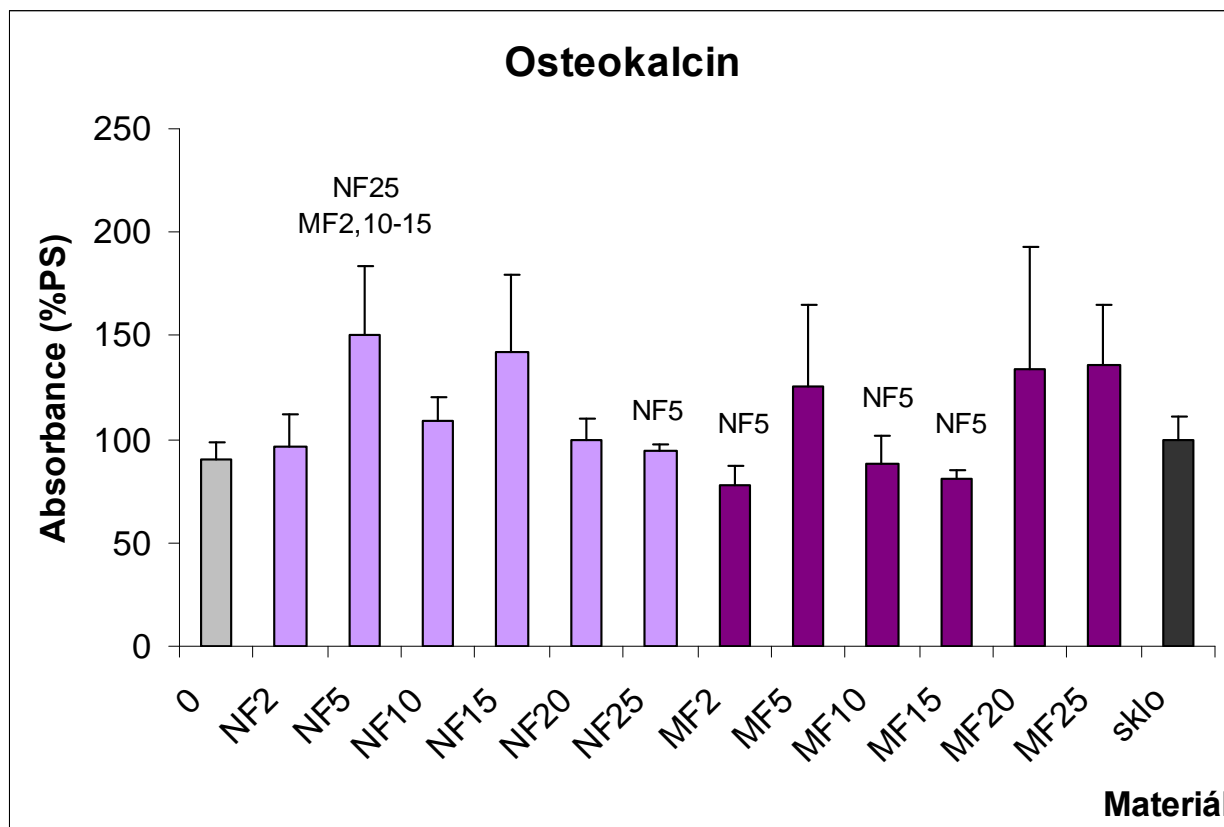
Obr. 10. Imunofluorescenční barvení vinkulinu (A) a osteokalcinu (B) u kostních buněk MG 63 na skle (A) a NF25 (B); červené šípky ukazují na dobře vyvinuté fokální adhezni plaky vinkulinu (A) a na depozity osteokalcinu v extracelulární matrix (B); konfokální mikroskop Leica SP2, obj. $\times 20$, zoom $4\times$, vodní imerze. Měřítka představuje $40\ \mu\text{m}$.



Obr. 11. Imunofluorescenční barvení osteokalcinu u kostních buněk MG 63 na dimetylsiloxanových kompozitech s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nano- a mikročástic trikalciumfosfátu; konfokální mikroskop Leica SP2, obj. $\times 20$, zoom 4 \times , vodní imerze. Měřítko představuje 40 μm .

4.3.1. ELISA – osteokalcin

Čtvrtý den po nasazení byla nejvyšší koncentrace osteokalcinu pozorována u kompozitu NF5 (Obr. 12). Naopak významně nižší koncentrace osteokalcinu byla zjištěna u buněk MG 63 na vzorcích s nižšími koncentracemi (2, 10 a 15%) mikročastic TCP a s vysokým obsahem (25%) nanočastic TCP.



Obr. 12. Koncentrace osteokalcinu u kostních buněk MG 63 na dimetylsiloxanových kompozitech s 0, 2, 5, 10, 15, 20 a 25% nano- a mikročastic trikalciumpfosfátu, stanovená pomocí metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 4. den po nasazení. Nad sloupci jsou vyznačeny vzorky, ve srovnání s nimiž je hodnota daného sloupce statisticky významná. Za statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou považovány hodnoty $p \leq 0,05$.

4.4. Publikace výsledků

Výsledky byly prezentovány formou posteru a publikovány v podobě abstraktu ve sborníku konference - 22nd European Conference on Biomaterials, konané od 7. do 11. září 2009 v Lausanne, Švýcarsko.

5. Diskuze

Materiál používaný na výrobu kostních protéz by měl umožnit dobrou iniciální adhezi osteoblastů ke svému povrchu a následně jejich relativně rychlou proliferaci, během které je protéza souvisle pokryta osteoblasty. V případě, že jde o porézní materiál, osteoblasty prorůstají i dovnitř. Poté by mělo dojít ke kalcifikaci a vrůstání protézy do nově vytvořené kosti, vzniklé činností osteoblastů, a vyplnění defektu. Kalcifikace vyžaduje správný směr diferenciaci osteoblastů, tj. diferenciaci osteogenní. Optimální materiál by měl tedy podpořit adhezi buněk, jejich růst i následnou diferenciaci.

Při hodnocení iniciální adheze kostních buněk MG 63 jsme u mikročastic TCP zjistili signifikantní závislost adheze osteoblastů na koncentraci TCP v kompozitu, přičemž s rostoucí koncentrací TCP se adheze zvyšovala a nejvyšší hustota buněk na cm^2 byla naměřena na kompozitu MF20. Podobně tomu bylo i u nanočastic TCP, kde adheze stoupala s koncentrací až ke vzorku NF15, který měl mezi kompozity s nanočásticemi nejvyšší densitu adherovaných buněk.

Závislost proliferace na koncentraci TCP již však zjištěna nebyla. Nicméně nejvyšší proliferaci jsme opět mohli pozorovat na kompozitu s 20 obj. % mikročastic TCP a 15 obj. % nanočastic TCP. Populační hustota buněk na těchto vzorcích (MF20 a NF15) byla 3. den po nasazení dokonce vyšší než na kontrolním skle. Nízké hustoty buněk MG 63 na vzorcích s nízkým obsahem nanočastic TCP (NF2 a NF5) sedmý den po nasazení je možné vysvětlit jednak toxicitou některé ze složek kompozitu, ke které mohlo dojít při zkoncentrování této složky během míchaní směsi při výrobě kompozitu. Druhou možností jsou změněné fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu u těchto vzorků (např. změna drsnosti či náboje), které vedly ke snížené buněčné proliferaci a nebyly překonány pozitivním vlivem nízké koncentrace TCP na růst buněk.

V porovnání s čistým kompozitem, tj. 0, jsme pozorovali lepší iniciální adhezi u buněk na kompozitech s nejvyššími koncentracemi mikročastic TCP, tj. MF15-25, a rovněž mírně více adherovaných buněk jsme napočítali na kompozitu NF 15. Kromě skla jsme zjistili vyšší proliferaci kostních MG 63 buněk i u MF20 a NF15 ve srovnání s kompozitem bez TCP.

V podobné studii byl zkoumán vliv různých koncentrací (5, 10, 20 a 40 obj. %) β -TCP v polyetheretherketonu na lidské osteoblasty (Petrovic a kol. 2006). Na všech vzorcích autoři našli životaschopné osteoblasty, avšak buněčná proliferace klesala na všech kompozitech s β -TCP nezávisle na jeho koncentraci ve srovnání s čistým netoxickým polyetheretherketonem.

V našem pokusu jsme kromě porovnávání různých koncentrací nano- nebo mikročastic trikalciemfosfátu (TCP) v kompozitu, také srovnávali samotný vliv nano- nebo mikročastic TCP na chování buněk. Na našich kompozitech, tj. matrice z dimetylsiloxanové pryskyřice vystužená aramidovými vlákny s nanočásticemi (100 nm) a mikročásticemi (50-150 μm) trikalciemfosfátu (TCP), jsme pozorovali mírně lepší adhezi i vyšší proliferaci kostních MG 63 buněk na vzorcích s mikročásticemi než s nanočásticemi TCP. K podobným výsledkům došli např. i Voisin a kol. (2009), kteří analyzovali reakci osteoblastů na mikro- a nanostrukturu povrchu polyamidového filmu, vytvořenou speciální metodou za využití laseru. Celkový počet buněk i jejich velikost byly vyšší na mikrostrukturovaném polymeru.

Naopak v pokusech jiných vědců se mnohem příznivěji pro adhezi i proliferaci osteoblastů jevila biologicky inspirovaná nanostruktura kompozitu. Například Price a kol. (2003) studovali adhezi lidských osteoblastů na polykarbonát-urethanových kompozitech s karbonovými nanovláknými o různých průměrech (60-100 nm a 100-200 nm). Povrchová energie byla kontrolována vytvořením nanovláken buď s pyrolytickou (tj. štěpnou teplem za nepřístupu kyslíku) aromatickou uhlovodíkovou vnější vrstvou, nebo bez této vrstvy. Adheze osteoblastů byla více podporována na karbonových nanovláknách o menším průměru (60-100 nm) a s vyšší povrchovou energií, tedy na nanovláknách bez pyrolytické vrstvy. Větší množství karbonových nanovláken v kompozitu také vedlo k rostoucí adhezi i proliferaci osteoblastů.

Elias a kol. (2002) zkoumali chování lidských osteoblastů kultivovaných na uhlíkových nanovláknách s průměrem menším nebo větším než 100 nm. Po třech a sedmi dnech kultivace byla

pozorována vyšší proliferace osteoblastů na uhlíkových vláknech o průměru menším než 100 nm ve srovnání s kulturou na vláknech větších než 100 nm. Buňky také syntetizovaly více alkalické fosfatázy (marker osteogenní diferenciace) a ukládaly na uhlíková nanovlákná více extracelulárního vápníku.

U polymerních, konkrétně polylaktidových kompozitů s nanočásticemi HA byly také zjištěny lepší mechanické vlastnosti materiálu a významně vyšší adsorpce proteinů ve srovnání s mikročásticemi HA (Wei a Ma 2004). Chování osteoblastů na nanostrukturovaném povrchu oxidu hlinitého, oxidu titaničitého a hydroxyapatitu studovali také Webster a kol. (2000). Kromě zvýšené adsorpce proteinů extracelulární matrix, jež zlepšovala i buněčnou adhezi a tlumila apoptózu buněk (tj. programovaná buněčná smrt, např. při nedostatečné adhezi buněk k povrchu), pozorovali tito autoři i selektivní adsorpci určitých typů proteinů, konkrétně vitronektinu (protein zvyšující adhezi osteoblastů).

Někteří autoři posuzovali i rozdíly v chování buněk na různých mikrostrukturách povrchu. Např. Murai a kol. (2006) zjišťovali efekt různě velkých mikročástic β -trikalciumfosfátu na růst kosti uvnitř titanového obalu *in vivo* v králičích lebkách. Zjistili, že středně velké mikročástice β -TCP (250-500 μm) více podporovaly formování nové regenerované kostní tkáně a její mineralizaci než menší mikročástice β -TCP (100-250 μm). Naopak při *in vitro* pokusech s mikrostrukturovaným titanovým povrchem vzorků Lossdörfer a kol. (2004) pozorovali, že s rostoucí mikrodrsností povrchu proliferace osteoblastů klesá, zatímco jejich diferenciace roste.

Kromě NF2 a NF5, které nepříznivě ovlivnily proliferaci kostních MG 63 buněk po 7 dnech kultivace, jsme u ostatních kompozitů pozorovali zvyšující se proliferaci buněk. MF20 a NF15 dokonce počtem buněk na svém povrchu převyšovaly i kompozit bez obsahu TCP. Na všech vzorcích jsme také mohli pozorovat dobře vyvinutý β -aktinový cytoskelet, fokální adhezni plaky s obsahem vinkulinu i pozitivní obarvení MG 63 buněk na osteokalcin, marker kostní diferenciace. Na kompozitech s nano-TCP byly buňky nejintenzivněji obarveny v okolí jádra, zatímco na mikro-TCP byly buňky silně obarveny v cytoplazmě a na povrchu buňky, což nasvědčuje pozdějšímu nástupu syntézy osteokalcinu v kostních MG 63 buňkách na kompozitech s nanočásticemi TCP.

Nejen velikost částic TCP, ale i jejich koncentrace měla vliv na množství a rozmístění osteokalcinu. U kompozitů s obsahem 15-25% TCP byl osteokalcin pozorován nejen na buňkách, ale i v extracelulární matrix. Nejvyšší koncentrace osteokalcinu čtvrtý den po nasazení byla pozorována u kompozitu NF5, na němž bylo 7. den po nasazení dosaženo nejnižší populační hustoty buněk. Naopak statisticky významně nižší koncentrace osteokalcinu byla zjištěna u MG 63 buněk na vzorcích s nižšími koncentracemi (2, 10 a 15 obj. %) mikročástic TCP a s vysokým obsahem (25 obj. %) nanočástic TCP. Domníváme se tedy, že TCP o vhodné koncentraci a velikosti částic má vysoký potenciál pro využití v kostním tkáňovém inženýrství. Naši teorii potvrzují i studie jiných autorů. Například Jensen a kol. (2007) hodnotili novotvorbu kostní tkáně *in vivo* (v miniprasatech) na různých typech kalcium fosfátových povrchů, tj. směsi HA a β -TCP (dvoufázový kalcium fosfát), čistém HA, čistém TCP a také na kontrolním autologním štěpu. Mezi zkoumanými vzorky se nová kostní tkáň nejrychleji tvořila na čistém TCP, kdy po 8 týdnech byl již implantát resorbován a kostní tkáň téměř úplně regenerována. Množství novotvořené kostní tkáně se zvyšovalo s množstvím β -TCP a klesalo s HA (autologní štěp > β -TCP > β -TCP/HA > HA).

K jiným závěrům však došli např. John a kol. (2003), kteří též hodnotili chování kostních buněk MG 63 na různých typech kalcium fosfátových povrchů – HA, β -TCP a HA-TCP. Zatímco v okolí HA materiálu pozorovali souvislou vrstvu životaschopných buněk, na površích s β -TCP a HA-TCP našli jen několik málo životaschopných kostních MG 63 buněk. HA tedy podporoval osteogenní aktivitu osteoblastů ve srovnání s povrchem β -TCP, který byl rozpuštěn na fosforečné a vápenaté ionty a znovu rekrystalizoval do podoby apatitu. V médiu s β -TCP také bylo zjištěno velké množství fosforečných iontů a nízké množství vápenatých iontů, což pravděpodobně zapříčinilo buněčnou smrt.

I Sun a kol. (1997) zkoumali různé varianty kalcium fosfátů – HA, β -TCP, β -dikalcium pyrofosfát (β -DCP) a slinutý (spékaný) β -dikalcium pyrofosfát (SDCP). Na vzorcích β -TCP a HA byla v prvních 3 dnech populace osteoblastů potkana poměrně nízká, avšak postupně rostla směrem k sedmému dni, zatímco množství alkalické fosfatázy bylo v prvních třech dnech vysoké a výrazně

kleslo mezi 3. a 7. dnem. Podobný trend byl pozorován i u β -DCP a SDCP, avšak hodnoty byly méně signifikantní. Sun a kol. (1997) tedy došli k závěru, že HA i β -TCP mají inhibující účinky na růst osteoblastů.

Santos a kol. (2009) porovnávali vliv TCP a HA v kompozitech, pokrytých zlatým práškem a o dvou různých nanodrsnostech, na chování lidských osteoblastů. U kompozitů s TCP bylo hlavním parametrem ovlivňujícím adhezi, proliferaci a buněčnou diferenciaci chemické složení, které negativně ovlivňovalo iniciální adhezi osteoblastů, ale podporovalo následnou buněčnou proliferaci a diferenciaci. Naproti tomu na HA vzorcích hrál větší roli reliéf povrchu, který zvyšoval buněčnou diferenciaci, ale snižoval proliferaci.

6. Závěr

V této práci jsme hodnotili kompozitní matrice složené z dimetylsiloxanové pryskyřice, aramidu a s obsahem 2, 5, 10, 15, 20 a 25 objemových procent nanočástic (100 nm) nebo mikročástic (50-150 μm) trikalciumfosfátu jako potenciálních materiálů pro tkáňové inženýrství kostí.

V *in vitro* testech s lidskými kostními MG 63 buňkami jsme hodnotili adhezi, růst a diferenciaci MG 63 buněk na těchto površích. Současně jsme sledovali vliv velikosti částic TCP a jejich koncentrace v kompozitu na chování buněk v kultuře.

Zjistili jsme, že iniciační adheze i tvorba fokálních adhezních plaků s obsahem vinkulinu v kostních MG 63 buňkách na dimetylsiloxan/aramidovém kompozitu s trikalciumfosfátem nebyla ovlivněna velikostí částic, avšak se zvyšující se koncentrací částic TCP do určitých mezí také rostla. Povrchy s mikročásticemi TCP více podporovaly buněčnou proliferaci MG 63 buněk ve srovnání s nanočásticemi TCP. Rostoucí koncentrace TCP také podporovala proliferaci a ukládání osteokalcinu v MG 63 buňkách. Jako neoptimálnější vzorek se jevil povrch s 20 objemovými procenty mikročástic TCP, mezi nanočásticemi byly nejlepší hodnoty zjištěny u kompozitu s 15 objemovými % TCP. Tyto kompozity se tedy jeví jako vhodný materiál pro využití v kostním tkáňovém inženýrství.

7. Seznam použité literatury

1. ARIMA, Y., IWATA, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 2007, vol. 28, no. 20, p. 3074-3082.
2. CAMPBELL, NA., REECE, JB. *Biologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2008. ISBN 80-251-1178-4. Kapitola 5, Struktura a funkce makromolekul, s. 78.
3. CAMPBELL, NA., REECE, JB. *Biologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2008. ISBN 80-251-1178-4. Kapitola 7, Putování buňkou, s. 133.
4. CUI, X., et al. Effects of chitosan-coated pressed calcium sulfate pellet combined with recombinant human bone morphogenetic protein 2 on restoration of segmental bone defect. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2008, vol. 19, no. 2, p. 459-465.
5. DETSCH, R., MAYR, H., ZIEGLER, G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics: *Acta Biomaterialia*, 2008, vol. 4, no. 1, p. 139-148.
6. ELIAS, KL., PRICE, RL., WEBSTER, TJ. Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, no. 15, p. 3279-3287.
7. ENGLER, A., et al. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophysical Journal*, 2004, vol. 86, no. 1, p. 617-628.
8. FASSINA, L., et al. Surface modification of a porous polyurethane through a culture of human osteoblasts and an electromagnetic bioreactor. *Technology and Health Care*, 2007, vol. 15, no. 1, p. 33-45.
9. GRIFFITH, LG. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 2000, vol. 48, no. 1, p. 263-277.
10. JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V. *Biologie pro gymnázia*. 8. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2005. ISBN 80-7182-177-2. Kapitola Biologie a fyziologie člověka - Orgánové soustavy, s. 250.
11. JANSSEN, FW., et al. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no. 3, p. 315-323.
12. JENSEN, SS., et al. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical Oral Implants Research*, 2007, vol. 18, no. 6, p. 752-760.
13. JOHN, A., VARMA, HK., KUMARI, TV. Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system. *Journal of Biomaterials Applications*, 2003, vol. 18, no. 1, p. 63-78.
14. JUNG, RE., et al. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clinical Oral Implants Research*, 2008, vol. 19, no. 2, p.188-195.
15. JUNQUEIRA, LC., CARNEIRO, J., KELLEY, RO. *Základy histologie*. Přeložil Richard Jelínek. 1. vyd. Jinočany: H&H, 1997 (1999 tisk). ISBN 80-85787-37-7. Kapitola 8, Kost, s. 133-152.
16. KESELOWSKY, BG., COLLARD, DM., GARCIA, AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, vol. 66, no. 2, p. 247-259.
17. KIM, SS., et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no. 8, p. 1399-1409.
18. KONG, L., et al. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2005, vol. 75, no. 2, p. 275-282.
19. LAKES, R. Composite Biomaterials. In PARK, JB., BRONZINO, JD. *Biomaterials: Principles and Applications*. 1st ed. Boca Raton (Florida): CRC Press, 2002. ISBN 0849314917. Section 4, p. 79-94.

20. LEE, JH., et al. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials*, 1997, vol. 18, no. 4, p. 351-358, 1997.
21. LILLI, C., et al. Biomembranes enriched with TGFbeta1 favor bone matrix protein expression by human osteoblasts in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, vol. 63, no. 5, p. 577-582, 2002.
22. LODISH, H., et al. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2004. ISBN 0-7167-4366-3. Section 6.5, Adhesive interactions and nonepithelial cells, p. 223-231.
23. LODISH, H., et al. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2004. ISBN 0-7167-4366-3. Section 6.4, The extracellular matrix of nonepithelial tissues, p. 216-223.
24. LOSSDÖRFER, S., et al. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, vol. 70, no. 3, p. 361-369.
25. LOWRY, OH., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, no. 1, p. 265-275.
26. MIKULČÁK, J., et al. *Matematické fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. 4. vyd. Praha: Prometheus, 2008. ISBN 978-80-7196-345-5.
27. MURAI, M., et al. Effects of Different Sizes of β -tricalcium Phosphate Particles on Bone Augmentation within a Titanium Cap in Rabbit Calvarium. *Dental Materials Journal*, 2006, vol. 25, no. 1, p. 87-96.
28. NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 1. vyd. Jinočany: H&H, 2000. ISBN 80-86022-46-3. Kapitola E1, Struktura a funkce cytoskeletu, s. 218-240.
29. PARIKH, SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *Journal of Postgraduate Medicine*, 2002, vol. 48, no. 2, p. 142-148.
30. PARK, JB., KIM, YK. Metallic Biomaterials. In PARK, JB., BRONZINO, JD. *Biomaterials: Principles and Applications*. 1st ed. Boca Raton (Florida): CRC Press, 2002. ISBN 0849314917. Section 1, p. 1-20.
31. PETROVIC, L., et al. Effect of betaTCP filled polyetheretherketone on osteoblast cell proliferation in vitro. *Journal of Biomedical Science*, 2006, vol. 13, no. 1, p. 41-46.
32. PODESTÁ, F., et al. Cytoskeletal changes induced by excess extracellular matrix impair endothelial cell replication. *Diabetologia*, 1997, vol. 40, no. 8, p. 879-886.
33. PONADER S, et al. In vitro response of hFOB cells to pamidronate modified sodium silicate coated cellulose scaffolds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, vol. 64, no. 2, p. 275-283.
34. PRICE, RL., et al. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, vol. 70, no. 1, p. 129-138.
35. PRICE, RL., et al. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, no. 11, p. 1877-1887.
36. REKTOROVÁ, I. Tkáňové inženýrství a klonování. *Neurologie pro praxi*, 2002, vol. 1, s. 50.
37. SANTOS, EA., et al. Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, vol. 89, no. 2, p. 510-520.
38. SCHNEIDER, GB., et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *Journal of Dental Research*, 2003, vol. 82, no. 5, p. 372-376.
39. STEVENS, MM., GEORGE, JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 2005, vol. 310, no. 5751, p. 1135-1138.
40. SUN, JS., et al. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997, vol. 37, no. 3, p. 324-334.
41. THOMAS CH, et al. The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone derived cells on materials with patterned surface chemistry. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997, vol. 37, no. 1, p. 81-93.

42. VAGASKÁ, B., et al. Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiological Research*, 2009, in press.
43. VAGASKÁ, B., et al. Adhesion and growth of human osteoblast-like cells on aliphatic polyesters with different chemical composition, surface roughness and modification with hydroxyapatite. *Engineering of Biomaterials*, 2006, vol. 9, no. 58-60, p. 4-7.
44. VOISIN, M., et al. Osteoblasts response to microstructured and nanostructured polyamide film, processed by the use of silica bead microlenses. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2009, in press.
45. WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, no. 13, p. 2133-2151.
46. WANG, X., et al. Development of biomimetic nano-hydroxyapatite/poly(hexamethylene adipamide) composites. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, no. 24, p. 4787-4791.
47. WEBB, K., HLADY, V., TRESKO, PA. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading and cytoskeletal organization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1998, vol. 41, no. 3, p. 422-430.
48. WEBSTER, TJ., et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2000, vol. 51, no. 3, p. 475-483.
49. WEI, G., MA, PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, no. 19, p. 4749-4757.

Elektronické zdroje:

50. TŘESOHLAVÁ, E., RYPÁČEK, F. *Polymerní biomateriály pro obnovu tkání* [online]. In Buněčná terapie, poslední aktualizace 26.10.2009 [cit. 2010-2-2]. Dostupné z URL: <<http://bunecnaterapie.cz/zajimavosti/2009/polymerni-biomaterialy-pro-obnovu-tkani>>
51. *Aktin* [online]. In Wikipedie: otevřená encyklopedie, poslední aktualizace 24. 8. 2009 [cit. 2009-12-13]. Dostupné z URL: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Aktin>>
52. *Polymer* [online]. In Wikipedie: otevřená encyklopedie, poslední aktualizace 3. 2. 2010 [cit. 2010-2-18]. Dostupné z URL: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer>>
53. *Vitamíny skupiny K* [online]. In Zdravcentra.sk: On-line knihovna, poslední aktualizace 30.1.2007 [cit. 2009-12-13]. Dostupné z URL: <https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_21296.html>

8. Přílohy

1. Abstract from 22nd European Conference on Biomaterials: VAHALOVÁ, P., et al. Adhesion and Growth of Human Bone-Derived MG 63 Cells on Dimethylsiloxane/Polyamide Composites with Nano- and Micro- Tricalcium Phosphate.