

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Mgr. Marta Vandrovcová

**Interakce kostních a cévních buněk s materiály
pro tkáňové náhrady a cílenou dodávku léčiv**

Disertační práce

Praha 2011

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Školitelka: MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Školící instituce: Fyziologický ústav Akademie věd ČR a 2. Lékařská fakulta
University Karlovy v Praze

Praha

2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

Souhlasím – ~~Nesouhlasím~~

V Praze, 5.9.2011

MARTA VANDROVCOVÁ

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala své školitelce, MUDr. Lucii Bačákové, CSc. (Fyziologický ústav Akademie Věd ČR) za pečlivé vedení během mého studia, za její cenné rady a připomínky a za nakažlivý entusiasmus, který ve své práci projevuje. Dále bych ráda poděkovala všem svým spolupracovníkům, kteří mě zásobovali vždy pečlivě analyzovanými vzorky: Prof. RNDr. Hynek Biederman, DrSc., Prof. Ing. Václav Švorčík, DrSc., Mgr. Jiří Vacík, CSc., Timothy Douglas, PhD. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat za pomoc všem svým kolegům na pracovišti Fyziologického ústavu. Další, komu patří slova díky, jsou oponenti, kteří věnovali čas mnou předkládané práci a připomínkovali ji.

Děkuji také své rodině, která trpělivě snášela moji náladovost nejen během samotného sepsání disertační práce, ale i během celého mého studia.

Seznam zkratek

a-C	amorfní uhlík
AFM	mikroskop atomárních sil (atomic force microscope)
BMP-2	lidský morfogenetický protein kostí (bone morphogenetic protein-2)
BSA	albumin z hovězího séra (bovine serum albumin)
C2C12	myší buněčná linie myoblastů
C ₆₀	fulleren C ₆₀
C ₇₀	fulleren C ₇₀
Cbfa1	transkripční faktor specifický pro osteoblasty
CFRC	kompozity s uhlíkovou maticí vyztuženou uhlíkovými vlákny (CFRC, carbon fibre-reinforced carbon composites)
CPC-2	lidská buněčná linie osteoblastů
CS	chondroitin sulfát
DGEA	Asp-Gly-Glu-Ala
DMEM	Eaglovo minimální esenciální médium modifikované Dulbecem (Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium)
DLC	uhlík podobný diamantu (diamond-like carbon)
EDTA	kyselina etyléndiaminotetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	enzymatická imunosorbentní esej (enzyme-linked immunosorbent assay)
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Správa potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FGF-2	růstový faktor fibroblastů-2 (fibroblast growth factor-2)
HAp	hydroxyapatit
HDMEC	lidské endotelové buňky z kožních kapilár (human dermal microvascular endothelial cells)
hMSCs	lidské mezenchymální kmenové buňky (human mesenchymal stem cells)
HOS	primokultura lidských osteoblastů (human osteoblasts)
HPLC	kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HSB	hladké svalové buňky
IGF-1	růstový faktor podobný insulinu-1 (insulin-like growth factor-1)
IgG	imunoglobulin G
IL-1	interleukin-1
KRSR	Lys-Arg-Ser-Arg

MBA-15	linie buněk kostní dřeně myši
MC3T3-E1	myší progenitorové buňky osteoblastů
M-CSF	faktor stimulující kolonie mikrofágů (macrophage colony-stimulating factor)
MG-63	lidská buněčná linie osteoblastů
MSCs	mezenchymální kmenové buňky
MWCNT	mnohostěnné uhlíkové nanotuby (multi-wall carbon nanotubes)
NCD	nanokrystalický diamant
OFETS	organické transistory (Organic Field Effect Transistors)
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfáty (phosphate-buffered saline)
PDGF	růstový faktor krevních destiček (platelet-derived growth factor)
PES Mesh	polyesterová síťka
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PLGA	poly-(laktid-co-glykolid) kopolymer laktidu a glykolidu
PLLA	kyselina poly(L-mléčná)
PTFE	polytetrafluoroetylen
R _a	průměrná aritmetická odchylka posuzovaného profilu drsnosti od střední linie
RANK	receptor aktivátoru jaderného faktoru- κ B
RANKL	ligand pro receptor aktivátoru jaderného faktoru- κ B
RGD	Arg-Gly-Asp
RMS	efektivní hodnota drsnosti (root mean square)
SaOS-2	lidská buněčná linie osteoblastů
SEM	rastrovací elektronový mikroskop (scanning elektron microscope)
S.E.M.	střední chyba průměru (standard error of mean)
SWCNT	jednostěnné uhlíkové nanotuby (single-wall carbon nanotubes)
TE-85	lidská buněčná linie osteoblastů
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor- α)
U-2OS	lidská buněčná linie osteoblastů
UHPLC	vysoce výkonná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UMR-106	linie osteoblastů potkana
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

Obsah

1. ÚVOD	9
1.1 Tkáňové inženýrství a umělé materiály.....	10
1.2 Buněčné modely a podmínky kultivace při studování interakcí mezi buňkou a materiálem.....	13
1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu materiálů	15
1.4. Smáčivost povrchu	16
1.5 Drsnost povrchu	18
1.5.1 Velikost nerovností	18
1.5.2 Tvar a distribuce nerovností	21
1.6 Chemické složení povrchu materiálu	21
1.7 Nové tenké bioaktivní povrchové vrstvy	22
1.7.1 Fullereny	23
1.7.2 Uhlíkové nanotuby.....	26
1.7.3 Nanokrystalický diamant.....	26
1.7.4 Diamantu podobný uhlík	27
1.8 Angiogenese během regenerace poškozených kostí	29
1.9 Cévní poškození a cévní náhrady	31
2. CÍLE PRÁCE	34
3. MATERIÁL A METODY	36
3.1 Příprava a charakterizace fullerenních vrstev	36
3.2 Příprava a charakterizace PLGA filmu	37
3.3 HPLC analýza chondroitin sulfátu	37
3.4 Příprava kolagenních vláken bez a s chondroitin sulfátem a jejich nanášení na PLGA scaffold	37
3.5 Příprava polyesterové sítěky pro uvolňování sirolimu a testovaných roztoků.....	38
3.6 Typy použitých buněk a kultivační podmínky	39
3.7 Počet buněk, velikost plochy jejich rozprostření, jejich životaschopnost, růstové křivky a doba zdvojení počtu buněk.....	40
3.8 Imunofluorescenční barvení molekulárních markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciace	41
3.8.1. Zástupci markerů buněčné adheze	41

3.8.2 Zástupci markerů osteogenní diference	41
3.9 Enzymatická imunosorbentní esej (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)	42
3.10 Statistická analýza	43
4. VÝSLEDKY	44
4.1. Interakce kostních buněk s fullereny	44
4.2. Vliv organických složek extracelulární matrix naadsorbovaných na PLGA na chování kostních buněk	47
4.3. Perivaskulární systém s řízeným uvolňováním sirolimu	50
5. DISKUSE	52
6. ZÁVĚR	61
7. SEZNAM LITERATURY	63
8. SEZNAM AUTORČINÝCH PUBLIKACÍ	89
9. SEZNAM ABSTRAKT A ČLÁNKŮ Z VĚDECKÝCH KONFERENCÍ	90
10. ZAHRANIČNÍ STÁŽ	92

1. ÚVOD

Moderní způsob života a zároveň postoj jednotlivců ke svému zdraví způsobuje stále častější výskyt takzvaných civilizačních chorob. Mezi nejčastější onemocnění patří především srdeční a vaskulární choroby, rakovina, obezita, cukrovka II. typu, revmatický zánět kloubů, samovolné potraty či předčasné porody, deprese apod. Příčiny těchto chorob jsou různé a často se i vzájemně kombinují. Jde především o příjem vysoce kalorických potravin, zvýšené konzumace živočišných produktů, snížení fyzické aktivity, nadměrné konzumace alkoholu a cigaret, a v neposlední řadě jde o psychický stres. Lidé se většinou nejsou schopni rozumně přizpůsobit výtvarným v tom nejlepší slova smyslu, které nám civilizace přináší. Potravinový průmysl produkuje tučné a slané pokrmy a přelázané nápoje. Rozvoj automobilové dopravy přispěl ke snížení fyzické aktivity a zároveň přispívá ke zraněním způsobených při dopravních nehodách. Životní styl "moderního" člověka pak může paradoxně snižovat kvalitu jeho života. Navzdory tomu všemu se díky lékařské péči lidský život neustále prodlužuje. S tím souvisí i potřeba prodloužit období tzv. produktivního života. Nyní přichází na scénu moderní medicína, která neustále vyvíjí nové léky, nové léčebné postupy, a ty v sobě zahrnují mimo jiné tkáňové inženýrství - pokročilý interdisciplinární vědní obor, který pomocí kombinace umělých a biologických komponent vytváří náhrady tkání a orgánů. Lidé by však neměli spoléhat pouze na medicínu samotnou. Neměli by podceňovat prevenci a sami by se měli zapojit do boje proti civilizačním chorobám.

Abychom byli schopni navrhnout správný materiál pro určitý typ postižení, je potřeba se důkladně obeznámit s fyziologií a patofyziologií té konkrétní tkáně či orgánu. V této práci se soustředím především na kostní náhrady a jejich modifikace, jejichž cílem je podporovat adhezi, růst a osteogenní diferenciaci buněk a vést k integraci mezi implantátem a kostní tkání.

Kost se skládá z řady buněk mezenchymálního původu. Jsou to např. osteoblasty, osteoklasty, kmenové buňky a cévní buňky. Osteoblasty se podílejí na růstu kosti, zatímco osteoklasty kost resorbují. Tyto dva protichůdné procesy se nazývají kostní remodelace (Barrett *et al.* 2010). Osteoblasty jsou velmi podobné fibroblastům, to znamená, že exprimují všechny geny, které jsou exprimovány i ve fibroblastech, až na dvě výjimky, které jsou specifické pouze pro osteoblasty: transkripční faktor Cbfa1 a protein osteokalcin. Cbfa1 je transkripční faktor specifický pro osteoblasty a je považován za nejranější a nejspecifičtější marker osteogeneze. Osteokalcin je nekologenní protein vyskytující se v kostní matrix v největším zastoupení. Tato molekula je také důležitým markerem diferenciaci osteoblastů.

Inhibuje kostní růst tím, že inhibuje aktivitu transglutaminázy. Dále na sebe váže vápník (Kaartinen *et al.* 1997, Ducky *et al.* 2000). K osteogenní diferenciaci může během embryonálního vývoje dojít dvěma odlišnými cestami: intramembranózní (desmogenní) či enchondrální osifikace. K intramembranózní osifikaci dochází především během formování plochých kostí lebky, obličejové části a větší části klíční kosti. V tomto případě mezenchymální progenitorové buňky diferencují přímo v osteoblasty. Naproti tomu k enchondrální osifikaci dochází u dlouhých kostí, které jsou formovány z chrupavky. Po vaskularizaci chrupavky začnou chondrocyty odumírat apoptózou a následně jsou nahrazeny osteoblasty. Chrupavčitý templát se přemění v kost (Barrett *et al.* 2010).

Ve zdravé kosti dochází k velmi křehké rovnováze mezi syntetickou aktivitou osteoblastů a resorpční aktivitou osteoklastů. Při narušení této rovnováhy dochází ke vzniku řady chorob. Během stárnutí (ale i u některých typů onemocnění) je rovnováha posunuta směrem k činnosti osteoklastů, což má za následek úbytek kostní hmoty. Tento proces ovlivňuje strukturu kostí a způsobuje jejich křehkost a náchylnost ke zlomeninám. Nejběžnějším onemocněním tohoto typu je osteoporóza. U žen bývá často způsobena sníženou produkcí estrogenu v období menopausy (Rodan a Martin 2000). Pokles hladiny estrogenů souvisí se zvýšenou kostní resorpcí zmnoženými osteoklasty. To vede ke zvýšené produkci cytokinů, které regulují množení osteoklastů kaskádou (signální dráhou) zahrnující následující faktory: receptor aktivátoru pro jaderný faktor- κ B (RANK) a jeho ligand (RANKL), faktor nádorové nekrózy α (TNF- α), interleukin-1, interleukin-6, interleukin-11, faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF) a prostaglandin E (Pacifici 1998).

Mezi nejčastější kloubní onemocnění patří degenerace kloubní chrupavky - osteoartritida. Rozlišujeme primární osteoartritidu způsobenou stářím či přetěžováním kloubů a sekundární osteoartritidu, která vzniká v důsledku traumat. Jak primární, tak sekundární osteoartritida se projevují především bolestí při chůzi, což je řešitelné podáváním tišících prostředků. Časem se však může samotný pohyb stát díky bolesti téměř nemožným. Jediným způsobem, jak zachovat pacientům mobilitu, je voperovat jim umělý kloub (Sedlák a Píša 2008). V roce 2005 se celosvětově investovalo do kostních náhrad okolo 23 miliard dolarů. A tato částka se rok od roku zvyšuje.

1.1 Tkáňové inženýrství a umělé materiály

Tkáňové inženýrství je definováno jako "interdisciplinární obor, který využívá principy technických a biologických vědních oborů pro vývoj biologické náhrady, která obnoví, zachová nebo zlepší funkci tkáně či celého orgánu" (Langer a Vacanti 1993). V

tkáňovém inženýrství se pro účely náhrad či regenerace tkání mohou používat buď čistě biologické stavební kameny (živé buňky a molekuly extracelulární matrix), nebo je buňkami osazen umělý materiál, který by se měl chovat jako analog extracelulární matrix. V této souvislosti se v tkáňovém inženýrství klade velký důraz na zkoumání interakcí mezi biomateriálem a buňkami. Opakovaně bylo prokázáno, že chování buněk silně závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech povrchu materiálů (Linez-Bataillon *et al.* 2002, Eisenbarth *et al.* 2002, Webster a Smith 2005).

Umělé materiály se pro náhrady tkání používají stovky let. Například Mayové vytvořili umělý zub z ulity již 600 let před n. l. V Evropě byl nalezen v ostatcích datovaných 200 let před n. l. podobný zubní implantát, avšak kovový. Biomateriály v dnešním slova smyslu se nepoužívají déle než 50 let. Před touto dobou se nebrala v potaz biokompatibilita, nebyly náhrady systematicky zhotovovány (kromě brýlí a jiných podobných pomůcek), a ohledně využití umělých materiálů v medicíně neexistovaly právní předpisy (Ratner *et al.* 2004).

Materiály, které se v současnosti používají v tkáňovém inženýrství, lze rozdělit do několika základních skupin: syntetické polymery, přírodní polymery, keramika, kovy a kompozity (kombinují vlastnosti dvou či více materiálů různých kategorií).

Každá z výše uvedených skupin materiálů může být použita i v kostním tkáňovém inženýrství. **Syntetické polymery** mohou být například použity jednak jako samotná umělá náhrada a jednak pro výrobu některých nástrojů používaných v ortopedii či zubním lékařství. Např. poly(metyl-metakrylát) je hlavní součástí kostního cementu při ortopedických operacích. Poly(dimethyl-siloxan), který je základní surovinou pro konstrukci srdečních chlopní, se používá i pro výrobu protéz prstních kloubů. Lékařská vlákna vyrobená např. z polytetrafluoroetyleny (PTFE) mají své využití jakožto náhrady vazů a šlach (např. při podpurné léčbě vykloubeného ramenního kloubu, nebo u přetržených vazů v kolenou). Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) je ve tkáňovém inženýrství široce používán při výrobě biodegradabilních prostorových nosičů buněk, tzv. scaffoldů (Golfstein *et al.* 1999, van Eijk *et al.* 2008, Pamula *et al.* 2009). V těle je PLGA odbouráván v Krebsově cyklu (Houchim a Topp 2008). Přes všechna tato fakta je použití polymerů omezeno kvůli častým problémům, jako je např. sklon k rychlému opotřebenosti, slabé propojení s kostní tkání, značná pružnost či nízká tvrdost. Vysoká tvrdost je naproti tomu charakteristická pro **keramické materiály**. Jejich nevýhodou je, že jsou křehké. Materiály, jako např. hydroxyapatit nebo fosforečnan vápenatý, se však úspěšně používají v kombinaci s polymery, obzvláště ve formě bioaktivních a biodegradabilních mikro- a nanočástic (více viz Abramson *et al.* 2004, Vagaská *et al.* 2010).

Biodegradabilní materiály jsou důležité u dočasně umístěných fixátorů podporujících hojení. Tyto materiály mají velký potenciál právě v kostním tkáňovém inženýrství za předpokladu, že regenerovaná a plně funkční kostní tkáň postupně nahradí dočasný biodegradabilní scaffold.

Přírodní polymery (získané z živočišných tkání či připravené rekombinantními technikami, např. molekuly podobné elastinu, Bellingham *et al.* 2003) mají stejnou či podobnou molekulovou strukturu jako původní přirozené makromolekuly. Jsou tělu vlastní, a proto nejsou cytotoxické. Dále jsou buňkám lépe přístupné, neboť ve svých molekulách obsahují specifické aminokyselinové sekvence, které představují ligandy pro adhezni receptory buněk, např. RGD či KRSR. Naproti tomu bývají často imunogenní a mohou být spojeny s nebezpečím přenosu patogenů. Jejich strukturální konformace je navíc složitější než u syntetických molekul, což může ztížit technologickou manipulaci. Pro kostní tkáňové inženýrství je jednou z nejzajímavějších molekul kolagen. Kolagen je protein, který je důležitou složkou extracelulární matrix nejrůznějších tkání. Kolagen I se vyskytuje převážně v kostní tkáni, šlachách a kůži. Velmi často se používá pro modifikaci povrchů jiných materiálů tak, aby co nejvíce napodobovaly přirozenou extracelulární matrix. Obsahuje totiž vazebná místa, která umožňují navázání a osteogenní diferenciaci kostních buněk, např. aminokyselinovou sekvenci DGEA (Culpepper *et al.* 2010). Podle řady publikací kolagen zlepšuje adhezi buněk, jejich rozptřeni a proliferaci (Geissler *et al.* 2000, Roehlecke *et al.* 2001, Douglas *et al.* 2007). Tento pozitivní efekt může být zesílen, pokud je kolagen kombinován i s jinými molekulami extracelulární matrix - např. glykosaminem chondroitin sulfátem. Chondroitin sulfát je schopný vázat některé růstové faktory, jako např. růstový faktor fibroblastů, FGF (Nandini a Sugaraha 2006, Asada *et al.* 2009), a po navázání na scaffold pokrytý kolagenem zvyšuje proliferaci fibroblastů a chondrocytů (van Susante *et al.* 2001, Zhong *et al.* 2005). Testovala se dále kombinace kolagenu a chondroitinu na titanu *in vitro* i *in vivo*. Tyto experimenty prokázaly lepší přijetí titanových implantátů, zlepšení jejich stability v kosti a účinnější formování nově mineralizované kostní tkáně okolo implantátu.

Poslední skupina materiálů - **kovy** - je v dnešní době hlavním materiálem používaným v ortopedii (pro přehled viz Abramson *et al.* 2004). Materiály nejčastěji používané v ortopedii jako implantáty jsou: nerezová ocel 316L, slitiny kobaltu a chromu, a titan a jeho slitiny. A právě titan je považován za nejvhodnější materiál pro kostní inženýrství. Existuje pro to několik důvodů. Jsou to zejména jeho mechanické vlastnosti, chemická stabilita a známá biokompatibilita. Ve srovnání s ostatními slitinami mají materiály z titanu nízký modulus elasticity (v rozmezí 110 a 55 GPa), který se blíží modulu elasticity přirozené kostní tkáně (30 GPa). Vysoký modulus elasticity, jaký mají ostatní slitiny (nerezová ocel dosahuje hodnot

310 GPa, slitiny kobaltu a chromu 240 GPa), může vést k uvolnění a poškození protézy nebo fraktuře okolní kosti. Proto je důležité, aby měl umělý materiál modulus elasticity co nejvíce podobný kosti (Geetha *et al.* 2009). Po implantaci může dojít i k odmítnutí implantátu v důsledku alergické reakce vyvolané kovovými ionty uvolněnými z materiálu (Long a Rack 1998). Titan je reaktivní kov a to znamená, že na vzduchu, ve vodě nebo jiném elektrolytu spontánně oxiduje za vzniku tenké vrstvy oxidu. Tento oxid je přibližně 4 nm tlustý. Příznivý způsob růstu oxidové vrstvy má za následek, že se z povrchu neuvolňují žádné kovové ionty. Oxid titaničitý je rovněž dobrý izolátor a navíc dokáže vázat takové aniontové nečistoty, jako jsou chloridy, fluoridy nebo fosfáty. Vodivé materiály často podporují redoxní procesy, které následně mohou vést k denaturaci makromolekul (Steinemann 1998).

1.2 Buněčné modely a podmínky kultivace při studování interakcí mezi buňkou a materiálem

Materiály navržené pro implantaci do kostí jsou nejprve testovány *in vitro* a následně *in vivo* na laboratorních zvířatech. *In vitro* testování zpočátku pracuje s buněčnými liniemi. Tyto linie představují homogenní, jasně definované a relativně dobře dostupné a snadno kultivovatelné buněčné populace, které umožňují testování mnoha typů vzorků a přitom dávají reprodukovatelný výsledek. Nejčastěji používané zvířecí linie jsou osteoblasty potkana UMR-106, myší buňky kostní dřene MBA-15 a myší progenitorové buňky MC3T3-E1. Poslední zmiňované buňky mají fibroblastový fenotyp se schopností ve vhodném prostředí diferencovat v osteoblasty (Kanazawa *et al.* 2007). Lidské buněčné linie odvozené z kostí jsou linie osteoblastů CPC-2, TE-85, MG-63, SaOS-2, U-2OS. Přestože jsou tyto linie odvozené z osteosarkomů, ponechávají si schopnost diferenciaci za přítomnosti markerů, jako jsou např. aktivita alkalické fosfatázy nebo produkce osteokalcinu (Zhao *et al.* 2007, Rudnik *et al.* 2008, Grausová *et al.* 2009a, Kalbáčová *et al.* 2009).

Získané příznivé výsledky jsou dále testovány na primokulturách nebo nízcě pasážovaných zvířecích nebo lidských kostních buňkách. Mohou to být buď již diferencované osteoblasty (např. osteoblasty z lebečních kostí novorozených potkanů; Webster *et al.* 2000a,b; de Oliveira a Nanci 2004, de Oliveira *et al.* 2007), lidské osteoblasty získané během chirurgických zásahů (Anselme a Biggerelle 2005) anebo nediferencované buňky kostní dřene (např. mezenchymální kmenové buňky, MSCs; Filová *et al.* 2009a; embryonální kmenové buňky; Bedi *et al.* 2009). Podobně jako buněčné linie, i tyto primokultury a nízcě pasážované buňky je možno zakoupit od specializovaných firem (Webster a Ejiófor 2004), které tímto ulehčují samotné testování biomateriálů.

Testování materiálu se může provádět buď statickou kultivací buněk nebo v dynamickém kultivačním systému. V obou případech jsou vzorky nejprve vloženy do kultivačních nádob (obvykle misek či komůrek), které jsou dále naplněny suspenzí buněk v kultivačním médiu. Buňky jsou pak prvních 24-48 hodin po nasazení obvykle ponechány ve statických podmínkách, aby jim bylo umožněno adherovat a rozprostřít se na materiálu, a pak je buď pokračováno v kultivaci statické, nebo jsou buňky vystaveny dynamickým podmínkám. Někdy se však dynamické podmínky aplikují již při nasazení buněk – například při osazování cévní protézy endotelovými či hladkými svalovými buňkami protéza zvolna rotuje podél své dlouhé osy, upevněná vodorovně ve válcovité nádobě se suspenzí buněk (Fernandez *et al.* 2005). Při osazení prostorových porézních nosičů zase bývá využívána odstředivá síla (Godbey *et al.* 2004).

Klasický statický systém je vhodný spíše pro planární vzorky (tzv. dvojrozměrné, 2D), zatímco vzorky trojrozměrné (3D) obvykle vyžadují kultivaci buněk v systémech dynamických. Avšak i dvojrozměrné vzorky lze vystavovat dynamickým podmínkám, aby se otestovalo, jak budou buňky odpovídat na daném materiálu různým typům mechanického namáhání, jako je např. nestabilní namáhání vyvolané tokem kultivačního média (Scaglione *et al.* 2008, Kokkinos *et al.* 2009, Tan *et al.* 2010), hydrostatický tlak (Gardinier *et al.* 2009) nebo deformace v tahu na elastických materiálech (např. na silikonové pryži; Kaspar *et al.* 2000). Tyto mechanické stimulace osteoblastů a jiných osteogenních buněk (tj. buňky kostní dřene, progenitorové MC3T3-E1 buňky, lidské kostní buňky MG 63) vedou k reorganizaci fokálních adenzních plaků a cytoskeletu, zvyšuje buněčnou stabilitu (resp. tuhost), což vede ke zvýšení osteogenní diferenciaci. Ta se projevuje expresí hlavních osteogenních transkripčních faktorů Cbfa1 a Osterix, proteinů extracelulární matrix (kolagen I, osteopontin, osteokalcin, kostní sialoprotein) a zvýšenou aktivitou alkalické fosfatázy.

Jak již bylo naznačeno, pro inženýrství kostní tkáně jsou buňky na trojrozměrných polymerních, keramických či kompozitních porézních nebo vláknitých materiálech kultivovány především v dynamických systémech. Tato kultivace, především je-li spojena s dynamickým nasazováním buněk, usnadňuje buňkám pronikání do pórů materiálu a kolonizaci hlubších vrstev scaffoldů, což je téměř nemožné při statické kultivaci. Dynamický systém navíc podporuje nasátí tekutiny do scaffoldů, čímž buňkám zlepšuje dostupnost kyslíku a živin, a zároveň umožňuje snazší odstraňování odpadních metabolických produktů (pro přehled viz Pamula *et al.* 2008, 2009). Nejčastější dynamické systémy jsou perfúzní bioreaktory (Olivier *et al.* 2007), horizontální či vertikální rotační bioreaktory (Belfiore *et al.* 2009, Meretoja *et al.* 2009) a bioreaktory vyvíjející tlak (Mauney *et al.* 2004). Jeden

bioreaktor v sobě může kombinovat i několik mechanických stimulací, např. cyklický hydraulický tlak a namáhání vyvolané tokem kultivačního média (Gardinier *et al.* 2009), tlak vyvolaný odstředivou silou v rotačním bioreaktoru kombinovaný se stlačováním ("centrifugal-force-induced fluid pressure in a rotating-cup bioreactor and compression pressure"; Belfiore *et al.* 2009), nebo smykové namáhání buněk na materiálu vyvolané průtokem média, kombinované se stlačováním ("perfusion-generated fluid shear stress and compression stress"; Bölgen *et al.* 2008). Buňky kultivované v dynamických podmínkách (3D materiály stejně jako planární vzorky) vykazují v porovnání s podmínkami statickými zvýšenou proliferaci, životaschopnost a osteogenní diferenciaci (Mauney *et al.* 2004, Olivier *et al.* 2007, Meretoja *et al.* 2009). Osteogenní diferenciaci podporuje i kultivační médium, do kterého jsou přidány např. dexametason, kyselina askorbová, vitamin D₃ a β-glycerolfosfát (Mauney *et al.* 2004, Kokkinos *et al.* 2009).

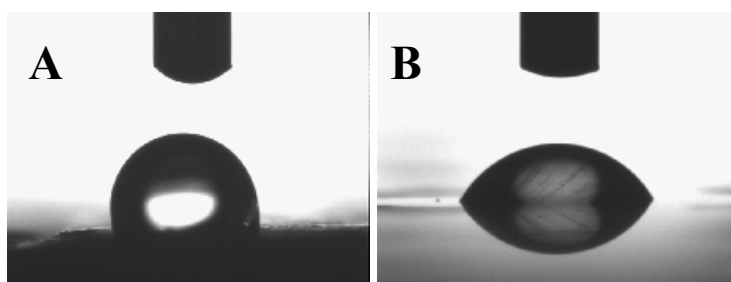
1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu materiálů

U nových typů materiálů je třeba brát v úvahu, aby tyto materiály podporovaly uchycení, migraci, proliferaci, diferenciaci, dlouhodobou životaschopnost a správnou funkci konkrétních buněk. Adheze buněk k materiálu a jejich následující osud je zprostředkován molekulami extracelulární matrix, jako je vitronektin, fibronectin, kolagen, laminin a fibrin - tedy molekulami, které se účastní při procesu hojení ran. Tyto molekuly se proto často používají pro vhodnou modifikaci povrchu biomateriálu (Brynda *et al.* 2005, Filová *et al.* 2009b). Tyto molekuly jsou obsaženy v biologických roztocích (kultivační médium, krev, intercelulární tekutina), spontánně se adsorbují na povrch materiálů, a poté jsou jejich specifická aktivní místa (např. specifické aminokyselinové sekvence RGD, KRSR, DGEA apod.) rozpoznána buněčnými receptory (především integriny). Molekuly extracelulární matrix se musí adsorbovat v dostatečném množství a zaujmout správnou prostorovou konformaci, aby byly pro buněčné receptory dostupné. Chování těchto proteinů při adsorpci je významně ovlivněno fyzikálními a chemickými vlastnostmi povrchu. Mezi nejvýznamnější vlastnosti patří: polarita, smáčivost, elektrický náboj a vodivost, drsnost a topografie, tuhost či pružnost povrchu a další (Engler *et al.* 2004, Bačáková *et al.* 2004, Bačáková a Švorčík 2008). Úprava drsnosti a topografie tak, aby měnila odpověď tkáně, je jedním ze základních kritérií, které jsou rozhodující při interakci buňka-materiál a pro integraci materiálu do okolní tkáně (Clark 1994, Ito 1999, He *et al.* 2008).

1.4. Smáčivost povrchu

Jak již bylo zmíněno, jedním z důležitých parametrů adheze buněk je smáčivost povrchu. Smáčivost, neboli hydrofilie povrchu, či naopak jeho hydrofobie, se obvykle měří pomocí kontaktního úhlu kapek polárních kapalin (např. voda) a kapalin nepolárních (např. benzylalkohol) na povrchu materiálu. Hydrofilie či hydrofobie povrchu materiálu totiž vyplývá z jeho polaritý – výška polární složky povrchové energie materiálu je přímo úměrná jeho hydrofilii.

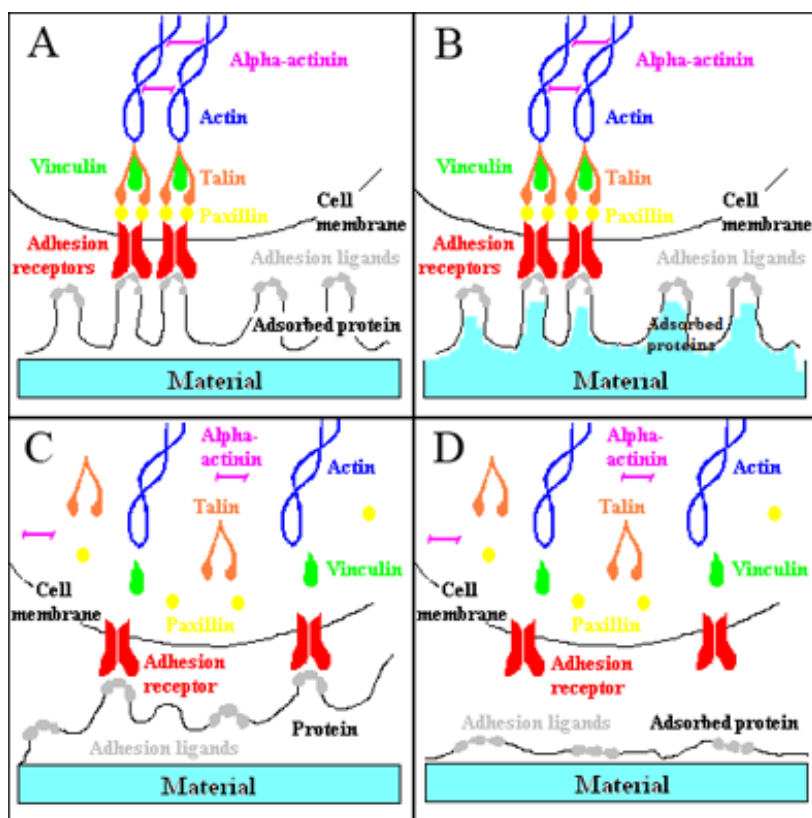
Velikost kontaktního úhlu vodní kapky je nepřímo úměrná smáčivosti daného materiálu. Menší kontaktní úhel udává výraznější rozprostření tekutiny na povrchu, tzv. hydrofilitu materiálu, zatímco vyšší kontaktní úhel odpovídá stavu, kdy tekutina sníží svůj kontakt s povrchem materiálu, který je tedy hydrofobní (obr. 1). Různé modifikace povrchů mohou ovlivnit jeho smáčivost. Např. oxygenace polymerů zvýší podíl polárních skupin a tím i smáčivost, která umožní adsorpci molekul zprostředkujících adhezi buněk, jako je např. vitronektin, fibronektin, kolagen, laminin.



Obr. 1. Vodní kapka na uhlíkových kompozitech s různou povrchovou úpravou. **A:** nemodifikovaný kompozit bezprostředně po výrobě s hydrofobním povrchem (kontaktní úhel vodní kapky $103 \pm 4^\circ$). **B:** Kompozit modifikovaný leštěním a pokrytím pyrolytickým grafitem, což mělo za následek zvýšení smáčivosti povrchu (kontaktní úhel vodní kapky $60 \pm 1^\circ$). Měřeno metodou reflexní goniometrie (přístroj DSA 10 Mk2, Kruss, Germany) (Bačáková *et al.* 2001, Starý *et al.* 2003a,b).

Buňky obvykle nejpříznivěji reagují na středně hydrofilní povrch, který umožní adhezi specifických proteinů v dostatečném množství, výhodném spektru a zejména výhodné geometrické konformaci, tj. blízké konformaci fyziologické. Na takto adsorbovaných molekulách jsou vazebná místa (např. specifické aminokyselinové sekvence) dobře přístupná adhezním receptorům buněk (obr. 2A). Navíc jsou molekuly adsorbovaných proteinů flexibilní a snadno přestavitelné buňkami, což rovněž podporuje regeneraci přilehlé tkáně a integraci umělého materiálu do této tkáně. Pokud je však materiál silně hydrofilní (kontaktní

úhel blízky 0°) a nebo je vysoká hydrofilie navíc kombinována s mechanickou nestabilitou povrchu materiálu (např. pohyblivé řetězce polyetylén oxidu, uchycené na materiálu pouze jedním koncem, Bačáková *et al.* 2007a), proteiny se k materiálu neadsorbují buď vůbec, nebo jen velmi slabě. V prvním případě buňky na materiál již primárně neadherují (obr. 2C), ve druhém případě se po krátkém období růstu předčasně odloučí, neboť slabě adsorbovaná vrstva proteinů není schopna vázat k materiálu vyšší počet buněk (Grausová *et al.* 2009a). Naproti tomu na silně hydrofobních materiálech (kontaktní úhel kolem 100°) se proteiny sice adsorbují v dostatečném množství (dokonce i vyšším než na materiálech přiměřeně hydrofilních), ale adsorbují se v rigidní a denaturované formě, což rovněž brání adhezi buněk. Specifické aminokyselinové sekvence, tj. ligandy pro adhezní receptory buněk v molekulách adsorbovaných proteinů, jsou totiž v tomto případě adhezním receptorům buněk špatně přístupné (obr. 2D). Navíc hydrofobní povrchy adsorbují přednostně albumin, který nepodporuje adhezi buněk, před proteiny zprostředkujícími buněčnou adhezi, jako je např. vitronektin, fibronektin, vinkulin, laminin (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2011).



Obr. 2.: Schéma interakce naadsorbovaných proteinů s povrchem materiálu v závislosti na jeho kontaktním úhlu: mírný hydrofilní povrch (A), nanostrukturovaný povrch (B), silně hydrofilní povrch (C), hydrofobní povrch (D). Obrázky A a B popisují takové vlastnosti materiálu, které jsou příhodné pro adsorpci správného spektra proteinů a jejich konformace pro adhezi kostních buněk (Bačáková *et al.* 2011).

1.5 Drsnost povrchu

Stále více prací se zabývá modifikacemi povrchu materiálů tak, aby se staly pro buňky atraktivnější a tím došlo k optimalizaci integrace implantátu do okolní tkáně. Jednou z těchto modifikací je úprava drsnosti a topografie povrchu materiálu, tj. velikosti, tvaru a distribuce nerovností.

1.5.1 Velikost nerovností

Nanostrukturovaný povrch materiálu, čili takový povrch, který obsahuje nerovnosti menší než 100 nm, odpovídá nanoarchitektuře přirozené kostní tkáně. Do tohoto rozmezí totiž spadají např. rozměry některých molekul extracelulární matrix nebo jejich části (např. různá zvlnění, větvení), a zároveň velikost extracelulárních částí buněčných receptorů. Extracelulární proteiny se na nanostrukturovaný povrch adsorbují ve výhodné konformaci, čímž buněčným receptorům zpřístupní specifické bioaktivní sekvence aminokyselin, jako jsou např. RGD nebo sekvenci specifickou pro navázání osteoblastů KRSR. Z tohoto hlediska lze říci, že nanostruktura povrchu má podobný účinek jako smáčivost materiálu (srov. obr. 2A a 2B), která rovněž podporuje adsorpci molekul zprostředkujících adhezi buněk ve výhodné geometrické konformaci blízké konformaci fyziologické (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, Bačáková a Švorčík 2008). Nejlépe na nanostrukturovaný povrch adsorbuje vitronektin, což je vysvětlováno jeho relativně malou a lineární molekulou ve srovnání s většími a rozvětvenými molekulami zprostředkujícími adhezi buněk, např. lamininu. Vitronektin je přednostně rozpoznáván osteoblasty ve srovnání s jinými buněčnými typy, zejména fibroblasty (Webster *et al.* 2000a,b; Price *et al.* 2004). Z tohoto hlediska by nanostruktura povrchu kostního implantátu mohla představovat určitou prevenci fibrózního opouzdření implantátu. Preferenční adheze osteoblastů je způsobena přítomností aminokyselinové sekvence KRSR v molekule vitronektinu (v jeho doméně vázající heparin), která je selektivně vázána molekulami proteoglykanu heparan sulfátu na povrchu osteoblastů (Dee *et al.* 1998).

Řada studií se zabývala porovnáváním vlivu mikro- a nanostrukturovaných povrchů na chování různých typů buněk (Lincks *et al.* 1998, Bačáková *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2007, Khang *et al.* 2008, Liu *et al.* 2008, Mendonça *et al.* 2008). Většina těchto prací se přiklání k názoru, že nerovnosti ve stupnici nanometrů jsou pro růst a proliferaci buněk výhodnější. Tento nálezný je možné vysvětlit tím, že nerovnosti řádově v nanometrech či desítkách nanometrů příznivě ovlivňují adsorpci molekul zprostředkujících adhezi buněk (viz výše), a tím zlepšují přichycení a rozptýlení osteoblastů, což jsou nezbytné kroky pro jejich následující účinnou proliferaci (Webster *et al.* 2000a,b; Christenson *et al.* 2007, Khang *et al.*

2008, Liu *et al.* 2008). Naproti tomu nerovnosti ve stupnici mikrometrů mohou bránit řádnému rozprostření buněk, jejichž plocha adheze k materiálu má za normálních okolností rovněž rozměry řádově v mikrometrech či desítkách mikrometrů. Buňky jsou nuceny vyhýbat se nerovnostem (např. adherovat jen v prohlubních mezi nerovnostmi) či nerovnosti přemostovat, což jednak omezuje kontakt jejich povrchu s materiálem, jednak vede i k deformacím a napětí buněčné membrány. Tyto faktory pak zpomalují proliferaci buněk (Bačáková *et al.* 2001, Starý *et al.* 2003a,b; pro přehled viz Vagaská *et al.* 2010, Grausová *et al.* 2011, Bačáková *et al.* 2011). V souladu s tímto tvrzením Rosa a Beloti (2003) dokázali, že se adheze a proliferace buněk snižují se zvyšující se drsností materiálu. V uvedené studii autoři porovnávali vliv submikronové a mikronové drsnosti titanového substrátu na růst lidských buněk kostní dřeně. Drsnost byla hodnocena pomocí parametru R_a , který je definován jako průměrná odchylka profilu drsnosti od střední linie ($R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i|$), a v citované studii tento parametr dosahoval 0.24 μm , 0.69 μm , 0.80 μm a 1.90 μm . K podobnému výsledku dospěli i Anselme a Bigerelle (2005), kteří kultivovali lidské osteoblasty na titanových površích, jejichž drsnost, měřená tentokrát parametrem S_a (definován jako průměrná amplituda drsnosti, tedy parametr podobný R_a) se pohybovala mezi 0.53 μm a 2.52 μm . Avšak buňky na drsnějších vzorcích titanu (R_a 0.80 μm a 1.90 μm) obsahovaly vyšší množství celkového proteinu a vykazovaly vyšší aktivitu alkalické fosfatázy, tj. enzymu, který se účastní osteogenní diferenciace (Rosa a Beloti 2003). Mikrodrsnost tedy může podporovat osteogenní diferenciaci buněk, přestože jejich počáteční adheze a proliferace není ideální.

Podobné chování buněk bylo pozorováno na površích s různou nanodrsností. Webster *et al.* (1999) ve své studii uvádí, že primární osteoblasty získané z lebečních kostí potkana a pěstované na nanodrsném titanu (zrna o velikosti 20 nm až 56 nm) a hliníku (zrna o velikosti 20 nm až 67 nm) dosahovaly nejvyšších počtů iniciálně adherovaných buněk na TiO_2 s velikostí zrn 20 nm až 32 nm a Al_2O_3 se zrn 20 nm až 49 nm. Tyto počty byly statisticky významně vyšší než hodnoty získané na samotném titanu a hliníku, které byly mnohem drsnější (velikost nerovností titanu byla 2120 nm a hliníku 177 nm). Příznivý účinek nanostrukturovaného povrchu lze vysvětlit i tím, že úpravou povrchu došlo jednak ke zvětšení jeho plochy, kterou mohou buňky využít pro adhezi, a jednak se zlepšila adsorpce a konformace adsorbovaných proteinů, které se účastní adheze buněk (Webster *et al.* 1999).

Ve studii, kterou jsme provedli na lidských kostních buňkách linie MG 63, jsme porovnávali vliv skla a povrchu potaženého TiO_2 o různých stupních nanodrsnosti, a dospěli

jsme k výsledku, že nejpříznivější drsností byla hodnota $R_a = 40$ nm (naše výsledky se tedy blížily podobnému výstupu, jaký uvádí ve své práci Webster *et al.* 1999). Dále buňky (na povrchu $R_a = 40$ nm) vykazovaly lepší rozprostření a významně vyšší počty 7. den po nasazení v porovnání s výsledky získanými na TiO_2 o vyšší drsnosti (R_a 100 nm a 170 nm; Vandrovcová *et al.* 2010, Vandrovcová a Bačáková 2011). Stejných výsledků bylo dosaženo na nanokrystalických diamantových filmech (nanocrystalline diamond films, NCD). Byly testovány vzorky s efektivní hodnotou drsnosti (root mean square, RMS) 20 nm, 270 nm a 500 nm. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo na povrchu s RMS 20 nm, kde měly lidské kostní buňky linie SaOS-2 nejlepší počáteční adhezi (měřeno 1 hodinu po nasazení), nejvyšší metabolickou aktivitu (měřena aktivitou buněčné dehydrogenázy 48 hodin po nasazení) a nejlepší osteogenní diferenciaci (měřena aktivitou alkalické fosfatázy a minerální depozice buněk 11 dní po nasazení). Tyto výhodné účinky nanodrsné úpravy se připisují faktu, že se povrch podobá topografii skutečného kostního povrchu (Kalbáčová *et al.* 2009).

Příznivý účinek nanodrsnosti byl rovněž prokázán porovnáním hladkého a nanodrsného povrchu. Přestože byla velikost buněčné kolonie (tj. celková plocha obsazená každou buněčnou kolonií) vyšší na hladkém borosilikátovém povrchu než na povrchu keramiky s nerovnostmi v nanometrických rozměrech, syntéza alkalické fosfatázy a depozice minerálů obsahujících vápník byla významně vyšší u osteoblastů na nanostrukturované keramice po 21. a 28. dni kultivace (Webster *et al.* 2000b).

Rovněž de Oliveira a Nanci (2004) porovnávali osteogenní diferenciaci kalvariálních osteoblastů (získaných z neonatálních potkanů) na nemodifikovaném titanu a TiAlV discích s nerovnostmi v řádu nanometrů. Těchto nerovností bylo docíleno chemickým leptáním v roztoku H_2SO_4 a H_2O_2 . Osteoblasty, které rostly na povrchu pokrytém nerovnostmi ve výši 10 nm ve tvaru včelí plástve, secernovaly více kostního sialoproteinu a osteopontinu, tj. typických nekolagenních proteinů kostní matrix. Na ošetřených površích byla u osteoblastů rovněž zaznamenána vyšší aktivita alkalické fosfatázy a formování mineralizovaných nodulů než na površích neošetřených (de Oliveira *et al.* 2007).

Lze tedy souhrnně říci, že povrchová drsnost v desítkách nanometrů je kostními buňkami upřednostňována. Buňky na ní lépe adherují, rostou, proliferují, diferencují a fenotypicky vyžívají v porovnání s chováním buněk na hladkých površích či naopak na drsných površích s nerovnostmi submikronových nebo mikronových rozměrů.

1.5.2 Tvar a distribuce nerovností

Pro správnou interakci mezi buňkou a materiálem nejsou důležité pouze rozměry nerovností povrchu, ale také tvar a distribuce těchto nerovností na povrchu. To dokazuje například pokus, ve kterém byl povrch titanu modifikován pomocí anodické oxidace tak, že na něm vznikly útvary o různém průměru (0.5 μm a 2.0 μm), s různým parametrem R_a (0.2 μm a 0.4 μm), avšak stejného pórovitého tvaru. Buňky se na porovnávaných površích chovaly velmi podobně. I jejich morfologické znaky, jako je například vytváření filopodií, se shodovaly. Buňky vykazovaly podobný tvar a distribuci vinkulinu, který je obsažen ve fokálních adhezních placích, a podobné prostorové uspořádání aktinového cytoskeletu (Zhu *et al.* 2004).

Při interakci buňka-materiál je důležitá i hustota nerovností na povrchu materiálu. Rice *et al.* (2003) například nanášeli latexové částice vyrobené z latexu (polokruhového tvaru o výšce 110 nm) na titanovou podložku v hustotě pokryvu 3 %, 19 %, 30 % a 43 % povrchu materiálu. Se zvyšující se koncentrací nanočástic se snižovalo rozprostření i proliferace kalvariálních osteoblastů potkana. Na druhé straně v buňkách kultivovaných na materiálech o vyšší hustotě nanočástic došlo ke zvýšené expresi osteokalcinu. K podobnému závěru dospěli i Kunzler *et al.* (2007), když na silikonové destičky pokryté polyethylen-iminem nanášeli nanočástice (průměr 73 nm) v hustotě v rozmezí od 0 % do 21 % pokryvu materiálu. Potkaní kalvariální osteoblasty na površích o vyšší hustotě nanočástic byly hůře rozprostřené, pomaleji proliferovaly a nedostatečně formovaly aktinový cytoskelet. Autoři tento výsledek vysvětlili tak, že na materiálech s hustším pokryvem částic docházelo k výraznějšímu ohybu membrány, většímu napínání buněk a snížené ploše kontaktu mezi buňkou a materiálem. Z těchto výsledků lze usuzovat, že vyšší hustota povrchových nerovností má podobný efekt jako zvýšení velikosti těchto nerovností (viz výše).

1.6 Chemické složení povrchu materiálu

Některé studie se zabývaly myšlenkou, zda-li mají na chování buněk větší vliv drsnost a topografie nebo chemismus povrchu. Webster *et al.* (1999) ve své práci uvedli, že vzrůst počáteční adheze potkaních kalvariálních osteoblastů kultivovaných na nanodrsných površích z oxidu hliníku a oxidu titaničitého byl nezávislý na chemickém složení materiálů. Tento vzrůst byl závislý pouze na optimální povrchové topografii v rozměrech nanometrů. K obdobnému závěru dospěli ve své pozdější práci Webster a Ejiofor (2004), když testovali lidské nízcé pasážované osteoblasty na kovech s povrchem v nanometrických rozměrech (Ti, Ti6Al4V a CoCrMo).

Avšak tyto výsledky jsme v našich pokusech s buňkami MG 63 kultivovanými na TiO₂ filmech (ve formě anatasu) a na mikroskopických sklech nepotvrdili. Buňky byly lépe rozprostřeny a lépe rostly na TiO₂ povrchu než na skle o stejné drsnosti (Vandrovcová *et al.* 2010). Podobných výsledků bylo dosaženo i v pokusu, při kterém byly pokryty silikonové substráty vrstvou TiO₂ ve formě anatasu, rutilu a v amorfni podobě. Test byl proveden pomocí primokultur potkaních kalvariálních osteoblastů (He *et al.* 2008). Přestože všechny tři filmy TiO₂ měly stejnou drsnost a topografii, největší rozprostření buněk (měřeno 8 hodin po nasazení) bylo na anatasu. Nejvyšších počtů buněk po 36 a 72 hodinách bylo dosaženo také na anatasu. A navíc, po 7. a 14. dnu od nasazení buňky na anatasu vykazovaly nejvyšší aktivitu alkalické fosfatázy, což je důležitý marker osteogenní diferenciace (He *et al.* 2008). Stimulační účinek anatasu na osídlení povrchu buňkami a jejich fenotypové vyzrávání je připisován faktu, že je povrch anatasu mnohem hydrofilnější (kontaktní úhel cca 60°), než je rutil nebo amorfni TiO₂ (kontaktní úhel cca 90°, He *et al.* 2008). Toto vysvětlení bylo později podpořeno prací kolektivu Sawase *et al.* (2008), ve které autoři popisují, že po dalším zvýšení smáčivosti anatasu ozářením povrchu UV světlem (před osazením buňkami či implantací do králičí tibie) se dále zvýšilo rozprostření buněk v testech *in vitro*, a rovněž v pokusech *in vivo* se zvýšil přírůstek kostní tkáně na povrchu materiálu. Lze tedy shrnout, že pozitivní účinek nanostrukturovaného povrchu na růst buněk může být ještě dále zvýšen, pokud se zvýší smáčivost povrchu - tj. smáčivost a nanostruktura materiálu projevují synergické účinky. Dojde pak k naadsorbování proteinů extracelulární matrix, které se účastní adheze buněk, ve vhodné prostorové konformaci, kdy specifické sekvence aminokyselin, které slouží jako ligandy pro buněčné receptory, jsou těmto receptorům dobře dostupné (Bačáková *et al.* 2004, 2011, Bačáková a Švorčík 2008).

1.7 Nové tenké bioaktivní povrchové vrstvy

Fyzikální a chemické vlastnosti povrchu materiálu lze modifikovat i nanášením jiných materiálů (atomů, molekul, částic). Molekuly mohou být nanášeny v kontinuální vrstvě nebo tak, aby měla výsledná vrstva určitou strukturu, tj. vzor. Pro úpravu povrchu materiálu lze použít řadu organických i anorganických sloučenin. Jsou to například celé molekuly extracelulární matrix, oligopeptidy, které se účastní adheze (ligandy pro adhezní receptory buněk), fibrin, keramické vrstvy, nejčastěji zastoupené hydroxyapatitem či fosforečnanem vápenatým (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2007a, Bačáková a Švorčík 2008, Filová *et al.* 2009b, Vagaská *et al.* 2010). Naše pracoviště se poslední dobou intenzivně zabývá studiem vlivu vrstev vyrobených z uhlíkových nanočástic na adhezi, růst, životaschopnost,

metabolickou aktivitu a osteogenní diferenciaci buněk. Jde především o fullereny, nanotuby a nanokrystalické diamanty. Při pokusech se nám potvrdilo, že z hlediska modifikace kostních náhrad jsou tyto materiály perspektivní (Bačáková *et al.* 2007b, Grausová *et al.* 2008a,b, 2009a,b, Vandrovcová *et al.* 2008; pro přehled viz Bačáková *et al.* 2008).

1.7.1 Fullereny

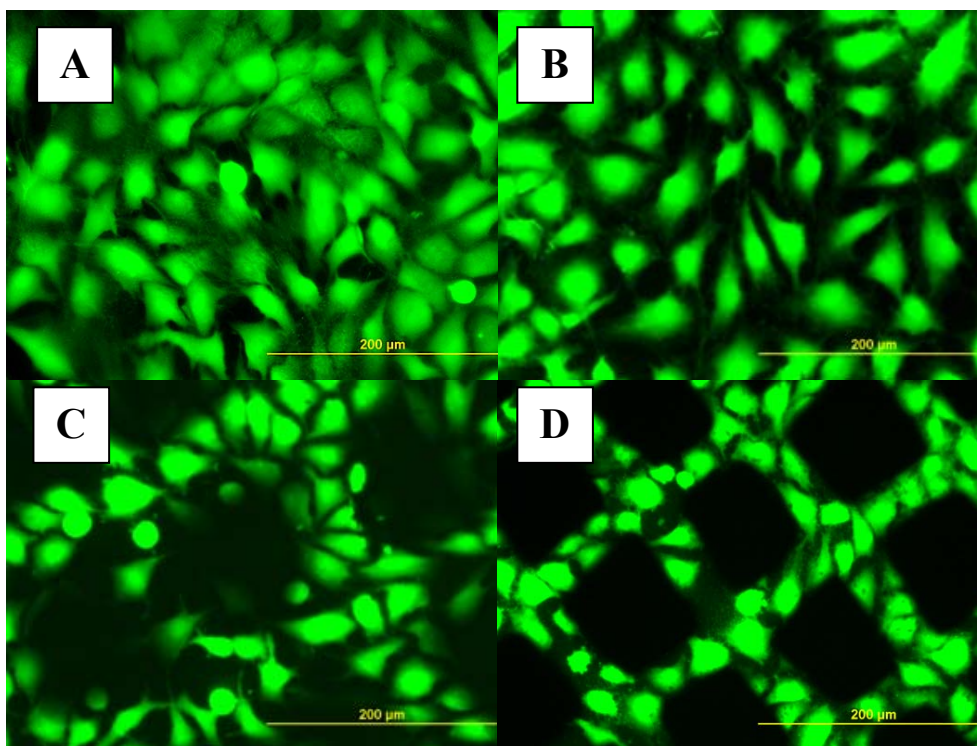
Fullereny jsou sférické molekuly tvořené atomy uhlíku (např. C₆₀, C₇₀). Tento allotrop uhlíku objevil Kroto *et al.* (1985). Tvar fullerenu se dá přirovnat k dutému kulovitému útvaru, podobajícímu se klatrinovým vesikulám, jež využívají buňky při endocytóze, tj. transportu látek do intracelulárního prostoru. To inspirovalo vědce k myšlence, že by se fullereny daly využít pro cílenou dodávku léčiv do buněk nebo dokonce pro přípravu umělých buněčných organel (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2008). Fullereny byly pojmenovány po slavném architektovi Richardu Buckminsteru Fullerovi, protože svou strukturou připomínají tvar tzv. geodetických kopulí, tj. avantgardních staveb kulovitého tvaru, které Fuller projektoval. Fullereny se vyskytují v geologickém prostředí, ve městech (především v exhalacích) i ve vesmíru (Poreda a Becker, 2003). Lze je vyrobit pyrolýzou polycyklických aromatických uhlovodíků (Crowley *et al.* 1996).

Fullereny mají široké spektrum jedinečných fyzikálních a chemických vlastností, např. schopnost odolat vysokým teplotám a tlakům, vysokou reaktivitu s dalšími sloučeninami a schopnost pojmout jiné malé prvky, jako je např. helium. V čistém stavu jsou fullereny silně hydrofobní a ve vodě nerozpustné. Na druhé straně, a to díky jejich vysoké reaktivitě, je lze modifikovat do požadovaných vlastností. Mohou vytvářet komplexy s kovy, nukleovými kyselinami, syntetickými polymery či jinými uhlíkovými nanočásticemi (např. nanotubami). Mohou do nich být zavedeny různé chemické funkční skupiny, např. skupiny hydroxylové, aldehydové, karbonylové, karboxylové, esterové nebo aminové. To často změní rozpustnost fullerenu ve vodě a zvýší jejich vzájemnou interakci s biologickými systémy (Lin a Wu 1999, Fumelli *et al.* 2000, Podolskii *et al.* 2002, Nakamura a Isobe 2003, Kawase *et al.* 2003, Zhou *et al.* 2003, Yamawaki a Iwai 2003, Chen *et al.* 2004, Sayes *et al.* 2005, Dhawan *et al.* 2006, Isakovic *et al.* 2006). Potencionální využití fullerenu v technických odvětvích zahrnuje výrobu supravodičů, lubrikantů, optických zařízení, chemických senzorů, aditiv polymerů a polymerové elektroniky (např. organické transistory, Organic Field Effect Transistors, OFETS) (Wilson 2000, Kawase *et al.* 2003). Díky své vysoké reaktivitě mohou fullereny sloužit jako katalyzátory. Představují též vhodné prostředí pro uchovávání vodíku a užívají se jako prekurzory při výrobě diamantových filmů (Qin *et al.* 1998).

Od objevu fullerenu se předpokládalo, že by tyto allotropy uhlíku mohly mít využití v různých biomedicínských odvětvích. Avšak je třeba počítat s tím, že navzdory svému slibnému potenciálnímu využití mohou být tyto molekuly cytotoxické. Například po ozáření viditelným či ultrafialovým světlem fullereny štěpí molekuly kyslíku na vysoce reaktivní kyslíkové radikály, které mohou poškodit buněčnou membránu, ovlivňovat aktivitu enzymů i měnit strukturu samotné DNA. Tohoto účinku lze využít při cílené fotodynamické terapii nádorů či při léčbě infekcí způsobených viry a bakteriemi rezistentními k širokému spektru léků (Yamakoshi *et al.* 2003, Tang *et al.* 2007). Na druhé straně mohou fullereny pohlcovat volné radikály. Záleží však na řadě mnohdy dosud neprobádaných faktorů, který účinek u fullerenu převládne. Vychytávání volných radikálů je možné díky relativně velkému počtu dvojných vazeb, které mohou přitahovat volné radikály, a tímto způsobem potlačovat jejich škodlivý účinek. Proto se uvažuje o jejich použití nejen v medicíně, ale i v kosmetice, např. pro výrobu opalovacích krémů (Nakamura a Isobe, 2003). Další důležitou vlastností fullerenu je jejich schopnost emise fotoluminiscence. Lze je tedy použít pro pokročilé zobrazovací technologie (Yamakoshi *et al.* 2003). Dalším potenciálním využitím fullerenu v biomedicíně je konstrukce biosenzorů, např. pro detekci anabolických steroidů (Goyal *et al.* 2007; pro přehled viz Bačáková *et al.* 2008). Je zajímavé, že fullereny C₆₀ dokonce podporují chondrogenesi, a to pravděpodobně díky stimulačnímu působení těchto molekul na syntézu proteoglykanů (Tsuchiya *et al.* 1995). Některé deriváty fullerenu mají též afinitu ke kostní tkáni. Např. Gonzáles *et al.* (2002) zjistili, že některé deriváty fullerenu mohou ovlivnit mineralizaci kostní tkáně. Tito autoři zkoumali interakce mezi bisfosfonátovým derivátem fullerenu C₆₀(OH)₁₆AMBP (tj. 4,4-bisfosfono-2-(polyhydroxyl-1,2-dihydro-1,2-metanfulleren(60)-61-karboxamino)máselnou kyselinou) a hydroxyapatitem (HAp), který je důležitou anorganickou složkou kostní tkáně. Sloučenina C₆₀(OH)₁₆AMBP obsahovala silná vazebná místa pro HAp, což se projevovalo vychytáváním HAp z roztoku a jeho nižší dostupností při mineralizaci. Toto nové zjištění může být užitečné v radiační léčbě onemocnění kostí, a to tak, že fullereny obsahující radionuklid se mohou cíleně navázat do postiženého místa kosti, v důsledku čehož lze použít nižší a přesně zaměřenou dávku záření, a tím předejít poškození zdravé tkáně (Gonzáles *et al.* 2002).

Interakce buněk s fullereny byla ve většině případů studována s použitím fullerenu ve formě suspenzí, zejména v kultivačním médiu. Dosud je tak málo známo o potenciálním využití fullerenu ve formě vrstev nanosených na povrch materiálu, které by sloužily jako substráty pro adhezi a růst buněk. V našich studiích jsme prokázali, že fullereny je možno nanášet na povrch materiálu ve formě kontinuálních nanostrukturovaných vrstev o různé

tloušťce. Tloušťka vrstvy se dá řídit pomocí změny depoziční teploty a času. Rovněž lze vytvářet různé povrchové vzory pomocí kovových masek, přes které se fullereny nanášejí (obr. 3). Toho se využívá při výrobě materiálů, u kterých je potřeba, aby buňky selektivně rostly pouze v některých oblastech materiálu, případně aby rostly v určitém uspořádání - např. v tkáňovém inženýrství, při tzv. technikách „microarrays“ užívaných v proteomických či genomických analýzách a při konstrukci biosenzorů (Grausová *et al.* 2008a, 2009b; Vandrovcová *et al.* 2008). Molekuly fullerenu je možné kombinovat i s dalšími materiály, především s atomy Ti, Co nebo Ni, či vyrábět dvousložkové kompozity fulleren-kov, což jsou opět velmi slibné úpravy pro použití v biomedicině (Vandrovcová *et al.* 2008, Vacík *et al.* 2010; pro přehled viz Bačáková *et al.* 2008).



Obr. 3.: Lidské kostní buňky MG 63 po 7 denní kultivaci na fullerenních strukturovaných vrstvách s výškou nerovnosti 128 ± 8 nm (A), 238 ± 3 (B), 326 ± 5 nm (C) a 1043 ± 57 (D). Obarveno pomocí LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kitu. Mikrofotografie byly pořízeny mikroskopem Olympus IX 50, obj. 20 ×, opatřeným DP 70 digitální kamerou. Měřítka = 200 µm (Bačáková *et al.* 2008, Grausová *et al.* 2009b).

1.7.2 Uhlíkové nanotuby

Uhlíkové nanotuby jsou válcovité útvary, které jsou vytvořeny z uhlíkových atomů. Vyskytují se ve dvou základních formách: jednovrstevné nanotuby (single-wall carbon nanotubes, SWCNT; tvořené jednou válcovitou grafenovou vrstvou) a mnohovrstevné nanotuby (multi-wall carbon nanotubes, MWCNT; obsahující dvě nebo více koncentricky uspořádaných grafenových vrstev) (Iijima 1991, Dresselhaus *et al.* 1996). Za určitých podmínek mohou být i uhlíkové nanotuby cytotoxické. Stejně jako fullereny, i nanotuby mohou štěpit kyslíkové molekuly na volné radikály, které mohou následně vyvolat oxidativní stres, zánět, strukturální změny proteinů (především enzymů a molekul extracelulární matrix) a poškozovat buněčnou membránu. Mohou dokonce narušit i strukturu DNA (Cui *et al.* 2005, Davoren *et al.* 2007, Kisin *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007). Některé studie ovšem cytotoxický účinek nanotub zpochybňují (Chen *et al.* 2006, Dumortier *et al.* 2006, Zhu *et al.* 2006, Yehia *et al.* 2007). Tyto rozporuplné výsledky lze vysvětlit tím, že v každé z výše zmíněných studií byly použity nanotuby s odlišnými vlastnostmi, jako je např. velikost, čistota, funkcionalizace, rozpustnost ve vodě, tendence vytvářet aglomeráty (pro přehled viz Bačáková *et al.* 2008). Řada studií se ve své práci zaměřila na využití nanotub v tkáňovém inženýrství nervového či vaskulárního systému, především jako součástí scaffoldů, které podporují buněčnou kolonizaci a správnou funkci buněk (Mattson *et al.* 2000, MacDonald *et al.* 2005, Matsumoto *et al.* 2007). Přes veškeré negativní účinky jsou nanotuby považovány za slibný materiál pro tkáňové inženýrství. Tak například Abarrategi *et al.* (2008) testovali MWCNT jako součást kompozitního materiálu obsahujícího chitosan a lidský morfogenetický protein kostí (BMP-2). Zjistili, že nanotuby měly osteoinduktivní efekt na myší buněčnou linii myoblastů C2C12. Byl také popsán pozitivní účinek nanotub v kombinaci s HAp na rozprostření a fenotypické zrání lidských osteoblastů (Balani *et al.* 2007).

1.7.3 Nanokrystalický diamant

Nanokrystalické diamanty se staly předmětem zájmu zejména proto, že mají výborné vlastnosti, jako je např. nízký koeficient tření, chemická stabilita a zejména vysoká biokompatibilita (Elam 2004, Tjong a Chen 2004, Bačáková *et al.* 2007b, Amaral *et al.* 2008, Grausová *et al.* 2008a,b; 2009a,b). Na rozdíl od výše zmíněných forem uhlíkových molekul nejsou nanodiamanty cytotoxické (Aspenberg *et al.* 1996, Schrand *et al.* 2007) ani imunogenní (Tang *et al.* 1995, Nordsletten *et al.* 1996). Tyto vlastnosti umožňují použít nanokrystalické diamanty nejen v elektronice či optice, ale též v biologii a medicíně. Díky své tvrdosti se nanodiamantové filmy osvědčily jako povrchové úpravy hlavic a jamek umělých kloubních

náhrad (Papo *et al.* 2004). Tyto filmy podporují i adhezi, růst a diferenciaci kostních buněk (Bajaj *et al.* 2007, Amaral *et al.* 2008). Z toho vyplývá, že lze tyto filmy nanášet na části kloubních protéz nebo zubních implantátů kvůli jejich kvalitnějšímu ukotvení do přilehlé kostní tkáně. Lze je připravovat o různé velikosti krystalů i o různé tloušťce podle toho, pro jaký účel se budou používat (tab. 1).

Tab.1: Klasifikace krystalických diamantů podle Institutu Fraunhofer

<http://www.ist.fraunhofer.de/english/c-products/c-d/diacer.html>

Designation	Crystalline Diamond films				
Thin film/ thick film	thin film			thick film (free standing)	
Doping, additional elements	Undoped		doped	undoped	doped
Crystal size on growth side	1 to 500 nm, nano-crystalline	0.5 to 10 μm , micro-crystalline	0.1 to 5 μm	(5 μm to) 80 to 500 μm	80 to 500 μm
Predomina- ting C-C- bond type	sp^3	sp^3	sp^3	sp^3	sp^3
Designation	nano-crystalline CVD diamond film	micro- crystalline CVD diamond film	doped CVD diamond film	CVD diamond	doped CVD diamond

1.7.4 Diamantu podobný uhlík

Uhlík podobný diamantu (diamond-like carbon, DLC) může obsahovat buď pouze samotné atomy uhlíku (a-C), nebo směs atomů uhlíků a vodíků (a-C:H) (tab. 2). Někdy se mu říká též amorfní uhlík (Dearnaley a Arps, 2005).

Existuje 7 odlišných forem materiálů z amorfního uhlíku, které se odlišují množstvím vodíku (DLC bez vodíkových atomů či hydrogenovaný DLC s různým zastoupením vodíku), hybridizací atomových orbitalů (sp^2 nebo sp^3) nebo přítomností dalších přidaných atomů (jiných než uhlík) především kovů (W, Ti) nebo nekovů (Si, O, N, F, B).

Tab. 2: Klasifikace DLC podle Institutu Fraunhofer:

<http://www.ist.fraunhofer.de/english/c-products/c-d/diameco+.html>

Designation	Amorphous carbon films (diamond-like-carbon films / DLC)						
Thin film/ thick film	Thin film						
Doping, additional elements	hydrogen-free			Hydrogenated			
			modified			modified	
			with metal			with metal	with non-metal
Predomina- ting C-C- bond type	sp ²	sp ³	sp ²	sp ² or sp ³	sp ³	sp ²	sp ²
Designation	Hydrogen- free amorphous carbon film	Tetra- hedral hydrogen- free amorphous carbon film	Metal- containing hydrogen- free amorphous carbon film	Hydro- genated amorphous carbon film	Tetra- hedral hydro- genated amorphous carbon film	Metal- containing hydro- genated amorphous carbon film	Modified hydro- genated amorphous carbon film
Recommended abbreviation	a-C	ta-C	a-C:Me	a-C:H	ta-C:H	a-C:H:Me (Me = W, Ti, ...)	a-C:H:X (X = Si, O, N, F, B, ...)

DLC vykazuje některé specifické vlastnosti diamantu (např. tvrdost, chemická odolnost, dobré tribologické charakteristiky). DLC navíc nevyvolal zánětlivé odpovědi v testech *in vitro* ani nezpůsobil histopatologické změny v testech *in vivo* (Schroeder *et al.* 2000, Bruinink *et al.* 2005). DLC může být nanášen na ortopedické implantáty, aby se zabránilo uvolňování kovových iontů, podobně jako je očekáváno od vrstev nanokrystalických diamantů (Dearnaley 1993, Dowling *et al.* 1997). Většina materiálů založených na DLC, především ty, které obsahují pouze atomy uhlíku či uhlíku a vodíku (tab. 2), jsou bioinertní, tj. nepodporují buněčnou adhezi. Proto jsou vhodné na potahování nástrojů a implantátů, které jsou v kontaktu s krví, jako jsou např. chlopně nebo koronární stenty, aby nedocházelo ke vzniku trombů (Grill 2003). Nicméně v některých případech je nutné naopak adhezi buněk podpořit (např. pro lepší integraci kostní náhrady do okolní kostní tkáně). V těchto případech lze také využít DLC či podobné materiály (např. uhlovodíkové plasmové polymery), avšak je potřeba je modifikovat tak, aby se staly bioaktivní - například inkorporací atomů kovů, nejčastěji titanu (Bačáková *et al.* 2001, Grinevich *et al.* 2009).

Kompletní přehledná tabulka o formách uhlíku, klasifikovaných podle Fraunhoferova institutu, je uvedena na internetové stránce: www.ist.fraunhofer.de/english/c-products/tab/complete.html

1.8 Angiogenese během regenerace poškozených kostí

Jak již bylo uvedeno výše, kosti jako komplexní orgány jsou složeny nejen z osteoblastů a osteoklastů, ale též z proteinů a anorganických složek extracelulární matrix a dalších buněk mezenchymálního původu, jako jsou např. kmenové buňky a cévní buňky. Při léčbě komplikovaných zlomenin je důležité zajistit alespoň základní přísun krve do postiženého místa. Tvorba otoků a hematomů může mít za následek nedostatečné prokrvení, což hojení ještě více ztěžuje. Buňky mohou být postiženy hypoxií díky nedostatečnému přísunu kyslíku, dále se mohou v postižené tkáni hromadit odpadní produkty metabolismu a v neposlední řadě může dojít k rozvoji infekce kvůli nepřítomnosti bílých krvinek při přerušení krevního oběhu v kosti. Z toho vyplývá, že základním předpokladem pro správné hojení rány je zajistit dostatečné prokrvení, které s sebou přináší přísun živin nezbytných pro obnovu kostí (např. růstové faktory, vitamin D, parathormon) a odvod nežádoucích produktů metabolismu. V některých případech, kdy je výrazně poničena i okolní měkká tkáň, je jediným vhodným způsobem léčby tzv. metoda volného laloku, tj. mikrochirurgický přenos tkáně z nepostiženého místa do místa zranění (Hankenson *et al.* 2011).

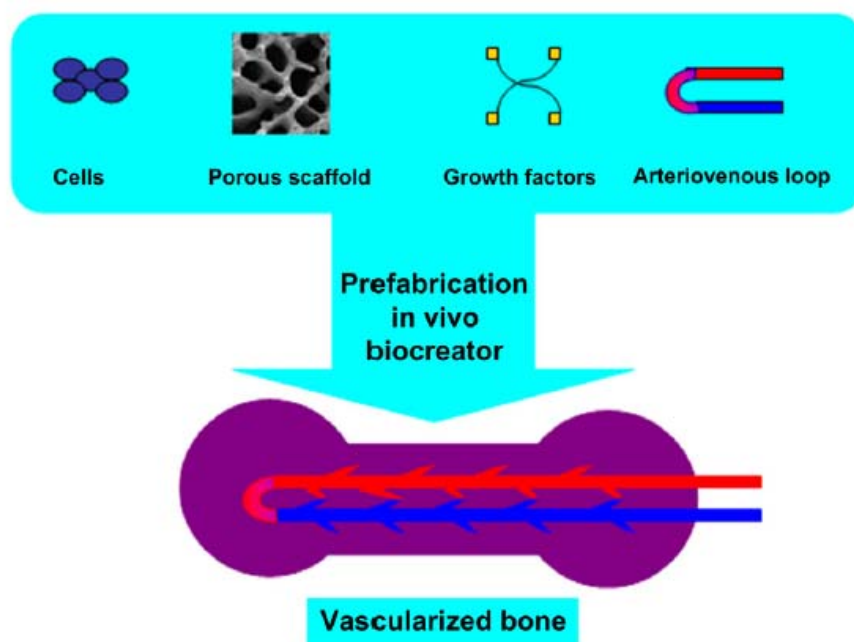
V dospělosti vznikají nové cévy dvěma různými způsoby: angiogenesí a vaskulogenesí (Cassell *et al.* 2002). Při angiogenesi se vytvářejí nové cévy tím, že vyrůstají z již existujících cév. Vaskulogenese je proces, ve kterém se cévy formují buď diferenciací lokálních endotelových progenitorových buněk nebo častěji z cirkulujících endotelových progenitorových buněk. Proces angiogenese je však v dospělosti běžnější, zatímco vaskulogenese má své místo především v embryonálním vývoji (Tepper *et al.* 2005).

Pro vznik nových cév je důležité, aby byly buňky v kontaktu se signálními molekulami - angiogenními růstovými faktory, především s vaskulárním endotelovým růstovým faktorem (VEGF - vascular endothelial growth factor; Cassell *et al.* 2002). VEGF nejen podporuje růst a diferenciaci endotelových buněk, ale stimuluje též tvorbu tubulárních útvarů a mobilizaci a vychytávání endotelových progenitorových buněk (Asahara *et al.* 1999, Ferrara 1999).

V neposlední řadě je pro vznik nových cév důležitá nejen přítomnost signálních molekul, ale i přítomnost určitých typů buněk. Unger *et al.* (2010) ve své práci dokázali, že pokud byly materiály před implantací osazeny kombinací endotelových buněk (human dermal microcapillary endothelial cells, HDMEC) a primokultur osteoblastů (primary human osteoblast cells, HOS), tato kokultivace stimulovala buňky k samovolné tvorbě cév na materiálu a zároveň podpořila růst a rychlý vrůst kapilár organismu do implantovaného

materiálu. Pokud autoři voperovali scaffold osazený pouze endotelovými buňkami nebo prostý scaffold bez buněk, výsledky nedosahovaly kvality ko-kultivace.

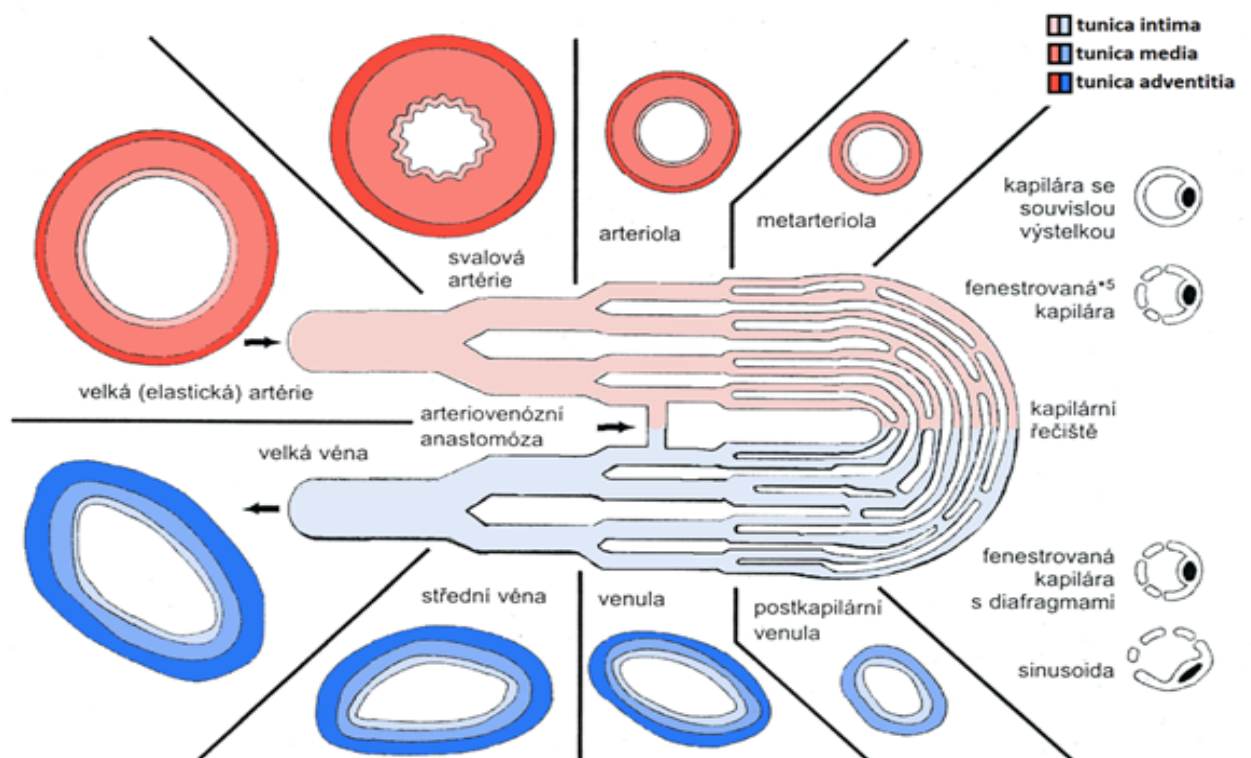
Tkáňové inženýrství je již schopné napravit malé až středně velké kostní defekty, avšak stále není schopno dosáhnout regenerace rozsáhlých defektů tkáně, především pokud je postižené místo zasaženo infekcí (Vacanti *et al.* 2001). Jednou z možností, jak překonat tyto problémy, je zkonstruovat velký úsek vaskularizované kostní tkáně, která bude v organismu dlouhodobě životaschopná a bude se správně integrovat do přilehlé tkáně. Je prokázáno, že vhodným způsobem pro konstrukci takovéto náhrady je vytvořit dlouhou kost v bioreaktoru *in vivo*, jejíž vaskularizace je zajištěna pomocí arteriovenózní smyčky (arteriovenous loop model). Po implantaci arteriovenózní smyčky dochází k výrazné novotvorbě cév. Implantace je indikována ve třech případech: místní zánět cév vzniklý po chirurgickém zákroku, hypoxie matrix a nebo při namáhání žilní stěny v důsledku její arterializace. Z pohledu tkáňového inženýrství se kostní náhrada připraví kombinací buněk, pevného scaffoldu, růstových faktorů a arteriovenózní smyčky, vloží se do organismu, kde se nechá po krátkou dobu, aby došlo k vaskularizaci v tzv. bioreaktoru *in vivo* (obr. 4; Ren *et al.* 2008).



Obr. 4.: Způsob přípravy axiálně vaskularizované tkáně pro konstrukci kostí za použití buněk, pevného porézního scaffoldu, růstových faktorů a arteriovenózní smyčky v bioreaktoru *in vivo* (Ren *et al.* 2008).

1.9 Cévní poškození a cévní náhrady

Poškození nebo stenózy cév v důsledku zranění či patologických procesů, jako je ateroskleróza a trombóza, se musí často řešit nahrazením cévy autologním transplantátem, obvykle žilním. Průchodnost autologního transplantátu se po 4 letech pohybuje mezi 40 a 70% (Taylor *et al.* 1990, Conklin *et al.* 2002). Autologní náhrady se užívají převážně pro nahrazení cév s malým průsvitem (Kannan *et al.* 2005). Problémem je, že mají žíly jinou histologickou strukturu než artérie (obr. 5).



Obr. 5.: Zjednodušené schéma cév krevního cévního systému včetně porovnání příčných průřezů různých typů cév (Paulsen 2004) .

Navíc bývá často vrstva endotelových buněk v cévní náhradě poškozena během operace. Nová vrstva endotelových buněk se vytvoří až za několik týdnů. Ve zdravé cévě mají endotelové buňky řadu vlastností: regulují trombózu, vazomotorický tonus, proliferaci a migraci hladkých svalových buněk, pronikání lipidů do média, adhezi, transmigraci a transformaci leukocytů (Nugent a Edelman 2001). Poškozená intima autologního transplantátu pak vystavuje původně venózní hladké svalové buňky (HSB) přímého působení HSB. Následuje pak agregace destiček a uvolňování růstových faktorů a faktorů

podporujících migraci buněk, jako jsou např. růstový faktor destiček (PDGF), interleukin-1 (IL-1), růstový faktor fibroblastů-2 (FGF-2), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), růstový faktor podobný insulinu 1 (IGF-1) a vazoaktivních aminů, např. serotoninu a tromboxanu A₂ (Topol a Serruys 1998, Liuzzo *et al.* 2005). V neposlední řadě je véna na arteriální pozici vystavena daleko vyššímu tlaku krve a mechanickému namáhání, než na jaké je adaptována. Všechny tyto faktory v konečném důsledku stimulují migraci HSB do intimy, jejich nadměrnou proliferační aktivitu a produkci extracelulární matrix, zejména kolagenu, což vede ke ztlustění stěny bypassu a stenóze či i úplnému uzavření jeho průsvitu (Liuzzo *et al.* 2005). Migraci, proliferaci a syntetické aktivitě HSB předchází jejich fenotypická modulace z tzv. kontraktilního do syntetického fenotypu, který je charakterizován úbytkem kontraktilních filament, nárůstem množství organel souvisejících s proteosyntézou, jako je např. endoplasmatické retikulum, ribosomy či Golgiho komplex, a již zmíněnou aktivací migrace a proliferace buněk. Naproti tomu diferencované HSB kontraktilního fenotypu se specializují na kontraktilní funkci a prakticky nemigují a neproliferují (Newby a Zaltsman 2000). V aortě zdravého dospělého potkana pouze 1 buňka z 10 000 HSB syntetizovala DNA (Rorive *et al.* 1980).

Aby se předešlo remodelaci autologního štěpu, je nutné podpořit proces jeho endotelizace a snížit proliferaci HSB. Nejjednodušší prevencí nadměrné proliferace HSB je zcela vyloučit tyto buňky z cévních náhrad, o což se snaží výrobci cévních protéz ze syntetických polymerů používaných v současné klinické praxi. Na protézách bývá nanejvýš rekonstruována endotelová vrstva (Bordenave *et al.* 2005). Přesto by mělo být bráno v potaz, že přítomnost HSB i dalších buněčných složek cévní stěny (např. složek tunica adventicia) v cévních náhradách je zcela přirozená. Začlenění HSB do bioarteficiálních náhrad krevních cév a dosažení jejich klidového diferencovaného kontraktilního fenotypu je hlavním úkolem pokročilého tkáňového inženýrství cévní stěny.

Další z možností, jak omezit proliferaci HSB v autologních i umělých cévních náhradách je cílená dodávka antiproliferativních léčiv do těchto náhrad, např. pomocí stentů. Stenty, které zároveň uvolňují léky, byly jako první lokální antiproliferační systémy dodávající léčiva (tzv. drug-delivery systems) použity v intervenční kardiologii. Komerčně dostupné stenty (např. BX Velocity™, Cypher™, Cordis, Johnson & Johnson) a také nově vyvíjené stenty uvolňující sirolimus či paclitaxel z polymerního filmu skutečně snižují tvorbu neointimy v cévách (Mehilli *et al.* 2008). V randomizované studii zahrnující 238 pacientů a 19 léčebných center se objem hyperplastické neointimy koronárních arterií, vyjádřený v procentech objemu stentu, po jednom roce léčby snížil z původních 20 - 30% na 1 - 3%

(Morice *et al.* 2002). Použití stentů je však limitováno jejich relativně komplikovaným zaváděním, nebezpečím jejich uvolnění a pohybu uvnitř cévy, zvýšeným mechanickým namáháním cévní stěny i lokálním poškozením endotelu a buněk hladkého svalstva, což může vést k reaktivaci růstu HSB a restenóze cévy či iniciovat trombózu (Colombo a Iakovou 2004). Poškozená cévní náhrada se pak znovu endotelizuje až po několika týdnech. I polymerní filmy, ze kterých se léčivo uvolňuje, umístěné v luminárním povrchu cévy, mohou mít neblahé účinky na endotelizaci cév. Proto se zdá být vhodnější využít systémy dodávky léčiva mimo cévu - periadventiciální nebo perivaskulární filmy, gely či pružné manžety.

Materiál pro výrobu externích stentů musí mít potřebné mechanické vlastnosti, které umožní ovinutí kolem cévy. Další z důležitých vlastností je jeho pružnost, aby se mohl přizpůsobovat kontrakční a relaxační funkci cévy. Přitom však je výhodné, když je zevní „obal“ cévní stěny dostatečně pevný, aby zabránil nadměrné dilataci venózního štěpu, náhle vystavenému zvýšenému mechanickému namáhání po zavedení do tepenného řečiště. Tato dilatace byla pozorována v klinické praxi i v experimentu, a je proto žádoucí, aby perivaskulární systém pro dodávku léčiv poskytoval cévě i určitou mechanickou oporu (Filová *et al.* 2011).

Materiál pro přípravu externích systémů pro dodávku léčiv do cévní stěny je obvykle polymerní. Obvykle jsou zvoleny polylaktidy, poly(ϵ -kaprolakton) (PLC) či jejich kopolymery - oba jsou totiž biokompatibilní a schválené organizací FDA (Správa potravin a léčiv, Food and Drug Administration) k zavedení do organismu. Během degradace polymeru, který obsahuje léčivo, se toto léčivo postupně uvolňuje. Degradace je obvykle hydrolytická, tj. neúčastní se jí buňky, a polymer je tedy spontánně z těla pacienta odstraněn. Kinetika degradace polymeru a uvolňování léčiva by měla být přizpůsobena době nezbytné pro regeneraci vrstvy endotelových buněk poškozených během operace (nejméně však několik týdnů). Z tohoto hlediska se zdá být nejvhodnější polyethylenglykol-Cys-NO hydrogel, který je naplněn S-nitrosothioly (prekurzory oxidu dusnatého). Pokud je hydrogel aplikován perivaskulárně, může uvolňovat NO až 50 dní, a tedy inhibovat proliferaci HSB a naopak podporovat růst endotelových buněk (Lipke a West 2005).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo připravit takové modifikace povrchu materiálů, které by sloužily k lepšímu zakotvení implantátů do kostní tkáně. Velmi slibnými úpravami je nanášení uhlíkatých vrstev na materiál, jehož mechanické vlastnosti umožňují inkorporaci do kosti. Jak bylo zmíněno v úvodu, mezi tyto vrstvy patří například uhlík podobný diamantu, vrstvy nanokrystalického diamantu či uhlovodíkové plasmové polymery. Mezi nejnovější potenciální povrchy biomateriálů, o nichž je relativně málo známo a jež by bylo zajímavé otestovat, patří fullereny (C_{60}). Lze testovat chování buněk buď na kontinuálních vrstvách, na vrstvách s určitým vzorem, či na vrstvách C_{60} obohacených o jiné prvky (např. titan, který je obecně užíván pro ortopedické účely a je znám tím, že podporuje růst buněk; viz dále odstavce 2.1 a 2.2). Jiným typem vrstev jsou biodegradabilní vrstvy organických polymerů (např. PLGA), které se během regenerace rozkládají na běžné a netoxické produkty metabolismu. I tento povrch lze modifikovat tak, aby byl buňkami lépe přijat, a to např. tím, že se bude podobat přirozené extracelulární matrix. Toho může být dosaženo tím, že se vrstva PLGA potáhne kolagenem (což je hlavní organická složka extracelulární matrix kostní tkáně). Povrch materiálu je pak buňkami rozpoznán jako vhodný substrát pro adhezi, a jakmile začnou buňky po nasazení aktivně metabolizovat, je polymer postupně odstraňován a nahrazován extracelulární matrixí produkovanou buňkami. Tím lze předcházet potenciální imunitní reakci organismu na cizorodý prvek (obvykle kov) a vytvoření fibrózní kapsuly kolem implantátu (2.3). Vzhledem k tomu, že se kostní tkáň neskládá pouze z osteoblastů, ale i z dalších buněk mezenchymálního původu (např. kmenové buňky kostní dřeně a cévní buňky), je nutné při implantaci zohlednit i tyto složky. Velmi důležité je mimo jiné zajistit koloběh živin prostřednictvím vaskularizace kosti. Zajímavý způsob, jak lze tento proces vylepšit, je vytvořit umělou cévu, která bude navíc uvolňovat látky regulující adhezi a růst buněk, či zabránit vzniku infekce (např. růstové faktory či naopak antiproliferativní látky, antibiotika apod.) (2.4).

2.1. Prvním cílem této práce bylo otestovat vliv tenké vrstvy fullerenu C_{60} na adhezi kostních buněk (human osteoblast-like MG 63 cells), jejich počáteční rozproštění, formování cytoskeletárního proteinu aktinu, jejich růst a životaschopnost. Jak již bylo připomenuto v úvodu této práce, nanostrukturovaný povrch podporuje selektivně adhezi a růst osteoblastů před jinými buněčnými typy (včetně fibroblastů), což může eliminovat vznik fibrózního zapouzdření a uvolnění kostního implantátu. Další novou modifikací je v této práci obohacení C_{60} o kovové ionty. Z hlediska biokompatibility je zajímavý titan, který se běžně používá ke

konstrukci kostních a kloubních náhrad. Navíc přítomnost kovu ve vrstvách fullerenu a obecně dalších uhlíkových allotropů může tyto vrstvy zpevnit a zvýšit jejich odolnost k odlupování od podložky a k mechanickému namáhání. V této práci jsme se zaměřili na porovnání vlivu jak vrstev samotných fullerenu C_{60} , tak vrstev binárních kompozitů C_{60}/Ti , které byly deponovány buď jako kontinuální vrstva nebo přes kovovou mřížku, abychom zjistili, zda může vytvoření vzoru navodit regionálně selektivní adhezi a růst buněk. Vzory byly i dále ozařovány zlatými ionty, což vedlo ke změně C_{60} na jinou alotropickou modifikaci, tj. amorfní uhlík (a-C). I tyto vzorky byly otestovány s kostními MG 63 buňkami (Vandrovcová *et al.* 2008).

2.2. Cílem druhého pokusu bylo otestovat adhezi a růst kostních buněk na vybraných typech fullerenových površích (kontinuálních vrstvách i vrstvách se vzorem) o různé tloušťce nanášené vrstvy. Vrstvy se vzorem se vyznačovaly různou výškou nerovností na svém povrchu a byly užity ke sledování vlivu této výšky na distribuci buněk na povrchu materiálu (Grausová *et al.* 2009b).

2.3. PLGA se běžně používá ke konstrukci scaffoldů v kostním tkáňovém inženýrství. Jeho vlastnosti lze vylepšit potahováním proteiny extracelulární matrix, které umožní navázání buněk pomocí integrinových i neintegrinových adhezních receptorů. V této části práce jsme se zaměřili na sledování vlivu PLGA s vrstvou kolagenu, chondroitin sulfátu či jejich kombinací na adhezi, růst a diferenciaci kostních buněk (Vandrovcová *et al.* 2011).

2.4. Sirolimus, známý též pod názvem rapamycin, je antiproliferační léčivo, které je možné využít k tomu, aby se u implantovaných cév předcházelo hyperplázii HSB a restenóze. Cílem této práce bylo vyvinout periadventiciální systém s řízeným uvolňováním léčiva ("drug-delivery system"), který by se skládal z polyesterové hedvábné sítěky potažené degradabilním kopolymerem, jež by byl napuštěn postupně se uvolňujícím sirolimem. Polyesterová mřížka dodá konstruktu mechanickou stabilitu, usnadní a urychlí ovnutí systému kolem cévního štěpu a zamezí uvolnění systému z periadventiciálního prostoru. Testovali jsme uvolňování sirolimu do vodního a bezvodého prostředí a jeho antiproliferační vliv na hladké svalové buňky izolované z aorty potkana (Filová *et al.* 2011).

3. MATERIÁL A METODY

Tato disertační práce je mezioborovou prací, která zahrnuje přípravu vzorků, otestování jejich fyzikálně chemických vlastností a samotné biologické testy *in vitro*. To vysvětluje fakt, že je práce založena na spolupráci mezi obory přírodních věd jako je chemie, fyzika a biologie. Tuto disertační práci píši na základě 4 publikací, které vyšly nebo vyjdou v impaktovaných časopisech, jejichž jsem buď první autorkou či spoluautorkou. Materiál a metody zde popisují pouze ve zkrácené verzi. Podrobnější popis je v připojených publikacích.

3.1 Příprava a charakterizace fullerenních vrstev

Fullerenní vrstvy byly vyrobeny a charakterizovány ve spolupráci s Mgr. Jiřím Vacíkem, CSc. a jeho kolegy z Ústavu jaderné fyziky (AV ČR), s RNDr. Vladimírem Vorlíčkem, CSc. z Fyzikálního ústavu (AV ČR), s Prof. Ing. Václavem Švorčíkem, DrSc. a jeho kolegy z Ústavu inženýrství pevných látek (VŠCHT, Fakulta chemické technologie), a s RNDr. Petrou Bílkovou, Ph.D. z Ústavu fyziky plazmatu (AV ČR).

Fullereny C_{60} (v čistotě 99.5%, SES Research, USA) byly deponovány na mikroskopická krycí sklíčka (Menzel Glaser, Německo; průměr 12 mm) evaporací C_{60} ve vakuovém systému (Leybold, Německo) za následujících podmínek: substrát o pokojové teplotě, C_{60} depoziční rychlost $\leq 10 \text{ \AA/s}$, teplota evaporace C_{60} v Knudsenově komůrce cca 450°C , doba depozice do 50 minut. Tloušťka vrstvy se měnila v závislosti na době depozice. Vzory na vrstvách byly vytvořeny pomocí kovové mřížky s obdélníkovými otvory o velikosti cca $128 \times 98 \text{ \mu m}$ (cca $12\,500 \text{ \mu m}^2$). Hybridní sloučeniny C_{60}/Ti byly vytvářeny podobným způsobem - spoludepozicí C_{60} a Ti v poměru 1:1 (tj. 1 molekula C_{60} na 1 molekulu Ti). Část připravených vzorků byla ozařována ionty zlata za vzniku a-C a Ti/a-C vrstev (ionty Au^+ o energii 1635 keV a toku prošlých iontů $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$). Ozáření bylo provedeno v urychlovači Tandetron 4130 MC. Dle simulace v programu SRIM mohly ionty zlata proniknout do vrstvy fullerenů až do hloubky 430 nm a do vrstvy kompozitů C_{60}/Ti do hloubky 30 nm. Lze tedy předpokládat, že vrchní vrstvy fullerenů se přeměnily na vrstvu amorfního uhlíku. Pod touto vrstvou se mohou vyskytovat nemodifikované molekuly fullerenů.

Ramanova spektra nanášených filmů byla měřena na mikroskopu Ramascope 1000 (Renishaw, UK), vybaveným Ar-ion laserem s excitační vlnovou délkou 514.5 nm. Ramanova spektra vypovídají o chemickém složení vrstev včetně rozlišení různých allotropů uhlíku v těchto vrstvách. Tloušťka C_{60} vrstvy byla měřena mikroskopem atomárních sil (atomic force microscopy, AFM, Digital Instruments CP II Veeco, USA). Dále byla pomocí AFM měřena

topografie povrchu a drsnost RMS (efektivní hodnota drsnosti, "root mean square roughness"; kvadratický průměr užívaný všude tam, kde hodnoty dosahují pozitivních i negativních hodnot – tedy i v případě nerovností na povrchu materiálu, které obvykle mají podobu výstupků i prohlubní). Morfologie povrchu byla hodnocena i pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu ("scanning electron microscopy", SEM) a konvenčního optického mikroskopu. Smáčivost byla hodnocena měřením kontaktního úhlu statickou metodou "sedící vodní kapky" na rozhraní materiál-voda pomocí reflexního goniometru (SEE System, Masarykova Universita, Brno, ČR).

Metodika je podrobněji rozvedena ve studiích Vandrovcová *et al.* 2008, Grausová *et al.* 2009.

3.2 Příprava a charakterizace PLGA filmu

PLGA scaffoldy byly připraveny ve spolupráci s Universitou v Kielu (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Německo) pod vedením Dr. Timothy Douglase. Pro výrobu scaffoldů byl použit kopolymer L-laktidu a glykolidu v poměru 85:15 (PURAC Biochem BV, 4206 AC Gorinchem, Holandsko) a to technikou odlévání z roztoku ("solvent casting technique") vyvinutou autory Pamula a Menaszek (2008). Podrobnější informace jsou uvedeny ve studii Vandrovcová *et al.* 2011.

3.3 HPLC analýza chondroitin sulfátu

Chondroitin sulfát A, známý také jako chondroitin-4-sulfát (CS), byl analyzován pomocí HPLC (kapalinová chromatografie) metodou dle autorů Viola *et al.* 2006. Bylo zjištěno, že hmotnostní procento kyseliny iduronové v CS bylo 34.9% a že disacharidy byly sulfonovány ve 48.7% na pozici C4, ve 44.4% na pozici C2 a v 6.9% na pozici CS. Více viz Vandrovcová *et al.* 2011.

3.4 Příprava kolagenních vláken bez a s chondroitin sulfátem a jejich nanášení na PLGA scaffold

Příprava vláken a jejich nanášení na PLGA scaffold byla založena na metodách dle autorů Bierbaum *et al.* 2006 a Douglas *et al.* 2007. Třetina vzorků PLGA byla ponořena do roztoku kolagenu I. Druhá třetina vzorků PLGA byla ponořena do roztoku, který obsahoval směs kolagenu I a chondroitin sulfátu. Poslední třetina vzorků PLGA zůstala nepotažena. Vrstvy byly následně biochemicky a mikroskopicky analyzovány. Byla stanovena koncentrace kolagenu I v roztoku a výsledné množství naadsorbované na PLGA pomocí

metody barvení saturnovou červení. Stanovení CS bylo provedeno zkouškou s dimethyl methylenovou modří. Povrchová morfologie PLGA vrstev s naneseným kolagenem a směsí kolagenu a CS byla pozorována pomocí rastrovacího elektronického mikroskopu s autoemisní tryskou po naprašování zlatem ("Field Emission Scanning Electron Microscopy" (FE-SEM 6330). Podrobnější informace jsou viz ve studii Vandrovcová *et al.* 2011.

3.5 Příprava polyesterové síťky pro uvolňování sirolimu a testovaných roztoků

Polyesterová síťka (CHS 50, PES Mesh) byla získána ve spolupráci s podnikem VÚP a.s., Brno, ČR. Purasorb PLC 7015, tedy kopolymer kyseliny L-mléčné a ϵ -kaprolaktonu (molární poměr 70/30), byl zakoupen od firmy PURAC Biomaterials, a sirolimus (Rapamycin ze Streptomycet) od firmy Sigma-Aldrich, Německo (katalogové číslo R0395). Polyesterová síťka byla vyrobena z příze o průměru 90 μm , která se skládá z vláken o průměru 17,5 μm . Purasorb při potahování pronikl mezi vlákna v přízi.

Čistá polyesterová síťka byla použita bez impregnace, nebo byla následně impregnována. Získali jsme tak tyto vzorky: **Síťka 1** = impregnována roztokem č. 1 s rozpuštěným purasorbem a sirolimem (36.4 mg purasorbu a 5.2 mg sirolimu v 1 ml směsi chlorbenzen-ethanol; 1.75 : 1 v/v), **síťka 2** = impregnována roztokem č. 2 s rozpuštěným purasorbem a sirolimem (36.4 mg purasorbu a 10.4 mg sirolimu v 1 ml směsi chlorbenzen-ethanol; 1.75 : 1 v/v) a následným překrytím roztokem č. 3 (36.4 mg purasorbu v 1 ml směsi chlorbenzen-ethanol; 1.75 : 1 v/v), a **síťka purasorb** = polyesterová síťka impregnována pouze purasorbem (roztokem č. 3).

Uvolňování sirolimu bylo měřeno z připravených kousků síťky o velikosti 0.5 cm^2 nebo 1 cm^2 , které byly inkubovány v 5 ml fyziologického roztoku pufovaného fosfáty (PBS) na cm^2 síťky při 37°C na třepače. PBS byl denně měněn, a vzorky byly odebírány po 0, 1, 4, 7, 9, 11, 14, 17, 21, 28, 35 a 42 dnech inkubace. Pro každý časový interval a každou skupinu jsme použili 3 - 8 vzorků.

Byla hodnocena stabilita sirolimu v různých rozpouštědlech (PBS, methanol, dichlormethan), o různých koncentracích (12,5; 50 a 750 ng/ml), za různých teplot (37°C, 25°C, -20°C a -75°C) a po různou dobu (od 5 minut do 3 měsíců) pomocí Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC).

Extrakce sirolimu byla provedena po vysušení sítěk, kdy byl polymer se sirolimem rozpuštěn v dichlormethanu, rozpouštědlo bylo následně odpařeno do sucha. Sirolimus byl rozpuštěn v 1 ml metanolu, centrifugován 5 min při 13 000 rpm a supernatant byl ihned analyzován pomocí systému Acquity UHPLC vybaveného detektorem 2966 PDA.

Podrobnější informace jsou uvedeny v příložené publikaci (Filová *et al.* 2011).

3.6 Typy použitých buněk a kultivační podmínky

Veškeré biologické analýzy, jako jsou měření adheze, růstu a životaschopnosti buněk a hodnocení molekulárních markerů diferenciací pomocí imunofluorescenčního barvení a enzymové imunanalýzy (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), včetně kultivace buněk, byly provedeny ve Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR.

V testech sledujících vliv materiálů na růst a diferenciaci kostních buněk byla použita linie lidských buněk z osteosarkomu MG 63 (Human Osteoblast-Like MG 63 Cells, z Evropské sbírky buněčných kultur - European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). Buňky byly v jednotlivých pokusech na materiál nasazeny v koncentracích mezi 3000 buněk/cm² a 17000 buněk/cm² v adekvátním objemu média v závislosti na velikosti kultivačních misek. Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM, Sigma USA, #D5648) obohacené o 10% fetální bovinní sérum (FBS, Sebak GmbH, Aidenbach, Německo) a gentamicin (40µg/ml, LEK, Ljubljana, Slovinsko). Sledované parametry byly odečítány v časových intervalech 1, 3, (5) a 7 dní po nasazení. Pro každou experimentální skupinu a každý časový interval byly použity tři vzorky.

V pokusech zaměřených na uvolňování sirolimu z cévních náhrad byly použity hladké svalové buňky (HSB) získané explantační metodou z komplexu intima-media hrudní aorty osmitýdenních samců potkanů Wistar SPF a použity v 5.-10. pasáži. Buňky byly nasazeny v hustotě cca 9000 buněk/cm² a kultivovány v Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM, Sigma USA, #D5648) obohaceném o 10% fetální sérum (FBS, Sebak GmbH, Aidenbach, Německo) a gentamicin (40µg/ml, LEK, Ljubljana, Slovinsko). Buňky byly nejprve nasazeny do čistých polystyrénových kultivačních misek. Po 24 hodinách byly k buňkám uchyceným v miskách přidány vzorky. Sledované parametry byly odečítány v časových intervalech 0, 2, 7 a 14 dní po nasazení. Pro každou experimentální skupinu a každý časový interval byly použity tři vzorky.

Všechny typy buněk byly inkubovány v termostatu s relativní vlhkostí atmosféry kolem 90% (aby se snížil odpar tekutiny z média, a tím nedocházelo ke změně koncentrace jeho složek), obohacenou o 5% CO₂ (zvýšená koncentrace oxidu uhličitého se podílí na udržení pH médií s bikarbonátovým pufrem, kromě toho vyšší koncentrace rozpuštěného CO₂ v médiu lépe odpovídá poměrům v extracelulární tekutině) a teplotou 37°C (tedy při teplotě

blízké tělesné teplotě organismu). Více viz příložené publikace (Vandrovcová *et al.* 2008, 2011; Grausová *et al.* 2009b, Filová *et al.* 2011).

3.7 Počet buněk, velikost plochy jejich rozprostření, jejich životaschopnost, růstové křivky a doba zdvojení počtu buněk

První den po nasazení bylo hodnoceno počáteční množství buněk, uchycených na materiálu, a velikost plochy jejich rozprostření na základě barvení kombinací barviv Texas Red C₂-maleimide (barvivo, které konjuguje s proteiny buněčné membrány, a u fixovaných buněk i s proteiny cytoplasmy) a Hoechst #33342 (barvivo, které se váže na buněčnou DNA). Buňky byly nejprve opláchnuty v PBS, poté fixovány 70% etanolem vychlazeným na -20°C či 4% paraformaldehydem vychlazeným na 0-4°C a obarveny. Počty buněk pak byly hodnoceny na mikrofotografiích pořízených epifluorescenčním mikroskopem (Axioplan2, ZEISS, Německo; objektiv 20) opatřeným digitální kamerou (AxioCam MRc5, ZEISS, Německo). Na mikrofotografiích byl rovněž hodnocen tvar buněk a byla měřena plocha rozprostření buněk pomocí softwaru Atlas (Tescan Ltd., Brno, ČR).

Hodnocení životaschopnosti (viability) buněk bylo provedeno především 1. a 7. den po nasazení (tj. v počátečním a konečném intervalu pokusu, ale v některých případech i v dalších intervalech). První den po nasazení byly vzorky s buňkami opláchnuty v PBS a obarveny pomocí LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kitu (Invitrogen, Molecular Probes, USA). Byly smíseny následující složky kitu: calcein AM (marker aktivity esterázy u živých buněk, emituje zelenou fluorescenci) a ethidium holodimer-1 (proniká poškozenou buněčnou membránou do mrtvých buněk, emituje červenou fluorescenci). Počty živých a mrtvých buněk byly odečítány z mikrofotografií pořízených epifluorescenčním mikroskopem (Axioplan2, ZEISS, Německo; objektiv 20) opatřeným digitální kamerou (AxioCam MRc5, ZEISS, Německo). Sedmý den po nasazení, kdy buňky rostly ve více vrstvách, byly jejich počty a životaschopnost hodnoceny automaticky v analyzátoru Vi-CELL XR (Beckman Coulter, USA), poté co byly opláchnuty v PBS a odděleny od vzorku pomocí roztoku trypsinu a EDTA v PBS. V analyzátoru byly buňky automaticky obarveny trypanovou modří, která proniká do mrtvých či poškozených buněk.

Počty buněk 3. den po nasazení byly odečteny z mikrofotografií pořízených epifluorescenčním mikroskopem (Axioplan2, ZEISS, Německo; objektiv 20) opatřeným digitální kamerou (AxioCam MRc5, ZEISS, Německo) po imunofluorescenčním barvení (více viz dále v kapitole 3.8)

Počty buněk v jednotlivých časových intervalech (spočítaných buď z mikrofotografií nebo pomocí analyzátoru Vi-CELL XR) byly vyjádřeny jako populační hustota buněk/cm² a sloužily k sestrojení růstových křivek. Doba zdvojení počtu buněk v populaci (Cell Population Doubling Time, DT) byla spočítána jako

$$DT = \log 2 \frac{t - t_0}{\log N_t - \log N_{t_0}}$$

kde t_0 značí počáteční časový interval a t konečný časový interval, N_{t_0} vyjadřuje počáteční množství buněk a N_t konečný počet buněk v příslušných časových intervalech.

Podrobnější informace týkající se hodnocení počtu buněk jsou v příložených publikacích (Grausová *et al.* 2009b).

3.8 Imunofluorescenční barvení molekulárních markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciace

3.8.1. Zástupci markerů buněčné adheze

Integriny s řetězcem β_1 (β_1 -integriny): jedná se skupinu adhezních receptorů buněk, která váže kolagen (integriny $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$), laminin ($\alpha_8\beta_1$), fibronectin ($\alpha_5\beta_1$) a vitronektin ($\alpha_v\beta_1$), tedy proteiny vyskytující se v přirozené kostní matrix (kolagen), proteiny bazální laminy (laminin) či hlavní proteiny adsorbující se k umělému materiálu ze séra kultivačního média (fibronectin, vitronektin). Adheze prostřednictvím β_1 -integrinů rovněž podporuje osteogenní diferenciaci (Wang *et al.* 2006, Schwarz *et al.* 2007).

Talin: protein fokálních adhezních plaků asociovaný s integriny, je přítomen v placích zajišťujících adhezi buňka-matrix.

Vinkulin: další protein fokálních adhezních plaků asociovaný s integriny, je přítomen v placích zajišťujících jak adhezi buňka-matrix, tak adhezi buňka-buňka, stabilizuje fokální adhezní plaky, tj. je známkou vyvrážděných plaků (Maheshwari *et al.* 2000).

β -aktin: důležitá složka aktinového cytoskeletu asociovaná s fokálními adhezními plaky, hraje roli v uchycení buněk a jejich rozprostření na materiálu.

3.8.2 Zástupci markerů osteogenní diferenciace

Osteopontin: časnější marker osteogenní diferenciace, glykoprotein extracelulární matrix, může být syntetizován nejen osteoblasty, ale i jinými buněčnými typy, zejména za patologických okolností (endotelové a hladké svalové buňky při cévních onemocněních,

zánětlivé a nádorové buňky). Hraje rovněž roli v remodelaci kostní tkáně (pro přehled viz Grausová *et al.* 2011).

Osteokalcin: pozdní marker osteogenní diferenciaci, glykoprotein extracelulární matrix vázající vápník, typický a specifický pro osteoblasty (pro přehled viz Vagaská *et al.* 2010, (Grausová *et al.* 2011).

Pro imunofluorescenční barvení byly buňky nejprve opláchnuty v PBS, fixovány pomocí 70% etanolu vychlazeného na -20°C či 4% paraformaldehydu vychlazeného v lednici. Nespecifická potenciální vazebná místa pro protilátky byla blokována pomocí 1% albuminu z hovězího séra (BSA, Serva, kat. č. 11930, Německo) rozpuštěného v PBS. Do tohoto roztoku byl přidán i 0.05% Triton X-100 (Serva, #37195), který permeabilizuje buněčnou membránu. Po 20 minutách byl roztok odstraněn a vzorky byly ponořeny na dalších 20 minut do 1% roztoku Tweenu (Merck, 822184, USA). Poté byly přes noc inkubovány při teplotě 4°C s myšimi monoklonálními protilátkami proti lidským antigenům, tj. β_1 -integrinům, talinu, β -aktinu a vinkulinu, a s králičí polyklonální protilátkou proti lidskému osteopontinu. Tyto primární protilátky byly rozpuštěny v PBS v koncentracích od 1:200 do 1:400. Druhý den byly vzorky s buňkami opláchnuty v PBS a inkubovány 60 minut při pokojové teplotě se sekundární protilátkou, tj. kozím IgG (H + L) konjugovaným s markerem Alexa Fluor[®]488 a směřovaným proti myším antigenům (ředěno 1:400; Molecular Probes, kat. č. A11017) nebo kozím IgG (H + L) konjugovaným s markerem Alexa Fluor[®]488 a směřovaným proti králičím antigenům (ředěno 1:1000; Molecular Probes, kat. č. A11070). Po inkubaci byly vzorky s buňkami 2× propláchnuty PBS a montovány na mikroskopická skla speciálním gelem, který uchovává fluorescenci (Gel/Mount, Biomeda Corporation, USA). Následně byly vzorky hodnoceny pomocí epifluorescenčního mikroskopu (Axioplan2, ZEISS, Německo; objektiv 20) opatřeného digitální kamerou (AxioCam MRc5, ZEISS, Německo) (Vandrovcová *et al.* 2008, Grausová *et al.* 2009b, Vandrovcová *et al.* 2011). Vybrané vzorky byly též snímány laserovým konfokálním mikroskopem (Leica TCS SP2, Německo) (Vandrovcová *et al.* 2008, Vandrovcová *et al.* 2011).

3.9 Enzymatická imunosorbentní esej (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Po třídní či sedmidenní kultivaci byly měřeny koncentrace následujících proteinů: β_1 -integriny, vinkulin, β -aktin a osteokalcin (Vandrovcová *et al.* 2011).

Buňky byly odděleny od materiálů pomocí roztoku trypsinu a EDTA. Buňky byly následně resuspendovány v PBS, centrifugovány a znovu resuspendovány v PBS (10^6 /ml) a přes noc zamrazeny v -70°C . Buněčný homogenát byl připraven pomocí ultrazvuku (sonifikace trvala 40 vteřin, byl použit sonikátor UP 100 H, Dr. Hielscher GmbH). Celkový obsah proteinů byl změřen modifikovanou Lowryho metodou (Lowry *et al.* 1951, modifikováno např. ve studiích Filová *et al.* 2009a,b; Grausová 2009a). Alikvotní množství buněčného homogenátu (o koncentraci 100 μg proteinu v 50 μl vody) bylo adsorbováno na 96-jamkovou mikrodestičku přes noc ve 4°C . Druhý den byla mikrodestička dvakrát promyta PBS, nespecifická vazebná místa byla blokována 0.02% želatinou rozpuštěnou v PBS (60 minut). Poté byly přidány primární protilátky, tj. myší monoklonální protilátky proti lidským β_1 -integrinům, β -aktinu a vinkulinu, a králíčí polyklonální protilátka proti lidskému osteokalcinu. Ty byly ředěny v PBS (ředěno 1:200 či 1:400) a působily 60 minut při pokojové teplotě. Jako sekundární protilátky byly použity kozí IgG proti myšimu antigenu (ředěno 1:1000) (Sigma, kat. č. A3682) nebo kozí IgG proti králíčímu antigenu (ředěno 1:5000) (Sigma, kat. č. A9169). Obě protilátky byly konjugovány s peroxidázou. Doba působení byla 45 minut při pokojové teplotě. Poté byly jamky dvakrát promyty roztokem PBS s 0.1% Tritonem X-100 a následovala ortofenylendiaminová reakce (ortofenylendiamin 2.76 mM, Sigma) s 0.05% H_2O_2 v 0.1 M fosfátovém pufru (pH 6.0, inkubace ve tmě). Reakce byla zastavena po 10 - 30 minutách napipetováním 2 M H_2SO_4 do jamek mikrodestičky (50 μl /jamka). Absorbance byla měřena při vlnových délkách 490 nm a 690 nm na přístroji Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, USA). Odečtená hodnota absorbance byla vyjádřena v procentech hodnoty získané z kontrolní kultury buněk na mikroskopickém krycím skle.

3.10 Statistická analýza

Kvantitativní data jsou vyjádřena jako průměr \pm S.E.M. (Standart Error of Mean). Statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru SigmaStat (Jandel Corporation, USA). Vzájemné porovnání mnoha skupin vzorků bylo provedeno testem ANOVA, a to Student-Newman-Keulsovou metodou. Za signifikantní byla považována hodnota $p \leq 0.05$. Více viz příložené publikace (Vandrovcová *et al.* 2008, 2011; Grausová *et al.* 2009b, Filová *et al.* 2011).

4. VÝSLEDKY

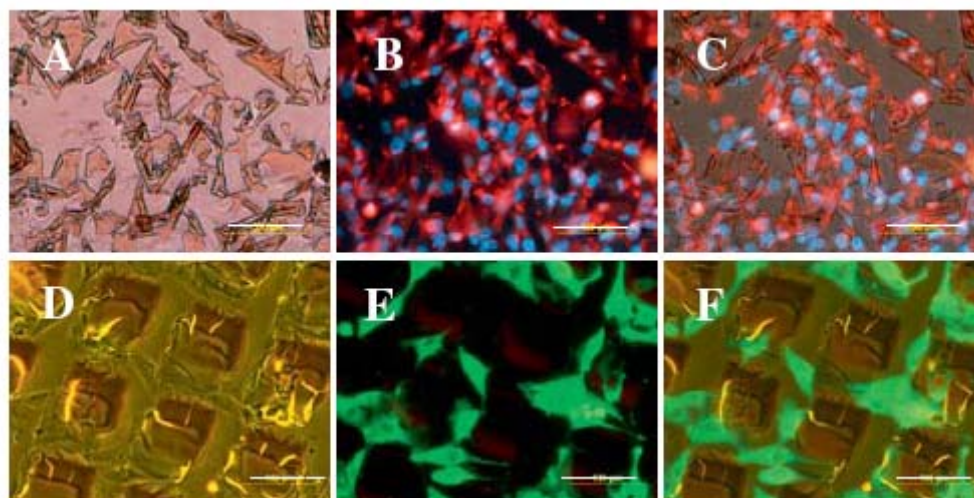
4.1. Interakce kostních buněk s fullereny

4.1.1. VANDROVCOVA M, VACIK J, SVORCIK V, SLEPICKA P, KASALKOVA N, VORLICEK V, LAVRENTIEV V, VOSECEK V, GRAUSOVA L, LISA V, BACAKOVA L: **Fullerene C₆₀ and hybrid C₆₀/Ti films as substrates for adhesion and growth of bone cells.** *Physica Status Solidi A* **205 (9)**: 2252-2261, 2008

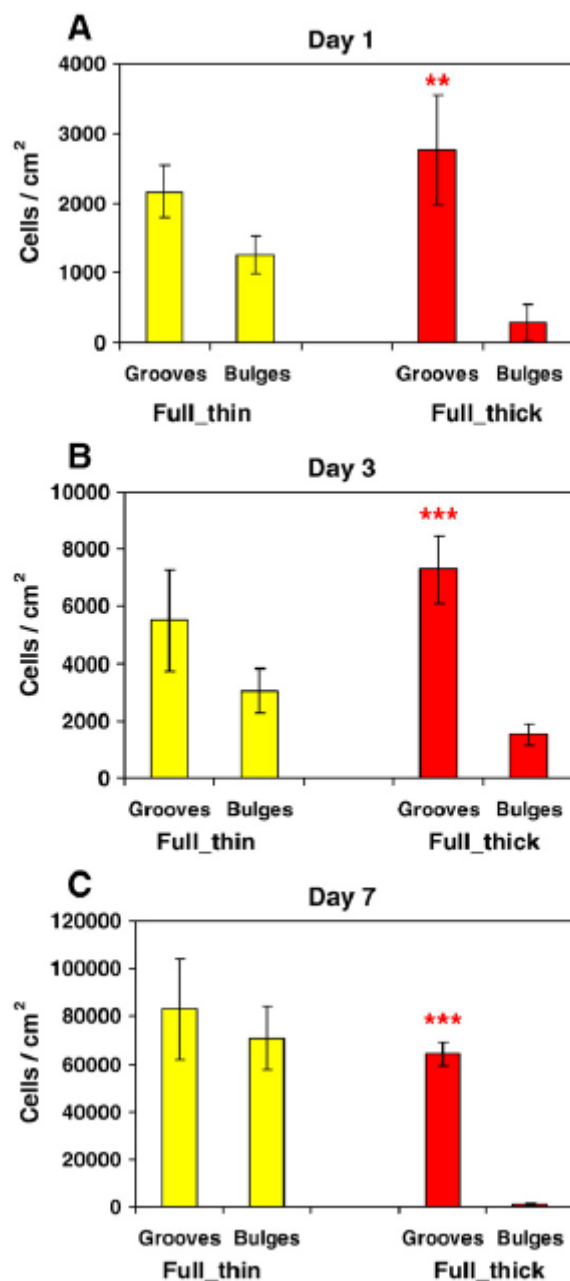
4.1.2. GRAUSOVA L, VACIK J, VORLICEK V, SVORCIK V, SLEPICKA P, BIKOVA P, VANDROVCOVA M, LISA V, BACAKOVA L: **Fullerene C₆₀ films of continuous and micropatterned morphology as substrates for adhesion and growth of bone cells.** *Diamond & Related Materials* **18**: 578-586, 2009

V obou výše zmíněných publikacích jsme se zaměřili na hodnocení adheze, rozprostření, růstu a životaschopnosti linie lidských kostních buněk MG 63 v závislosti na konkrétních modifikacích fullerenních filmů. Fullereny lze nanášet na povrch materiálu buď samotné nebo obohacené o další prvky či sloučeniny, dále v kontinuální vrstvě či ve vrstvě s určitým vzorem, tj. vrstvy fullerenu získávají ke své nanostruktúře ještě mikrostrukturu, přičemž mikro- a nanostruktura jsou hierarchicky organizovány. Další modifikací, která může mít vliv na chování buněk, je i tloušťka nanášeného filmu. V první z prací jsme porovnávali vliv vrstev deponovaných přes kovovou mřížku. Vrstvy byly připraveny z různých forem fullerenu: čistého fullerenu C₆₀, kompozitu C₆₀/Ti a C₆₀, který byl ozařován zlatými ionty za vzniku amorfního uhlíku (a-C). Mikrostrukturované vrstvy byly formovány jako vyvýšeniny a prohlubně. Zajímavým jevem bylo, že fullereny byly přítomny i v prohlubních – došlo totiž k nanesení fullerenu i pod kovovou částí mřížky, třebaže v daleko tenčí vrstvě. Potvrdila se tak naše hypotéza, že vytvoření vzoru ovlivňuje distribuci buněk, a to tak, že buňky mají tendenci růst přednostně v prohlubních mezi vyvýšeninami. Proto by se dala metoda nanášení mikrostrukturovaných vrstev fullerenu i jejich kompozitů s kovy použít k řízení adheze buněk (obr. 6). Ve druhé práci jsme se zaměřili na otestování chování kostních buněk na fullerenních filmech nejen s určitým vzorem, ale i o různé tloušťce nanášené vrstvy. Zjistili jsme, že preferenční růst buněk v prohlubních mezi vyvýšeninami se zvyrazňuje se stoupající tloušťkou vrstvy, tj. se stoupající výškou nerovností na povrchu vrstvy. Rovněž se zvyrazňuje s prodlužující se dobou kultivace. Sedmý den po nasazení na vrstvy o výšce nerovností 1043

± 57 nm rostly již prakticky všechny buňky selektivně v prohlubních mezi vyvýšeninami (obr. 7).



Obr. 6.: Lidské osteoblasty MG 63 po třídenní kultivaci na kontinuální (A-C) a mikrostrukturované (D-F) kompozitní C_{60}/Ti vrstvě. Buňky byly fixovány paraformaldehydem a obarveny kombinací barviv Hoechst 33342 (modrá fluorescence) a Texas Red (červená fluorescence) (B, C) nebo imunofluorescenčně proti lidskému β -aktinu (E, F). Snímky byly pořízeny mikroskopem Olympus IX 50, obj. 20 \times , opatřeným digitální kamerou DP 70. A, D: obraz ze světelného mikroskopu, B, E: obraz pořízený fluorescenčním mikroskopem, C, F: kombinace jak světelného, tak fluorescenčního mikroskopu. Měřítko = 100 μm . (Vandrovcová *et al.* 2008)

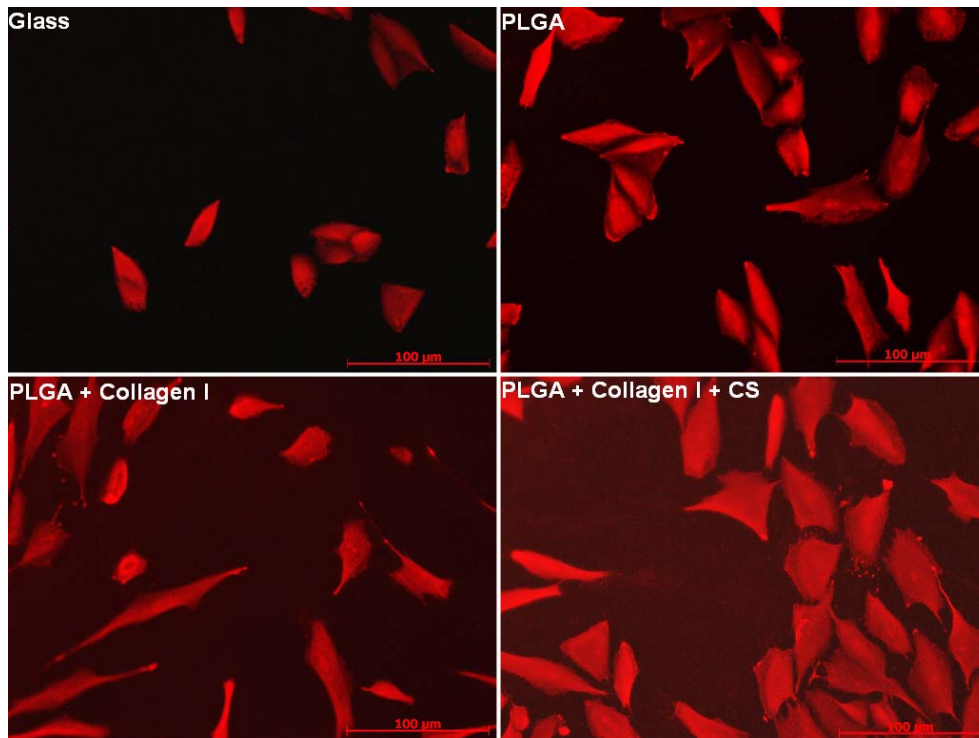


Obr. 7.: Populační hustota lidských osteoblastů MG 63 1. den (A), 3. den (B) a 7. den po nasazení (C) na tenké nebo tlusté fullerenní (Full) C₆₀ vrstvě mikrostrukturované vyvýšeninami (Bulges) a prohlubněmi (Grooves). U tenkých vrstev dosahovaly vyvýšeniny 326 ± 5 nm, a u vrstev tlustých 1043 ± 57 nm. Průměr \pm S.E.M. z 9 měření. Statistická analýza: Studentův t-test pro nepárová data. Statistická významnost: ** $p \leq 0.01$ a *** $p \leq 0.001$ v porovnání s hodnotami na vyvýšeninách (Grausová *et al.* 2009b).

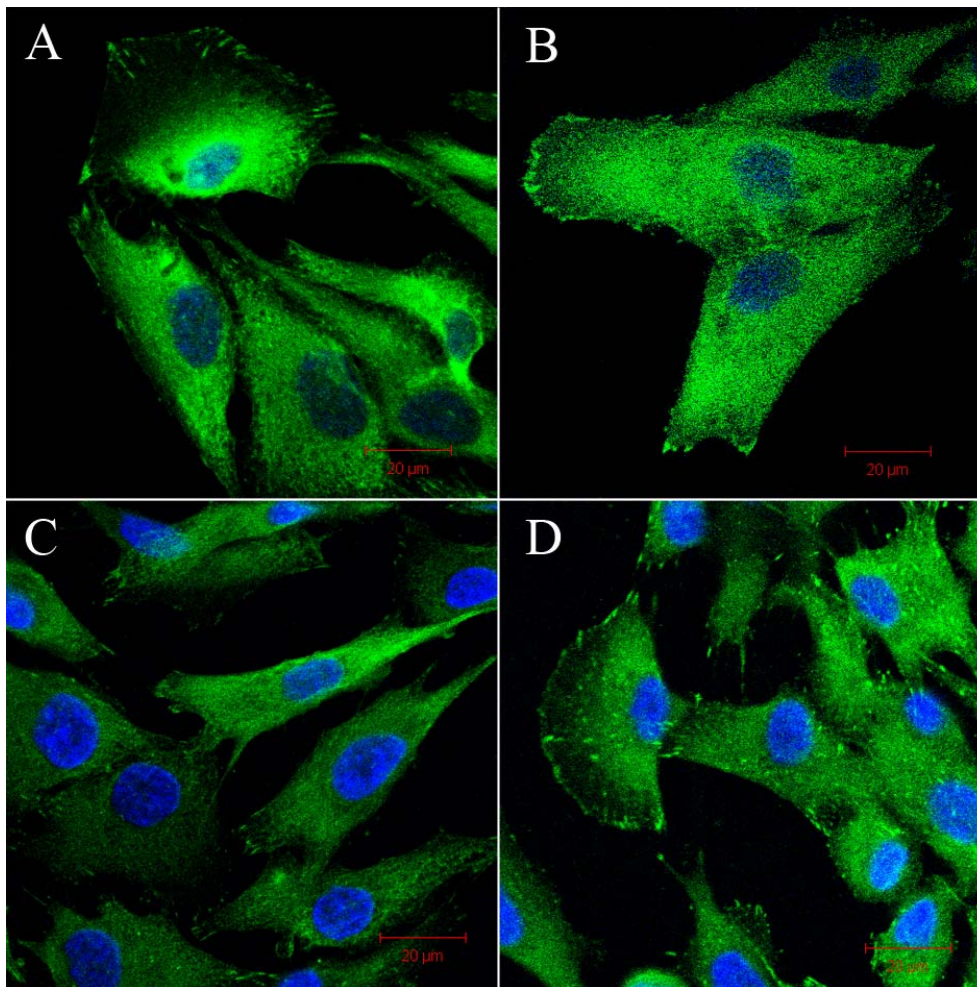
4.2. Vliv organických složek extracelulární matrix naadsorbovaných na PLGA na chování kostních buněk

4.2.1. VANDROVCOVA M, DOUGLAS T, HAUK D, GRÖSSNER-SCHREIBER B, WILTFANG J, BACAKOVA L, WARNKE PH: **Influence of collagen and chondroitin sulfat (CS) coatings on poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) on MG 63 osteoblast-like cells.** *Physiological Research* **60 (5):** x-xx, 2011 *In Press*

V této práci jsme sledovali chování buněk na PLGA materiálech, které byly pokryty buď pouze kolagenem I nebo kombinací kolagenu I a chondroitin sulfátu (CS). Jako kontrolní vzorky sloužily čisté vzorky PLGA a čistá mikroskopická skla. K hodnocení jsme použili počty buněk v jednotlivých časových intervalech, jejich tvar a plochu jejich rozprostření (obr. 8), dále množství a distribuci vybraných molekul proteinů (β_1 -integriny, vinkulin, β -aktin). Prokázali jsme, že nanášení kombinace kolagenu I a CS na PLGA zlepšilo proliferaci kostních MG 63 buněk. Dále jsme naměřili vyšší koncentraci cytoskeletárního proteinu β -aktinu, což korespondovalo s lepším rozprostřením buněk na povrchu. Zaznamenali jsme dobře vyvinuté fokální adhezní plaky obsahující vinkulin (obr. 9). Dokonce i množství osteokalcinu, tj. významného ukazatele osteogenní diferenciace, bylo vyšší v porovnání s buňkami na PLGA, kde byl adsorbován pouze kolagen I.



Obr. 8.: Typické mikrofotografie jednodenních kultur kostních buněk obarvených barvivem Texas Red C₂-maleimide na kontrolním mikroskopickém krycím sklíčku a na filmech PLGA, PLGA potaženém kolagenem I, a PLGA s naadsorbovanými kolagenem I a chondroitin sulfátem (Collagen I + CS). Buňky kultivované na PLGA filmech a na obou potažených filmech (zejména kombinací kolagenu I a CS) vykazovaly vyšší rozprostření než na kontrolních krycích sklech, a vytvářely pseudopodia. Mikroskop AxioPlan2 s digitální kamerou AxioCam MRc5 (ZEISS, Německo). Měřítko = 100 µm (Vandrovcová *et al.* 2011).



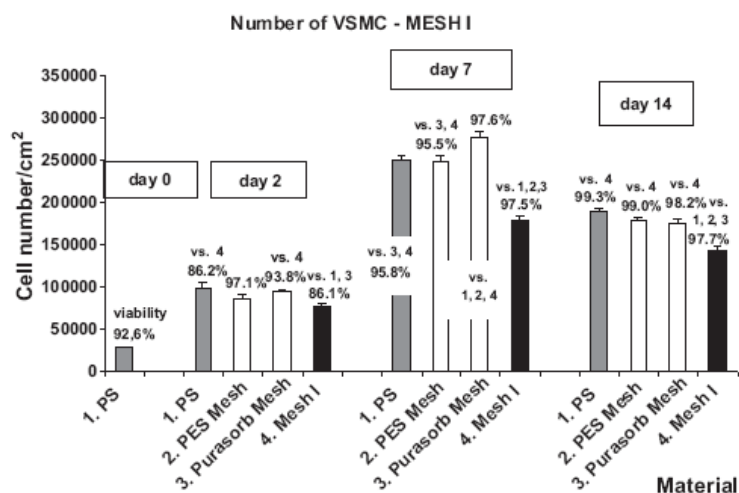
Obr. 9.: Imunofluorescenční barvení vinkulinu (zelená fluorescence) v lidských kostních buňkách MG 63 po třídní kultivaci na kontrolním mikroskopickém sklíčku (A) a na filmech PLGA (B), PLGA potaženém kolagenem I (C) a PLGA s neadsorbovaným kolagenem I a chondroitin sulfátem (D). Na vzorcích PLGA s kolagenem I a CS byly zaznamenány početnější a větší fokální adhezní plaky. Jádra buněk byla dobarvena barvivem Hoechst 33342 (modrá fluorescence). Konfokální laserový scannovací mikroskop Carl ZEISS Microimaging LSM 510, měřítko 20 µm (Vandrovcová *et al.* 2011).

4.3. Perivaskulární systém s řízeným uvolňováním sirolimu

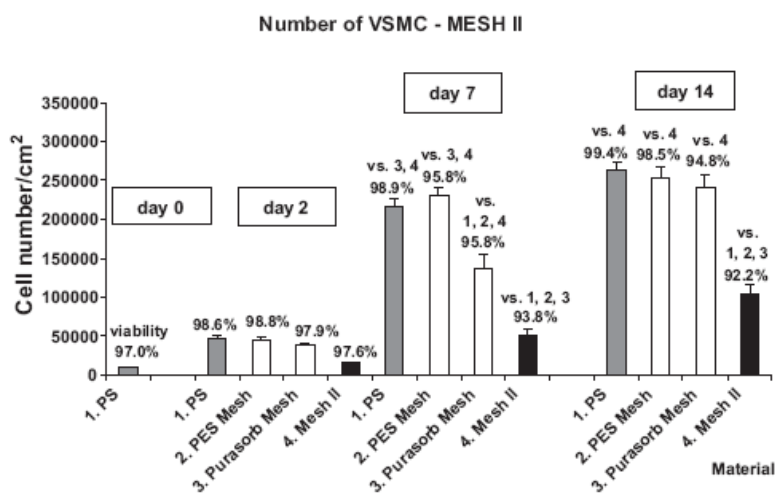
4.3.1. FILOVA E, PARIZEK M, OLISOVSKA J, KAMENIK Z, BRYNDA E, REIDEL T, VANDROVCOVA M, LISA V, MACHOVA L, SKALSKY I, SZARSZOI O, SUCHY T, BACAKOVA L: **Perivascular sirolimus-delivery system**. *International Journal of Pharmaceutics* **404**: 94-101, 2011

Poslední předkládaná práce se zabývá sledováním vlivu uvolňovaného antiproliferačního léčiva na růst a životaschopnost hladkých svalových buněk (HSB). Materiál, který zajišťoval mechanickou stabilitu systému uvolňujícího léčivo, byl vyroben z polyesterové síťky. Tato síťka byla následně impregnována roztoky o různém poměru mezi rozpuštěným purasorbem (kopolymer kyseliny L-mléčné a ϵ -kaprolaktonu) a sirolimem (Rapamycin izolovaný ze Streptomycet) v chlorbenzen-ethanolu (síťka 1). Vzorek s vyšší koncentrací sirolimu byl následně překryt roztokem s rozpuštěným purasorbem (síťka 2). Posledním typem vzorku, který sloužil zároveň jako kontrolní materiál, byla polyesterová síťka impregnována samotným rozpuštěným purasorbem.

Životaschopnost hladkých svalových buněk se v průběhu pokusu pohybovala u všech typů vzorků mezi 86,1 – 98,4%. Sirolimus, který se uvolňoval ze síťky 1, významně snížil počet hladkých svalových buněk v časových intervalech 2, 7 a 14 dní. V porovnání s počtem buněk kultivovaných na dně polystyrénové kultivační misky se snížil počet buněk 2. den po nasazení o 21,8%, 7. den o 28,7% a 14. den o 24,8% (obr. 10). Sirolimus uvolňovaný ze síťky 2 snížil ve stejných časových intervalech počty buněk o 67,6%, 76,1% a 60,1% v porovnání s počty buněk na polystyrénové kultivační misce (obr. 11).



Obr. 10.: Počet a životaschopnost (procentuální údaje nad sloupci) hladkých svalových buněk na čisté kultivační polystyrénové misce (PS), na PS s polyesterovou síťkou (PES Mesh), na PS s PES Mesh impregnovanou purasorbem (Purasorb Mesh) nebo na PS s PES Mesh impregnovanou sirolimem (Mesh I) v časových intervalech 0, 2, 7 a 14 dní po přidání síťky ke kulturám. Statistická významnost: $p \leq 0.05$ v porovnání se vzorky ve stejném časovém intervalu. Čísla vzorků se statisticky významně odlišným počtem buněk jsou vyznačeny nad sloupci (výraz „vs.“ a číslo vzorku) (Filová *et al.* 2011).



Obr. 11.: Počet a životaschopnost (procentuální údaje nad sloupci) hladkých svalových buněk na čisté kultivační polystyrénové misce (PS), na PS s polyesterovou síťkou (PES Mesh), na PS s PES Mesh impregnovanou purasorbem (Purasorb Mesh) nebo na PS s PES Mesh impregnovanou sirolimem (Mesh II) v časových intervalech 0, 2, 7 a 14 dní po přidání síťky ke kulturám. Statistická významnost: $p \leq 0.05$ v porovnání se vzorky ve stejném časovém intervalu. Čísla vzorků se statisticky významně odlišným počtem buněk jsou vyznačeny nad sloupci (výraz „vs.“ a číslo vzorku) (Filová *et al.* 2011).

5. DISKUSE

Z našich studií zaměřených na sledování vlivu fullerenu na růst buněk lze usuzovat, že fullereny C₆₀ jsou vhodným substrátem pro adhezi, růst a diferenciaci lidských kostních buněk MG 63, a to v porovnání s kontrolními materiály jako jsou dna polystyrénových kultivačních misek či mikroskopická krycí sklíčka (Vandrovcová *et al.* 2008, Grausová *et al.* 2009b). Na kontinuálních vrstvách fullerenu bylo dosaženo srovnatelných parametrů chování buněk, jako je počet, dynamika růstu, životaschopnost a morfologie buněk, jako na standardních kultivačních materiálech. V našich pokusech se tedy potenciální cytotoxicita fullerenu neprokázala. Možným vysvětlením je stabilita fullerenných vrstev, z nichž se fullerenné molekuly významně neuvolňovaly a nepronikaly do buněk. Uvolňování různých molekul a nanočástic a jejich průnik do buněk bývá obvykle podmínkou cytotoxického účinku materiálů. Naše výsledky jsou v souladu s dřívějšími studiemi, které se např. zabývaly sledováním pozitivního účinku fullerenních vrstev (deponovaných na polystyrénové kultivační misky odpařováním methanolu z koloidní suspenze C₆₀-methanol) na adhezi, proliferaci a formování aktinového cytoskeletu několika linií epitelových buněk (Levi *et al.* 2006). Nanášení molekul fullerenu na polyuretanový povrch také zvýšilo počet naadherovaných krevních destiček a podpořilo jejich aktivitu (Lin and Wu 1999).

V naší první práci jsme porovnávali vliv různých chemických modifikací fullerenu a jejich rozdílné distribuce na povrchu mikroskopického krycího sklíčka na adhezi a růst buněk (Vandrovcová *et al.* 2008). První den po nasazení byl počet adherovaných buněk podobný jako na kontrolních materiálech (dno polystyrénové kultivační misky a mikroskopické krycí sklíčko), a v některých případech byl počet dokonce vyšší. Tento pozitivní účinek vrstev C₆₀, Ti a kombinace C₆₀/Ti může být vysvětlen tím, že byl povrch nanostrukturovaný (Vandrovcová *et al.* 2008). Nanostruktura povrchů se podobou přibližuje nanoarchitektuře buněčné membrány, a zároveň i přirozeného substrátu, k němuž buňky adherují, tj. nanoarchitektuře molekul extracelulární matrix (Webster *et al.* 2000a, Price *et al.* 2004, Woo *et al.* 2003, Tan and Saltzman 2004, Wei and Ma 2005). Molekuly, které se podílejí na adhezi buněk (např. vitronektin, fibronektin, kolagen a laminin) a které se přidávají do kultivačních médií (např. ve formě sérového doplňku) či si je buňky syntetizují samy, se na nanostrukturovaných površích spontánně adsorbují ve vhodném množství, spektru a zejména ve výhodné prostorové konformaci blízcí se konformaci fyziologické. Za výhodnou prostorovou konformaci se považuje taková konformace, která zpřístupní buněčným receptorům specifické aminokyselinové sekvence (např. RGD), které fungují jako ligandy pro

adhezní receptory buněk (Webster *et al.* 2000a, Price *et al.* 2004, Woo *et al.* 2003, pro přehled viz Bačáková *et al.* 2004, 2008, Bačáková a Švorčík 2008). Na námi testovaných površích měly buňky 1. den po nasazení polygonální tvar, byly dobře rozprostřené a měly dobře vyvinutý β -aktinový cytoskelet, což lze považovat za znak funkčních vazeb mezi adhezními receptory buněk a molekulami extracelulární matrix adsorbovanými na vrstvách C_{60} , Ti a kombinace C_{60}/Ti . Nejvyšší počty buněk 1. den po nasazení byly zaznamenány na kontinuálním povrchu C_{60}/Ti a na vrstvě C_{60} ozářené zlatými ionty. Toto zjištění je možné vysvětlit tím, že se v uvedených vrstvách vlivem oxidace povrchů zvýšilo množství kyslíku (Vandrovcová *et al.* 2008). Je známo, že fullereny vystavené světlu podléhají fotooxidaci, a stejně tak i titanové nanočástice, které byly deponovány společně s fullereny. Oxidace mohla být i průvodním jevem ozařování fullerenních vrstev ionty zlata. Opakovaně bylo prokázáno, že chemické funkční skupiny obsahující kyslík podporují adsorpci molekul extracelulární matrix, které zprostředkovávají adhezi buněk (Bačáková *et al.* 2001, Mikulíková *et al.* 2005). Hlavním mechanismem tohoto působení kyslíkových skupin je zvyšování polarity a hydrofilie povrchu. Dochází pak k synergickému působení kyslíkových skupin a nanostruktury povrchu, jehož výsledkem je zlepšení kolonizace povrchu materiálu buňkami.

Počty buněk první i třetí den po nasazení vykazovaly vyšší počty na kontinuálních vrstvách než na mikrostrukturovaných vrstvách, tj. vrstvách deponovaných přes kovovou masku. Třetí den po nasazení byly počty na mikrostrukturovaném C_{60} filmu statisticky významně nižší než na polystyrénové kultivační misce. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že buňky přednostně osídlovaly prohlubně (brázdy) před vyvýšeninami (vzniklými nahromaděním fullerenu v místech, kde k podložnímu substrátu přiléhala oka kovové mřížky), a měly tedy méně prostoru k adhezi a růstu. Preferenční růst různých typů buněk v prohlubních byl zaznamenán v řadě dřívějších studií, které pracovaly s mikrostrukturovanými povrchy různých polymerních a kovových materiálů, včetně mikrostrukturovaných fullerenu C_{60} o tloušťce kolem 1 μm (Grausová *et al.* 2008a). Na filmech, které obsahují C_{60} může být nízká atraktivita vyvýšenin pro buněčnou kolonizaci způsobena kombinací následujících faktorů: příliš strmé stoupání vyvýšenin, tendence kulových molekul fullerenu difundovat z vyvýšeniny a zabraňovat tak stabilní adhezi buněk, nebo relativně vysoká hydrofobicita nefunkcionalizovaných fullerenu. Na mikrostrukturovaných vrstvách Ti nebyla tato tendence příliš markantní. Tuto skutečnost je možno vysvětlit nižší hydrofobicitou povrchu a stabilnější strukturou vyvýšeniny tvořené pouze Ti. Dále jsme došli k zajímavému zjištění, že na mikrostrukturovaných površích, které byly ozářeny zlatými ionty, byl preferenční růst v prohlubních zaznamenán pouze 1. den po nasazení, zatímco 3. den již byly buňky

distribučovány na povrchu homogenně. Zřejmě je to způsobeno přeměnou C₆₀ po ozáření na amorfni uhlík, který již z vyvýšenin nedifundoval, a navíc obsahoval kyslík, čímž se stal relativně hydrofilním (Vacík *et al.* 2001, Vandrovcová *et al.* 2008).

Na všech námi testovaných vzorcích C₆₀, C₆₀/Ti a Ti byly buňky vysoce životaschopné. První den po nasazení bylo rozmezí životaschopnosti (měřeno pomocí LIVE/DEAD kitu, jež je založen na hodnocení esterázové aktivity a permeability buněčné membrány) od 95 ± 9% do 99 ± 14% a blížila se životaschopnosti buněk na kontrolních vzorcích (na polystyrénové kultivační misce byla životaschopnost 99 ± 12% a na mikroskopickém podložním skle 95 ± 10%). Sedmý den po nasazení byla životaschopnost hodnocena pomocí barviva trypanové modři, která proniká přes buněčnou membránu poškozených a mrtvých buněk, a tyto buňky jsou pak zbarveny modře. Životaschopnost buněk byla v porovnání s 1. dnem nižší, což mohlo být způsobeno rozdílnou metodou testování životaschopnosti buněk 7. den. Zatímco 1. den byla životaschopnost sledována přímo u buněk uchycených k materiálu, pro analýzu provedenou 7. den bylo nutno buňky oddělit od materiálu použitím roztoku trypsinu a EDTA, což mohlo poškodit buněčnou membránu.

Sedmý den po nasazení byl nejnižší počet buněk zaznamenán na mikrostrukturovaném povrchu filmu C₆₀/Ti a nejvyšší na mikrostrukturovaném Ti, na kterém byl dokonce vyšší než na kontinuální vrstvě Ti. Naproti tomu na vzorcích pokrytých mikrostrukturovanými vrstvami C₆₀ a C₆₀/Ti byly počty buněk vždy nižší než na kontinuálních vrstvách, a to díky preferenční kolonizaci brázd před vyvýšeninami (Vandrovcová *et al.* 2008).

V druhé práci jsme testovali adhezi a růst kostních buněk na vybraných typech fullerénových površích (kontinuálních vrstvách i vrstvách se vzorem) o různé tloušťce nanášené vrstvy (Grausová *et al.* 2009b). Také zde jsme potvrdili pozitivní vliv fullerénů na chování buněk. Imunofluorescenční barvení MG 63 buněk odhalilo shluky proteinů ve formě fokálních adhezních plaků. Na těch se podílely např. β_1 -integriny (integrální receptory pro kolagen, laminin, fibronektin a vitronektin) a talin (protein asociovaný s β_1 -integriny uvnitř buňky). Vznik fokálních adhezních plaků byl doprovázen formací β -aktinového cytoskeletu a syntézou osteopontinu (marker osteogenní diferenciace kostních buněk). Výše vyjmenované jevy lze považovat za znak aktivní interakce mezi buňkou a substrátem, který měl za následek přenos signálu do buňky a ovlivnil expresi osteogenních genů. Kromě toho bylo prokázáno, že β_1 -integriny podporují osteogenní diferenciaci, která se projevuje vyšším množstvím produkovaného osteokalcinu a osteopontinu, zvýšené aktivity alkalické fosfatázy a lepšího využití 1,25-dihydroxyvitaminu D₃ (Wang *et al.* 2006). Podobně jiní autoři zjistili, že ve

vodě rozpustný derivát fullerenu (C_3 -fullero-*tris*-methanodikarbxylová kyselina) rovněž podporoval formování fokálních adhezních plaků a aktinového cytoskeletu v lidských buňkách epidermálního karcinomu. Díky svému antioxidačnímu účinku umožnil zmíněný derivát fullerenu růst těchto buněk dokonce i po ozáření UV světlem (Straface *et al.* 1999). Schopnost fullerenů a jejich derivátů pohlcovat volné radikály zabránila apoptóze keratinocytů po ozáření UV světlem B (Fumelli *et al.* 2000), minimalizovala oxidativní poškození transplantátů tenkého střeva (Lai *et al.* 2000), či snížila degeneraci a smrt neuronů a předešla mozkové ischemii (Lai *et al.* 2000, Huang *et al.* 2001).

V našich pokusech byl první den po nasazení počet buněk na kontinuálních vrstvách (tenkých i tlustých, tj. o tloušťce 505 ± 43 nm a 1090 ± 8 nm) velmi podobný a blížil se hodnotám počtu buněk na kontrolních vzorcích (dno polystyrénové kultivační misky a mikroskopické krycí sklo). Na tenkých mikrostrukturovaných površích (výška nerovností 326 ± 5 nm) byla populační hustota buněk v průměru nižší než na kontrolních vzorcích, ale rozdíly nebyly statisticky významné. V časovém intervalu od 1. dne do 5. dne byla doba zdvojení počtu buněk na kontinuálních površích C_{60} a površích kontrolních podobná. Největší rozdíl byl zaznamenán na tlustších mikrostrukturovaných vrstvách (výška nerovností 1043 ± 57 nm), kde byla doba zdvojení statisticky významně delší a populační hustota buněk na konci pokusu byla významně nižší než na tenkých mikrostrukturovaných vrstvách (obr. 5). Pomalejší růst na tlustších mikrostrukturovaných vrstvách byl pravděpodobně způsoben přítomností relativně velkých vyvýšenin a prohlubní. Buňky pak rostly především v prohlubních, kde měly k dispozici menší plochu pro kolonizaci. Na tenkých mikrostrukturovaných vrstvách rostly buňky homogenně po celém povrchu vzorků. V některých pracích je uvedeno, že buňky mohou osidlovat i vyvýšeniny. Autoři měli připraveny vzorky s dokonce mnohem větším velikostním rozdílem mezi vyvýšeninami a prohlubněmi než v naší práci (až desítky μm v porovnání s naším $1 \mu\text{m}$), jenže povrchy byly stabilní a pevné (jednalo se o povrchy kovové, keramické či syntetické polymerní). Jak již bylo zmíněno výše u první práce o fullerelech (Vandrovcová *et al.* 2008), i v případě práce druhé mohlo hrát roli synergické působení hydrofobicity, mechanických vlastností fullerenů a dále možnosti difúze fullerenů z povrchu vyvýšenin (Guo *et al.* 2007). Lze si představit, že fullereny, které se podobají fotbalovému míči, se „kutálejí“ dolů z vyvýšenin, či se alespoň „protácejí“, a tím buňkám nezajistí stabilní mechanickou podporu, která je pro adhezi kostních buněk nezbytná. Obvykle jsou totiž kostní buňky schopné uchytit se na vyvýšeninách i překlenout prohlubně, například póry scaffoldů používaných v kostním

tkáňovém inženýrství o průměru od 40 až téměř ke 100 μm (Karageorgiou a Kaplan 2005, Pamula *et al.* 2008).

Z toho plyne, že mikrostrukturované fullerenní filmy je možné použít jako šablonu pro regionálně selektivní adhezi a růst buněk. Osteogenní buňky rostoucí na určitých vymezených místech umělého materiálu pak navíc vykazují vyšší aktivitu fosforylace různých druhů kináz a transkripčních faktorů, přenosu signálů do buňky a její diferenciaci (Papenburg *et al.* 2007, Charest *et al.* 2004, Kenar *et al.* 2006, Hamilton a Brunette 2007). Tenké mikrostrukturované vrstvy fullerenů, které pevně lnou k podložce a neodlupují se, by bylo možno použít k bioaktivnímu nanášení na kostní náhrady, aby se zlepšila jejich integrace do okolní kostní tkáně.

V další práci jsme se zaměřili na sledování vlivu potahování PLGA scaffoldu molekulami extracelulární matrix za účelem podpory adheze a růstu kostních buněk (Vandrovcová *et al.* 2011).

Poly-(laktid-co-glykolid) (PLGA) je kopolymer polylaktidu a polyglykolidu. Je schválen Správou potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA). Z těla je odstraňován Krebsovým cyklem, proto se používá k výrobě chirurgických materiálů, např. materiálů šicích (Houchim a Topp 2008). Lze jej využít též pro výrobu scaffoldů ke konstrukci umělých náhrad poškozených tkání (Goldstein *et al.* 1999, van Eijk *et al.* 2008, Pamula *et al.* 2009). Předpokladem pro správnou adhezi kostních buněk je, že se povrch materiálu bude co nejvíce podobat jejich přirozenému prostředí. Mimo jiné je to nutnost adsorpce organických složek běžně se vyskytujících v kostní matrix. Mezi ně patří protein kolagen I a glykosaminoglykan chondroitin sulfát (CS).

V některých pracích je uvedeno, že povrchová úprava polymerních povrchů kolagenem zvýšila rozprostření buněk (He *et al.* 2005, Ma *et al.* 2005, Keresztes *et al.* 2006). V naší studii se to nepotvrdilo. Rozprostření buněk nebylo významně vyšší než na čistém PLGA. Pozorovali jsme však na buňkách tvorbu charakteristických pseudopodií, a to na PLGA pokrytých jak kolagenem, tak směsí kolagenu a CS. Pseudopodia jsou považována za indikátor dobré buněčné adheze, protože zlepšují přichycení buněk k substrátu a zajišťují intenzivnější interakce mezi buňkou a substrátem (Zhu *et al.* 2004). Kromě toho byl na povrchu pokrytém směsí kolagen/CS pozorován vyšší výskyt dobře rozprostřených polygonálních buněk, zatímco na PLGA s kolagenem vykazovaly buňky tvar spíše protáhlý. Tento fakt lze vysvětlit tím, že na povrchu PLGA se vytvořila vlákna kolagenu a CS, která byla v porovnání s čistými kolagenovými vlákny tenčí, kratší a orientována náhodně (Douglas *et al.* 2007). Je tedy možné, že určité rozdíly v morfologii povrchu materiálu se

odrážejí na morfologii buněk. Například dlouhá a relativně tlustá vlákna kolagenu, která se často formují paralelně, mohou ovlivnit tvar buněk, jež je pak protáhlý a kopíruje průběh těchto vláken. To potvrzuje i studie, která se zabývala kultivací MG 63 buněk na paralelně uspořádaných nanovlákních kyseliny L-polymléčné (PLLA, poly(L-lactic acid)). Buňky na těchto vlákních rostly v souladu se směrem vláken, zatímco na povrchu s náhodně orientovanými vlákny měly buňky polygonální tvar bez zřejmé pravidelné orientace (Wang *et al.* 2011). Podobně i v práci hodnotící adhezi a růst kostních buněk MG 63 a cévních hladkých svalových buněk na kompozitech s uhlíkovou maticí vyztužených uhlíkovými vlákny (CFRC, carbon fibre-reinforced carbon composites) měly buňky protáhlý tvar, který svou dlouhou osou směřoval podél uhlíkových vláken (Bačáková *et al.* 2001). K zajímavému závěru došel Born se svými spolupracovníky (2009), kteří našli korelaci mezi tvarem buňky a osteogenní diferenciací u lidských kostních progenitorových buněk. Buňky, které rostly v médiu s proliferačními růstovými faktory, měly vřetenovitý tvar, zatímco buňky kultivované v médiu navozujícím osteogenní diferenciací zaujímalý polygonální tvar (Born *et al.* 2009). Z těchto zjištění tedy plyne, že při hodnocení iniciální adheze buněk by měl být brán zřetel nejen na velikost, ale i na tvar plochy jejich rozprostření.

Nicméně, kompozitní vrstva kolagen/CS podpořila i proliferaci buněk MG 63, jak vyplývá ze statisticky významného zvýšení počtu buněk 3. a 7. den kultivace v porovnání s ostatními materiály. Glykosaminoglykany jsou často používány jako složky scaffoldů v tkáňovém inženýrství, protože mají pozitivní vliv na proliferaci osteoblastů (Benoit a Anseth 2005, Ekaputra *et al.* 2008). V některých pracích byly CS používány k potahování scaffoldů i pro jiné typy buněk, např. fibroblasty a chondrocyty (Zhong *et al.* 2005, van Susante *et al.* 2001). Pozitivní účinek chondroitin sulfátu na růst buněk lze vysvětlit tím, že je schopen vázat růstové faktory (Asada *et al.* 2009).

Imunofluorescenční barvení prokázalo, že nejnápadněji vyvinuté fokální adhezní plakety, obsahující vinkulin, byly na vzorcích PLGA potažených kombinací kolagen/CS (obr. 9). Tento náález byl podpořen i dalšími studii. Např. přítomnost CS na titanu potaženém kolagenem také zlepšila tvorbu fokálních adhezních plaků (Bierbaum *et al.* 2006, Douglas *et al.* 2007). Tento jev může být způsoben navázáním vápenatých iontů, které jsou pro vznik fokálních adhezních plaků nezbytné (např. zprostředkují adhezní funkci integrinů), na povrchu CS. Enzymová imunoanalýza (ELISA) však odhalila, že nejvyšší koncentrace vinkulinu se vyskytovala v buňkách, které rostly na čistém PLGA vzorku. Tuto disproporcii je možné vysvětlit tím, že konvenční ELISA použitá v naší studii měří celkové množství testované molekuly v buňce. Neměří tedy pouze složku podílející se na formování fokálních

adhezních plaků či cytoskeletárních vláken, ale i tu část, která se vyskytuje volně v cytoplasmě či v organelách, jako je např. Golgiho komplex. Tento fakt lze ověřit i na základě obrázku z konfokálního mikroskopu, kde na snímku s čistým PLGA je patrné, že se zeleně obarvený vinkulin vyskytuje homogenně v celém objemu buňky (obr. 9). Podobně můžeme vysvětlit i rozdílné výsledky mezi imunofluorescenčním barvením β_1 -integrinů a stanovením jeho koncentrace metodou ELISA. Zatímco ve fokálních adhezních placích je přítomen aktivovaný β_1 -integrin (tedy fosforylovaný), ELISA změří i volný neaktivovaný β_1 -integrin v cytoplasmě. Specifické tečkovité útvary β_1 -integrinů (tj. fokální adhezní plaky s obsahem β_1 -integrinů) na mikrofotografiích jsou nejlépe zachyceny na vzorcích PLGA pokrytých směsí kolagen/CS, zatímco nejvyšší koncentrace celkových β_1 -integrinů byla na čistém PLGA. Aby bylo možno metodou ELISA změřit selektivně koncentraci adhezních a s nimi asociovaných molekul vázaných ve fokálních adhezních placích, bylo by nutno použít protilátky proti fosforylovaným antigenům, které však v řadě případů nejsou na trhu zatím dostupné. Starší studie rovněž používaly poměrně pracnou a méně spolehlivou metodu extrakce nevázaných molekul detergenty, např. tritonem (Ezzell *et al.* 1997, Sawada a Sheetz 2002).

Jak již bylo zmíněno výše, chondroitin sulfát dokáže vázat vápenaté ionty (Bierbaum *et al.* 2006, Douglas *et al.* 2007), které jsou nezbytné pro fenotypickou maturaci kostních buněk (především pro mineralizaci kostní matrix). Proto po přidání CS ke kolagenu se významně zvýšila koncentrace osteokalcinu (glykoproteinu kostní extracelulární matrix, který váže vápenaté ionty). Podobný účinek mělo i potahování polykaprolaktonového (polycaprolactone, PCL) scaffoldu směsí kolagenu a CS na osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk (hMSCs - human Mesenchymal Stem Cells). Buňky diferencovaly, přestože do média nebyly přidány doplňky potřebné pro osteogenní diferenciaci (Rentsch *et al.* 2010). Mechanismus, kterým CS řídí osteogenní diferenciaci, může být takový, že CS ovlivňuje afinitu faktorů podílejících se na diferenciaci, jako jsou např. fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2) a nebo morfogenetický protein kostí (BMP-4) (Ling *et al.* 2006, Miyazaki *et al.* 2008, Stadlinger *et al.* 2007).

V práci zabývající se cévními náhradami jsme připravili systém s řízeným uvolňováním antiproliferační látky sirolimus (Filová *et al.* 2011). Předpokládá se, že lokální uvolňování léčiv hraje zásadní roli v prevenci restenózy cévní náhrady, aniž by způsobilo nežádoucí reakce (Pires *et al.* 2005). Předchází tak i degradaci léčiva před tím, než se dostane na místo určení, a zajistí absorpci v konkrétní tkáni (Golomb *et al.* 1996). Avšak dlouhodobé pozorování antiproliferačních účinků intravaskulárních stentů uvolňujících léčiva (např. paclitaxel, sirolimus nebo tacrolimus) odhalilo řadu nežádoucích reakcí způsobených

mechanickým a biochemickým poškozením cévní stěny stentem. Mezi tyto reakce patří částečné poškození endotelu, zvýšená agregace krevních destiček a trombóza, depozice reziduálního fibrinu, vyvolání apoptózy HSB a nedostatečné snížení neointimální hyperplázie poté, co bylo léčivo kompletně ze stentu uvolněno (Suzuki *et al.* 2001). Další závažnou komplikací je vznik zánětu cévní stěny a místní hypersenzitivní reakce na stent pokrytý polymerem. PLLA o vysoké molekulové hmotnosti (320 000 Da), který byl použit na potahování tantalového stentu, způsobil menší zánětlivou reakci v porovnání s PLLA o nižší molekulové hmotnosti (80 000 Da) (Lincoff *et al.* 1997). Přítomnost stentu uvnitř cévy rovněž často vede ke zhoršení hojícího procesu endotelu doprovázené rizikem pozdějšího rozvoje trombózy.

Pokud použijeme perivaskulární stent, zabráníme mechanickému poškození endotelové vrstvy. Použití perivaskulárního systému s řízeným uvolňováním antiproliferační látky může snížit riziko vzniku trombózy jednak tím, že antiproliferační látka není v přímém kontaktu s endotelem, a také proto, že její uvolňování je dočasné (obvykle několik týdnů). Tato doba inhibice růstu hladkých svalových buněk je přibližně stejná jako doba potřebná pro reendotelializaci štěpu. Pokud jsou ale nosiče léku konstruované ve formě gelu, mohou se uvolnit a vzdálit se z požadovaného terapeutického místa, podobně jako intravaskulární stenty (Owen *et al.* 2010).

Vyvinuli jsme perivaskulární systém řízeného uvolňování léčiva, který je založen na relativně mechanicky stabilní polyesterové síťce, a předpokládá se, že se pevně ovine kolem cévního štěpu. Mechanická podpora poskytnutá síťkou může zabránit roztažení žilního autologního štěpu po implantaci do arteriální části krevního řečiště, a také může inhibovat proliferaci HSB (Mehta *et al.* 1998).

Polyesterové síťky v naší studii byly pokryty odbouratelným kopolymerem L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu (tj. purasorbem), který obsahoval sirolimus. Uvolňování z degradabilní matrice obvykle probíhá ve třech fázích: fáze počáteční prudkého uvolnění, následovaná difúzní fází, a proces je ukončen fází řízené degradace (Venkatraman a Boey 2007). Kinetika uvolňování léčiva závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech léčiva, volbě polymeru nebo kopolymeru a jejich uspořádání do vrstev s léčivem nebo bez něho (Finkelstein *et al.* 2003).

Kopolymer použitý v naší studii měl relativně vysokou molekulovou hmotnost ($M_w = 117\,250$ g/mol). Po dvou a čtyřech týdnech inkubace v PBS jsme pozorovali pouze malé erozní změny na jeho povrchu. Z toho vyplývá, že se sirolimus uvolňoval z polymerní matrice difúzí a nikoli degradací polymeru. Ze síťky I se sirolimus úplně uvolnil po 6 týdnech a z

síťky II po 4 týdnech. Ze síťky I se během prvního týdne uvolnila podstatná část léčiva, zatímco uvolňování sirolimu ze síťky II bylo více homogenní (bez počátečního prudkého uvolnění). Rozdílná kinetika uvolňování sirolimu byla způsobena odlišným způsobem potahování sítěk. Síťka I byla potažena homogenní vrstvou purasorbu se sirolimem. Síťka II obsahovala nejprve vrstvu purasorbu s dvojnásobnou koncentrací sirolimu, než tomu bylo u síťky I a následně byla vrstva překryta ještě jednou vrstvou tvořenou pouze kopolymerem. Vrchní vrstva zabránila počátečnímu prudkému uvolnění sirolimu díky postupné difúzi skrz čistý kopolymer.

V dalších studiích, které se zabývali úplným odstraněním léčiva, se maximální doba výskytu pohybovala u některých 15 dní, u jiných 28 dní, nebo dokonce 90 dní (Venkatraman a Boey 2007, Hausleiter *et al.* 2005, Pires *et al.* 2005). Z perivaskulární poly(ϵ -kaprolaktonové) (PCL) manžety se veškerý paclitaxel nebo rapamycin uvolnil po třech týdnech (Pires *et al.* 2005). Filmy vyrobené z PLGA smíšené s methoxypolyethylen glykolem (MePEG) použité jako perivaskulární obal s obsahem paclitaxelu, uvolnily tuto antiproliferační látku po třech týdnech pouze z 5 - 10% (Jackson *et al.* 2004).

Obě námi vyvinuté síťky snížily po 14 dnech proliferaci hladkých svalových buněk v kultuře. Silnější účinek měla síťka II. Růst hladkých svalových buněk byl inhibován, aniž by docházelo ke smrti buněk (zjištěno pomocí testu životaschopnosti LIVE/DEAD kitem), což lze považovat za příznivý účinek, který sice zpočátku sníží počet buněk, ale nepoškodí je a zachová jejich fyziologickou funkci, především jejich kontraktilitu.

6. ZÁVĚR

Veškeré materiály, které jsme vyvíjeli pro inženýrství kostní tkáně, umožňovaly kostním buňkám adhezi a růst, neovlivňovaly negativně jejich životaschopnost a podporovaly jejich diferenciaci. Stejně tak látka uvolňovaná ze sítěk, jejímž cílem bylo inhibovat růst hladkých svalových buněk po implantaci cévního stentu, snížila proliferaci buněk, aniž by je poškodila, čímž zachovala jejich životaschopnost.

V této práci jsme připravili a hodnotili vliv povrchový úprav materiálů na chování kostních buněk. Tyto úpravy v sobě zahrnovaly: **změnu v chemismu** (vrstvy čistých fullerenů, kompozity fullerenů a titanu, či fullereny přeměněné v amorfni uhlík), **v topografii vrstev** (fullerenní vrstvy v tenké či tlusté vrstvě, v kontinuální či mikrostrukturované podobě a po expozici vrstev iontům zlata) či **ve funkcionalizaci povrchu** organickými složkami extracelulární matrix (adsorpce kolagenu a chondroitinu sulfátu na PLGA). Poslední částí této práce bylo sledování vlivu postupného uvolňování antiproliferačního léčiva (Sirolimus) na růst a životaschopnost cévních hladkých svalových buněk pro potencionální využití při výrobě umělých cévních náhrad.

Zjistili jsme, že čisté i modifikované fullerenní vrstvy podporovaly adhezi, rozprostření, růst i životaschopnost lidských osteoblastů MG 63. Mikrostrukturované vrstvy C₆₀ a C₆₀/Ti, které na povrchu obsahovaly vyvýšeniny a prohlubně, umožňovaly selektivní růst buněk právě v prohlubních. Po ozáření mikrostrukturovaných vrstev zlatými ionty byla tato selektivita potlačena, což bylo pravděpodobně způsobeno přeměnou fullerenů na hydrofilnější amorfni uhlík. Takto vytvořené mikrostrukturované vzorky by mohly být úspěšně použity v tkáňovém inženýrství pro zajištění selektivního růstu buněk v konkrétních místech implantátu.

Dále jsme došli k závěru, že kromě chemické modifikace je důležitá i tloušťka nanášené fullerenní vrstvy. Růst buněk na silnějších mikrostrukturovaných vrstvách (tj. vrstvách s vyššími nerovnostmi) se projevoval vyšší selektivitou. Buňky se vyskytovaly z mnohem větší části v prohlubních, než tomu bylo u tenčích vrstev (tj. vrstev s nižšími nerovnostmi). Na tenkých mikrostrukturovaných vrstvách rostly buňky homogenně po celém povrchu vzorků. Předpokládáme, že tenké vrstvy jsou na podložním materiálu pevně uchycené a tato mechanická stabilita umožňuje kostním buňkám překlenout topografické nerovnosti, a proto by je bylo možno použít (podobně jako vrstvy kontinuální) k bioaktivnímu nanášení na kostní náhrady, aby se zlepšila jejich integrace do okolní kostní tkáně.

V případě použití PLGA v kostním tkáňovém inženýrství jsme zjistili, že po naadsobování kombinace dvou organických složek extracelulární matrix (kolagenu I a

chondroitin sulfátu) se také zlepšila proliferace kostních buněk MG 63. Buňky na takto ošetřeném povrchu vytvářely pseudopodia, obsahovaly vyšší koncentraci cytoskeletárního proteinu β -aktinu, markeru buněčné adheze a rozprostření, a vytvářely zřetelněji vyvinuté fokální adhezní plaky, jak ukázalo imunofluorescenční barvení vinkulinu. V buňkách na vzorcích s kolagenem a CS byla koncentrace osteokalcinu statisticky významně vyšší v porovnání se vzorky se samotným kolagenem. Z toho plyne, že i chondroitin sulfát lze využít nejen v tkáňovém inženýrství pro vývoj chrupavek, ale může pozitivně ovlivnit i chování kostních buněk.

Poslední práce se zabývala vývojem perivaskulárního systému cílené dodávky antiproliferačního léčiva sirolimu. Námí vytvořený perivaskulární systém je určený k ovinutí kolem žilního štěpu a implantaci do arteriální pozice. Stent se skládá z polyesterové sítě, která zajišťuje mechanickou stabilitu systému, kopolymeru kyseliny L-mléčné a ϵ -kaprolaktonu a z antiproliferační látky sirolimus. Vytvořili jsme dva typy sítěk s odlišnou koncentrací sirolimu. V obou případech vzorky snížily v kultuře proliferaci hladkých svalových buněk. Uvedený perivaskulární systém s řízeným uvolňováním sirolimu je velmi perspektivní pro prevenci proti vzniku intimální hyperplázie a restenóze štěpu.

7. SEZNAM LITERATURY

- ABARRATEGI A, GUTIÉRREZ MC, MORENO-VICENTE C, HORTIGÜELA MJ, RAMOS V, LÓPEZ-LACOMBA JL, FERRER ML, DEL MONTE F: **Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes.** *Biomaterials* **29**: 94-102, 2008.
- ABRAMSON S, ALEXANDER H, BEST S, BOKROS JC, BRUNSKI JB, COLAS A, COOPER SL, CURTIS J, HAUBOLD A, HENSCH LL, HERGENROTHER RW, HOFFMAN AS, HUBBELL JE, JANSEN JA, KING MW, KOHN J, LAMBA NMK, LANGER R, MIGLIARESI C, MORE RB, PEPPAS NA, RATNER BD, VISSER SA, VON RECUM A, WEINBERG S, YANNAS IV: **Classes of material used in medicine.** In: *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine.* BD Ratner, AS HOFFMAN, FJ SCHOEN, JE LEMONS (eds), Elsevier Academic Press, London, 2004, pp 67-137.
- AMARAL M, DIAS AG, GOMES PS, LOPES MA, SILVA RF, SANTOS JD, FERNANDES MH: **Nanocrystalline diamond: In vitro biocompatibility assessment by MG 63 and human bone marrow cells cultures.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **87**: 91-99, 2008.
- ANSELME K, BIGERELLE M: **Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion.** *Acta Biomaterialia* **1**: 211-222, 2005.
- ASADA M, SHINOMIYA M, SUZUKI M, HONDA E, SUGIMOTO R, IKEKITA M, IMAMURA T: **Glycosaminoglycan affinity of the complete fibroblast growth factor family.** *Acta Biochimica et Biophysica* **1790**: 40-48, 2009.
- ASAHARA T, TAKAHASHI T, MASUDA H, KALKA C, CHEN DH, IWAGURO H, INAI Y, SILVER M, ISNER JM: **VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *EMBO Journal* **18**: 3964-3972, 1999.

- ASPENBERG P, ANTTILA A, KONTTINEN YT, LAPPALAINEN R, GOODMAN SB, NORDSLETTEN L, SANTAVIRTA S: **Benign response to particles of diamond and SiC: bone chamber studies of new joint replacement coating materials in rabbits.** *Biomaterials* **17**: 807-812, 1996.
- BAČÁKOVÁ L, STARÝ V, KOFROŇOVÁ O, LISÁ V: **Polishing and coating carbon fiber-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG63 cells and vascular smooth muscle cells in vitro.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **54**: 567-578, 2001.
- BAČÁKOVÁ L, FILOVÁ E, RYPÁČEK F, ŠVORČÍK V, STARÝ V: **Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering.** *Physiological Research* **53** (Suppl 1): S35-S45, 2004.
- BAČÁKOVÁ L, FILOVÁ E, KUBIES D, MACHOVÁ L, PROKS V, MALINOVÁ V, LISÁ V, RYPÁČEK F: **Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on bioactive RGD peptide-carrying polylactides.** *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **18**: 1317-1323, 2007a.
- BAČÁKOVÁ L, GRAUSOVÁ L, VACÍK J, FRACZEK A, BLAZEWCZ S, KROMKA A, VANĚČEK M, ŠVORČÍK V: **Improved adhesion and growth of human osteoblast-like MG63 cells on biomaterials modified with carbon nanoparticles.** *Diamond & Related Materials* **16**: 2133-2140, 2007b.
- BAČÁKOVÁ L, GRAUSOVÁ L, VANDROVCOVÁ M, VACÍK J, FRACZEK A, BLAZEWCZ S, KROMKA A, VANĚČEK M, NESLÁDEK M, KOPEČEK M: **Carbon nanoparticles as substrates for cell adhesion and growth.** In: *Nanoparticles: New Research*. FRANK COLUMBUS (ed), Nova Science Publisher, New York, 39-107, 2008.
- BAČÁKOVÁ L, ŠVORČÍK V: **Cell Colonization Control by Physical and Chemical Modification of Materials.** In: *Cell Growth Processes: New Research*. Daiki Kimura (ed), 2008, pp 5-56.

- BAČÁKOVÁ L, FILOVÁ E, PAŘÍZEK M, RUML T, ŠVORČÍK V: **Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants.** *Biotechnology Advances*, accepted, in press, 2011.
- BAJAJ P, AKIN D, GUPTA A, SHERMAN D, SHI B, AUCIELLO O, BASHIR R: **Ultrananocrystalline diamond film as an optimal cell interface for biomedical applications.** *Biomedical Microdevices* **9**: 787-794, 2007.
- BALANI K, ANDERSON R, LAHA T, ANDARA M, TERCERO J, CRUMPLER E, AGARWAL A: **Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro.** *Biomaterials* **28**: 616-624, 2007.
- BARRETT KE, BARMAN SM, BOITANO S, BROOKS H: **Ganong's Review of Medical Physiology, 23e.** Chapter 23. Hormonal Control of Calcium & Phosphate Metabolism & the Physiology of Bone. Electronic access at <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aid=5244785>
- BELFIORE LA, BONANI W, LEONI M, BELFIORE CJ: **Pressure-sensitive nutrient consumption via dynamic normal stress in rotational bioreactors.** *Biophysical Chemistry* **140**: 99-107, 2009.
- BELLINGHAM CM, LILLIE MA, GOSLINE JM, WRIGHT GM, STARCHER BC, BAILEY AJ, WOODHOUSE KA, KEELEY FW. **Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties.** *Biopolymers* **70**: 445-455, 2003.
- BENOIT DS, ANSETH KS: **Heparin functionalized PEG gels that modulate protein adsorption for hMSC adhesion and differentiation.** *Acta Biomaterialia* **1**: 461-470, 2005.
- BIERBAUM S, DOUGLAS T, HANKE T, SCHARNWEBER D, TIPPELT S, MONSEES TK, FUNK RH, WORCH H: **Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: characterization and influence on osteoblastic cells.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **77**: 551-562, 2006.

- BÖLGEN N, YANG Y, KORKUSUZ P, GÜZEL E, EL HAJ AJ, PIŞKIN E: **Three-dimensional ingrowth of bone cells within biodegradable cryogel scaffolds in bioreactors at different regimes.** *Tissue Engineering. Part A* **14**: 1743-1750, 2008.
- BORDENAVE L, FERNANDEZ P, RÉMY-ZOLGHADRI M, VILLARS S, DACULSI R, MIDY D: **In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization.** *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **33**: 227-234, 2005.
- BORN AK, ROTTMAR M, LISCHER S, PLESKOVA M, BRUININK A, MANIURA-WEBER K: Correlating cell architecture with osteogenesis: **First steps towards live single cell monitoring.** *European Cells and Materials* **18**: 49-62, 2009.
- BRUININK A, SCHROEDER A, FRAN CZ G, HAUERT R: **In vitro studies on the effect of delaminated a-C:H film fragments on bone marrow cell cultures.** *Biomaterials* **26**: 3487-3494, 2005.
- BRYNDA E, PACHERNÍK J, HOUSKA M, PIENKA Z, DVOŘÁK P: **Surface immobilized protein multilayers for cell seeding.** *Langmuir* **21**: 7877-7883, 2005.
- CASSELL OCS, HOFER SOP, MORRISON WA, KNIGHT KR: **Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states.** *British Journal of Plastic Surgery* **55**: 603-610, 2002.
- CHAREST JL, BRYANT LE, GARCIA AJ, KING WP: **Hot embossing for micropatterned cell substrates.** *Biomaterials* **25**: 4767-4775, 2004.
- CHEN YW, HWANG KC, YEN CC, LAI YL: **Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemie-reperfused lungs.** *American Journal of physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **287**: R21-R26, 2004.
- CHEN X, TAM UC, CZLAPINSKY JL, LEE GS, RABUKA D, ZETTL A, BERTTOZZI CR: **Interfacing carbon nanotubes with living cells.** *Journal of American Chemical Society* **128**: 6292-6293, 2006.

- CHRISTENSON EM, ANSETH KS, VAN DEN BEUCKEN JJJP, CHAN CK, ERCAN B, JANSEN JA, LAURENCIN CT, LI WJ, MURUGAN R, NAIR LS, RAMAKRISHNA S, TUAN RS, WEBSTER TJ, MIKOS AG: **Nanobiomaterial applications in orthopedics.** *Journal of Orthopaedic Research* **25**: 11-22, 2007.
- CLARK P: **Cell behaviour on micropatterned surfaces.** *Biosensors and Bioelectronics* **9**: 657-661, 1994.
- COLOMBO A, IAKOVOU I: **Drug-eluting stents: the new gold standard for percutaneous coronary revascularisation.** *European Heart Journal* **25**: 895-897, 2004.
- CONKLIN BS, RICHTER ER, KREUTZIGER KL, ZHONG DS, CHEN C: **Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft.** *Medical Engineering & Physics* **24**: 173-183, 2002.
- CROWLEY C, TAYLOR R, KROTO HW, WALTON DRM, CHENG PC, SCOTT LT: **Pyrolytic production of fullerenes.** *Synthetic Metals* **77**: 17-22, 1996.
- CUI D, TIAN F, OZKAN CS, WANG M, GAO H: **Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells.** *Toxicology Letters* **155**: 73-85, 2005.
- CULPEPPER BK, PHIPPS MC, BONVALLET PP, BELLIS SL: **Enhancement of peptide coupling to hydroxyapatite and implant osseointegration through collagen mimetic peptide modified with a polyglutamate domain.** *Biomaterials* **31**: 9586-9594, 2010.
- DAVOREN M, HERZOG E, CASEY A, COTTINEAU B, CHAMBERS G, BYRNE HJ, LYNG FM: **In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells.** *Toxicology In Vitro* **21**: 438-448, 2007.
- DE OLIVEIRA PT, NANCI A: **Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells.** *Biomaterials* **25**: 403-413, 2004.

- DE OLIVEIRA PT, ZALZAL SF, BELOTI MM, ROSA AL, NANCI A: **Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **80**: 554-564, 2007.
- DEARNALEY G: **Diamond-like carbon: a potential means of reducing wear in total joint replacements.** *Clinical Materials* **12**: 237-244, 1993.
- DEARNALEY G, ARPS JH: **Biomedical applications of diamond-like (DLC) coating: A review.** *Surface & Coatings Technology* **200**: 2518-2524, 2005.
- DEE KC, ANDERSEN TT, BIZIOS R: **Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **40**: 371-377, 1998.
- DHAWAN A, TAUROZZI JS, PANDEY AK, SHAN WQ, MILLER SM, HASHSHAM SA, TARABARA VV: **Stable colloidal dispersions of C-60 fullerenes in water: Evidence for gonotoxicity.** *Environmental Science & Technology* **40**: 7394-7401, 2006.
- DOUGLAS T, HEINEMANN S, MIETRACH C, HEMPEL U, BIERBAUM S, SCHARNWEBER D, WORCH H: **Interactions of collagen types I and II with chondroitin sulfates A-C and their effect on osteoblast adhesion.** *Biomacromolecules* **8**: 1085-1092, 2007.
- DOWLING DP, KOLA PV, DONELLY K, KELLY TC, BRUMITT K, LLOYD L, ELOY R, THERIN M, WEILL N: **Evaluation of diamond-like carbon-coated orthopaedic implants.** *Diamond & Related Materials* **6**: 390-393, 1997.
- DRESSELHAUS MS, DRESSELHAUS G, EKLUND PC: **Science of fullerenes and carbon nanotubes.** Academic Press Inc., (ed) New York, 1996.
- DUCY P, SCHINKE T, KARSENTY G: **The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance.** *Science* **289**: 1501-1504, 2000.

- DUMORTIER H, LACOTTE S, PASTORIN G, MAREGA R, WU W, BONIFAZI D, BRIAND JP, PRATO M, MULLER S, BIANCO A: **Functionalized carbon nanotubes are non-toxic and preserve the functionality of primary immune cells.** *Nano Letters* **6**: 1522-1528, 2006.
- EISENBARTH E, LINEZ P, BIEHL V, BREME J, HILDEBRAND HF: **Cell orientation and cytoskeleton organisation on ground titanium surfaces.** *Biomolecular Engineering* **19**: 233–238, 2002.
- EKAPUTRA AK, PRESTWICH GD, COOL SM, HUTMACHER DW: **Combining electrospun scaffolds with electrosprayed hydrogels leads to three-dimensional cellularization of hybrid constructs.** *Biomacromolecules* **9**: 2097-2103, 2008.
- ELAM J: **Development of ultracrystalline diamond (UNCD) coatings.** *Materials, Sensor & Automation and Glass Project Review*: 21-24, 2004.
- ENGLER A, BAČÁKOVÁ L, NEWMAN C, HATEGAN A, GRIFFIN M, DISCHER D: **Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses.** *Biophysical Journal* **86**: 617-628, 2004.
- EZZELL RM, GOLDMANN WH, WANG N, PARASHURAMA N, INGBER DE: **Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton.** *Experimental Cell Research* **231**: 14-26, 1997.
- FERNANDEZ P, DEGUETTE A, POTHUAUD L, BELLEANNÉE G, COSTE P, BORDENAVE L: **Quality control assessment of ePTFE precoating procedure for in vitro endothelial cell seeding.** *Biomaterials* **26**: 5042-5047, 2005.
- FERRARA N: **Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor.** *Journal of Molecular Medicine* **77**: 527-543, 1999.

- FILOVÁ E, BULLETT NA, BAČÁKOVÁ L, GRAUSOVÁ L, HAYCOCK JW, HLUČILOVÁ J, KLÍMA J, SHARD A: **Regionally-selective cell colonization of micropatterned surfaces prepared by plasma polymerisation of acrylic acid and 1,7-octadiene.** *Physiological Research* **58**: 669-684, 2009a.
- FILOVÁ E, BRYNDA E, RIEDEL T, BAČÁKOVÁ L, CHLUPÁČ J, LISÁ V, HOUSKA M, DYR JE: **Vascular endothelial cells on two- and three-dimensional fibrin assemblies for biomaterial coatings.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **90**: 55-69, 2009b.
- FINKELSTEIN A, MCCLEAN D, KAR S, TAKIZAWA K, VARGHESE K, BAEK N, PARK K, FISHBEIN MC, MAKKAR R, LITVACK F, EIGLER NL: **Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics.** *Circulation* **107**: 777-784, 2003.
- FUMELLI C, MARCONI A, SALVIOLI S, STRAFACE E, MALORNI W, OFFIDANI AM, PELLICCIARI R, SCHETTINI G, GIANNETTI A, MONTI D, FRANCESCHI C, PINECEI C: **Carboxylfullerenes protect human keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis.** *Journal of Investigative Dermatology* **115**: 853-841, 2000.
- GARDINIER JD, MAJUMDAR S, DUNCAN RL, WANG L: **Cyclic hydraulic pressure and fluid flow differentially modulate cytoskeleton re-organization in MC3T3 osteoblasts.** *Cellular and Molecular Bioengineering* **2**: 133-143, 2009.
- GEETHA M, SINGH AK, ASOKAMANI R: **Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review.** *Materials Science* **54**: 397-425, 2009.
- GEISSLER U, HEMPEL U, WOLF C, SCHARNWEBER D, WORCH H, WENZEL K: **Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **51**: 752-760, 2000.
- GODBEY WT, HINDY SB, SHERMAN ME, ATALA A: **A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds.** *Biomaterials* **25**: 2799-2805, 2004.

- GOLDSTEIN AS, ZHU G, MORRIS GE, MESZLENYI RK, MIKOS AG: **Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foam scaffolds.** *Tissue Engineering* **5**: 421-434, 1999.
- GOLOMB G, FISHBEIN I, BANAI S, MISHALY D, MOSCOVITZ D, GERTZ SD, GAZIT A, PORADOSU E, LEVITZKI A: **Controlled delivery of a tyrphostin inhibits intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model.** *Arteriosclerosis* **125**: 171-182, 1996.
- GONZALES KA, WILSON LJ, WU W, NANCOLLAS GH: **Synthesis and in vitro characterization of tissue-selective fullerene: vectoring C60(OH)16AMBP to mineralized bone.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**: 1991-1997, 2002.
- GOYAL RN, GUPTA VK, BACHHETI N: **Fullerene-C-60 modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone - An anabolic steroid used in doping.** *Analytica Chimica Acta* **597**: 82-89, 2007.
- GRAUSOVÁ L, VACÍK J, BÍLKOVÁ P, VORLÍČEK V, ŠVORČÍK V, SOUKUP D, BAČÁKOVÁ M, LISÁ V, BAČÁKOVÁ L: **Regionally-selective adhesion and growth of human osteoblast-like MG 63 cells on micropatterned fullerene C60 layers.** *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **10**: 2071-2076, 2008a.
- GRAUSOVÁ L, KROMKA A, BAČÁKOVÁ L, POTOCKÝ S, VANĚČEK M, LISÁ: **Bone and vascular endothelial cells in cultures on nanocrystalline diamond films.** *Diamond & Related Materials* **17**: 1405-1409, 2008b.
- GRAUSOVÁ L, BAČÁKOVÁ L, KROMKA A, VANĚČEK M, LISÁ V: **Molecular markers of adhesion, maturation and immune activation of human osteoblast-like MG 63 cells on nanocrystalline diamond films.** *Diamond & Related Materials* **18**: 258–263, 2009a.
- GRAUSOVÁ L, VACÍK J, VORLÍČEK V, ŠVORČÍK V, SLEPIČKA P, BÍLKOVÁ P, VANDROVCOVÁ M, LISÁ V, BAČÁKOVÁ L: **Fullerene C60 films of continuous and micropatterned morphology as substrates for adhesion and growth of bone cells.** *Diamond & Related Materials* **18**: 578-586, 2009b.

- GRAUSOVA L, KROMKA A, BURDIKOVA Z, ECKHARDT A, REZEK B, VACIK J, HAENEN K, LISA V, BACAKOVA L: **Enhanced growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells on boron-doped nanocrystalline diamond thin films.** *PLoS One* **6**: e20943, 2011.
- GRILL A: **Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials - an overview.** *Diamond & Related Materials* **12**: 166-170, 2003.
- GRINEVICH A, BAČÁKOVÁ L, CHOUKOUROV A, BOLDYRYEVA H, PIHOSH Y, SLAVINSKÁ D, NOSKOVÁ L, ŠKUCIOVÁ M, LISÁ V, BIEDERMAN H: **Nanocomposite Ti/hydrocarbon plasma polymer films from reactive magnetron sputtering as growth supports for osteoblast-like and endothelial cells.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **88**: 952-966, 2009.
- GUO S, NAGEL PM, DEERING AL, VAN LUE SM, KANDEL SA: **Scanning tunneling microscopy of surface-adsorbed fullerenes: C-60, C-70, and C-84.** *Surface Science* **601**: 994-1000, 2007.
- HAMILTON DW, BRUNETTE DM: **The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation.** *Biomaterials* **28**: 1806-1819, 2007.
- HANKENSON KD, DISHOWITZ M, GRAY C, SCHENKER M: **Angiogenesis in bone regeneration.** *Injury: International Journal of the Care of the Injured* **42**: 556-561, 2011.
- HAUSLEITER J, KASTRATI A, WESSELY R, DIBRA A, MEHILLI J, SCHRATZENSTALLER T, GRAF I, RENKE-GLUSZKO M, BEHNISCH B, DIRSCHINGER J, WINTERMANTEL E, SCHOMIG A: **FASTTRACK - Prevention of restenosis by a novel drug-eluting stent system with a dose-adjustable, polymerfree, on-site stent coating.** *European Heart Journal* **26**: 1475-1481, 2005.
- HE W, MA Z, YONG T, TEO WE, RAMAKRISHNA S: **Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth.** *Biomaterials* **26**: 7606-7615, 2005.

- HE J, ZHOU W, ZHOU X, ZHONG X, ZHANG X, WAN P, ZHU B CHEN W: **The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **19**: 3465-3472, 2008.
- HOUCHIN ML, TOPP EM: **Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* **97**: 2395-2404, 2008.
- HUANG SS, TSAI SK, CHIH CL, CHIANG LY, HSIEH HM, TENG CM, TSAI MC: **Neuroprotective effect of hexasulfobutylated C-60 on rats subjected to focal cerebral ischemia.** *Free Radical Biology and Medicine* **30**: 643-649, 2001.
- IJIMA S: **Helical microtubules of graphitic carbon.** *Nature* **354**: 56-58, 1991.
- ISAKOVIC A, MARKOVIC Z, TODOROVIC-MARKOVIC B, NIKOLIC N, VRANJES-DJURIC S, MIRKOVIC M, DEAMICANIN M, HARHAJI L, RAICEVIC N, NIKOLIC Z, TRAJKOVIC V: **Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene.** *Toxicological Sciences* **91**: 173-183, 2006.
- ITO Y: **Surface micropatterning to regulate cell functions.** *Biomaterials* **20**: 2333-2342, 1999.
- JACKSON JK, SMITH J, LETCHFORD K, BABIUK KA, LINDSAY M, SIGNORE P, HUNTER WL, WANG KY, BURT HM: **Characterization of perivascular poly (lactic-co-glycolic acid) films containing paclitaxel.** *International Journal of Pharmaceutics* **283**: 97-109, 2004.
- KAARTINEN MT, PIRHONEN A, LINNALA-KANKKUNEN A, MÄENPÄÄ PH: **Transglutaminase-catalyzed cross-linking of osteopontin is inhibited by osteocalcin.** *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 22736-22741, 1997.

- KALBÁČOVÁ M, REZEK B, BAREŠOVÁ V, WOLF-BRANDSTETTER C, KROMKA A.: **Nanoscale topography of nanocrystalline diamonds promotes differentiation of osteoblasts.** *Acta Biomaterialia* **5**: 3076-3085, 2009.
- KANAZAWA I, YAMAGUCHI T, YANO S, YAMAUCHI M, YAMAMOTO M, SUGIMOTO T: **Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells.** *BMC Cell Biology* **8**: 51, 2007.
- KANNAN RY, SALACINSKI HJ, BUTLER PE, HAMILTON G, SEIFALIAN AM: **Current status of prosthetic bypass grafts: A Review.** *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* **74**: 570-581, 2005.
- KARAGEORGIU V, KAPLAN D: **Porosity of 3D biornaterial scaffolds and osteogenesis.** *Biomaterials* **26**: 5474-5491, 2005.
- KASPAR D, SEIDL W, NEIDLINGER-WILKE C, CLAES L: **In vitro effects of dynamic strain on the proliferative and metabolic activity of human osteoblasts.** *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interaction* **1**: 161-164, 2000.
- KAWASE T, TANAKA K, SEIRAI Y, SHIONO N, ODA M: **Complexation of carbon nanorings with fullerene: Supramolecular dynamics and structural tuning for a fullerene sensor.** *Angewandte Chemie-International Edition* **42**: 5597-5600, 2003.
- KENAR H, KOSE GT, HASIRCI V: **Tissue engineering of bone on micropatterned biodegradable polyester films.** *Biomaterials* **27**: 885-895, 2006.
- KERESZTES Z, ROUXHET PG, REMACLE C, DUPONT-GILLAIN C: **Supramolecular assemblies of adsorbed collagen affect the adhesion of endothelial cells.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **76**: 223-233, 2006.
- KHANG D, LU J, YAO CH, HABERSTROH KM, WEBSTER TJ: **The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium.** *Biomaterials* **29**: 970-983, 2008.

- KISIN ER, MURRAY AR, KEANE MJ, SHI XC, SCHWEGLER-BERRY D, GORELIK O, AREPALLI S, CASTRANOVA V, WALLACE WE, KAGAN VE, SHVEDOVA AA: **Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells.** *Journal of Toxicology and Environmental Health A* **70**: 2071-2079, 2007.
- KOKKINOS PA, ZARKADIS IK, PANIDIS TT, DELIGIANNI DD: **Estimation of hydrodynamic shear stresses developed on human osteoblasts cultured on Ti-6Al-4V and strained by four point bending. Effects of mechanical loading to specific gene expression.** *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **20**: 655-665, 2009.
- KROTO HW, HEATH JR, O'BRIEN SC, CURL RF, SMALLEY RE: **C₆₀: Buckminsterfullerene.** *Nature* **318**: 162-163, 1985.
- KUNZLER TP, HUWILER CH, DROBEK T, VÖRÖS J, SPENCER ND: **Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradient.** *Biomaterials* **28**: 5000-5006, 2007.
- LAI HS, CHEN Y, CHEN WJ, CHANG KJ, CHIANG LY: **Free radical scavenging activity of fullereneol on grafts after small bowel transplantation in dogs.** *Transplantation Proceedings* **32**: 1272-1274, 2000.
- LANGER R, VACANTI JP: **Tissue engineering.** *Science* **260**: 920-926, 1993.
- LEVI N, HANTGAN RR, LIVELY MO, CARROLL DL, PRASAD G: **C₆₀-Fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects.** *Journal of Nanobiotechnology* **4**: 1-11, 2006.
- LIN JC, WU CH: **Surface characterization and platelet adhesion studies on polyurethane surface immobilized with C₆₀.** *Biomaterials* **20**: 1623-1620, 1999.
- LING L, MURALI S, DOMBROWSKI C, HAUPT LM, STEIN GS, VAN WIJNEN AJ, NURCOMBE V, COOL SM: **Sulfated glycosaminoglycans mediate the effects of FGF2 on the osteogenic potential of rat calvarial osteoprogenitor cells.** *Journal of Cellular Physiology* **209**: 811-825, 2006.

- LINCKS J, BOYAN BD, BLANCHARD CR, LOHMANN CH, LIU Y, COCHRAN DL, DEAN DD, SCHWARTZ Z: **Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition.** *Biomaterials* **19**: 2219-2232, 1998.
- LINCOFF AM, FURST JG, ELLIS SG, TUCH RJ, TOPOL EJ: **Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model.** *Journal of the American College of Cardiology* **29**: 808-816, 1997
- LINEZ-BATAILLON P, MONCHAU F, BIGERELLE M, HILDEBRAND HF: **In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates.** *Biomolecular Engineering* **19**: 133-141, 2002.
- LIPKE EA, WEST JL: **Localized delivery of nitric oxide from hydrogels inhibits neointima formation in a rat carotid balloon injury model.** *Acta Biomaterialia* **1**: 597-606, 2005.
- LIU H, YAZICI H, ERGUN C, WEBSTER TJ, BERMEK H: **An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration.** *Acta Biomaterialia* **4**: 1472-1479, 2008.
- LIUZZO JP, AMBROSE JA, COPPOLA JT: **Sirolimus- and taxol-eluting stents differ towards intimal hyperplasia and re-endothelization.** *The Journal of Invasive Cardiology* **17**: 497-502, 2005.
- LONG M, RACK HJ: **Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective.** *Biomaterials* **19**: 1621-1639, 1998.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275, 1951.

- MA Z, GAO C, GONG Y, SHEN J: **Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor.** *Biomaterials* **26**: 1253-1259, 2005.
- MACDONALD RA, LAURENZI BF, VISWANTHAN G, AJAYAN PM, STEGEMANN JP. **Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **74**: 489-496, 2005.
- MATSUMOTO K, SATO C, NAKA Y, KITAZAWA A, WHITBY RLD, SHIMIZU N. **Neurite outgrowths with neurotrophin-coated carbon nanotubes.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* **103**: 216-220, 2007.
- MATTSON MP, HADDON RC, RAO AM. **Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth.** *Journal of Molecular Neuroscience* **14**: 175-182, 2000.
- MAUNEY JR, SJOSTORM S, BLUMBERG J, HORAN R, O'LEARY JP, VUNJAK-NOVAKOVIC G, VOLLOCH V, KAPLAN DL: **Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro.** *Calcified Tissue International* **74**: 458-468, 2004.
- MEHILLI J, BYRNE RA, WIECZOREK A, IJIMA R, SCHULZ S, BRUSKINA O, PACHE J, WESSLEY R, SCHOEMIG A, KASTRATI A: **Randomized trial of three rapamycin-eluting stents with different coating strategies for the reduction of coronary restenosis.** *European Heart Journal* **29**: 1875-1982, 2008.
- MEHTA D, GEORGE SJ, JEREMY JY, IZZAT MB, SOUTHGATE KM, BRYAN AJ, NEWBY AC, ANGELINI GD: **External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting.** *Nature Medicine* **4**: 235-239, 1998.
- MENDONÇA G, MENDONÇA DBS, ARAGÃO FJL, COOPER LF: **Advancing dental implant surface technology – From micron- to nanotopography.** *Biomaterials* **29**: 3822-3835, 2008.

- MERETOJA VV, MALIN M, SEPPÄLÄ JV, NÄRHI TO: **Osteoblast response to continuous phase macroporous scaffolds under static and dynamic culture conditions.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **89**: 317-325, 2009.
- MI FL, SHYU SS, PENG CK, WU YB, SUNG HW, WANG PS, HUANG CC: **Fabrication of chondroitin sulfate-chitosan composite artificial extracellular matrix for stabilization of fibroblast growth factor.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **76**: 1-15, 2006.
- MIKULIKOVÁ R, MORITZ S, GUMPENBERGER T, OLBRICH M, ROMANIN C, BAČÁKOVÁ L, ŠVORČÍK V, HEITZ J: **Cell microarrays on photochemically modified polytetrafluorethylene.** *Biomaterials* **26**: 5572-5580, 2005.
- MIYAZAKI T, MIYAUCHI S, TAWADA A, ANADA T, MATSUZAKA S, SUZUKI O: **Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation.** *Journal of Cellular Physiology* **217**: 769-777, 2008.
- MORICE M, SERRUYS PW, SOUSA JE, FAJADET J, HAYASHI EB, PERIN M, COLOMBO A, SCHULER G, BARRAGAN P, GUAGLIUMI G, MOLNAR F, FALOTICO R: **A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization.** *New England Journal of Medicine* **346**: 1773-1780, 2002.
- NAKAMURA E, ISOBE H: **Functionalized fullerenes in water. The first 10 years of their chemistry, biology, and nanoscience.** *Accounts of Chemical Research* **36**: 807-815, 2003.
- NANDINI CD, SUGAHARA K: **Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors.** *Advances in Pharmacology* **53**: 253-279, 2006.
- NEWBY AC, ZALTSMAN AB. **Molecular mechanisms in intimal hyperplasia.** *Journal of Pathology* **190**: 300-309, 2000.

NORDSLETTEN L, HØGÅSEN AKM, KONTTINEN YT, SANTAVIRTA S, ASPENBERG P, AASEN AO: **Human monocytes stimulation by particles of hydroxyapatite, silicon carbide and diamond: in vitro studies of new prosthesis coatings.** *Biomaterials* **17**: 1521-1527, 1996.

NUGENT HM, EDELMAN ER: **Endothelial implants provide long-term control of vascular repair in a porcine model of arterial injury.** *The Journal of Surgical Research* **99**: 228-234, 2001.

OLIVIER V, HIVART P, DESCAMPS M, HARDOUIN P: **In vitro culture of large bone substitutes in a new bioreactor: importance of the flow direction.** *Biomedical Materials* **2**: 174-180, 2007.

OWEN SC, LI HA, SANDERS WG, CHEUNG AK, TERRY CM: **Correlation of tissue drug concentrations with in vivo magnetic resonance images of polymer drug depot around arteriovenous graft.** *Journal of Controlled Release* **146**: 23-30, 2010.

PACIFICI R: **Cytokines, estrogen, and postmenopausal, osteoporosis - the second decade.** *Endocrinology* **139**: 2659-2661, 1998.

PAMULA E, BAČÁKOVÁ L, FILOVÁ E, BUCZYNSKA J, DOBRZYNSKI P, NOSKOVÁ L, GRAUSOVÁ L: **The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro.** *Journal of Materials Sciences. Materials in Medicine* **19**: 425-435, 2008.

PAMULA E, MENASZEK E: **In vitro and in vivo degradation of poly(L-lactide-co-glycolide) films and scaffolds.** *Journal of Materials Sciences. Materials in Medicine* **19**: 2063-2070, 2008.

PAMULA E, FILOVÁ E, BAČÁKOVÁ L, LISÁ V, ADAMCZYK D: **Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: The influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **89**: 432-443, 2009.

- PAPENBURG BJ, VOGELAAR L, BOLHUIS-VERSTEEG LAM, LAMMERTINK RGH, STAMATIALLIS D, WESSLING M: **One-step fabrication of porous micropatterned scaffolds to control cell behavior.** *Biomaterials* **28**: 1998-2009, 2007.
- PAPO MJ, CATLEDGE SA, VOHRA YK, MACHADO C: **Mechanical wear behavior of nanocrystalline and multilayer diamond coatings on temporomandibular joint implants.** *Journal of Materials Sciences. Materials in Medicine* **15**: 773-777, 2004.
- PAULSEN DF: **Histologie a buněčná biologie: Opakování a příprava ke zkouškám.** 1. vydání. Jinočany: H & H, 2004.
- PIRES NMM, VAN DER HOEVEN BL, DE VRIES MR, HAVEKES LM, VAN VLIJMEN BJ, HENNINK WE, QUAX PHA, JUKEMA JW: **Local perivascular delivery of anti-restenotic agents from a drug-eluting poly(epsilon-caprolactone) stent cuff.** *Biomaterials* **26**: 5386-5394, 2005.
- PODOĽSKIĬ IY, KONDRATEVA EV, SHCHEGLOV IV, DUMPIS MA, PIOTROVSKIĬ LB: **Fullerene C₆₀ complexed with poly(N-vinyl-pyrrolidone) prevents the disturbance of long-term memory consolidation.** *Physics of the Solid State* **44**: 578-580, 2002.
- PRICE RL, ELLISON K, HABERSTROH KM, WEBSTER TJ: **Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **70**: 129-138, 2004.
- QIN LC, ZHOUD, KRAUSS AR, GRUEN DM: **TEM characterizaion of nanodiamond thin films.** *Nanostructured Materials* **10**: 649-660, 1998.
- RATNER BD: **A history of biomaterials.** In: *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine.* BD Ratner, AS HOFFMAN, FJ SCHOEN, JE LEMONS (eds), Elsevier Academic Press, London, 2004, pp 10-19.

- REN LL, MA DY, FENG X, MAO TQ, LIU YP, DING Y: **A novel strategy for prefabrication of large and axially vascularized tissue engineered bone by using an arteriovenous loop.** *Medical Hypotheses* **71**: 737-740, 2008.
- RENTSCH C, HESS R, RENTSCH B, HOFMANN A, MANTHEY S, SCHARNWEBER D, BIEWENER A, ZWIPP H: **Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* **46**: 624-634, 2010.
- RICE JM, HUNT JA, GALLAGHER JA, HANARP P, SUTHERLAND DS, GOLD J: **Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblast and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model in vitro.** *Biomaterials* **24**: 4799-4818, 2003.
- RODAN GA, MARTIN TJ: **Therapeutic approaches to bone diseases.** *Science* **289**: 1508-1514, 2000.
- ROEHLECKE C, WITT M, KASPER M, SCHULZE E, WOLF C, HOFER A, FUNK RW: **Synergistic effect of titanium alloy and collagen type I on cell adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells.** *Cells Tissues Organs* **168**: 178-187, 2001.
- RORIVE GL, CARLIER PJ, FOIDART JM: **Hyperplasia of rat arteries smooth muscle cells associated with development and reversal of renal hypertension.** *Clinical Science* **59** Suppl 6: 335s-338s, 1980.
- ROSA AL, BELOTI MM: **Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation.** *Brazilian Dental Journal* **14**: 16-21, 2003.
- RUDNIK V, SANYAL A, SYED FA, MONROE DG, SPELSBERG TC, OURSLER MJ, KHOSLA S: **Loss of ERE binding activity by estrogen receptor-alpha alters basal and estrogen-stimulated bone-related gene expression by osteoblastic cells.** *Journal of Cellular Biochemistry* **103**: 896-907, 2008.

- SAWADA Y, SHEETZ MP: **Force transduction by Triton cytoskeletons.** *Journal of Cell Biology* **156**: 609-615, 2002.
- SAWASE T, JIMBO R, BABA K, SHIBATA Y, IKEDA T, ATSUTA M: **Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition.** *Clinical Oral Implants Research* **19**: 491-496, 2008.
- SAYES C, GOBIN AM, AUSMAN KD, MENDEZ J, WEST JL, COLVIN VL: **Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation.** *Biomaterials* **26**: 7587-7595, 2005.
- SCAGLIONE S, WENDT D, MIGGINO S, PAPADIMITROPOULOS A, FATO M, QUARTO R, MARTIN I: **Effects of fluid flow and calcium phosphate coating on human bone marrow stromal cells cultured in a defined 2D model system.** *Journal of Biomedical Materials Research A* **86**: 411-419, 2008.
- SCHRAND AM, HUANG H, CARLSON C, SCHLAGER JJ, OSAWA E, HUSSAIN SM, DAI L: **Are diamond nanoparticles cytotoxic?** *The Journal of Physical Chemistry B* **111**: 2-7, 2007.
- SCHROEDER A, FRAN CZ G, BRUININK A, HAUERT R, MAYER J, WINTERMANTEL E: **Titanium containing amorphous hydrogenated carbon films (a-C:H/Ti): surface analysis and evaluation of cellular reactions using bone marrow cell cultures in vitro.** *Biomaterials* **21**: 449-456, 2000.
- SCHWARTZ Z, BELL BF, WANG L, ZHAO G, OLIVARES-NAVARRETE R, BOYAN BD: **Beta-1 integrins mediate substrate dependent effects of 1 α ,25(OH)₂D₃ on osteoblasts.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **103**: 606-609, 2007.
- SEDLÁK J, PÍŠKA M: **Výroba implantátů.** *MM Průmyslové spektrum* **3**: 74, 2008; electronic article at <http://www.mmspektrum.com/clanek/vyroba-implantatu> (in Czech).

- STADLINGER B, PILLING E, HUHLE M, MAI R, BIERBAUM S, BERNHARDT R, SCHARNWEBER D, KUHLISCH E, HEMPEL U, ECKELT U: **Influence of extracellular matrix coatings on implant stability and osseointegration: an animal study.** *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials* **83**: 222-231, 2007.
- STARÝ V, BAČÁKOVÁ L, HORNÍK J, CHMELÍK V: **Bio-compatibility of the surface layer of pyrolytic graphite.** *Thin Solid Films*, **433**: 191-198, 2003a.
- STARÝ V, GLOGAR P, BAČÁKOVÁ L, HNILICA F, CHMELÍK V, KOŘÍNEK Z, GREGOR J, MAREŠ V, LISÁ V: **A study of surface properties of composite materials and their influence on the biocompatibility.** *Acta Montana AB* **11**: 19-36, 2003b.
- STEINEMANN SG: **Titanium - the material of choice?** *Periodontology* **17**: 7-21, 1998.
- STRAFACE E, NATALINI B, MONTI D, FRANCESCHI C, SCHETTINI G, BISAGLIA M, FUMELLI C, PINCELLI C, PELLICCIARI R, MALORNI W: **C-3-Fullero-tris-methanodicarboxylic acid protects epithelial cells from radiation-induced anoikia by influencing cell adhesion ability.** *FEBS Letters* **454**: 335-340, 1999.
- SUZUKI T, KOPIA G, HAYASHI S, BAILEY LR, LLANOS G, WILENSKY R, KLUGHERZ BD, PAPANDREOU G, NARAYAN P, LEON MB, YEUNG AC, TIO F, TSAO PS, FALOTICO R, CARTER AJ: **Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model.** *Circulation* **104**: 1188-1193, 2001.
- TAN L, MEYER T, PFAU B, HOFMANN T, TAN TW, JONES D: **Rapid vinculin exchange dynamics at focal adhesions in primary osteoblasts following shear flow stimulation.** *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* **10**: 92-99, 2010.
- TAN J, SALTZMAN WM: **Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure.** *Biomaterials* **25**: 3593-3601, 2004.
- TANG L, TSAI C, GERBERICH WW, KRUCKEBERG L, KANIA DR: **Biocompatibility of chemical-vapour-deposited diamond.** *Biomaterials* **16**: 483-488, 1995.

- TANG YJJ, ASHCROFT JM, CHEN D, MIN GW, KIN CH, MURHEJEE B, LARABELL C, KEASLING JD, CHEN FDF: **Charge-associated effects of fullerene derivatives on microbial structural integrity and central metabolism.** *Nano Letters* **7**: 754-760, 2007.
- TAYLOR LM, EDWARDS JM, PORTER JM: **Present status of reversed vein bypass-grafting: 5-year results of a modern series.** *Journal of vascular surgery* **11**: 193-206, 1990.
- TJONG SS, CHEN H: **Nanocrystalline materials and coatings.** *Materials Science & Engineering R-Reports* **R45**: 1-88, 2004.
- TEPPER OM, CAPLA JM, GALIANO RD, CERADINI DJ, CALLAGHAN MJ, KLEINMAN ME, GUNTER GC: **Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells.** *Blood* **105**: 1068-1077, 2005.
- TOPOL EJ, SERRUYS PW: **Frontiers in interventional cardiology.** *Circulation* **98**: 1802-1820, 1998.
- UNGER RE, SHAHRAM G, ORTH C, SARTORIS A, BARBECK M, HALSTENBERG S, MOTTA A, MIGLIARESI C, KIRKPATRIK CJ: **The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature.** *Biomaterials* **31**: 6959-6967, 2010.
- VACANTI CA, BONASSAR LJ, VACANTI MP, SHUFFLEBARGER J: **Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone.** *New England Journal of Medicine* **344**: 1511-1514, 2001.
- VACÍK J, LAVRENTIEV V, NOVOTNÁ K, BAČÁKOVÁ L, LISÁ V, VORLÍČEK V, FAJGAR R: **Fullerene (C60)-transitional metal (Ti) composites: Structural and biological properties of the thin films.** *Diamond & Related Materials* **19**: 242-246, 2010.

- VACÍK J, NARAMOTO H, NARUMI K, YAMAMOTO S, MIYASHITA K: **Pattern formation induced by co-deposition of Ni and C-60 on MgO(100).** *Journal of Chemical Physics* **114**: 9115-9119, 2001.
- VAGASKÁ B, BAČÁKOVÁ L, FILOVÁ E, BALÍK K: **Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering.** *Physiological Research* **59**: 309-322, 2010.
- VANDROVCOVÁ M, VACÍK J, ŠVORČÍK V, SLEPIČKA P, KASÁLKOVÁ N, VORLÍČEK V, LAVRENTIEV V, VOSEČEK V, GRAUSOVÁ L, LISÁ V, BAČÁKOVÁ L: **Fullerene C60 and hybrid C60/Ti films as substrates for adhesion and growth of bone cells.** *Physica Status Solidi (a)* **205**: 2252-2261, 2008.
- VANDROVCOVÁ M, HANUŠ J, KYLIÁN O, BIEDERMAN H, LISÁ V, BAČÁKOVÁ L: **Effect of Different Surface Nanoroughness of TiO₂ Films on the Growth of MG63 Cells.** Abstract submitted for 2nd International Conference on Cellular and Molecular Bioengineering (ICCMB2), August 2-4, 2010, Singapore.
- VANDROVCOVÁ M, BAČÁKOVÁ L: **Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants.** *Physiological Research* **60 (3)**: 403-417, 2011
- VAN EIJK F, SARIS DB, CREEMERS LB, RIESLE J, WILLEMS WJ, VAN BLITTERSWIJK CA, VERBOUT AJ, DHERT WJ: **The effect of timing of mechanical stimulation on proliferation and differentiation of goat bone marrow stem cells cultured on braided PLGA scaffolds.** *Tissue Engineering Part A* **14**: 1425-1433, 2008.
- VAN SUSANTE JLC, PIEPER J, BUMA P, KUPPEVELT TH, VAN BEUNINGEN H, VAN DER KRAAN PM, VEERKAMP JH, VAN DEN BERG WB, VETH RPH: **Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro.** *Biomaterials* **22**: 2359-2369, 2001.
- VENKATRAMAN S, BOEY F: **Release profiles in drug-eluting stents: Issues and uncertainties** *Journal of Controlled Release* **120**: 149-160, 2007.

- VIOLA M, KAROUSOU EG, VIGETTI D, GENASETTI A, PALLOTTI F, GUIDETTI GF, TIRA E: **Decorin from different bovine tissues: study of glycosaminoglycan chain by PAGEFS.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 36-42, 2006.
- WANG B, CAI Q, ZHANG S, YANG X, DENG X: **The effect of poly(L-lactic acid) nanofiber orientation on osteogenic responses of human osteoblast-like MG63 cells.** *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **4**: 600-609, 2011.
- WANG LP, ZHAO G, OLIVARES-NAVARRETE R, BELL BF, WIELAND M, COCHRAN DL, SCHWARTZ Z, BOYAN BD: **Integrin beta(1) silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxy vitamin D-3.** *Biomaterials* **27**: 3716-3725, 2006.
- WEBSTER TJ, SIEGEL RW, BIZIOS R: **Osteoblast adhesion on nanophase ceramics.** *Biomaterials* **20**: 1221-1227, 1999.
- WEBSTER TJ, ERGUN C, DOREMUS RH, SIEGEL RW, BIZIOS R: **Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **51**: 475-483, 2000a.
- WEBSTER TJ, ERGUN C, DOREMUS RH, SIEGEL RW, BIZIOS R: **Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics.** *Biomaterials* **21**: 1803-1810, 2000b.
- WEBSTER TJ, EJIOFOR JU: **Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo.** *Biomaterials* **25**: 4731-4739, 2004.
- WEBSTER TJ, SMITH TA: **Increased osteoblast function on PLGA composites containing nanophase titania.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **74A**: 677-686, 2005.
- WEI GB, MA PX: **Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering.** *Biomaterials* **25**: 4749-4757, 2004.

WILSON SR: **Fullerenes: Chemistry, Physics, and Technology**, Edited by KADISH KM and ROUFF RS (John Wiley and Sons) 2000.

WOO KM, CHEN VJ, MA PX: **Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **67A**: 531-537, 2003.

YAMAKOSHI Y, UMEZAWA N, RYU A, ARAKANE K, MIYATA N, GODA Y, MASUMIZU T, NAGANO T: **Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C-60) as potential medicine: O-2(-center dot) versus O-1(2).** *Journal of American Chemical Society* **125**: 12803-12809, 2003.

YAMAWAKI H, IWAI N: **Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells.** *American Journal of Physiology: Cell Physiology* **290**: C1495-C1502, 2006.

YEHIA HN, DRAPER RK, MIKORYAK C, WALKER EK, BAJAJ P, MUSSELMAN IH, DAIGREPONT MC, DIECKMANN GR, PANTANO P: **Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells.** *Journal of Nanobiotechnology* **5**: 8-24, 2007.

ZHANG LW, ZENG L, BARRON AR, MONTEIRO-RIVIERE NA: **Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes.** *International Journal of Toxicology* **26**: 103-113, 2007.

ZHAO G, RAINES AL, WIELAND M, SCHWARTZ Z, BOYAN BD: **Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography.** *Biomaterials* **28**: 2821-2829, 2007.

ZHONG S, TEO WE, ZHU X, BEUERMAN R, RAMAKRISHNA S, YUNG LY: **Formation of collagen-glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and their biological properties.** *Biomacromolecules* **6**: 2998-3004, 2005.

ZHOU ZG, SCHUSTER DI, WILSON SR: **Selective syntheses of novel polyether fullerene multiple adducts.** *Journal of Organic Chemistry* **68**: 7612-7617, 2003.

ZHU X, CHEN J, SCHEIDERLER L, ALTEBAEUMER T, GEIS-GERSTORFER J, KERN D: **Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces.** *Cells Tissues Organs* **178**: 13-22, 2004.

ZHU Y, RAN T, LI Y, GUO J, LI W: **Dependence of the cytotoxicity of MWCNTs on the culture medium.** *Nanotechnology* **17**: 4668-4674, 2006.

8. SEZNAM AUTORČINÝCH PUBLIKACÍ

Články s vyznačeným impakt faktorem:

VANDROVCOVÁ M, VACÍK J, ŠVORČÍK V, SLEPIČKA P, KASÁLKOVÁ N, VORLÍČEK V, LAVRENTIEV V, VOSEČEK V, GRAUSOVÁ L, LISÁ V, BAČÁKOVÁ L: **Fullerene C₆₀ and hybrid C₆₀/Ti films as substrates for adhesion and growth of bone cells.** *Physica Status Solidi A* **205 (9)**: 2252-2261, 2008 (IF = 1.458)

GRAUSOVÁ L, VACÍK J, VORLÍČEK V, ŠVORČÍK V, SLEPIČKA P, BÍLKOVÁ P, VANDROVCOVÁ M, LISÁ V, BAČÁKOVÁ L: **Fullerene C₆₀ films of continuous and micropatterned morphology as substrates for adhesion and growth of bone cells.** *Diamond & Related Materials* **18**: 578-586, 2009 (IF = 1.825)

VANDROVCOVÁ M, DOUGLAS T, HAUK D, GRÖSSNER-SCHREIBER B, WILTFANG J, BAČÁKOVÁ L, WARNKE PH: **Influence of collagen and chondroitin sulfat (CS) coatings on poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) on MG 63 osteoblast-like cells.** *Physiological Research* **60 (5)**: 797-813, 2011 (IF = 1.646)

FILOVÁ E, PAŘÍZEK M, OLŠOVSKÁ J, KAMENÍK Z, BRYNDA E, REIDEL T, VANDROVCOVÁ M, LISÁ V, MACHOVÁ L, SKALSKÝ I, SZARSZOI O, SUCHÝ T, BAČÁKOVÁ L: **Perivascular sirolimus-delivery system.** *International Journal of Pharmaceutics* **404**: 94-101, 2011 (IF = 3.607)

Přehledný článek:

VANDROVCOVÁ M, BAČÁKOVÁ L: **Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants.** *Physiological Research* **60 (3)**: 403-417, 2011 (IF = 1.646)

Kapitola v knize:

L BAČÁKOVÁ, L GRAUSOVÁ, M VANDROVCOVÁ, J VACÍK, A FRAZCEK, S BLAZEWICZ, A KROMKA, B REZEK, M VANĚČEK, M NESLÁDEK, V ŠVORČÍK, V VORLÍČEK, M KOPEČEK: **Carbon nanoparticles as substrates for cell adhesion and growth.** In: Nanoparticles: New Research. Simone Luca Lombardi (ed), 2004, Chapter 2, 1-71

9. SEZNAM ABSTRAKT A ČLÁNKŮ Z VĚDECKÝCH KONFERENCÍ

Marta Vandrovcová, Lucie Bačáková, Jan Hanuš, Lea Nichtová, Martin Drabik, and Hynek Biederman: **Effect of Different Surface Nanoroughness of Titanium Dioxide Films on the Growth of Human Osteoblast-Like MG63 Cells.**

Autorka posteru presentovaného na konferenci „5th Tampere Tissue Engineering Symposium“, konané 23.4. - 25.4. 2008 v Tampere, Finsko, abstrakt publikován se sborníku konference v elektronické podobě (č. posteru 007)

Lucie Bačáková, Lubica Grausová, Milan Kopeček, Marta Vandrovcová, Jiří Vacík, Aneta Fraczek, Stanislaw Blazewicz, Alexander Kromka, Milan Vaněček, Miloš Nesládek, František Fendrych, Václav Švorčík: **Surfaces modified with carbon nanoparticles improve adhesion, growth and maturation of human bone-derived cells**

Spoluautorka přednášky na konferenci „Hasselt Diamond Workshop 2008 SBDD XIII“, konané ve dnech 25.2 – 27.2. 2008 v Hasseltu, Belgie, abstrakt publikován ve sborníku konference na str. 46 - 47

Lucie Bačáková, Lubica Grausová, Marta Vandrovcová, Jiří Vacík, Vasily Lavrentiev, Vladimír Vorlíček, Václav Švorčík: **Fullerene C₆₀ and Hybrid Ti/C₆₀ Films of Continuous and Micropatterned Morphology as Substrates for Adhesion and Growth of Bone Cells.**

Spoluautorka posteru presentovaného na konferenci „New Diamond and Nanocarbons (NDNC-2008)“, konané ve dnech 26.5.-29.5. 2008 v Taipei, Taiwan, Čína, abstrakt publikován ve sborníku konference na str. 442

Lucie Bačáková, Marta Vandrovcová, Jiří Vacík, Lubica Grausová, Václav Švorčík, Petr Slepíčka, Nikola Kasálková, Vladimír Vorlíček, Vasily Lavrentiev, Václav Voseček, Věra Lisá: **Micropatterned Fullerene C₆₀ and Hybrid C₆₀/Ti Films as Substrates for Directed Cell Adhesion and Growth.**

Spoluautorka posteru presentovaného na konferenci „Carbon 2008“, konané ve dnech 13.-18.7. v Naganu, Japonsko, abstrakt publikován ve sborníku konference na str. 196

M. Vandrovcová, A. Grinevich, L. Bačáková, V. Lisá, A. Shukurov, D. Slavinská, H. Biederman: **Effect of different concentration of Ti in hydrocarbon plasma polymer films on the adhesion, proliferation and differentiation of human osteoblast-like MG63 cells.**

Poster prezentovaný na konferenci „4th International Workshop on Polymer/Metal Nanocomposites“, konané v Praze 2.9.-4.9.2009, abstrakt publikován ve sborníku konference na str. 34

Lucie Bačáková, Chadi Ali, Zdeněk Čejka, Martin Pařízek, Marta Vandrovcová, Lubica Grausová, Věra Lisá: **Adhesion, growth and differentiation of human osteoblast-like MG 63 cells on metallic and polymeric materials developed for artificial joint replacements.**

Přednáška prezentovaná na konferenci „4th International Workshop on Polymer/Metal Nanocomposites“, konané v Praze 2.9.-4.9.2009, abstrakt publikován ve sborníku konference na str. 88

Timothy Douglas, Marta Vandrovcová, Dominik Hauk, Birte Grössner-Schreiber, Manuela Viola, Barbara Bertolini, Marie-Luise Kruse, Qin Liu, Andrea Renzing, Stephan T. Becker, Jörg Wiltfang, Sureshan Sivananthan, Eugene Sherry, Patrick H. Warnke: **Osteoblast-like cells on PLGA films coated with collagen I and collagen I with chondroitin sulphate.**

Poster prezentovaný na konferenci “22nd European Conference on Biomaterials”, konané v Lausanne 7.9.-11.9.2009, abstrakt publikován na konferenčním CD pod číslem P676-772

Marta Vandrovcová, Jan Hanuš, Ondrej Kylián, Hynek Biederman, Věra Lisá, and Lucie Bačáková, **Effect of Different Surface Nanoroughness of TiO₂ Films on the Growth of MG63 Cells.**

Poster prezentovaný na konferenci „The 2nd International Conference on Cellular & Molecular Bioengineering“, konané v Singapuru 2.8.-4.8.2010, abstrakt publikován ve sborníku konference

Marta Vandrovcová, Aleš Marek, Hynek Biederman, Lucie Bačáková: **Effect of Different Density and Surface Modification of Titanium Clusters on the Adhesion and Growth of MG 63 Cells.**

Poster prezentovaný na konferenci „3rd International Conference on Drug Discovery & Therapy“, konané v Dubaji 7.2. - 10.2.2011, abstrakt publikován ve sborníku konference pod číslem 1137

Marta Vandrovcová, Sona Kontarova, Vladimír Cech, Lucie Bačáková: **Effect of Plasma Polymer Surface Modification on the Growth of Human Osteoblast-Like MG63 Cells.**

Poster prezentovaný na konferenci "bone-tec 2011: International Bone-Tissue-Engineering Congress", konané v Hannoveru 12.-15.10. 2011, abstrakt publikován ve sborníku na straně 52.

10. ZAHRANIČNÍ STÁŽ

1.9.2008 - 28.2.2009: Universita Christian-Albrechts, Kiel, Německo. Universitní klinika Schleswig Holstein, oddělení ústní a maxilofaciální chirurgie, Dr. Timothy Douglas, Studijní pobyt v programu Erasmus.