

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Speciální chemicko-biologické obory:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Markéta Krýslová

Růst lidských osteoblastů SaOS-2 na titanu modifikovaném nanotubami

Growth of human osteoblasts SaOS-2 on titanium modified with nanotubes

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Elena Filová, Ph.D.

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 5. 2013

.....

Podpis

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Eleně Filové, Ph.D., z Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, za její cenné odborné rady a připomínky, bez kterých by tato práce nikdy nevznikla. Dále bych chtěla poděkovat Doc. Luděkovi Joskovi z Ústavu kovových materiálů a korozního inženýrství, Fakulta chemické technologie, VŠCHT v Praze za uvedení do problematiky výroby titaničitých nanotub. Dále bych také chtěla poděkovat Doc. MUDr. Lucii Bačákové CSc., vedoucí Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. i ostatním kolegům za motivaci, podporu a vytváření skvělého pracovního prostředí.

Abstrakt

Tato práce shrnuje informace o interakcích mezi kostními osteoblasty a nanostrukturovanými materiály, které v dnešní době nabývají stále většího významu a nacházejí nové perspektivní uplatnění v medicíně a tkáňovém inženýrství. Každoročně se zvyšuje množství osob s umělou náhradou některých tkání, ale i celých orgánů, jako jsou kosti, klouby, zuby, chrupavky či šlachy. Mezi nejčastěji používané umělé materiály pro kostní náhrady patří titan a jeho slitiny. Titan má specifické vlastnosti, které umožňují implantátům setrvat v místě integrace déle než třicet let. Povrch titanu je pro lepší osteointegraci specificky upravován nejrůznějšími způsoby, např. potahováním hydroxyapatitem, potahováním vrstvou DLC (*diamond like carbon*) nebo plazmovým sprejováním. Nejnovější metodou povrchové úpravy titanu je takzvaná modifikace pomocí nanotub, které vytváří na povrchu implantátu nanodrsnost a zlepšují tak fyzikálně-chemické vlastnosti umělého materiálu. Nanostrukturovaný materiál napodobuje přirozenou strukturu kostní tkáně, podporuje adsorpci určitých proteinů, zlepšuje biokompatibilitu materiálu a příznivě ovlivňuje chování buněk, např. podporuje syntézu a vhodné uspořádání specifických molekul buněčné adheze a diferenciaci.

Klíčová slova: osteoblasty, kostní proteiny, titan, biokompatibilita, integrinové receptory, nanotuby

Abstract

This work summarizes information about the interactions between osteoblasts and nanostructured materials, which are of growing importance and are highly promising in regard to their application in medicine and in tissue engineering. The number of people with artificial replacements of tissues, such as bones, joints, teeth, cartilage, and tendons increases every year. Titanium and his alloys are extensively used for artificial tissue replacements. Titanium is favourable for its mechanical properties that allow the implant to remain in the place of implantation more than thirty years. For better osseointegration the surface of titanium can be modified with hydroxyapatite, coating with diamond-like carbon or plasma spray coating. Another option is to prepare a layer of nanotubes, which forms nanoroughness on material surface. The nanoroughness in turn improves physical and chemical properties of the material surface. Nanostructured materials mimic the natural bone tissue, support adsorption of specific proteins, improve the biocompatibility of the implants and positively influence cell behaviour, e.g. stimulate the synthesis and suitable conformation of specific molecules for cell adhesion and differentiation.

Key words: osteoblasts, bone proteins, titanium, biocompatibility, integrin receptors, nanotubes

Seznam zkratk

| | |
|------------------|--|
| BMP-2 | lidský morfogenetický protein kostí (bone morphogenetic protein 2) |
| C2C12 | myší buněčná linie myoblastů |
| Ca | vápník |
| Ca ²⁺ | vápenaté ionty |
| CNT | uhlíkové nanotuby (carbon nanotubes) |
| CPC-2 | lidská buněčná linie osteoblastů |
| DGEA | Asp-Gly-Glu-Ala |
| DLC | uhlík podobný diamantu (diamond-like carbon) |
| ECM | extracelulární matrix |
| FAK | fokální adhezní kináza |
| HAp | hydroxyapatit |
| KSRS | Lys-Arg-Ser-Arg |
| LDH | laktát dehydrogenáza |
| MC3T3-E1 | myší progenitorové buňky osteoblastů |
| MG-63 | lidská buněčná linie osteoblastů |
| MWCNT | mnohostěnné nanotuby (multiple-walled carbon nanotubes) |
| P | fosfor |
| R _a | průměrná aritmetická odchylka posuzovaného profilu drsnosti od střední linie |
| RGD | Arg-Gly-Asp |
| RRETAWA | Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala |
| SaOS-2 | lidská buněčná linie osteoblastů |
| SEM | rastrovací elektronový mikroskop (scanning elektron microscope) |
| SWCNT | jednostěnné nanotuby (single-walled carbon nanotubes) |
| TiO ₂ | oxid titaničitý |
| U-2OS | lidská buněčná linie osteoblastů |
| VACNT | vertikálně uspořádané uhlíkové nanotuby |

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1. Úvod | 8 |
| 2. Kost | 9 |
| 2.1 <i>Stavba kosti</i> | 9 |
| 2.1.1 Kostní buňky | 9 |
| 2.1.2 Kostní matrix | 11 |
| 2.1.3 Periost a endost | 11 |
| 2.2 <i>Struktura kosti</i> | 12 |
| 2.3 <i>Kostní proteiny</i> | 14 |
| 2.3.1 Vitronektin | 14 |
| 2.3.2 Vinkulin a β -aktin | 14 |
| 2.3.3 Kolagen I | 14 |
| 2.3.4 Alkalická fosfatáza | 15 |
| 2.3.5 Osteokalcin | 15 |
| 3. Vlastnosti umělých materiálů | 16 |
| 3.1 <i>Materiály pro kostní inženýrství</i> | 17 |
| 3.2 <i>Použití titanu v medicíně</i> | 17 |
| 3.3 <i>Fyzikálně - chemické vlastnosti titanu</i> | 18 |
| 3.4 <i>Biokompatibilita kostních implantátů</i> | 19 |
| 4. Molekulární mechanismus adheze buňka - umělý materiál | 20 |
| 4.1 <i>Integriny - hlavní receptory buněčné adheze</i> | 21 |
| 5. Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu materiálů | 23 |
| 5.1 <i>Povrchová drsnost</i> | 23 |
| 5.2 <i>Smáčivost povrchu</i> | 24 |
| 5.3 <i>Modifikace pomocí nanotub</i> | 26 |
| 5.3.1 <i>Uhlíkové nanotuby</i> | 27 |
| 5.3.2 <i>TiO₂ nanotuby</i> | 28 |
| 6. Interakce buněk s povrchovou vrstvou nanotub | 30 |
| 7. Závěr | 33 |
| 8. Seznam literatury | 34 |

1. Úvod

Každoročně se zvyšuje množství osob se ztrátou kostní tkáně díky traumatickému poškození či onemocnění kostí. Současná medicína se zabývá způsoby jak tuto poškozenou tkáň nahradit. Dříve se pro rekonstrukci tkání využívaly autologní štěpy, jejichž dárce je sám pacient, bohužel tato metoda má několik nevýhod např. pacient musel podstoupit několik operací, s nimiž se zvyšovala doba rekonvalescence a riziko infekce. V posledních letech je proto věnována pozornost hlavně umělým materiálům, které nabývají v biologii a medicíně stále většího významu. Tyto materiály musí být svými vlastnostmi pro lidský organismus netoxické, nesmí vyvolávat žádné negativní imunitní reakce, měly by podporovat adhezi, růst osteoblastů a svými vlastnostmi by se měly co nejvíce podobat kosti.

Vývojem takovýchto materiálů se zabývá mezioborová disciplína zvaná tkáňové inženýrství. Hlavním cílem tkáňového inženýrství je vývoj nanostrukturovaných matic, které mají schopnost podpořit regeneraci kostní tkáně nebo ji plně nahradit. Tyto matrice by se měly svou povrchovou strukturou co nejvíce podobat nanostruktuře přirozené kostní tkáně. Existuje řada modifikací, díky nimž lze upravit fyzikálně-chemické vlastnosti umělých biomateriálů pro zlepšení adheze, proliferace a diferenciaci buněk a následné osteointegrace samotného implantátu. Mezi tyto modifikace patří především vytvoření vrstvy nanotub na povrchu materiálu, které svojí nanodrsnou strukturou napodobují přirozenou kostní matrix a umožňují adsorpci specifických proteinů mezibuněčné hmoty z kultivačního média či tělních tekutin ve správné konformaci, množství a výrazně tím přispívají ke změně chování buněk.

Cílem této práce je pochopit strukturu kostní tkáně ve vztahu k vlastnostem umělých kostních náhrad a optimalizaci jejich vlastností. Dalším cílem je porovnání jednotlivých umělých materiálů používaných na výrobu kostních implantátů se zaměřením na titan a jeho modifikace. Tato práce je soustředěna především na hodnocení titanu modifikovaného TiO_2 nanotrubičkami, které tvoří nanostrukturovaný povrch titanu. Dalším cílem je analyzovat interakce mezi titanem modifikovaným nanotubami a buněčnými liniemi osteoblastů, jejichž pochopení je velice důležité pro návrh správného biomateriálu pro konkrétní typ postižení.

2. Kost

Kost je jednou z nejtvrděších tkání v lidském těle, tvoří hlavní podíl skeletu dospělého jedince a její hlavní funkcí je strukturální podpora těla. Kosti jsou odpovědné za tělesný pohyb, vytvářejí totiž tzv. systém pák, který násobí síly vzniklé svalovou kontrakcí. Kosti chrání důležité orgány v dutině hrudní a lebeční a ve své dřeni přechovávají krvetvorný orgán. Kost je specializovaná pojivová tkáň s možností opravy a regenerace, je pro ni typická strukturální nehomogenita a anizotropie. Kost jako orgán se skládá ze spongiózní a kompaktní kostní tkáně, vaziva ale i cévního zásobení a inervace. Vlastní kostní tkáň je tvořena buňkami a mezibuněčnou hmotou s minerály, které poskytují kosti pevnost, a proteinovými vlákny, která naopak podporují pružnost. Oba tyto parametry jsou z funkčního hlediska nejdůležitějšími biomechanickými vlastnostmi kosti. Osteogenní buňky jsou obsažené v endostu, resp. periostu, což je vrstva tkáně, jímž je lemován vnitřní i vnější povrch kostí. (Dylevský 2009; Nordin a Frankel 2001).

2.1 Stavba kosti

Kostní tkáň se skládá z buněk a mezibuněčné hmoty, zvané kostní matrix, která na rozdíl od ostatních pojiv obsahuje vysoký podíl anorganických látek (asi 50 % celkového objemu) (web 2).

2.1.1 Kostní buňky

V kostní tkáni se vyskytují čtyři typy buněk tj. osteoprogenitorové buňky, osteoblasty, osteocyty a osteoklasty. Tyto buňky formují kostní matrix a plní funkci metabolického centra kosti. Přítomnost a funkce těchto buněk je pro fyziologii kosti zcela zásadní.

Osteoprogenitorové buňky jsou kmenové buňky, které derivují z mezenchymu. Buňky jsou vřetenovitě protáhlé a nacházejí se na vnitřní straně periostu, dále v endostu a v kanálcích kompaktní kosti podél krevních cév. Buňky si uchovávají schopnost mitoticky se dělit a diferenciovat ve zralé kostní buňky (web 2).

Osteoblasty (nevyvinuté kostní buňky) jsou jednojaderné osteoprogenitorové buňky vzniklé z mezenchymálních kmenových buněk. Jejich hlavní funkcí je produkce

organických složek kostní matrix (kolagenních vláken typu I, proteoglykanů a glykoproteinů) a syntéza proteinů kostní matrix (alkalické fosfatázy), díky které se osteoblasty podílejí také na mineralizaci kostní tkáně. Jedna z funkcí osteoblastů je také produkce amorfni proteoglykanové mezibuněčné hmoty. Jeden osteoblast vyprodukuje asi $500 \mu\text{m}^3$ mezibuněčné hmoty denně, tj. třikrát více než je jeho hmotnost (web 3). Mineralizace je řízena hladinou parathormonu a kalcitoninu - udržují kalcemii.

Osteoblasty se nachází na povrchu kostní tkáně a jsou seskupeny do těsného uspořádání na způsob jednovrstevného epitelu. Cytoplazma osteoblastů vybíhá v dlouhé výběžky, jimiž navazují kontakt se sousedními osteoblasty. Pomocí těchto kontaktů se realizuje látková výměna kosti (web 3). Jakmile se buňky začínají obklopot mezibuněčnou hmotou, kterou samy produkují a do které jsou postupně uzavírány, mění se v osteocyty. Nově syntetizovaná, dosud nekalcifikovaná, mezibuněčná hmota uložená v blízkosti osteoblastů se nazývá osteoid (web 2). Osteoblasty se uplatňují při vhojování umělých implantátů do kostní tkáně.

Osteocyty (vyvinuté kostní buňky) jsou klidové formy osteoblastů, které mají protáhlý tvar a byly začleněny do nově vytvořené mezibuněčné hmoty a později uzavřeny mineralizovanou kostí. Vznikají tak lakuny a kanálky, neboť matrix se vytváří kolem buněčných těl i jejich výběžků. Osteocyty ve srovnání s osteoblasty mají méně organel. Spíše se účastní uvolňování minerálů z kostní tkáně a jsou proto součástí regulačních mechanismů udržujících hladinu vápníku v tělních tekutinách, především v krevní plazmě. Kromě schopnosti syntetizovat a obnovovat mezibuněčnou hmotu slouží rovněž jako mechanoreceptory (čidla tlaku a tahu) s možností ovlivňovat míru odezvy kosti na aktuální zatížení. Doba života osteocytů je asi dvacet let. Rozpadlé osteocyty se již nenahrazují, jejich zánik je následován resorpcí matrix a drobné prostory, ve kterých buňky v kosti leží, zůstávají prázdné (web 3).

Osteoklasty jsou velké (i $100 \mu\text{m}$) mnohjaderné bohatě větvené pohyblivé buňky, jejichž hlavní funkcí je resorpce kostní hmoty (remodelace kosti za účelem zmenšit její objem). Vznikají splynutím krevních monocytů a tvoří tak i součást imunitního systému. Oproti osteoblastům, které mezibuněčnou hmotu tvoří, osteoklasty vylučují enzymy kyselou fosfatázu a kolagenázu. Pomocí těchto enzymů atakují kostní matrix a uvolňují zvápenatělou základní hmotu, čímž rozrušují její původní strukturu. Enzymaticky vyleptané prolákliny matrix, v nichž leží osteoklasty resorbující kost,

se nazývají Howshipovy lakuny. Přítomnost osteoklastů je nezbytná pro přestavbu kosti, uvolňují totiž prostor pro novotvořenou kost a napomáhají tak její remodelaci.

2.1.2 Kostní matrix

Anorganická složka tvoří okolo 50% suché hmotnosti kosti. Převládá zde vápník (Ca) a fosfor (P), které tvoří nanokrystaly hydroxyapatitu [HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] o délce 100 nm a průměru 20 - 30 nm. V mezibuněčné hmotě je také značné množství amorfního (nekystalického) fosforečnanu vápenatého, který zaručuje strukturní stabilitu kosti. V kostní matrix najdeme i další ionty jako hydrogenuhlíčitan, citráty, hořčík, draslík a sodík. Organická složka kosti je z 95 % zastoupena kolagenem I a amorfní matrix, která obsahuje glykosaminoglykany společně s proteiny. Kostní sialoprotein a osteokalcin velmi dobře váží vápník a podporují tak kalcifikaci (vápenatění) kostní matrix. Ostatní tkáň obsahující kolagen I nejsou kalcifikované, protože neobsahují tyto glykoproteiny (Lowestan a Weiner 1989; web 1). Vazbou HAp na kolagenní vlákna je zajištěna tvrdost a zároveň odolnost a pružnost kosti. Odvápněná kost si sice díky velkému množství kolagenu zachová svůj tvar i po dekalifikaci, ale je ohebná jako šlacha. Původní tvar zůstane zachován i po odstranění organických částí matrix, především kolagenních vláken, ale kost se stává velmi křehkou, lámavou a drobivou (web 1).

2.1.3 Periost a endost

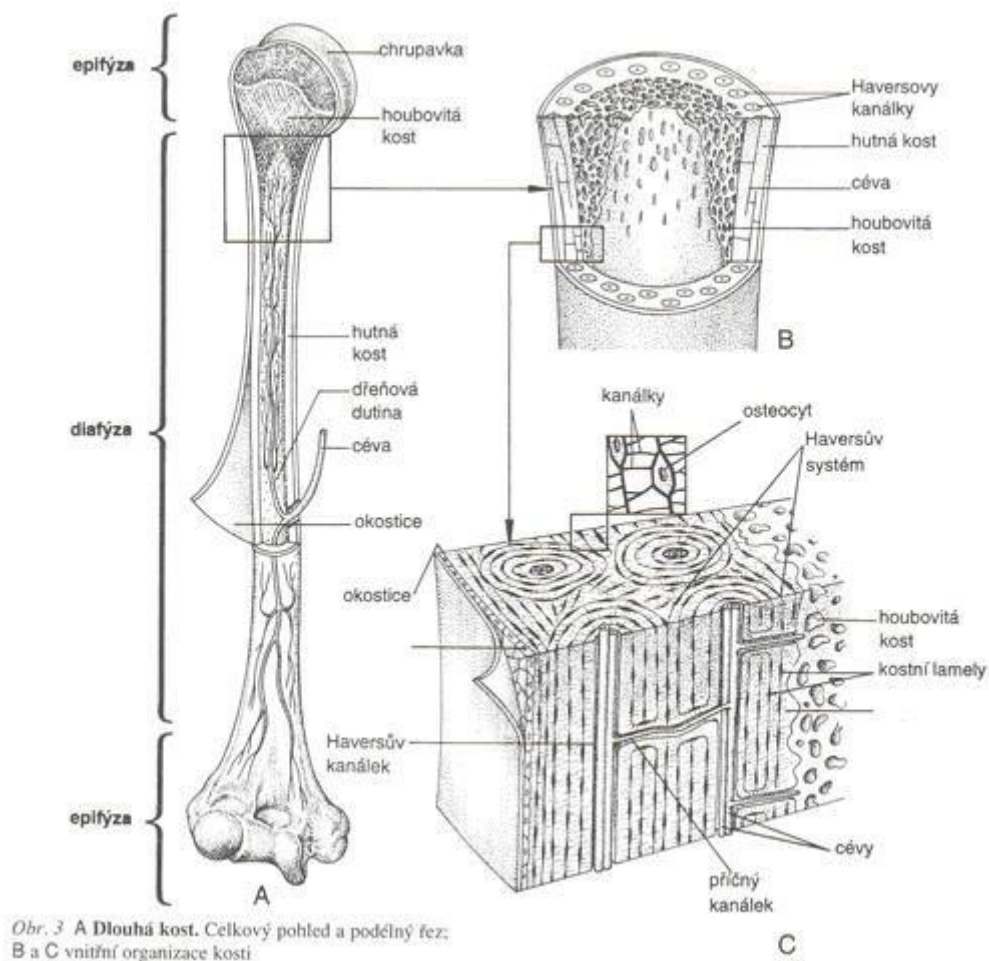
Zevní i vnitřní povrch kosti je obalen vrstvou osteogenních buněk a vazivovou tkání, zvanou periost a endost. Periost je složen ze zevní vrstvy kolagenních vláken a fibroblastů. Svazky kolagenních vláken pronikají do kostní matrix a pomáhají přidržovat periost na kosti, jsou to Sharpeyova vlákna (web 1). Vnitřní, více buněčná vrstva periostu je složena z plochých buněk se schopností mitoticky se dělit a diferenciovat v osteoblasty. Tyto osteoprogenitorové buňky hrají významnou roli při růstu a reparaci kosti. Endost vystýlá vnitřní povrch dutiny kostní, je tvořen pouze jednou vrstvou plochých osteoprogenitorových buněk a velmi malým množstvím vazivové tkáně. Proto je endost mnohem tenčí než periost. Hlavní funkcí periostu a endostu je výživa kostní tkáně (ve vazivu leží kapilární sítě i větší cévy) a zajištění nepřetržité dodávky nových osteoblastů pro růst a hojení kostí (web 1).

2.2 Struktura kosti

Histologicky lze rozlišit dva typy kostní tkáně: primární, nezralá čili vláknitá kost a sekundární, zralá neboli lamelózní kost. Ačkoliv oba typy obsahují stejné stavební jednotky, v nezralé vláknité kosti probíhají kolagenní vlákna náhodně, neuspořádaně, ve zralé kosti jsou uspořádána do lamel (web 1). Při tvorbě každé kosti v embryonálním vývoji, stejně jako při hojení zlomenin a ostatních reparačních procesech, je vytvořena nejprve nezralá vláknitá kost. Je pouze dočasná a u dospělých je postupně nahrazena zralou sekundární kostí. Vláknitá kost zůstává pouze v blízkosti švů plochých kostí lebky, v kostních alveolech a v *tuberositas ossium*. Kromě neuspořádaných kolagenních vláken je tato kost méně kalcifikována a má více osteocytů (web 1).

Při makroskopickém pozorování kosti na příčném řezu lze kost rozdělit na kompaktní kost skládající se z celistvých úseků bez mezer a na spongiózní kost, která tvoří oblasti s velkým množstvím navzájem propojených dutinek. Ale na mikroskopické úrovni mají kompaktní kost i trabekuly oddělující dutinky spongiózní kosti přibližně stejnou základní stavbu. Hlavní funkce kompaktní kostní tkáně je odolnost vůči tahu a tlaku. To je zajištěno kolagenními vlákny uspořádanými do fibril. Fibrily v počtu od čtyř do dvaceti paralelně obkružují cévní kanál. Komplex těchto lamel s centrálním (Haversovým) kanálkem se nazývá Haversův systém neboli osteon (Mays 1998). Ve stěnách lamel jsou mělké jamky (lakuny), ve kterých jsou uloženy kostní buňky: osteoblasty a osteocyty. Osteon je základní stavební i cirkulační jednotkou kompaktní kosti. Centrální kanálky jsou mezi sebou spojeny příčnými a šikmými Volkmannovými kanálky, takže krevní oběh osteonů je vzájemně propojen. Možnost oboustranné látkové výměny mezi krví a kostními buňkami je tak zajištěna cestou: kapiláry v centrálním Haversově kanálku ↔ kostní kanálky ↔ osteoblasty (osteocyty) ↔ mezibuněčná kostní hmota. Pomocí této komunikace se uskutečňuje jednak mineralizace kostní tkáně, ale také transport vápenatých a hořečnatých iontů uvolňovaných z kompaktní kosti do krevního oběhu. Transport iontů umožňuje tkáňová (extracelulární) tekutina proudící lakunami a kostními kanálky, která je v kontaktu s velkou plochou anorganických krystalů (Mallat a Marieb 2005). Kompaktní tkáň tvoří silnou plášťovou vrstvu dlouhých kostí a tenkou tuhou vrstvu na povrchu kostí krátkých a plochých. Spongiózní kost je složena z trámců (trabekul) a plotének vytvářejících prostorové struktury, jejichž tvar je výsledkem různých mechanických sil působících na kost.

Prostorová orientace a uspořádání průběhu trámců a lamel spongiózy v kosti je označováno jako kostní architektonika, která není neměnná a při jednotlivých změnách kostního tvaru (např. při kostní zlomenině a následném odlišném tlakovém zatěžení zhojené, ale deformované kosti) se trámce přestavují a vzniká architektonická úprava trámců již typická pro nové tlakové zatěžení. Spongióza neobsahuje Haversův systém a živiny zde difundují do kosti přímo z kapilár. Spongióza se vyskytuje v dlouhých kostech všude tam, kde není vytvořena souvislá a jednotná dřeňová dutina (kloubní hlavice) (web 3).



Obr. 3 A Dlouhá kost. Celkový pohled a podélný řez; B a C vnitřní organizace kosti.

Obr. 1. Stavba kosti (zdroj: <http://www.giobio.ic.cz/obrazky/clovek/clovek/kost.JPG>).

2.3 Kostní proteiny

2.3.1 Vitronektin

Vitronektin je glykoprotein, který se hojně vyskytuje v séru a extracelulární matrix a podporuje adhezi buněk a jejich rozprostření. Jedná se o sekreční protein, který existuje buď v jednořetězcové či dvouřetězcové formě, kde jednotlivé řetězce drží pohromadě pomocí disulfidové vazby (web 4).

2.3.2 Vinkulin a β -aktin

Vinkulin je buněčný protein asociovaný s integrinovými receptory, které zprostředkovávají buněčnou adhezi na extracelulární matrix či na umělý materiál. Propojuje buněčný aktin s integriny v plasmatické membráně. Vinkulin je spolu s dalšími proteiny (např. talin) a integrinovými receptory sdružován do tzv. fokálních adhezních plaků, které jsou ukazatelem správné adheze buněk, umožňují signalizaci mezi buňkou a extracelulární matrix oběma směry a jsou signálem pro další vývoj a diferenciaci kostních osteoblastů (pro přehled viz Bačáková *a kol.* 2011).

β -aktin je nejvíce rozšířeným aktinem ve většině buněk, který se nachází především v cytoskeletu a buněčném jádře. Je asociovaný s fokálními adhezními plakami, hraje roli v uchycení buněk a jejich rozprostření na materiálu.

2.3.3 Kolagen I

Kolagen je hlavním proteinem organické složky kosti. Je zde zastoupen 85 - 90 %. Kolagen je specifická bílkovina, která se vyskytuje v různých tkáních, zejména pojivových. Velké množství kolagenu obsahují kosti a klouby, ale i cévy a pokožka (Vokurka a Hugo 2002). Vlákna kolagenu jsou měkká, ohebná, nepružná a vysoce pevná v tahu. Základní jednotkou kolagenu je tropokolagen složený z řetězců $\alpha 1$ a $\alpha 2$ uspořádaných do triple-helixu. Co se týče chemické podstaty kolagenu, jeho molekula je tvořena hlavně aminokyselinami glycinem, prolinem, hydroxyprolinem a hydroxylysinem (web 5, web 6).

2.3.4 Alkalická fosfatáza

Existuje několik typů tohoto enzymu. V membráně osteoblastů se nachází kostní izoenzym alkalické fosfatázy. Alkalická fosfatáza je ukazatelem časně diferenciací buněk a je produkována samotnými osteoblasty. Je to enzym, který se podílí na mineralizaci kostní tkáně a na inkorporaci Ca^{2+} do kostí.

2.3.5 Osteokalcin

Osteokalcin je glykoprotein extracelulární matrix vylučovaný kostními osteoblasty. Váže vápník a je považován za ukazatel osteogenní diferenciací. Je významný pro regulaci mineralizace obnovující se kostní tkáně, řídí potřebnou rovnováhu mezi osteoblasty a osteoklasty při kostní remodelaci. Pro syntézu osteokalcinu je důležitá přítomnost vitamínu K. Vitamin K aktivuje osteokalcin a umožňuje tak vazbu osteokalcinu s vápníkem, což je důležité pro ukládání vápníku v kostech.

3. Vlastnosti umělých materiálů

Umělý materiál pro kostní náhrady by měl co nejvíce napodobovat složení a strukturu přirozené kostní tkáně. Podpůrná matrice (scaffold) pro kultivaci tkáně musí splňovat některá kritéria jako například snadnou zpracovatelnost do požadovaného tvaru a velikosti. Materiál musí mít mechanické vlastnosti odpovídající aplikaci - například v případě náhrad cév materiál nesmí prasknout nebo se „odhojit“ z místa, kde byl přišit k živé tkáni, musí být dlouhodobě stabilní a odolávat i výkyvům krevního tlaku (web 7) nebo v případě nahrazení dlouhých kostí, kde dochází k intenzivní zátěži, musí být zvlášť mechanicky pevný a odolný.

Pro některé aplikace je žádoucí vstřebatelnost materiálu, v takovém případě hovoříme o biodegradovatelné náhradě, kdy je tvorba tkáně doprovázena degradací původní matrice, až dojde k jejímu postupnému vyloučení z těla. V těchto případech je samozřejmě důležitá i povaha degradačních produktů a jejich bezpečnost pro lidský organismus (web 7). Rychlost degradace by neměla výrazně přesahovat rychlost růstu nové tkáně. V neposlední řadě je velice důležité, aby byl umělý materiál dobře snášen lidským organismem, nebyl pro tělo toxický a nevyvolával žádné jiné nežádoucí reakce (např. karcinogenní, alergické či zánětové).

Biomateriály mohou být bioinertní nebo bioaktivní. Bioinertní materiály tzv. biomateriály první generace jsou navrhovány tak, aby odpovídaly mechanickým vlastnostem nahrazované tkáně a aby nedovolovaly adsorpci proteinů a buněčnou adhezi (přilnavost) za účelem omezení možné negativní imunitní odpovědi nebo srážení krve na povrchu implantátu (Hench a Polak 2002). Bioinertní materiály však nejsou dokonale neutrální a často dochází k určitým interakcím s lidským organismem. Například krevní buňky mohou svými enzymy narušovat cévní náhrady vyrobené z biologicky inertního plastového materiálu tím, že na jeho povrch umísťují své vlastní bílkoviny. Proto se dnes vědci specializují na vývoj materiálů, označovaných jako biomateriály druhé generace, které jsou speciálně navrženy tak, aby byly bioaktivní. To znamená, že materiál by měl vyvolávat specifické žádoucí buněčné reakce jako například adhezi buněk k materiálu, proliferaci a diferenciaci buněk (specializace kmenových buněk do konkrétních buněčných typů s určitou funkcí). Dochází tak např. k diferenciaci kostních buněk, které budou tvořit novou kostní tkáň a tím integrovat implantát do okolní původní tkáně (Hench a Polak 2002).

3.1 Materiály pro kostní inženýrství

Materiály, které se dnes využívají v kostním inženýrství, lze rozdělit do několika skupin: keramické materiály, syntetické polymery, kompozity (spojují vlastnosti dvou či více materiálů různých kategorií) a kovy.

Keramické materiály jsou tvrdé, nepružné a biologicky nedegradovatelné. Jejich nevýhodou je, že jsou velmi křehké. Na druhé straně materiál jako např. hydroxyapatit (HAp), který bývá nejčastější anorganickou přísadou kompozitů, je vysoce biokompatibilní, nedochází u něj ke korozi a v kombinaci s polymery se vyznačuje silnou bioaktivitou. U materiálů s obsahem HAp byl prokázán stimulační efekt na buněčnou proliferaci (Vagaská *a kol.* 2006).

Polymery jsou biokompatibilní chemické látky s nízkou hmotností. Ve své struktuře obsahují atomy uhlíku, vodíku a kyslíku, chloru, dusíku a jiných prvků (Ducháček 2006). Mezi syntetické polymery používané v medicíně jako biomateriály patří polyetylenetereftalát, polytetrafluoroetylen, poly(mléčná kyselina), poly(glykolová kyselina), poly(kaprolakton), polyetylen či silikony (Griffith 2000). Polymery mají slabší mechanické vlastnosti, nedochází u nich ke korozi, alergickým reakcím a mohou být resorbovatelné.

Kovy se díky své pevnosti používají hlavně pro konstrukci ortopedických implantátů. Mají vynikající mechanické a fyzikální vlastnosti např. elektrickou a tepelnou vodivost. Negativními vlastnostmi kovů jsou koroze (následkem působení tělních tekutin) a uvolňování iontů, které mohou snížit tvorbu kostní tkáně. Díky příliš vysoké densitě může docházet k vymílání kosti a uvolňování náhrady (Park a Kim 2000). Nejčastěji se pro kostní náhrady využívají: slitiny kobaltu a chromu, nerezová ocel 316L a titan a jeho slitiny. A právě titan je považován za nejvhodnější materiál pro kostní inženýrství.

3.2 Použití titanu v medicíně

Titan se používá jako materiál pro implantáty už od 60. let minulého století. Titan vykazuje skvělé antikorozi chování a výtečné přijetí tkáněmi ve srovnání s nerezovou ocelí či slitinami na bázi chromu a kobaltu. Na druhou stranu jeho mechanické vlastnosti a tribologické chování zabraňují v některých případech jeho použití jako biologický materiál. To platí zejména tehdy, kdy je vyžadována velmi

vysoká mechanická pevnost, jako například u nahrazení tvrdých dlouhých kostí anebo tam, kde dochází k intenzivnímu využití - u kyčelního kloubu (Oliveira *a kol.* 1998).

Díky těmto omezením se od surového titanu postupně přešlo k titanovým slitinám, ty nejrozšířenější jsou titanové slitiny Gr 5 Ti-6Al-4V typu $\alpha+\beta$, které byly původně vyvinuty pro letecký průmysl. I když tento typ slitiny je považován za dobrý materiál pro chirurgické implantáty, nedávné studie prokázaly, že vanad může reagovat s lidskou tkání. Kromě toho, i hliník může být spojován s některými neurologickými poruchami a Alzheimerovou chorobou (Wang 1996). Později se přešlo na titanové slitiny Ti-6Al-4V typu β , které nevykazují takovou toxicitu vůči lidskému tělu, mají nižší modul pružnosti, vyšší korozní odolnost a biokompatibilitu. V lékařství naleznou své uplatnění také slitiny titanu s tvarovou pamětí.

Z hlediska biomedicínského použití vlastnostmi zájmu jsou vysoká biokompatibilita, korozní a mechanické chování, zpracovatelnost a dostupnost titanu (Katti 1998). Také materiály na bázi titanu mají, ve srovnání s jinými kovy a jejich slitinami, poměrně nízký modul elasticity, který se mění od 110 GPa až na 55 GPa, a tím se blíží k modulu elasticity kosti, který je 30 GPa. Vysoký modul elasticity může vést k uvolnění a poškození protézy nebo k fraktuře okolní kosti. Pro správnou funkčnost implantátu je tedy výhodné, aby modul elasticity umělého materiálu byl co nejvíce podobný kosti (Geetha *a kol.* 2009).

3.3 Fyzikálně - chemické vlastnosti titanu

Titan je velmi tvrdý a lehký kov ocelového vzhledu patřící mezi přechodné prvky. Jeho vysoká odolnost vůči korozi převyšuje v některých prostředích i speciální nerezavějící oceli a antikorozní slitiny (Sedláček 1963). Z chemického hlediska je titan velmi reaktivní kov. Třebaže je titan pevný jako některé druhy oceli, jeho hustota je oproti nim poloviční. Má nejvyšší poměr mezi pevností a hustotou ze všech kovových materiálů. Výhodou je, že nedochází k vymílání kosti vlivem nadměrné zátěže protézou. Titan na svém povrchu vytváří ochrannou vrstvu. Tento mechanismus se nazývá pasivace titanu a napomáhá jí přítomnost oxidačních látek. Působí tak kyslík (i vzdušný), který na titanu vytvoří ochrannou vrstvu oxidu titaničitého. Na pasivaci titanu dobře působí také vlhkost. Dobrá korozní odolnost ve vodných roztocích je způsobena disociací vody (web 10). Ochranná vrstva TiO_2 se ovšem účinkem vysoké

teploty rozpadá a titan se stává velmi reaktivním, což se nepříznivě projevuje na jeho výrobě a zpracování.

3.4 Biokompatibilita kostních implantátů

Biokompatibilita je vlastnost materiálu, jenž nevyvolává nepříznivou odezvu na povrchu ani uvnitř tkáně. Jedná se o přijetí umělého implantátu okolní tkání a tělem jako celkem. Jakmile je nějaký cizí materiál umístěn do prostředí lidského těla, nastane reakce na cizí těleso, která může být v rozsahu od mírného podráždění nebo zánětu až po prudkou reakci, jež může vést i ke smrti pacienta. Každý materiál pro výrobu implantátů musí být biokompatibilní, což znamená, že musí způsobovat minimální odmítavou reakci. Biokompatibilita je závislá na umístění implantátu v těle, stejně tak jako na jeho chemickém složení a tvaru (Callister 2000). Biokompatibilita materiálů je obvykle určována empiricky. Materiál je implantován laboratorním zvířatům a biokompatibilita je posuzována na základě odmítavé reakce, stupně koroze, vzniku toxických látek, apod. Tento proces je později opakován na lidech a to s materiály, které jsou shledány jako biokompatibilní u zvířat. Chirurgické procedury mohou být neúspěšné díky infekci. Problémy infekce mají tendenci se zhoršovat v přítomnosti biomateriálů, poněvadž bakterie se přednostně vážou na cizorodý materiál a implantát může způsobit, že se oblast stane nepřístupná imunologicky kompetentním buňkám (Callister 2000; Koutský 1997).

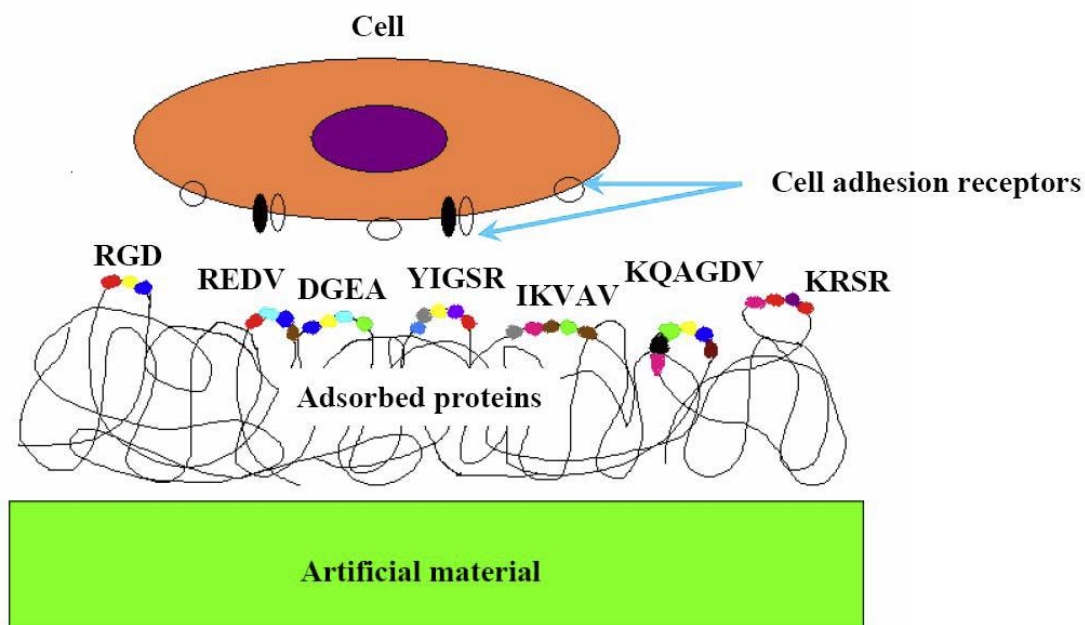
Titan je sice reaktivní kov, ale od ostatních reaktivních kovů se liší tím, že nevyvolává v lidském těle žádné negativní ani alergické reakce. Je to dáno jeho vysokou biokompatibilitou. Nedochozí totiž k uvolňování reaktivních iontů z jeho povrchu. Tomuto uvolňování je zabráněno tzv. pasivací. Na povrchu kovu se tvoří vrstvička oxidu titaničitého působením vzduchu, vody nebo v jakémkoliv elektrolytu. A právě tento specifický růst oxidů na povrchu implantátu způsobuje, že nedochází k žádnému uvolnění nežádoucích iontů. Tato pozitivní bariérová vlastnost oxidu titaničitého je hojně využívána a dokonce se tyto TiO₂ filmy často na povrchu titanových materiálu aplikují uměle pro zesílení bioaktivity.

4. Molekulární mechanismus adheze buňka - umělý materiál

Adheze, rozprostření buněk, jejich následný růst, migrace, diferenciace a životaschopnost na umělém materiálu, jsou zprostředkovány proteiny mezibuněčné hmoty (ECM). Nejčastěji jsou to následující proteiny: vitronektin, fibronektin, kolagen, laminin a fibrin - tedy molekuly, které se účastní při procesu hojení ran. Ty jsou spontánně adsorbované ze séra kultivačního média nebo z tělních tekutin, ale mohou být také přímo syntetizovány samotnými buňkami.

Molekuly proteinů ECM jsou k povrchu materiálu poutány slabými chemickými vazbami, jako jsou vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly a další slabé interakce. Buňky se na tyto proteiny vážou pomocí svých adhezních receptorů. Tyto receptory mohou být např. cukerného charakteru, jako jsou proteoglykany, které se mohou vázat i na cukerné ligandy (například galaktosový ligand). Nejčastějšími a nejlépe prozkoumanými receptory buněčné adheze jsou integrinové receptory, které jsou přítomny na buněčné membráně. Adhezní receptory rozpoznávají a vážou se na specifická místa proteinů ECM, například na aminokyselinové sekvence Arg-Gly-Asp, tzv. RGD. Tyto sekvence rozlišujeme dle toho, zda jsou typické pro nějaký protein, např. RGD sekvence se vyskytuje ve fibrinonektinu a vitronektinu, pro kolagen je naopak typická DGEA sekvence, tj. Asp-Gly-Glu-Ala nebo preferují vazbu k nějakému určitému buněčnému typu (např. sekvence KSRS (Lys-Arg-Ser-Arg) je specifická pro kostní osteoblasty). Receptory se na sekvence opět vážou pomocí slabých sil, stejně jako proteiny ECM na povrch materiálu (Bačáková a Švorčík 2008; Bačáková *a kol.* 2004).

Kromě integrinových a neintegrinových receptorů existují i další buněčné adhezivní molekuly - cadheriny a imunoglobuliny, které zajišťují interakci buňka-buňka, včetně interakce s buňkami imunitního systému, cestou přímého kontaktu (ligand-receptor). Cadheriny jsou molekuly odpovědné za selektivní adhezi určitých buněčných typů, což je nezbytné během vývinu jedince. Jsou tvořeny jako polypeptidové prekurzory, které jsou posttranslačně modifikovány (např. glykosylací či fosforylací).



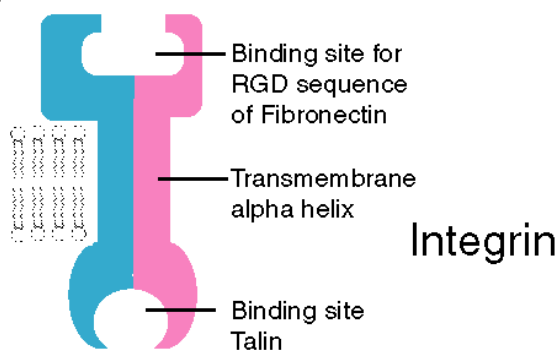
Obr. 2. Mechanismus adheze buňky k umělému materiálu (Bačáková *a kol.* 2008)

Ačkoliv je chemické složení povrchu materiálu důležitým faktorem, který ovlivňuje interakci buňka-umělý materiál, není jediným faktorem. Existuje mnoho dalších fyzikálně-chemických vlastností povrchu materiálu (např. polarita, rigidita, smáčivost, drsnost, elektrický náboj a vodivost), které určují v jakém množství, konformaci, stabilitě či prostorové orientaci budou k materiálu adsorbovány výše uvedené molekuly ECM a výrazně tím mohou přispět ke změně chování buněk (Bačáková a Švorčík 2008; Bačáková *a kol.* 2004). V důsledku toho je povrchová modifikace tkáňových náhrad jedna z nejdůležitějších kritérií při výběru biomateriálů.

4.1 Integriny - hlavní receptory buněčné adheze

Integriny jsou nejčastěji zastoupené a nejlépe prozkoumané receptory buněčné adheze. Tyto unikátní molekuly mohou při signalizaci přes buněčnou membránu fungovat oběma směry. Při signalizaci dovnitř buňky dojde k vazbě ligandu na extracelulární doménu integrinu, změní se konformace receptoru a signál je přenesen do buňky. Opačný typ signalizace se objeví díky cytoplazmatickým molekulám, které aktivují signální dráhy v buňce a vedou k aktivaci či deaktivaci integrinů (Gahmberg *a kol.* 2009). Integrinové receptory jsou heterodimerní transmembránové

glykoproteiny skládající se z nekovalentně vázaných α a β podjednotek (Hynes 2002). Podle typu jednotlivých řetězců α a β (např. α_1 , α_2 , α_v , α_5 , β_1 , β_2) a jejich kombinací (např. $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$) se integrinové receptory vážou k určitým molekulám ECM, tzn. k určitým aminokyselinovým sekvencím. Například $\alpha_v\beta_3$ integrin rozpoznává sekvenci RGD na vitronektinu, $\alpha_5\beta_1$ integrin je také receptorem pro RGD sekvenci, ale na fibronektinu. Na druhou stranu může jeden typ integrinu vázat více ligandů, například tento stejný integrin $\alpha_5\beta_1$ váže mimo RGD sekvence také například RRETAWA (Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala) sekvenci (Bačáková *a kol.* 2004). Jinými slovy, integrinové receptory nejsou zcela striktně specifické pro určitý ligand, pouze jejich afinita může být k danému ligandu větší. Pokud se tento preferovaný ligand v prostředí zrovna nevyskytuje, mohou vázat i jiné typy molekul extracelulární matrix. Z tohoto důvodu bývají někdy integriny označovány jako "nejpromiskuitnější receptory" (Hemler 1998; Horton 1997). V lidských buňkách je možno nalézt 24 typů různých integrinů (Gahmberg *a kol.* 2009). Po vazbě integrinových receptorů na jednotlivé aminokyselinové sekvence se integriny sdružují do specifických míst na buněčné membráně zvaných fokální adhezivní plaky nebo jednoduše fokální adheze. V těchto placích integriny komunikují s mnoha strukturálními a signálními proteiny (např. talin, vinkulin, fokální adhezivní kináza (FAK), paxillin, α -aktin) a spojují se s aktinovým cytoskeletem, který prostupuje celou cytoplazmou buňky a váže se na různé enzymy, buněčné organely i jádro. Díky tomu se signál z extracelulárního prostředí, představovaného umělým materiálem, přeneše až ke genetické informaci buňky a může ovlivnit její následný vnější projev (proteosyntézu), tím i celkové fungování buňky. Jedná se např. o její schopnost adherovat, migrovat, růst, dělit se, kontrahovat se, produkovat a uvolňovat různé látky (Bačáková a Švorčík 2008; Bačáková *a kol.* 2004).



Obr. 3. Integrin (převzato z <http://course1.winona.edu/sberg/ILLUST/Integrin.gif>)

5. Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu materiálů

Mezi nejvýznamnější povrchové vlastnosti biomateriálu patří: povrchová drsnost, polarita, smáčivost, elektrický náboj a vodivost, tuhost či pružnost povrchu a další (Bačáková *a kol.* 2004; Bačáková a Švorčík 2008; Engler *a kol.* 2004). Povrchová drsnost a topografie jsou důležité vlastnosti při interakci buňka-materiál a pro kvalitní integraci implantátu do okolní tkáně (He *a kol.* 2008, Hench a Polak 2002).

5.1 Povrchová drsnost

Podle míry nepravidelností povrchu materiálu lze rozlišovat makrodrsnost (nerovnosti o rozměrech 100 μm - milimetry), mikrodrsnost (100 nm - 100 μm) a nanodrsnost (méně než 100 nm). Každá z těchto úrovní drsnosti má na buňky specifický vliv.

Makrodrsnost se jeví příznivě, protože zlepšuje upevnění implantátu v přirozené tkáni a obvykle nijak negativně neovlivňuje např. adhezi a rozptřeni buněk. Mikrodrsnost na jednu stranu příznivě stimuluje rostoucí osteoblasty směrem k jejich diferenciaci, jak ukázala genová exprese navozující osteogenní diferenciaci a vyšší stupeň mineralizace extracelulární matrix ve srovnání s buněčným růstem na hladkých površích (Lossdorfer *a kol.* 2004; Schneider *a kol.* 2003). Na druhou stranu byla zpozorována snížená adheze a proliferace buněk rostoucích na mikrodrsném povrchu (Lossdorfer *a kol.* 2004; Schneider *a kol.* 2003), což může být zapříčiněno tím, že velikost adhezni plochy je limitována topografií povrchu materiálu. Jinými slovy, buňky, jejichž plocha adheze má obvykle rozměry řádově v desítkách mikrometrů, jsou na mikrostrukturovaných površích nuceny vyhýbat se nerovnostem (např. adherovat jen v prohlubních mezi nimi) či nerovnosti přemostovat, což omezuje kontakt jejich povrchu s materiálem. Například osteoblasty získané z kostní dřene myši a pěstované na mikrodrsném titanu tryskaném hliníkem nebyly zcela rozptřeny a jejich proliferace, viabilita a aktivita alkalické fosfatázy byly ve srovnání s hladkými povrchy nižší (Sader *a kol.* 2005). Podobně tomu bylo v pokusu s kompozity uhlík-uhlík, tj. materiály s uhlíkovou maticí vyztuženou uhlíkovými vlákny, které měly na svém povrchu mikrometrové nerovnosti způsobené vyvýšením uhlíkových vláken nad maticí. Zde kostní buňky MG 63 přednostně adherovaly a rostly v brázdách mezi vyvýšeninami a měly poměrně málo vyvinuté fokální adhezni plaky. Pokud však byla

na materiálu místa s alespoň částečně vyrovnanými vyvýšeninami, růst těchto buněk byl rychlejší, měly dobře vyvinuté fokálních adhezni plaky a koncentrace osteokalcinu a osteopontinu (tj. markerů osteogenní diferenciace) byla v buňkách významně vyšší (Bačáková *a kol.* 2001b; Starý *a kol.* 2003a). Je obtížné srovnávat výsledky těchto studií, neboť chování buněk na mikrodrsných površích je určováno nejen velikostí nerovností, ale i tvarem a vzdáleností. Například oblé nerovnosti s velkými mezerami mezi sebou spíše podporují adhezi buněk než nerovnosti hustě rozložené ostré a špičaté. Většina studií však porovnává pouze velikosti povrchových nerovností, popisované parametrem R_a (aritmetická střední hodnota drsnosti), který je definován jako průměrná odchylka profilu drsnosti od střední linie.

Zatímco vliv mikrodrsnosti na chování buněk se ukazuje být stále sporný, značná pozornost byla v posledních letech věnována studiu efektu nepravidelností v rozměrech nanometrů. Nanostrukturovaný povrch se ukázal jako pozitivní a jednoznačně podporující iniciální adhezi, následnou proliferaci a expresi diferenciačních markerů buněk, především kostních osteoblastů. Vyplývá to z toho, že nanostrukturovaný povrch se značně podobá architektuře přirozené extracelulární matrix, která je také organizovaná v nanorozměrech. Je složena především z kolagenních vláken o tloušťce 50 - 200 nm a anorganických hydroxyapatitových nanokrystalů o velikosti přibližně 4 nm (Stevens a George 2005). Na nanostrukturovaný povrch se také adsorbují proteiny ECM (zprostředkovávající adhezi buněk) ve výhodnější prostorové konformaci, která poskytuje adhezivním receptorům lepší přístup ke specifickým místům v těchto adsorbovaných proteinech, jako je například aminokyselinová sekvence Arg-Gly-Asp (RGD), která slouží jako ligand pro tyto receptory (Price *a kol.* 2004; Webster *a kol.* 2000).

5.2 Smáčivost povrchu

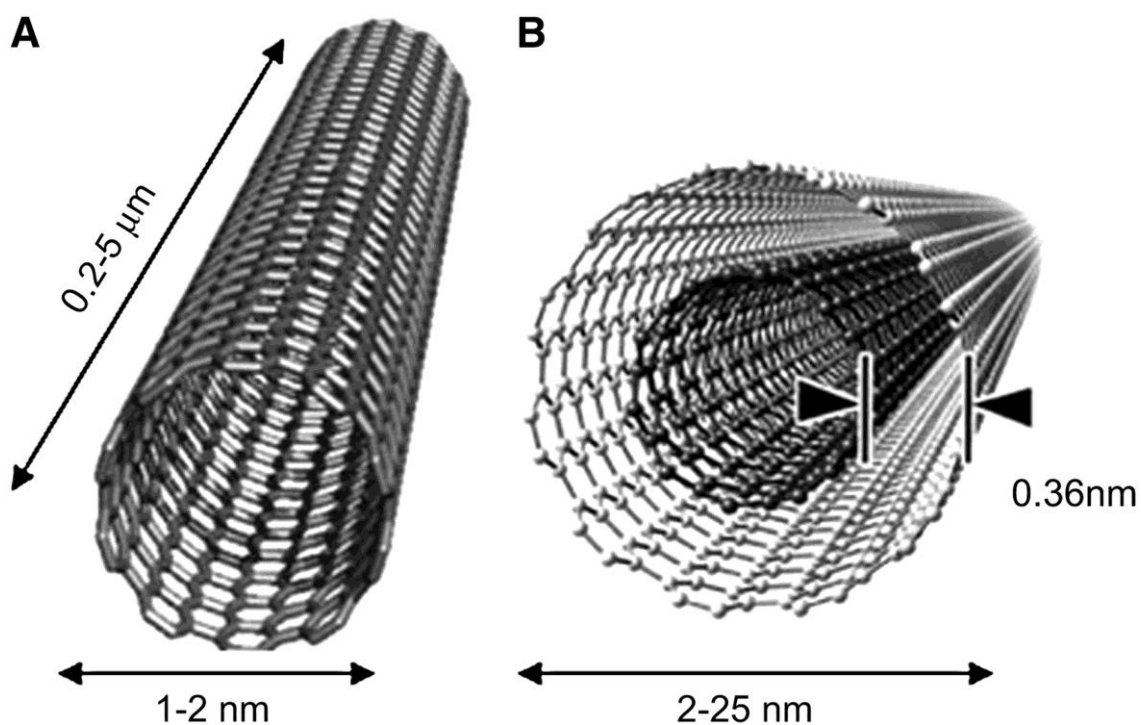
Další z důležitých parametrů adheze buněk je smáčivost povrchu. Smáčivost neboli hydrofilie či hydrofobie povrchu, se obvykle měří pomocí kontaktního úhlu kapek polárních kapalin (voda) a nepolárních kapalin (benzylalkohol) na povrchu materiálu. Velikost kontaktního úhlu kapky je nepřímě úměrná smáčivosti materiálu, která totiž vyplývá z jeho polaritu - výška polární složky povrchové energie materiálu je přímo úměrná jeho hydrofilii. Při vyšším kontaktním úhlu polární tekutina (voda) sniží

svůj kontakt s povrchem materiálu, který je hydrofobní, zatímco menší úhel udává výraznější rozprostření tekutiny na povrchu, tzv. smáčivost materiálu. Buňky nejpříznivěji reagují na středně hydrofilní povrch, který umožní adsorpci proteinů v dostatečném množství a výhodné konformaci. Někteří autoři ve své studii kombinovali efekt nanodrsnosti se smáčivostí a porovnávali růst a osteogenní diferenciaci kalvariálních osteoblastů (získaných z neonatálních potkanů) na silikonových substrátech pokrytých vrstvou TiO_2 filmů ve formě anatasu, rutilu a amorfního TiO_2) s nerovnostmi s řádu nanometrů (8 - 10 nm), ale s různou povrchovou smáčivostí. Adheze, rozprostření, proliferace a aktivita alkalické fosfatázy těchto osteoblastů byla vyšší na středně smáčivém povrchu anatazu (He *a kol.* 2008).

Další z cest, které by mohly vést ke zlepšení interakce buněk s povrchem titanového implantátu a jeho přijetí lidskou tkání, jsou nejrůznější úpravy a modifikace fyzikálně-chemických vlastností povrchu materiálu. Důležité je najít co nejdokonalejší systém s kvalitní osteointegrací a dlouhodobou funkčností při zatížení. Toto mohou zajišťovat bioaktivní materiály, které urychlují vznik pevné vazby mezi kostní tkání a povrchem implantátu bez jakékoliv mezivrstvy vazivové tkáně. Drsné neboli texturované titanové povrchy původní hladký povrch téměř vytlačily, protože vedou k lepší integraci implantátu do kostní tkáně během hojení. Zdrsněný povrch implantátu se podobá struktuře kosti a ta do něj ochotně vrůstá, tedy se zvyšující se drsností povrchu se zvýší i úroveň osteointegrace. Mezi modifikace povrchu lze zařadit i nanášení jiných materiálů např. atomů, molekul anorganických či organických sloučenin. Na povrch lze nanést různé molekuly extracelulární matrix, ligandy pro adhezni receptory buněk, fibrin, keramické vrstvy (např. hydroxyapatit) (Bačáková a Švorčík 2008; Vagaská *a kol.* 2010). Potahování vrstvou hydroxyapatitu je stále napadáno. Námitky proti potahování se týkají chování tenké vrstvy z dlouhodobého hlediska. Zpochybňována je především stabilita hydroxyapatitu v biologickém prostředí (web 8). Proto se hledají nové technologie fyzikálních nebo chemických úprav titanu, které by urychlily vznik a zvýšily kvalitu osteointegrace. Zajímavými technologiemi povrchových úprav titanových implantátů jsou anodická oxidace ve vodných roztocích minerálních kyselin a solí, potahování povrchu vrstvou diamantu podobnému uhlíku (DLC - diamond like carbon) a především modifikace povrchu pomocí nanotub.

5.3 Modifikace pomocí nanotub

Nanotrubička má - jak sám název hovoří - tvar trubičky a její povrch se skládá z atomů uhlíku, TiO_2 , atd. Nanotuby mají velké přednosti oproti dřívějším materiálům, jsou totiž velmi pevné, až tisíckrát pevnější než ocelová vlákna a přitom šestkrát lehčí. Mohou sloužit i například jako jehly v injekčních stříkačkách, které budou schopné propíchnout buněčnou stěnu a dopravit do buňky přesné množství chemikálií (web 9).



Obr. 3. Schéma jednotěnné (A) a mnohostěnné (B) uhlíkové nanotuby s typickými rozměry šířky, délky a vzdáleností mezi jednotlivými vrstvy grafenu u MWCNT (Iijima 2002, upraveno).

5.3.1 Uhlíkové nanotuby

Uhlíkové nanotuby (CNT) byly poprvé objeveny a popsány Sumio Iijimou v roce 1991 (Iijima 1991). Uhlíkové nanotuby jsou jednorozměrné válcovité nanostruktury, které jsou vytvořeny z uhlíkových atomů o průměru 1 - 100 nanometrů a délkou do 100 μm . Nanotuby jsou velice populární díky svým netradičním vlastnostem a možnostem pro praktické aplikace, které z těchto vlastností vyplývají. Mezi tyto vlastnosti patří elektronická struktura či mechanická pevnost, uhlíkové nanotuby jsou asi desetkrát pevnější než ocel a přitom desetkrát lehčí. Díky tomu jsou nanotuby velmi výhodné právě při konstrukci pevných a zároveň lehkých materiálů. Lze je rozdělit na trubkové konstrukce, které jsou tvořené jednou válcovitou grafenovou vrstvou se zakončením ve tvaru polokoule (tzv. jednostěnné nanotuby, single-walled carbon nanotubes = SWCNT) nebo několika koncentricky upořádaných vrstev grafenu (tzv. mnohostěnné nanotuby, multiple-walled carbon nanotubes = MWCNT) (Merkoçi *a kol.* 2005). Jednotlivé jednostěnné uhlíkové nanotuby je možné využít jako mikroelektrody nebo jako sondu u technik skenovací mikroskopie. Uhlíkové nanotuby ve směsi s polymerním nosičem dávají vzniknout uhlíkovým pastám a kompozitům (Merkoçi *a kol.* 2005).

Řada autorů se ve svých studiích zaměřila na využití uhlíkových nanotub také v tkáňovém inženýrství. Například Abarrategi *a kol.* (2008) testovali adhezi, životaschopnost a proliferaci myších myoblastů C2C12 na mnohostěnných uhlíkových nanotubách, které byly součástí kompozitního materiálu obsahujícího chitosan a lidský morfogenetický protein kostí (BMP-2). Autoři prokázali, že nanotuby podpořily vývoj buněčné linie myoblastů C2C12 směrem k osteoblastům. Kromě toho by uhlíkové nanotuby mohly být použity pro elektrickou stimulaci osteoblastů, což by podpořilo jejich proliferaci, diferenciaci a tvorbu mineralizované kostní matrix a tím i hojení poškozené kosti. Po splnění této funkce by se daly nanotuby poměrně rychle odstranit z těla glomerulární filtrací (McDevitt *a kol.* 2007, Supronowicz *a kol.* 2002, Zanello *a kol.* 2006).

5.3.2 TiO₂ nanotuby

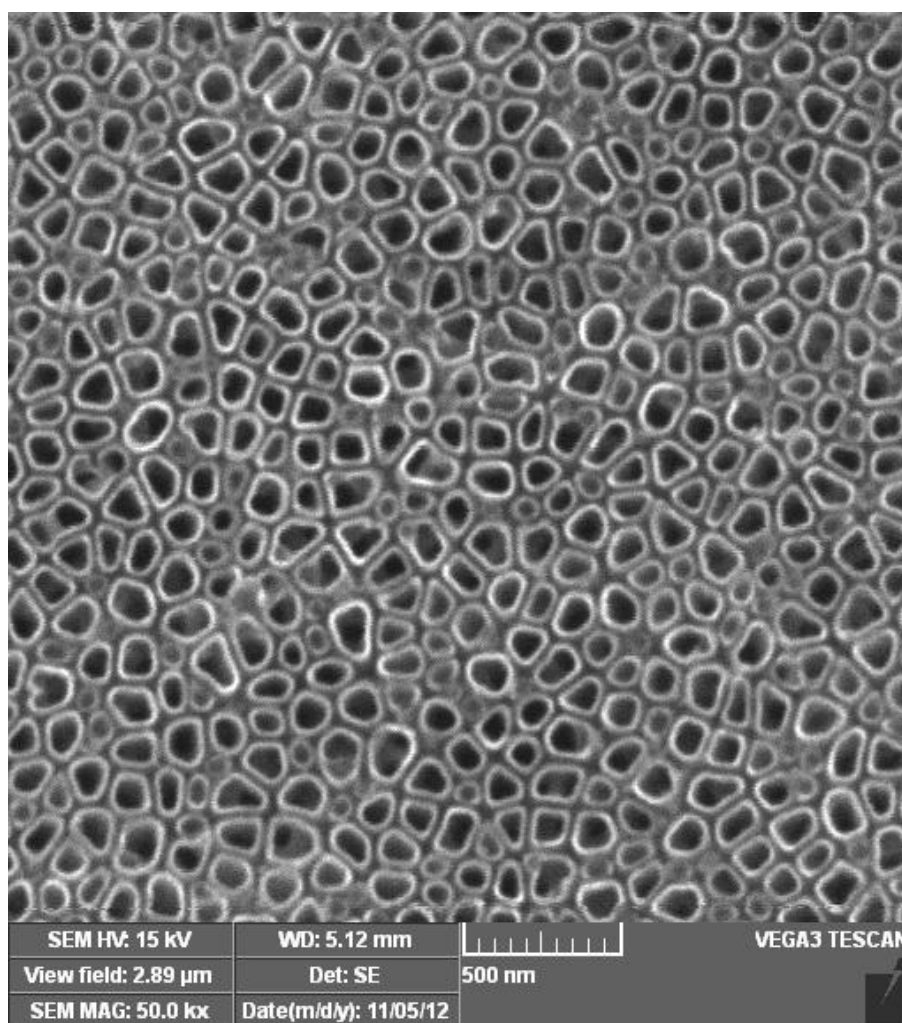
TiO₂ se v přírodě vyskytuje v několika krystalických fázích. Ty nejvíce známe a rozšířené jsou brookit, rutil, anatáz a TiO₂ ve své amorfní formě. Brookit není příliš stabilní a zatím není známo její širší využití. Následující dvě fáze jsou však mnohem zajímavější. Jednak je to nízkoteplotní anatáz, který je známý především pro své intenzivní fotoaktivní účinky (ty budou vysvětleny později) a rutil, stabilní při vysokých teplotách, který vykazuje slabší fotoaktivitu a je dobrým substrátem pro růst a životaschopnost různých buněk, například lidských kožních fibroblastů (Popescu *a kol.* 2007). Vzhledem ke své bioinertnosti, tj. antiadhezivní vlastnosti, se rutil používá v kombinaci s bioaktivní molekulou zprostředkovávající adhezi, jako je fibronectin (von Walter *a kol.* 2005).

Anatáz jako forma TiO₂ má silnější fotoaktivní účinky než rutil. Do fotoaktivity patří jednak superhydrofilicita, čili vysoká smáčivost povrchu, a fotokatalýza. Díky fotokatalytickým účinkům dokáže rozkládat nejen vodu, ale i různé organické sloučeniny, mnohdy zdraví škodlivé, ale například také bakterie. Jak superhydrofilicita, tak fotokatalýza se projevují po ozáření materiálu UV zářením. Navíc se oba tyto jevy projevují současně a dokonce jeden podporuje druhý, což má za následek tzv. samočisticí efekt. Anatáz se také ukázal být nejlepší fází TiO₂ pro adhezi, růst a diferenciaci osteoblastů (He *a kol.* 2008).

Nanotuby umožňují mnohem větší kontrolu chemického nebo fyzikálního chování. Nejedná se jen o velikost plochy, ale různé nanotuby mohou mít i jiné elektronické vlastnosti. Právě tyto efekty se podílejí ke zlepšení interakce materiálu s okolními médii. Oxid titaničitý může být připraven ve formě trubek o průměru několika nanometrů a délce i několik mikrometrů. Takové nanostruktury mohou být na titanu vytvořeny jeho elektrochemicko-anodickou oxidací v elektrolytu s obsahem fluoridových iontů. Růst takových nanotrubiček je v tomto případě souhrou dvou zároveň probíhajících procesů. První z nich je anodická oxidace povrchu (vznik souvislé pasivní vrstvy TiO₂) a druhý je lokální rozpuštění rostoucího TiO₂ fluoridovými ionty.

Nanotuby nemusí být pouze titaničité, ale mohou být tvořeny i jinými oxidy přechodných kovů. Atraktivní je však TiO₂ především díky jeho vlastnostem. Tyto struktury představují jedinečnou kombinaci vysoce funkčních vlastností TiO₂ s pravidelnou a kontrolovatelnou nanogeometrií (délka, průměr trubky a vlastní uspořádání lze nastavit dle požadovaných parametrů). Struktura trubek je amorfní a lze

ji upravit tak, aby byla podpořena jejich biologická aktivita (např. doping pomocí fosforu či vápníku). Bioaktivní povrch stimuluje depozici kostních osteoblastů a tím usnadňuje interakci implantátu s kostí (Balasundaram *a kol.* 2007; Kodama *a kol.* 2009; Kunze *a kol.* 2008; Macak *a kol.* 2007; cit dle Fojt *a kol.* 2010).



Obr. 4. SEM fotografie povrchové topografie TiO_2 nanotub (pořízeno v Ústavu kovových materiálů a korozního inženýrství, Fakulta chemické technologie, VŠCHT v Praze).

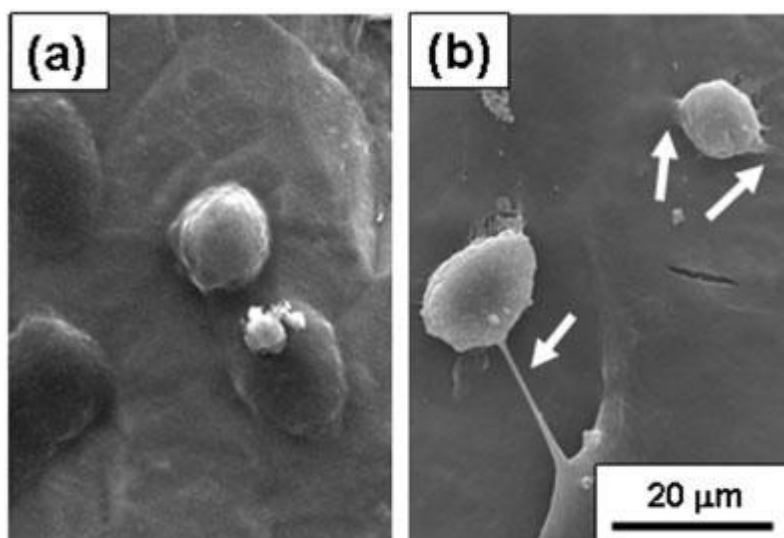
6. Interakce buněk s povrchovou vrstvou nanotub

Nanotuby jsou velice důležité pro regeneraci kostní tkáně, protože napodobují přirozenou kostní matrix a umožňují tak buňkám lépe adherovat na biomateriál. Prvními kroky pro hodnocení biokompatibility materiálu jsou *in vitro* a následně *in vivo* testy na laboratorních zvířatech. *In vitro* se provádí testy cytotoxicity a adheze s buněčnými liniemi osteoblastů. Nejčastěji používané lidské linie osteoblastů odvozené z kostí jsou linie CPC-2, MG-63, SaOS-2 či U-2OS, u kterých se testuje schopnost adheze, růstu, proliferace na materiálu a syntézy markerů osteogenní diferenciace (např. alkalické fosfatázy, osteopontinu a osteokalcinu). Pro kultivaci buněk na umělém materiálu se používá buď statická kultivace buněk (vhodná pro planární vzorky tzv. dvojrozměrné) či kultivace v dynamickém systému (vyžadována pro vzorky trojrozměrné). Vzorky jsou vloženy do kultivačních nádob, které jsou naplněny suspenzí buněk v kultivačním médiu. Buňky jsou pak první den po nasazení ponechány ve statických podmínkách, aby měly dostatek času pro adhezi a rozprostření se na materiálu, a pak je pokračováno ve vybrané kultivaci a následných testech cytotoxicity materiálu a viability buněk (pro přehled viz Vandrovcová a Bačáková 2011).

V posledních letech se mnoho autorů zabývá vlivem uhlíkových i TiO_2 nanotub na buněčné linie osteoblastů. Například Lobo *a kol.* (2010) zkoumali růst lidských osteoblastů SaOS-2 na vertikálně uspořádaných uhlíkových nanotubách (VACNT) pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Testovali životaschopnost buněk pomocí enzymu laktát dehydrogenáza (LDH), který se nachází v cytoplasmě buněk a jeho extracelulární přítomnost signalizuje mechanické poškození cytoplasmatické membrány. VACNT neprokázali žádnou toxicitu vůči buňkám SaOS-2, které podle uvedené studie vykazovaly vysokou životaschopnost a proliferanci a vytvořily na povrchu VACNT souvislou vrstvu. Další studie se zabývají adhezí osteoblastů SaOS-2 na různé formy uhlíkových nanotub. Buňky více adherují na MWCNT navíc s vyšší rychlostí adheze zejména v počáteční fázi po nasazení, nicméně povrch MWCNT brání dostatečnému rozprostření buněk oproti SWCNT. Adheze buněk je také značně ovlivněna inkubací nanotub se sérem před nasazením buněk, což podle některých výsledků ještě zvyšuje adsorpci specifických proteinů ze séra kultivačního média (Akasaka *a kol.* 2009).

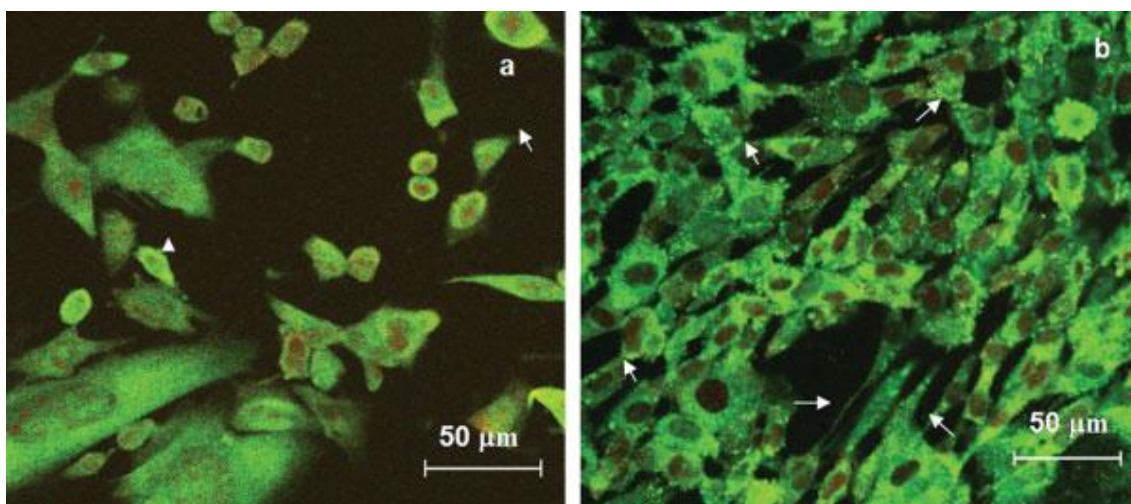
Nejvyužívanějším biomateriálem pro kostní náhrady je titan a jeho slitiny a to především díky jeho mechanickým vlastnostem, stabilitě v biologických roztocích, biokompatibilitě atd. Ovšem existují i případy, kdy došlo u pacientů zřejmě k neúspěšné osteointegraci titanového implantátu a vyskytly se u nich negativní imunitní reakce. Některé tyto příznaky byly popsány jako kožní vyrážky, selhání implantátu a dokonce nespecifické imunoprese (Sicilia *a kol.* 2008). Proto se v posledních letech vědci zabývají biokompatibilitou mezi vrstvou titaničitých nanotub a lidskými osteoblasty.

Klíčovou roli pro integraci implantátu hraje právě stupeň adheze osteoblastů na materiál. Například Portan *a kol.* (2012) hodnotili interakci osteoblastů s čistým titanem, TiO₂ nanotubami a TiO₂ nanotubami potaženými HAp částicemi, které vykazovaly nejvyšší biokompatibilitu. Ve své studii došli k závěru, že osteoblasty efektivně adherují na jakýkoliv titanový povrch (čistý Ti nebo nanotubové vrstvy). Nicméně toto silné ukotvení osteoblastů ke kovovému materiálu může vést k jejich apoptóze, což může mít za následek zmiňované neúspěšné implantace (Portan *a kol.* 2012). Také Oh *a kol.* se ve své práci zabývali vlivem TiO₂ nanotub na růst myších progenitorových buněk MC3T3-E1 a došli k závěru, že nanotuby značně mění topografii materiálu, který díky nim podporuje adhezi a rozptřeni buněk. Osteoblasty kultivované na TiO₂ nanotubách mohou svými filopodii zasahovat přímo až do pórů nanotub a vytvářet tak složité propletenou strukturu.



Obr. 5. SEM mikrofotografie osteoblastů linie MC3T3-E1 na čistém titanu (a) a na TiO₂ nanotubách (b) po 2 hod inkubace (Oh *a kol.* 2006)

Přítomnost nanotrubiček vyvolává výrazné zrychlení tempa růstu osteoblastů až o 300 - 400% v porovnání s rychlostí růstu buněk na čistém titanu, což je pravděpodobně způsobeno právě změnou topografie povrchu materiálu a zvětšenou plochou pro adhezi buněk (Oh *a kol.* 2006). Adheze a rozprostření buněk na nanostrukturovaný materiál závisí také na struktuře nanotub, především na jejich průměru. Zdá se, že nanotuby s menším průměrem (přibližně 100 nm) tvoří na povrchu materiálu více ostrých hran na jednotku plochy než nanotuby s větším průměrem, což zlepšuje nanodrsnost materiálu a afinitu buněk k jeho povrchu (Gongadze *a kol.* 2013). Stejně jako předchozí autoři, tak i Das *a kol.* (2009) poukázali na fakt, že čistý titan jako bioinertní materiál není vhodný pro buněčnou adhezi v porovnání s bioaktivním povrchem materiálu, který zajišťují právě nanotuby. Prokázala to řada pokusů, ve kterých se titaničité nanotuby ukázaly být příznivé pro adhezi a rozprostření buněk. A především nanoporézní morfologie materiálu vytváří vynikající kotevní místa pro prodlužování filopodií osteoblastů. Adheze buněk na vzorky byla testována pomocí imunofluorescenčního barvení a následného focení vzorků, kde se projevila vyšší syntéza vinkulinu, proteinu asociovaného s integrinovými receptory, na materiálu s nanotubami (Obr. 6.). Vyšší drsnost, nízký úhel smáčení a nanoporézní morfologie nanotub vede k významnému zlepšení interakcí buňka-umělý materiál (Das *a kol.* 2009).



Obr. 6. Imunolokalizace vinkulinu v osteoblastech po 5 dnech kultivace v kultuře na čistém titanu (a) a povrchu s TiO₂ nanotubami. Šipky ukazují fokální adhezni místa, zelená fluorescence indikuje protilátka vázaná na vinkulin, červená fluorescence indikuje jádro (Das *a kol.* 2009).

7. Závěr

Umělý materiál, který je vyvíjen tkáňovým inženýrstvím pro kostní náhrady, musí umožňovat kostním buňkám adhezi, růst, správnou diferenciaci a zachovat jejich životaschopnost. Chování osteoblastů velice ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti materiálu, jako je povrchová drsnost, chemické složení či smáčivost. Kostní osteoblasty adherují k umělému materiálu prostřednictvím proteinů extracelulární matrix adsorbovaných k povrchu materiálu. Množství, konformaci, stabilitu či prostorovou orientaci adsorbovaných proteinů ovlivňují právě tyto povrchové vlastnosti. Jednou z nejdůležitějších povrchových vlastností je drsnost materiálu. Zjistili jsme, že různé parametry drsnosti mohou mít na buňky odlišný vliv, například drsnost v řádu mikrometrů stimuluje diferenciaci osteoblastů, ale na druhou stranu negativně ovlivňuje adhezi buněk a snižuje jejich proliferaci. Naopak jednoznačně pozitivní vliv na buňky prokázala drsnost v řádu nanometrů.

Interakci buňka - kovový materiál (zejména titan) lze významně ovlivnit pomocí povrchových úprav materiálu, jedná se především o modifikaci vrstvou nanotub. Nanotuby zvyšují povrchovou drsnost titanu, napodobují přirozenou strukturu kostní tkáně a podporují tak adhezi, růst a osteogenní diferenciaci buněk. Zjistili jsme, že samotná struktura nanotub může ovlivnit chování buněk. Nanotuby s menším průměrem výrazněji podporují afinitu buněk k materiálu. Studie, které srovnávají růst buněk na čistém titanu a titanu s povrchovou vrstvou nanotub, jednoznačně prokázaly lepší buněčnou adhezi na materiálu s nanotubami. Ten má proto velký potenciál pro budoucí využití v tkáňovém inženýrství. Povrchová vrstva nanotrubiček mnohem více podporuje iniciační adhezi osteoblastů a následně jejich proliferaci, takže dochází k vytvoření souvislé vrstvy buněk na materiálu. Tato vlastnost je zásadní pro rychlou integraci implantátu do okolní tkáně. Právě pro to se domníváme, že protézy na bázi titanu s TiO_2 nanotrubičkami jsou vhodné pro další zkoumání a testování *in vitro* a *in vivo* na laboratorních zvířatech a případně i pro klinickou aplikaci, kde by mohly urychlit osteointegraci kostních implantátů a zlepšit kvalitu života pacientů s umělými kostními náhradami.

8. 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*, 2008; **29**: s 94-102.
- Akasaka T, Yokoyama A, Matsuoka M, Hashimoto T, Abe S, Uo M, Watari F: Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2) to carbon nanotube sheets: *Biomedical Materials and Engineering*, 2009; **19**: s 147-153.
- Báčáková L, Starý V, Kofroňová O, Lisá V: Polishing and coating carbon fibre-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG 63 cells and vascular smooth muscle cells *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001b; **54**: s 567-578.
- Báčáková L, Filová E, Rypáček F, Švorčík V & Starý V: Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research*, 2004; **53**: s 35-45.
- Báčáková L, Švorčík V: Cell colonization control by physical and chemical modification of materials, kapitola I: Cell Growth Processes: New Research (Ed. Daiki Kimura), Nova Science Publishers, Inc., 2008; s 5-56.
- Báčáková L, Filová E, Pařízek M, Ruml T, Švorčík V: Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, 2011; **29**: s 739-767.
- Balasundaram G, Yao C, Webster T J: TiO₂ nanotubes functionalized with regions of bone morphogenetic protein-2 increase osteoblast adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2007; **84A**: s 447-453.
- Callister WD: *Materials Science and Engineering : An Introduction*. 5th Ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2000; s 871.

- Das K, Bose S, Bandyopadhyay A: TiO₂ nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009; **90**: s 225-237.
- Ducháček V: Polymery – výroba, vlastnosti, zpracování, použití. VŠCHT, Praha 2006.
- Dylevský I: Funkční anatomie. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009; ISBN 978-80-247-3240-4.
- Engler A, Bačáková L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Discher D: Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophysical Journal*, 2004; **86**: s 617-628.
- Fojt J, Moravec H, Joska L: Nanostructuring of titanium for medical applications, *Nanocon*, 2010; s 1-3.
- Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M: Regulation of integrin activity and signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2009; **1790**: s 431-444.
- Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia Ak: Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Progress in Materials Science*, 2009; **54**: s 397-425.
- Gongadze E, Kabaso D, Bauer S, Park J, Schmuki P, Iglič A. Adhesion of osteoblasts to a vertically aligned TiO₂ nanotube surface. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013; **13**: s 194-200.
- Griffith LG. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 2000; **48**: s 263-277.

- 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*, 2008; **19**: s 3465-3472.
- Hemler ME: Integrin associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998; **10**: s 578-585.
- Hench LL & Polak JM: Third-generation biomedical materials. *Science*, 2002; **295**: s 1014-1017.
- Horton MA: The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1997; **29**: s 721-725.
- Hynes RO: Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002; **110**: s 673-687.
- Iijima S: Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 1991; **354**: s 56-58.
- Iijima S: Carbon nanotubes: past, present, and future. *Physica B*, 2002; **323**: s 1-5.
- Katti KS: Biomaterials in total joint replacement. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004; **39**: s 133-42.
- Kodama, A., Bauerb S, Komatsua A, Asoha H, Onoa S, Schmuki P: Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly preloaded with synthetic hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 2009; **5**: s 2322-2330.
- Koutský J: Biomateriály. *Vydavatelství Západočeské univerzity*, 1997; s 72.
- Kunze J, Müller L, Macak JM, Greil P, Schmuki P, Müller FA: Time-dependent growth of biomimetic apatite on anodic TiO₂ nanotubes. *Electrochimica Acta*, 2008; **53**: s 6995-7003.

- Lobo AO, Antunes EF, Palma MB, Pacheco-Soares C, Trava-Airoldi VJ, Corat EJ: Monolayer formation of human osteoblastic cells on vertically aligned multiwalled carbon nanotube scaffolds. *Cell biology international*, 2010; **34**: s 393-398.
- Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD: Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004; **70A**: s 361-369.
- Lowestan HA, Weiner S: On Biomineralization. *Oxford University. Press: New York*, 1989.
- Macak JM, Tsuchiya H, Ghicov A, Yasuda K, Hahn R, Bauer S, Schmuki P: TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2007; **11**: s 3-18.
- Mallat JM, Marieb EN: Anatomie lidského těla. *Computer press*, 2005; s 880.
- Mays S: The Archaeology of human bones. New York, London: Roulledge, 1998; s 257.
- McDevitt MR, Chattopadhyay D, Jaggi JS, Finn RD, Zanzonico PB, Villa C, Rey D, Mendenhall J, Batt CA, Njardarson JT, Scheinberg DA: PET imaging of soluble yttrium-86-labeled carbon nanotubes in mice. *PLoS one*, 2007; **2**: s 907.
- Merkoçi A, Pumera M, Llopis X, Pérez B, del Valle M, Alegret S: New Materials for Electrochemical Sensing VI: Carbon Nanotubes. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005; **24**: s 826.
- Nordin M, Frankel VH: Basic biomechanics of the musculoskeletal system. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*, 2001.

- Oh S, Daraio C, Chen LH, Pisanic TR, Fiñones RR, Jin S: Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006; **78A**: s 97-103.
- Oliveira V, Chaves RR, Bertazzoli R and Caram R: Preparation and characterization of Ti-Al-Nb orthopedic implants, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 1998; **17**: s 326.
- Park JB, Kim YK: Metallic Biomaterials. In *The Biomedical Engineering Handbook*, 2nd ed.; Bronzino JD, Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, USA, 2000.
- Popescu S, Demetrescu I, Sarantopoulos C, Gleizes AN, Iordachescu D: The biocompatibility of titanium in a buffer solution: compared effects of a thin film of TiO₂ deposited by MOVCD and of collagen deposited from a gel. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2007; **18**: s 2075-2083.
- Portan DV, Kroustalli AA, Deligianni DD, Papanicolaou GC: On the biocompatibility between TiO₂ nanotubes layer and human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012; **100A**: s 2546-2553.
- Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ: Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004; **70A**: s 129-138.
- Sader MS, Balduino A, de Soares A, Borojevic R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblasts attachment, proliferation, and differentiation. *Clinical Oral Implants Research B*, 2005; **16B**: s 667-675.
- Sedláček V: Titan a jeho slitiny. *Praha: ANTL*, 1963; s 206.
- Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C: Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *Journal of Dental Research*, 2003; **82**: s 372-376.

- Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A: Titanium allergy in dental implant patients. *Clinical Oral Implants Research*, 2008; **19**: s 823-835.
- Starý V, Bačáková L, Horník J, Chmelík V: Bio-compatibility of the surface layer of pyrolytic graphite. *Thin Solid Films*, 2003a; **433**: s 191-198.
- Stevens MM., George JH: Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 2005; **310**: s 1135-1138.
- Supronowicz PR, Ajayan PM, Ullmann KR, Arulanandam BP, Metzger DW, Bizios R: Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002; **59**: s 499-506.
- Vagaská B, Bačáková L, Pamula E, Lisá V, Dobrzynski P: Adhesion and growth of human osteoblast-like cells on aliphatic polyesters with different chemical composition, surface roughness and modification with hydroxyapatite. *Engineering of Biomaterials*, 2006; **9**: s 58-60.
- Vagaská B, Bačáková L, Filová E, Balík K: Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiological Research*, 2010; **59**: s 309-322.
- Vandrovcová M, Bačáková L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiological Research* 2011; **60**: s 403-417.
- Vokurka M, Hugo J: Velký lékařský slovník. *Praha: Maxdorf*, 2002; s 925.
- von Walter M, Rüger M, Ragoss C, Steffens GC, Hollander DA, Paar O, Maier HR, Jahnhen-Dechent W, Bosserhogg AK, Erli HJ: In vitro behavior of a porous TiO₂/perlite composite and its surface modification with fibronectin. *Biomaterials*, 2005; **26**: s 2813-2826.

Wang K: The use of titanium for medical applications in the USA. *Materials Science and Engineering A*, 1996; **213A**: s 134-137.

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R: Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000; **51**: s 475-483.

Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC: Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett*, 2006; **6**: s 562-567.

Internetové zdroje

Web 1: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>

Web 2: http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_2/OH_txt5-7.htm

Web 3: <http://biomech.ftvs.cuni.cz/pbpk/kompodium/anatomie/index.php>

Web 4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7448>

Web 5: <http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>

Web 6: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Web 7: <http://bunecnaterapie.cz/zajimavosti/2009/polymerni-biomaterialy-pro-obnovu-tkani>

Web 8: <http://mech.fsv.cvut.cz/biomechanika/download/poster4.pdf>

Web 9: <http://fyzweb.cuni.cz/knihovna/nanotech/index.htm>

Web 10: <http://www.fd.cvut.cz/personal/vavrdond/text1.html>