

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Markéta Krýslová**

**Biomimetické modifikace titanu v tkáňovém inženýrství kostí**

**Biomimetic modifications of titanium in bone tissue engineering**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Elena Filová, Ph.D.

Praha 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci „Biomimetické modifikace titanu v tkáňovém inženýrství kostí“ vypracovala samostatně na základě citované literatury, výsledků z vyhodnocených dat a za pomoci konzultací se svým školitelem. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2015

.....

Podpis

### **Poděkování**

Tato diplomová práce by nemohla vzniknout bez mé školitelky Mgr. Eleny Filové, Ph.D., z Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, které bych chtěla touto cestou velice poděkovat. Dále bych chtěla poděkovat Doc. Luďkovi Joskovi z Ústavu kovových materiálů a korozního inženýrství, Fakulta chemické technologie, VŠCHT v Praze za přípravu vzorků s nanotubami a panu Ing. Jaroslavu Fenclovi z firmy Beznoska s.r.o. za přípravu vzorků s nástřiky. Za odborné, praktické rady a ochotu pomoci patří díky také Doc. MUDr. Lucii Bačákové CSc., vedoucí Oddělení biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. a i ostatním kolegům zejména za motivaci, podporu a vytváření skvělého pracovního prostředí.

## **Abstrakt**

V okamžiku, kdy dojde k poškození či opotřebením kloubů, je jedním z řešení problému umělá náhrada. Nahrazením postiženého kloubu endoprotézou dochází ke snížení bolesti a pacient může opět vést kvalitní život bez omezení pohybu. Při konstrukci implantátu je třeba splnit všechna specifická kritéria na vlastnosti materiálu. Důležitý je hlavně jeho povrch, který je přímo spojen s kostní tkání. Po implantaci materiálu do kosti se může objevit řada negativních efektů např. infekce, zánět či uvolnění implantátu v důsledku nedostatečné osteointegrace. A právě vhodnou modifikací povrchu materiálu by mohla být zkvalitněna a urychlena osteointegrace a následná regenerace kostní tkáně. Tato práce se zabývá vývojem a hodnocením moderních materiálů imitujících strukturu kosti, zejména nanodrsnost a přítomnost biomimetické složky, např. hydroxyapatitu. V samotném experimentu je hodnocena adheze, proliferace, viabilita, diferenciací a syntéza specifických proteinů lidských osteoblastů linie Saos-2 na titanu modifikovaném nanotubami a hydroxyapatitem v porovnání s nemodifikovaným titanem.

**Klíčová slova:** titan, osteoblasty, nanotuby, hydroxyapatit, nanodrsnost

## **Abstract**

When the big joints like a knee or hip joint are damaged, the solution of this problem is an artificial substitute. The replacement of damaged joints with endoprothesis helps to reduce the pain and to move normally. In the design of the implant is necessary to fulfil all requirements on the properties of the material. The surface of implant is important, because it is directly connected to bone tissue. After implantation, the negative effect include infection, inflammation or release of the implant due to limited osseointegration, may appear. The osseointegration can be improved by modifying the material surface. This thesis is focused on development and evaluation of advanced materials imitating the bone structure, especially nanoroughness and the presence of biomimetic component, such as hydroxyapatite. In this study is evaluated adhesion, proliferation, viability, differentiation, and synthesis of specific proteins of human osteoblasts like Saos-2 on titanium modified with nanotubes and plasma sprayed hydroxyapatite compared with smooth surfaces.

**Key words:** titanium, nanotubes, osteoblasts, hydroxyapatite, nanoroughness

## Obsah

<b>Seznam zkratek.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>Literární přehled.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Historie tkáňového inženýrství.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Kovové materiály v tkáňovém inženýrství.....</b>	<b>12</b>
3.1 Titanové implantáty.....	12
<b>4. Biomimetické modifikace povrchu implantátu.....</b>	<b>13</b>
4.1 Struktura kostní tkáně.....	13
4.2 Nanotuby.....	15
4.3 Hydroxyapatit.....	17
4.4 Trikalciumfosfát.....	19
<b>5. Adheze buněk na umělý materiál.....</b>	<b>21</b>
5.1 Přímá vazba bez účasti receptorových molekul.....	21
5.2 Receptorem zprostředkovaná vazba přes molekuly extracelulární matrix.....	21
<b>6. Markery buněčné adheze a diferenciaci.....</b>	<b>23</b>
6.1 Vinkulin a Talin.....	23
6.2 Kolagen.....	23
6.3 Alkalická fosfatáza.....	24
6.4 Osteopontin.....	24
6.5 Osteokalcin.....	25
<b>7. Cíle diplomové práce.....</b>	<b>26</b>
<b>Experimentální část.....</b>	<b>27</b>
<b>8. Materiály a metody.....</b>	<b>27</b>
8.1 Materiál s modifikací pomocí nanotub.....	27
8.2 Materiál s modifikací pomocí nástřiku hydroxyapatitem.....	28
8.3 Kultivace buněk na nanotubových vzorcích.....	28
8.4 Kultivace buněk na HA vzorcích.....	28
8.5 Počet a viabilita buněk.....	29
8.6 Imunofluorescenční barvení markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciaci.....	29
8.7 Enzymatická imunosorbentní esej (ELISA) markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciaci.....	30

8.8 Barvení depozitů kalcia u markerů osteogenní diferenciaci pomocí Alizarin Red .....	32
8.9 Statistická analýza.....	32
<b>9. Výsledky .....</b>	<b>33</b>
<b>9.1 Materiál s modifikací pomocí nanotub .....</b>	<b>33</b>
9.1.1 Počet a viabilita buněk .....	33
9.1.2 Imunofluorescenční barvení markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciaci .....	34
9.1.3 Enzymatická imunosorbentní esej (ELISA) markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciaci.....	37
<b>9.2 Materiál s modifikací pomocí nástřiku HA, FA, TCP .....</b>	<b>40</b>
9.2.1 Počet a viabilita buněk .....	40
9.2.2 Imunofluorescenční barvení markerů osteogenní diferenciaci .....	42
<b>10. Diskuze.....</b>	<b>45</b>
10.1 Materiál s modifikací pomocí nanotub .....	45
10.2 Materiál s modifikací pomocí nástřiku HA, FA a TCP .....	48
<b>11. Závěr .....</b>	<b>53</b>
<b>12. Seznam literatury .....</b>	<b>54</b>

## Seznam zkratek

ABTS	diamonná sůl 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonové kyseliny
ALP	alkalická fosfatáza
C3H10T1/2	C3H myší embryonální buňky
DGEA	Asp-Gly-Glu-Ala
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzymatická imunosorbentní esej (enzyme-linked immunosorbent assay)
FA	fluorapatit
HA	hydroxyapatit
KRSR	Lys-Arg-Ser-Arg
MC3T3-E1	myší progenitorové buňky osteoblastů
MG-63	lidská buněčná linie osteoblastů
RGD	Arg-Gly-Asp
Saos-2	lidská buněčná linie osteoblastů
SEM	rastrovací elektronový mikroskop (scanning elektron microscope)
S.E.M	střední chyba průměru (standard error of mean)
TiO <sub>2</sub>	oxid titaničitý
OPC-1	buněčná linie lidských preosteoblastů
OSTEO-1	buněčná linie osteoblastů získaná z lebky neonatálních potkanů
PBS	fosfátový pufr
PGA	polyglykolid
PLA	polylaktid
RBP2	retinol vázající protein 2 demethyláza (retinol binding protein 2)
TCP	trikalciumfosfát
TNALP	tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza



## 1. Úvod

V současné době přibývá pacientů, kteří mají problémy s pohybovým aparátem. Jedním z těchto problémů je opotřebování velkých kloubů např. kolenního a kyčelního. Nahrazením těchto kloubů vhodnou endoprotézou dochází ke snížení bolesti, obnovení pružnosti a pohybu a celkovému z kvalitnějšího života pacienta. Při konstrukci implantátu je třeba splnit specifické požadavky na vlastnosti materiálu. Důraz je kladem především na odolnost vůči korozi, mechanickou pevnost a pružnost a vysokou biokompatibilitu. Titan a titanové slitiny takovéto vlastnosti splňují a proto jsou hojně využívány v biomedicínských aplikacích. V ortopedické a traumatologické chirurgii je dosažení stabilního spojení kost-implantát základem úspěchu či selhání implantátu. Implantát se po určitém čase přímo spojí s kostí, která se začíná tvořit na povrchu materiálu bezprostředně po implantaci. Problém nastává v okamžiku, kdy na rozhraní kost-implantát dochází k tvorbě vaziva a implantát není lidskou tkání přijat. Osteointegrace je složitý a dlouhodobý proces, který je ovlivňován řadou faktorů. Jedním ze způsobů jak osteointegraci urychlit je úprava povrchu implantátu vhodnými modifikacemi. Kostní implantát by měl být navržen tak, aby napodoboval strukturu kosti, která je organizovaná v makro-, mikro- a nanostrukturu. Cílem povrchových modifikací je tak dosáhnout podobné nanostruktury. Mezi široce využívané úpravy patří například mechanické tryskání, chemické leptání povrchu, plazmové nástřiky hydroxyapatitu a elektrochemická metoda známá jako anodická oxidace (Brunette *et al.* 2001; Narayanan *et al.* 2008; Sittig *et al.* 1999). Zavedením těchto úprav dochází ke zlepšení povrchových vlastností materiálu a zejména k vyšší adsorpci specifických proteinů, které zprostředkovávají kontakt mezi buňkou a povrchem implantátu, což je prvním krokem pro adhezi, proliferaci, diferenciaci kostních osteoblastů a následnou osteointegraci implantátu do kosti.

## Literární přehled

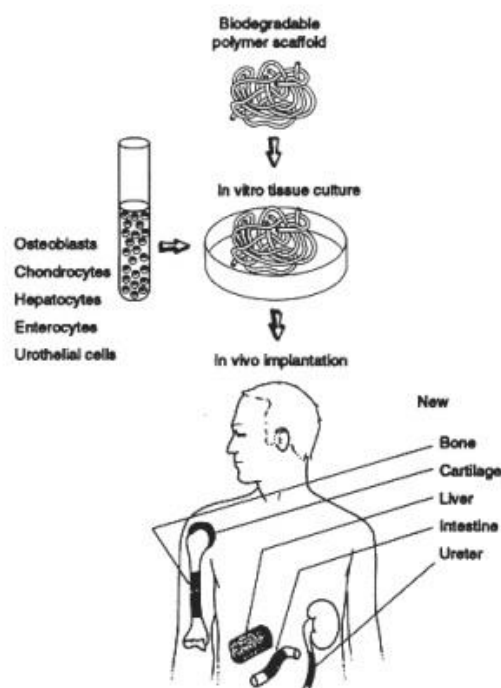
### 2. Historie tkáňového inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární vědní obor s velmi bohatou historií. První historickou zmínkou o tkáňovém inženýrství je většinou označován slavný obraz Fra Angelica, který zobrazuje zázračné uzdravení nohy Kosmou a Damiánem pomocí transplantace.

Mezi první cílené implantáty patřily dentální implantáty. Už staří Egypťané používaly dřevo jako falešný zub před 3000 lety. Na území dnešní Francie byl nalezen osteointegrovaný železný dentální implantát přibližně 2200 let starý (Crubezy *et al.* 1998). Až dvacáté století přineslo první úspěchy v rozvoji bioimplantátů. V období od roku 1960 - 1970 byly vyvinuty tzv. biomateriály první generace neboli bioinertní materiály. Tyto materiály byly navrženy vhodnou kombinací fyzikálních a mechanických vlastností tak, aby odpovídaly mechanickým vlastnostem nahrazované tkáně a aby nedovolovaly adsorpci proteinů a buněčnou adhezi za účelem omezení možné negativní imunitní odpovědi nebo srážení krve na povrchu implantátu (Hench a Polak 2002). Některé známé příklady klinického použití biomateriálů první generace jsou totální endoprotéza, cévní štěpy a srdeční chlopně. Bioinertní materiály však nebyly dokonale neutrální a často docházelo k odmítnutí implantátu imunitním systémem hostitele. Proto se vědci začali specializovat na vývoj biomateriálů druhé generace, tzv. bioaktivních materiálů. Mezi tyto materiály patří např. bioaktivní sklo, hydroxyapatit (HA), sklokeramika (Bačáková *et al.* 2004). U těchto materiálů bylo naopak žádoucí, aby vyvolával specifické buněčné reakce jako např. adhezi buněk k materiálu, proliferaci a diferenciaci buněk. Docházelo tak třeba k diferenciaci kostních buněk, které mohly tvořit novou kostní tkáň a tím integrovat implantát do okolní původní tkáně (Hench a Polak 2002).

Dalším příkladem z této kategorie je biologicky rozložitelný materiál tzv. biodegradabilní, který je po implantaci do lidského těla postupně degradován. Typické biodegradabilní materiály jsou polymery jako je polylaktid (PLA), polyglykolid (PGA) či biokeramika trikalciumpfosfát (TCP) (Bohner 2010).

Navzdory velké klinické úspěšnosti obou generací mají výše uvedené materiály stále jistá omezení v léčbě některých těžce poškozených tkání. Současný nejpokročilejší trend v tkáňovém inženýrství se zaměřuje na tvorbu tzv. trojrozměrného materiálu třetí generace. Při navrhování takového materiálu probíhá především snaha o to, aby jeho architektura přímo podporovala růst a diferenciaci buněk spolu s jeho odstraněním a nahrazením plně regenerovanou tkání pacienta (Obr. 1) (Langer a Vacanti 1993). Tyto resorbovatelné materiály mají na svém povrchu navázané spektrum bioaktivních molekul, jako jsou ligandy pro adhezní buněčné receptory, funkční části přirozených růstových faktorů, hormony a enzymy nebo syntetické regulátory buněčného chování, které se zde vyskytují v definované koncentraci a prostorové distribuci proti bioinertnímu pozadí materiálu, které je odolné vůči nekontrolovatelné adsorpci proteinů a adhezi buněk. Po implantaci takového materiálu do těla pacienta by pak v ideálním případě došlo k postupnému nahrazení chybějící kosti za novou plně regenerovanou tkáň (Bačáková *et al.* 2004).



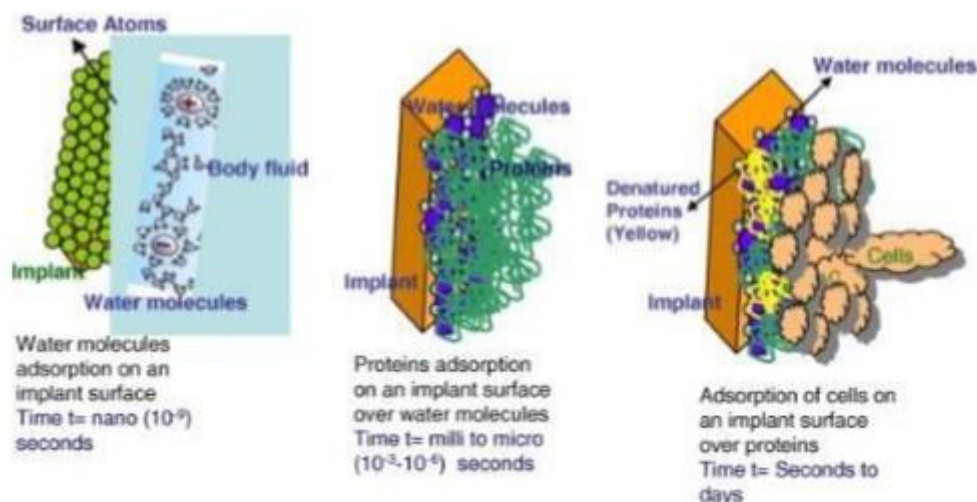
**Obr. 1.** Formování tkáňové struktury podobné přirozenému orgánu po nasazení buněk na vhodný materiál (Langer a Vacanti 1993).

### 3. Kovové materiály v tkáňovém inženýrství

V tkáňovém inženýrství se používají nejrůznější materiály, mezi ty hlavní patří keramika, polymery, kompozity (spojující vlastnosti několika materiálů různých kategorií) a kovy, které se díky své pevnosti využívají hlavně pro konstrukci ortopedických implantátů. Kovy mají v porovnání s polymery a keramikou větší pevnost v tahu, jsou odolné proti zlomení a jejich opotřebenosti není tak výrazné jako u jiných materiálů (Plecko *et al.* 2012). Další výhody kovů jsou jejich mechanické a fyzikální vlastnosti např. elektrická a tepelná vodivost. Ale i kovy mají svá negativa, např. koroze (následkem působení tělních tekutin) a uvolňování iontů, které mohou snížit tvorbu kostní tkáně, což vede k odmítnutí implantátu hostitelským organismem. Díky příliš vysoké denzitě může docházet k vymílání kosti a uvolňování samotné náhrady (Park a Kim 2000). Nejčastěji se pro kostní náhrady využívají nerezová ocel 316L a titan a jeho slitiny.

#### 3.1 Titanové implantáty

Titan a jeho slitiny tvoří velice významnou část materiálů používaných pro konstrukci dentálních a ortopedických implantátů. Pro řadu aplikací nejsou mechanické vlastnosti čistého titanu dostatečné, proto se častěji používá slitina Ti-6Al-4V. Tento materiál byl původně vyvinutý pro letecký a kosmický průmysl, ale od 70. let minulého století se stále frekventovaněji používá i v medicínských aplikacích (Wang 1996). Titan a jeho slitiny se řadí do skupiny materiálů vyznačujících se biokompatibilitou, to znamená, že materiál nevyvolává nepříznivou odezvu na povrchu ani uvnitř tkáně (Callister 2000). Pro tvorbu implantátu z těchto materiálů je důležitá také jejich schopnost integrovat se do kosti bez růstu vaziva na rozhraní kost-implantát. Tento jev je v literatuře označován jako kontaktní osteogeneze nebo osteointegrace (Dohan Ehrenfest 2010). Stav povrchu materiálu je rozhodující pro klinickou úspěšnost vhojení implantátu. Implantáty *in vivo* spouštějí rozsáhlou kaskádu reakcí v biologickém mikroprostředí prostřednictvím interakcí s fyziologickými tekutinami, bílkovinami a dalšími typy buněk. Na Obr. 2 je zobrazena odpověď kostní tkáně na přítomnost cizího implantátu a reakce, které probíhají na povrchu materiálu v různých časových intervalech (Geetha *et al.* 2009).



**Obr. 2.** Odpověď kostní tkáně na přítomnost implantátu v časovém sledu událostí (Geetha *et al.* 2009).

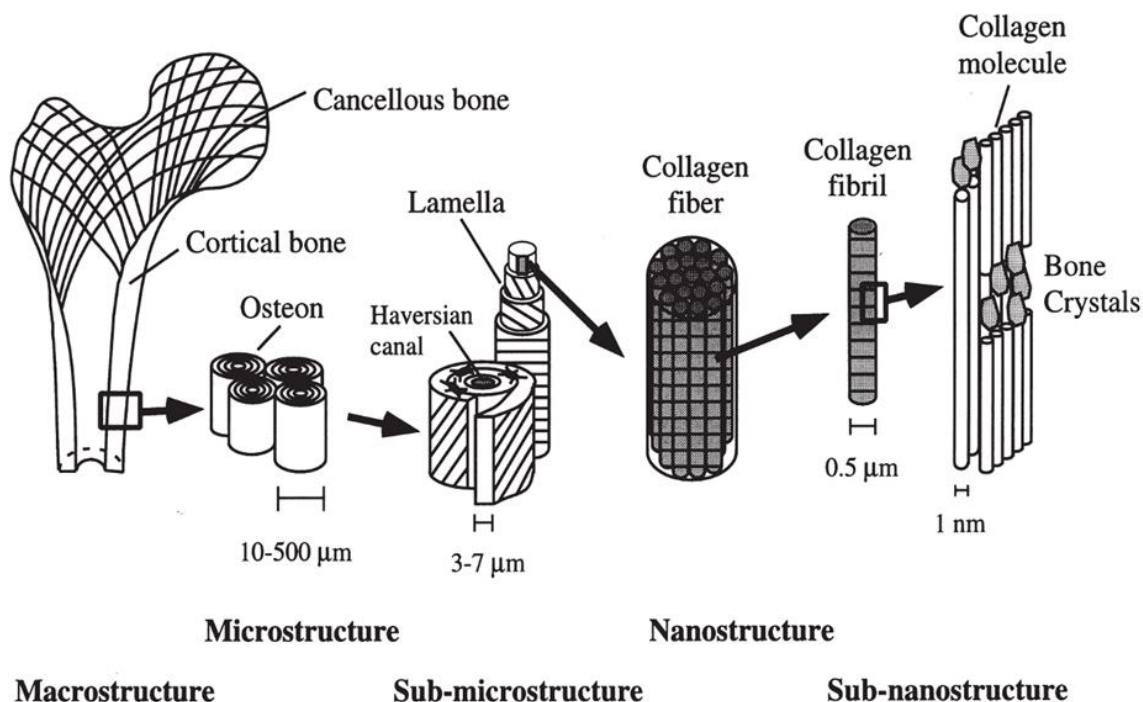
Odpověď na kovový materiál bývá velice specifická a životnost implantátu je limitována řadou nepříznivých efektů. Mohou se objevit infekce, rozsáhlé záněty různého původu či celkově špatné osteointegrace (Aninwene *et al.* 2008; Bjursten *et al.* 2010). Pro zlepšení vlastností titanu a jeho slitin pro klinickou aplikaci se povrch materiálu vhodně upravuje, což vede k bioaktivaci, zvýšené osteointegraci a následně k rychlejší integraci implantátu do kosti. Mezi tyto techniky úpravy povrchu patří např. mechanické metody (pískování, tryskání), chemické metody (leptání povrchu), plazmové nástřiky hydroxyapatitu (HA), pulsní laserová depozice a elektrochemická metoda známá jako anodická oxidace (Brunette *et al.* 2001; Narayanan *et al.* 2008; Sittig *et al.* 1999).

## 4. Biomimetické modifikace povrchu implantátu

### 4.1 Struktura kostní tkáně

Pro pochopení problematiky mechanických vlastností biomateriálů a interakcí mezi nimi a kostí je nutné znát základní pojmy o struktuře kostní tkáně. Kost je vysoce výkonný biologický materiál, který kombinuje měkký materiál (kolagen) a minerály (hydroxyapatit) pro dosažení optimální pevnosti. Funkce kosti není jen mechanická opora těla a ochrana orgánů, slouží také jako zásobárna důležitých minerálů např. vápníku a fosforu. Absorpce a uvolnění těchto minerálů udržuje homeostázu prostředí a zabraňuje nadměrným změnám pH. Kostní tkáň je hierarchicky uspořádaná do několika struktur.

Tyto struktury jsou: makrostruktura (spongiózní a kompaktní kost), mikrostruktura (osteon, Haversův systém), submikrostruktura (lamely), nanostruktura (kolagenní vlákna) a subnanostruktura (molekulární struktura jednotlivých základních prvků tj. anorganická a organická složka kostní ECM) (Rho *et al.* 1998).



**Obr. 3.** Základní uspořádání kostní tkáně (Rho *et al.* 1998).

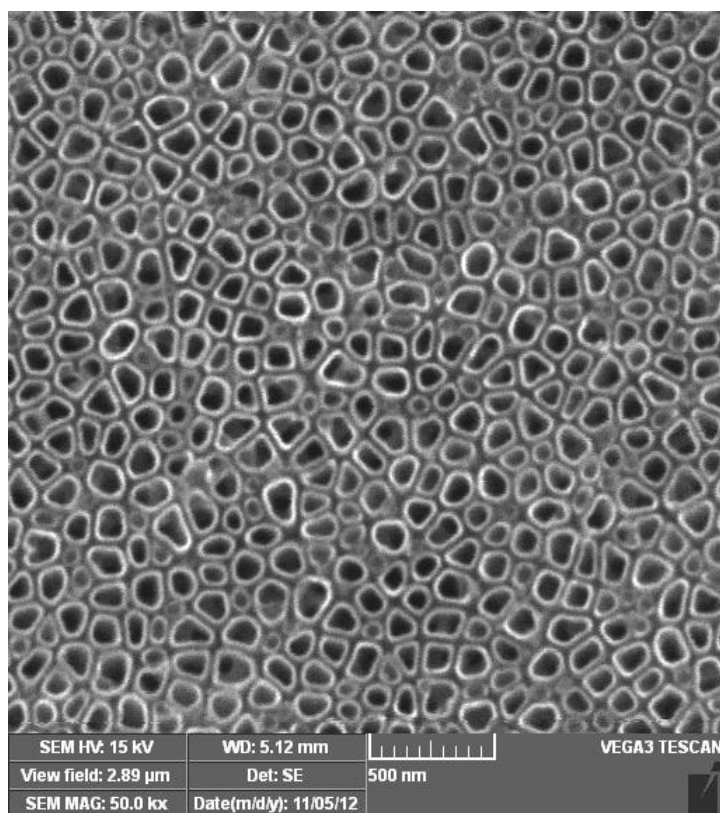
Extracelulární kostní matrix je složena z organické složky, která je syntetizována osteoblasty, a anorganické složky. Organická složka obsahuje 4 hlavní typy makromolekul, jsou to glykosaminoglykany (chondroitin-4-sulfát, dermatansulfát, heparansulfát), proteoglykany (agrekany, biglykan, fibromodulin napojený na kolagenní vlákna), fibrózní proteiny (kolagen) a multiadhezní molekuly (osteokalcin, osteopontin) a glykoproteiny (fibronektin, vitronektin, laminin apod.) (Rey *et al.* 1995; Herndon *et al.* 1999; Nesbitt *et al.* 1993). Anorganickou složku tvoří především krystaly hydroxyapatitu (HA). Krystaly HA v kostní tkáni nemají jehlicový tvar, ale deskovitý (Weiner a Traub 1992). Deskovité krystaly apatitu o délce až 200 nm se vyskytují v samostatných prostorech uvnitř kolagenních vláken, čímž se limituje jejich schopnost dorůstat do jehlicovitého tvaru. Jejich uspořádání je přibližně rovnoběžné s osou kolagenních vláken (Rey *et al.* 1995). Organická složka kosti je tvořena především kolagenem typu I. Jednotlivé molekuly kolagenu na sebe vážou hydroxyapatit, čímž je zajištěna tvrdost

a zároveň odolnost a pevnost kosti. Ukládání krystalů HA kolem kolagenních vláken je také důležité pro správnou mineralizaci nové kostní tkáně. Mineralizaci podporují i nekolagenní proteiny syntetizované osteoblasty např. osteokalcin a osteopontin, které mají vysokou afinitu k HA a mohou regulovat velikost, orientaci a uspořádání HA krystalů (Schneider *et al.* 2001). Právě správná mineralizace nové kostní tkáně je klíčová pro osteointegraci implantátu do kosti. Umělý materiál by měl být biomimetický, tzn., měl by napodobovat přirozenou kostní matrix a neměl by být pro organismus toxický.

## 4.2 Nanotuby

Důležitým faktorem pro správné vhojení implantátu do kosti je drsnost povrchu materiálu a velikost těchto nerovností. Podle velikosti těchto povrchových nerovností lze rozlišit makrostrukturu (nerovnosti o rozměrech 100  $\mu\text{m}$  - několik mm), mikrostrukturu (100 nm - 100  $\mu\text{m}$ ) a nanostrukturu (méně než 100 nm). Právě přítomnost nanostruktury pozitivně působí na buňky lidských osteoblastů a zvyšuje jejich adhezi, proliferaci a diferenciaci (Brammer *et al.* 2012). Toto zjištění není tak překvapivé, vzhledem k tomu že přirozené prostředí (kostní ECM) těchto buněk je organizované v nanometrech. Proto se nově vyvinuté biomateriály snaží napodobit tento pozitivní efekt na buňky tím, že se jejich povrch modifikuje také pomocí nějaké nanostruktury (Webster *et al.* 2000). V tkáňovém inženýrství se používají nanovlákna či různé nanotubulární struktury. Zejména nanotuby jsou v současné době často studovaným materiálem. Existuje více způsobů přípravy nanotub, nejběžnějším způsobem je anodická oxidace ve vhodném prostředí s obsahem látek specificky reagujících s pasivní vrstvou  $\text{TiO}_2$ . Nanotuby za těchto podmínek kolmo vrůstají do základního materiálu. První nanotuby byly připraveny v roce 1991 (Zwilling *et al.* 1999). Tsuchiya *et al.* (2006) zjistili, že existence nanotubulární struktury na titanu vede ke stimulaci růstu hydroxyapatitu, který je nezbytný pro úspěšnou osteointegraci implantátu. Osteointegrace materiálu je důležitá pro posouzení vhodnosti materiálu v klinické praxi. Podstatou osteointegrace biomateriálu je vrůstání implantátu do kosti bez jakékoliv další mezivrstvy. Jedná se tedy o přímý kontakt živé kosti s cizím materiálem (Bränemark 1983). Tento kontakt vzniká právě díky povrchu implantátu či jeho povrchové úpravě (Franchi *et al.* 2005). Pro proces vhojování implantátu je velice důležitá správná adheze buněk k materiálu. Na adhezi závisí životaschopnost, proliferace, migrace a diferenciaci buněk (Anselme 2000).

Několik studií ukázalo, že osteoblasty preferenčně adherují na nanotubulární strukturu než na hladký materiál. Například Das *et al.* (2009) modifikovali titanový materiál pomocí TiO<sub>2</sub> nanotub a porovnávali růst lidských preosteoblastů (OPC1) na nanotubách a na leptaném povrchu. Preosteoblasty více adherovaly na materiál s nanotubami. Buňky na nanotubách byly lépe rozprostřené a svými filopodii zasahovaly přímo do nanotub. Filopodia buněk zde působí jako tzv. senzorické zařízení a jejich rozprostření ukazuje interakci buněk s povrchem materiálu a následnou adhezi (Faix a Rottner 2006). Nanotuby zvětšují kontaktní plochu implantátu a umožňují tak buňkám tvořit propletenou síť (Das *et al.* 2009).



**Obr. 4.** Příklad nanotubulární struktury. SEM fotografie povrchové topografie TiO<sub>2</sub> nanotub (SEM Vega 3, pořízeno v Ústavu kovových materiálů a korozního inženýrství, Fakulta chemické technologie, VŠCHT v Praze).



### 4.3 Hydroxyapatit

Hydroxyapatit (chemicky fosforečnan-hydroxid vápenatý  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) tvoří hlavní anorganickou složku kostní tkáně (50-70 %) (Hench 1991). HA krystaly jsou odpovědné za pevnost kosti v tlaku, zatímco kolagenová vlákna zajišťují vynikající elastické vlastnosti. Nicméně výjimečná pevnost a odolnost kosti pochází nejen z kombinace materiálových vlastností jednotlivých anorganických a organických složek, ale i hierarchického trojrozměrného uspořádání (Fratzl a Weinkamer 2007). Povrch HA je krystalický a tudíž zřídka hladký. Jeho drsnost zlepšuje vazbu proteinů v procesu biomineralizace kosti (Kirkham *et al.* 2002) a také zlepšuje biokompatibilitu materiálu. Hydroxyapatit je v tkáňovém inženýrství považován za bioaktivní materiál, jenž příznivě ovlivňuje adhezi, růst a osteogenní diferenciaci osteoblastů. Bioaktivita je schopnost materiálu interagovat s živým organismem. Bioaktivní povrch implantátu urychluje tvorbu rozhraní implantát-kost a tím poskytuje implantátu zvyšující se sekundární stabilitu, která je důležitá především v rané fázi hojení (Hench a Polak 2002). Navzdory svým vynikajícím biologickým vlastnostem je HA velmi křehký a lámavý materiál, což omezuje jeho přímé využití pro ortopedické aplikace (Nakahira a Eguchi 2001). Proto se hydroxyapatit v tkáňovém inženýrství používá pro tvorbu tzv. kompozitních materiálů, což jsou materiály, které obsahují kovy, keramiku, polymery a další materiály a kombinují jejich vlastnosti. Obsah jednotlivých složek může být upraven tak, aby napodoboval přirozenou strukturu kosti. Základní princip vysoké biokompatibility HA spočívá v jeho schopnosti adsorbovat buněčné adhezni proteiny (zejména fibronektin a vitronektin) ze séra, což umožňuje adhezi osteoblastů prostřednictvím integrinových receptorů (Kilpadi *et al.* 2001). V posledních letech se velice často využívají kompozity HA-titan. HA se ve formě prášku nanáší na Ti nebo jeho slitiny pomocí plazmových nástřiků. Důležité kritérium pro tvorbu kompozitu HA-Ti je optimální koncentrace, velikost, orientace a růst HA krystalů (Müller *et al.* 2007). Vzhledem k takové variabilitě ve vlastnostech HA vznikají ve studiích různé rozpory, nicméně je prokázáno, že jehlovité HA částice působí na buňky ve srovnání s kulovitými částicemi nepříznivě (Laquerriere *et al.* 2005). HA se používá ve formě částic sférického tvaru o rozměrech 0,5 – 2  $\mu\text{m}$ . V lidské kostní tkáni jsou HA krystaly vmezeřeny mezi kolagenová vlákna a jejich rozměry jsou 50 nm  $\times$  25 nm  $\times$  2-5 nm na délku, šířku a tloušťku (Vallet-Regi a Gonzalez-Calbet 2004). Tyto krystaly slouží jako místní zdroj vápníku pro okolní buňky a zároveň interagují

s kolagenovými vlákny a zajišťují tak relativně vysoké mechanické vlastnosti kostí. Částice v řádech mikrometrů a menší se ukázaly dokonce jako nepříznivé. Tyto HA částice vyvolávaly u kostních buněk zvýšenou zánětlivou odpověď (Laquerriere *et al.* 2005) a snižují proliferaci buněk na materiálu (Bačáková *et al.* 2001a).

Dalším faktorem, který ovlivňuje HA biomateriály, je krystalinita. Stupeň krystalinity je vyjadřován jako relativní podíl uspořádaných krystalických oblastí uložených mezi amorfními (Kumar a Münstedt 2005). HA se v tělních tekutinách rozpouští, když je jeho krystalinita nízká (Nakayama *et al.* 2004). S vyšší krystalinitou by se v podstatě mohla zvýšit stabilita a činnost buněk (Maxian *et al.* 1993). Overgaard *et al.* (1999) porovnávali fixaci implantátů do kosti s HA povlakem o krystalinitě 50 % a 75 % *in vivo* po 16 a 32 týdnech. Méně krystalický (50%) HA povlak vykazoval rychlejší počáteční mechanickou fixaci a vrůstání do kosti než implantát s vyšší krystalinitou. Nicméně po 32 týdnech nebyly pozorovány žádné rozdíly. Pouze v období mezi 16. a 32. týdnem byla vidět ztráta HA potahu u implantátu s 50 % HA. Povlak byl resorbován a částečně nahrazen novou kostí, což naznačuje pevnou fixaci a trvanlivost implantátu (Overgaard *et al.* 1999). Také Seydlová *et al.* (2008) ve své studii dokazují, že buňky fibroblastů vykazují lepší proliferaci na krystalickém HA v porovnání s amorfním materiálem. Oh *et al.* (2005) ve studii na potkanech prokázali větší přímou vazbu na implantát a rozsáhlejší obsah kosti u implantátů povlečených hydroxyapatitem s krystalinitou přibližně 70 % (Oh *et al.* 2005).

Potahování povrchu implantátu se provádí několika technikami, např. depozicí pomocí elektroforézy, iontovým či plazmovým naprašováním, což je nejvíce komerčně používaný způsob (Harada *et al.* 1996). Reakce buněk na materiál je velice komplexní děj zahrnující mnoho procesů. Modifikovaný povrch implantátu podněcuje okolní kmenové buňky k sekreci složek extracelulární matrix, buňky se poté začnou diferencovat v osteoblasty. Kalcifikace matrix pak proběhne mezi 6 a 14 dny a kost se začíná remodelovat za 21 dní (Schwartz a Boyan 1994).

#### 4.4 Trikalciumfosfát

Trikalciumfosfát (TCP) je stejně jako hydroxyapatit anorganická látka stechiometricky podobná amorfnímu biologickému prekursoru kosti. Žádný z uměle připravených TCP neexistuje v přírodě, ale i uměle připravené formy TCP vykazují srovnatelné biologické chování jako kostní apatit (Vaccaro 2002). Existují 2 hlavní modifikace syntetického krystalického TCP: nízkoteplotní  $\beta$  forma TCP, která se v tkáňovém inženýrství využívá nejčastěji, a vysokoteplotní  $\alpha$  modifikace TCP lišící se především chemickou a termodynamickou stabilitou (Liang *et al.* 2010). V tkáňovém inženýrství bývá tento biomateriál často upřednostňován před synteticky připravenými krystaly HA. Syntetický HA se rozpouští v těle velmi pomalu, zatímco hlavní předností TCP je právě resorbovatelnost. V organismu se postupně rozpouští a následnou precipitací se přeměňuje na kostní apatit, tzn. je nahrazen novou kostí (Jensen *et al.* 2007). Na druhou stranu vyšší rozpustnost TCP může být také spojena s vyšší mírou uvolňování a vyšší lokální koncentrací vápenatých a fosfátových iontů, což může toxicky působit na okolní buňky (John *et al.* 2003; Detsch *et al.* 2008). Právě toxický účinek TCP způsobený rozpouštěním a uvolňováním vysoké koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  do média zaznamenali i Detsch *et al.* (2008). V jejich studii docházelo k inhibici migrace osteoklastů na materiálu TCP v porovnání s HA povrchem. Z tohoto důvodu se TCP většinou používá pro tvorbu kompozitů s jinými méně resorbovatelnými materiály např. s HA, polykaprolaktonem, polyethylenem či čistým titanem (Yeo *et al.* 2011; Gallinetti *et al.* 2014; Piccirillo *et al.* 2015). TCP v kompozitech stimuluje kostní buňky ke tvorbě nové tkáně, tím pomáhá zlepšit osteointegraci vlastního implantátu. Například Yeo *et al.* (2011) ve své studii zkoumali chování buněk na hierarchicky uspořádaném PCL/ $\beta$ -TCP kompozitu s vloženými vlákny kolagenu. Kompozit vykazoval vynikající mechanické vlastnosti a iniciační adheze buněk osteoblastů MG-63 byla vysoká. Po sedmi dnech kultivace buňky vykazovaly téměř dvojnásobnou proliferaci v porovnání s kontrolou. Kolagenová nanovlákna s  $\beta$ -TCP poskytují dobré synergické účinky na buněčnou aktivitu (Yeo *et al.* 2011). Podobné výsledky byly pozorovány také u osteoblastů Saos-2 rostoucích na kompozitu HA/ $\beta$ -TCP, kdy po sedmidenní kultivaci byla zaznamenána vyšší hustota buněk na studovaném kompozitu v porovnání s komerčním kontrolním vzorkem (Piccirillo *et al.* 2015). Při tvorbě kompozitu je důležitý správný poměr obou složek. S vyšším poměrem  $\beta$ -TCP může stoupat cytotoxicita materiálu, v důsledku rychlejšího rozpouštění krystalů než u HA (Shuai *et al.* 2013).

Ačkoliv bifázické kompozity ze směsi HA a TCP poskytují optimální rychlost rozpouštění iontů, což stimuluje buňky k produkci kostní hmoty a urychluje následnou regeneraci poškozené tkáně, nelze je použít pro nosné aplikace, vzhledem k jejich špatným mechanickým vlastnostem (Viswanath a Ravishankar 2007; Ramay a Zhang 2004). Z tohoto důvodu se ve tkáňovém inženýrství kostí TCP používá jako povrchová modifikace nějakého kovu, např. titanu a jeho slitin (Suchanek a Yoshimura 1998). Vrstva biokeramického materiálu zabraňuje přímé reakci kovu s tělními tekutinami. Povlékají se například dentální implantáty. Tyto povlaky vykazují lepší biokompatibilní vlastnosti a rychlejší hojení než kovové implantáty (Zomorodian *et al.* 2015).

## 5. Adheze buněk na umělý materiál

Po implantaci materiálu do lidské tkáně dochází ke kontaktu implantátu s biologickým mikroprostředím. Bezprostředně po implantaci dochází k adsorpci proteinů (např. vitronektin, fibronektin) na povrch materiálu, takže k přímému kontaktu mezi materiálem a buňkami prakticky nedochází. Tato vrstva naadsorbovaných proteinů zprostředkovává adhezi buněk na umělý materiál a přenos signálu do buněk přes buněčné receptory (Thomas *et al.* 1997).

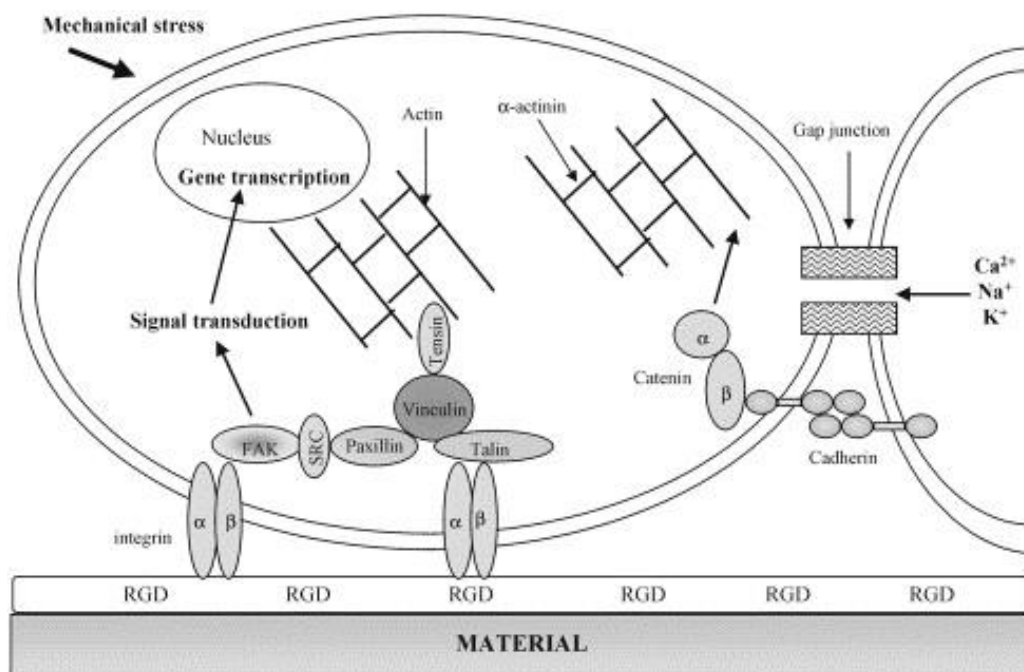
### 5.1 Přímá vazba bez účasti receptorových molekul

Přímá vazba buněk k materiálu bez účasti ECM (např. v médiu bez séra) a specifických receptorových molekul je zprostředkována zejména slabými chemickými vazbami, jako jsou vodíkové můstky, elektrostatické vazby, Van der Waalsovy síly mezi molekulami na buněčné membráně a funkčními chemickými skupinami na povrchu materiálu. Tento typ vazby nemůže zabezpečit přenos adekvátního signálu z extracelulárního prostředí do buněk. Jestliže dojde k tomu, že buňky nejsou schopné syntetizovat a ukládat své vlastní molekuly ECM v relativně krátkém časovém období (obvykle do 24 až 48 hodin) anebo nemají některé z těchto molekul připojené k buněčné membráně ve správné konformaci, podléhají apoptóze (Bačáková *et al.* 2004; Garcia *et al.* 1999; Huang *et al.* 1998).

### 5.2 Receptorem zprostředkovaná vazba přes molekuly extracelulární matrix

Mezi molekuly ECM, které zprostředkovávají vazbu mezi buňkou a materiálem patří např. fibronektin, vitronektin, kolagen nebo laminin (Garcia *et al.* 1999). Tyto molekuly jsou na povrch umělého materiálu adsorbovány z kultivačního séra *in vitro* nebo z lidských tekutin *in vivo* a k povrchu materiálu jsou poutány slabými chemickými vazbami. Buňky pak pomocí svých adhezních integrinových receptorů vážou specifická místa těchto proteinů ECM, jaké jsou např. aminokyselinové sekvence. Nejčastěji vázanými aminokyselinovými sekvencemi jsou Arg-Gly-Asp (RGD), ale existují i další sekvence. Tyto aminokyselinové sekvence se obecně rozlišují podle toho, zda jsou typické pro nějaký protein, např. RGD sekvence se vyskytuje ve fibronektinu a vitronektinu, pro kolagen je naopak typická DGEA sekvence, tj. Asp-Gly-Glu-Ala anebo zdali preferují vazbu k nějakému určitému buněčnému typu (např. sekvence KRSSR (Lys-Arg-Ser-Arg) je specifická pro kostní osteoblasty). Receptory se na sekvence opět

váhou pomocí slabých sil, stejně jako proteiny ECM na povrch materiálu (Bačáková a Švorčík 2008; Bačáková *et al.* 2004).



**Obr. 5.** Zastoupení buněčných proteinů podílejících se na adhezi buněk k umělému materiálu (Anselme 2000).

Adheze a rozptřeni buněk na povrchu materiálu patřĩ mezi první fáze v procesu interakce mezi buňkou a umělým materiálem. Kvalita této první fáze ovlivňuje další chování buněk, především jejich proliferaci a diferenciaci a tkáňovou odpověď (Anselme 2000). Studium adheze buněk k materiálu je předmětem zájmu mnoha vědců již několik let. Schopnost buněk žít a růst v přítomnosti cizího materiálu je důležitým měřítkem funkční schopnosti buněk (Dubious *et al.* 1999). Právě snížená schopnost adheze buněk či jejich změněná morfologie značí možnou cytotoxicitu materiálu (Lavos-Valereto *et al.* 2001). Vývoj jednotlivých buněk závisí na interakci buňka-materiál, na který buňka adheruje. Nicméně buňky, které vykazují kvalitní adhezi k jednomu povrchu, nemusí adherovat k povrchu jiného materiálu (Ireland *et al.* 1987).

## 6. Markery buněčné adheze a diference

### 6.1 Vinkulin a Talin

Vinkulin a talin jsou proteiny asociované s integrinovými receptory. Tyto proteiny patří do skupiny aktin-vázajících proteinů lokalizovaných v cytoskeletu eukaryot (Mierke 2009). Na rozdíl od talinu může vinkulin asociovat i s jinými membránovými receptory např. kadheriny. Funkcí těchto proteinů je zajišťovat buněčné migrace a adheze. Vinkulin je také důležitou složkou fokálních adhezních plaků. Fokální adheze jsou hlavním zdrojem adhezivních sil a důležitým přenašečem biochemických signálů z vnějšího prostředí pro mezenchymálně se pohybující buňku. Přenáší signály mezi cytoskeletem a adhezivními receptory (Bačáková *et al.* 2004). Vinkulin se uplatňuje také při regulaci apoptózy. Jeho přítomnost v buňce je klíčová pro adhezi buňka-materiál a buňka-buňka (Janssen *et al.* 2006; Zamir a Geiger 2001). Talin tvoří mechanické spojení integrinů s aktinovými vlákny a výrazně reguluje přenos síly mezi cytoskeletem a fokálními adhezemi (Hu *et al.* 2007).

### 6.2 Kolagen

Kolagen je nejhojnějším glykoproteinem v těle a doposud bylo rozpoznáno asi 28 typů této molekuly, z nichž každý se nachází v jiné části těla (Soderhall *et al.* 2007). V kostech se nachází kolagen I typu, který je všeobecně v lidských tkáních nejrozšířenější. Tento typ kolagenu tvoří přes 90 % všech bílkovin organické kostní matrix, je také přítomen v kůži, dentinu, rohovce, cévní stěně, fibrózní chrupavce a šlachách. Molekula kolagenu se skládá ze třech polypeptidových řetězců poskládaných do heterodimerické struktury (Soderhall *et al.* 2007). Jednotlivá vlákna jsou uspořádána do pravotočivé struktury o šířce 50-200 nm a délce 300 nm, která je stabilizovaná přítomností glycinu, prolinu, hydroxyprolinu a zároveň také prostřednictvím vodíkových můstků a elektrostatických interakcí (Persikov *et al.* 2005). Uvnitř osteoblastů se nejprve syntetizuje prokolagen, který je z buňky vyloučen a v extracelulárním prostoru dochází ke spojení prokolagenních fibril za vzniku trojitě spirály kolagenového vlákna (Myllyharju a Kivirikko 2004). Kolagenová vlákna se nacházejí v extracelulární matrix (ECM), kde se podílejí na vzájemných interakcích mezi buňkami a ECM prostřednictvím integrinových receptorů. Kolagenová vlákna hrají důležitou roli v regulaci buněčného růstu, diference a migraci buněk pomocí jejich vazby na tyto receptory (Heino 2007).

Kolagen I se poměrně často používá při modifikaci povrchu umělých materiálů (např. polyethylenu). Jeho přítomnost totiž zvyšuje biokompatibilitu medicínských implantátů s měkkými tkáněmi (Kinoshita *et al.* 1993).

### **6.3 Alkalická fosfatáza**

Alkalická fosfatáza (ALP) se v buňce vyskytuje jak membránově vázaná tak volně. U člověka je ALP kódována čtyřmi geny. Tři z nich produkují tkáňově specifické izoenzymy ALP: placentální, onkogenní a střevní. Čtvrtý ALP gen kóduje skupinu tkáňově nespecifických proteinů (TNALP), které se odlišují svými postranními sacharidovými řetězci. Tyto sekundární izoenzymy jsou rozšířeny v celém těle, nejvíce však v játrech, kostech a ledvinách (Whyte *et al.* 1996). Pro tvorbu a mineralizaci kostní tkáně je nejdůležitější kostní alkalická fosfatáza (Whyte 1994). Změna aktivity ALP tak potom může sloužit jako znak růstu a vývoje, ale zároveň také poruch organismu.

### **6.4 Osteopontin**

Osteopontin je integrin vázající fosfoprotein extracelulární matrix. Jeho exprese není typická pouze pro kostní osteoblasty, ale produkují ho i jiné buňkové typy např. fibroblasty či buňky hladkých svalů. Osteopontin se uplatňuje zejména při remodelaci kosti. Dle studií se podílí na kostní resorpci zprostředkováním vazby osteoklasty-kostní ECM (Reinholt *et al.* 1990). Osteopontin je také exprimován v řadě imunitních buněk a může působit jako modulátor imunitní odpovědi (Rangaswami *et al.* 2006). Jeho sekrece bývá zvýšena při různých patologických stavech, jako jsou kardiovaskulární či nádorová onemocnění (Scatena *et al.* 2007). Proto jeho nízká koncentrace v přítomnosti kovových materiálů nemusí být vždy chápána negativně.



## 6.5 Osteokalcin

Osteokalcin je protein extracelulární matrix (ECM) syntetizován především buňkami osteoblastů. V kostní tkáni vážně kalcium a tím aktivně působí na vývoj, zrání a udržení kvality ECM v kostech. Jeho tvorba v buňkách je závislá na přítomnosti vitamínu K. Osteokalcin se v těle chová také jako hormon. Stimuluje růst beta-buněk slinivky břišní, čímž se zvyšuje sekrece inzulínu a zároveň zvyšuje citlivost na něj. Osteokalcin tak reguluje množství glukózy v krvi a zesiluje proces spalování tuků (Lee *et al.* 2007). Protože je osteokalcin primárně exprimován osteoblasty, patří tedy mezi pozdní markery osteogenní diferenciace (Liggett *et al.* 1994). V některých studiích se osteokalcin používá jako biomarker účinnosti zkoumaných léků na léčbu osteoporózy (Pietschmann 1991).

## **7. Cíle diplomové práce**

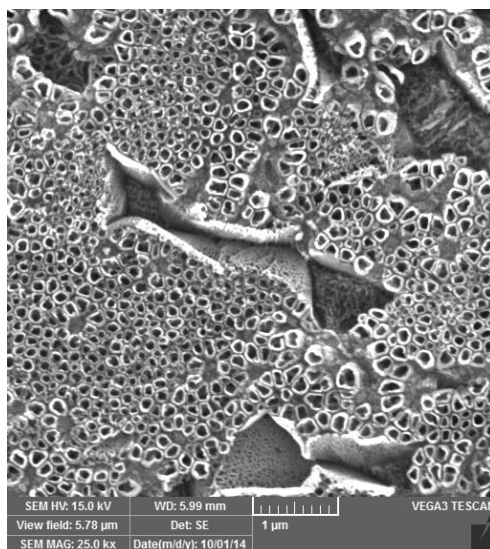
1. Prvním cílem mé diplomové práce je hodnotit vliv nanotubulární povrchové modifikace kovových materiálů vyrobených ze slitiny Ti-6Al-4V na adhezi, tvorbu fokálních adhezních plaků, viabilitu a proliferaci kostních buněk Saos-2.
2. Druhým cílem je kvantifikovat osteogenní diferenciaci Saos-2 buněk na nanotubách připravených z Ti-6Al-4V.
3. Třetím cílem je hodnocení vlivu Ti-6Al-4V modifikované hydroxyapatitem, fluorapatitem a trikalciumfosfátem na adhezi, viabilitu, proliferaci a diferenciaci kostních buněk Saos-2.

## Experimentální část

### 8. Materiály a metody

#### 8.1 Materiál s modifikací pomocí nanotub

V této diplomové práci byly pro jednotlivé experimenty použity vzorky ze slitiny Ti-6Al-4V ve tvaru disku o průměru 16 mm a tloušťce 3 mm. Před nanostrukturováním byly vzorky broušeny a odmaštěny v ultrazvukové lázni ve směsi ethanolu a isopropanolu. Nanostrukturování povrchu vzorků bylo provedeno tzv. anodickou oxidací pomocí potenciostatu za přítomnosti elektrolytů obsahujících fluoridové ionty. Potenciálový režim při nanostrukturování se skládal z lineárního růstu potenciálu rychlostí 100 mV/s a jeho následné výdrže na konečné hodnotě (10V, 20V, 30V) po dobu 2000s. Aplikace elektrického pole vedla k růstu oxidické vrstvy a tvorbě nanotub. Tloušťka vrstvy se pohybovala od 200 nm pro 10V, až po cca 700 nm pro 30V a průměr nanotub byl  $18 \pm 4$  nm pro 10V,  $43 \pm 10$  nm pro 20V a  $79 \pm 32$  nm pro vzorek 30V. Tyto vzorky s označením 10V, 20V, 30V byly vyrobeny v laboratoři Doc. Luďka Josky v Ústavu kovových materiálů a korozního inženýrství, Fakulta chemické technologie, VŠCHT v Praze. Dále byl použit hladký vzorek bez nanotub ze slitiny Ti-6Al-4V s označením Ti\_C, který sloužil jako materiálová kontrola.



**Obr. 6.** Ukázka povrchu vzorku nanostrukturovaného při 30V (Skenovací elektronový mikroskop Vega3, Tescan).

## **8.2 Materiál s modifikací pomocí nástřiku hydroxyapatitem**

Jednotlivé vzorky byly připraveny firmou Beznoska s.r.o. Ploché vzorky s označením HA byly vyrobené ze slitiny Ti-6Al-4V pokryté plasmou nanášenou vrstvou hydroxyapatitu. Krystalinita vzorku byla 36,9 %. Vzorky s označením FA byly taktéž vyrobeny ze slitiny Ti-6Al-4V, ale jejich povrch byl pokryt plasmou nanášenou vrstvou fluorapatitu a krystalinita byla 59,5 %. Vzorky s označením TCP byly vyrobeny ze stejné slitiny Ti-6Al-4V a jejich povrch byl pokryt plasmou nanášenou vrstvou trikalciumpfosfátu (TCP) + hydroxyapatitu (HA) v poměru 1:1. Krystalinita vzorku TCP+HA byla 50,2 %. Všechny ploché vzorky byly před nanášením vrstvy upraveny tryskáním korundem (průměr vzorků byl 28 a 14 mm a tloušťka 2 mm).

## **8.3 Kultivace buněk na nanotubových vzorcích**

Vzorky 10V, 20V, 30V, Ti\_C a kontrolní krycí sklo (Marienfeld Superior, Německo) byly sterilizovány v 70 % etanolu po dobu 1 hodiny, dvakrát propláchnuty ve fosfátovém pufru PBS a umístěny do 12-ti jamkové destičky (TPP, Švýcarsko). Lidské osteoblasty Saos-2 (ATCC-HTB-85, Chemos) byly v jednotlivých experimentech nasazeny do misek s materiálem v hustotě 15300 buněk/cm<sup>2</sup> v 1,5ml kultivačního média McCoy 5A (Sigma-Aldrich, USA) obohaceného o 15 % fetální hovězího sérum (GIBCO, Life Technologies), hydrogenuhličitan sodný (S 8761, Sigma-Aldrich, USA) a 40μg/ml getamicínu (Getamicin Lek, Ljubljana, Slovinsko). Buňky se vzorky byly kultivovány v termostatu s relativní vlhkostí atmosféry přibližně 95 % s 5 % CO<sub>2</sub> při teplotě 37°C po dobu 7 dní.

## **8.4 Kultivace buněk na HA vzorcích**

Všechny vzorky HA, FA, TCP o průměru 14 mm a kontrolní krycí sklo (Marienfeld Superior, Německo) byly sterilizovány v 70 % etanolu po dobu 1 hodiny, dvakrát propláchnuty ve fosfátovém pufru PBS a umístěny do 24-ti jamkových destiček (TPP, Švýcarsko). Vzory HA, FA, TCP o průměru 28 mm a kontrolní krycí sklo byly taktéž sterilizovány v 70 % etanolu po dobu 1 hodiny, dvakrát propláchnuty ve fosfátovém pufru PBS a umístěny do 12 jamkových destiček (TPP, Švýcarsko). Lidské osteoblasty Saos-2 (ATCC-HTB-85, Chemos) byly v jednotlivých experimentech nasazeny do misek s materiálem HA, FA a TCP o průměru 14 mm v hustotě 17000 buněk/cm<sup>2</sup> a s materiálem HA, FA a TCP o průměru 28 mm v hustotě 55000 buněk/cm<sup>2</sup>

v 1,5ml kultivačního média McCoy 5A (Sigma-Aldrich, USA) obohaceného o 15 % fetální hovězí sérum (GIBCO, Life Technologies), hydrogenuhličitan sodný (S 8761, Sigma-Aldrich, USA) a 40µg/ml getamicínu (Getamicin Lek, Ljubljana, Slovinsko). Buňky se vzorky byly kultivovány v termostatu s relativní vlhkostí atmosféry přibližně 95 % s 5 % CO<sub>2</sub> při teplotě 37°C po dobu 7 dní.

### **8.5 Počet a viabilita buněk**

Počet a viabilita buněk byly hodnoceny 1., 3. a 7. den po nasazení. První a třetí den byly buňky Saos-2 opláchnuty v PBS a následně barveny pomocí LIVE/DEAD® viability/cytotoxicity kitu (L-3224, Molecular Probes, Life Technologies) po dobu 10 minut. Základem tohoto kitu jsou dvě fluorescenční barviva calcein AM a ethidium homodimer-1. Calcein AM je barvivo, které prochází buněčnou membránou, a pouze v živých buňkách vlivem aktivních intracelulárních esteráz dochází k jeho rozštěpení na zeleně fluoreskující calcein. Naopak ethidium homodimer prochází pouze poškozenou membránou mrtvých buněk a v jádře se váže na DNA. Mrtvé buňky prostřednictvím ethidium homodimeru emitují červenou fluorescenci. Jednotlivé počty obarvených buněk byly analyzovány mikrofotografií pořízených na inverzním fluorescenčním mikroskopu značky Olympus IX71 s digitální kamerou DP 71 (Japonsko). Počet živých a mrtvých adherovaných buněk byl počítán z 10-20-ti mikrofotografií. Životaschopnost je vyjádřena jako procento živých buněk. Sedmý den byly vzorky promyty v PBS, 10 minut inkubovány v 1ml roztoku trypsinu EDTA (Sigma-Aldrich, USA) a počet buněk byl počítán analyzátozem Vi-CELL XR (Beckman Coulter, USA, 6 měření pro každou experimentální skupinu). Pro hodnocení počtu buněk byla posuzována i dynamika růstu buněk v jednotlivých dnech pomocí růstové křivky.

### **8.6 Imunofluorescenční barvení markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciaci**

Vybrané markery buněčné adheze osteogenní diferenciaci, konkrétně talin, vinkulin, kolagen I, osteopontin, alkalická fosfatáza a osteokalcin byly vizualizovány imunofluorescenčním barvením pro vyhodnocení jejich distribuce a prostorového uspořádání na studovaném materiálu. Pro imunofluorescenční barvení talinu a vinkulinu byly buňky linie Saos-2 na vzorcích 10 minut fixovány 2 % paraformaldehydem (pH 7,4) ve třetím dnu po nasazení, ostatní proteiny až v sedmém dnu po nasazení. Po fixaci byly vzorky třikrát promyty v PBS (5 minut) a následně hodinu inkubovány v 1 % albuminu

(BSA, Německo) v PBS obsahujícím 0,1 % Triton X-100. Albumin zablokoval nespecifická vazebná místa pro protilátky a Triton X-100 permeabilizoval membránu buněk. Po hodině byly vzorky 20 minut inkubovány v 1 % Tweenu 20 a následně opláchnuty v PBS. Poté byly ke vzorkům přidány primární protilátky proti lidským antigenům, konkrétně myši monoklonální anti-talin (klon 8D4, Sigma-Aldrich, USA.; kat. č. T3287, ředěno 1:200 v PBS), monoklonální anti-vinkulin, myši ascitická tekutina, (klon hVIN-1, Sigma-Aldrich, kat. č. V 9131, ředěno 1:100), králičí anti-kolagen I (Cosmo Bio Co., LTD., kat. č. LSL-LB-1197, ředěno 1:200), polyklonální králičí anti-osteopontin, (lidský) pAb (Enzo Life Sciences, Inc. USA; kat. č. LSL-LB-1197, ředěno 1: 200), monoklonální anti-humánní placentární alkalická fosfatáza (klon 8B6, Sigma-Aldrich, USA, ředěno 1: 200) a polyklonální králičí anti-osteokalcin (1-49) (lidský) IgG (Peninsula Laboratories Inc. CA, USA, kat. č. T-4743, ředěno 1:200. Primární protilátky byly použity přes noc při teplotě 4°C. Druhý den byly vzorky opláchnuty v PBS a inkubovány se sekundární protilátkou 80 minut při pokojové teplotě. Jako sekundární protilátka proti myšimu antigenu byl použit kozí IgG anti-mouse (H+L) konjugovaný s Alexa Fluor®488 (Molecular Probes, kat. č. A11017, ředěno 1:400) a proti polyklonální primární králičí protilátce byl použitý IgG anti-rabbit (H+L) konjugovaný s Alexa Fluor®488 (Molecular Probes, kat. č. A11070, ředěno 1:400). Po inkubaci byly vzorky opláchnuté roztokem 0,05 % Tweenu 20 v PBS. Buněčná jádra byla fluorescenčně obarvena barvivem bisBenzimide H 33258 (10µl/ml, Sigma-Aldrich, USA, kat. č. B1155) po dobu 20 minut. Buňky byly hodnoceny fluorescenčním mikroskopem značky Olympus IX51 s digitální kamerou DP70 (Japonsko) a konfokálním mikroskopem značky Leica (TCS SP2, Německo). Pro měření intenzity fluorescence bylo vyhotoveno 10-20 mikrofotografií každého vzorku ve stejném expozičním čase po 3 dnech od nasazení buněk (talin, vinkulin) a po 7 dnech (kolagen I, osteopontin, osteokalcin a alkalická fosfatáza). Intenzita fluorescence byla měřena pomocí softwaru Fluorescent Image Analyser (ver 1.0) (Matějka 2014) a následně normalizována na počet buněk. Intenzita fluorescence vzorků barvených bez primární protilátky byla odečtena.

### **8.7 Enzymatická imunisorbentní esej (ELISA) markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciaci**

Koncentrace adhezních proteinů vinkulin a talin a proteinů podílejících se na osteogenní diferenciaci buněk jako kolagen I, osteopontin, alkalická fosfatáza

a osteokalcin byla měřena na mg proteinu v buňkách po 7 dnech kultivace na vzorcích. Buňky Saos-2 byly od vzorků separovány pomocí roztoku trypsin-EDTA (5 minut, 37°C), resuspendovány v PBS a centrifugovány 5 minut při 1000 otáčkách/min. Následně byly buňky opět resuspendované v PBS a výsledná suspenze byla přes noc uskladněna v boxu při -70°C. Druhý den byl pomocí ultrazvuku připraven buněčný homogenát. Ultrasonikace trvala 40 s při amplitudě 70 % v sonikátoru UP 100 H (Dr. Hielscher GmbH) a celkový obsah proteinů byl změřen pomocí kalorimetrické Lowryho metody (1951). Alikvotní množství tohoto buněčného homogenátu, které odpovídalo 1-50 µg proteinu v 50 µl destilované vody, bylo naadsorbováno na 96 jamkovou mikrodestičku (Maxisorp, NUNC, Roskilde, Dánsko) a inkubováno přes noc v lednici při 4°C. Druhý den byla mikrodestička dvakrát opláchnuta PBS (100 µl/jamku), potom byla nespecifická vazebná místa zablokována 1 % albuminem rozpuštěným v PBS (100 µl/jamku, 60min). Po hodině byl do mikrodestičky přidán 1 % Tween 20 v PBS (100 µl/jamku, 20min). Po opláchnutí roztokem (100 µl/jamku) 1x PBS + 0,05 % Tween 20, 2x roztokem 0,1 % Triton X100 v PBS a znovu 1x PBS + 0,05 % Tween 20 byly do mikrodestičky napipetovány primární protilátky ředěny v PBS (50 µl/jamku, 60min při pokojové teplotě 20°C). Konkrétně se jednalo o myší monoklonální anti-talin (klon 8D4, Sigma, USA, kat. č. T3287, ředěno 1:200.), monoklonální anti-vinkulin, myší ascitická tekutina, klon hVIN-1 (Sigma, kat. č. V 9131, ředěno 1:100), králičí anti-kolagenu I, králík (Cosmo Bio Co., LTD, Japonsko; kat. č. LSL-LB-1197, ředěno 1:200), polyklonální králičí anti-osteopontin, člověk, pAb (Enzo Life Sciences, Inc. USA; kat. č. LSL-LB-1197, ředěno 1:200), monoklonální protilátka proti lidské placentární alkalické fosfatáze (klon 8B6, Sigma-Aldrich, USA, ředění 1: 200), polyklonální králičí anti-osteokalcin (1-49) (lidský) IgG (Peninsula Laboratories Inc. CA, USA, kat. č. T-4743, ředěno 1:200). Po inkubaci s primárními protilátkami byla destička opět opláchnuta roztokem PBS + 0,05% Tween 20 (100µl/jamku) a následně bylo přidáno 50 µl/jamku sekundární protilátky IgG (Fab2) fragment proti myšimu antigenu (ředěný 1:5000) (Sigma, kat. č. A3682) a kozí IgG (Fab2) fragment proti králičímu antigenu (ředěný 1:500) (Sigma, kat. č. A9169). Obě dvě protilátky byly konjugované s peroxidázou a působily 45 minut při pokojové teplotě. Tento krok byl následován dvojitým promytím v PBS s Triton X-100 (0,1 %) čtyřikrát. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl ABTS roztoku (Sigma Aldrich, USA, kat. č. A1888). Tato ortofenylendiaminová reakce probíhala 30-40 min ve tmě při pokojové teplotě. Roztok ABTS byl připraven smícháním 10 ml

pufry (0,1 M octanu sodného, Sigma Aldrich, kat. č. S2889, 0,05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, Penta, kat. č. 13472-35-0, pH 5), 0,5 ml roztoku ABTS (40 mM ABTS, Sigma Aldrich, USA, A1888), a 10 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Po inkubaci se měřila absorbance při 405 nm pomocí přístroje Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA).

## **8.8 Barvení depozitů kalcia u markerů osteogenní diferenciacce pomocí Alizarin Red**

Buňky byly fixovány 2 % paraformaldehydem po dobu 10 min a následně promyty destilovanou vodou. Po promytí byl k buňkám přidat roztok Alizarinové červeně S v H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 40mM, pH 4,1 (pH bylo upraveno pomocí 10 % (v/v) NH<sub>4</sub>OH). Buňky se vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 20 min za stálého protřepávání a po inkubaci 4× promyty destilovanou vodou. Jedno promytí trvalo 5 minut za stálého třepání. Po tomto promytí bylo do každé jamky přidáno 800 µl 10 % (v/v) kyseliny octové (30 min při pokojové teplotě za stálého třepání). Usazená vrstva buněk na vzorcích se seškrábala do zkumavky a 30 s vortexovala. Každá zkumavka byla doplněna 500 µl minerálního oleje (Sigma Aldrich, USA), inkubována 10 min při 85°C a následně vložena do ledu na 5 minut. Po vychlazení byly zkumavky 15 min centrifugovány při 20000g a 500 µl supernatantu bylo napipetováno do nových mikrozkuavek. Jejich obsah byl neutralizován 200 µl 10 % (v/v) NH<sub>4</sub>OH (pH 4,1-4,5). Posledním krokem bylo měření absorbance v triplicátech po 150 µl při 405 nm pomocí přístroje Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA) (Gregory *et al.* 2004).

## **8.9 Statistická analýza**

Kvantitativní data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± S.E.M (Standard Error of Mean, střední chyba průměru). Na statistickou analýzu byl použit software SigmaStat (Jandel Corporation, USA). Vzájemné porovnání jednotlivých skupin vzorků bylo provedeno testem ANOVA a to Student-Newman-Keulsovou metodou. Za významnou byla považována hodnota  $p \leq 0,05$ .

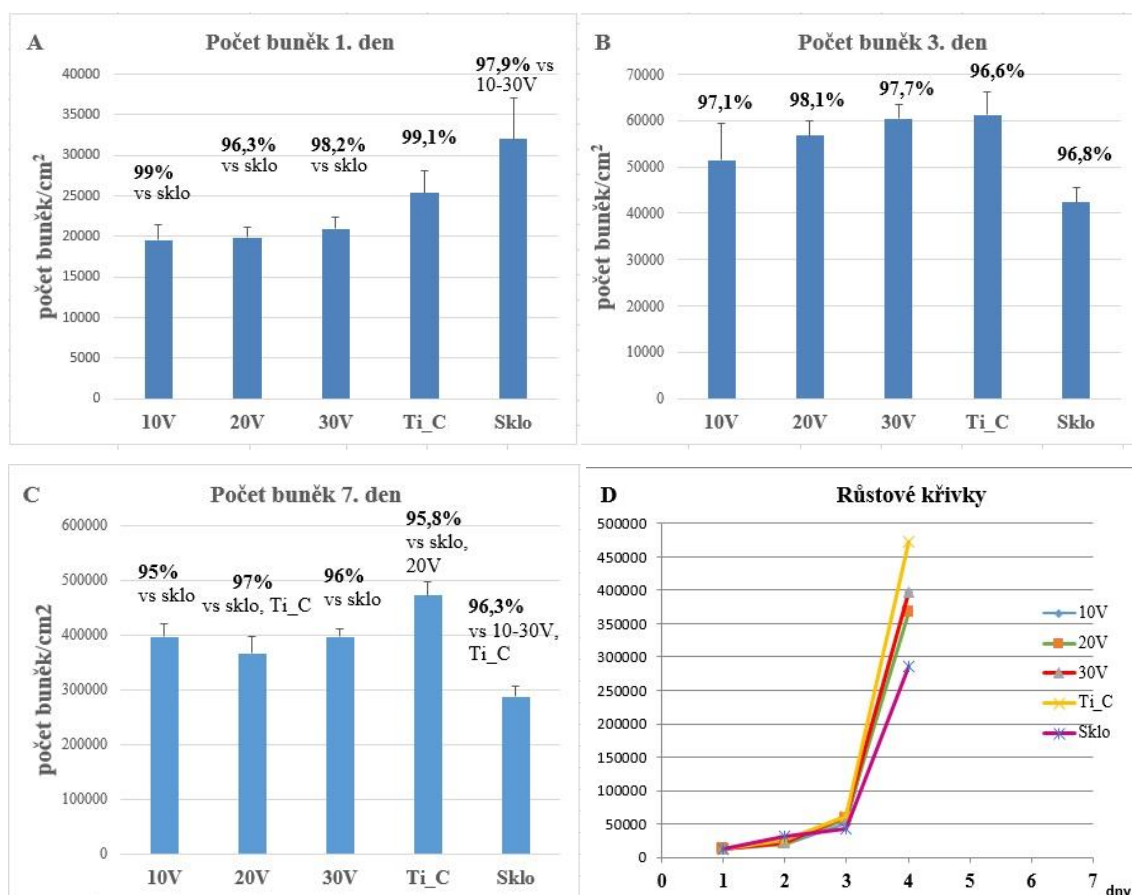


## 9. Výsledky

### 9.1 Materiál s modifikací pomocí nanotub

#### 9.1.1 Počet a viabilita buněk

Iniciální adheze lidských osteoblastů Saos-2 byla první den po nasazení nejvyšší na kontrolním skle a hladkém Ti\_C, Na Ti-6Al-4V nanotubách buňky adherovaly ve výrazně nižší denzitě (Obr. 7A). Nicméně viabilita buněk Saos-2 byla na všech testovaných vzorcích nad 96 %. Třetí den po nasazení byla hustota buněk na povrchu všech vzorků podobná a jejich viabilita byla okolo 97-98 %. Sedmý den byla nejvyšší hustota Saos-2 pozorována na hladkém Ti\_C a naopak nejnižší na kontrolním skle (Obr. 7C). Hustota buněk na vzorcích 10V a 30V byla vyšší než na skle.

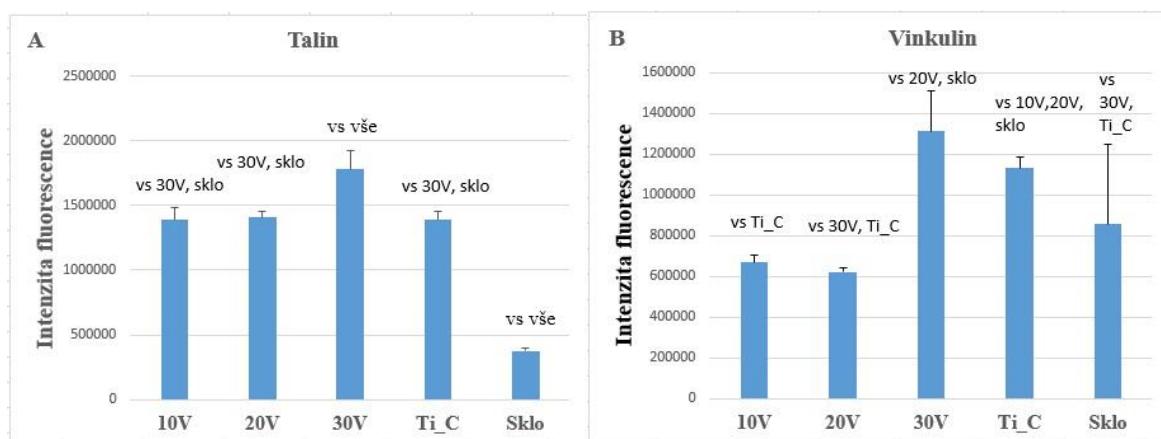


**Obr. 7.** Hustota a životaschopnost lidských osteoblastů linie Saos-2 první (A), třetí (B) a sedmý (C) den po nasazení na 10V, 20V, 30V nanotubách, na hladkém Ti\_C a na kontrolním skle. Růstová křivka buněk na těchto površích je zobrazena na Obr. 7D.

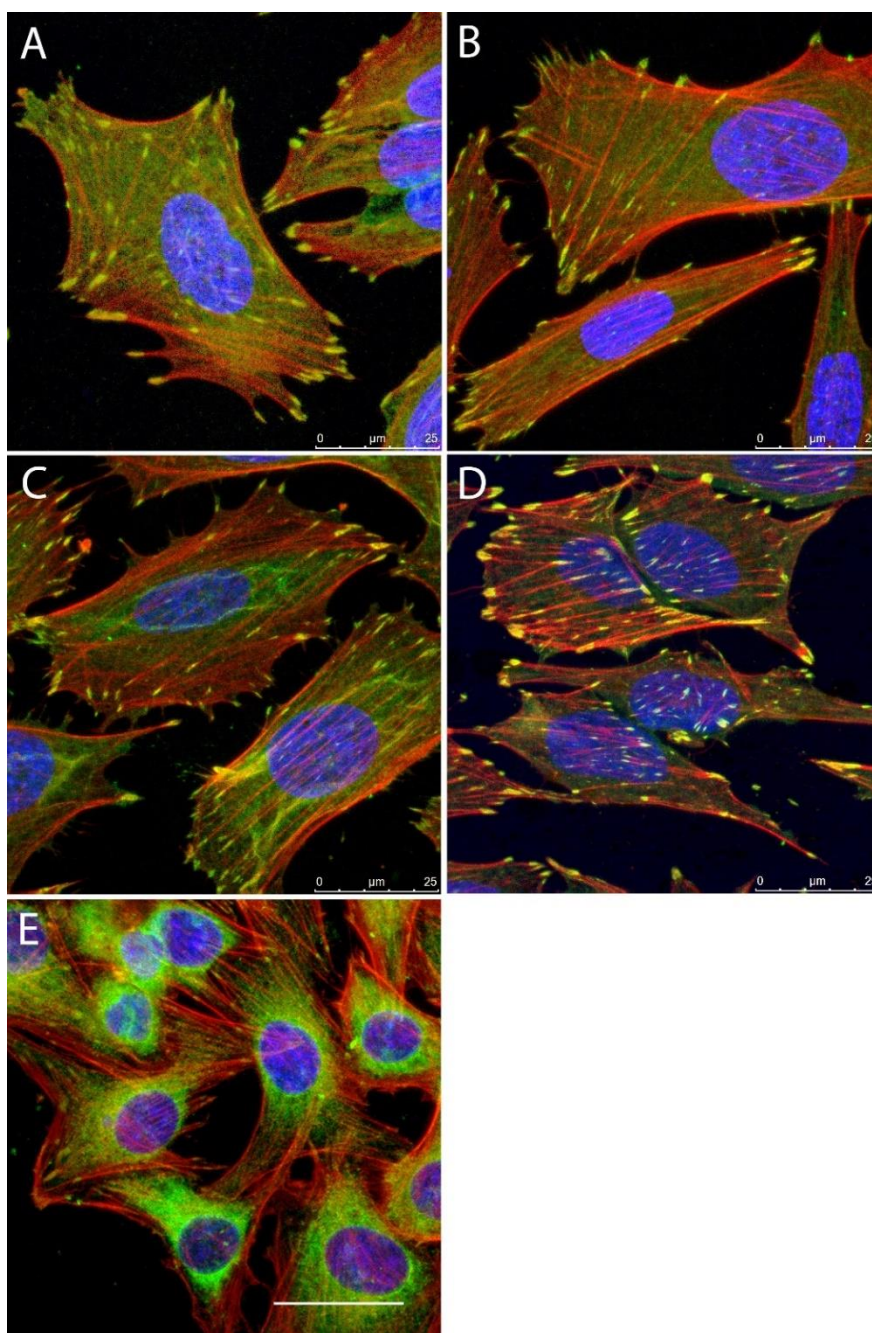
Jednotlivé hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  S.E.M. Nad sloupce v grafech jsou označeny vzorky, které jsou v porovnání s hodnotou daného sloupce statisticky významné (výraz „vs a název vzorku“). Za statisticky významné byly považovány hodnoty s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$ .

### 9.1.2 Imunofluorescenční barvení markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciaci

Koncentrace a distribuce markerů buněčné adheze jako je vinkulin a talin, byly hodnoceny pomocí imunofluorescenčního barvení a metodou ELISA. Intenzita fluorescence talinu na buňku byla nejvyšší na nanotubovém vzorku 30V a velmi nízký signál byl na kontrolním skle (Obr. 8A). Na všech vzorcích jsou zaznamenány velmi dobře vyvinuté fokálně adhezni plaky obsahující vinkulin (Obr. 9). Na hladkém Ti\_C se zdají být nepatrně větší než na nanotubových vzorcích. Na kontrolním skle jsou fokální adheze buněk Saos-2 menší než na ostatních vzorcích a intenzita fluorescence vinkulinu je nižší než na vzorcích 30V a Ti\_C. Intenzita fluorescence vinkulinu na buňku byla nejvyšší na vzorku s největším průměrem nanotub 30V a naopak nejnižší na 10V a 20V. To znamená, že intenzita fluorescence talinu a vinkulinu byla vyšší na nanotubách s větším průměrem a větší tloušťkou stěny, než na nanotubách s průměrem a tloušťkou stěny menší.

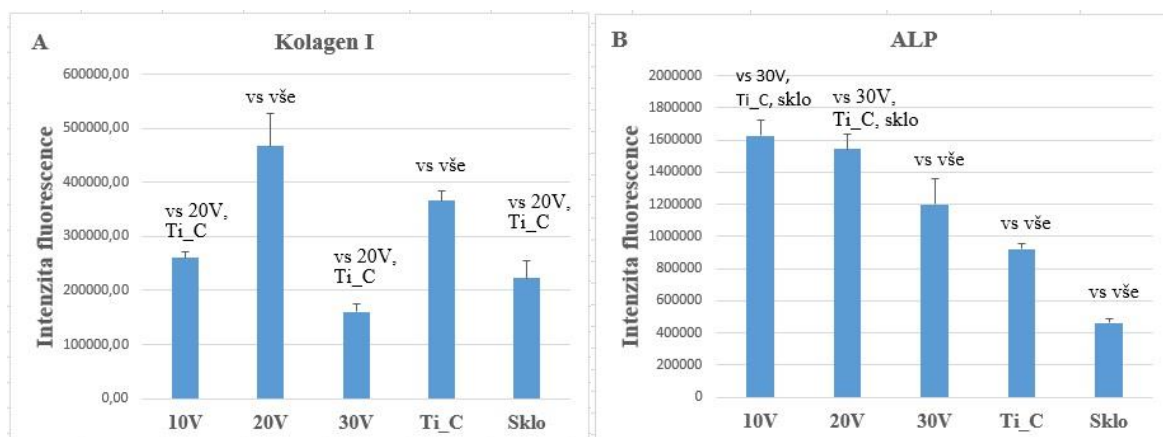


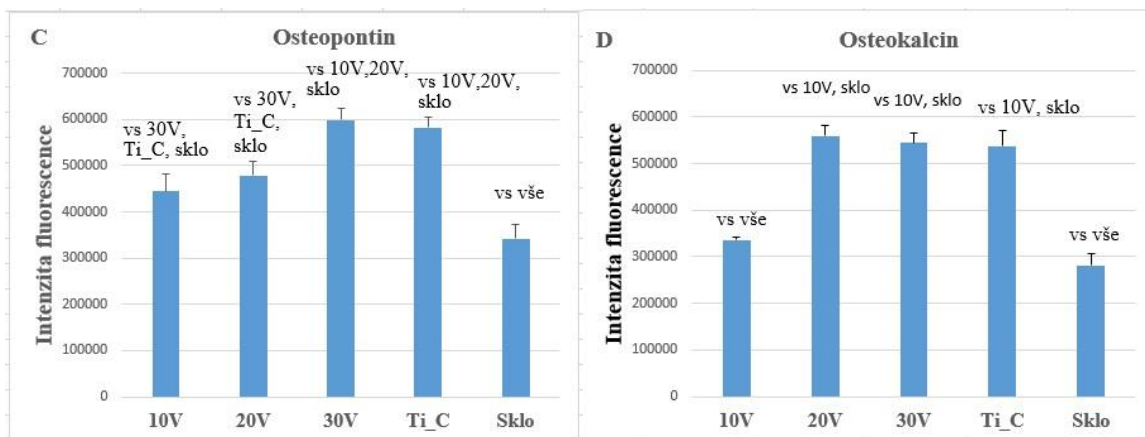
**Obr. 8.** Intenzita fluorescence talinu (A) a vinkulinu (B) na buňku v lidských osteoblastech Saos-2 na 10V, 20V, 30V nanotubách, hladkém Ti\_C a kontrolním skle 3. den po nasazení. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr  $\pm$  S.E.M. Nad sloupce v grafech jsou označeny vzorky, které jsou v porovnání s hodnotou daného sloupce statisticky významné. Za statisticky významné byly považovány hodnoty s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$ .



**Obr. 9.** Imunofluorescenční barvení vinkulinu (zelená fluorescence) a F-aktinu (červená fluorescence) v lidských osteoblastech Saos-2 po 3 denní kultivaci na vzorcích 10V, 20V, 30V, hladkém Ti\_C a kontrolním skle. Buněčná jádra (modrá fluorescence) byla dobarvena barvivem Hoechst 33258. Konfokální laserový mikroskop Leica SPE, obj.  $\times 63$ , zoom  $\times 2$ , měřítko 20  $\mu\text{m}$ .

Podobně jako markery buněčné adheze, i koncentrace markerů osteogenní diference jako je kolagen I, alkalická fosfatáza, osteopontin, a osteokalcin byla hodnocena pomocí imunofluorescenčního barvení. Kolagen I a alkalická fosfatáza (ALP) jsou časné markery, osteopontin je tzv. střednědobý marker a osteokalcin je pozdní marker osteogenní diference buněk. Dalším pozdním markerem byla koncentrace vápníku odhalena barvením Alizarin Red. Intenzita fluorescence kolagenu I na buňku byla nejvyšší na vzorku 20V a nejnižší na 30V (Obr. 10A). Relativně vysoká intenzita signálu byla i na hladkém Ti\_C. Fluorescenční signál ALP byl vysoký na nanotubových vzorcích 10V a 20V, na nanotubách s největším průměrem tj. 30V byl o něco nižší. Nejnižší signál byl naměřen na hladkém Ti\_C a kontrolním skle (Obr. 10B). Naopak intenzita signálu osteopontinu se s rostoucím průměrem nanotub zvyšuje a vysoká je i na hladkém Ti\_C (Obr. 10C). Intenzita fluorescence pozdního markeru osteogenní diference tj. osteokalcinu byla nejvyšší na 20V, 30V a Ti\_C a o něco nižší na nanotubách 10V a kontrolním skle (Obr. 10D).

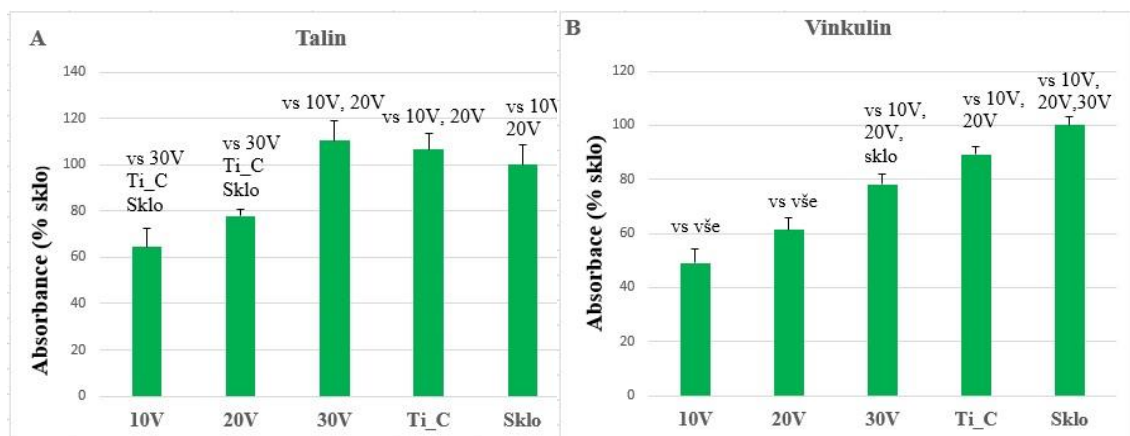




**Obr. 10.** Intenzita fluorescence kolagenu I (A), ALP (B), osteopontinu (C) a osteokalcinu (D) v lidských osteoblastech linie Saos-2 na 10V, 20V, 30V nanotubách, hladkém Ti\_C a kontrolním skle 7. den po nasazení. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± S.E.M. Nad sloupce v grafech jsou označené vzorky, které jsou v porovnání s hodnotou daného sloupce statisticky významné. Za statisticky významné byly považovány hodnoty s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$ .

### 9.1.3 Enzymatická imunosorbentní esej (ELISA) markerů buněčné adheze a osteogenní diferenciacce

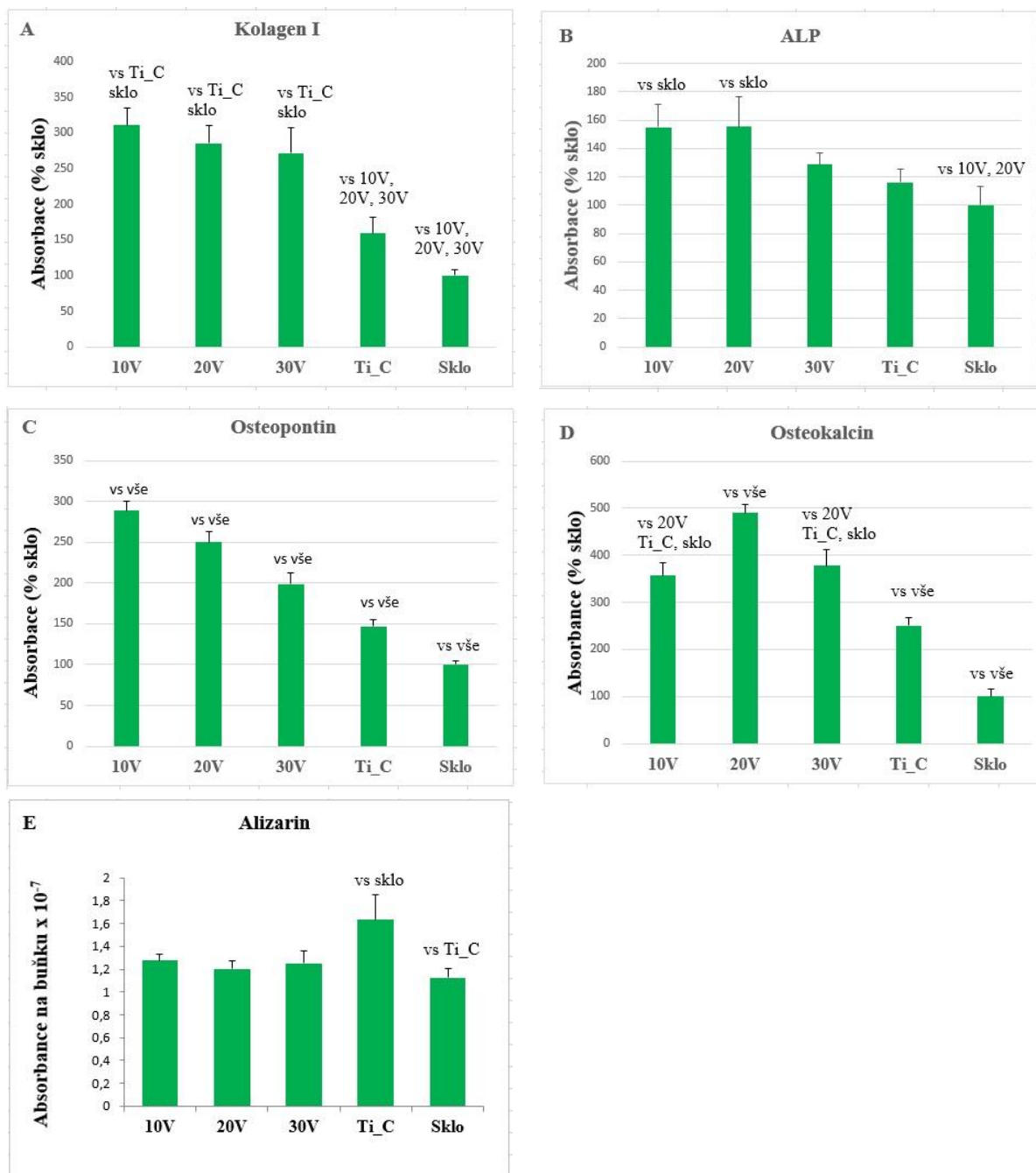
Koncentrace adhezních proteinů talinu a vinkulinu, které byly měřeny semikvantitativně metodou ELISA, vykazovaly podobný trend jako u měření intenzity fluorescenčního signálu. Koncentrace talinu byla vyšší na nanotubách 30V, hladkém Ti\_C a kontrolním skle v porovnání s nanotubovými vzorky 10V a 20V (Obr. 11A). Koncentrace vinkulinu roste od 10V do 30V, ale nejvyšší koncentrace se však ukázala na rovných površích, tedy na hladkém Ti\_C a kontrolním skle (Obr. 11B).



**Obr. 11.** Absorbance talinu a vinkulinu produkované buňkami Saos-2 na nanotubových vzorcích 10V, 20V, 30V, hladkém Ti\_C a kontrolním skle 7. den po nasazení přepočítané na mg proteinu. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± S.E.M. Nad sloupci v grafech jsou označeny vzorky, které jsou v porovnání s hodnotou daného sloupce statisticky významné (výraz „vs a název vzorku“). Za statisticky významné byly považovány hodnoty s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$ .

ELISA kolagenu I tj. časného markeru osteogenní diferenciace ukázala nejvyšší koncentrace na nanotubách 10V, 20V, 30V, tyto hodnoty začaly výrazně klesat na hladkém Ti\_C a kontrolním skle (Obr. 12A). Na nanotubových vzorcích klesala průměrná hodnota od 10V až k 30V, ale tyto rozdíly koncentrací nebyly statisticky významné. Pokles hodnot byl výraznější u měření koncentrace ALP, která byla nejvyšší v buňkách na vzorcích 10V a 20V ve srovnání s koncentrací v buňkách na 30V a hladkém Ti\_C. Nejnižší koncentrace ALP byla naměřena buňkám rostoucím na kontrolním skle (Obr. 12B). Koncentrace střednědobého a pozdních markerů osteogenní diferenciace buněk ukázaly ještě větší tendenci klesat se zvyšujícím se průměrem Ti-6Al-4V nanotub. Koncentrace osteopontinu byla nejvyšší v buňkách na nanotubovém vzorku 10V a nejnižší na kontrolním skle (Obr. 12C). Také koncentrace osteokalcinu byla výrazně nižší na vzorku 30V vzorkům 20V a 10V a minimální na hladkém Ti\_C a kontrolním skle (Obr. 12D). Kvantifikace vápníku pomocí Alizarin Red prokázala zvýšenou koncentraci vápníku v buňkách na hladkém Ti\_C ve srovnání s kontrolním sklem, zatímco koncentrace vápníku buněk v nanotubových vzorcích 10V, 20V, 30V byly velmi podobné hodnotě na skle (Obr. 12E). Tyto výsledky ukazují, že koncentrace adhezních proteinů spíše roste s větším průměrem a tloušťkou stěny nanotub a naopak

osteogenní diferenciaci buněk je podporována spíše jemnější nanostrukturou Ti-6Al-4V nanotub, tedy vzorky 10V a 20V.



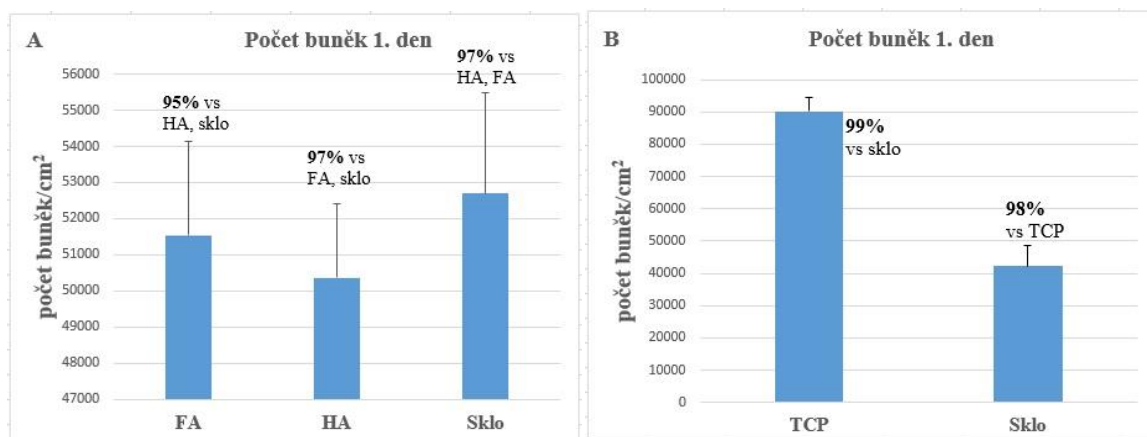
**Obr. 12.** Absorbance proteinů kolagenu I (A), ALP (B), osteopontinu (C), osteokalcinu (D) a koncentrace vápníku (E) v lidských osteoblastech Saos-2 na nanotubových vzorcích 10V, 20V, 30V, hladkém Ti\_C a kontrolním skle. Měřeno metodou ELISA (A-D) a alizarinovým barvením (E) 7. den po nasazení. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± S.E.M. Nad sloupci v grafech jsou označeny vzorky, které jsou v porovnání

s hodnotou daného sloupce statisticky významné. Za statisticky významné byly považovány hodnoty s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$ .

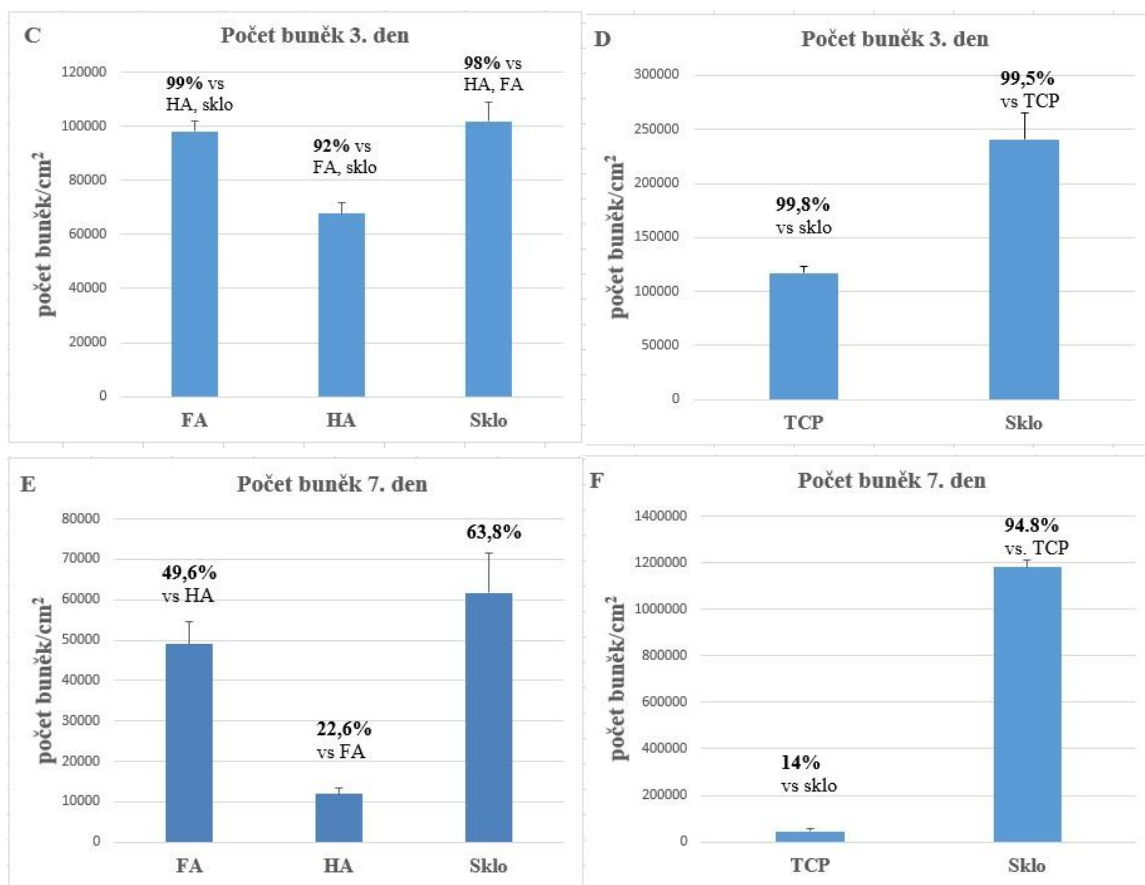
## 9.2 Materiál s modifikací pomocí nástříku HA, FA, TCP

### 9.2.1 Počet a viabilita buněk

Iniciální adheze lidských osteoblastů Saos-2 byla posuzována na vzorcích FA a HA a nezávisle na nich na vzorku TCP. Jako kontrola pro všechny vzorky sloužilo krycí sklo. Iniciální adheze buněk Saos-2 byla první den po nasazení nejvyšší na kontrolním skle a vzorku FA. Na vzorku HA buňky adherovaly ve výrazně nižší denzitě (Obr. 13A). Počáteční adheze osteoblastů na titanu s vrstvou TCP byla v porovnání s kontrolním sklem vyšší (Obr. 13B). Životaschopnost buněk byla na všech materiálech vysoká. Třetí den po nasazení byla hustota buněk na vzorcích FA a HA nižší než na kontrolním skle (Obr. 13C). Na materiálu TCP byla zaznamenána výrazně nižší denzita buněk při současně vysoké viabilitě osteoblastů (Obr. 13D). Sedmý den byla nejvyšší hustota Saos-2 pozorována na kontrolním skle a na vzorku FA. Viabilita buněk značně poklesla a to zejména na materiálu HA (Obr. 13E). Po sedmidenní kultivaci buněk na materiálu TCP byla zaznamenána extrémně nízká hustota buněk a nízké procento živých buněk v porovnání s kontrolním sklem, což nasvědčuje tomu, že je materiál TCP toxický (Obr. 13F).



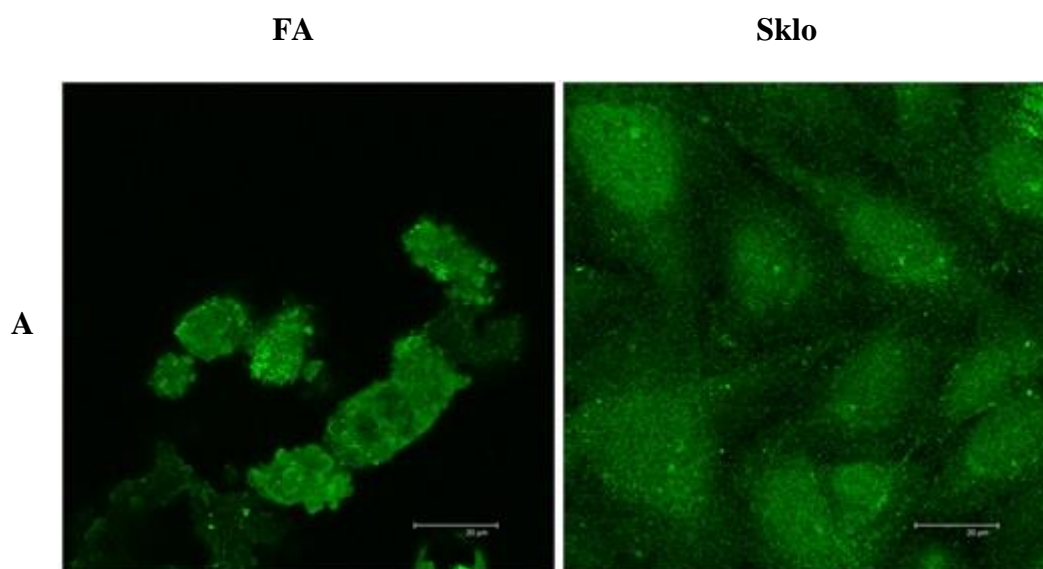


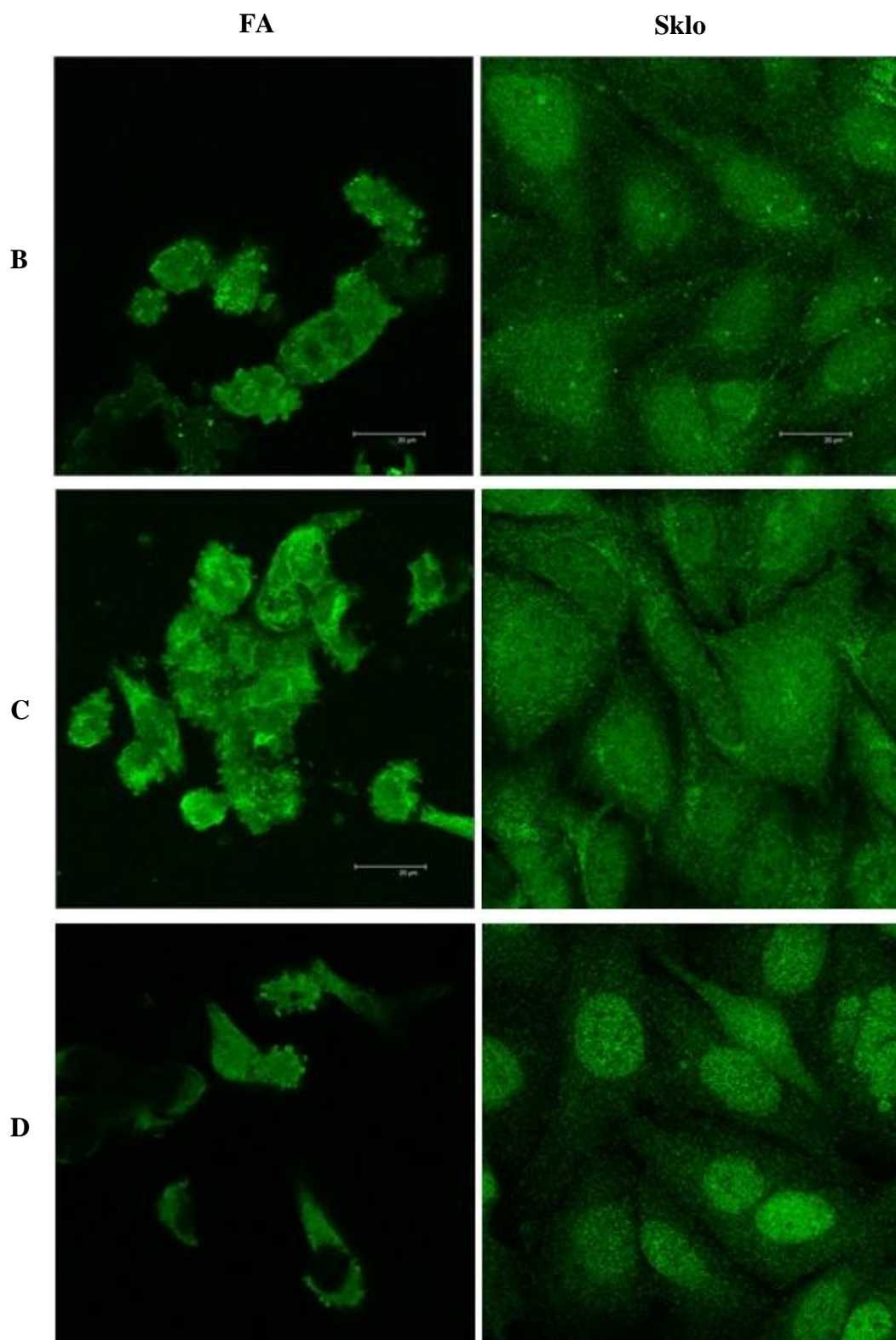


**Obr. 13.** Hustota a životaschopnost (v %) lidských osteoblastů linie Saos-2 na materiálu FA, HA a kontrolním krycím sklu první (A), třetí (C) a sedmý (E) den po nasazení. Hustota a životaschopnost buněk Saos-2 na titanu s vrstvou TCP a kontrolním krycím sklu první (B), třetí (D) a sedmý (F) den po nasazení. Jednotlivé hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± S.E.M. Nad sloupci v grafech jsou označeny vzorky, které jsou v porovnání s hodnotou daného sloupce statisticky významné (výraz „vs a název vzorku“). Za statisticky významné byly považovány hodnoty s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$ .

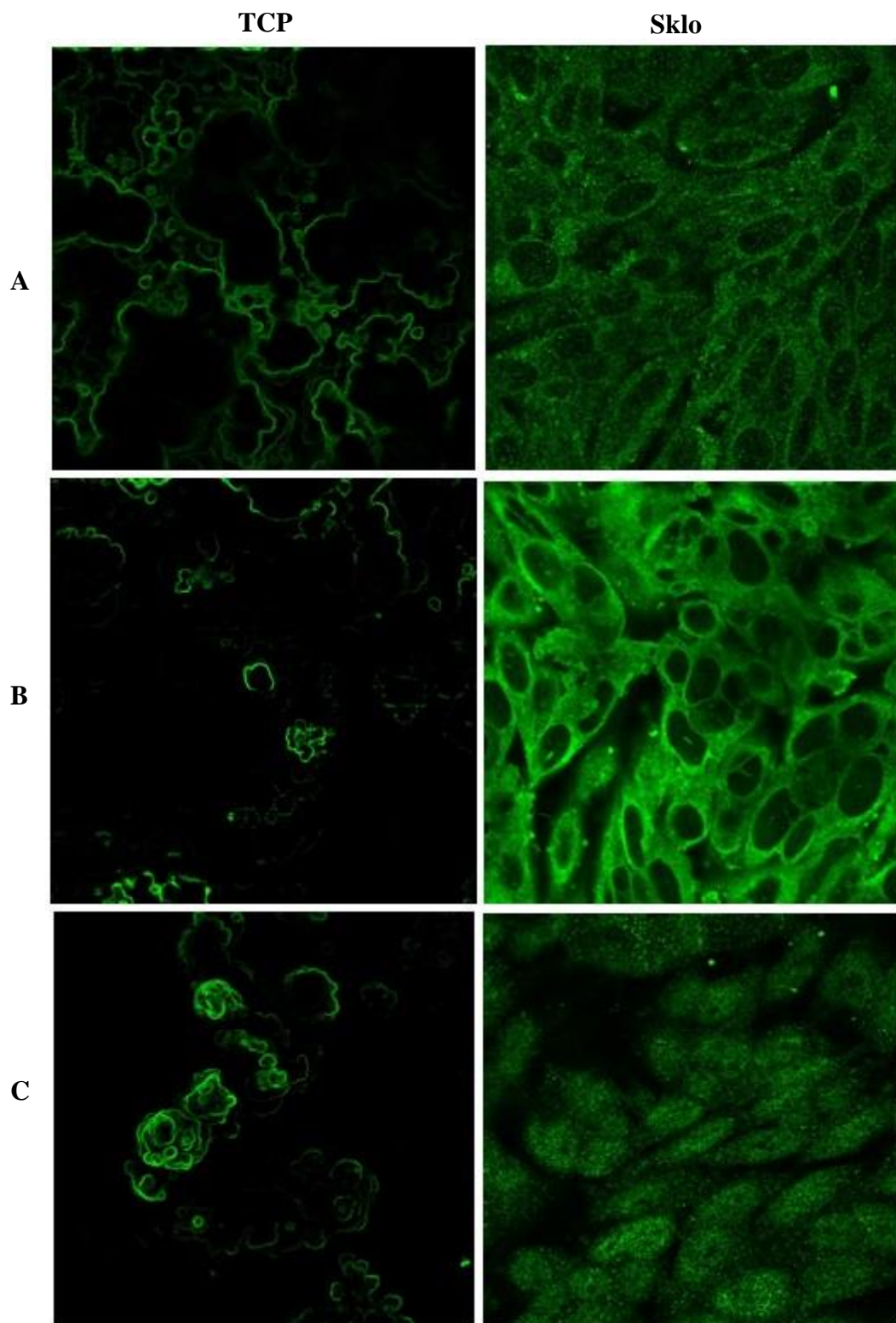
## 9.2.2 Imunofluorescenční barvení markerů osteogenní diferenciace

Prostřednictvím imunofluorescenčního barvení byly v lidských osteoblastech Saos-2 označeny základní markery osteogenní diferenciace tj. kolagen I, ALP, osteopontin a osteokalcin 7. den po nasazení. Na Obr. 14 lze pozorovat jednotlivé diferenciační markery v buňkách na materiálu FA a kontrolním skle. Barvení prokázalo vysokou produkci proteinu ALP a osteopontinu u buněk na materiálu FA než na skle, naopak rozptřeni jednotlivých buněk Saos-2 bylo lepší na kontrolním skle. Na materiálu HA nebyly buňky po nabarvení nalezeny. Z výše uvedených výsledků je patrné, že kontrolní sklo podporuje zejména adhezi a růst buněk, zatímco vzorek FA podporuje více jejich osteogenní diferenciaci. Po imunofluorescenčním barvení buněk rostoucích na materiálu TCP a kontrolním skle byl pozorovaný signál na markery ALP, osteopontin a osteokalcin pouze v buňkách rostoucích na kontrolním skle. Na vzorku TCP nabyt detekován žádný pozitivní signál na buňky, fluorescenčně obarven byl pouze materiál samotný. Buňky na TCP byly pravděpodobně poškozeny toxicitou materiálu (Obr. 15). Vzorek TCP podporuje iniciální adhezi buněk, ale od 3. dne inhibuje jejich proliferaci a jeví se pro osteoblasty jako toxický. Vzhledem k možné toxicitě materiálů nebyly vzorky dále hodnoceny.





**Obr. 14.** Imunofluorescenční barvení kolagenu I (A), ALP (B) osteopontinu (C) a osteokalcinu (D) v lidských osteoblastech Saos-2 7. den po jejich nasazení na materiál FA a kontrolní sklo. Konfokální mikroskop Leica SP2, objektiv  $\times 63$ , zoom  $\times 2$ .



**Obr. 15.** Imunofluorescenční barvení ALP (A), osteopontinu (B) a osteokalcinu (C) v lidských osteoblastech Saos-2 7. den po jejich nasazení na materiál TCP a kontrolní sklo. Konfokální mikroskop Leica SP2, objektiv  $\times 63$ , zoom  $\times 2$ .

## 10. Diskuze

### 10.1 Materiál s modifikací pomocí nanotub

Titan má vynikající mechanické vlastnosti, je pevný, odolný vůči korozi a biokompatibilní s lidským tělem (Geetha *et al.* 2009). Topografie kovových implantátů hraje velmi důležitou roli při osteointegraci implantátů do kosti. Lidské osteoblasty pozitivně reagují na nanostrukturované povrchy jako jsou např. nanotuby (Zhao *et al.* 2007). Anodickou oxidací byla připravena nanotubulární struktura povrchu vzorků ze slitiny Ti-6Al-4V. Morfologie a velikost nanotub závisí na podmínkách anodizace. Velikost nanotub by měla být podobná velikosti kostního apatitu, který je tvořen 10 až 20 nm dlouhými a 2-3 nm širokými pláty (Weiner a Wagner 1998), nebo velikosti vláken kolagen I, které jsou 200 nm dlouhé a 2-3 nm široké (Kane a Ma 2013). Je obecně známo, že chemické složení, drsnost a nanostruktura povrchu ovlivňuje adhezi buněk na materiál. Pro hodnocení adheze buněk na námi studovaný materiál byla pro *in vitro* pokusy použita buňková populace osteoblastů Saos-2. Buňky Saos-2 byly původně derivovány z primárního osteosarkomu 11leté dívky bělošského původu v roce 1973. Jedná se o adherentní linii, která zcela postrádá gen p53 (Fogh *et al.* 1977). Tyto buňky byly nasazeny na nanotubové vzorky 10V, 20V, 30V ze slitiny Ti-6Al-4V a hladký vzorek bez nanotub Ti\_C. Jako kontrolní materiál bylo použito krycí sklo. Tloušťka nanotubové vrstvy se pohybovala od 200 nm pro 10V, až po cca 700 nm pro 30V a průměr nanotub byl  $18 \pm 4$  nm pro 10V,  $43 \pm 10$  nm pro 20V a  $79 \pm 32$  nm pro vzorek 30V. Iniciální adheze osteoblastů na vzorcích 10V, 20V a 30V byla první den po nasazení nižší než na hladkých površích. Třetí den po nasazení byla hustota buněk na všech vzorcích podobná a nebyla zaznamenána žádná výrazná odchylka. Sedmý den byla pozorována snížená denzita buněk na vzorku 20V v porovnání s hladkým Ti\_C. Nejnižší hustota buněk Saos-2 byla na kontrolním skle. Přestože je tato modifikace povrchu relativně nová, existuje několik studií zabývajících vlivem této úpravy povrchu na buňky osteoblastů. Studie Solar *et al.* (2015) nezaznamenala žádný vliv nanočástic o velikosti 1-100 nm na iniciální adhezi osteoblastů linie MG-63. Naopak myší linie MC3T3-E1 preferenčně adherovala na nanotuby narostlé na slitině Ti-Zr a exprimovala integriny specifické pro kolagen ( $\alpha 2$ ) a fibronektin ( $\alpha 5$ ) po 4 a 24 hod v porovnání s hladkým a leptaným materiálem (Sista *et al.* 2013). Tvrzení, že nanotuby podporují růst

a adhezi buněk na materiál, podporují i Oh *et al.* (2006), kteří se ve své práci zabývali vlivem TiO<sub>2</sub> nanotub na růst myších buněk MC3T3-E1. Jejich výsledky ukazují, že nanotuby značně mění topografii materiálu, který díky nim podporuje adhezi a rozptřeni buněk. Přítomnost nanotub vyvolala výrazné zrychlení tempa růstu osteoblastů až o 300 – 400 % v porovnání s rychlostí růstu buněk na čistém titanu, což bylo pravděpodobně způsobeno právě změnou topografie povrchu materiálu a zvětšenou plochou pro adhezi buněk (Oh *et al.* 2006).

Topografie povrchu materiálu, jako je velikost a průměr nanotub, má vliv na adhezi a růst buněk. Veliký průměr samotných nanotub (např. 100 nm) nebo široké mezery mezi jednotlivými nanotubami neumožňují vazbu buňka-materiál pomocí integrinových receptorů, tvorbu fokálních adhezních plaků a následnou buněčnou signalizaci (Park *et al.* 2007; Yu *et al.* 2010). Vazba buňka-materiál pomocí buněčných integrinových receptorů je zprostředkována adsorpcí specifických proteinů (např. vitronektin, fibronektin) na povrch materiálu z biologických tekutin. Nicméně tyto proteiny na povrchu nanotub s velkým průměrem adsorbují jen řídce v důsledku přítomnosti velikých mezer (Brammer *et al.* 2009). Z mnoha studií tak vyplývá, že adheze buněk na materiál klesá s rostoucím průměrem nanotub. Například lidské osteoblasty dosahovaly nejvyšší hustoty na nanotubách s vnitřním průměrem 15 nm v porovnání s hladkým materiálem bez přítomnosti nanotubulární struktury a hustota buněk na nanotubách s průměrem 20, 30, 50, 70 a 100 nm výrazně klesala. Také rozptřeni filopodií a produkce fibronektinu v primárních lidských osteoblastech byla vyšší na vzorku s 15 nm nanotubami než na nanotubách s vnitřním průměrem 100 nm (Park *et al.* 2009). Podobně tomu bylo u Ti vzorků s TiO<sub>2</sub> nanotubami o průměru 30 nm, které podporovaly adhezi myších preosteoblastů MC3T3-E1 nejvíce, zatímco větší průměry nanotub (70-100 nm) měly na buňky spíše negativní vliv (Brammer *et al.* 2009). V této práci byl průměr nanotub na vzorcích 18 ± 4 nm pro 10V, 43 ± 10 nm pro 20V a 79 ± 32 nm pro 30V vhodný pro integriny zprostředkovanou adhezi buněk Saos-2 a tvorbu fokálních adhezních plaků. Pro integriny je optimální velikost povrchu 10 nm a fokální adhezní plaky jsou tvořeny mezi povrchem materiálu a buňkou, kde ideální vzdálenost mezi materiálem a buněčnou membránou je 15 nm (Anselme *et al.* 2010). V souladu s touto skutečností, v této práci mají osteoblasty Saos-2 na všech vzorcích s nanotubami dobře vyvinuté fokální adheze (Obr. 9).

Ačkoliv iniciální adheze buněk Saos-2 na nanostrukturu byla první den po nasazení nižší než na skle, buňky rostly relativně rychle a 7. den byla jejich hustota podobná jako na hladkém Ti\_C a dokonce vyšší než na kontrolním skle s viabilitou 95 % a více (Obr. 7C).

Adheze buněk na studovaný materiál může být také hodnocena stanovením koncentrace a distribuce markerů buněčné adheze jako je vinkulin a talin. Koncentrace těchto proteinů byla v této práci měřena pomocí imunofluorescenčního barvení a metodou ELISA. Z výsledků vyplývá, že koncentrace těchto markerů roste se zvyšujícím se průměrem nanotub. Podobně tomu bylo i na vzorcích s 80 nm nanotubami, kde byla intenzita vinkulinu v myších C3H10T1/2 osteogenních buňkách vyšší než u 30 nm nanotub či leštěných a leptaných povrchů (Peng *et al.* 2013). Tento výsledek je v souladu s uvedenými výsledky v této diplomové práci, že nejvyšší imunofluorescence vinkulinu byla na vzorku 30V se středním průměrem nanotub  $79 \pm 32$  nm (Obr. 8B). Vinkulin je klíčový fokální adhezní protein, který stabilizuje talin-integrin komplex a zvyšuje tak buněčnou adheze. Buňky mohou stabilně adherovat na povrch materiálu a aktivovat expresi vinkulinu. Proto může exprese vinkulinu v buňkách na implantátu do jisté míry odrážet sílu adheze (Peng *et al.* 2013).

Při testování vlivu materiálu s nanotubulární strukturou na osteogenní diferenciaci osteoblastů linie Saos-2 byla měřena koncentrace vybraných markerů, které jsou pro osteogenní diferenciaci buněk typické. Mezi tyto markery patří kolagen I a ALP jako ukazatelé časné diferenciaci buněk, osteopontin jako tzv. střednědobý marker a osteokalcin jako pozdní marker osteogenní diferenciaci. Dalším pozdním ukazatelem byla koncentrace vápníku stanovena barvením Alizarin Red. Nejvyšší koncentrace kolagenu I, ALP a osteopontinu 7. den po nasazení byla v buňkách rostoucích na vzorku 10V a nejvyšší koncentrace osteokalcinu byla na nanotubovém vzorku 20V. Z těchto výsledků vyplývá opačné tvrzení, než tomu bylo u adhezních proteinů (tj. že s rostoucím průměrem nanotub rostla koncentrace proteinů). Osteogenní diferenciaci buněk je podporována spíše menšími průměry nanotub (tj. vzorky 10V a 20V). Podobně tomu bylo i ve studii, kde byly použity TiO<sub>2</sub> nanotuby o průměru 15, 20, 30, 70 a 100 nm. Ukládání vápníku a produkce osteokalcinu v primárních lidských osteoblastech byla vyšší na TiO<sub>2</sub> nanotubách o průměru 15 nm než na nanotubách o průměru 20, 30, 70 nebo 100 nm (Park *et al.* 2009). Také myší preosteoblasty MC3T3-E1 rostoucí na TiO<sub>2</sub>

nanotubách vykazovaly lepší adhezi, mineralizaci a aktivitu ALP na nanotubách s nižším průměrem (20-70 nm) a naopak na nanotubách o průměru 100-120 nm došlo k těžkému poškození buněk (Yu *et al.* 2010). Nicméně některé studie uvádějí úplně opačné výsledky a to, že osteogenní diferenciaci se zvyšuje s rostoucím průměrem nanotub. Nanotuby s malým průměrem 30 nm sice podporovaly adhezi lidských mezenchymálních buněk, ale bez znatelné diferenciaci. Naopak koncentrace osteopontinu a osteokalcinu byly nejvyšší v buňkách rostoucích na nanotubách o průměru 100 nm (Oh *et al.* 2009). Podobné výsledky zaznamenali i Brammer *et al.* (2009) u myších MC3T3-E1 kultivovaných na TiO<sub>2</sub> nanotubových vrstvách. Buňky nejvíce adherovaly na nanotuby o průměru 30 nm, zatímco nanotuby s vyšším průměrem 70-100 nm sice vyvolaly nižší hustotu buněk, nicméně koncentrace a aktivita ALP u nich byla vyšší než u buněk na 30 nm nanotubách (Brammer *et al.* 2009). Další studie na TiO<sub>2</sub> nanotubách o průměru 50, 70 a 100 nm ukázala, že 70 nm nanotuby byly optimální pro osteogenní diferenciaci lidských kmenových buněk odvozených z tukové tkáně. Kromě toho pozorovali, že TiO<sub>2</sub> nanotuby podporovaly osteogenní diferenciaci kmenových buněk upregulací úrovně methylace histonu H3 na lysinu 4 v promotorové oblasti osteogenního genu Runx2 a osteokalcinu tím, že inhibovaly specifickou demethylázu RBP2 (retinol vázající protein 2) (Lv *et al.* 2015). V této práci byla intenzita osteokalcinu nejvyšší v buňkách rostoucích na vzorcích 20V a 30V tj. na nanotubách o průměru  $43 \pm 10$  nm a  $79 \pm 32$  nm, což zahrnuje optimální průměr 70 nm uvedený v práci Lv *et al.* (2015).

## 10.2 Materiál s modifikací pomocí nástřiku HA, FA a TCP

Fyzikální vlastnosti implantátu jsou často důležitější než jeho chemické složení, zejména z hlediska adheze buněk k materiálu. Pro správnou osteointegraci implantátu do kosti, musí být materiál dokonale akceptován lidským organismem. Toto vhojení do kosti může být zlepšeno povrchovou modifikací, která bude v kontaktu s lidskou tkání (Dubious *et al.* 1999; Lavos-Valereto *et al.* 2001). Hydroxyapatit se používá k povlakování materiálů zejména díky jeho biokompatibilitě, neboť je součástí anorganické kostní tkáně. Samotné krystaly HA nemohou být využity k výrobě implantátu, protože jsou velmi křehké. Nicméně několik studií prokázalo, že materiál s HA nástřikem se rychleji osteointegruje, usnadňuje adhezi osteoblastů a tím umožňuje přímý kontakt s kostí ve srovnání s nepovlakovanými implantáty (Baltag *et al.* 2006). Nejběžnější formou nanášení hydroxyapatitu na materiál jsou nástřiky pomocí plazmy.



Tento způsob dosahuje výborných klinických výsledků. Nicméně během tohoto procesu vlivem vysoké teploty může dojít ke strukturálním změnám samotného HA a právě udržení dlouhodobé stability HA nástřiku je stále velkým problémem (Lai *et al.* 2002). Vzhledem k resorpci HA v biologickém prostředí může docházet k pozvolnému rozpadu povlaku a ztrátě mechanických vlastností, což může vést ke ztrátě pevné fixace mezi implantátem a okolní kostní tkání (Sun *et al.* 2001). Pro stabilitu HA se do chemických nástřiků začal přidávat fluor, který se vyznačuje nízkou rozpustností a odolností vůči kyselinám. Několik studií prokázalo větší stabilitu materiálu s fluorapatitovým nástřikem. Například fluorapatit (FA) implantovaný do kozích stehenních kostí nevykazoval po 12 a 25 týdnech žádnou degradaci v porovnání s částečnou resorpcí HA (Dhert *et al.* 1991). V této diplomové práci byla hodnocena iniciální adheze lidských osteoblastů linie Saos-2 rostoucích na materiálu modifikovaném pomocí nástřiků hydroxyapatitu, fluorapatitu a trikalciumfosfátu. Kontrolou pro všechny vzorky bylo krycí sklo. Na jednotlivých vzorcích byly provedeny testy cytokompatibility hodnotící vliv těchto materiálů na růst, adhezi a osteogenní diferenciaci buněk. Pro správnou buněčnou odpověď na materiál s HA nástřikem je důležité optimalizovat velikost a koncentraci HA částic (Filová *et al.* 2014). Vlastnosti HA částic jsou dány způsobem přípravy, tvarem, velikostí a drsností. Menší částice v řádech nanometrů jsou více resorbovány než mikročástice (Ignjatovic *et al.* 2010). Velikost částic má vliv také na adsorpci proteinů ze séra kultivačního média či tělních tekutin. Dos Santos *et al.* (2008) zjistili, že adsorpce proteinů albumin a fibronektin na HA povrch s částicemi o velikosti  $32 \pm 6$  nm byla vyšší, než tomu bylo u  $\beta$ -TCP, kde byla velikost částic  $142 \pm 24$  nm. Nicméně účinek syntetického hydroxyapatitu na chování buněk není zcela jasný, hydroxyapatit bývá interpretován jako biokompatibilní i cytotoxický (Filová *et al.* 2014). Zároveň i materiály, na které je HA nanášen, mohou na buňky působit pozitivně i negativně. V této práci byly pro HA nástřiky použity materiály ze slitiny Ti-6Al-4V, která se všeobecně vyznačuje vysokou biokompatibilitou. Rozdílné působení HA kompozitů na buňky lze vysvětlit tím, že sytký HA je obvykle homogenně rozptýlen v celém základním materiálu, z něhož je kompozit vyroben. Proto podstatná část HA tak není v přímém kontaktu s buňkami a do kontaktu s nimi se dostane pouze po rozpuštění v kultivačním médiu nebo v krvi (Filová *et al.* 2014). V této studii byla iniciální adheze lidských osteoblastů Saos-2 první den po nasazení nejvyšší na kontrolním sklu a vzorku FA. Zároveň počáteční adheze buněk na vzorku s TCP byla v porovnání s kontrolním

sklem vyšší. Všechny buňky vykazovaly vysokou životaschopnost. Adheze lidských osteoblastů je obvykle rozdělena do několika kroků, které předcházejí proliferaci. Počáteční fáze začíná v momentě, kdy jsou buňky nasazeny na biomateriál *in vitro* nebo když přijdou do styku s implantátem *in vivo* a na povrch materiálu jsou adsorbovány specifické proteiny (fibronectin, vitronektin) ze séra kultivačního média či z tělních tekutin. Poté dochází ke kontaktu buněk s materiálem přes naadsorbované proteiny, ve stejném momentě dochází k expresi cytoskeletálních proteinů (talin, vinkulin) a integrinových receptorů. V třetí fázi dochází ke shlukování integrinových receptorů na membráně, reorganizaci cytoskeletu a aktivnímu rozprostření buněk na povrchu materiálu. Obecně platí, že kvalitní adheze určuje další chování buněk. Proto hodnocení adheze hraje důležitou roli v určování biokompatibility studovaného materiálu (Anselme *et al.* 2010). Několik dalších studií prokázalo, že modifikace různých umělých materiálů pomocí HA/FA/TCP zlepšuje růst buněk. Například lidské osteoblasty kultivované na kompozitu HA/polyethylen vykazovaly vysokou proliferaci a diferenciaci a rychlou organizaci svého cytoskeletu (Di Silvio *et al.* 2002). Stejně tak i ve studii Huang *et al.* (1997) pozorovali vyšší adhezi a následnou proliferaci buněk na HA/polyethylen kompozitu než na čistém polyethylen. Podobně také adherovaly osteoblasty linie OSTEO-1 na HA potažený materiál ze slitiny Ti-6Al-7Nb. Kromě adheze vykazovaly osteoblasty vynikající růst, proliferaci a viabilitu během celého testovacího období (Lavos-Valereto *et al.* 2001). Pozitivní vliv HA částic na adhezi a růst buněk lze vysvětlit především tím, že HA částice mění topografii povrchu materiálu. Dochází tak ke zlepšení adsorpce adhezích proteinů ze séra kultivačního média na materiál, což upevňuje adhezi buněk (Gloria *et al.* 2013). V této práci, sedmý den po nasazení byla nejvyšší hustota Saos-2 pozorována na kontrolním skle a na vzorku FA. Viabilita buněk značně poklesla a to zejména na materiálu HA. Podobně tomu bylo tak i u buněk rostoucích na materiálu TCP, kde byla zaznamenána extrémně nízká hustota buněk a nízké procento živých buněk v porovnání s kontrolním sklem. Tato skutečnost lze vysvětlit možnou cytotoxicitou hydroxyapatitu. Biokompatibilita či cytotoxicita HA částic závisí na jejich krystalinitě a koncentraci. Ve studii Qinga *et al.* (2012) bylo zjištěno, že koncentrace HA nanočástic v rozsahu 100 až 500 µg/ml snížila růst a životaschopnost buněk linie MG-63. Buňky rostoucí na materiálu s koncentrací částic 100 µg/ml obsahovaly nanočástice HA ve svých lysozomech a koncentrace částic 250 µg/ml a vyšší vyvolávaly u buněk apoptózu (Qing *et al.* 2012). Cytotoxicita HA částic může být zapříčiněna relativně vysokým

uvolňováním  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, o nichž je známo, že mají negativní účinek na osteoblasty *in vitro* (Hoppe *et al.* 2011). Naopak přidáním fluoru do HA se stabilizuje nanášený povlak a nedochází k jeho uvolňování do okolního prostředí. Vliv fluorapatitu na osteoblasty zkoumali také Liu *et al.* (2010), kteří zaznamenali vysokou iniciální adhezi osteoblastů linie MG-63 zejména na materiálu s uspořádanými částicemi FA. Oba materiály s uspořádanými i neuspořádanými částicemi FA však vykazovaly vysokou biokompatibilitu. Analýza buněk průtokovou cytometrií ukázala téměř 0 % buněčnou apoptózu na obou površích (Liu *et al.* 2010). Podobně tomu bylo tak i u primárních lidských osteoblastů rostoucích na materiálu s nástřikem FA a HA. Po 24 hod nebyly mezi buňkami žádné statistické rozdíly, nicméně po 7 dnech kultivace vykazovaly osteoblasty vyšší proliferaci zejména na 40 % FA materiálu oproti 100 % HA (Bhadang *et al.* 2010).

V dalších pokusech byl hodnocen vliv vzorků FA, HA a TCP na osteogenní diferenciaci buněk Saos-2. Opět byly imunofluorescenčně hodnoceny vybrané markery tj. kolagen I, ALP, osteopontin a osteokalcin 7. den po nasazení. Po obarvení buněk rostoucích na materiálu TCP a kontrolním skle byl pozorován imunofluorescenční signál na markery ALP, osteopontin a osteokalcin pouze v buňkách na skle. Na vzorku TCP nebyl detekován žádný pozitivní signál na buňky, fluorescenčně byl obarven pouze materiál samotný. Vzorek TCP sice podporuje iniciální adhezi buněk, ale od 3. dne inhibuje jejich proliferaci a jeví se pro lidské osteoblasty jako toxický. Z imunofluorescenčního barvení lze vidět vysokou produkci proteinu ALP a osteopontinu v buňkách rostoucích na materiálu FA v porovnání s kontrolním sklem. Naopak lepší rozprostření jednotlivých buněk Saos-2 bylo na skle. Na materiálu s HA nástřikem nebyly buňky po nabarvení nalezeny. Lze tedy říci, že kontrolní sklo podporuje zejména adhezi a růst osteoblastů linie Saos-2, zatímco materiál s FA nástřikem podporuje spíše jejich následnou osteogenní diferenciaci. Naopak tomu bylo u buněk MG-63, kde byla exprese osteokalcinu v porovnání se sklem stejná anebo dokonce nižší. Buňky si na materiálu s fluorohydroxyapatitem sice zachovaly životní funkce, ale jejich schopnost se diferencovat byla omezená (Montanaro *et al.* 2002). Někteří autoři se domnívají, že nižší exprese osteokalcinu může souviset s nízkou hladinou extra-hepatického vitamínu K v médiu (Price *et al.* 1997). Podobné výsledky jako v této práci byly zaznamenány i ve studii Bhadanga *et al.* (2010). Nejvyšší koncentrace osteokalcinu produkovaly osteoblasty rostoucí na vzorku FA v porovnání s HA vzorkem

či kontrolou, kterou zde představoval dentin (Bhadang *et al.* 2010). Vyšší exprese zejména osteokalcinu je velice žádoucí. Osteokalcin hraje důležitou roli v procesu mineralizace kostní tkáně, což napomáhá osteointegraci implantátu (Liu *et al.* 1994). Některé předchozí studie ukázaly, že FA povlaky s vhodnou koncentrací fluoridových iontů umožňují rychlejší osteointegraci materiálu do kosti než materiály s čistým HA (Kim *et al.* 2004). Vysoká exprese osteokalcinu byla také v buňkách MG-63 rostoucích na kovovém materiálu modifikovaném FA v porovnání s hladkou kontrolou. I přesto, že po 3 dnech kultivace byl počet buněk vyšší na hladkém povrchu. Nicméně iniciální adheze většího počtu buněk nemusí nutně vést k rychlejší a kvalitnější osteogenní diferenciaci buněk (Liu *et al.* 2010). K podobnému závěru lze dojít i z výsledků z této diplomové práce, kdy počet buněk první, třetí i sedmý den byl nejvyšší na kontrolním skle. Ale naopak materiál s nástřikem FA podporuje lepší osteogenní diferenciaci osteoblastů Saos-2, což je zde vyjádřeno zejména imunofluorescenčním barvením osteogenních markerů ALP a osteopontinu.

## 11. Závěr

V této práci byla hodnocena biokompatibilita materiálů se dvěma různými úpravami povrchu. První z nich byla modifikace povrchu pomocí Ti-6Al-4V nanotubů připravené anodickou oxidací v přítomnosti elektrolytů obsahujících fluoridové ionty při 10V, 20V a 30V. Druhým materiálem byly 3 typy vzorků ze slitiny Ti-6Al-4V pokryté plazmovým nástřikem hydroxyapatitu (HA), fluorapatitu (FA) a trikalciumfosfátu (TCP). Všechny vzorky byly hodnoceny *in vitro* s lidskými osteoblasty linie Saos-2. Na základě provedených experimentů lze říci, že iniciální adheze a proliferace buněk byla na nanotubových vzorcích podobná bez ohledu na průměr a velikost nanotub během celé sedmidenní kultivace. Rozdíly se projevíly při imunofluorescenčním barvení markerů buněčné adheze a diferenciaci. V buňkách rostoucích na vzorku 30V byla vysoká koncentrace fokálních adhezních proteinů talinu a vinkulinu, na druhé straně vzorky 10V a 20V spíše podporují osteogenní diferenciaci buněk. To se projevilo zvýšenou koncentrací časných či pozdních markerů tj. kolagenu I, ALP a osteokalcinu v porovnání se vzorkem 30V či hladkým Ti\_C bez nanotub. Podobně byla hodnocena i biokompatibilita vzorků s nástřikem HA, FA a TCP. Iniciální adheze osteoblastů Saos-2 zde byla nejvyšší na kontrolním skle a vzorku FA a zároveň počáteční adheze buněk na TCP byla vyšší než na skle. V průběhu sedmidenní kultivace se ale počet buněk snížil a jejich životaschopnost značně poklesla. Sedmý den byla nejvyšší hustota buněk na kontrolním skle a FA, nízká hustota a viabilita buněk byla na materiálu HA a TCP v porovnání s kontrolou. Imunofluorescenční barvení ukázalo vyšší produkci proteinu ALP a osteopontinu v buňkách rostoucích na FA v porovnání s kontrolním sklem. Byl to také jediný materiál s nástřikem, kde byl po obarvení detekován nějaký pozitivní signál na buňky. Vzorky TCP a HA sice podporují iniciální adhezi buněk, nicméně od 3. dne inhibují jejich proliferaci a jeví se pro lidské osteoblasty jako toxické. Lze tedy říci, že kontrolní sklo podporuje zejména adhezi a růst buněk, zatímco materiál s FA nástřikem podporuje spíše jejich následnou osteogenní diferenciaci. Na základě jednotlivých výsledků lze usoudit, že Ti-6Al-4V nanotuby jsou slibnější modifikací než HA nástřiky, nicméně obě povrchové úpravy je nutno dále vyvíjet a testovat jejich biokompatibilitu pro potenciální využití v klinické praxi.

## 12. Seznam literatury

- Aninwene GE, Yao C, Webster TJ. Enhanced osteoblast adhesion to drug-coated anodized nanotubular titanium surfaces. *Int J Nanomedicine*. 2008; 3:s 257.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000;21:s 667-681.
- Anselme K, Ploux L, Ponche A. Cell/material interfaces: influence of surface chemistry and surface topography on cell adhesion. *J Adhes Sci Technol*. 2010;24:s 831-52.
- 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*. 2001a;54:s 567-578.
- Bačáková L, Filová E, Rypáček F, Švorčík V, Starý V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research*, 2004;53:s 35-45.
- Bačáková 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.
- Baltag I, Watanabe K, Kusakari H, Taguchi N, Miyakawa O, Kobayoshi M, Ito N. Long-Term Changes of Hydroxyapatite-Coated Dental Implants. *J Biomed Mater Res*. 2000;53:s 76-85.
- Bhadang KA, Holding CA, Thissen H, McLean KM, Forsythe JS, Haynes DR. Biological responses of human osteoblasts and osteoclasts to flame-sprayed coatings of hydroxyapatite and fluorapatite blends. *Biomaterials*. 2010;6:s 1575-1583.
- Bjursten LM, Rasmusson L, Oh S, Smith GC, Brammer KS, Jin S. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *J. Biomed. Mater. Res*. 2010;92A:s 1218.

- Bohner M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Mater. Today*. 2010;13:s 24-30.
- Brammer KS, Frandsen CJ, Jin S. TiO<sub>2</sub> nanotubes for bone regeneration. *Trends Biotechnol.* 2012;30:s 315.
- Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, van der Heyde H, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface. *Acta Biomaterialia*. 2009;5:s 3215-3223.
- Bränemark PI. Osseointegration and its experimental background. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1983;3:s 399-410.
- Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. Titanium in medicine. *Springer*. 2001; s 232.
- Callister WD: Materials Science and Engineering: An Introduction. *5th Ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.* 2000; s 871.
- Crubezy E, Murail P, Girald L, Bernadou JP. False teeth of the Roman world. *Nature*. 1998;391:s 29.
- Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009;90:s 225-237.
- Detsch R, Mayr H, Ziegler G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomaterialia*. 2008;4:s 139-148.
- Dhert WJ, Klein CP, Wolke JGC, van der Velde EA, de Groot K, Rozing PM. A mechanical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. *J. Biomed. Mater. Res.* 1991;25:s 1183-2000.

- Di Silvio L, Dalby MJ, Bonfield W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. *Biomaterials*. 2002;23:s 101-107.
- Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol*. 2010;28:s 198–206.
- Dos Santos E, Farina M, Soares G, Anselme K. Surface energy of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2008;19:s 2307–2316.
- Dubious JC, Souchier C, Couble ML, Exbrayat P, Lissac M. An image analysis method for the study of cell adhesion to biomaterials. *Biomaterials*. 1999;20:s 1841-1849.
- Faix J, Rottner K. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:s 18–25.
- Filová E, Suchý T, Sucharda Z, Šupová M, Žaloudková M, Balík K, Lisá V, Šlouf M, Bačáková L. Support for the initial attachment, growth and differentiation of MG-63 cells: a comparison between nano-size hydroxyapatite and micro-size hydroxyapatite in composites. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9: s 1-20.
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1977;59:s 221–226.
- Franchi M, Fini M, Giavaresi G, Ottani V. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*. 2005;36:s 630-644.
- Fratzl P, Weinkamer R. Nature's Hierarchical Materials. *Prog Mater Sci*. 2007;52: s 1263–1334.



- Gallinetti S, Canal C, Ginebra MP, Ferreira J. Development and Characterization of Biphasic Hydroxyapatite/ $\beta$ -TCP Cements. *J Am Ceram Soc.* 2014;97:s 1065-1073.
- Garcia AJ, Vega MD, Boettiger D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol Biol Cell.* 1999;10:s 785-798.
- Geetha M, Singhb AK, Asokamani R, Gogiac AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science.* 2009;54:s 397–425.
- Gloria A, Russo T, D'Amora U, et al. Magnetic poly( $\epsilon$ -caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposite substrates for advanced bone tissue engineering. *J R Soc Interface.* 2013;10:s 2012.
- Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry.* 2004;329:s 77–84.
- Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, Nagase M, Goldring SR. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1996;31:s 19-26.
- Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays.* 2007;29:s 1001–1010.
- Hench LL. Bioceramic: from Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 1991;74:s 1487–1510.

- Hench LL, Polak JM: Third-generation biomedical materials. *Science*, 2002; 295:s 1014-1017.
- Herndon ME, Stipp CS, Lander AD. Interactions of neural glycosaminoglycans and proteoglycans with protein ligands: assessment of selectivity, heterogeneity and the participation of core proteins in binding. *Glycobiology*. 1999;9:s 143-155.
- Hoppe A, Gldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32:s 2757–2774.
- Hu K, Ji L, Applegate KT, Danuser G, Waterman-Stirer CM. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science*. 2007;315:s 111-115.
- Huang S, Chen CS, Ingber DE. Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell*. 1998;9:s 3179-3193.
- Huang J, Di Silvio L, Wang M, Tanner KE, Bonfield W. In vitro mechanical and biological assessment of hydroxyapatite-reinforced polyethylene composite. *J Mater Sci Mater Med*. 199;8:s 775-779.
- Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*. 1999;9:s 33-37.
- Ignjatovic NL, Ajdukovic ZR, Savic VP, Uskokovic DP. Size effect of calcium phosphate coated with poly-DL-lactide-co-glycolide on healing processes in bone reconstruction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94:s 108–117.
- Ireland GW, Doping-Hepenstal P, Jordan J, O'Neil C. Effect of patterned surfaces of adhesive islands on the shape, cytoskeleton, 61 adhesion and behaviour of Swiss mouse 3T3 fibroblasts. *J.Cell Sci*. 1987;8:s 19-33.

- Janssen ME, Kim E, Liu H, Fujimoto LM, Bobkov A, Volkmann N, Hanein D. Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Mol Cell*. 2006;21:s 271-281.
- Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical Oral Implants Research*. 2007;18:s 752-760.
- John A, Varma HK, Kumari TV. Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system. *Journal of Biomaterials Applications*. 2003;18:s 63-78.
- Kane R, Ma PX. Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. *Mater Today*. 2013;16:s 418-423.
- Kilpadi KL, Chang P, Bellis SL. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res*. 2001;57:s 258-267.
- Kim HW, Kim HE, Knowles JC. Fluor-hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissue implants. *Biomaterials*. 2004;25:s 3351.
- Kinoshita Y, Kuzuhara T, Kirigakubo M, Kobayashi M, Shimura K, Ikada Y. Reduction in tumour formation on porous polyethylene by collagen immobilization. *Biomaterials*. 1993;14:s 546-550.
- Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Wood SR, Smith DA, Zhang J, Chen H, Robinson C. Physico-chemical properties of crystal surfaces in matrix-mineral interactions during mammalian biomineralisation. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2002;7:s 124-132.
- Kumar R, Münstedt H. Polyamide/silver antimicrobials: effect of crystallinity on the silver ion release. *Polymer International*. 2005;54:s 1180.

- Lai KA, Shen WJ, Chen CS, Yang CY, Hu WP, Chang GL. Failure of hydroxyapatite-coated acetabular cups: ten-year follow-up of 85 Landos Atoll arthroplasties. *J. Bone Joint Surg.* 2002;84B:s 641-646.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260:s 920-926.
- Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Nardin M, Frayssinet P, Nedelec J-M, Laurent-maquin D. Influence des proprietes physicochimiques d'hydroxyapatites sur le comportement cellulaire. *ITBM-RBM.* 2005;26:s 200-205.
- Lavos-Valereto IC, Wolyneq S, Deboni MCZ, Kónig BJr. In Vitro and In Vivo Biocompatibility Testing of Ti-6Al-7Nb Alloy with and without Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coating. *J Biomed Mater Res.* 2001;58:s 727-733.
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* 2007;130:s 456-69.
- Liang L, Rulis P, Ching WY. Mechanical properties, electronic structure and bonding of alpha- and beta-tricalcium phosphates with surface characterization. *Acta Biomaterialia.* 2010;6:s 3763.
- Liggett WH Jr, Lian JB, Greenberger JS, Glowacki J. Osteocalcin promotes differentiation of osteoclast progenitors from murine long-term bone marrow cultures. *J Cell Biochem.* 1994;55:s 190-199.
- Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol.* 1994;166:s 220-234.

- Liu J, Jin T, Chang S, Czajka-Jakubowska A, Zhang Z, Nör JE, Clarkson BH. The Effect of Novel Fluorapatite Surfaces on Osteoblast-Like Cell Adhesion, Growth, and Mineralization. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:s 2977-2986.
- Liu X, Chu PK, Ding C: Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2004;47:s 49-121.
- Lv L, Liu Y, Zhang P, Zhang X, Liu J, Chen T, Su P, Li H, Zhou Y. The nanoscale geometry of TiO<sub>2</sub> nanotubes influences the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by modulating H3K4 trimethylation. *Biomaterials*. 2015;39:s 193-205.
- Matějka R. ALICE: Fluorescent Image Analyser (ver 1.0); software k dispozici na: <http://alice.fbmi.cvut.cz>
- Maquart FX, Siméon A, Pasco S, Monboisse JC. Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines. *J Soc Biol* 1999;193:s 423-428
- Maxian SH, Zawadsky JP, Dunn MG. Abstract Mechanical and histological evaluation of amorphous calcium phosphate and poorly crystallized hydroxyapatite coatings on titanium implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993;27:s 717-728.
- Mierke CT. The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells. *Cell Biochem Biophys*. 2009;53:s115-126.
- Montanaro L, Arciola CR, Campoccia D, Cervellati M. In vitro effects on MG63 osteoblast-like cells following contact with two roughness-differing fluorohydroxyapatite-coated titanium alloys. *Biomaterials*. 2002;23:s 3651-3659.
- Müller F, Müller L, Caillard D, Conforto E. Preferred growth orientation of biomimetic apatite crystals. *Journal of Crystal Growth*. 2007;304:s 464-471.

- Myllyhajru J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 2004;20:s 33–43.
- Nakahira A, Eguchi K. Evaluation of microstructure and some properties of hydroxyapatite/Ti composites. *J Ceram Process Res.* 2001;2:s 108–112.
- Nakayama T, Tanaka T, Tsumoto Y, Katayam, H, Katto M. High-quality hydroxyapatite coating on biocompatible materials by laser-assisted laser ablation method. *Appl. Phys.* 2004;79:s 833-836.
- Narayanan R., Seshadri S. K., Kwon T. Y., Kim K. H.: Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *J. Biomed. Mater. Res.* 2008;85B:s 279.
- Nesbitt S, Nesbit A, Helfrich M, Horton M. Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha 2v \beta 1$  and  $\alpha v \beta 1$  integrins. *J Biol Chem.* 1993;268:s 16737-16745.
- Oh S, Daraio C, Chen LH, Pisanic TR, Fiñones RR, Jin S: Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006;78A:s 97-103.
- Oh S, Brammer KS, Li YS, Teng D, Engler AJ, Chien S, Jin S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:s 2130-2135.
- Oh S, Tobin E, Yang Y, Carnes DLJr., Ong JL. In vivo evaluation of hydroxyapatite coating of different crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20: s 726-31.
- Overgaard S, Bromose U, Lind M, Büniger C, Søballe K. The influence of crystallinity of the hydroxyapatite coating on the fixation of implants. *J Bone Joint Surg.* 1999;81B:s 725-31

- Park JB, Kim YK: Metallic Biomaterials. In *The Biomedical Engineering Handbook*, 2nd ed.; Bronzino JD, Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, USA, 2000.
- Park J, Bauer S, von der Mark K, Schmuki P. Nanosize and vitality: TiO<sub>2</sub> nanotube diameter directs cell fate. *Nano Lett.* 2007;7:s 1686-91.
- Park J, Bauer S, Schlegel KA, Neukam FW, von der Mark K, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces: 15 nm- an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation. *Small.* 2009;5:s 666-671.
- Peng Z, Ni J, Zheng K, Shen Y, Wang X, He G, Jin S, Tang T. Dual effects and mechanism of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:s 3093-105.
- Persikov AV, Ramshaw JA, Kirkpatrick A, Brodsky B. Electrostatic interactions involving lysine make major contributions to collagen triple-helix stability. *Biochemistry.* 2005;44:s 1414–1422.
- Piccirillo C, Pullar RC, Costa E, Santos-Silva A, E Pintado MM, L Castro PM. Hydroxyapatite-based materials of marine origin: A bioactivity and sintering study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;51:s 309-315.
- Pietschmann P, Resch H, Krexner E, Woloszczuk W, Willvonseder R. Decreased serum osteocalcin levels in patients with postmenopausal osteoporosis. *Acta Med Austriaca.* 1991;18:s 114-116.
- Plecko M, Sievert C, Andermatt D, Frigg R, Kronen P, Klein K, Stubinger S, Nuss K, Burki A, Ferguson S, Stockle U, von Rechenberh B. Osseointegration and biocompatibility of different metal implants--a comparative experimental investigation in sheep. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012;13:s 32.

- Price N, Bendall PS, Frondoza C, Jinnah RH, Hungerford DS. Human osteoblast-like cells (MG63) proliferate on a bioactive glass surface. *J Biomed Mater Res.* 1997; 37:s 394-400.
- Qing F, Wang Z, Hong Y, et al. Selective effects of hydroxyapatite nanoparticles on osteosarcoma cells and osteoblasts. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23:s 2245–2251.
- Ramay HRR, Zhang M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2004;25:s 5171–5180.
- Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2006;16:s 79–87.
- Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:s 4473-4475.
- Rey C, Miquel JL, Facchini L, Legrand AP, Glimcher MJ. Hydroxyl groups in bone minerals. *Bone.* 1995;16:583–586.
- Rho JY, Liisa KS, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics,* 1998;20:s 92–102.
- Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:s 2302-2309.
- Schneider GB, Zaharias R, Stanford C. Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. *J Den Res.* 2001;80:s 1540-1544.
- Shuai C, Li P, Liu J, Peng S. Optimization of TCP/HAP ratio for better properties of calcium phosphate scaffold via selective laser sintering. *Mater. Charact.* 2013;77:s 23–31.



- Schwartz Z Boyan BD. Underlying mechanisms of the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem.* 1994;56:s 340-347.
- Seydlová M, Teuberová Z., Dostálová T, Kříž P, Dvořánková B, Smetana K Jr., Jelínek M, Kocourek T. Influence of Hydroxyapatite Crystallinity on the Growth of Keratinocytes. *Prague Medical Report.* 2008;109:s 142–148.
- Sittig C, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Vallotton PH. Surface characterization of implant materials c.p. Ti, Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V with different pretreatments. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10: s 35-46.
- Sista S, Nouri A, Li Y, Wen C, Hodgson PD, Pande G. Cell biological responses of osteoblasts on anodized nanotubular surface of a titanium-zirconium alloy. *J Biomed Mater res Part A.* 2013;101A:s 3416-3430.
- Soderhall C, Marenholz I, Kerscher T, Ruschendorf F, Esparza-Gordillo J, Worm M, Gruber C, Mayr G, Albrecht M, Rohde K, et al. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol.* 2007;5:s 242.
- Solar P, Kylian O, Marek A, Vandrovčova M, Bacakova L, Hanus J, Vyskocil J, Slavinska D, Biederman H. Particles induced surface nanoroughness of titanium surface and its influence on adhesion of osteoblast-like MG-63 cells. *Applied Surface Science.* 2015;324:s 99–105.
- Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Materials Research.* 1998;13:s 94-117.
- Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J. Biomed. Mater. Res. Part B.* 2001;58:s 570-592.

- Thomas CH, McFarland CD, Jenkins ML, Rezania A, Steele JG, Healy KE. The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone derived cells on materials with patterned surface chemistry. *J Biomed Mater Res.* 1997;37:s 81-93.
- Tsuchiya H, Macak JM, Müller L, Kunze J, Müller F, Greil P, Virtanen S, Schmuki P. Hydroxyapatite growth on anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes. *J Biomed Mater Res A.* 2006;77:s 534-41.
- Vaccaro AR. The role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft. *Orthopedics.* 2002;25:s 571-578.
- Vallet-Regi M, Gonzalez-Calbet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog Solid State Chem.* 2004;32:s 1-31.
- Viswanath B, Ravishankar N. Porous biphasic scaffolds and coatings for biomedical applications via morphology transition of nanorods. *Nanotechnology.* 2007;18:s 475604.
- Wang K. The use of titanium for medical applications in the USA. *Mater. Sci. Eng,* 1996; A213:s 134-137.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Biziosi R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:s 475-483.
- Weiner S, Traub W. Bone structure: from angstroms to microns. *Faseb J.* 1992;6:s 879-885.
- Weiner S, Wagner HD. The material bone: structure mechanical function relations. *Annu rev Mater Sci.* 1998;28:s 271-98.

- Whyte MP. Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization. *Endocrine Reviews*. 1994;15:s 439-461.
- Whyte MP. Hypophosphatasia: Nature's window on alkaline phosphatase function in man. *Principles of Bone Biology*. 1996; Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. San Diego, CA, U.S.A: Academic Press. s: 951–68.
- Yeo M, Lee H, Kim GH. Three-Dimensional Hierarchical Composite Scaffolds Consisting of Polycaprolactone,  $\beta$ -Tricalcium Phosphate, and Collagen Nanofibers: Fabrication, Physical Properties, and In Vitro Cell Activity for Bone Tissue Regeneration. *Biomacromolecules*. 2011;12:s 502–510.
- Yu WQ, Jiang XQ, Zhang FQ, Xu L. The effect of anatase TiO<sub>2</sub> nanotube layers on MC3T3-E1 preosteoblast adhesion, proliferation, and differentiation. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94:s 1012-22.
- Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell– matrix adhesions. *J Cell Sci*. 2001;114:s 3583–3590.
- Zhao G, Raines A, Wieland M, Schwartz Z, Boyan B. Requirement for both micron- and submicron-scale structure for synergic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*. 2007;28:s 2821-2829.
- Zomorodian A, Garcia MP, Moura E Silva T, Fernandes JC, Fernandes MH, Montemor MF. Biofunctional composite coating architectures based on polycaprolactone and nanohydroxyapatite for controlled corrosion activity and enhanced biocompatibility of magnesium AZ31 alloy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;48:s 434-443.
- Zwilling V, Aucouturier M, Darque-Ceretti E. Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach. *Electrochimica Acta*. 1999;45:s 921-929.