

Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Martina Doubková

**Adheze, růst a diferenciacce kostních buněk na materiálech
vyvíjených pro kostní implantáty**

**Adhesion, growth and differentiation of osteoblast-like cells on
materials for bone implants**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc.

Praha 2017

Prohlášení

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

Povrchovou modifikaci slitiny Ti-6Al-4V ELI, dodané firmou Medin a.s., a měření vybraných chemických a fyzikálních parametrů vzorků této slitiny provedli zaměstnanci Laboratoře chemické a radioizotopové firmy VÚHŽ a.s. Proces modifikace vzorků není předmětem této práce a autorka se na něm nepodílela, proto jsou uvedeny pouze informace přímo relevantní kontextu práce.

V Praze, dne 14. 8. 2017

Bc. Martina Doubková

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé diplomové práce, paní Doc. MUDr. Lucii Bačákové, DrSc., a RNDr. Martě Vandrovcové, Ph.D. z oddělení Biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu Akademie věd České Republiky za laskavou pomoc, cenné rady, poskytnuté materiály, podporu a množství času stráveného konzultacemi této práce. Rovněž bych chtěla vyjádřit své díky panu Ing. Romanu Gaborovi, Ph.D. z VÚHŽ, a.s. a panu Ing. Jaroslavu Marvanovi z firmy MEDIN, a.s. za vývoj, výrobu, charakterizaci a poskytnutí vzorků, jež tvoří podklad této práce. Děkuji rovněž paní Ing. Nikole Slepíčkové Kasálkové, Ph.D. z Ústavu inženýrství pevných látek VŠCHT Praha za zapůjčení přístrojového vybavení a instruktáž provozu.

Za poskytnutí prostor k pokusům, materiálního vybavení a dobrých rad náleží můj dík též všem pracovníkům oddělení Biomateriálů a tkáňového inženýrství Fyziologického ústavu Akademie věd České Republiky v Praze 4 – Krči.

Projekt byl podporován Technologickou agenturou České Republiky (TAČR, grant č. TA04011214).

Abstrakt

Práce se zaměřuje na testování a vylepšování biomateriálů ze slitiny Ti-6Al-4V ELI, nejčastěji biomedicínsky používané slitiny titanu (především v ortopedii a stomatologii), a to ve spolupráci s vědeckými ústavami a společnostmi zabývajícími se jejich vývojem. Vzorčky Ti-6Al-4V ELI byly upravené metodou plazmatické elektrolytické oxidace (PEO) v elektrolytech různých složení pro vytvoření homogenní povrchové vrstvy TiO₂. Ke studiu interakce buněk s materiálem *in vitro* byly zvoleny buňky lidské buněčné linie osteoblastů Saos-2. Byla hodnocena iniciální adheze buněk, jejich rozprostření, morfologie, populační hustota, viabilita, depozice vápníku a exprese vybraných markerů osteogeneze, jako je kolagen typu I, alkalická fosfatáza a osteokalcin. Chování buněk je korelováno s fyzikálními a chemickými vlastnostmi povrchu vzorků, jako je např. topografie, drsnost, smáčivost a chemické složení povrchových vrstev. Výsledky jsou porovnávány s daty získanými na kontrolních nemodifikovaných vzorcích slitiny, a rovněž na standardních kultivačních materiálech, jako jsou dna kultivační polystyrénové jamky a mikroskopická krycí skla. Cílem práce je zhodnotit, který z prezentovaných modifikovaných vzorků se nejlépe hodí pro použití v dočasných ortopedických implantátech.

Klíčová slova: Ti-6Al-4V, kostní implantáty, inženýrství kostní tkáně, osteoblast, Saos-2, depozice vápníku, kolagen typu I, osteokalcin, alkalická fosfatáza.

Abstract

This thesis focuses on testing and improving Ti-6Al-4V ELI biomaterials, which are currently one of the most used titanium alloys in biomedicine (predominantly in orthopaedics and dentistry), in cooperation with research institutions and private companies developing and producing such materials. The metallic samples were previously modified by plasma electrolytic oxidation (PEO) with use of electrolytes of a different composition to induce development of a homogeneous TiO₂ layer on its surface. *In vitro* interactions of human osteoblast-like cell line Saos-2 with the surface of Ti-6Al-4V ELI alloy samples are investigated. Initial cell attachment, spreading, morphology, cell population density, viability, calcium deposition and expression of selected osteogenic markers, e.g. collagen type I, alkaline phosphatase and osteocalcin, were evaluated on cultured cells. The cells behavior were then correlated with physicochemical properties of the material surface, such as its topography, roughness, wettability, surface layer chemical composition *etc.* The results are also compared with those obtained in cells cultured on control samples of untreated alloys as well as microscopic glass coverslips and bottom of standard polystyrene cell culture wells. The aim of this thesis is to select the most promising modified material for use in temporary bone implants.

Keywords: Ti-6Al-4V, bone implants, bone tissue engineering, osteoblast, Saos-2, calcium deposition, collagen type I, osteocalcin, alkaline phosphatase.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
ÚVOD.....	10
LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
1. ZÁKLADNÍ ARCHITEKTURA, BUNĚČNÉ A CHEMICKÉ SLOŽENÍ KOSTNÍ TKÁŇ	12
2. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ A BIOMATERIÁLY	18
3. KOVY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ	23
4. BUNĚČNÉ MODELY A JEJICH VÝBĚR.....	26
5. VLASTNOSTI MATERIÁLU A BUNĚČNÉ INTERAKCE	28
5.1 ADHEZE A OSTEOINTEGRACE	28
5.2 SMÁČIVOST POVRCHU	30
5.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ A POVRCHOVÝ NÁBOJ	32
5.4 TOPOGRAFIE POVRCHU.....	33
6. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	35
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
7. MATERIÁLY	36
7.1 POUŽITÉ MATERIÁLY	36
7.2 PŘÍPRAVA MATERIÁLŮ, JEJICH KONEČNÁ ÚPRAVA A CHARAKTERIZACE	39
8. METODY	41
8.1 MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU KAPALIN NA VZORCÍCH A STANOVENÍ POVRCHOVÉ ENERGIE	41
8.2 PŘÍPRAVA A STERILIZACE VZORKŮ PRO TKÁŇOVÉ KULTURY.....	42
8.3 POUŽITÝ BUNĚČNÝ MODEL	43
8.4 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	44
8.5 HODNOCENÍ ADHEZE A PROLIFERACE	45
8.5.1 Vizualizace buněk fluorescenčním barvením	45
8.5.2 Hodnocení populační hustoty buněk.....	45
8.5.3 Viabilita buněk a cytotoxicita	46
8.5.4 Plocha rozprostření a morfologie buněk.....	47
8.6 HODNOCENÍ DIFERENCIACE	47
8.6.1 Imunofluorescenční barvení buněčné produkce kolagenu typu I.....	47
8.6.2 Stanovení genové exprese markerů osteogenní diferenciaci pomocí qPCR.....	49
8.6.3 Hodnocení depozice vápníku	50
8.7 STATISTICKÁ ANALÝZA	52
9. VÝSLEDKY	53
9.1 I. SADA VZORKŮ	53
9.2 II. SADA VZORKŮ	56
9.3 III. SADA VZORKŮ	60
9.4 IV. SADA VZORKŮ	66
9.5 V. SADA VZORKŮ	72
9.6 SPOLEČNÉ POKUSY.....	78
10. DISKUSE	83
ZÁVĚR	89
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91
SEZNAM PŘÍLOH	100

Seznam použitých zkratk

AFM	Mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy)
ALP, bALP	Kostní alkalická fosfatáza (bone alkaline phosphatase)
ANOVA	Analýza rozptylu (analysis of variance)
BMP	Kostní morfogenetické proteiny (bone morphogenetic proteins)
BMU	Kostní multiceulární jednotka (bone multicellular unit)
CaP	Kalcium fosfát (calcium phosphate)
Col I	Kolagen typu I (type I collagen)
CP-Ti	Komerčně vyráběný čistý titan (commercially produced pure titanium)
Ctrl	Kontrolní vzorek (control sample)
DLC	Uhlík podobný diamantu (diamond-like carbon)
ECM	Extracelulární matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
FBS	Fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
HA	Hydroxyapatit (hydroxyapatite)
HOb	Primární lidské osteoblasty (primary human osteoblasts)
IGF	Růstový faktor podobný inzulinu (insulin-like growth factor)
IL-1, IL-6	Interleukiny 1 a 6 (interleukins 1 and 6)
KRSR	Lys-Arg-Ser-Arg
MAO	Mikrooblouková anodická oxidace (micro-arc „spark“ anodization) = PEO
MC3T3-E1	Myší buněčná linie preosteoblastů (murine preosteoblast cell line)
M-CSF	Faktor stimulující kolonie makrofágů ,macrophage colony-stimulating factor)
MG-63	Lidská buněčná linie osteoblastů z osteosarkomu (human osteoblastic osteosarcoma cell line)
MMP	Matrixová metaloproteináza (matrix metalloproteinase)
OC	Osteokalcin (osteocalcin)
OPG	Osteoprotegerin (osteoprotegerin)
PBS	Fyziologický roztok pufovaný fosfáty (phosphate-buffered saline)
PCL	poly-ε-kaprolakton (poly-ε-caprolactone)
PDGF	Růstový faktor trombocytů (platelet-derived growth factor)
PEO	Plazmatická elektrolytická oxidace (plasma electrolytic oxidation) = MAO

PGA	Kyselina polyglykolová (polyglycolic acid)
PLA	Kyselina polymléčná (polylactid acid)
PMMA	Polymethylmethakrylát (polymethylemethacrylate)
PS	Polystyren (polystyrene)
R _a	Průměrná aritmetická odchylka drsnosti povrchu (roughness average)
RANKL	Ligand receptorem aktivovaného jaderného faktoru κB (receptor-activator of NFκB ligand)
RDG	Arg-Gly-Asp
REM	Rastrovací elektronový mikroskop (Scanning Electron Microscope)
R _z	Největší výška profilu povrchu (mean roughness depth)
S.E.M.	Střední chyba průměru (standard error of mean)
Saos-2	Lidská buněčná linie osteoblastů z osteosarkomu (human osteoblastic osteosarcoma cell line; human osteoblast-like cell line)
SD	Směrodatná odchylka (standard deviation)
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop (Scanning Electron Microscope)
TCP	Trikalciumfosfát (tricalcium phosphate)
TGF-β	Transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
Ti	Titan (titan)
Ti-6Al-4V	Slitina titanu, hliníku a vanadu (titanium aluminium vanadium alloy)
TiO ₂	Oxid titaničitý (titanium dioxide)
TNF	Faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
U-2 OS	Lidská buněčná linie z osteosarkomu (human osteosarcoma cell line)

ÚVOD

Kostní tkáň je specializovaným typem mineralizované pojivové tkáně, utvářející ve spolupráci se svaly a klouby opěrný a lokomoční aparát obratlovců. Díky své struktuře a složení vykazuje vysokou mechanickou odolnost (tvrdost, pružnost a pevnost) v tahu, tlaku i ohybu. Poskytuje ochranu vnitřním orgánům. Významně se podílí na udržování kalcium-fosfátové homeostázy a acidobazické rovnováhy organismu (Clarke 2008). Je tvořena několika typy specializovaných buněk, jejichž společná aktivita propůjčuje kostní tkáni vlastnosti mechanosensorické, mechanotrandukční (Tan *et al.* 2007; Safadi *et al.* 2009; Temiyasathit *et Jacobs* 2010), značné schopnosti regenerační a – díky její vysoké metabolické aktivitě – také regulační ve smyslu vlastní morfologické adaptability na zátěž.

Kvalita kostní hmoty závisí na přirozené schopnosti její obnovy a správné mineralizaci. Roli hrají genetické predispozice (Podock *et al.* 1987) či mutace specifických genů (např. Pagetova choroba, Osteogenesis imperfecta, osteopetróza; Khurana *et Fitzpatrick* 2009), výživa, intenzita, frekvence, typ fyzické aktivity (Turner 2004; Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.* 2006b) a současně celá řada faktorů hormonálních (Safadi *et al.* 2009) spojených jak s poruchami metabolismu tkáně, tak s fyziologickým procesem stárnutí. Patologie mohou být též způsobeny následkem úrazů či v důsledku dlouhodobého přetěžování.

Ve zdravé tkáni jsou procesy resorpce a syntézy udržovány v rovnováze, při jejímž vychýlení dochází k defektům a vzniku onemocnění, charakterizovaných změnami mechanických vlastností kostí. Úbytek kostní hmoty je spojený se zvýšeným rizikem fraktur. Nejčastěji se vyskytujícím onemocněním tohoto typu je osteoporóza, k jejímuž vzniku přispívá snížená produkce pohlavních hormonů ve stáří – estrogeneru u žen, testosteronu u mužů (Michael *et al.* 2005). Opačnou situací je vzácný stav, a sice osteopetróza, kdy vlivem vrozené poruchy dochází k narušení přirozeného odbourávání kostní hmoty. Toto sice vede k celkovému zvýšení objemu kostní hmoty i její hustoty, ale ta je křehká v důsledku přílišné mineralizace (Khurana *et Fitzpatrick* 2009).

Dalšími častými onemocněními jsou choroby různé etiologie postihující klouby – arthropatie. V tomto ohledu je nejběžnější diagnózou pokročilého věku osteoartrtida. Toto degenerativní onemocnění chrupavky ve svém důsledku nepřírozeně zatěžuje okolní tkáň (kost, vazivo, svaly). Projevuje se bolestí provázející pohyb, krepitem a počáteční

ztuhlostí kloubu po delší inaktivitě. V pozdějších fázích se přidávají nárůsty osteofytů (výrůstků periostu) omezující pohyb kloubů a atrofie svalů z nedostatku stimulace (Reinus *et al.* 2009). V případě postižení velkých kloubů může být operace jediným způsobem, jak zachovat či obnovit mobilitu pacienta.

Omezení mobility v důsledku postižení pohybového aparátu, stejně jako následky úrazů při sportu či po nehodách a v neposlední řadě též nevhodného životního stylu, představují závažný zdravotní a sociální problém nemalé části populace s přímým dopadem na kvalitu života. Moderní medicína umožňuje tyto následky v uspokojivé míře mírnit či odstraňovat cílenou léčbou, rehabilitací i operativně, např. použitím implantátu, jakým je totální endoprotéza kyčelního kloubu. Jistá omezení, vázající se k vlastnostem samotného implantátu a jeho ukotvení v kosti, však zůstávají.

Vývojem, vylepšováním a testováním materiálů vhodných ke konstrukci implantátů – kostních, kloubních a zubních náhrad, vnitřních dlah, fixází, hřebů, ale také náhrad měkkých tkání, tj. srdečních chlopní, cév, vývodů různých orgánů, nitroočních čoček, kožních krytů pro léčbu rozsáhlých popálenin a dekubitů nebo systémů pro řízenou dodávku léčiv – se zabývá multioborová disciplína tkáňové inženýrství.

Tato práce se zaměřuje na implantáty určené pro kostní tkáň – používané materiály, metody jejich modifikace a jejich interakci s buňkami, především z hlediska adheze, proliferace a osteogenní diferenciaci *in vitro*.

Literární přehled

1. ZÁKLADNÍ ARCHITEKTURA, BUNĚČNÉ A CHEMICKÉ SLOŽENÍ KOSTNÍ TKÁNĚ

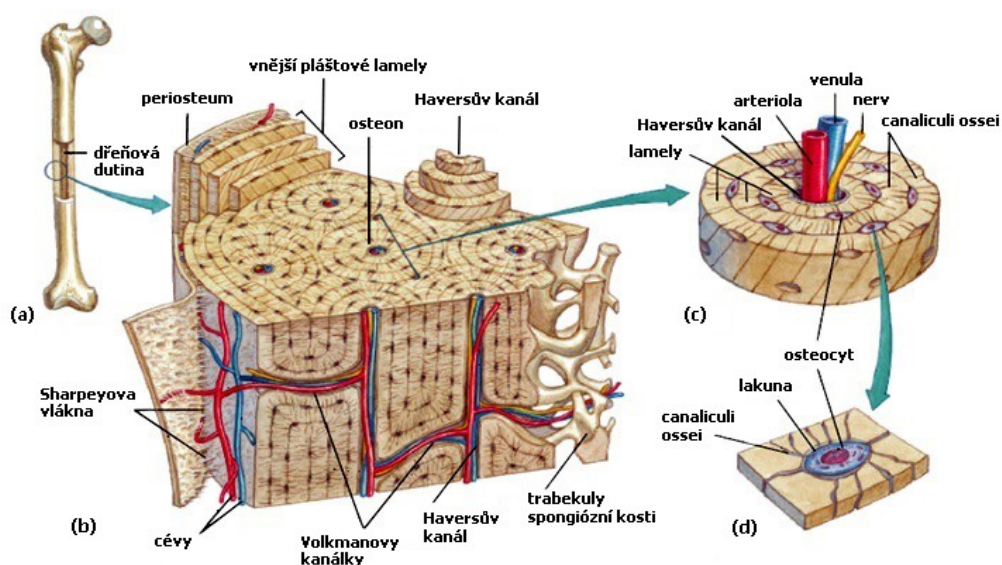
Osteogeneze začíná během embryonálního vývoje a pokračuje postnatálně postupnou přeměnou nezralé, málo mineralizované, primární formy kostní tkáně z plst'ovité na lamelární cestou intramembranózní či enchondrální osifikace. Při intramembranózní osifikaci dochází k přímé diferenciaci mezenchymálních osteoprogenitorových buněk na osteoblasty. Tímto způsobem osifikují ploché kosti lebky a obličej. K enchondrální osifikaci dochází např. u pánve a dlouhých kostí končetin, které získávají svoji podobu nejprve jako chrupavka. Ta je následně vaskularizována, chondrocyty podstupují apoptózu a na jejich místo vcestovávají osteoblasty nově diferencované z osteoprogenitorových buněk (Safadi *et al.* 2009).

Tělo dospělého člověka obsahuje už téměř výhradně sekundární, zralou formu kostní tkáně – kost lamelární. Výjimku tvoří zubní alveoly, kostní výčnělky (*tuberositas ossium*), ploché švy lebky a stěna nitroušního labyrintu, kde přetrvává kost plst'ovitá. Mimo tato specifická místa se objevuje pouze při procesu hojení zlomeniny (Mescher 2010), kdekoli jinde je její výskyt považován za patologický (Qin 2013). Lamelární kostní tkáň dospělého organismu dělíme podle makroskopických odlišností na kompaktní (80 %) a spongiózní (zbylých 20 %). Na rozdíl od spongiózy, vytvářející prostorovou síť destiček, trámců (trabekul) a ostnů (spikul) s mezerami vyplněnými kostní dřeví, vykazuje kompakta větší densitu i pevnost. Oba typy kostní tkáně sdílejí obdobnou vnitřní strukturu (tj. uspořádání do lamel, viz níže) a buněčné složení.

Hlavní komponentou určující fyzikální vlastnosti tkáně je její extracelulární matrix (ECM), obsahující v případě kosti více jak z poloviny anorganické látky zastoupené především krystalickým hydroxyapatitem (HA), amorfním kalciumfosfátem (CaPO_4) a jinými vápenatými solemi (uhličitan vápenatý, fluorid vápenatý *etc.*). Převážnou část (až 90%) organické složky ECM představuje kolagen typu I. Dále jsou přítomny především glykosaminoglykany (hyaluronan, chondroitin sulfát), proteoglykany (dekorin, biglykan), glykoproteiny (kostní alkalická fosfatáza, osteonektin, osteokalcin, kostní sialoprotein, fibronectin, vitronektin) a regulační faktory (TNF, TGF- β , IGF, PDGF,

BMP, IL-1, IL-6), nezbytné pro vývoj a mineralizaci kostí (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.* 2006a).

Složky kostní tkáně jsou organizovány ve vrstvách ECM do lamel. Lamely v kompaktě jsou obvykle cylindrické. Probíhají soustředně kolem centrálního kanálu s cévami a nervy a tvoří tzv. osteony, neboli Haversovy systémy. Ty jsou mezi sebou propojeny bočně Volkmannovými kanálky, které umožňují spojení centrálního kanálu s jinými osteony uvnitř kosti, periostem na jedné i dřevnou dutinou na druhé straně. Vnitřní a vnější povrch kosti je tvořen plášťovými cirkumferenciálními lamelami, které pokrývá nemineralizovaná kolagenní vrstva perioste (vnější) a endoste (vnitřní povrch kosti). V trámčích spongiózy jsou lamely osteonů uspořádány paralelně v ploše, neboť zde chybí dutina centrálního kanálu. Prostor mezi jednotlivými trámci umožňuje zásobení buněk spongiózy z kostní dřeně (Mescher 2010) (**Obr. 1**).



Obr. 1: Struktura lamelární kostní tkáně na průřezu diafýzou dlouhé kosti. (a) Kost kompaktní tvoří až 10 mm silnou vrstvu stěny diafýzy. Směrem do dřevné dutiny přechází v kost spongiózní. (b) Ve struktuře osteonu kompaktní kosti si můžeme všimnout střídavé orientace kolagenních fibril v sousedních lamelách. Lamely jsou koncentricky uspořádané kolem centrálního kanálu. Tkáň je vaskularizovaná a inervovaná. (c) Struktura Haversova systému s centrálním kanálem. (d) Osteocyt uložený v lakuně a jeho výběžky v *canaliculi ossei*. Upraveno z www.majordifferences.com.

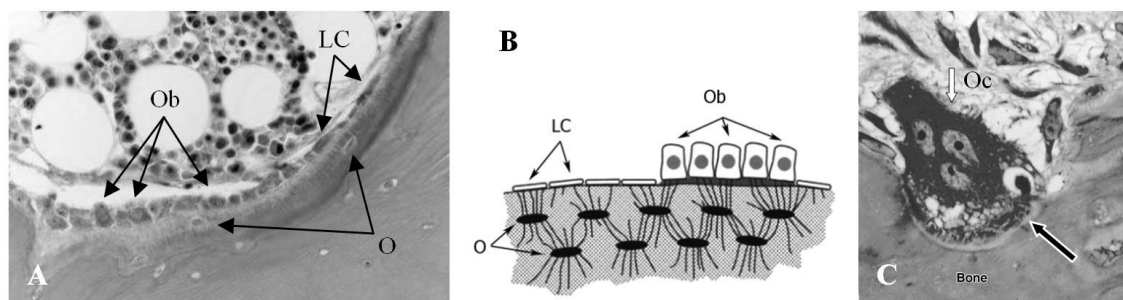
Kostní tkáň je tvořena čtyřmi typy buněk, které navzájem interagují a ovlivňují se: osteoblasty, osteocyty, osteoklasty a tzv. buňky lemující kost (lining cells) (**Obr. 2a, 2b**, str. 15). **Osteoblasty** se nacházejí na povrchu kosti, kde tvoří shluky v místech probíhající tvorby kostní tkáně. Produkují organickou část mezibuněčné hmoty (osteoid) a podílí se na její mineralizaci, především produkcí enzymu alkalické fosfatázy (ALP). Sekretují

regulační faktory (viz výše), včetně ligandu receptorem aktivovaného jaderného faktoru κ B (RANKL) a osteoprotegerinu (OPG), které se účastní regulace diferenciaci a aktivity dalšího typu kostních buněk – osteoklastů. Novotvořená ECM je produkována apozicí na již existující mineralizovanou vrstvu (Safadi *et al.* 2009), čímž se vytváří typická lamelární struktura osteonů. Prekurzorovými buňkami osteoblastů jsou osteoprogenitorové buňky odvozené z mezenchymálních buněk kostní dřeně aktivací přes Wnt/ β -kateninovou signalizační dráhu (Clarke 2008).

Některé osteoblasty v sekretované hmotě postupně uvíznou a diferencují se v **osteocyty**. Nacházejí se pak v čočkovitých komůrkách, tzv. lakunách (**Obr. 1**, str. 13), z nichž vybíhají dlouhými plasmatickými výběžky skrze kostní kanálky *canaliculi ossei* v mineralizované mezibuněčné hmotě a napojují se filopodií a na nich umístěných gap junctions na osteocyty, osteoklasty nebo lining cells, čímž vytvářejí komunikační síť uvnitř kosti (**Obr. 2b**, str. 15). Ze všech kostních buněk jsou nejvíce zastoupené – tvoří až 90 %. Zároveň mají i nejdelší životnost, která činí kolem 20 let. Jejich nejdůležitější funkcí je mechanotrandukce, zprostředkovaná rozsáhlou lakuno-kanalikulární sítí jejich výběžků, díky níž jsou schopny registrovat jak hladiny hormonů a dalších látek, které obsahuje intersticiální tekutina uvnitř kanalikulů, tak změny její cirkulace, ovlivněné vnějšími mechanickými faktory. Interpretace takových signálů umožňuje reagovat na potřeby úpravy kostní hmoty vlastní signalizací, směřující k zahájení reparačních nebo resorpčních procesů (Manolagas 2000; Safadi *et al.* 2009) regulací proliferace a diferenciaci osteoblastů i samotných prekurzorových mezenchymálních buněk kostní dřeně.

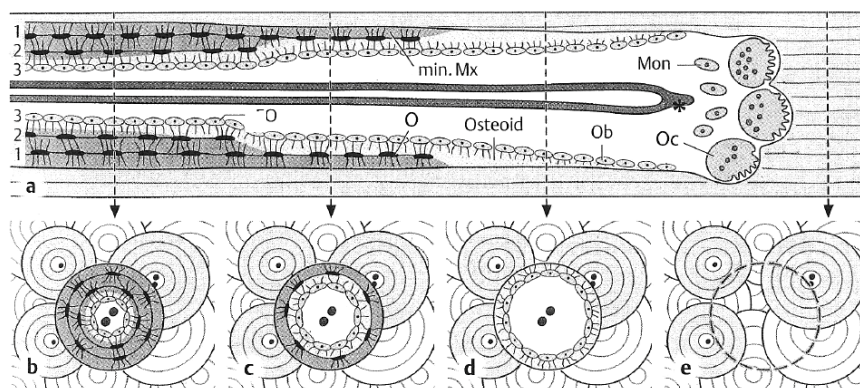
Lining cells jsou protáhlé oploštělé buňky. Představují klidovou formou osteoblastů, které ukončily svoji sekreční aktivitu a nacházejí se na povrchu kostí, na nichž právě neprobíhá přestavba ani formování nové tkáně. Vytvářejí iontovou bariéru mezi extracelulární tekutinou a intersticiální tekutinou lakuno-kanalikulárního systému. Podílejí se na regulaci homeostázy vápníku a fosfátů v kosti. Nacházejí se v těsné blízkosti osteoblastů, s nimiž jsou spojeny buněčnými spoji typu *zonula adherens* (pásové desmozomy) (Clarke 2008). Povrchová nemineralizovaná vrstva, na které jsou přisedlé, za normálních okolností neumožňuje přisednutí osteoklastu a zahájení resorpce. Na základě signalizační aktivity osteocytů v reakci na potřebu remodelace v daném místě začnou lining cells produkovat matrixovou metaloproteinázu (kolagenáza, MMP-1), která umožní odstranění této vrstvy (Everts *et al.* 2002).

Osteoklasty (Obr. 2c) jsou polarizované mnohojaderné buňky vznikající fúzí jednojaderných prekurzorů z buněk monocyto-makrofágové linie. Proliferují a diferencují pod vlivem cytokinů M-CSF (faktor stimulující kolonie makrofágů), RANKL (ligand receptorem aktivovaného jaderného faktoru κ B) a dalších. Po své aktivaci a uchycení na povrchu kosti jsou schopné díky přítomnosti protonové pumpy na membráně vytvářet mikroblast s kyselým pH, v níž odbourávají ECM prostřednictvím proteolýzy, endocytózy a dekalifikace zbývající hmoty. Specifickou strukturou osteoklastu je tzv. zvlněný lem (ruffled border), jehož mnohočetné invaginace zvyšují aktivní resorpční plochu, usnadňují enzymatický rozklad, záchyt a endocytózu částic v prostoru Howshipovy lakuny (tj. jamky, která vzniká činností osteoklastu). Po ukončení své aktivity se buď přidávají ke skupině lining cell přechodem do klidového stavu, nebo po několika týdnech prodělají apoptózu (Manolagas 2000).



Obr. 2: A) Osteoblasty, osteocyty a lining cells. Ob – Osteoblasty na povrchu kosti. O – Osteocyty vzniklé z osteoblastů, které zůstanou obklopeny hmotou osteoidu. LC – Zplošťující se osteoblasty, přecházející do klidového stavu, které se stanou lining cells. (Manolagas 2010, upraveno) B) Lakuno-kanalikulární síť (Turner 2004, upraveno). C) Aktivní osteoblast (bílá šipka) s několika jádry a rozeznatelným zvlněným lem (černá šipka) (Mescher 2010, upraveno).

Mechanismus remodelace kostní tkáně probíhá během života jedince nepřetržitě a tak poskytuje tělu možnost účinné adaptace na mechanickou zátěž. Umožňuje opravu stávajících poškození, snižuje riziko vzniku fraktur a přispívá k udržování homeostázy obsahu důležitých minerálů v kostech. Přestavba kostní tkáně probíhá v tzv. remodelačním cyklu při vzájemné kooperaci kostních buněk v útvaru známém jako základní/kostní multicelulární jednotka (BMU). Začátek tohoto komplexu tvoří skupina osteoklastů, tzv. řezací kužel, za nimi vstupují osteoblasty a kapilára v tzv. uzavíracím kuželu (**Obr. 3**, str. 16) (Parfitt 2002).

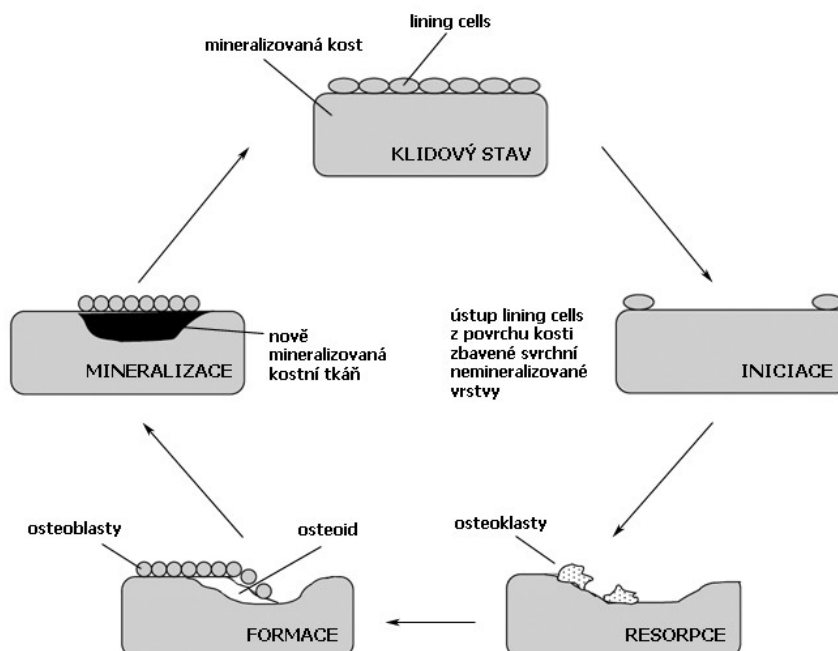


Obr. 3: Postupující BMU v kompaktní kostní tkáni na podélném a příčném řezu. Procesy vedoucí k tvorbě a remodelaci kostní tkáně zahajují lining cells, reagující na signály od osteocytů, které umožní nasednutí osteoklastů na povrch kosti. Činností osteoklastů je nejprve hloubena dutina v kostní tkáni, do níž vstupují osteoblasty a začínají sekretovat novou kostní hmotu. Ta se tvoří apozicí, tedy přikládáním nových vrstev na starší, čímž postupně vzniká typický osteon s Haversovým kanálem. Do něj vstupují cévy a nervová vlákna. V průběhu remodelačního procesu dochází k narušení struktur původních osteonů nově vzniklými. (Parfitt 2002; Obr. upraven z Lüllmann-Rauch, 2012).

Zkratky: Mon – mononukleární, dosud nesfúzované, prekurzory osteoklastů; Oc – osteoklasty; Ob – osteoblasty; E – buňky endostu; min. Mx – mineralizovaná matrix; * – vrůstající cévní klička.

Remodelační proces můžeme formálně rozdělit do několika fází: iniciace, resorpce, produkce matrix, mineralizace a klidová mezifáze (kviescence) (**Obr. 4**, str. 17). V **klidovém** stavu remodelace neprobíhá. Na tenké vrstvě nemineralizované matrix na povrchu kosti se nachází vrstva zploštělých lining cells, které zahájí remodelaci až v reakci na příslušnou signalizaci od osteocytů. V **iniciační** (nebo také aktivační) fázi lining cells upravují tento povrch prostřednictvím sekretovaných MMPs a ustupují z něj (Everts *et al.* 2002). Působením různých chemoatraktantů, produkovaných okolními osteoblasty, probíhá v místě budoucí přestavby shromažďování mononukleárních prekurzorů osteoklastů, které fúzí a po přisednutí na povrch odhalené tkáně dokončují svou diferenciaci díky přítomnosti RANKL a M-CSF (Clarke 2008). Po přisednutí jsou aktivovány osteoblastovými cytokiny – interleukiny IL-1 a IL-6, pod jejichž vlivem se polarizují a cytoskeletárně přestavují (Safadi *et al.* 2009). Započetím enzymatického odbourávání kostní hmoty začíná fáze **resorpce**. Ve fázi **formace**, která je nejdelší fází celého cyklu, jsou resorbovaná místa zaplněna nově tvořenou mezibuněčnou hmotou osteoidu, sekretovanou osteoblasty diferencovaných z prekurzorů přilákaných chemotaktickými signály aktivních osteoklastů. Poslední fázi – **mineralizační** – končí období funkčnosti BMU. Doprovází ji ukládání Ca^{2+} a PO_4^- do osteoidu a vytváření krystalů hydroxyapatitu (HA). Osteoblasty sekretují vesikuly obsahující ALP, která jejich ukládání podporuje a zároveň hydrolyzuje inhibitory mineralizace (Clarke 2008). Mineralizace probíhá vždy od nejspodnějších vrstev osteoidu k nejsvrchnějším

(Mescher 2010). Po ukončení produkce a mineralizace se z osteoblastů stávají osteocyty nebo klidové lining cells.¹



Obr. 4: Fáze remodelačního cyklu. První fáze cyklu je v literatuře častěji tradičně označována jako aktivační, podle názvu navržným v 60. letech 20. století H. M. Frostem. Dochází v ní ke formování BMU. Povrch buňky je připravován na adhezi osteoklastů řezacího kužele, který svoji aktivitu zahajuje až následně. Parfitt (2002) se proto přiklání k výstižnějším, již dříve navrhovaným označením, kterými je „iniciace“ nebo, dle jeho slov ještě lépe, „originace“, jakožto fáze vzniku BMU (Obr. upraven podle Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.* 2006b).

¹ Rozsáhlý souhrn poznatků o stavbě, složení kostní tkáně, procesu remodelace a její regulace nabízí již bakalářská práce autorky: Doubková, Martina. *Cyto- a chemoarchitektonika kostní tkáně a její přestavba (obnova) u člověka v dospělosti*. Ústí nad Labem, 2014. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta. 94 str. Vedoucí práce Vladislav Mareš.

2. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ A BIOMATERIÁLY

Přestože první výzkumné snahy v tomto oboru jakožto celku spadají již do první poloviny 20. století – po provedení prvních úspěšných orgánových transplantací – termín tkáňové inženýrství byl poprvé oficiálně přijat až v roce 1988. Přijatá definice jej představuje jako interdisciplinární obor, využívající poznatků a metod technických a přírodních věd s cílem vývoje biologických náhrad, které budou schopny zachovat, obnovit nebo zlepšit funkčnost konkrétní tkáně nebo celého orgánu (Skalak *et Fox* 1988² cit. Langer *et Vacanti* 1993). Již tehdy bylo jasné, že potřeba materiálu pro implantace bude s rozvojem a pokroky medicíny stoupat, množství dostupných dárců nebude dostačující a je proto nutné začít hledat adekvátní substituty, a to jak v možnosti zvířecích dárců, tak v umělých materiálech s potenciálem komerční výroby.

V případě tkáňového inženýrství zaměřeného na kostní tkáň a chrupavku stojí v centru zájmu implantáty určené k náhradám, regeneraci nebo fixaci kostí (včetně zubů), spinální implantáty, náhrady kloubních hlavic a povrchů kloubních jamek pro použití v ortopedii a stomatologii (pro přehled typů implantátů viz Slone *et al.* 1991; King and Phillips 2016; Mittal *et al.* 2016). Důsledkem zvyšujícího se věku dožití ve vyspělých zemích, rozvoji civilizačních chorob, zvýšení průměrné tělesné hmotnosti a nezdravého životního stylu roste i nutnost náhrad opotřebovaných či vážně poraněných orgánů, což se díky pokrokům v regenerativní medicíně a zvyšující se dostupnosti operačních zákroků daří stále lépe. Značnou část dnes nejčastěji užívaných implantátů tvoří právě implantáty ortopedické (Viteri *et Fuentes* 2013), přičemž použití kloubních náhrad a kostních štěpů je, po krevních transfuzích, spolu s kůží stále druhým nejčastějším typem transplantace vůbec (Langer *et Vacanti* 1993; Giannoudis *et al.* 2005).

Kostní štěpy z vlastního těla pacienta (autologní), z lidského či zvířecího dárce (alogenní, často z kadaverů, a xenogenní) se stále používají jako zcela přirozená náhrada poškozené nebo chybějící tkáně. Autologní štěpy se získávají nejčastěji z hřebene kosti kyčelní. Dochází tak sice k přenosu vlastní tkáně, která nevyvolá imunitní odpověď organismu, avšak k její extrakci je nutná další operace, čímž vzniká spolu se zatížením organismu i riziko pooperačních komplikací (infekce, vznik zánětu, tvorba deformit

² Skalak R., Fox C. F. (eds.). NSF Workshop, UCLA Symposia on molecular and cellular biology, 1988 (New York: Alan R. Liss, Inc., 1988). Proceedings of Granlibakken workshop. Held in Granlibakken Resort, Lake Tahoe, California, USA, in February 1988.

v místě odběru, krvácení). Autologní štěpy nelze použít v případech, kdy je potřeba transplantovat větší část tkáně. Tehdy přicházejí na řadu alogenní či xenogenní implantáty, které s sebou ovšem kromě zvýšeného rizika imunitní reakce proti implantátu nesou také možnost přenosu patogenů (Giannoudis *et al.* 2005). Oba typy transplantátů jsou osteoinduktivní (stimulují diferenciaci kostních buněk) a osteokonduktivní (podporující růst kostních buněk na svém vnějším i vnitřním povrchu) (podrobněji viz Albrektsson *et Johansson* 2001). Dnes se používají hlavně k úpravě kostních defektů po úrazech, po vyjmutí nezhoubného nádoru kosti nebo tkáně v okolí uvolněného, například kloubního, implantátu (Kumar *et al.* 2013). Vzhledem k jejich zmíněným nevýhodám je snaha o jejich nahrazování syntetickými substituty.

Nejdůležitější vlastností materiálů pro biomedicínské použití je biokompatibilita s prostředím tkání a tělních tekutin. Ideální materiál je takový, který umožňuje dobrou integraci do tkáně pacienta bez indukce nežádoucích účinků imunogenních, mutagenních, cytotoxických či karcinogenních v důsledku jeho povrchových vlastností nebo uvolňování částic (Williams 2008). První materiály, které byly konstruovány v tomto duchu, se začaly vyrábět v 60. letech 20. století. Do této doby na biokompatibilitu nebyl kladen důraz.

Tzv. **první generace materiálů** se snažila vyhybat výše popsaným problémům kostních štěpů vývojem umělých implantátů splňujících především nároky na mechanické, chemické a fyzikální vlastnosti nahrazované tkáně. Tyto materiály měly být „bioinertní“ ve smyslu minimalizace imunitní reakce vůči implantátu (Hench *et Polak* 2002). Dnes je bioinertní materiál chápán v širším smyslu jako takový, který je prostředím těla tolerován, nevyvolává nežádoucí fyziologické reakce, avšak ani nepodporuje adsorpci proteinů a buněčnou adhezi. Nachází uplatnění na površích, kde je nežádoucí jejich přerůstání buňkami, např. fibroblasty (kloubní plochy, nitrooční čočky), v aplikacích kde jejich použití nebylo dosud překonáno žádným dostupným biomateriálem (kovové hřeby, dřívky, krčky a hlavice endoprotéz), nebo které jsou do organismu implantovány pouze dočasně (šrouby a dlahy). Prvními úspěšně používanými materiály v ortopedii byly kovy, z nichž celá řada se ukázala jako biokompatibilní, a zároveň umožňující adsorpci proteinů a následné osídlení buňkami (titan a jeho slitiny, nerezová ocel, slitiny na bázi chromu a kobaltu – více viz **kapitola 3**, str. 23). Dalšími, skutečně bioinertními materiály, jejichž použití doznalo rozšíření v rámci tzv. první generace, byla keramika (zirkonia, alumina) a některé polymery

(např. polymethylmethakrylát – PMMA) (Wang 2003; Geetha *et al.* 2009). Alumina, neboli oxid hlinitý, se využívá při výrobě dentálních implantátů a třecích ploch kloubních spojení v kyčelních endoprotézách a dalších kloubních náhradách. Zirkonia, oxid zirkoničitý, představuje méně tvrdou, ale vůči lomu odolnější alternativu k Al_2O_3 . Oba materiály mají excelentní korozní odolnost, avšak vzhledem k relativní křehkosti a horším klinickým výsledkům se od použití zirkonia v ortopedii upouští. Přetrvává však jeho aplikace v zubařství (Rahaman *et al.* 2007) a nachází také uplatnění např. ve výrobě keramických kompozitů se zlepšenou odolností vůči lomu (oxid zirkoničitý tvrzený aluminou, ATZ) (Schierano *et al.* 2015). PMMA je používán jako kostní cement k fixaci dřívků endoprotéz. Snižuje rozdíl v elasticitě mezi materiálem implantátu a kostní tkáně, neboť jeho modulus elasticity (viz dále) se blíží kosti. Zmenšování objemu cementu při tvrdnutí však vytváří pnutí mezi materiálem implantátu a kostí, což může vést ke zlomům a vzniku zánětlivé reakce v důsledku uvolněných částic cementu (Dhandayuthapani *et al.* 2011). Nevýhodou je i omezená životnost těchto materiálů, jež si vynucuje nezbytnost opětovného chirurgického zásahu a výměnu během následujících 10 až 25 let (Hench *et al.* 2002).

Pro různé použití jsou však vyžadovány různé vlastnosti materiálu. Při vývoji **druhé generace** implantátů v 80. letech bylo přistoupeno k vývoji materiálu s bioaktivními složkami směřujícími ke zlepšení osteokonduktivity, čili integrace, mezi povrchem implantátu a kostí, podporou buněčné adheze, proliferace, diferenciaci a mineralizaci, napodobováním struktury a funkce ECM. Bioaktivní skla a skelná keramika toho dosahují při reakci svého povrchu s vnitřním prostředím těla, která vede k vytvoření tenké vrstvy hydroxyapatitu (HA), významné složky kostní ECM, *in vivo*. Mají vysoký modul pružnosti, jsou tvrdé, avšak poměrně křehké (Hench *et al.* 2002). Využití našly např. v náhradách kůstek středního ucha či částí obratlů (Wang 2003). Bioaktivní sklo, případně syntetický HA a trikalciumfosfát (TCP) se začaly používat také k potahování kovových materiálů, například dřívků endoprotéz (Hench *et al.* 2002). Dalším krokem byla konstrukce degradabilních náhrad pro regeneraci tkání. Přírodní a umělé polymery poskytují možnost postupné resorpce uvnitř těla pacienta, prostoupení a úplné nahrazení buňkami tkáně. Výhodou přírodních polymerů je nízká imunogenicita a podobná molekulární struktura s přirozenými makromolekulami (Armentano *et al.* 2010). Používán je například kolagen, chitosan, kyselina hyaluronová a polyhydroxybutyrát. K syntetickým polymerům, s jejichž použitím se v biomedicíně můžeme setkat častěji,

řadíme kyselinu polymléčnou (PLA), polyglykolovou (PGA), poly- ϵ -kaprolakton (PCL), kopolymery těchto látek a polykarbonáty (Armentano *et al.* 2010; Liu *et al.* 2004).

Třetí generace biomateriálů, přicházející s přelomem století, se zaměřila na zdokonalení kompozitů v podobě trojrozměrných lešení (scaffolds). Kombinuje výhodné vlastnosti keramických materiálů (jejich osteokonduktivitu a tuhost) s tvrdostí, pružností a degradabilitou polymerů obojího typu bez nutnosti chirurgického vyjmutí. Porozita materiálu vytvořená prostorovou strukturou lešení má umožnit dostatečnou vaskularizaci, stimulující vcestování buněk, jejich adhezi a proliferaci. Kromě toho mohou být povrchy materiálů funkcionalizovány určitými chemickými skupinami nebo makromolekulami proteinů napodobujícími prostředí extracelulární matrix, s integriny, které usnadňují buněčnou adhezi, enzymy, hormony, růstovými faktory, syntetickými regulátory buněčného cyklu, které stimulují buňky ke specifické odpovědi (Bačáková *et al.* 2004). Jejich povrch také může být již *in vitro* osazený např. progenitorovými buňkami dané tkáně, případně buňkami získanými ze samotného pacienta, čímž se resorbovatelný scaffold ještě více přiblíží funkční alternativě kostních štěpů (Hench *et al.* 2002; Armentano *et al.* 2010). V poslední době se rovněž začínají používat indukované pluripotentní kmenové buňky (pro přehled viz Kuo *et al.* 2017). Kromě uvolňování bioaktivních molekul je možné takto do organismu dočasně dodávat léky (např. antibiotika, chemoterapeutika) ke zlepšení pooperačního hojení či potlačení imunitní reakce proti buněčné komponentě (více viz Zilberman *et al.* 2008; Franz *et al.* 2010).

Trend ve vývoji biomateriálů se dále ubírá směrem k tzv. chytrým (smart) bioaktivním materiálům, které budou navíc schopné reagovat na mechanické a/nebo elektrické stimuly ve tkáni. Řeč je především o tzv. piezoelektrických materiálech, v nichž mechanická stimulace vyvolává elektrickou odezvu. Piezoelektrické vlastnosti nejen kostní tkáně jsou již dlouho známy (Shamos *et al.* 1967). Nejvíce studovaným je v současnosti vodivý polymer polypyrrol (PPy) a jeho kombinace s jinými polymery jako např. kyselinou L-polymléčnou (PLLA), alginátem a chitosanem (Sajesh *et al.* 2013). Další podobnou skupinou materiálů jsou uhlíkové nanotrubičky (pro přehled piezoelektrických materiálů viz Ribeiro *et al.* 2015). Materiály s těmito pokročilými biomimetickými vlastnostmi označuje Ning *et al.* (2016) jako rodící se **generaci čtvrtou**.

Jak naznačuje Williams (2008) jednotlivé generace vývoje biomateriálů je nutné vnímat spíše jako konceptuální změny ve vnímání kritéria biokompatibility. V žádném

případě nemůžeme říct, že příchod nové generace materiálů zcela překonává a nahrazuje ty předchozí, nebo dokonce že výzkum v těchto oblastech ustává. Všechny typy dosud vyvinutých materiálů nacházejí svoje využití a jejich výběr se řídí specifickými požadavky na vlastnosti implantátu. Způsob provedení, materiál, nároky na funkčnost a výdrž implantátu se mohou lišit vzhledem k jeho umístění v tkáni, věku a úrovni běžné fyzické zátěže pacienta.

3. KOVY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Všechny výše zmíněné materiály – keramika, polymery i kompozity – v kostním tkáňovém inženýrství nacházejí své uplatnění. Zdaleka nejčastěji používaným materiálem v ortopedických kostních implantátech jsou však kovy. Důvodem je jejich dobrá biokompatibilita, chemická stabilita a mechanické vlastnosti (tlaková a tahová odolnost), předurčující je k použití v místech velké zátěže.

Prvotně používanou karbonovou a vanadovou ocel, které po vystavení tělním tekutinám relativně rychle korodovaly, úspěšně nahradila v tomto ohledu vhodnější nerezová ocel (nejpoužívanější typ 316L, tedy Low carbon), slitiny kobaltu a chromu (Co-Cr), později titan a jeho slitiny (Williams 2008; Viteri *et Fuentes* 2013).

Hlavními přednostmi **nerezové oceli 316L** je její nízká cena v porovnání s ostatními a snadná zpracovatelnost. Vysoký obsah chromu (alespoň 17 %), zabraňující korozi prostřednictvím samovolné tvorby oxidického povlaku Cr_2O_3 na povrchu materiálu, však nedosahuje kvalit zbylých dvou zmíněných typů materiálů – slitin Co-Cr či titanu (Navarro *et al.* 2008). Ty disponují ještě lepšími antikorozními vlastnostmi. Nevýhodou nerezové oceli je přítomnost niklu, považovaného za cytotoxický, potenciálně karcinogenní a mutagenní (Biesiekierski *et al.* 2012), který se v důsledku tření může ve velmi malých koncentracích uvolňovat z implantátu. V novějších typech nerezové oceli je proto snaha nahrazovat částečně obsah niklu zvýšením obsahu manganu nebo molybdenu s o něco příznivějšími vlastnostmi (Navarro *et al.* 2008). Riziko uvolňování iontů i větších částic v důsledku koroze nebo mechanického opotřebení je však společné všem kovovým materiálům. Může vést ke vzniku sterilního zánětu a následnému uvolňování implantátu (Hanawa 2004; Alvarez *et Nakajima* 2009; Geetha *et al.* 2009).

Slitiny kobaltu a chromu, například často používaná slitina Co-Cr-Mo, jsou lépe odolné vůči korozi i mechanickému opotřebení než nerezová ocel. Jejich Youngův modulus elasticity (udávající hodnotu poměru mechanického napětí vůči deformabilitě materiálu) je vyšší než v případě nerezové oceli (316L: 200-210 GPa, Co-Cr slitiny: 220-230 GPa) a svědčí o dobré mechanické odolnosti (Geetha *et al.* 2009). Porovnáme-li jej však s udávaným elastickým modulem kortikální kosti, vidíme, že ten je při hodnotě pohybující se v rozmezí 4-30 GPa značně nižší. Toto rozmezí je o něco větší, neboť konkrétní hodnoty modulu elasticity kosti značně individuálně závisí na věku, výživě a fyzické aktivitě (Alvarez *et Nakajima* 2009) a také na typu kosti a směru, v němž se

měření provádí (Rho *et al.* 1997; de Viteri *et Fuentes* 2013). Takto vysoké rozdíly mezi elastickým modulem kosti a implantátu vedou k rozvoji efektu zvaného stress shielding, kdy pevnější kovový materiál přebírá většinu zátěže, čímž ochuzuje okolní kostní tkáň o důležitou mechanickou stimulaci. Důsledkem může být zvýšená resorpce kosti v okolí implantátu, jeho uvolňování a nutnost rychlého provedení revizní operace k jeho výměně (Navarro *et al.* 2008). Ionty chromu a kobaltu mohou navíc po uvolnění z implantátu působit jako mutageny a alergeny (Biesiekierski *et al.* 2012).

Kombinace vysoké zátěžové odolnosti ve smyslu pevnosti, nižšího Youngova modulu pružnosti (zhruba 110 GPa, což je výrazně bližší kosti než předchozí zmiňované), nízké hustoty (o 50 % nižší než ocel), nízké hmotnosti a nejlepší korozní odolnosti ze všech ostatních používaných slitin, společně se zvýšenou biokompatibilitou, činí **titanové slitiny** nejlepší volbou (Viteri *et Fuentes* 2013). Slitina titanu s hliníkem a vanadem (Ti-6Al-4V), ač původně vyráběná pouze pro letecký průmysl, rozšířila své využití např. na výrobu stomatologických implantátů, náhrad kloubů dolních i horních končetin, fixačního materiálu a některých chirurgických nástrojů (Geetha *et al.* 2009). Ačkoli mají titanové slitiny obecně ve srovnání s čistým titanem větší odolnost vůči opotřebení, k otěru a uvolňování iontů i u nich v menší míře dochází. Na rozdíl od titanu však uvolněné samostatné ionty hliníku mohou působit genotoxicky a neurotoxicky, vanadové ionty navíc i mutagenně a vysoce cytotoxicky (Gomes *et al.* 2011; viz také Biesiekierski *et al.* 2012). O tom zda vůbec nastane možnost, že by uvolněný iont mohl poškozovat organismus nějakým z těchto způsobů, rozhoduje molekula nebo aniont, s nímž se naváže. K rozvoji negativních účinků dojde teprve v případě, že se naváže na biomolekulu (Hanawa 2004).

Titanové slitiny dosahují své korozní stability prostřednictvím pasivace povrchovou oxidickou vrstvou. Na vzduchu či v přítomnosti elektrolytu spontánně oxidují a vytvářejí tenký nerozpustný film – v případě titanových slitin složený především z TiO_2 – o tloušťce několika nanometrů (Alvarez *et Nakajima* 2009). Přítomnost tohoto filmu navíc přispívá také ke zlepšení biokompatibility a chemické stability omezením uvolňování iontů materiálu, neboť pokud je na celém povrchu implantátu intaktní, funguje jako bariéra omezující uvolňování potenciálně toxických iontů na minimum (Hanawa 2004; de Viteri *et Fuentes* 2013). Výhodou vrstvy je také fakt, že pokud dojde k jejímu porušení, po určité době se spontánně obnoví, což u titanu a jeho slitin trvá zdaleka nejkratší dobu – přibližně 8 minut (Hanawa 2004). Kvůli omezení potenciálních

nežádoucích vlivů se přesto přistoupilo k vývoji slitin obsahujících netoxické či méně toxické prvky jako např. niob (Ti-6Al-7Nb), železo (Ti-5Al-2.5Fe), zirkonium (Ti-13Nb-13Zr; Ti-12Mo-6Zr-2Fe), popřípadě jejich kombinace s tantalem (Ti-26Nb-13Ta-4.6Zr; Ti-15Zr-4Nb-2Ta-0,2Pd) (Niinomi 1998; Alvarez *et Nakajima* 2009). Ionty Ti, Zr, Nb a Ta se na biomolekuly váží jen velice obtížně (Hanawa 2004).

Nejčastěji používanými biomedicínskými materiály k výrobě klinicky užívaných implantátů jsou stále komerční čistý titan (CP-Ti) a slitina Ti-6Al-4V. Ke zvýšení biokompatibility a podpoře osteointegrace vhodnými povrchovými vlastnostmi a zlepšení tribologických charakteristik materiálu (snižování tření a opotřebení, tvrzení), jsou jejich povrchy ošetřovány řadou mechanických a chemických procesů. Pískováním a leptáním je možné ovlivnit porozitu povrchu a podpořit tak buněčnou adhezi a následnou osteointegraci (Kim 2010; Park *et al.* 2013). Anodickou oxidací lze urychlit tvorbu oxidické vrstvy na povrchu materiálu – korigovat její trouštku (Kuromoto *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2015) a mikro- či nano- strukturu povrchu (Kim 2010; Echeverry-Rendón *et al.* 2015). Chemická depozice z plynné fáze dovoluje nanesení vrstvy amorfního uhlíku podobného diamantu (diamond-like carbon, DLC) ke zlepšení korozní a tribologické odolnosti povrchu (Kim *et al.* 2005). Vystavení kyselým či zásaditým roztokům má vliv na výsledný povrchový náboj a depozici apatitu (CaP) (Teixeira *et al.* 2004; Pattanayak *et al.* 2012). Plazmové sprejování vede k nanesení vrstvy HA či TCP (Demnati *et al.* 2013). Z povrchových modifikací se jeví jako nejslibnější právě nanášení vrstev DLC a plazmatická elektrolytická oxidace (PEO; neboli mikrooblouková oxidace – MAO) (de Viteri *et Fuentes* 2013).

Další možnosti skýtají biochemické modifikace prostřednictvím imobilizace růstových, osteogenních a angiogenních faktorů – např. BMP, PDGF (Martino *et al.* 2011), proteinů ECM (fibronectin, vitronectin, laminin, osteopontin a další) nebo krátkých biomimetických peptidů z nich odvozených, např. s RGD (Arg-Gly-Asp), tj. sekvencí zprostředkující adhezi buněk vazbou na jejich integrinové receptory, či s KRSR (Lys-Arg-Ser-Arg), tj. motivem vázajícím specificky přímo osteoblasty (Le Gillou-Buffello *et al.* 2008; Bell *et al.* 2011). Velmi rozsáhlý přehledný článek o použití mnohých růstových faktorů a biomimetických peptidů nedávno zpracoval Visser *et al.* (2016). Antimikrobiální vlastnosti může materiálu přinést použití nanočástic stříbra nebo jiných kovů (viz Ferraris *et Spriano* 2016), případně vytvoření specifické krystalické formy TiO₂ (anatás) na titanové slitině (Giordano *et al.* 2011).

4. BUNĚČNÉ MODELY A JEJICH VÝBĚR

V souladu s obecně přijímanou snahou o minimalizaci užití laboratorních zvířat se prvotní hodnocení biokompatibility materiálů pro implantaci vždy provádí nejprve *in vitro* na vhodném buněčném modelu. K testování *in vivo* se přistupuje až po důkladných studiích. Stále však jde o nezastupitelnou součást procesu vývoje biomateriálů, neboť přímá odpověď organismu na aplikaci implantátu je nejen tkáňové závislá, ale i druhově specifická. Ke zkoumání procesu hojení rány, zánětlivé reakce po aplikaci implantátu, iritability tkáně, karcinogeneze či biodegradability ortopedických implantátů se používají především králíci a prasata (Anderson 2001).

Studium chování buněk při kontaktu s povrchem materiálu *in vitro* se běžně provádí na dostupných primárních, imortalizovaných či z tumorů odvozených buněčných liniích osteoblastů. Každý z těchto buněčných modelů je charakteristický svými podobnostmi a odlišnostmi ve vztahu k primárním lidským osteoblastům (HOb). Tyto jsou obecně považovány za nejvhodnější model z hlediska relevance pro klinické aplikace, neboť disponují fenotypem normálních osteoblastů. Jejich proliferační potenciál a genová exprese však podléhá vlivu věku dárce, rozdíly lze najít také mezi pohlavími, v závislosti na místě odběru i použité technice izolace (Czekanska *et al.* 2012). Další nevýhodou je, že HOb rostou v podmínkách *in vitro* velice pomalu a mají v kultuře omezenou životnost (Liu *et al.* 2007). Zvířecí primokultury osteoblastů jsou sice dostupnější, jenže jejich hlavním problémem je nesnadná převoditelnost na lidský organismus v důsledku mezidruhových odlišností, které se odrážejí například v rozdílné syntéze proteinů. Výhodnější je v tomto ohledu použití buněčných linií, které představují relativně dobře dostupné (i komerčně), charakterizované a fenotypicky poměrně stabilní populace, eliminující do jisté míry heterogenicitu primokultur a umožňující dlouhodobou kultivaci s neomezeným počtem pasáží (Safadi *et al.* 2009; Czekanska *et al.* 2012). Mezi zvířecími liniemi jsou nejčastěji používaným modelem myší preosteoblasty MC3T3-E1, imortalizované v časném stádiu diferenciaci. Z lidských především linie MG-63, Saos-2 a U-2 OS, odvozené z osteosarkomů, a imortalizované lidské fetální osteoblasty (hFOb) (Kartsogiannis *et Ng* 2004).

Přestože osteosarkomové linie jako Saos-2 a MG-63 nemohou sloužit jako plnohodnotná náhrada HOb, skýtají možnost provedení testů bez zdlouhavé izolace a úvahy profilu dárce, a výsledky takto získané jsou dobře reprodukovatelné. Úroveň

podobnosti s HOb je v určitých aspektech různá, a tak je vhodné vybírat linii s ohledem na to, které procesy chceme sledovat. Také je nutno brát v potaz vlastnosti těchto linií, vycházející z jejich původu v nádorově transformovaných buňkách, jako je narušení kontaktní inhibice proliferace, která je nelimituje na růst v monovrstvě (Pautke *et al.* 2004), a kontroly průběhu buněčného cyklu (Czekanska *et al.* 2014).

Obsáhlé srovnávací studie zahrnující tyto a mnoho dalších typů dostupných buněčných linií představují Kartsogiannis *et Ng* (2004) a Czekanska *et al.* (2012). Charakterizaci často užívaných linií MG-63, Saos-2, U-2 OS se zabývají Pautke *et al.* (2004) a Saldana *et al.* (2011). Czekanska *et al.* (2014) se navíc věnuje též myší linii MC3T3-E1. Z uvedených studií vyplývá, že buňky linie Saos-2 lze považovat za nejvhodnější buněčný model osteogenní diferenciaci, zatímco buňky MG-63 jsou vhodné spíše pro studium adheze a proliferace. Buňky linie U-2 OS jsou vhodným modelem pro studium poškození DNA, např. sledováním markerů buněčné odpovědi na poškození DNA, jako je fosforylovaný histon H2AX a protein vázající p53 (53BP1). Důvodem je to, že na rozdíl od linií Saos-2 a MG-63 nevykazuje linie U-2 OS deficit p53 (Schultz *et al.* 2010).

5. VLASTNOSTI MATERIÁLU A BUNĚČNÉ INTERAKCE

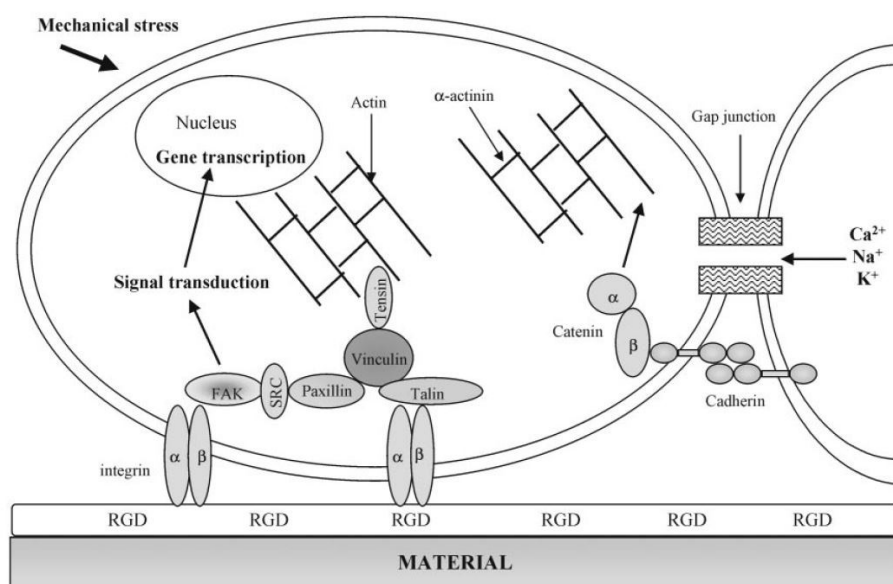
Interakce buňka-materiál je zásadním způsobem ovlivňována chemickými a fyzikálními vlastnostmi materiálu, proto je žádoucí je různými způsoby modifikovat, aby bylo dosaženo co nejvýhodnějších kombinací. Nejdůležitějšími vlastnostmi materiálu je kromě mechanických vlastností (mechanická odolnost, tuhost a pružnost) a korozní odolnosti u kovů (viz **kapitola 3**, str. 23) jeho smáčivost, povrchová energie, elektrický náboj a vodivost, topografie a drsnost povrchu (Anselme 2000; Liu *et al.* 2007; Bačáková *et al.* 2011; Anselme *et Bigerelle* 2014), neboť tento materiál tvoří substrát, na kterém probíhá iniciální buněčná adheze, rozprostírání, proliferace a diferenciací. Tato kapitola se bude zabývat obecnými vlastnostmi biomateriálů ve vztahu k interakci s vnitřním prostředím organismu a buňkami kostní tkáně, především na příkladu kovových materiálů.

5.1 Adheze a osteointegrace

Pro funkčnost dlouhodobého implantátu je důležité jeho stabilní ukotvení v kostní tkáni, které odolává statické i dynamické funkční zátěži – tzv. osteointegrace (nebo osseointegrace), zprostředkovaná na mikroskopické úrovni interakcí buněk tkáně s povrchem implantátu (Albrektsson *et Johansson* 2001; Kasemo 2002).

Bezprostředně po voperování se implantát ocitá v přímém kontaktu s tělními tekutinami (v podmínkách *in vitro* s kultivačním médiem). Nejprve dochází ke kontaktu s molekulami vody, přítomnými v těchto tekutinách, a následně rozpustnými proteiny (Kasemo 2002), které na povrch implantátu adherují buď slabými vazebnými interakcemi nebo silnějšími kovalentními vazbami (Hayes *et al.* 2011). Vrstva proteinů obalí materiál už po několika sekundách od implantace (Kuzyk *et Schemitsch* 2011), následkem toho buněčná interakce neprobíhá přímo se samotným povrchem implantátu, ale je zprostředkovaná adsorbovanou proteinovou vrstvou (Anselme 2000). Složení této vrstvy je ovlivněno topografií, nábojem a chemickým složením povrchu materiálu (Kuzyk *et Schemitsch* 2011, Bačáková *et al.* 2011). Prvotní vazba buňky probíhá formou slabých iontových vazeb, elektrostatických interakcí, vodíkových můstků a van der Waalsových sil. Pokud nedojde k adsorpci proteinů na materiál, nebo buňka nezačne v relativně krátké době syntetizovat ECM, zůstane bez přítomnosti potřebných signálů z extracelulárního prostředí a zaniká apoptózou (Bačáková *et al.* 2004). Dlouhodobá adheze je

zprostředkovaná proteiny ECM (fibronektin, vitronektin, kolagen, osteopontin) se specifickými vazebnými aminokyselinovými sekvencemi, proteiny buněčné membrány (integriny, proteoglykany) a cytoskeletu (aktin), jejichž vzájemné interakce umožňují signalizaci, aktivaci transkripčních faktorů a regulaci genové exprese (Anselme 2000). Hlavními adhezními strukturami mezi buňkou a ECM jsou tzv. fokální adheze. Jde o nahromadění integrinových transmembránových receptorů na extracelulární straně, které se vážou na ligandy v podobě proteinů ECM. Tato spojení umožňují buňce přijímat nejen biochemické, ale i mechanické signály (mechanosensing) na jejichž základě mohou regulovat organizaci cytoskeletu (Selhuber-Unkel *et al.* 2010) v podobě změn morfologie nebo orientace a tvorby fokálních adhezí (Nebe *et al.* 2007) (**Obr. 5**).



Obr. 5: Příklad proteinů účastnících se buněčné adheze na povrch biomateriálu. Podjednotky integrinů se vně buňky váží s aminokyselinovými sekvencemi matrixových proteinů (např. RGD motiv a další). Uvnitř buňky se napojují na proteiny kotvící aktinová filamenta cytoskeletu. Při adhezi mohou aktivovat fosforylaci tyrozinového zbytku fokální adhezni kinázy (FAK; PTK2). FAK se účastní regulace buněčného cyklu a ovlivňuje migrační schopnost buňky. Obrázek podle Anselme (2000).

Prvními buňkami, které na povrch implantátu adherují, jsou krevní destičky. Vytvořená krevní sraženina pak slouží jako biodegradabilní zásobárna signálních molekul (tvoří gradient chemoatraktantů, cytokinů, mitogenů a růstových faktorů poblíž povrchu implantátu), které ovlivňují chování monocytů, neutrofilů a mezenchymálních kmenových buněk (Kuzyk *et Schemitsch* 2011). Faktory jako TGF- β , BMPs, FGFs a další regulují diferenciaci osteoprogenitorových buněk v osteoblasty, které pak zahajují depozici ECM a následnou mineralizaci stejnými mechanismy jako při formativní fázi

remodelace. Samotný proces produkce kostní hmoty trvá asi tři nebo čtyři měsíce, mineralizace několik dalších (Safadi *et al.* 2009). Začlenění implantátu probíhá tzv. distanční nebo kontaktní osteogenezi (Puleo *et Nanci* 1999; Kuzyk *et Schemitsch* 2011). Při distanční osteogenezi dochází nejprve k nekróze osteoblastů na okrajích rány, poškozených při zákroku, vyčištění oblasti osteoklasty, a poté k depozici nové kostní hmoty směrem od povrchu kosti k implantátu. Při osteogenezi kontaktní dochází k apozici kostní hmoty osteoblasty současně i na povrchu implantátu, což tento proces činí rychlejším. Zhojení probíhá obdobným způsobem jako při fraktuře, přes prvotní tvorbu plst'ovité kostní tkáně, která je přestavěna osifikací (viz **kapitola 1**). Colnot *et al.* (2007) popisují, že na rozdíl od fraktury, kde po neovaskularizaci a vcestování progenitorových buněk dochází k osifikaci enchondrální, buňky na rozhraní kosti a implantátu diferencují přímo do osteoblastů a tkáň osifikuje intramembranózně. Důvodem této odlišnosti je mimo jiné vliv povrchových vlastností implantátu.

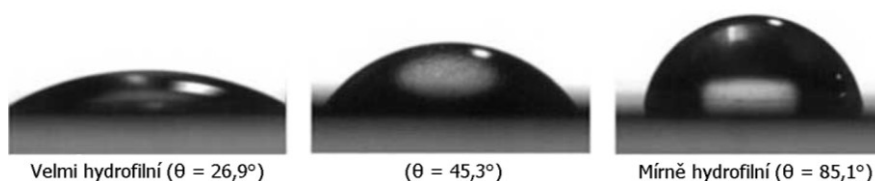
5.2 Smáčivost povrchu

Schopnost materiálu smáčet se tekutinami v prostředí těla je důležitá především z hlediska adsorpce proteinů, které ovlivňují schopnost buněčné adheze. Smáčivost je vlastnost kapaliny přilnout k povrchu pevné látky, která udává míru hydrofilie či hydrofobie povrchu. Hydrofilie je dána vyšší hodnoty polární složky povrchové energie materiálu, a mezi těmito veličinami existuje přímá úměra (Gentleman *et Gentleman* 2014). Obě hodnoty, povrchovou energii i smáčivost, lze určit měřením kontaktního úhlu materiálu s kapkami alespoň dvou kapalin (např. voda, glycerol, benzylalkohol) o známých hodnotách povrchové energie (viz **kapitola 8.1**, str. 41). Měření se provádí na rozhraní pevná látka – kapalina – plyn. Materiály s hodnotou kontaktního úhlu $\theta < 90^\circ$ s vodou jsou považovány za hydrofilní (dobře smáčivé), $\theta > 90^\circ$ za hydrofobní (špatně smáčivé), extrémní hodnoty blízké 0° za tzv. superhydrofilní, zatímco hodnoty nad 150° za tzv. supehydrofobní (Rupp *et al.* 2014). Vidíme, že velikost kontaktního úhlu je nepřímou úměrná smáčivosti (**Obr. 6**, str. 32). Čím je vyšší polární složka povrchové energie, tím vyšší je i polarita povrchu a jeho hydrofilie.

Celková povrchová energie má složku polární a disperzní (pro popis viz Bačáková *et al.* 2011). V kontextu adheze osteoblastů na materiál hraje pravděpodobně důležitější roli její polární složka (Feng *et al.* 2003). Hodnoty polární složky povrchové energie se mění v závislosti na přítomnosti určitých chemických skupin na povrchu materiálu.

Povrchy polymerů obsahující skupiny s kyslíkem mají vyšší zastoupení polární složky, jsou smáčivější a usnadňují adsorpci proteinů ECM zprostředkujících a podporujících buněčnou adhezi, jako jsou vitronektin, fibronektin, kolagen, laminin (Bačáková *et al.* 2011), zatímco proteiny jako albumin, které adhezi nepodporují, preferují vazbu na hydrofobnější povrchy (Hayes *et al.* 2011; Bačáková *et Švorčík* 2008). Povrchová energie má vliv na prostorové uspořádání adsorbovaných proteinů (Anselme 2000). Bylo zjištěno, že její vyšší hodnoty podporují rozprostírání buněk v přítomnosti sérových proteinů i bez nich (Zhao *et al.* 2005). Takto podpořená buněčná adheze se odráží v uspořádání cytoskeletu a morfologii buněk, které pak zaujímají větší plochu a polygonální tvar (He *et al.* 2008; Bačáková *et Švorčík* 2008). Můžeme říci, že s klesajícím kontaktním úhlem (čili větší hydrofilitou) a/nebo vzestupem povrchové energie je ve větší míře podporována adsorpce proteinů, buněčná adheze, proliferace a diferenciací (Minagar *et al.* 2013), ale jen do určité míry.

Proteiny na velmi hydrofobních površích s nízkou povrchovou energií naproti tomu ztrácí svoji přirozenou konformaci (Vasita *et al.* 2008) a jsou navázány v denaturované formě s pozměněnou konformací receptorů vázajících se na integrinové domény (Vagaská *et al.* 2009). Na velmi hydrofilních površích zase může docházet z důvodu slabé vazby ECM k biomateriálu k oslabení až znemožnění buněčné adheze (Bačáková *et al.* 2011). Zdá se však, že hodnoty povrchové energie nemusejí být v přímé korelaci se smáčivostí (Gentleman *et Gentleman* 2014). Výsledná smáčivost závisí na kombinaci povrchových vlastností materiálu, jakými jsou jeho topografie, chemické složení a povrchový náboj. Tyto parametry se navzájem ovlivňují, a je proto obtížné je posuzovat jednotlivě. K dosažení žádoucí buněčné odpovědi je možné je ovlivňovat různými druhy modifikací (Gentleman *et Gentleman* 2014; He *et al.* 2008; viz **kapitola 3**, str. 23). Za optimálně smáčivý povrch materiálu pro adsorpci proteinů a adhezi savčích buněk je obecně považován takový, u něž hodnota kontaktního úhlu dosahuje hodnot okolo 60°, tedy mírně hydrofilní (Bačáková *et al.* 2014; Liu *et al.* 2007), někteří autoři udávají širší rozmezí okolo 60°–70° (Gentleman *et Gentleman* 2014).



Obr. 6: Příklady velikostí kontaktních úhlů povrchu materiálů s vodní kapkou. (Zhao *et al.* 2015, upraveno).

5.3 Chemické složení a povrchový náboj

Náboj na povrchu materiálu se mění s jeho chemickým složením. Je vytvářen např. přítomností nabitých funkčních skupin ($-\text{NH}_2$ nebo $-\text{COOH}$). S přihlédnutím k roli elektrostatických interakcí (především elektrokinetického, neboli ζ -potenciálu – viz Bačáková *et al.* 2011) v biologických procesech byly nabitě povrchy zkoumány z hlediska možné osteokonduktivity (Puleo *et Nanci* 1999). Sledování interakcí buněk s elektricky nabitými povrchy však přináší poněkud protichůdné výsledky.

Marcolongo *et al.* (1998) popisují 60 % navýšení počtu adheroovaných osteoblastů Saos-2 na negativně nabitěm titanovém povrchu oproti kontrole s neutrálním nábojem a mírnou inhibicí na povrchu nabitěm kladně. Argumentem tohoto pozorování je, že ζ -potenciál kostní tkáně se pohybuje kolem -10 mV a potenciály naměřené *in vivo* v místě zlomeniny jsou rovněž záporné (Pollack 1984 cit. Marcolongo *et al.* 1998), což by nasvědčovalo spíše pozitivnímu vlivu negativního náboje na adhezi na následnou tvorbu kostní tkáně osteoblasty. Spontánně tvořená vrstva TiO_2 na povrchu CP-Ti a titanových slitin má ve formě anatasu při fyziologickém pH rovněž mírně záporný náboj (Marcolongo *et al.* 1998). Záporný náboj titanového povrchu je výsledkem adsorpce aniontů jako OH^- , F^- z okolního elektrolytu (Minagar *et al.* 2013). Rapuano *et MacDonald* (2011) zkoumali osteoblasty linií MG-63 a MC3T3-E1 rostoucí na slitině Ti-6Al-4V s povrchem upraveným tepelně a prostřednictvím radiofrekvenčně řízeného doutnavého výboje. Zvýšení negativního náboje oxidických funkčních skupin na povrchu stiliny v důsledku úprav vedlo k modulaci aktivity integrinových receptorů pro fibronectin změnou konformace adsorbovaného proteinu. Obě buněčné linie vykazovaly zvýšenou adhezi oproti kontrole.

Králičí osteoblasty, zkoumané na tepelně ošetřených titanových površích (Feng *et al.* 2003), ovšem lépe adherovaly na povrchy se zvýšenou drsností, vyšší povrchovou energií a přítomností bazických, tj. kladně nabitých $-\text{OH}$ skupin. V souvislosti s takto charakterizovaným povrchem se prokázala se i vyšší aktivita ALP, časného diferenciacního markeru. Také myší osteoblasty MC3T2-E1 se přes své integrinové receptory snadněji vázaly na polární povrchy s pozitivním nábojem, obsahující hydroxylové ($-\text{OH}$) a amino ($-\text{NH}_2$) skupiny než na nepolární povrchy s negativním

nábojem nesoucí methylové (-CH₃) a karboxylové (-COOH) skupiny (Keselowsky *et al.* 2004). Podobné výsledky ukazuje i studie chování MG-63 na titanových površích, upravených pískováním a leptáním, kdy je výsledkem podpora diferenciaci prokázána zvýšením produkce ALP i osteokalcinu (Zhao *et al.* 2005).

Lze shrnout, že dle výsledků různých vědeckých skupin jsou při buněčné adhezi častěji upřednostňovány povrchy nabitě kladně, což je vysvětlováno jak jejich preferenční vazbou proteinů ECM ve vhodné koncentraci, druhu a konformaci tak faktem že buněčná membrána je nabitá negativně a proto lépe interagují s opačně nabitými proteiny nebo povrchem materiálu (Bačáková *et al.* 2011; Minagar *et al.* 2013). Tyto výsledky však nejsou jednoznačné. Studie naší skupiny, provedené na Ti a na slitině TiNb, po úpravě tepelnou oxidací, ukázaly, že kladně nabitě (bazické) skupiny -OH podpořily spíše adhezi a růst lidských osteosarkomových buněk linií MG-63 a Saos-2, zatímco záporně nabitě (acidické) skupiny spíše osteogenní diferenciaci těchto buněk (Jirka *et al.* 2013, Vandrovcová *et al.* 2014).

5.4 Topografie povrchu

Povrch materiálu je charakterizován drsností, která zahrnuje velikost, tvar a vzdálenost nerovností. Drsnost ovlivňuje buněčnou signalizaci, morfologii, proliferaci, diferenciaci a zakotvení materiálu v kosti. Podle velikosti nerovností můžeme drsnost formálně rozdělit do tří úrovní: makrodrsnost (povrchové útvary jsou v měřítku 100 µm až milimetrů), mikrodrsnost (1 µm – 100 µm), submikrodrsnost (100 nm – 1 µm) a nanodrsnost (pod 100 nm) (Bačáková *et al.* 2011). Stejně jako v případě smáčivosti a povrchového náboje však není možné s jistotou tvrdit, že by existovala jedna univerzální optimální úroveň drsnosti. Pro jednotlivé typy materiálů (kovy, kompozity, syntetické polymery *etc.*) a buněk se může lišit (Bačáková *et al.* 2004). Obecně lze však říct, že vhodná je vždy taková úroveň drsnosti, která se co nejvíce blíží organizaci dané tkáně. V případě kosti uvažujeme ECM a krystaly HA, jejichž rozměry jsou v nanometrech (Stevens *et George* 2005).

In vivo studie prokázaly, že implantáty s drsnějším povrchem (mikro-, případně makrodrsnost) lépe fixují implantát v kosti než implantáty hladké (Buser *et al.* 1991; Brunette *et al.* 1991). Buňky obvykle lépe adherují k povrchům, kde vzdálenosti mezi nerovnostmi převyšují jejich vlastní rozměry, nebo jsou výrazně menší než je velikost

buněk (Anselme *et Bigerelle* 2014). V případě osteoblastů, jejichž průměr je většinou 15 – 30 μm (Li *et Jee* 2005), je proto výhodná spíše makrodrsnost nebo, lépe, již zmiňovaná nanodrsnost, při níž nebude docházet k deformaci cytoskeletu a snížení pevnosti adheze tím, že buňky např. musí svými výběžky překlenovat prohlubně na povrchu materiálu. Nejčastější parametr, s nímž se při popisu drsnosti můžeme setkat, je průměrná aritmetická odchylka profilu povrchu (R_a), popisující velikost nerovností ve smyslu vyvýšenin i prohlubní na povrchu materiálu.

Pozitivní vliv drsnosti na adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk je popsán v mnoha studiích. Pokusy Nebe *et al.* (2007) na titanových discích upravených na různou drsnost ($R_a = 0,54 - 48,59 \mu\text{m}$) ukázala, že zvyšující se drsnost povrchu podporovala ve vyšší míře adhezi a proliferaci osteoblastů MG-63 v porovnání s leštěným kontrolním materiálem ($R_a = 0,07 \mu\text{m}$) a viditelně ovlivnila organizaci cytoskeletu v čase. Ve vztahu ke struktuře a tvaru nerovností byla zaznamenána změna v rozprostírání těchto buněk na povrchu s ostrými hranami po tryskání korundem. Pozorovány byly také změny v expresi integrinových podjednotek a délky integrinových adhezních spojení.

Cytoskelet myších osteoblastů MC3T3-E1 ve studii autorů Eisenbarth *et al.* (2002) vytvářel rozsáhlejší síť aktinových stresových vláken a větší hustotu fokálních adhezí na titanových discích se zdrsňelým povrchem ($R_a = 1,4 \mu\text{m}$) než na leštěném povrchu kontrolního vzorku ($R_a = 0,04 \mu\text{m}$).

Rovněž *in vivo* studie provedená na králících (Hayakawa *et al.* 2000) ukázala pozitivní efekt tibiálních a femorálních titanových implantátů pokrytých vrstvou kalcium fosfátu (CaP) o tloušťce 2-4 μm při vhojování do kosti. Oproti hladkým implantátům bez CaP vrstvy zde byla po 12 týdnech zaznamenána větší plocha kontaktu s novotvořenou kostní tkání a lepší ukotvení v kosti.

Nanotopografická modifikace povrchové oxidické vrstvy titanového implantátu ionty Ca^{2+} , kterou provedli Anitua *et al.* (2015) nejprve *in vitro* na lidských fetálních osteoblastech (hFOb) dokládá zvýšenou adhezi, proliferaci i diferenciaci v přítomnosti pomalu se uvolňujících iontů z povrchové vrstvy. Jako marker diferenciaci byl v této studii zvolen osteopontin. Osteointegrace stejného implantátu byla úspěšně otestována *in vitro* v tibií ovce.

6. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Studium biokompatibility a sledování interakcí buňka-kov *in vitro* na materiálech určených pro krátkodobé použití v kostních implantátech.
 - Porovnání vlastností slitiny Ti-6Al-4V ELI povrchově upravené prostřednictvím elektrochemické anodizace v různých elektrolytech s nemodifikovaným materiálem.
 - Hodnocení vlivu úprav povrchu na adhezi, viabilitu a proliferaci kostních buněk s využitím lidských osteoblastům podobných buněk linie Saos-2.
 - Kvantifikace osteogenní diferenciací buněk pomocí různých metod porovnáním produkce vybraných markerů (např. kolagen typu I, osteokalcin, alkalická fosfatáza).

2. Posouzení vhodnosti zkoumaných modifikací pro:
 - Použití k výrobě implantátů pro trvalou či dočasnou osteosyntézu.
 - Další výzkum a případné testování biokompatibility *in vivo*.

7. MATERIÁLY

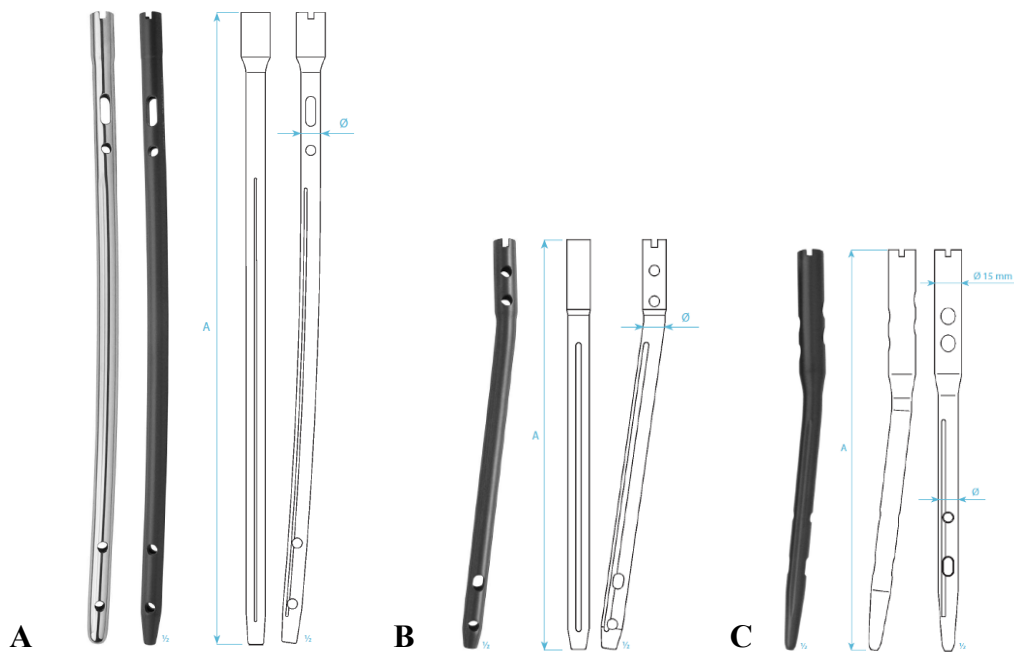
7.1 Použité materiály

V této práci byly hodnoceny kovové materiály ze slitiny Ti-6Al-4V ELI (Extra Low Interstitial), povrchově upravené procesem plazmatické elektrolytické oxidace (PEO) v elektrolytech různých složení (viz **Příloha A**) v kombinaci s mechanickou předúpravou a/nebo konečnou povrchovou úpravou (popsáno v následující kapitole). Vzorčky ve formě disků (\varnothing 15 mm, tloušťka 2,5 mm; **Obr. 11**, str. 38) byly vyrobeny firmou MEDIN a.s. (Nové Město na Moravě, Ing. Jaroslav Marvan) ve spolupráci s firmou VÚHŽ a.s. (Dobruška, Ing. Roman Gabor), v rámci společného grantového projektu (TAČR, grant č. TA04011214), za účelem výzkumu a optimalizace technologie elektrochemické anodizace, jejímž cílem bylo vytvoření modifikovaného povrchu titanové slitiny Ti-6Al-4V ELI s vlastnostmi odpovídajícími traumatologickým aplikacím do kostní tkáně pro potřeby krátkodobých implantátů (hřebky – **Obr. 7**, zajišťovací šrouby – **Obr. 8**, dlahy – **Obr. 9**; Str. 37).

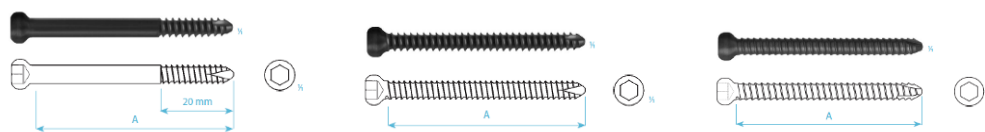
Slitina Ti-6Al-4V ELI (Titan grade 23) je varianta slitiny Ti-6Al-4V (Titan Grade 5) nejčastěji používaná pro výrobu ortopedických implantátů. Oproti původní slitině Ti-6Al-4V jde o verzi s nižší pevností, avšak vyšší tažností, za což vděčí sníženému obsahu kyslíku a železa. Maximální obsah jednotlivých prvků slitiny určuje americká norma ASTM (**Tab. 1**). Youngův modul pružnosti obou verzí slitin je *de facto* stejný a udává se kolem 110 GPa (Disegi 2000; Material Properties Database: www.makeitfrom.com).

Tab. 1: Srovnání % zastoupení jednotlivých prvků ve slitině Ti-6Al-4V a Ti-6Al-4V ELI. Material Properties Database – www.makeitfrom.com; Disegi (2000).

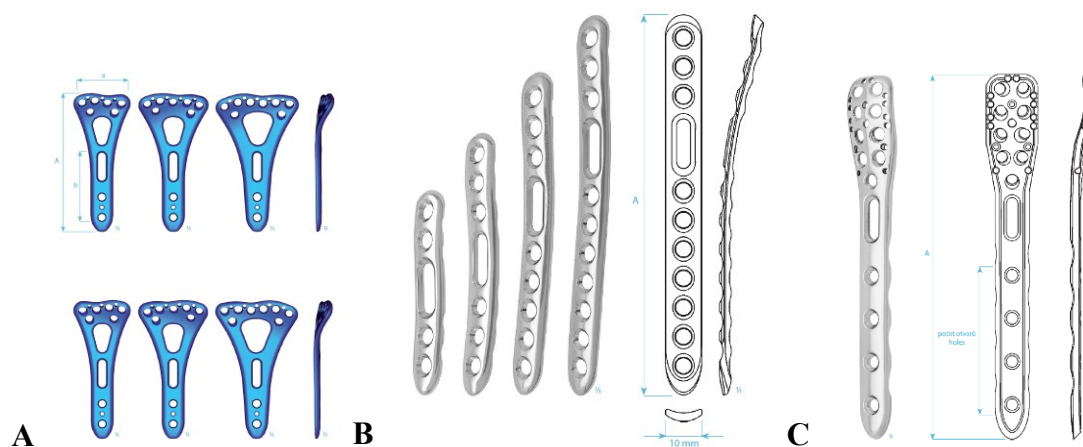
Max [%]	N	C	H	Fe	O	Al	V	Ti
TAV	0,05	0,08	0,015	0,30	0,20	5,5 - 6,75	3,5 - 4,5	87,4 - 91
TAV ELI	0,05	0,08	0,012	0,25	0,13	5,5 - 6,5	3,5 - 4,5	88,1 - 91



Obr. 7: Hřeby. Hotové výrobky připravené firmou MEDIN, a.s. – A) hřeb femorální nitrodřeňový, B) hřeb retrográdní nitrodřeňový, C) hřeb rekonstrukční. Převzato z medin.cz, © 2017, MEDIN, a.s.



Obr. 8: Zajišťovací šrouby. Hotové výrobky připravené firmou MEDIN, a.s. Převzato z medin.cz, © 2017, MEDIN, a.s.



Obr. 9: Dlahy. Hotové výrobky připravené firmou MEDIN, a.s. – A) dlahy radiální distální volární úhlově stabilní, B) dlahy fibulární distální úhlově stabilní, C) dlahy humerální proximální úhlově stabilní. Převzato z medin.cz, © 2017, MEDIN, a.s.



Obr. 10: Příklady použití implantátů na RTG snímcích. A) Dlahová osteosyntéza proximálního humeru. Křivohlávek *et al.* (2014), obr. 3a. B) Osteosyntéza proximálního femuru nitrodřeňovým hřebem. Zdravotnické noviny (4/2012), www.zdn.cz.

Jako referenční materiály byly zvoleny surové vzorky slitiny Ti-6Al-4V ELI o výše uvedeném průměru a tloušťce, upravené pouze mechanicky jemným soustružením a kartáčováním (kontrolní vzorky, značeno Ctrl), mikroskopická krycí sklíčka (Menzel-Gläser, Německo, \varnothing 12 mm; vzorky značeny „sklo“) a polystyren (dna standardních kultivačních komůrek od firmy TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko; průměr komůrky 15,4 mm; značeno jako PS).

Testy vzorků byly prováděny po jednotlivých sadách tak, jak byly připraveny a dodávány po domluvě se spolupracujícím pracovištěm. Sady III, IV a V byly opětovně testovány rovněž v rámci společných pokusů.



Obr. 11: Vzorky slitiny Ti-6Al-4V ELI. Ilustrační foto III. sady vzorků.

7.2 Příprava materiálů, jejich konečná úprava a charakterizace

Materiál pro výrobu vzorků byl poskytnut firmou MEDIN, a.s (Nové Město na Moravě, Ing. Jaroslav Marvan) v surové formě, strojně opracované pro účely vývoje technologie elektrochemické anodizace a modifikace povrchu. Později také ve formě již hotových výrobků (hřebů, šroubů a dlah) pro optimalizaci procesu mechanické předúpravy a následné anodické oxidace. Mechanická předúprava, povrchová modifikace a charakterizace většiny chemických a fyzikálních parametrů vzorků (viz níže) probíhala ve firmě VÚHŽ, a.s. v týmu pod vedením pana Ing. Romana Gabora.

Všechny vzorky, včetně kontrolních, nejprve prošly mechanickou předúpravou povrchu tryskáním gumovkou (zrnitost 120) a omlety keramickými omílacími tělísky na drsnost $Ra = 0,15 \mu\text{m}$ (tělíska PI 4 x 10 ZS; zařízení Turbofin, 1 hod.). Chemická předúprava byla provedena odmaštěním pomocí n-hexanu a mořením ve směsi kyselin HNO_3/HF , což vedlo k odstranění kontaminantů a přirozené oxidické vrstvy, která se běžně na titanových slitinách tvoří (viz **kapitola 3**, str. 23). Tato spontánně vytvořená vrstva dosahuje 3 – 10 nm (de Viteri *et* Fuentes 2013). Povrchy byly doleštěny za použití keramických tělísek (RP 6 x 10 ZS, 1 hod.) a leštící směsi KFF 100 v zařízení Turbofin. Vzorky sady I byly upraveny anodickou oxidací v nízkonapěťovém režimu. Vzorky sady II, III, IV a V byly po opracování upraveny metodou plazmatické elektrolytické oxidace (PEO, vysokonapěťový režim). Tato technika, také nazývaná technikou mikroobloukové oxidace (MAO), anodizace typu II, je používána k vytvoření tenké funkční oxidické vrstvy, tvořené převážně z TiO_2 , na povrchu materiálu. Proces probíhá v elektrolytu přiložením elektrického napětí na systém anoda – katoda podobně jako u klasické anodizace. Kovový materiál připravený k modifikaci tvořící anodu je ponořen do roztoku elektrolytu. Mezi anodu a katodu je aplikováno střídavé napětí s nesymetrickým průběhem. Napětí na anodě se pohybuje v rozmezí 150–1000 V (Liu *et al.* 2004). Při PEO dochází k modifikaci rostoucí vrstvy na anodě prostřednictvím mikroplazmových výbojů vznikajících na rozhraní kovu a elektrolytu při průchodu elektrického proudu (de Viteri *et* Fuentes 2013) (**Obr. 12**, str. 40). Pro detailnější popis úpravy vzorků viz články spolupracující skupiny Gabor *et al.* (2015, 2016), citace viz **Příloha C**.

Vzniklý keramický povlak napomáhá chránit materiál proti korozi, zvyšuje jeho tvrdost a pevnost, adhezi a odolnost proti opotřebení (Liu *et al.* 2004). Architektura povlaku vytvořeného pomocí PEO je dvouvrstvá – tvořená přechodovou vrstvou a vnější mikroporézní vrstvou z mnoha jemných dutinek. Takto vytvořená vrstva je složena jak

z oxidů kovu, tak složek elektrolytu (Krzakała *et al.* 2013; Wang *et al.* 2005). Kvalita výsledné povrchové vrstvy je ovlivněna různými parametry anodizace: složením elektrolytu, teplotou, použitým napětím, proudovou hustotou, časem aplikace, typem anodizovaného materiálu *etc.* (Liu *et al.* 2004). Např. tloušťka výsledného povlaku je typicky vyšší v závislosti na zvyšujícím se použitým napětí (Krzakała *et al.* 2013).



Obr. 12: Výboj plazmatu na rozhraní kov-elektrolyt, kterého je nutno dosáhnout pro vytvoření potřebné keramické vrstvy. Ilustrační foto. VÚHŽ, a.s.

Surové povrchy vzorků byly připraveny pomocí výše uvedené mechanické a chemické předúpravy, poté anodizovány a následně znovu mechanicky upravovány různými způsoby za účelem odstranění svrchní porézní vrstvy. Vzorky Ctrl a Ctrl-n byly připraveny pomocí jemného soustružení a kartáčování (viz tabulka v části **Příloha A**).

Drsnost vzorků byla měřena pomocí přístroje Taylor Hobson Form Talysurf 50 a vyjádřena parametry Ra (průměrná aritmetická odchylka profilu povrchu) a Rz (největší výška profilu povrchu, čili součet výšky nejvyššího výstupku a hloubky nejnížší prohlubně). Rozbor topografie povrchu a jeho chemického složení byl proveden s použitím rastrovacího (skenovacího) elektronového mikroskopu (REM, SEM) Quanta 450 FEG (FEI Company, USA) s autoemisním zdrojem. Tloušťky povlaků byly hodnoceny na metalografických řezech. Parametry drsnosti, tloušťku povrchové vrstvy a složení elektrolytů u jednotlivých vzorků uvádí tabulka v části **Příloha A**. Dále byly provedeny tribologické testy, strukturní analýza povrchu, měření samovolných korozních potenciálů, test nanoindentace a Ramanova analýza, které nejsou součástí této práce (viz články spolupracujících autorů vydané v Hutnických listech – **Příloha C**). Jedinou výjimkou je uvedení mikrofotografií získaných při Ramanově spektroskopické analýze, dokumentující rozdílnou homogenitu povrchových vrstev u vzorků I. sady. Autorka práce charakterizovala smáčivost vzorků (**kapitola 8.1**, str. 41) a zpracovala veškerá biologická hodnocení, která jsou podkladem diplomové práce.

8. METODY

8.1 Měření kontaktního úhlu kapalin na vzorcích a stanovení povrchové energie

Kontaktní úhel je důležitý z hlediska interakce materiálu a buněk ve vodném prostředí, tj. prostředí kultivačního média či tělních tekutin (viz **kapitola 5.2**, str. 30).

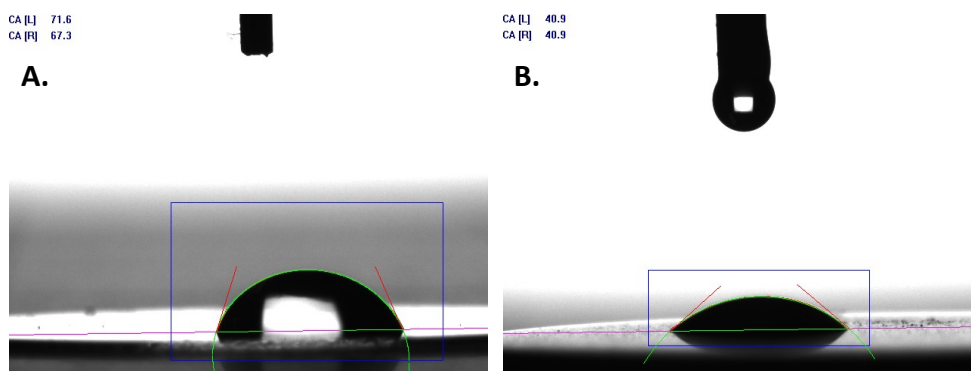
Vzorky byly odmaštěny ponořením do ethanolu po dobu 2 hodin a následně omyty destilovanou vodou. Na vzorcích byl nejprve stanoven statický kontaktní úhel kapalin a povrchová energie pro stanovení smáčivosti materiálu. Měření bylo provedeno metodou analýzy profilu přisedlé kapky.

Kontaktní úhel byl měřen na přístroji Krüss DSA 100 (Krüss GmbH, Německo). K měření byly použity dvě testovací kapaliny: destilovaná voda a glycerol. Měření bylo provedeno pomocí kapek o objemu 3 μl na 8 různých místech na vzorku. Interval mezi nanesením kapky na vzorek a vyhotovením snímku pro měření kontaktního úhlu byl stanoven na 10 sekund. Kapce je po tuto dobu umožněno se roztékat po povrchu vzorku a zaujmout určitý tvar. K vyhodnocení kontaktního úhlu a stanovení povrchové energie byl použit software DSA4 (Drop Shape Analyzer 4). Kontaktní úhel byl stanoven metodou tangent 1, případně tangent 2 (vyhovovala-li lépe tvaru kapky). Měření probíhalo za laboratorní teploty. K vyhodnocení a výpočtu povrchové energie byla použita metoda Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK). Přístroj byl zpřístupněn s laskavým svolením paní Ing. Nikoly Slepíčkové Kasákové, Ph.D. z Ústavu inženýrství pevných látek VŠCHT Praha.

Nejprve bylo provedeno důkladné odvzdušnění jehel pro aplikaci kapalin. Na držák přístroje byl umístěn vzorek na podložním sklíčku a pomocí počítačového programu byla kamera zaostřena na hrot jehly nad vzorkem. Po nastavení testovací kapaliny ze zásobníku, požadovaného objemu kapaliny (3 μl) a nasměrování jehly nad vybrané místo na vzorku došlo k nanesení kapaliny na vzorek a spuštění odpočtu (10 sekund). Během této doby bylo kapce umožněno se roztékat na vzorku, než zaujala relativně stálý tvar vhodný k měření. Po uplynutí stanovené doby byl pořízen snímek profilu kapky pomocí integrované kamery. Interval mezi nanesením kapaliny a pořízením snímku slouží k normalizaci získaných dat a zajištění neměnného stavu kapky v průběhu provádění dalších úkonů potřebných k výpočtu kontaktního úhlu a stanovení povrchové energie.

Kapaliny nanesené na vzorcích mohou mít tendenci se dále roztékat. Zároveň dochází k odparu kapaliny, což dále ovlivňuje tvar profilu kapky.

Pomocí programu byla nastavena základní linie (baseline) tak, aby kopírovala rovinu dotyku kapky se vzorkem. Korekce byla provedena podle místa styku okrajů kapky a povrchu vzorku. Křivka kopírující tvar kapky a tečny pro výpočet kontaktního úhlu byly vyneseny programem automaticky. V případě potřeby bylo umístění základní linie dodatečně manuálně zkorigováno. Pro analýzu tvaru byla zvolena metoda tangent 1 (eliptický oblouk; neměla-li kapka dokonale kruhový profil, ale kruhu se blížila), nebo tangent 2 (proložení polynomem; byla-li kapka nestandardně tvarovaná) v případě, že lépe vyhovovala tvaru kapky. Vynesené tečny s povrchem vzorku svírají kontaktní úhel. Povrchová energie vzorku se vypočítá na základě kontaktního úhlu. Výpočty byly provedeny programem automaticky za použití metody OWRK.



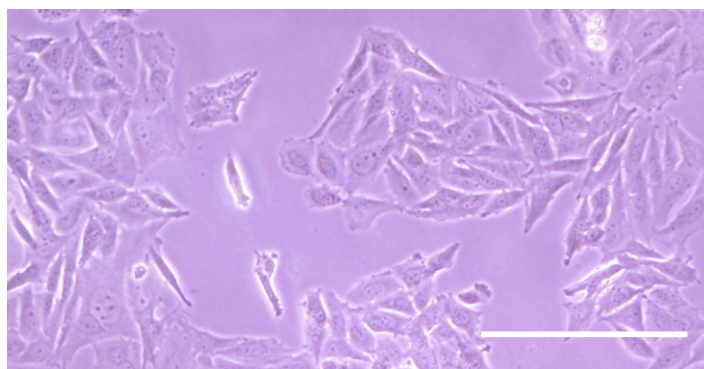
Obr. 13: Měření kontaktního úhlu metodou přisedlé kapky na přístroji Krüss DSA 100 (Krüss GmbH, Německo). A) vodní kapka na skle; B) glycerolová kapka na vzorku 8T.

8.2 Příprava a sterilizace vzorků pro tkáňové kultury

Pro testování v kulturách kostních buněk byly vzorky odmaštěny a sterilizovány. Byly ponořeny na 2 hodiny do 70% ethanolu při laboratorní teplotě, promyty destilovanou a deionizovanou vodou a následně sterilizovány v autoklávu (Tuttnauer 2540 ELC; 120 °C, 101,5 kPa, 60 min) v kádinkách překrytých hliníkovou folií. Před vložením do testovacích 24-jamkových destiček (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko) bezprostředně před započítáním pokusu byly vzorky ponechány k osušení ve sterilním prostředí na Petriho miskách v laminárním boxu, rozdělené a označené podle příslušných skupin.

8.3 Použitý buněčný model

Pro testování adheze, proliferace a diferenciace kostních buněk na materiálech *in vitro* byla zvolena buněčná linie Saos-2 (ATCC-HTB-85, Chemos). Ačkoliv buňky Saos-2 pocházejí z osteosarkomu, jsou považovány za dobrý model osteogenní diferenciace, fenotypově odpovídající zralým osteoblastům, a s podobnou úrovní exprese osteogenních markerů jako u normálních lidských osteoblastů (HOb). Kontaktní inhibice, kterou normální buňky v prostředí *in vitro* vykazují, je v případě Saos-2 částečně potlačena. Rychlost proliferace v kultuře u této linie je relativně vysoká (přestože nižší než např. u buněk MG-63), čímž se od HOb odchyľuje především v pozdějších fázích udržování kontinuální kultury. Vykazuje ovšem podobný mineralizační potenciál, s kalcifikovanou ECM vytvářející strukturu podobající se plst'ovité kostní tkáni. Má značně vyšší aktivitu ALP než jiné osteosarkomové linie, která je srovnatelná s HOb pouze v raných fázích. Míra exprese cytokinů a růstových faktorů je taktéž obdobná jako u HOb (Czekanska *et al.* 2012, 2014). Na rozdíl od další běžně používané linie – myších preosteoblastů M3T3-E1, má linie Saos-2 výhodu použití buněk pocházejících ze stejného živočišného druhu, tj. člověka. Oproti MG-63 mají buňky Saos-2 výhodu schopnosti pokročilé diferenciace vedoucí k mineralizaci. Podle Hausser *et Brenner* (2005) vykazuje Saos-2 se vzrůstajícím počtem pasáží postupné změny v proliferační kinetice (vzrůst), aktivitě ALP (pokles) a urychlení mineralizačních procesů. Proto v této práci byly použity pouze buňky z rozmezí 79.–83. pasáže. Komerčně byly buňky dodány v 75. pasáži.



Obr. 14: Kultura lidských kostních buněk linie Saos-2 podobných osteoblastům. Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10×, měřítko 200 μm .

8.4 Kultivační podmínky

Buňky Saos-2 byly nasazovány na vzorky v počáteční hustotě 20 000 buněk/jamka (přibližně 10 730 buněk na cm^2). Pouze v případě pokusů pro hodnocení qPCR byly nasazovány v počáteční hustotě 30 000 buněk/jamka (přibližně 16 090 buněk na cm^2) pro větší výtěžnost RNA. Viabilita buněk při nasazení byla stanovena přístrojem Vi-Cell XR 2.03 Analyser (Beckman Coulter, Inc.), který analyzuje množství živých a mrtvých buněk v suspenzi po jejím obarvení trypanovou modří, výsledek přepočítává a uvádí jako počet buněk na 1 ml. Buňky byly kultivovány v 24-jamkových destičkách (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko) s jednotným objemem média 1,5 ml na vzorek. Jako kontrola byly použity vzorky neanodizované slitiny Ti-6Al-4V ELI, mikroskopická krycí sklička a dna kultivačních jamek polystyrenových destiček.

Pro sledování proliferace byly buňky Saos-2 kultivovány v kultivačním médiu McCoy 5A (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), doplněném 15% fetálního bovinního séra (FBS; GIBCO, Life Technologies) a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycinu (LEK, Ljubljana, Slovenia), po dobu 1, 4, 7 a 14 dnů (pokud není uvedeno jinak). Toto médium bylo pro účely vyhodnocování pokusů označováno jako standardní médium (NORM). Pro hodnocení diferenciaci byly Saos-2 souběžně kultivovány po dobu 7 dnů (nebo 9 dnů) ve standardním médiu (NORM), tj. do dosažení subkonfluencí, a poté dalších 7 dnů v médiu podporujícím osteogenní diferenciaci (značeno DIF) o stejném složení jako NORM, dále doplněném o β -glycerolfosfát (10 mM), L-glutamin (2 mM), kyselinu askorbovou (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), dihydroxyvitamin D3 (10^{-6} M) a dexamethason (10^{-8} M). Média byla vyměňována každý 3. den.

Podle studie autorů Jørgensen *et al.* (2004) výše zmíněné doplňky DIF média podporují osteogenní diferenciaci osteoblastů a produkci diferenciacních markerů. Např. přidání dexamethasonu stimuluje Saos-2 k vyšší produkci ALP a zároveň zvyšuje citlivost jejich receptorů k dihydroxyvitaminu D3 (Czekanska *et al.* 2012).

Buňky ve všech pokusech byly kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C, s vlhkostí atmosféry cca 95 % a s 5% koncentrací oxidu uhličitého.

8.5 Hodnocení adheze a proliferace

Hodnocení proliferace buněk bylo prováděno v časových intervalech 1, 4 a 7 a 14 dnů (pokud není uvedeno jinak) u buněk kultivovaných ve standardním médiu (NORM) a v intervalu 14 dní u buněk kultivovaných v médiu diferenciačním (DIF). Byl stanovován počet buněk a jeho vývoj v čase na jednotlivých vzorcích, zjišťována iniciální plocha rozprostření buněk po prvním dni kultivace a hodnocena buněčná morfologie.

8.5.1 Vizualizace buněk fluorescenčním barvením

Ve vybraných časových intervalech kultivace (1., 4., 7. a 14. den) byly buňky fixovány a barveny fluorescenčními barvivy pro vizualizaci proteinů buněčné membrány a cytoplasmy (červené barvivo Texas Red C₂-Maleimid; Molecular Probes, Invitrogen, UK) a DNA buněčného jádra (modré barvivo Hoechst #33258; Sigma-Aldrich Co., USA). Po 1 a 4 dnech kultivace byly buňky barveny oběma fluorescenčními barvivy, a po 7 a 14 dnech pouze modrým barvivem Hoechst #33258 pro vizualizaci jader.

Buňky byly opláchnuty ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfáty (PBS, Phosphate Buffered Saline; Sigma-Aldrich Co., USA), fixovány ethanolem vychlazeným na -20 °C po dobu 10 min a, po omytí PBS barveny fluorescenčními barvivy Texas Red C₂-Maleimid (20 ng/ml PBS) a Hoechst #33258 (5 µg/ml PBS) po dobu 1 hodiny ve tmě při laboratorní teplotě. Vzorky byly prohlíženy a fotografovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu Olympus IX 51 (obj. 10×, 20×) vybaveného digitální kamerou DP 70 (obojí Olympus Corp., Tokyo, Japonsko) v množství 20 mikrosnímků náhodně vybraných oblastí rovnoměrně rozložených po povrchu materiálu pro každý vzorek. Pro každý časový interval a experimentální skupinu byly použity vždy dva vzorky ve dvou různých biologických experimentech.

8.5.2 Hodnocení populační hustoty buněk

Počty buněk rostoucích na jednotlivých vzorcích ve vybraných časových intervalech (1., 4., 7. a 14. den kultivace) byly stanovovány prostřednictvím analýzy pořízených mikrofotografií v programu ImageJ FIJI (<https://imagej.net/Fiji>; Schindelin *et al.* 2012). Na snímcích viditelný modrý fluorescenční signál označuje buněčná jádra. V časových intervalech 1. a 4. den byly počty jader na zorných polích snímků vyhodnoceny programem automaticky s použitím makra vytvořeného autorkou práce

(viz **Příloha B**). Po 7 a 14 dnech kultivace již byla kultura natolik hustá, že nebylo možné automatické vyhodnocení použít, a proto byly počty jader spočítány manuálně s použitím funkce Multi-point. Počty buněk byly přepočítány ze zorného pole na cm^2 . Data jsou prezentována jako medián naměřených hodnot s kvartily (25, 75) a percentily (5, 95) ze 40 mikrofotografií pro každou experimentální skupinu pořízených dohromady ve dvou biologických experimentech. Data jsou graficky znázorněna také formou růstových křivek pro posouzení dynamiky proliferace buněk na jednotlivých vzorcích v průběhu časových intervalů (1., 4. a 7. den kultivace). Data ze 14. dne kultivace prezentována nejsou, byla však použita k přepočtu získaného fluorescenčního signálu při hodnocení produkce kolagenu typu I buňkami.

8.5.3 Viabilita buněk a cytotoxicita

Počáteční viabilita buněk při nasazení na vzorky (0. den) byla stanovována pomocí přístroje Vi-Cell XR 2.03 Analyser (Beckman Coulter, Inc., viz **kapitola 8.3**, str. 43). V následujících dnech kultivace byla viabilita buněk hodnocena barvením pomocí kitu LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity kit (ThermoFisher Scientific, USA). Buňky byly barveny současně dvěma fluorescenčními barvivy – calceinem-acetoxymethylem a ethidium homodimerem 1 (EthD-1). Calcein-AM sám o sobě fluorescenční není, avšak prostupuje semipermeabilní membránou živých buněk a prostřednictvím intracelulární esterázy je enzymaticky štěpen za vzniku produktu (calcein) emitujícího intenzivní zelené fluorescenční záření. K obarvení mrtvých buněk dojít nemůže, neboť ty již aktivní intracelulární esterázy neobsahují. Mrtvé buňky jsou barveny červeným barvivem ethidium homodimer-1. Ten indikuje ztrátu integrity buněčné membrány, neboť přes intaktní membránu buněk za normálních okolností neprochází. K mnohonásobné amplifikaci jeho fluorescence dochází až po vazbě na nukleové kyseliny jádra.

Pro lepší přehled o počtu živých buněk bylo k barvení buněk po 7 dnech kultivace přidáno fluorescenční barvivo Hoechst #33342 (modrá fluorescence), které barví jádra živých buněk. Měření byla provedena pouze na závěrečných sadách vzorků (sady č. III, IV a V). Pro každý jednotlivý vzorek ve všech hodnocených časových intervalech bylo pořízeno 16 mikrofotografií zorného pole pro každou experimentální skupinu ve dvou biologických experimentech. Počty živých a mrtvých buněk na jednotlivých snímcích byly porovnány a přepočteny na procenta z celkového počtu buněk. Výsledné hodnoty vyjadřují viabilitu buněk na vzorcích v procentech.

8.5.4 Plocha rozprostření a morfologie buněk

Plocha iniciálního rozprostření buněk na vzorcích a jejich morfologie byla sledována a měřena 1. den po nasazení. Buňky vizualizované pomocí fluorescenčních barviv Texas Red C₂-Maleimid (20 ng/ml) a Hoechst #33258 (5 µg/ml) byly při zobrazení v epifluorescenčním mikroskopu Olympus IX 51 (obj. 20x) fotografovány pomocí kamery DP 70 (obojí Olympus Corp., Tokyo, Japonsko). Plochy buněk byly měřeny na pořizovaných snímcích s použitím programu Atlas (Tescan Ltd., Brno, Česká Republika). Hodnoty byly vyjadřovány v µm². Plochy rozprostření byly měřeny pouze u buněk, které se nevyskytovaly v kontaktu s jinými buňkami, což by mohlo ovlivnit plochu rozprostření buněk. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr naměřených hodnot ± střední chyba průměru (S.E.M.) z různého počtu buněk (n = 100 – 200) ze 40 mikrofotografií z dvou nezávislých vzorků pro každou experimentální skupinu pořizovaných ve dvou biologických experimentech.

8.6 Hodnocení diferenciac

Diferenciace buněk byla posuzována na základě jejich extra- a intracelulární produkce kolagenu typu I, relativní genové exprese markerů osteogenní diferenciac osteoblastů, jako jsou kolagen typu I, alkalická fosfatáza a osteokalcin, a porovnáním úrovně depozice vápníku mezi buňkami rostoucími na testovaných materiálech.

8.6.1 Imunofluorescenční barvení buněčné produkce kolagenu typu I

Kolagen typu I tvoří nezastupitelnou součást organické složky extracelulární matrix kostní tkáně. Osteoblasty zahajují jeho sekreci v rané fázi remodelačního cyklu, jeho produkce je považována za časný ukazatel osteogenní diferenciac.

Pro hodnocení produkce kolagenu byly buňky Saos-2 nejprve kultivovány na vzorcích po dobu 7 dní ve standardním kultivačním médiu McCoy's 5A s 15 % FBS. Toto médium bylo sedmý den kultivace odebráno a bylo přidáno médium podporující osteogenní diferenciaci (DIF), v němž byly buňky kultivovány dalších 7 dní. Paralelní skupina vzorků o stejném počtu byla za stejných podmínek osazena buňkami a kultivována po dobu 14 dní pouze ve standardním médiu (NORM). Produkce

kolagenu typu I byla stanovována pomocí imunofluorescenčního barvení a následné obrazové analýzy pořízených mikrofotografií.

Buňky byly promyty v PBS, fixovány 70 % ethanolem vychlazeným na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a znovu propláchnuty PBS. K zablokování nespecifických vazeb byly vzorky ponořeny v roztoku 1% bovinního sérového albuminu a 0,1% tritonu v PBS (20 minut) a po oplachu PBS následně v roztoku 1% Tweenu v PBS (dalších 20 minut). Dále byla přes noc aplikována králičí protilátka proti kolagenu typu I (Cosmo Bio Co., Ltd., USA, Cat. No. LSL-LB-1197, Anti type I Collagen Rabbit), zředěná 1:200 v PBS. Vzorky byly po tuto dobu uloženy v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den, po promytí v PBS, byly vzorky po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě inkubovány v přítomnosti sekundární konjugované anti-králičí protilátky z kozího séra, konjugované s fluorescenčním markerem Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, USA, Cat. No. A-11070, Alexa Fluor 488[®]-conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG), zředěné 1:400 v PBS společně s modrým fluorescenčním barvivem Hoechst #33258 (5 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich Co., USA) k označení buněčných jader. Pomocí epifluorescenčního mikroskopu Olympus IX 51 (obj. 20x) s kamerou DP 70 (obojí Olympus Corp., Tokyo, Japonsko) bylo pořízeno 10 snímků náhodných zorných polí pro každý vzorek (dva na každou experimentální skupinu) při stejné expozici ve dvou rozdílných filtrech (modrý fluorescenční signál zobrazující buněčná jádra, zelený fluorescenční signál zobrazující vyprodukovaný kolagen).

Intenzita fluorescence kolagenu typu I na vzorcích byla měřena v programu Fluorescent Image Analyser při stejném nastavení barevného prahu pro všechny hodnocené snímky. Data byla následně normalizována na počet buněk získaný vyhodnocením modrého fluorescenčního signálu buněčných jader (viz **kapitola 8.5.2**, str. 45). Pro vyloučení fluorescence pozadí byly odečteny hodnoty naměřené na vzorcích kontroly barvení (jeden vzorek pro každou experimentální skupinu, včetně polystyrenu a skla) barvenými bez přidání primární protilátky.

Data jsou prezentována jako medián naměřených hodnot s kvartily (25, 75) a percentily (5, 95) ze dvou experimentálních měření na 20 snímcích pro každý typ vzorku ve dvou biologických experimentech.

8.6.2 Stanovení genové exprese markerů osteogenní diferenciace pomocí qPCR

Buněčná linie Saos-2 je obecně považována za linii s fenotypem zralých osteoblastů (Saldaña *et al.* 2011; Czekanska *et al.* 2012), proto je možné měřit markery osteogenní diferenciace již v krátkých intervalech po nasazení buněčné kultury. Pro hodnocení osteogenní diferenciace bylo proto zvoleno sledování exprese následujících markerů: kolagen typu I (Col I), kostní alkalická fosfatáza (ALP), a osteokalcin (OC). Kolagen typu I je považován za časný marker osteogenní diferenciace, neboť je sekretován osteoblasty ve fázi depozice nové ECM (tvoří až 90 % ECM) a reguluje vývoj osteoprogenitorových buněk. ALP je považována za časný či střednědobý marker vzhledem k její účasti na mineralizaci. Osteokalcin za pozdní marker, který se do osteoidu inkorporuje sekrecí z osteoblastů po zahájení mineralizace (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.* 2006b; Safadi *et al.* 2009; Setzer *et al.* 2009). Jako tzv. house-keeping gen byla vybrána glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH). Cílem experimentu bylo zhodnocení vlivu povrchových modifikací vzorků Ti-6Al-4V ELI na osteogenní diferenciaci buněk kultivovaných v médiu diferenciaci podporujícím (DIF) a ve standardním médiu (NORM).

Měření byla provedena pouze na závěrečných sadách vzorků (sady č. III, IV a V) v rámci společných pokusů. Buňky byly kultivovány na vzorcích vždy ve dvou experimentálních skupinách. První skupina byla kultivována pouze ve standardním kultivačním médiu (NORM) a to po dobu 7 nebo 14 dnů. Skupině druhé bylo standardní kultivační médium sedmý den nahrazeno za médium osteogenní (DIF).

Na vzorcích bylo provedeno hodnocení míry exprese vybraných osteogenních markerů pomocí metody Real-time qPCR. Hodnocena byla exprese genů pro alkalickou fosfatázu (ALP, gen ALPL), osteokalcin (OC, gen BGLAP) a kolagen typu I (Col I, gen COL1A1). RNA byla izolována z buněk Saos-2 pomocí kolonek Total RNA purification Micro Kit Plus (NORGEN Biotek Corp, Cat. No. 48500) podle protokolu udávaného výrobcem. Koncentrace celkové RNA byla změřena na přístroji NanoPhotometerTM S/N (IMPLEN). 300 ng/μl RNA bylo následně použito pro transkripci do cDNA pomocí kitu ProtoScript[®] First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs, Cat. No. E6300L), za použití oligo-dT primerů. Reakce proběhla v přístroji T-Personal Thermocycler (Biometra). Při hodnocení metodou real-time qPCR byly použity primery zakoupené od firmy Generi Biotech s.r.o. (ČR) (**Tab. 2**, str. 50), SYBR Green (FastStart Universal SYBR Green Master; Roche Diagnostics GmbH.) a přístroj iCycler detection system

(iQ™ 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System, BioRad) s následujícími parametry cyklu: nejprve 10 min při 95 °C, a následně 40 cyklů, ve kterých se střídá 15 s při 95 °C a 1 min při 60 °C. Na závěr byla zaznamenána tzv. křivka tání (melting curve). Celkový reakční objem byl 20 µl.

Pokus byl proveden v duplikátech. Data byla analyzována metodou $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Prahová hodnota (termed cycle treshold, C_t) byla stanovena přístrojem automaticky. Změny v expresi cílových genů byly spočítány pomocí rovnice:

$$\Delta\Delta C_t = (C_t^{target} - C_t^{GAPDH})_{sample} - (C_t^{target} - C_t^{GAPDH})_{calibrator}$$

Data byla normalizována podle míry exprese sledovaných genů buňkami Saos-2 rostoucími na polystyrenu (PS, calibrator) ve stejných intervalech kultivace. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD) ze čtyř experimentálních měření na dvou nezávislých vzorcích od každého typu ve dvou biologických experimentech.

Tab. 2: Oligonukleotidové primery použité při amplifikaci RT q-PCR.

Gen	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
COL 1	Forward: 5'-CAGCCGCTTCACCTACAGC-3'	83
	Reverse: 5'-TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC-3'	
ALP	Forward: 5'-GACCCTTGACCCCAACAAT-3'	68
	Reverse: 5'-GCTCGTACTGCATGTCCCCT-3'	
OC	Forward: 5'-GAAGCCCAGCGGTGCA-3'	70
	Reverse: 5'-CACTACCTCGTGCCCTCC-3'	
GAPDH	Forward: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	87
	Reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	

8.6.3 Hodnocení depozice vápníku

Měření byla provedena pouze na závěrečných sadách vzorků (sady č. III, IV a V) v rámci společných pokusů. Buňky byly kultivovány po dobu 7 dní ve standardním médiu a dalších 7 dní v médiu diferenciačním (DIF; III., IV. a V. sada vzorků), nebo po dobu 14 dní ve standardním médiu (NORM; IV. a V. sada vzorků).

Stanovení mineralizace mezibuněčné hmoty proběhlo s použitím kitu Calcium Colorimetric Assay (BioVision, Inc., USA, Cat. No. K380-250) podle protokolu dodávaného výrobcem. Všechny vzorky byly na začátku pokusu přemístěny do nové

24-jamkové kultivační destičky, aby nedošlo k ovlivnění výsledků množstvím vápníku deponovaným buňkami rostoucími mimo vzorky na polystyrenovém dně jamky. Buňky byly opláchnuty dvakrát v PBS a ponechány oschnout v nesterilních podmínkách na laboratorním stole po dobu 1 hodiny. Následně byly inkubovány přes noc v 700 μ l 0,5 M HCl v chladové místnosti (4 °C) na orbitální třepače SSL1 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). Druhý den byly buňky ze vzorků i referenčních materiálů (mikroskopické krycí sklíčko, dno polystyrenové kultivační jamky) seškrábány pomocí škrabky na buňky. Obsah jednotlivých jamek byl stočen na centrifuze (SIGMA. Sartorius, 10 000 rpm, 10 min). Z těchto roztoků bylo odebráno vždy po 600 μ l do čistých eppendorfek podle experimentálních skupin. Kalibrační křivka byla připravena podle návodu výrobce. Do jamek 96-jamkové destičky (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko) bylo napipetováno po 25 μ l v triplicátech pro každý ze 2 vzorků na experimentální skupinu. Do každé jamky bylo následně přidáno 45 μ l Chromogenic Reagent a 30 μ l Calcium Assay Buffer. Po každém kroku byla destička jemně zcentrifugována. Vzorky byly následně ponechány 5-10 minut ve tmě při pokojové teplotě, aby mohla reakce proběhnout. Poté byla destička opět stočena na centrifuze (300 rpm). Bubliny vzniklé v tekutině při centrifugaci byly odstraněny propíchnutím čistou injekční jehlou. Absorbance byla měřena při 575 nm na přístroji Synergy HT Mutli-mode Reader (BioTek) ve výrobcem stanoveném limitu 30 minut. Chromofor v tomto kitu je nestabilní a v průběhu času postupně bledne, absorbance proto byla měřena ihned po dokončení eseje.

Ze standardů obsahujících známou koncentraci vápníku byla vytvořena kalibrační regresní křivka. Na základě regresní rovnice byla naměřená absorbance přepočítána na koncentraci. Získaná data byla přepočítána na plochu vzorku a jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD ze šesti měření na dvou nezávislých vzorcích pro každý typ vzorku.

8.7 Statistická analýza

Vstupní data byla zpracovávána v programu Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., USA). Pro účely statistické analýzy byl použit software SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., USA). Srovnání jednotlivých skupin vzorků bylo provedeno pomocí parametrického testu One Way Analysis of Variance (One Way ANOVA) s použitím metody Holm-Sidak při splnění hodnotících předpokladů (normální rozložení dat, shodnost rozptylů, nezávislost veličin). Pokud nedošlo ke splnění alespoň jednoho z předpokladů, bylo přistoupeno k neparametrickému testu za použití metody Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks v kombinaci s post hoc analýzou metodou Dunnové. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm S.E.M., aritmetický průměr \pm SD (specifikováno pro jednotlivá hodnocení) nebo formou krabicového grafu jako medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil), vousy po 1,5 IQR a extrémními hodnotami vyznačenými černými tečkami ($< 5.$ percentil a $> 95.$). Data z PCR ve formě průměrů Δ Ct byla zpracována pomocí testu One Way ANOVA, metodou Student-Newman-Keuls. Hladina významnosti byla pro PCR stanovena na hodnotu $p \leq 0,001$, pro všechny ostatní výpočty na hodnotu $p \leq 0,05$. Grafy byly vytvořeny v programu SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., USA) a Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., USA). Pokud není v textu uvedeno jinak, byla data shromažďována minimálně ze dvou vzorků z každé experimentální skupiny a časového intervalu v rámci dvou nezávislých experimentů, tj. celkem ze čtyř vzorků.

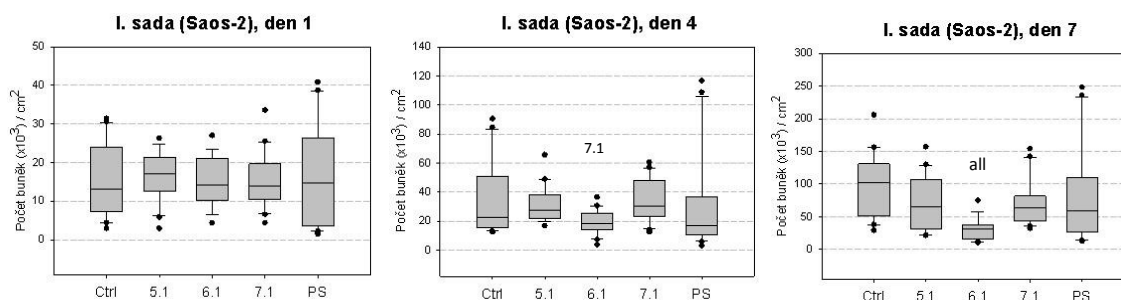
9. VÝSLEDKY

Struktura kapitol v této části práce byla zvolena z důvodu provedení některých testů nejen v rámci jednotlivých skupin vzorků, ale hromadně pouze na závěrečných sadách číslo III, IV a V. Obsah kapitol zároveň ilustruje vývoj k výběru konečné úpravy. Složení elektrolytů použitých k úpravě jednotlivých vzorků Ti-6Al-4V uvádí tabulka v části **Příloha A**.

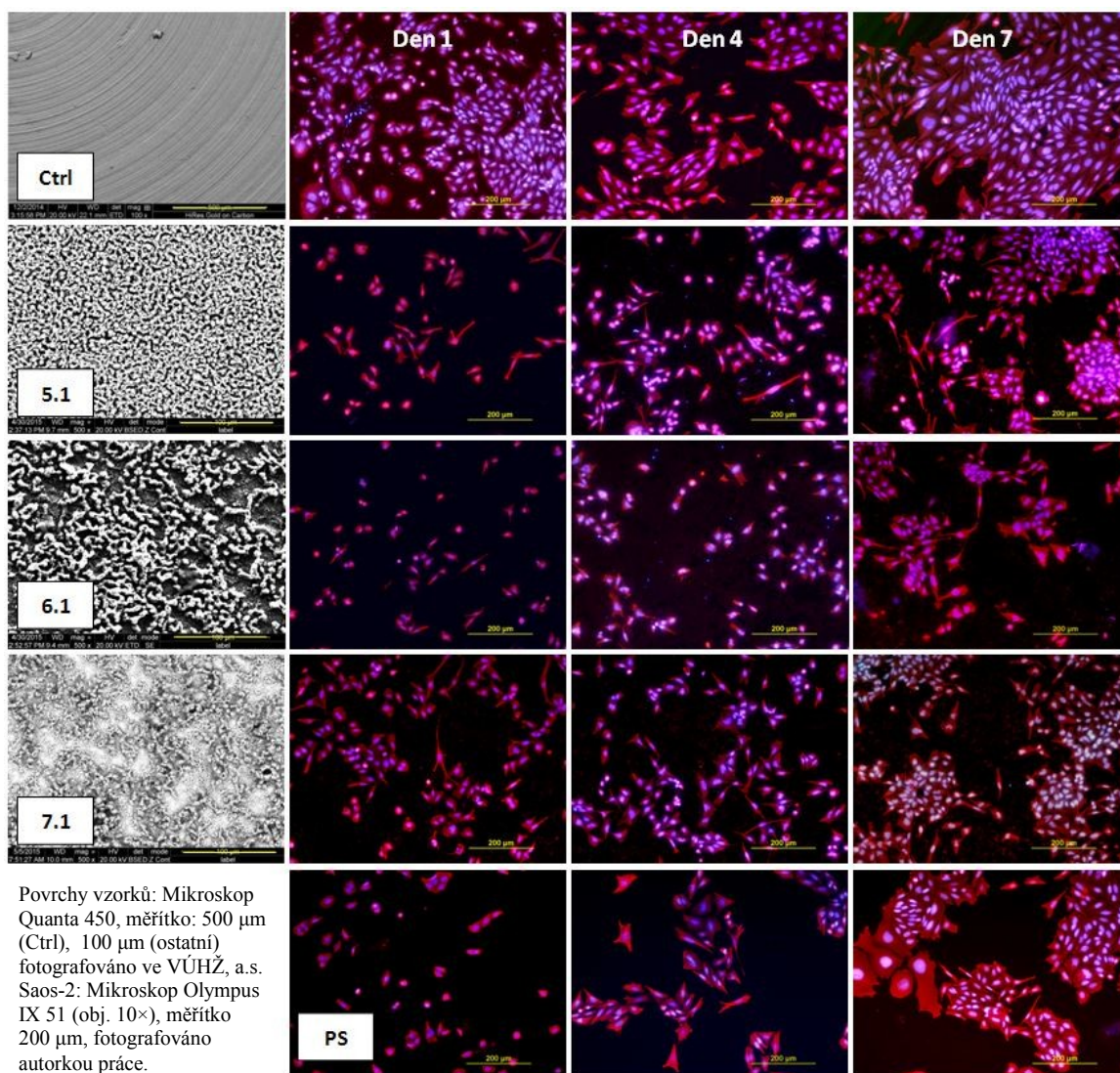
9.1 I. sada vzorků

Na vzorcích I. sady (Ctrl, 5.1, 6.1, 7.1, PS), tj. na vzorcích lišících se složením elektrolytu pro anodizaci, finální úpravou a drsností, a na dnech referenčních polystyrenových jamek (**Příloha A**), byla provedena analýza iniciální adheze (1. den) a proliferace (hodnocení počtu buněk v kultuře 1., 4., 7. den kultivace) ve standardním kultivačním médiu (NORM). Z dalšího testování byly vzorky vyřazeny.

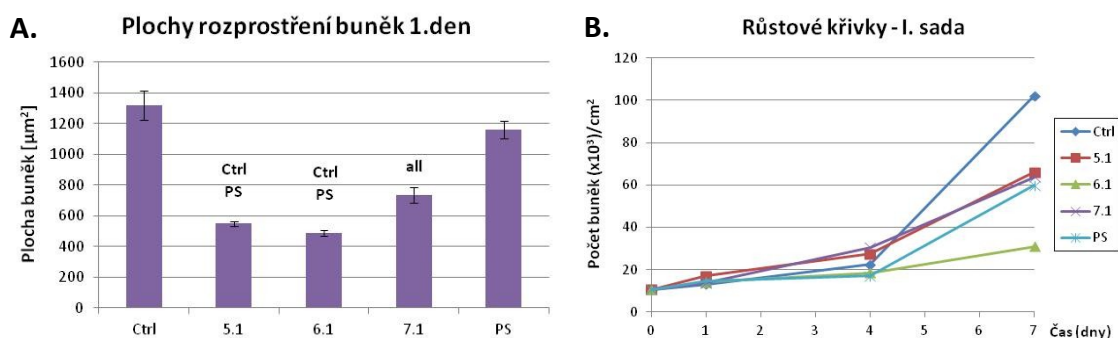
Od 4. dne kultivace lidské osteoblasty linie Saos-2 proliferovaly lépe na vzorcích 5.1 a 7.1. Po 7 dnech byl zaznamenán statisticky významný nejnižší počet buněk na vzorku 6.1 (**Graf 1, Graf 2ab**). Morfologie buněk Saos-2 na sledovaných površích byla 4. den po nasazení spíše protáhlá s dlouhými výběžky nebo polygonální na všech posuzovaných vzorcích, vyjma vzorku 6.1, kde byly pozorovány buňky s menším množstvím výběžků (**Obr. 15**). Menší plocha rozprostření buněk na vzorku 6.1 byla naměřena již první den po nasazení (**Graf 2a**). Za 7 dní byly již buňky na vzorcích 5.1, 6.1, 7.1, kontrolním nemodifikovaném vzorku slitiny (Ctrl) i na dně standardních kultivačních polystyrenových komůrek (PS) dobře rozprostřené.



Graf 1: Populační hustota buněk osteoblastů Saos-2 na vzorcích slitiny Ti-6Al-4V a PS po 1, 4 a 7 dnech kultivace. Počet buněk na vzorku je přepočten na cm^2 . Medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média, extrémní hodnoty vyznačeny černými tečkami. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám).



Obr. 15: Povrchy vzorků, morfologie a proliferace osteoblastů Saos-2 na vzorcích slitiny Ti-6Al-4V (Ctrl, 5.1, 6.1, 7.1) a PS po 1, 4 a 7 dnech kultivace. Buňky barveny fluorescenčními barvivy Texas Red C₂-maleimid (červená fluorescence) a Hoechst #33258 (modrá fluorescence).



Graf 2: A) Plochy rozptřeni lidských osteoblastů linie Saos-2 na vzorcích I. sady. Průměr \pm S.E.M ze 100-200 měření pro každou skupinu vzorků. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. B) Dynamika růstu osteoblastů Saos-2. Data jsou zobrazena jako mediány naměřených hodnot. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám).

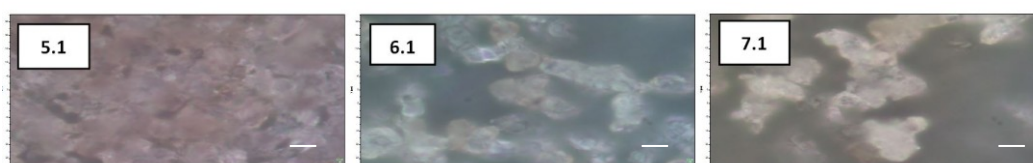
Zaujímaly většinou polygonální tvar, ale dosud nevytvářely souvislou (konfluentní) vrstvu a rostly v ostrůvcích. Pouze na Ctrl byly buňky schopny dosáhnout konfluency, či aspoň subkonfluency (**Obr. 15**).

Ramanova analýza provedená spolupracující skupinou z VÚHŽ, a.s. ukázala, že povrchová vrstva TiO_2 na vzorcích 6.1 byla relativně málo kompaktní (nedostatečně homogenní) ve srovnání se vzorky 5.1, kde byla vrstva téměř souvislá (pro ilustraci viz **Obr. 16**). Obdobná nehomogenita ovšem byla zaznamenána také na vzorcích 7.1. Roli hraje také odlišná drsnost vzorků (**Tab. 3**) a morfologie nerovností na jejich povrchu (**Obr. 15**). Buňky celkově proliferovaly lépe na vzorku 5.1 s relativně hladkým povrchem ($R_a = 0,89 \mu\text{m}$) a vzorku 7.1 s drsným povrchem ($R_a = 2,28 \mu\text{m}$) než na vzorku 6.1 o střední drsnosti ($R_a = 1,54 \mu\text{m}$). Povrchová vrstva všech sledovaných vzorků obsahovala TiO_2 převážně ve formě anatasu, s malou příměsí rutilu.

Z dalšího testování byly vzorky vyřazeny z důvodu uvolňování částic materiálu do kultivačního média (**Obr. 17**). Tento jev ukázal nutnost aplikace další mechanické úpravy povrchu vzorků po anodizaci. Vzhledem k tomu, že se nedařilo dosáhnout homogenní povrchové vrstvy ani při opakovaných aplikacích metodou nízkonapěťové anodizace (40 V, 5 A, 1 min), bylo přistoupeno k její úpravě. Změny byly provedeny také ve složení elektrolytů (viz **Příloha A**).

I. sada	Drsnost [μm]	Tloušťka vrstvy [μm]
	R_a	
Ctrl	$0,16 \pm 0,04$	--
5.1	$0,89 \pm 0,03$	Vysoce porézní
6.1	$1,54 \pm 0,10$	Vysoce porézní
7.1	$2,28 \pm 0,01$	Vysoce porézní

Tab. 3: Parametry vzorků sady I. U této sady nebylo prováděno měření kontaktního úhlu. Vzhledem k vyřazení vzorků z dalšího hodnocení je pro informaci uvedena pouze hodnota R_a . Tloušťka povrchových vrstev nemohla být změřena kvůli jejich velmi poréznímu charakteru. Změřeno ve VÚHŽ, a.s.



Obr. 16: Homogenita vrstev TiO_2 nanesených na vzorky Ti-6Al-4V sady I metodou anodické oxidace v nízkonapěťovém režimu v elektrolytech o různém složení (Příloha A). Snímky pořízeny ve VÚHŽ, a.s. při ostření na měřený bod ve vzorku při hodnocení složení povrchu vzorků Ramanovou spektroskopií. Mikroskop Olympus BX41/51 (obj. 100 \times), měřítko 5 μm .



Obr. 17: Uvolňování částic materiálu do média. Mikroskop Olympus IX 51 (obj. 10 \times), měřítko: 200 μm .

9.2 II. sada vzorků

Na vzorcích II. sady (1, 2, PS, mikroskopické krycí sklo) byla provedena analýza iniciální adheze měřením ploch rozprostření buněk, proliferace (hodnocení počtu buněk v kultuře 1. a 7. den kultivace) a diferenciaci (fluorescenční měření produkce kolagenu typu I po 16 dnech kultivace v médiu NORM nebo 7 dnech v NORM a 9 dnech v DIF).

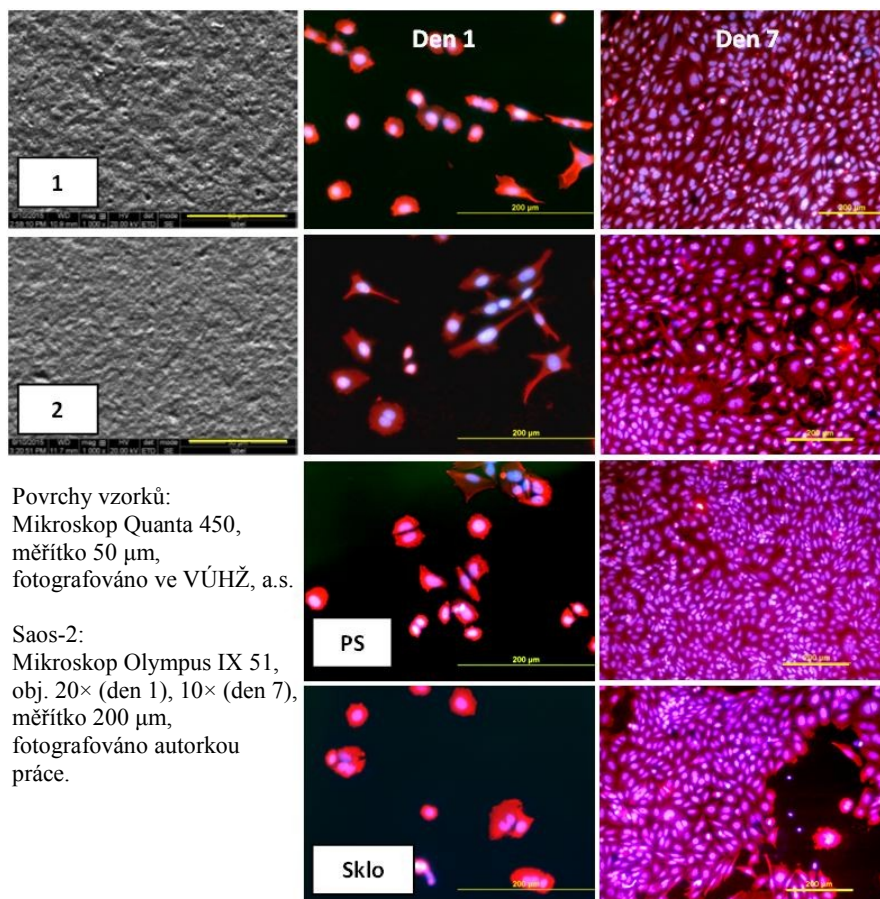
Vzorky II. sady byly již upravovány za použití vysokonapěťového procesu plazmatické elektrolytické oxidace (PEO; 400 V, 2 min) (podrobněji viz **kapitola 7.2**) v elektrolytech o odlišném složení než předchozí sada. Povrchy vzorků byly modifikovány ve dvou typech alkalických roztoků elektrolytů o stejném složení, avšak s různým poměrem jednotlivých látek (**Příloha A**).

Hodnocené modifikované vzorky dosahovaly velmi podobné drsnosti, topografie povrchu a tloušťky povrchové oxidické vrstvy (**Tab. 4, Obr. 18**), která byla oproti vzorkům sady I výrazně tenčí a homogennější, takže mohla být na metalografickém řezu změřena. Naměřené drsnosti povrchů vzorků se blíží hodnotám kontrolních nemodifikovaných vzorků slitiny (Ctrl) z I. sady ($R_a = 0,16 \mu\text{m}$). Povrchy obou vzorků byly mírně hydrofilní, více než porovnávané dno kultivační destičky (PS), s vyšší hodnotou povrchové energie (**Tab. 4**). Počet iniciálně adherovaných buněk Saos-2 za 1 den po nasazení se statisticky významně nelišil na všech testovaných vzorcích, avšak po 7 dnech kultivace bylo nejvyšších počtů dosaženo na vzorcích slitiny č. 1 a na PS (**Graf 4b**). Tyto počty byly statisticky významně vyšší než na vzorcích č. 2 a na skle (**Graf 3**). Při měření plochy rozprostření buněk 1. den po nasazení byla pozorována tendence většího rozprostírání u buněk kultivovaných na vzorcích modifikovaných PEO (vz. 1 a 2). Tento rozdíl dosáhl statistické významnosti u buněk na vzorcích č. 2, kde byla

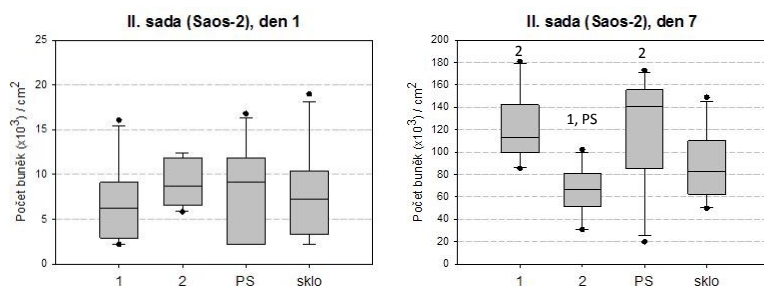
Tab. 4: Parametry vzorků sady II. S touto sadou nebyly dodány kontrolní vzorky slitiny Ti-6Al-4V. Vzorky byly hodnoceny pouze ve srovnání s PS a sklem. Pro složení elektrolytů, v nichž byly upravovány vzorky Ti-6Al-4V viz **Příloha A**. Drsnost a tloušťka vrstvy měřena ve VÚHŽ, a.s. Kontaktní úhel a povrchová energie měřena autorkou práce.

II. sada	Drsnost [μm]		Tloušťka vrstvy [μm]	Kontaktní úhel [°]		Povrchová energie [mN/m]		
	R_a	R_z		H_2O	Glycerol	Celková	Disperzní	Polární
1	$0,15 \pm 0,01$	$1,19 \pm 0,10$	$2,42 \pm 0,13$	$58,1 \pm 2,9$	$109,5 \pm 8,6$	$200,2 \pm 52,4$	$48,2 \pm 23,4$	$152,0 \pm 28,9$
2	$0,12 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,26$	$2,16 \pm 0,10$	$63,4 \pm 1,2$	$81,5 \pm 0,4$	$60,3 \pm 3,69$	$0,3 \pm 0,23$	$60,0 \pm 3,46$
PS	–	–	–	$76,5 \pm 1,6$	$71,2 \pm 1,2$	$28,3 \pm 5,23$	$12,5 \pm 2,48$	$15,8 \pm 2,76$

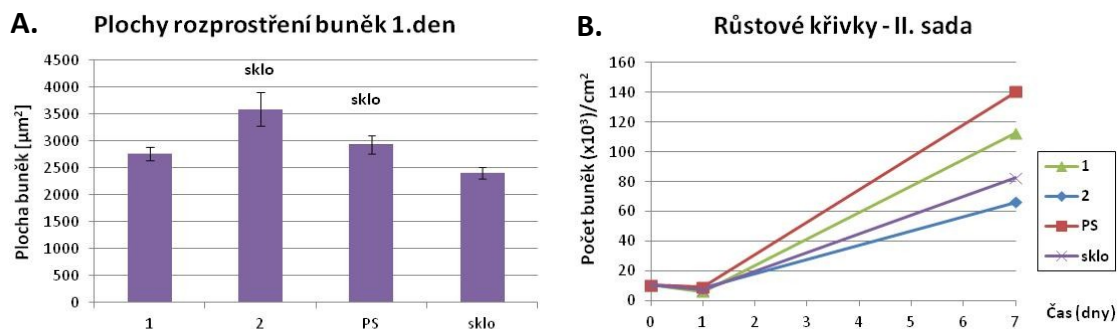
průměrná naměřená plocha rozptřeni největší ve srovnání s ostatními hodnocenými vzorky této sady, což vysvětluje jejich nižší počty (**Graf 4a**). Na vzorcích č. 2 byla zároveň pozorována častěji hvězdicovitá morfologie buněk s dlouhými výběžky než na buňkách na ostatních vzorcích, které byly častěji polygonální až zakulacené (**Obr. 18**).



Obr. 18: Povrchy vzorků, morfologie a proliferace osteoblastů Saos-2 na vzorcích Ti-6Al-4V (1, 2), PS a sklu po 1 a 7 dnech kultivace. Buňky barveny fluorescenčními barvivy Texas Red C₂-maleimid (červená fluorescence) a Hoechst #33258 (modrá fluorescence).



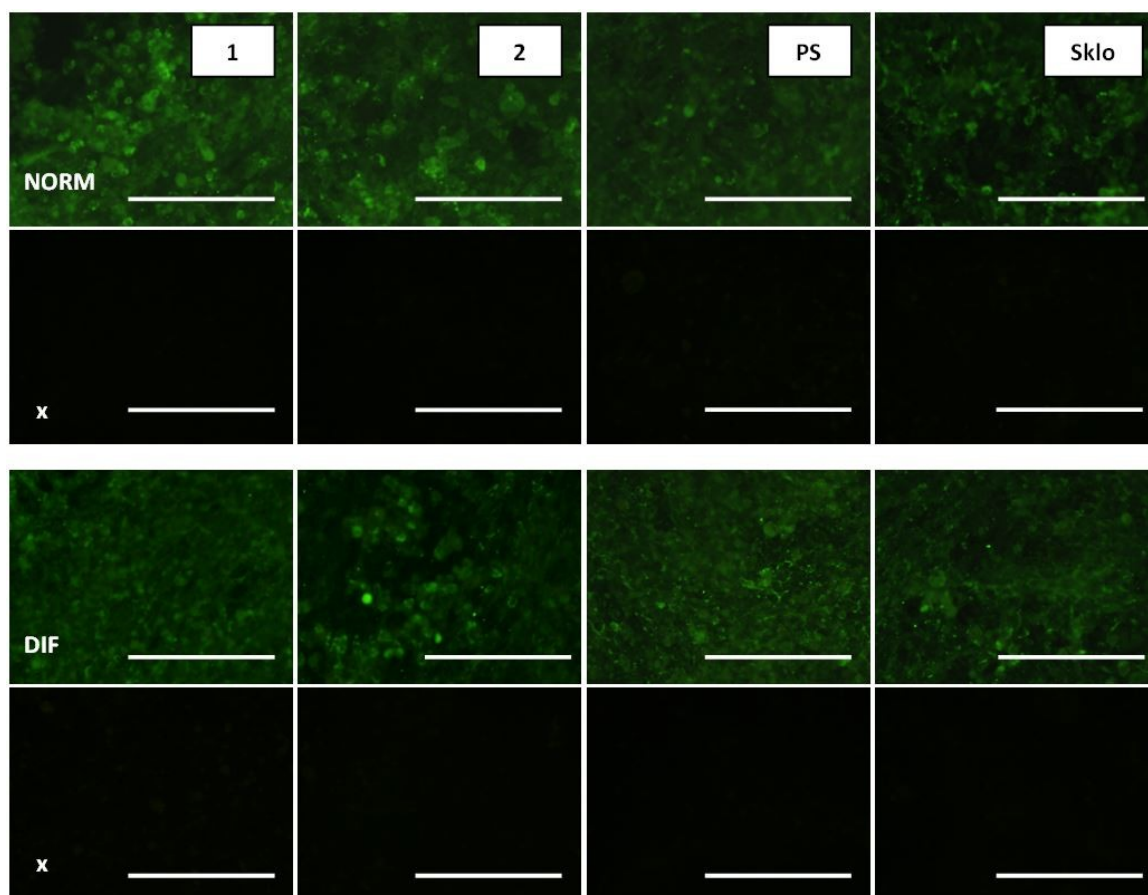
Graf 3: Populační hustota lidských osteoblastů linie Saos-2 na vzorcích slitiny Ti-6Al-4V, PS a skle po 1 a 7 dnech kultivace. Počet buněk na vzorku je přepočten na cm². Medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média, extrémní hodnoty vyznačeny černými tečkami. One Way ANOVA, metoda Holm-Sidak, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu.



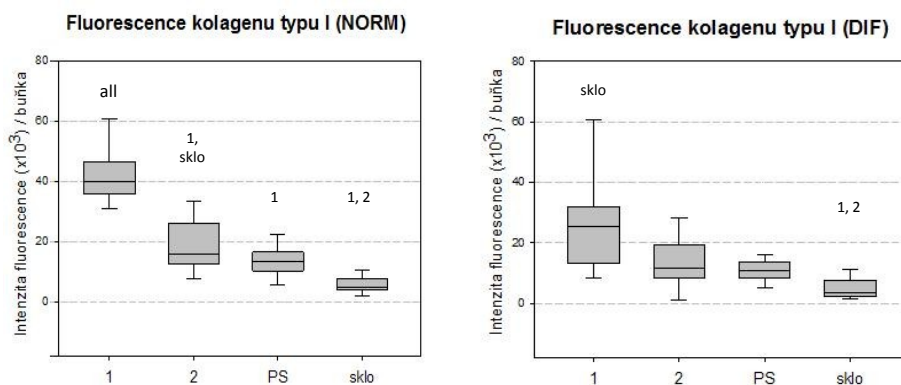
Graf 4: A) Plochy rozprostření lidských osteoblastů linie Saos-2 na vzorcích II. sady. Průměr \pm S.E.M ze 100-200 měření pro každou skupinu vzorků. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu. **B) Dynamika růstu buněk Saos-2 na vzorcích II. sady.** Data jsou zobrazena jako mediány naměřených hodnot.

Osteogenní diferenciaci buněk Saos-2 byla hodnocena prostřednictvím intenzity fluorescence kolagenu typu I, který je časným markerem osteogenní diferenciaci, vyprodukovaného buňkami po 16 dnech kultivace. Po 7 dnech kultivace ve standardním kultivačním médiu (NORM) bylo toto médium vyměněno buď za médium o stejném složení nebo za médium s přidavkem diferenciacních faktorů (DIF), v němž byly buňky na vzorcích kultivovány dalších 9 dní. Oba vzorky upravené PEO (vz. 1 a 2) podpořily časnou osteogenní diferenciaci buněk, která byla na jejich površích vyšší než na mikroskopických krycích sklech (sklo) nebo PS, a to v obou typech médií (**Graf 5, Obr. 19**). V tomto pokusu také bylo zjištěno, že bude vhodné posunout interval hodnocení diferenciaci o několik dní dopředu (proto je v pozdějších pokusech diferenciaci hodnocena již 14. den kultivace). Buňky kultivované v DIF nejspíše pokročily do pozdější fáze diferenciaci, kdy se produkce kolagenu začíná snižovat, proto byla naměřená hodnota kolagenu typu I mírně zvýšená u buněk kultivovaných v médiu NORM než v médiu DIF. Zároveň se domníváme, že vyšší parametr Rz vzorku č. 1 ($1,19 \mu\text{m}$ v porovnání s $0,97 \mu\text{m}$ u vzorku č. 2) poskytl buňkám větší plochu pro potenciální adhezi, což by korespondovalo s jejich vyšší populační hustotou, avšak menšími adhezními plochami než na vzorcích č. 2.

Lze shrnout, že buňky linie Saos-2 měly tendenci adherovat na vzorky upravené PEO větší nebo obdobně velkou plochou, což bylo patrné především na vzorcích č. 2. Další růst buněk na materiálech byl podpořen v rozsahu zhruba srovnatelném se standardními kultivačními materiály (PS, sklo), avšak osteogenní diferenciaci buněk podpořily modifikované vzorky (především vzorek č. 1) v míře vyšší než oba zmíněné referenční materiály.



Obr. 19: Imunofluorescenční barvení kolagenu I v kulturách lidských osteoblastů linie Saos-2 za 16 dnů po nasazení na vzorky slitiny Ti-6Al-4V (1, 2), PS a sklo. Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo toto médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Pro kontrolní barvení byly buňky inkubovány bez primární protilátky (x). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 20×, měřítko 200 μm .



Graf 5: Množství kolagenu typu I produkovaného buňkami Saos-2 po 16 dnech kultivace, měřené intenzitou fluorescence. Přepočteno na buňku. Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Zobrazen medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média. NORM: One Way ANOVA, metoda Holm-Sidak, $p < 0,050$. DIF: Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám).

9.3 III. sada vzorků

Na vzorcích III. sady (Ctrl, 5, 6, 12, 15, 5+FAS, PS, sklo) byla provedena analýza iniciální adheze měřením ploch rozprostření buněk, proliferace (hodnocení počtu buněk v kultuře 1., 4. a 7. den kultivace) a stanovení procentuální úrovně viability buněk (1. a 4. den kultivace). Diferenciace byla hodnocena fluorescenčním měřením produkce kolagenu typu I po 14 dnech kultivace v médiu NORM nebo 7 dnech v NORM a 7 dnech v DIF. Dále byla sledována genová exprese osteogenních markerů ALP, kolagenu typu I (Col I) a osteokalcinu (OC) po 7 a 14 dnech kultivace v médiu NORM a DIF a provedeno hodnocení úrovně depozice vápníku buňkami po 14 dnech kultivace kultivace v rámci společných pokusů se sadami III a IV (výsledky těchto pokusů viz **kapitola 9.6**, str. 78).

V této sadě bylo hodnoceno pět vzorků Ti-6Al-4V modifikovaných pomocí PEO (400 V, 4 min) v pěti rozdílných typech alkalických elektrolytů (**Příloha A**), následně upravených omíláním pro sjednocení parametrů drsnosti a morfologie povrchů. Část skupiny vzorků č. 5 (v **Tab. 5** označená jako 5+FAS, dále jen jako FAS) byla navíc po aplikaci PEO vystavena roztoku s obsahem 1,0 % hm. fluoroalkylsilanu (FAS) v ethanolu za účelem snížení povrchové energie s cílem dosažení hydrofobního povrchu.

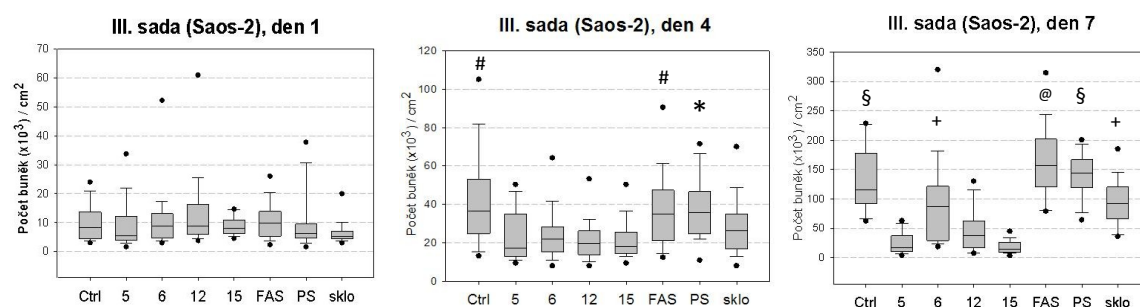
Bylo zjištěno, že kontaktní úhel vodní kapky, jakožto kapaliny tvořící základ biologických tekutin včetně kultivačních médií, byl na anodizovaných vzorcích č. 5, 6, 12 a 15 podstatně nižší (12° - 24°) než na nemodifikovaném vzorku slitiny (Ctrl, 72°), který byl naopak blízký hodnotám pro PS a sklo (77° , 66°). Dodatečná chemická úprava vzorků

Tab. 5: Parametry vzorků sady III. Vzorek označený jako 5+FAS, v textu dále označené jen jako FAS, byly anodizovány v elektrolytu o stejném složení jako vzorek 5 (viz **Příloha A**) a následně exponovány v roztoku 1 hm. % fluoroalkylsilanu ((tridecafluorooctyl)-triethoxysilan) v ethanolu. Tloušťka svrchní porézní vrstvy byla obtížně stanovitelná, proto je uvedeno pouze rozmezí hodnot. Drsnost a tloušťka vrstvy měřena ve VUHŽ, a.s. Kontaktní úhel a povrchová energie měřena autorkou práce.

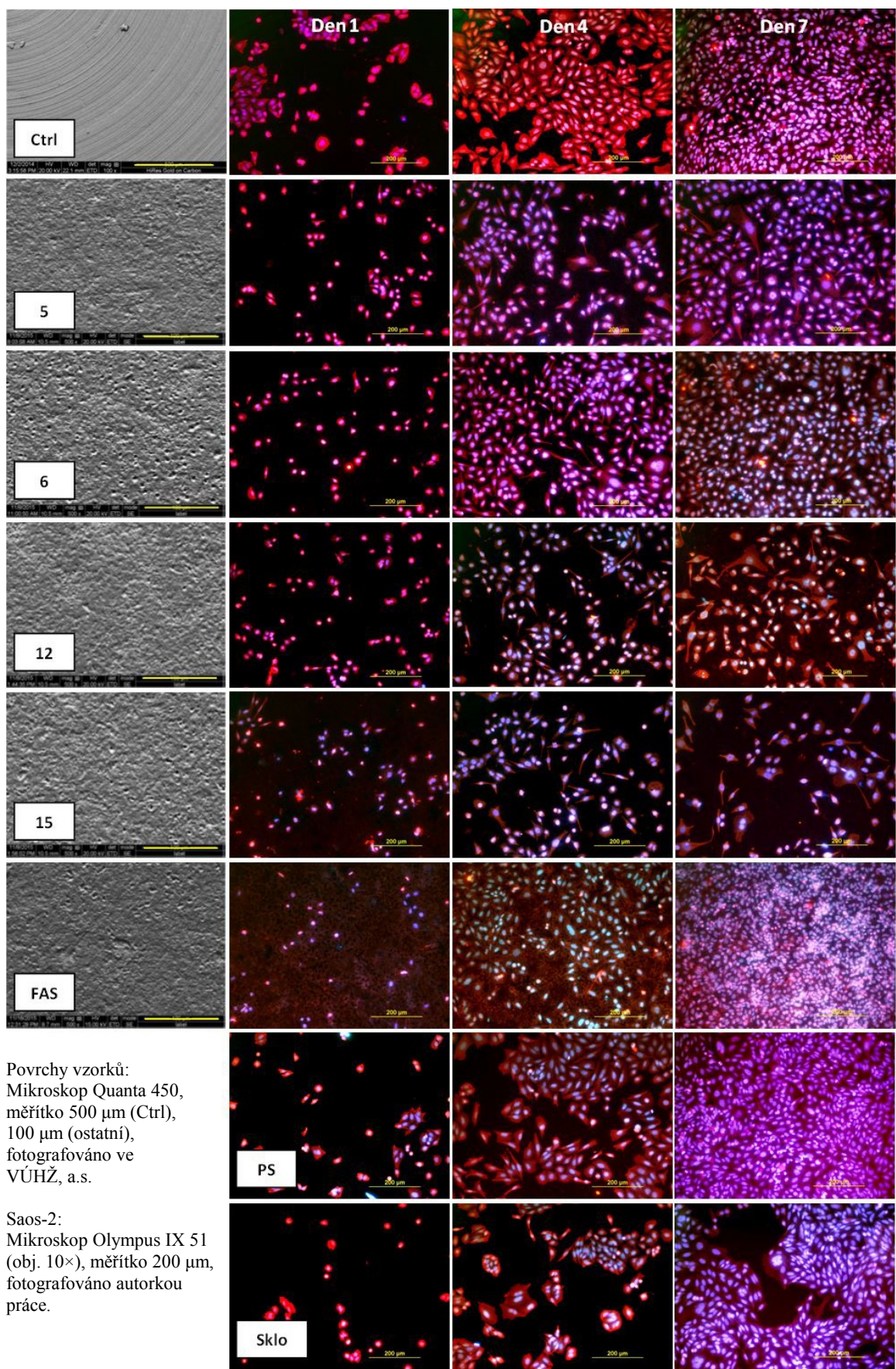
III. sada	Drsnost [μm]		Tloušťka vrstvy [μm]	Kontaktní úhel [$^{\circ}$]		Povrchová energie [mN/m]		
	Ra	Rz		H ₂ O	Glycerol	Celková	Disperzní	Polární
Ctrl	0,28 ± 0,01	1,41 ± 0,00	–	71,8 ± 5,8	63,3 ± 3,70	33,4 ± 18,84	18,1 ± 9,67	15,3 ± 9,17
5	0,21 ± 0,03	1,79 ± 0,24	1,19 – 2,27	14,7 ± 0,0	15,5 ± 0,4	71,0 ± 0,38	15,5 ± 0,17	55,5 ± 1,76
6	0,22 ± 0,02	2,24 ± 0,34	1,19 – 2,27	11,9 ± 2,6	12,0 ± 1,8	71,8 ± 2,70	16,0 ± 0,94	55,8 ± 1,76
12	0,19 ± 0,02	1,49 ± 0,34	1,19 – 2,27	23,7 ± 2,3	18,9 ± 2,8	66,9 ± 5,08	17,9 ± 2,04	49,0 ± 3,04
15	0,20 ± 0,03	1,96 ± 0,55	1,19 – 2,27	14,7 ± 1,9	16,6 ± 0,3	71,2 ± 2,09	15,0 ± 0,64	56,1 ± 1,45
5+FAS	0,21 ± 0,03	1,79 ± 0,24	1,19 – 2,27	112,6 ± 4,8	118,9 ± 2,3	9,5 ± 5,8	0,0 ± 0,16	9,5 ± 5,64
PS	–	–	–	76,5 ± 1,6	71,2 ± 1,2	28,3 ± 5,23	12,5 ± 2,48	15,8 ± 2,76
Sklo	–	–	–	66,1 ± 6,1	67,2 ± 4,3	36,5 ± 19,93	7,0 ± 6,53	29,6 ± 13,4

FAS skutečně docílila výrazného snížení smáčivosti jejich povrchu (kontaktní úhel s vodou 113°) i snížení celkové povrchové energie ($9,5 \text{ mN/m}$), vedoucí téměř až k eliminaci její disperzní složky ($0,0 \pm 0,16 \text{ mN/m}$). Vzorky modifikované pouze PEO se tedy jevily jako vysoce hydrofilní (smáčivé), kontrolní vzorky jako mírně hydrofilní a vzorky FAS jako vysoce hydrofobní. V souladu s vysokou smáčivostí měly i vzorky č. 5, 6, 12 a 15 vysokou povrchovou energii, především její polární složku, zatímco tyto hodnoty byly u kontrolních vzorků výrazně nižší (**Tab. 5**).

Za 1 den po nasazení adherovaly buňky Saos-2 na všechny typy vzorků s populační hustotou obdobnou na všech sledovaných vzorcích (**Graf 6**). Lépe adherovaly buňky, zaujímající polygonální tvar s větší plochou rozprostření byly pozorovány převážně na kontrolních vzorcích slitiny, PS a skle, zatímco na anodizovaných vzorcích byly buňky podobného tvaru ve větší míře kombinovány s buňkami málo rozprostřenými a relativně zakulacenými, méně často protáhlými (**Obr. 20**). Morfologie buněk na vzorcích FAS byla poměrně nesnadno hodnotitelná vzhledem k velkému fluorescenčnímu pozadí vzorků, buňky se však velikostně i vzhledem spíše podobaly buňkám na ostatních vzorcích, s čímž koresponduje také statisticky nižší velikost iniciální plochy rozprostření buněk na všech modifikovaných vzorcích (**Graf 7**). Za 4 dny po nasazení byla populační hustota buněk na vysoce hydrofilních vzorcích č. 5, 6, 12 a 15 statisticky významně nižší než na PS a skle, zatímco na vysoce hydrofobních vzorcích FAS byly počty buněk obdobné jako na těchto referenčních vzorcích. Podobný trend pokračoval také 7 dní po nasazení, kdy počet buněk na vzorku FAS zůstal statisticky významně vyšší oproti ostatním anodizovaným vzorkům, ale bylo zaznamenáno rovněž jeho zvýšení, ač bez statistické významnosti, ve srovnání s referenčními vzorky Ctrl, PS a sklo (**Graf 6, Graf 8**).



Graf 6: Populační hustota buněk osteoblastů Saos-2 na vzorcích slitiny Ti-6Al-4V (Ctrl, 5, 6, 12, 15, FAS), PS a sklu po 1, 4 a 7 dnech kultivace. Počet buněk na vzorku je přečten na cm^2 . Medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média, extrémní hodnoty vyznačeny černými tečkami. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu. Den 4: # vs. 5, 12, 15; * vs. 5, 6, 12, 15. Den 7: § vs. 5, 12, 15, + vs. 5, 15; @ vs. 5, 6, 12, 15.



Povrchy vzorků:
Mikroskop Quanta 450,
měřítko 500 μm (Ctrl),
100 μm (ostatní),
fotografováno ve
VÚHŽ, a.s.

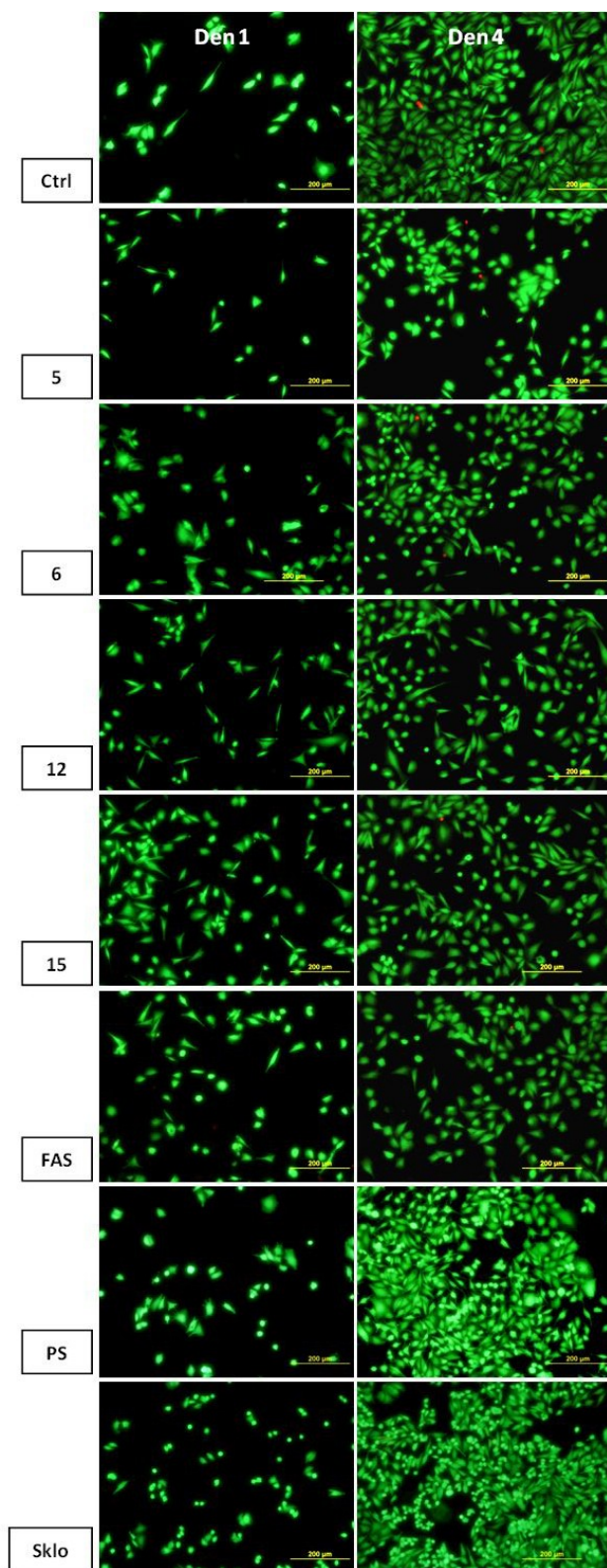
Saos-2:
Mikroskop Olympus IX 51
(obj. 10 \times), měřítko 200 μm ,
fotografováno autorkou
práce.

Obr. 20: Povrchy vzorků, morfologie a proliferace osteoblastů Saos-2 na vzorcích Ti-6Al-4V (Ctrl, 5, 6, 12, 15, FAS), PS a sklu po 1, 4 a 7 dnech kultivace. Buňky barveny fluorescenčními barvivy Texas Red C₂-maleimid (červená fluorescence) a Hoechst #33258 (modrá fluorescence).

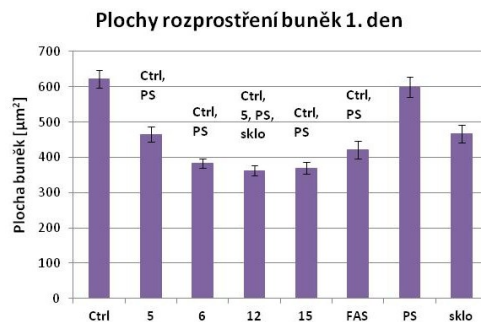
Relativně vysokých počtů dosáhly také buňky na vzorcích č. 6, kde byly obdobné jako na skle a významně vyšší než na vzorcích č. 5 a 15 (**Graf 6**). Buňky na vzorcích č. 12 a 15, ač zaujímaly 7 den kultivace často výrazně větší plochu než ostatní vzorky, dosahovaly nejnižších počtů ze všech posuzovaných vzorků (**Graf 8**). Buňky na vzorcích FAS v souladu se svou vysokou populační hustotou dosáhly konfluence dříve než na ostatních anodizovaných vzorcích – již 7. den byly plně konfluentní (**Obr. 20**). Příčina vysoké proliferace na velmi hydrofobním povrchu vzorku FAS vyžaduje další zkoumání.

Hodnocení viability buněk ukázalo mírně nižší viabilitu buněk 1. den po nasazení na vzorcích č. 5 a 6. Viabilita buněk na všech hodnocených vzorcích však dosahovala vysokých hodnot nad 90 %, a tyto rozdíly se 4. den po nasazení úplně setřely, neboť minimální průměrná viabilita vzorků dosahovala alespoň 98 % (**Obr. 21, Tab. 6**). Můžeme proto říct, že v hodnocených kultivačních intervalech nevykazovaly posuzované vzorky cytotoxicitu.

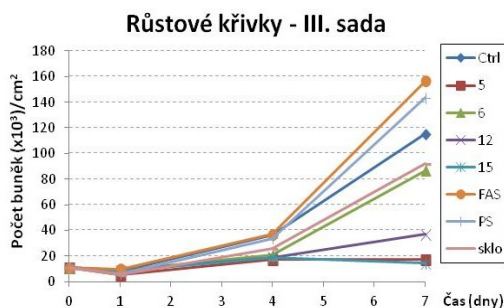
Diferenciace buněk hodnocená intenzitou fluorescence jimi vyprodukovaného kolagenu typu I (**Obr. 22**) ukázala u vzorků Ctrl, FAS, PS a sklo, které dosahovaly nejvyšších hodnot v počtech buněk na cm^2 vzorku již 7. den kultivace, relativně nízkou produkci tohoto markeru a to v obou hodnocených skupinách (kultivační médium NORM i DIF). Ve srovnání s buňkami kultivovanými celých 14 dní ve standardním médiu (NORM) byla při kultivaci v médiu DIF produkce kolagenu vyšší u buněk na vzorcích č. 6 (**Graf 9**). Jak ukázalo hodnocení populační hustoty 7. den kultivace (**Graf 6**), měly buňky na těchto vzorcích největší proliferační potenciál z anodizovaných vzorků (kromě FAS). Naměřená produkce kolagenu přepočtená na buňku u těchto vzorků kultivovaných v médiu NORM je proto výrazně nižší než v médiu DIF, kde buňky ukončily proliferaci a začaly dříve, tj. při nižší populační hustotě, produkovat kolagen, který je časným diferenciačním markerem. Naopak vzorky č. 5 a 15 s nízkým proliferačním potenciálem v hodnocených intervalech vykazovaly díky nadále nižšímu počtu buněk vyšší produkci kolagenu ve srovnání s ostatními vzorky. Hodnocení genové exprese pomocí qPCR toto potvrzuje, neboť mezi zmíněnými anodizovanými ani referenčními vzorky nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi kolagenu typu I (**Graf 17, kapitola 9.6**). Buňky na vzorku FAS vykazovaly také nižší expresi kolagenu typu I po 14 dnech v médiu NORM.



Obr. 21: Viabilita buněk na vzorcích III. sady ve srovnání s PS a sklem. Barveno pomocí kitu LIVE/DEAD viability/cytotoxicity. Živé buňky zobrazeny zeleně, mrtvé červeně. Mikroskop Olympus IX 51 (obj. 10×), měřítko 200 µm.



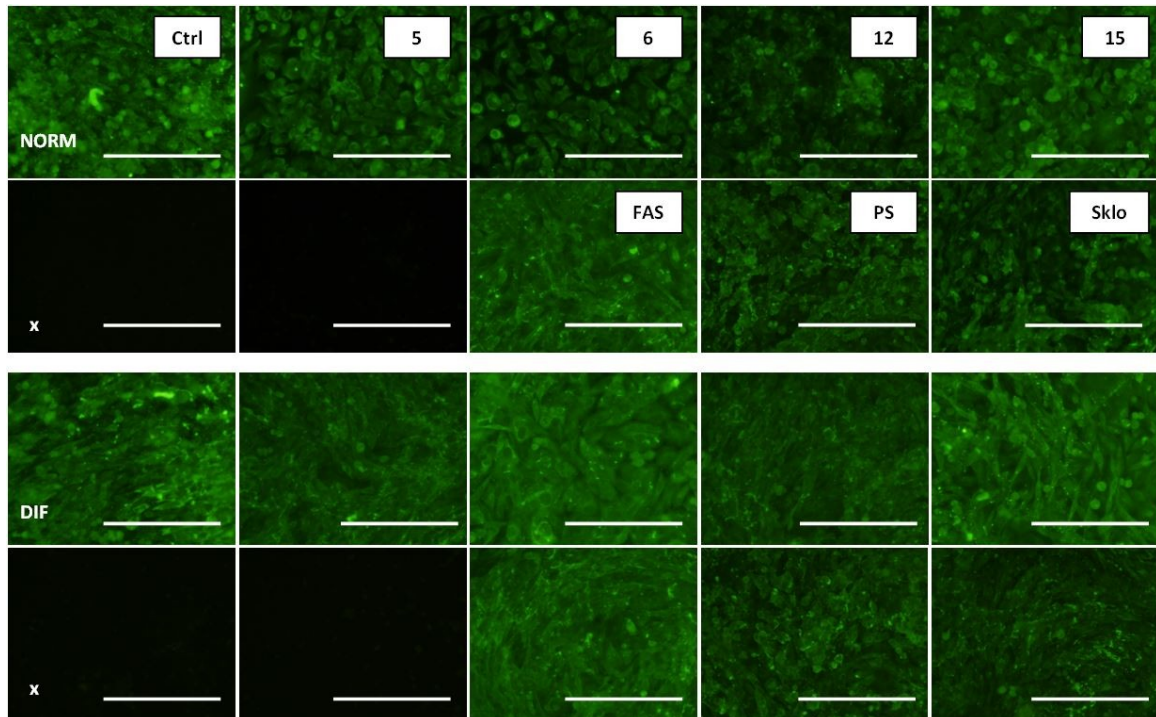
Graf 7: Plochy rozprostření osteoblastů linie Saos-2. Průměr ± S.E.M ze 150 měření pro každou skupinu vzorků. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu.



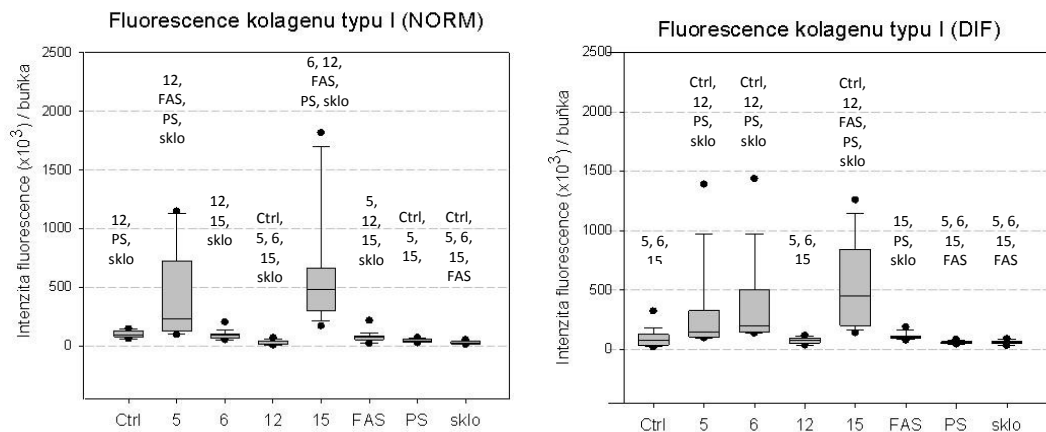
Graf 8: Dynamika růstu osteoblastů linie Saos-2 na vzorcích sady III. Data zobrazena jako medián naměřených hodnot.

Tab. 6: Viabilita osteoblastů linie Saos-2 na vzorcích sady III, vyjádřená v % z celkového počtu buněk. Průměrná hodnota ze 16 snímků pro každou experimentální skupinu.

III. sada	Viabilita buněk [%]	
	1. den	4. den
Ctrl	98,33	99,56
5	93,40	98,89
6	94,81	99,85
12	98,54	99,73
15	97,37	99,68
FAS	96,99	99,74
PS	99,16	99,99
Sklo	97,50	99,24



Obr. 22: Imunofluorescenční barvení kolagenu I v kulturách lidských osteoblastů linie Saos-2 za 14 dnů po nasazení na vzorky slitiny Ti-6Al-4V (Ctrl, 5, 6, 12, 15, FAS), PS a sklo. Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo toto médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Pro kontrolní barvení byly buňky inkubovány bez primární protilátky (x; příklad dvou snímků). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 20×, měřítko 200 μm.



Graf 9: Množství kolagenu typu I produkovaného buňkami Saos-2 po 14 dnech kultivace, měřená intenzitou fluorescence. Přepočteno na buňku. Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Zobrazen medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média, extrémní hodnoty vyznačeny černými tečkami. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu.

9.4 IV. sada vzorků

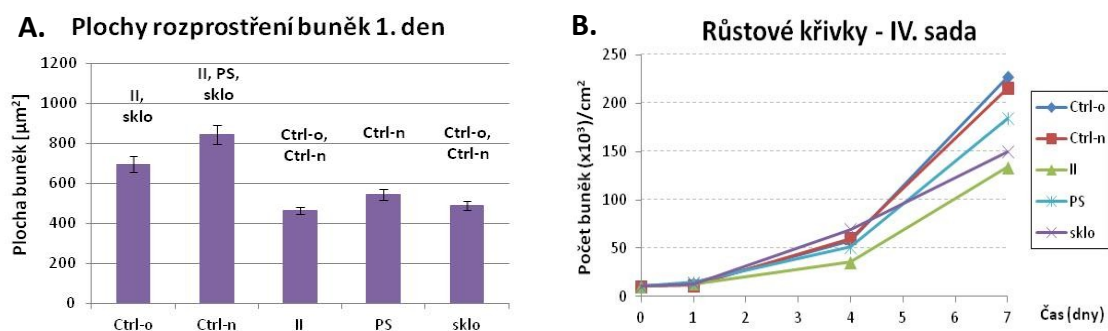
Na vzorcích IV. sady (Ctrl-o, Ctrl-n, II, PS, sklo) byla provedena analýza iniciální adheze měřením ploch rozptřeni buněk, proliferace (hodnocení počtu buněk v kultuře 1., 4. a 7. den kultivace) a stanovení procentuální úrovně viability (1., 4. a 7. den kultivace). Diferenciace byla hodnocena fluorescenčním měřením produkce kolagenu typu I po 14 dnech kultivace v médiu NORM nebo 7 dnech v NORM a 7 dnech v DIF. Dále byla sledována genová exprese osteogenních markerů ALP, Col I a OC po 7 a 14 dnech kultivace v médiu NORM a DIF a provedeno hodnocení úrovně depozice vápníku buňkami po 14 dnech kultivace kultivace v rámci společných pokusů se sadami III a IV (pro výsledky těchto pokusů viz **kapitolu 9.6**, str. 78).

Z důvodu neúplného mechanického sjednocení povrchové porézní vrstvy, vzniklé po anodizaci na předchozí sadě vzorků, byly dále testovány různé metody mechanických povrchových úprav. Složení použitého elektrolytu pro modifikaci vzorku č. II (PEO, 400 V, 4 min) bylo návratem k elektrolytům použitým v sadě II (**Příloha A**). Vzorky č. II a Ctrl-o byly následně upraveny omíláním ve vibračně žlabovém stroji a porovnávány s neomletým kontrolním vzorkem. Povrchová vrstva na vzorku II zůstala i po omletí porézní a nedostatečně sjednocená. Drsnost povrchu tohoto vzorku ukazuje vyšší parametr Ra (1,68 μm) než u kontrolních vzorků, a výrazně vyšší parametr Rz (9,62 μm) než u všech doposud hodnocených vzorků v jednotlivých sadách. Kontaktní úhly na kontrolních vzorcích, PS a sklu ukazovaly na mírnou hydrofilitu. Anodizované vzorky vykazovaly obrovskou smáčivost a podobně polární složka jejich povrchové energie, která má pozitivní vliv na adhezi a růst buněk, byla výrazně vyšší na těchto vzorcích.

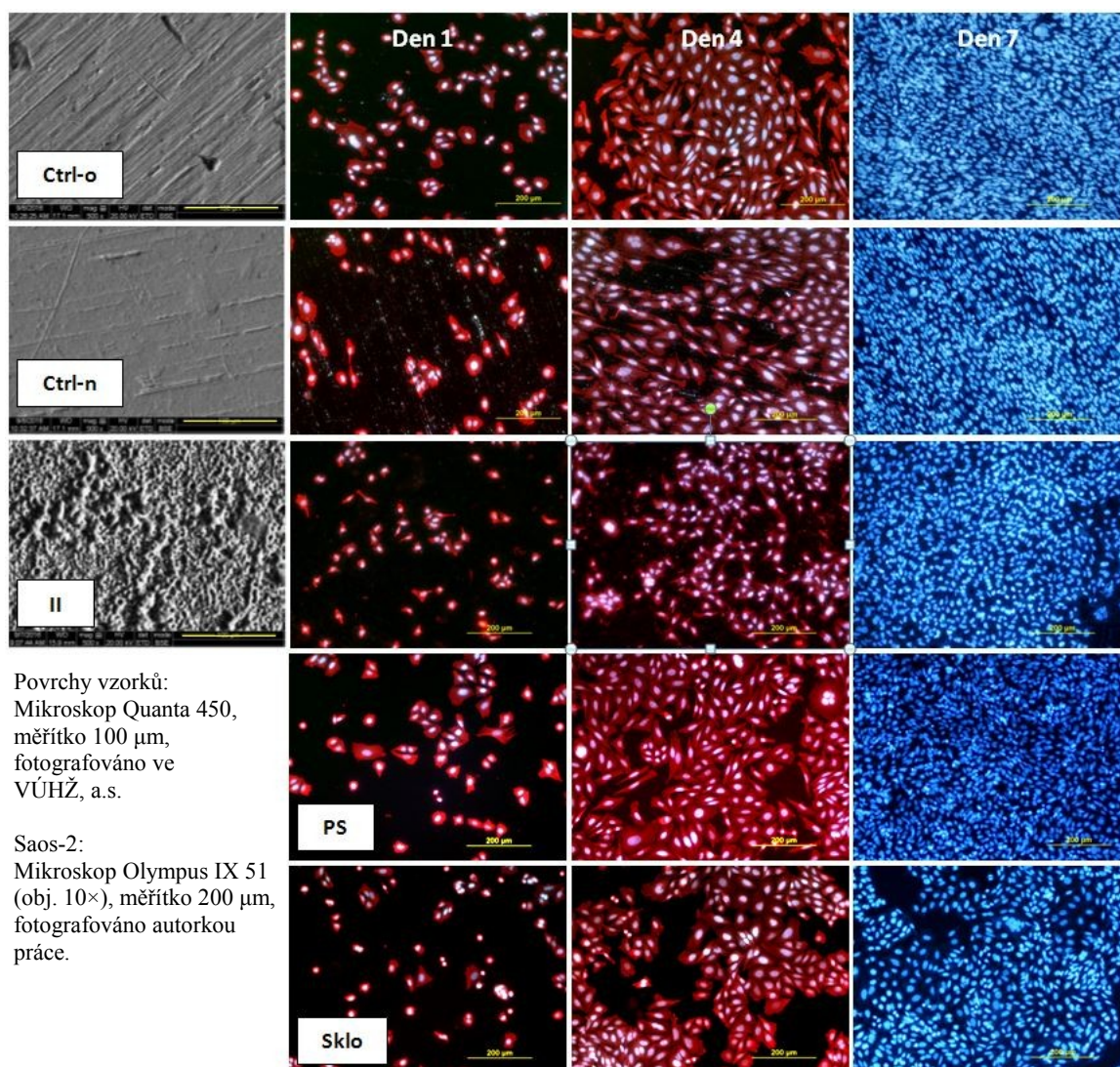
Tab. 7: Parametry vzorků sady IV. Tato sada obsahuje dva kontrolní vzorky slitiny Ti-6Al-4V (Ctrl-o – omletý; Ctrl-n – neomletý). Pro složení elektrolytů, v nichž byly upravovány vzorky Ti-6Al-4V viz **Příloha A**. Drsnost a tloušťka vrstvy měřena ve VÚHŽ, a.s. Kontaktní úhel a povrchová energie měřena autorkou práce.

IV. sada	Drsnost [μm]		Tloušťka vrstvy [μm]	Kontaktní úhel [$^{\circ}$]		Povrchová energie [mN/m]		
	Ra	Rz		H ₂ O	Glycerol	Celková	Disperzní	Polární
Ctrl-o	0,13 \pm 0,04	0,99 \pm 0,38	–	69,7 \pm 2,0	71,5 \pm 1,0	33,9 \pm 5,86	5,7 \pm 1,74	28,2 \pm 4,12
Ctrl-n	0,16 \pm 0,04	1,29 \pm 0,22	–	86,1 \pm 1,1	73,0 \pm 1,0	28,2 \pm 3,72	22,8 \pm 2,56	5,4 \pm 1,16
II	1,68 \pm 0,18	9,62 \pm 1,08	porézní	9,4 \pm 3,5	19,1 \pm 0,6	73,6 \pm 2,54	12,5 \pm 0,73	61,1 \pm 1,81
PS	–	–	–	76,5 \pm 1,6	71,2 \pm 1,2	28,3 \pm 5,23	12,5 \pm 2,48	15,8 \pm 2,76
Sklo	–	–	–	66,1 \pm 6,1	67,2 \pm 4,3	36,5 \pm 19,93	7,0 \pm 6,53	29,6 \pm 13,4

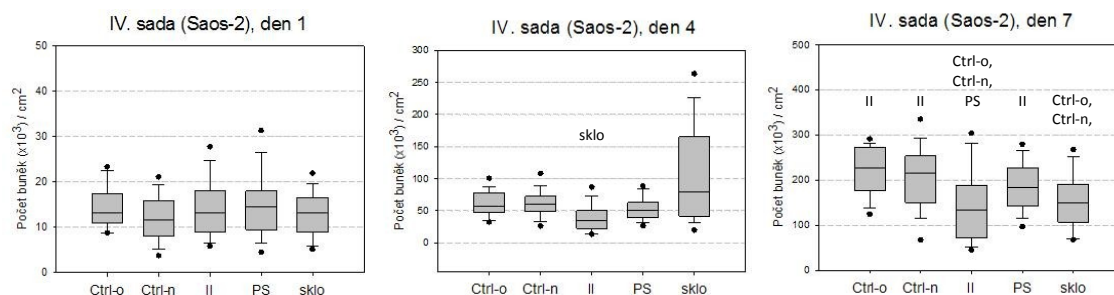
Počty iniciálně adherovaných buněk se mezi jednotlivými sledovanými skupinami vzorků 1. den po nasazení nijak významně nelišily (**Graf 11**). Buňky na všech vzorcích byly polygonální a dobře rozprostřené, s výjimkou modifikovaného vzorku II, kde byly spíše menší a protáhlé, případně zakulacené. Podobná morfologie buněk na těchto vzorcích převládá i 4. den kultivace (**Obr. 23**). V souladu s tímto pozorováním byly zaznamenány statisticky významně větší plochy rozprostření u nemodifikovaných vzorků slitiny (Ctrl-o, Ctrl-n), zatímco buňky na vzorku II adherovaly menší plochou, podobně jako na PS a skle (**Graf 10 a**). Za 4 dny po nasazení dosáhly buňky na skle významně vyšší populační hustoty než buňky na vzorku II, který se zároveň stal vzorkem s relativně nejnižším počtem buněk na cm^2 . Za 7 dní od nasazení již buňky na všech sledovaných površích dosáhly stádia konfluence, tj. souvislé vrstvy buněk (**Obr. 23**). Nejvyšších průměrných počtů buňky dosáhly na kontrolních vzorcích slitiny Ctrl-o, Ctrl-n a PS, oproti nimž se vzorek II nyní už jevil jako statisticky významně méně podporující proliferaci buněk Saos-2 (**Graf 11, Graf 10 b**). Viabilita buněk dosahovala ve všech hodnocených intervalech (1., 4. a 7. den kultivace) hodnot nad 96 % u všech typů vzorků. Celkově nejvyšších hodnot dosáhla 4. den – 99 % u všech vzorků (**Obr. 24, Tab. 8**). Ve sledovaných intervalech na žádných vzorcích nedocházelo k prokazatelně zvýšenému úhynu buněk. Nízká proliferační aktivita na vzorcích č. II tedy není způsobena cytotoxicitou materiálu, ale spíše výraznou topografií povrchu, která nutí buňky se přizpůsobovat nerovnostem a omezuje jejich růst.



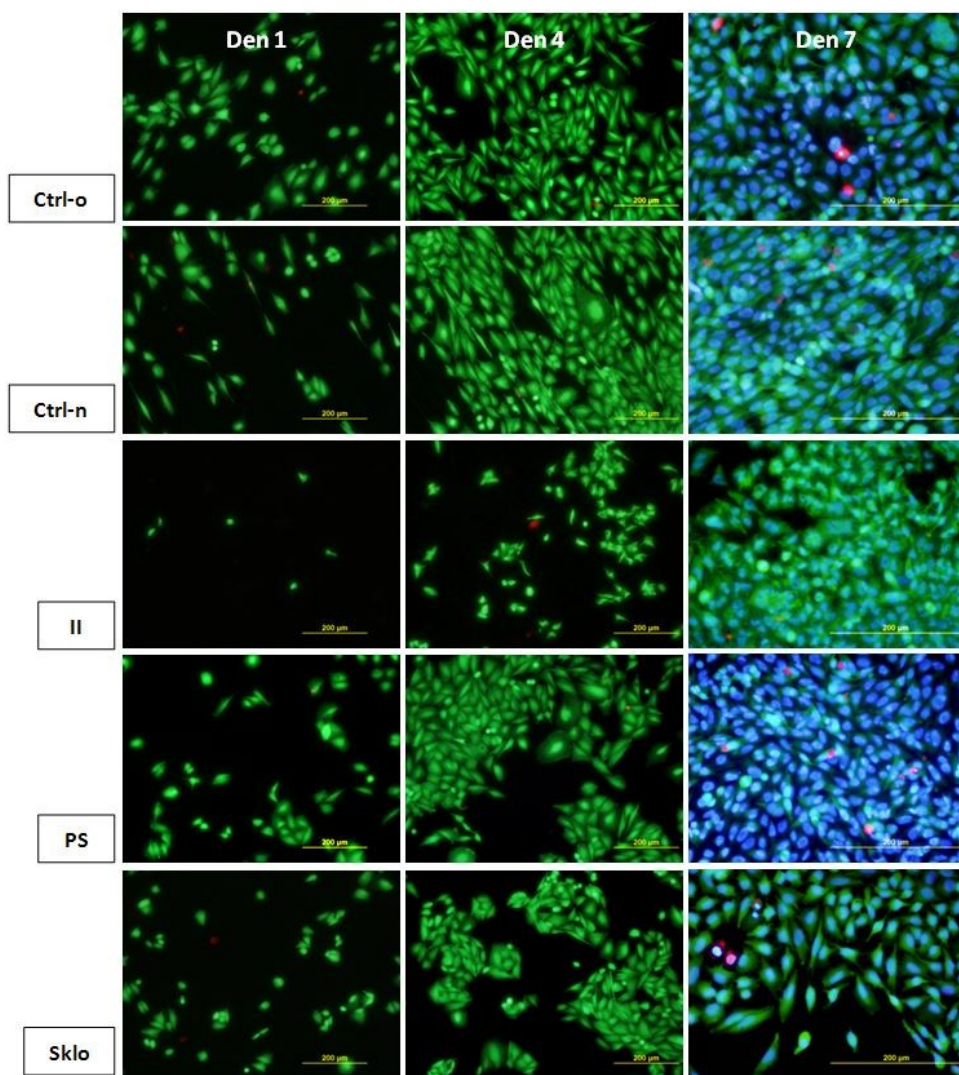
Graf 10: A) Plochy rozprostření lidských osteoblastů linie Saos-2 na vzorcích IV. sady. Průměr \pm S.E.M ze 150 měření pro každou skupinu vzorků. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu. **B) Dynamika růstu Saos-2 na vzorcích IV. sady.** Data jsou zobrazena jako mediány naměřených hodnot.



Obr. 23: Povrchy vzorků, morfologie a proliferace osteoblastů Saos-2 na vzorcích Ti-6Al-4V (Ctrl-o, Ctrl-n, II), PS a sklu po 1, 4 a 7 dnech kultivace. Buňky barveny fluorescenčními barvivy Texas Red C₂-maleimid (červená fluorescence) a Hoechst #33258 (modrá fluorescence; 7 den byly buňky barveny pouze tímto barvivem).



Graf 11: Populační hustota buněk osteoblastů Saos-2 na vzorcích slitiny Ti-6Al-4V (Ctrl-o, Ctrl-n, II), PS a sklu po 1, 4 a 7 dnech kultivace. Počet buněk na vzorku je přepočten na cm^2 . Medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média, extrémní hodnoty vyznačeny černými tečkami. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové (den 1 a 4). One Way ANOVA, Holm-Sidak (den 7). Statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,05$) vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu.



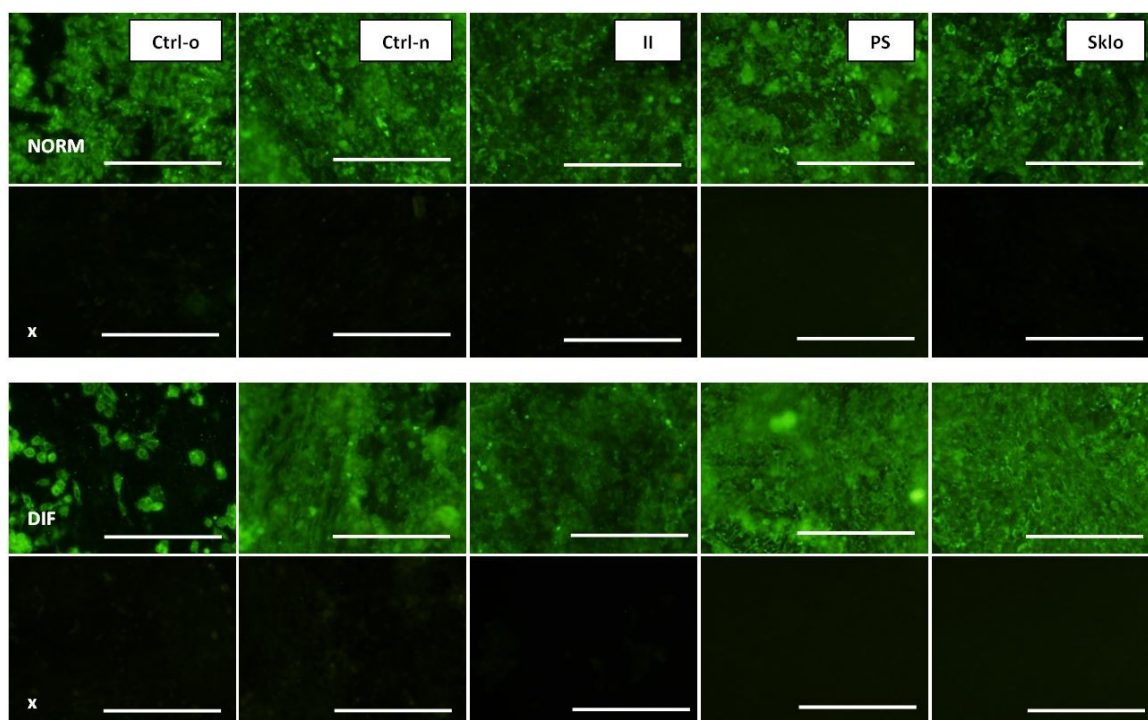
Obr. 24: Viabilita vzorků IV. sady ve srovnání s PS a sklem. Barveno pomocí kitu LIVE/DEAD viability/cytotoxicity. Pro přehlednost byla 7. den jádra buněk dobarvena fluorescenčním barvivem Hoechst #33342 (modrá fluorescence). Živé buňky zobrazeny zeleně, mrtvé červeně, jádra živých buněk modře. Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10× (den 1 a 4), obj. 20× (den 7), měřítko 200 μm.

Tab. 8: Viabilita osteoblastů Saos-2 na vzorcích sady IV, vyjádřená v % z celkového počtu buněk. Průměrná hodnota ze 16 snímků pro každou experimentální skupinu.

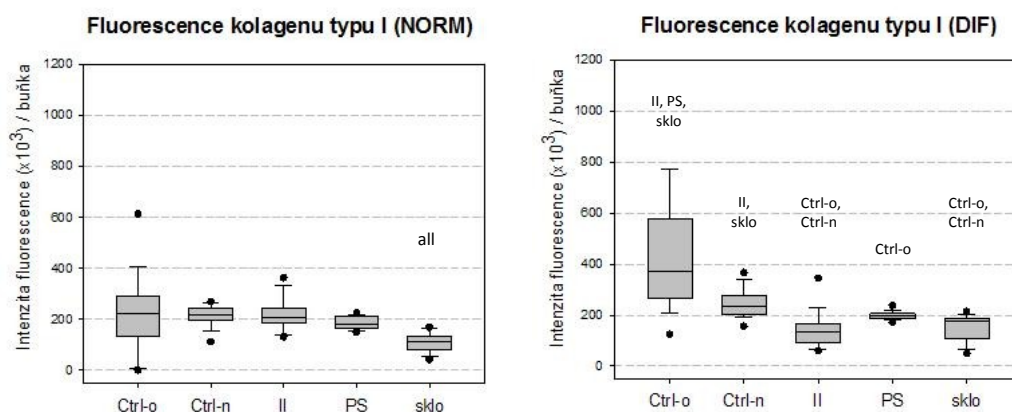
IV. sada	Viabilita buněk [%]		
	1. den	4. den	7. den
Ctrl-o	98,28	99,56	97,90
Ctrl-n	98,64	99,29	98,18
II	100,00	99,06	97,63
PS	99,40	99,86	98,30
Sklo	96,94	99,36	97,82

Produkce kolagenu typu I buňkami Saos-2, měřená intenzitou jeho fluorescence po obarvení, byla jak ve standardním kultivačním médiu (NORM), tak v osteogenním (DIF) obdobná u buněk na kontrolních nemodifikovaných surových vzorcích (Ctrl-n, Ctrl-o) a PS i na vzorcích č. II modifikovaných anodizací. Výrazná produkce kolagenu, časného markeru osteogenní diferenciaci, byla zaznamenána pouze u buněk pěstovaných v osteogenním médiu (DIF) na nemodifikovaných kontrolních vzorcích mechanicky upravených omíláním (Ctrl-o) (**Graf 12**). Intenzita fluorescence v kontrolních buňkách barvených bez primární protilátky proti kolagenu I byla prakticky nulová, což vylučuje nespecifickou vazbu sekundární protilátky s fluorescenčním značením na materiál (**Obr. 25**). Hodnocení exprese osteogenních markerů provedené metodou qPCR ukazuje v případě kolagenu typu I rovněž statisticky významně nižší úroveň u buněk na vzorku č. II, kultivovaných v médiu DIF (**Graf 18, kapitola 9.6**).

Vzorky č. II, modifikované PEO, podpořily adhezi, růst a časnou osteogenní diferenciaci buněk linie Saos-2 v podobném rozsahu jako standardní kultivační materiály (PS, sklo) a kontrolní vzorky slitiny Ti-6Al-4V. Nemodifikované kontrolní vzorky slitiny, upravené omíláním (Ctrl-o) podpořily adhezi a růst buněk podobně jako ostatní vzorky, ale navíc výrazně podpořily také časnou osteogenní diferenciaci.



Obr. 25: Imunofluorescenční barvení kolagenu I v kulturách lidských osteoblastů linie Saos-2 za 14 dnů po nasazení na vzorky slitiny Ti-6Al-4V (Ctrl-o, Ctrl-n, II), PS a sklo. Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo toto médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Pro kontrolní barvení byly buňky inkubovány bez primární protilátky (x). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 20×, měřítko 200 μm.



Graf 12: Množství kolagenu typu I, produkovaného buňkami Saos-2 po 14 dnech kultivace, měřeného intenzitou fluorescence. Přepočteno na buňku. Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Zobrazen medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média, extrémní hodnoty vyznačeny černými tečkami. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám).

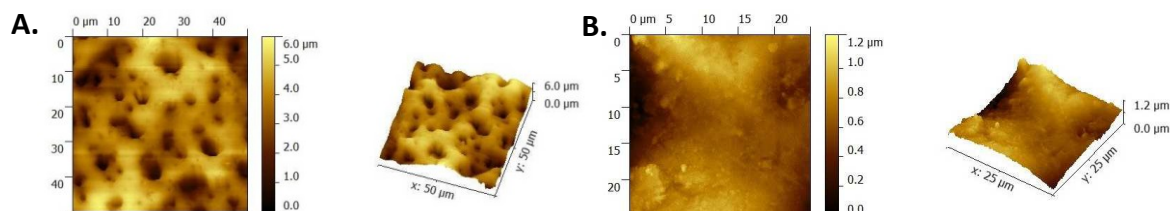
9.5 V. sada vzorků

Na vzorcích V. sady (Ctrl, 8, 8T, PS, sklo) byla provedena analýza iniciální adheze měřením ploch rozprostření buněk, proliferace (hodnocení počtu buněk v kultuře 1., 4. a 7. den kultivace) a stanovení procentuální úrovně viability (1., 4. a 7. den kultivace). Diferenciace byla hodnocena fluorescenčním měřením produkce kolagenu typu I po 16 dnech kultivace v médiu NORM nebo 9 dnech v NORM a 7 dnech v DIF. Dále byla sledována genová exprese osteogenních markerů ALP, Col I a OC po 7 a 14 dnech kultivace v médiu NORM a DIF a provedeno hodnocení úrovně depozice vápníku buňkami po 14 dnech kultivace v rámci společných pokusů se sadami III a IV (pro výsledky těchto pokusů viz **kapitolu 9.6**, str. 78).

Po provedení řady zkoušek byla optimalizována technologie tryskání (pracovní vzdálenost 15 cm, tlak 1,5 bar, médium balotina o zrnitosti 65-105) k odstranění svrchní vrstvy a sjednocení povrchu. Takto upravené vzorky (8T) byly porovnány v rámci V. sady vzorků se vzorky, které byly upraveny pouze PEO (vzorky č. 8). Sjednocené povrchy materiálů mají po procesu PEO (450 V, 1 h) a otryskání vnější vrstvy matný charakter a sníženou drsnost, především parametr Rz (**Tab. 9, Obr. 26**).

Tab. 9: Parametry vzorků sady V. Pro složení elektrolytů, v nichž byly upravovány vzorky Ti-6Al-4V viz **Příloha A**. Drsnost a tloušťka vrstvy měřena ve VÚHŽ, a.s. Kontaktní úhel a povrchová energie měřena autorkou práce.

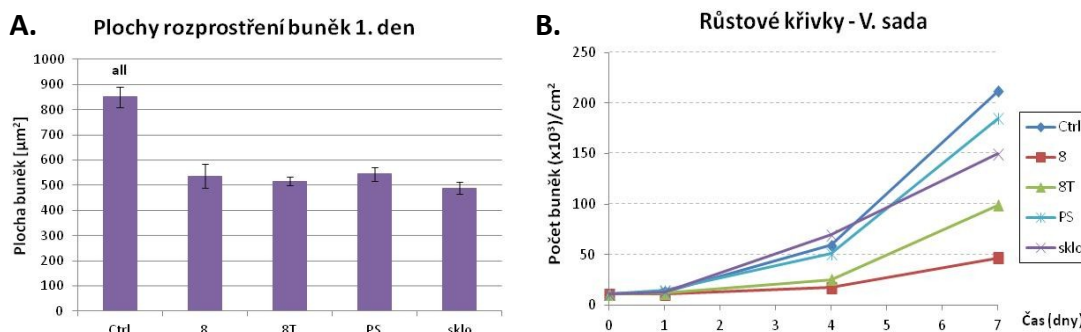
V. sada	Drsnost [μm]		Tloušťka vrstvy [μm]	Kontaktní úhel [$^\circ$]		Povrchová energie [mN/m]		
	Ra	Rz		H ₂ O	Glycerol	Celková	Disperzní	Polární
Ctrl	0,28 ± 0,01	1,41 ± 0,00	–	71,8 ± 5,8	63,3 ± 3,70	33,4 ± 18,84	18,1 ± 9,67	15,3 ± 9,17
8	1,50 ± 0,04	6,49 ± 0,25	0,7 – 1	15,6 ± 4,6	17,8 ± 4,2	70,9 ± 6,98	14,8 ± 2,54	56,1 ± 4,45
8T	0,50 ± 0,02	2,57 ± 0,03	0,7 – 1	35,4 ± 9,3	30,4 ± 6,7	60,0 ± 24,69	17,8 ± 9,6	42,1 ± 15,08
PS	–	–	–	76,5 ± 1,6	71,2 ± 1,2	28,3 ± 5,23	12,5 ± 2,48	15,8 ± 2,76
Sklo	–	–	–	66,1 ± 6,1	67,2 ± 4,3	36,5 ± 19,93	7 ± 6,53	29,6 ± 13,4



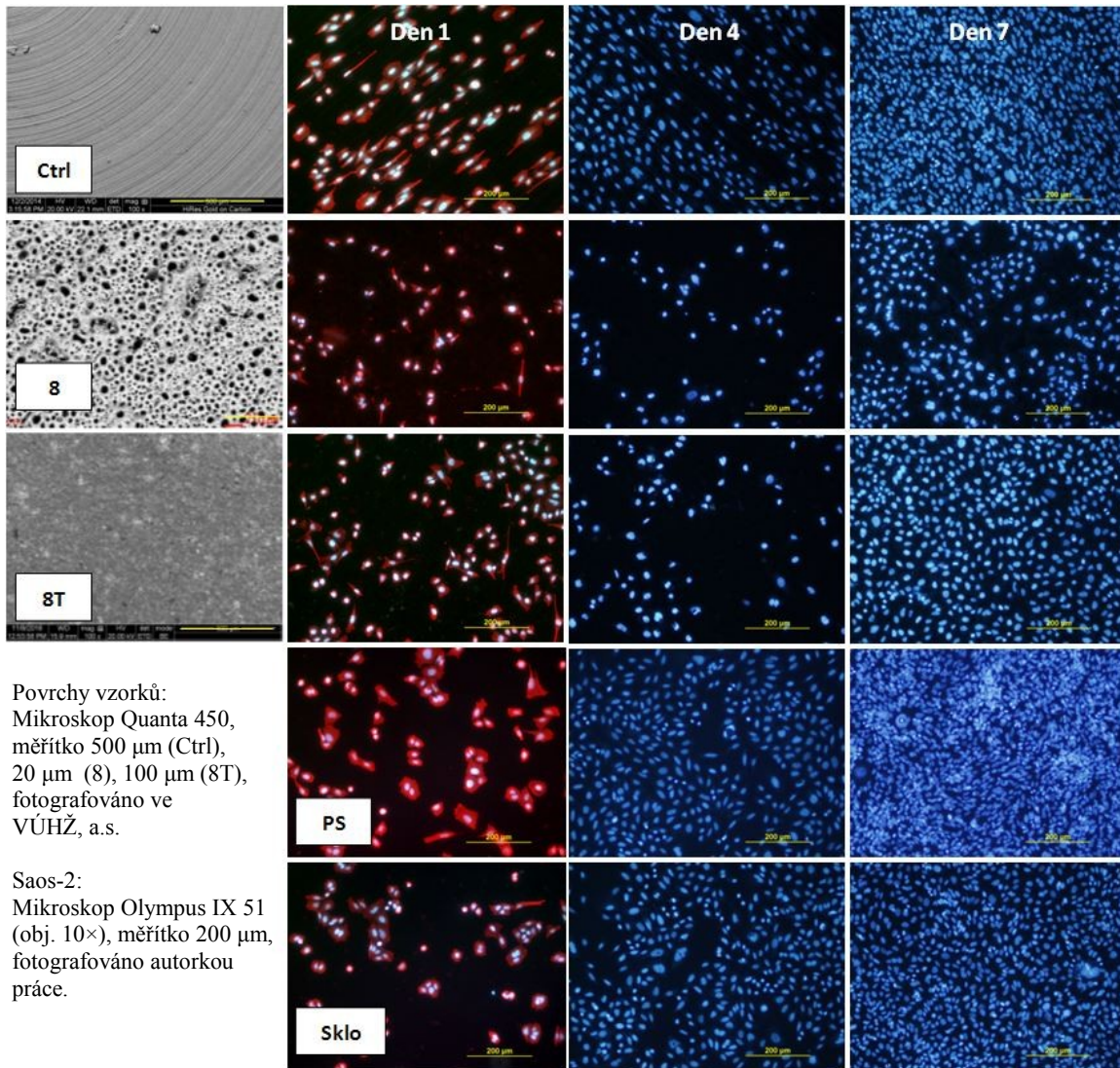
Obr. 26: Topografie povrchu vzorků znázorněná pomocí AFM (3 D režim). VÚHŽ, a.s. A) Vzorek č. 8. B) Vzorek č. 8T. Je patrný příznivý vliv tryskání jako konečné úpravy povrchu na jeho celkový charakter. Tato skutečnost se projevila i na parametrech drsnosti.

Kontaktní úhel vodní i glycerolové kapky byl několikanásobně nižší na anodizovaných vzorcích Ti-6Al-4V č. 8 než na kontrolních nemodifikovaných vzorcích slitiny (Ctrl) i druhém anodizovaném vzorku č. 8T. Vzorek č. 8 vykazoval výraznou smáčivost (kontaktní úhel vodní kapky 16°) a podobně i polární složka jeho povrchové energie byla vyšší než u ostatních srovnávaných vzorků (56 mN/m ve srovnání s 15-43 mN/m). Referenční vzorky (Ctrl, PS, sklo) můžeme považovat za mírně hydrofilní (71-76°), o nichž je známo, že svými vlastnostmi podporují proliferaci buněk velmi dobře (**Tab. 9**). Vzorek č. 8T, který se těmito hodnotám alespoň přibližuje, lze považovat za středně hydrofilní.

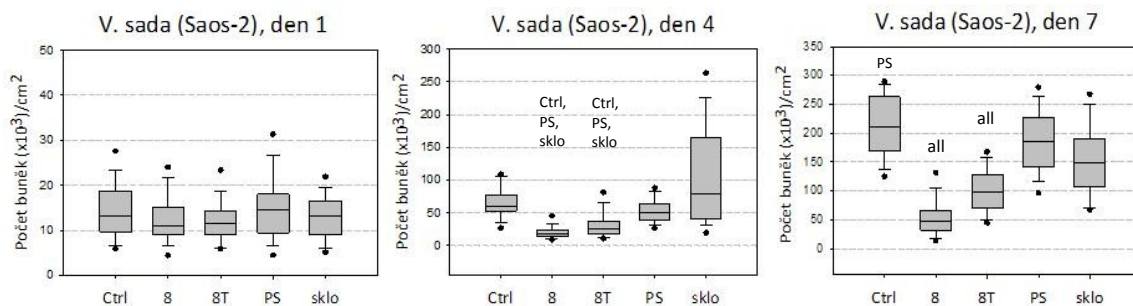
Po 1. dni kultivace byla populační hustota buněk na anodizovaných vzorcích mírně nižší než na kontrolních a referenčních vzorcích. Tento rozdíl však nebyl statisticky významný (**Graf 14**). Buňky adherovaly významně větší plochou pouze na kontrolních vzorcích slitiny (**Graf 13a**). Morfologie buněk na vzorcích Ctrl, 8 i 8T byla podobná, sestávající spíše z protáhlých buněk s dlouhými výběžky. Polygonálně rozprostřené buňky se vyskytovaly více na PS a sklu (**Obr. 27**). Od 4. dne kultivace vykazovaly buňky rostoucí na vzorcích č. 8 a 8T statisticky významně nižší rychlost proliferace oproti ostatním vzorkům (**Graf 14**, **Graf 13b**). Buňky na těchto vzorcích rostly více roztroušeně, ale kromě menší celkové plochy rozptřeni s nižší četností tvorby výběžků na vzorku č. 8 nevykazovaly ani v dalších kultivačních intervalech markantní rozdíly v morfologii. Rovněž viabilita buněk byla všeobecně vysoká, a mezi jednotlivými vzorky se v hodnocených intervalech (1., 4. a 7. den kultivace) nijak výrazně nelišila. Nejnižší hodnoty pro 1. den byly 96 %, pro 4. den 99 % a pro 7. den 97 % (**Obr. 21**, **Tab. 6**).



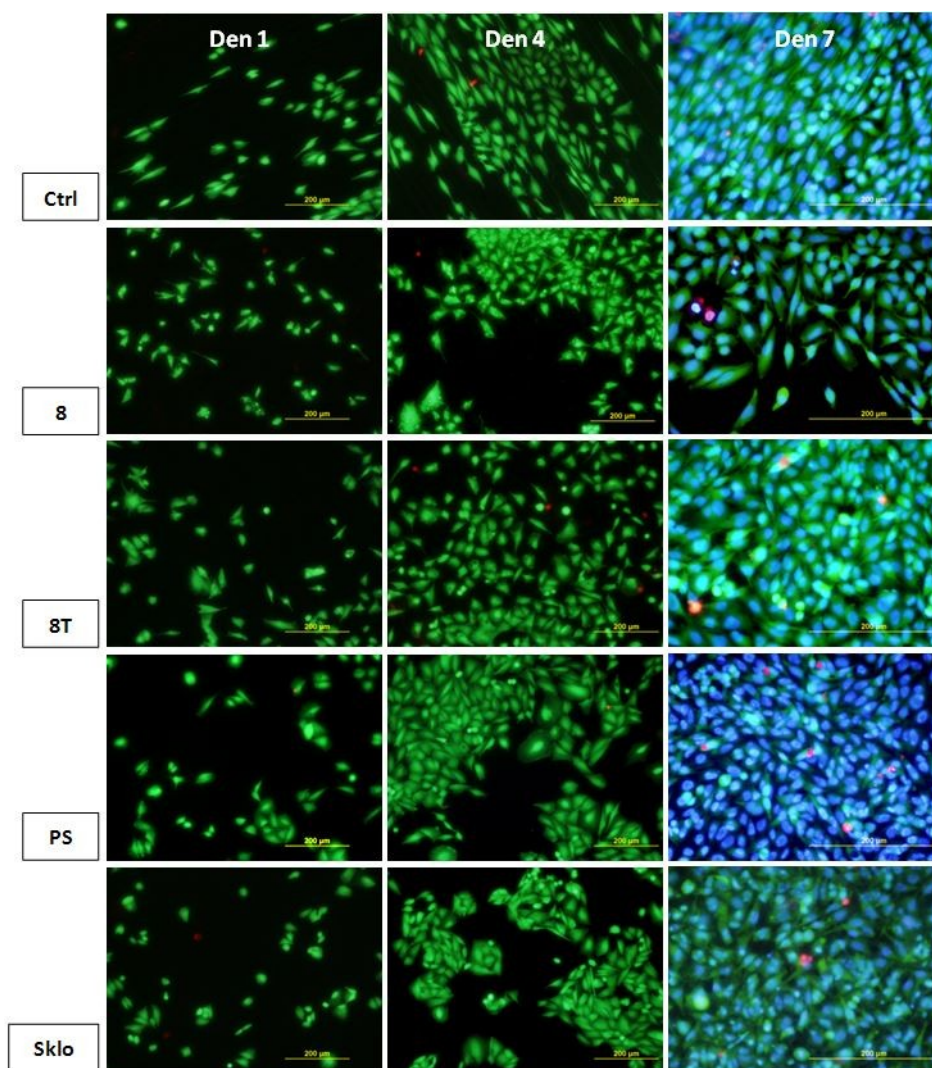
Graf 13: A) Plochy rozptřeni lidských osteoblastů linie Saos-2 na vzorcích V. sady. Průměr \pm S.E.M ze 150 měření pro každou skupinu vzorků. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p < 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám). **B) Dynamika růstu Saos-2 na vzorcích V. sady.** Data jsou zobrazena jako mediány naměřených hodnot.



Obr. 27: Povrchy vzorků, morfologie a proliferace osteoblastů Saos-2 na vzorcích Ti-6Al-4V (Ctrl, 8, 8T), PS a sklu po 1, 4 a 7 dnech kultivace. Buňky barveny fluorescenčními barvivou Texas Red C₂-maleimid (červená fluorescence) a Hoechst #33258 (modrá fluorescence; 4 a 7 den byly buňky barveny pouze tímto barvivem).



Graf 14: Populační hustota buněk osteoblastů Saos-2 na vzorcích slitiny Ti-6Al-4V (Ctrl, 8, 8T), PS a sklu po 1, 4 a 7 dnech kultivace. Počet buněk na vzorku je přepočten na cm². Medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média; extrémní hodnoty vyznačeny černými tečkami. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám).



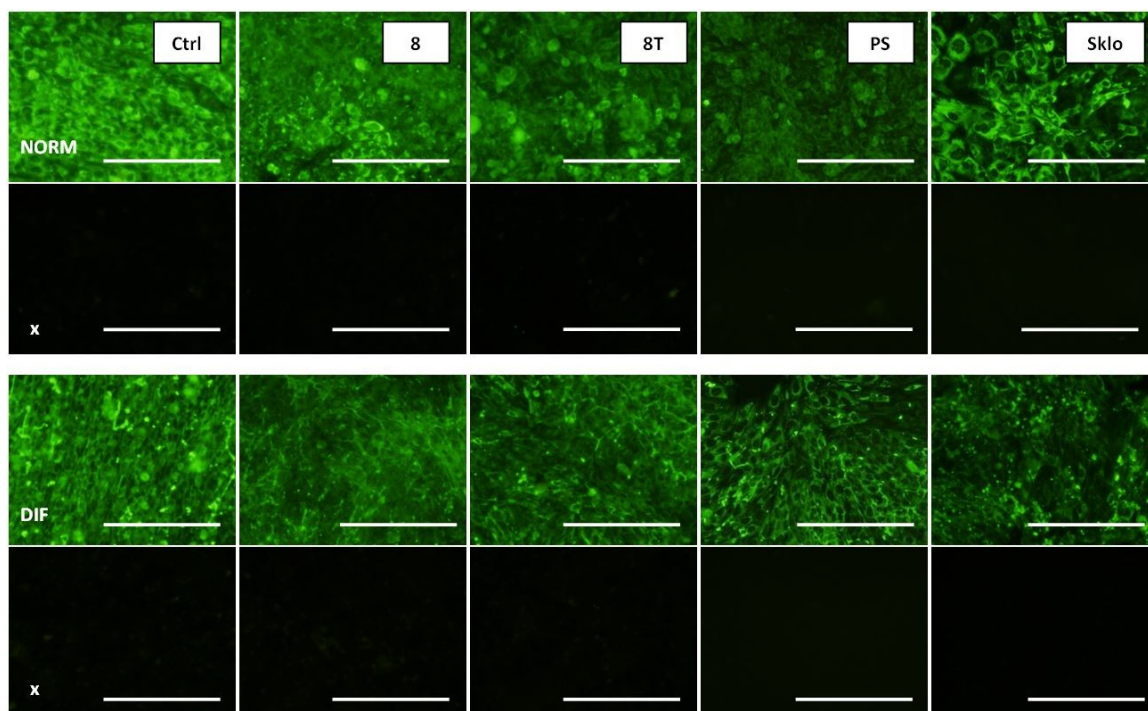
Obr. 28: Viabilita buněk na vzorcích V. sady ve srovnání s PS a sklem. Barveno pomocí kitu LIVE/DEAD viability/cytotoxicity. Pro přehlednost byla 7. den jádra buněk dobarvena fluorescenčním barvivem Hoechst #33342 (modrá fluorescence). Živé buňky zobrazeny zeleně, mrtvé červeně, jádra živých buněk modře. Mikroskop Olympus IX 51, obj. 10× (den 1 a 4), obj. 20× (den 7), měřítko 200 μm.

Tab. 10: Viabilita osteoblastů Saos-2 na vzorcích sady V, vyjádřená v % z celkového počtu buněk. Průměrná hodnota ze 16 snímků pro každou experimentální skupinu.

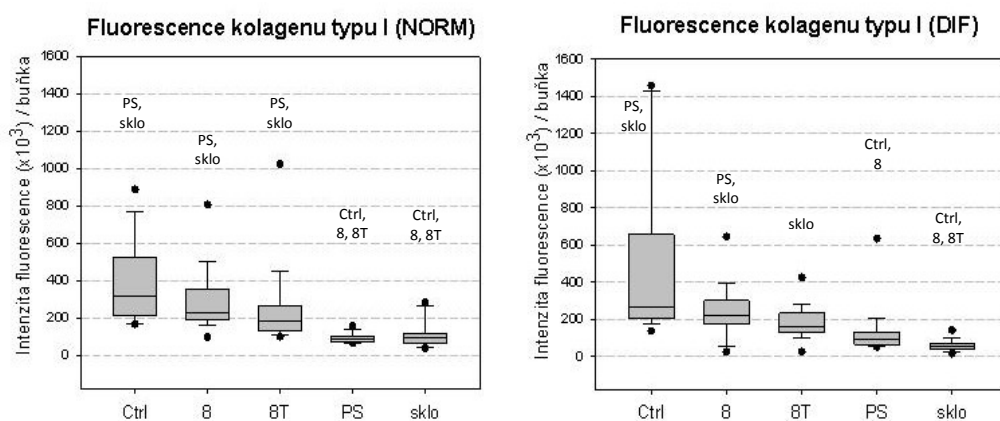
V. sada	Viabilita buněk [%]		
	1. den	4. den	7. den
Ctrl	98,99	99,61	98,07
8	98,50	99,34	97,97
8T	97,77	98,65	98,24
PS	99,40	99,86	98,30
Sklo	96,94	99,36	98,02

Hodnocení diferenciací buněk mírou produkce kolagenu typu I bylo z důvodu pomalejší proliferace buněk na vzorku č. 8 oddáleno na 16. den namísto 14. dne jako u ostatních pokusů. Médium podporující diferenciaci bylo přidáno až po dosažení konfluency na všech vzorcích 9. den. Naměřená produkce kolagenu typu I na obou materiálech upravených PEO (8 i 8T) byla významně vyšší než na dnech standardních kultivačních jamek (PS) i skle jak u buněk kultivovaných po celou dobu ve standardním kultivačním médiu (NORM), tak v médiu s přidavkem osteogenních faktorů (DIF) (**Obr. 29, Graf 15**). Vyšší hodnoty kolagenu typu I na vzorku č. 8 ve srovnání s 8T, která ale nedosahovala statistické významnosti se objevila také při hodnocení jeho genové exprese metodou qPCR po kultivaci v médiu DIF i NORM (**Graf 18, kapitola 9.6**).

Můžeme shrnout, že vzorky Ti-6Al-4V modifikované PEO, značené č. 8 a 8T (tryskaný), podporovaly adhezi a růst lidských kostních buněk linie Saos-2 v rozsahu obdobném nebo nižším než standardní kultivační materiály (mikroskopická sklíčka, polystyrenové kultivační jamky). Nemodifikované vzorky slitiny (Ctrl) podporovaly adhezi a růst buněk podobným způsobem jako referenční materiály, navíc také podporovaly časnou osteogenní diferenciaci. Buňky rostly o něco lépe na vzorku č. 8T než na vzorku č. 8. Tento rozdíl je při $p \leq 0,05$ hodnocen jako statisticky významný až v pozdějších fázích kultivace. Všechny dodané kovové materiály, modifikované či nemodifikované PEO, podporovaly osteogenní diferenciaci lépe než standardní kultivační materiály (PS, sklo).



Obr. 29: Imunofluorescenční barvení kolagenu I v kulturách lidských osteoblastů linie Saos-2 za 16 dnů po nasazení na vzorky slitiny Ti-6Al-4V (Ctrl, 8, 8T), PS a sklo. Po 9 dnech kultivace ve standardním médiu bylo toto médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Pro kontrolní barvení byly buňky inkubovány bez primární protilátky (x). Mikroskop Olympus IX 51, obj. 20×, měřítko 200 μm .

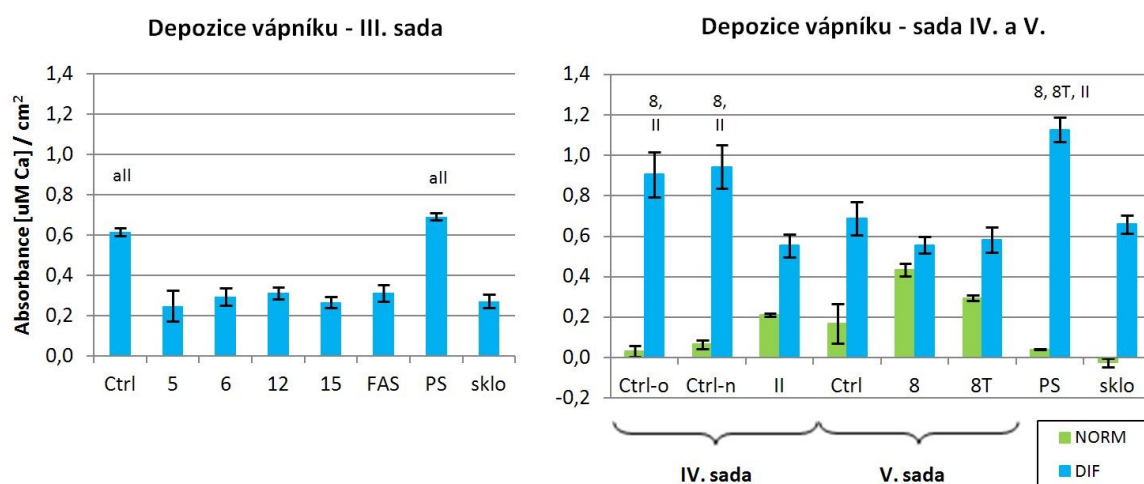


Graf 15: Množství kolagenu typu I, produkovaného buňkami Saos-2 po 16 dnech kultivace, měřené intenzitou fluorescence. Přepočteno na buňku. Po 9 dnech kultivace ve standardním médiu bylo médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Zobrazen medián hodnot s kvartily (1. a 3. kvartil, čili 25. a 75. percentil) z 20 měření pro každou skupinu vzorků a typ kultivačního média, extrémní hodnoty vyznačeny černými tečkami. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu.

9.6 Společné pokusy

Na vzorcích III., IV. a V. sady byla navíc v rámci společných pokusů stanovena úroveň depozice vápníku buňkami Saos-2 po 14 dnech kultivace v médiu NORM a DIF, a provedeno hodnocení genové exprese osteogenních markerů ALP, Col I a OC po 7 a 14 dnech kultivace v médiu NORM a DIF. Tyto výsledky jsou mezi sebou porovnatelné, proto jsou uvedeny v samostatné podkapitole.

Hodnocení mineralizace ECM měřením depozice vápníku na vzorcích slitiny Ti-6Al-4V bylo u III. sady vzorků provedeno pouze pro buňky pěstované s přidavkem média podporujícího osteogenní diferenciaci (DIF) z důvodu nedostatku vzorků. Další vzorky této sady nám již nebyly dodány, a proto nebylo možné dále ověřovat získaná data. Vzorky ostatních sad byly hodnoceny při kultivaci buněk v médiu DIF i NORM. Ze všech hodnocených anodizovaných vzorků Ti-6Al-4V dosáhly relativně nejvyšší úrovně depozice vápníku při kultivaci v médiu podporujícím osteogenní diferenciaci (DIF) vzorky V. sady (8 a 8T), následované vzorkem IV. sady (II). Společnou charakteristikou těchto vzorků je velice podobné složení alkalických elektrolytů použitých při úpravě PEO (viz **Příloha A**). Vzorky sady III, které se od sad IV a V lišily především parametry drsnosti povrchu Ra i Rz v tom smyslu, že byly nižší, a vykazovaly tak hladší povrch, nedosahovaly takové míry depozice vápníku jako ostatní srovnávané anodizované vzorky (**Graf 16**).



Graf 16: Depozice vápníku lidskými osteoblasty linie Saos-2 na vzorcích sady III. (Ctrl, 5, 6, 12, 15, FAS), sady IV. (Ctrl-o, Ctrl-n, II) a sady V. (Ctrl, 8, 8T) za 14 dní po nasazení. Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo toto médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Průměr ± SD ze 6 měření na 2 nezávislých vzorcích pro každou skupinu vzorků. Přepočítáno na plochu vzorku. Kruskal-Wallis One Way ANOVA, metoda Dunnové, $p \leq 0,05$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám).

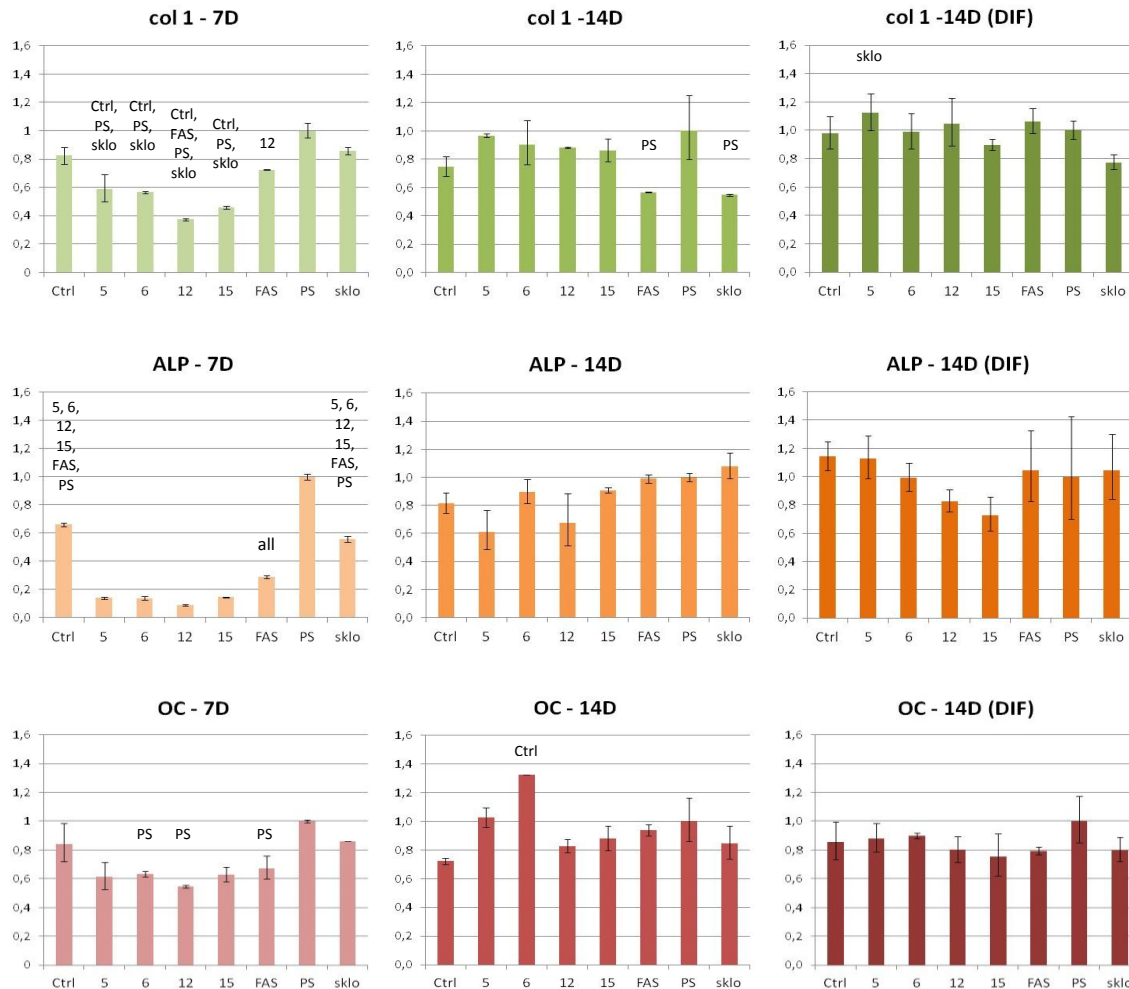
Hodnoty povrchové energie, včetně její polární složky, mezi jednotlivými vzorky nedosahovaly výrazných rozdílů. Výjimkou byl pouze vysoce hydrofobní vzorek FAS, který však při tomto hodnocení nevykazoval rozdíl ve srovnání s ostatními skupinami. Zajímavým faktem je skutečnost, že hodnoty depozice vápníku na standardních kultivačních materiálech (PS a sklo) vycházely v tomto pokusu rozdílně pro každou testovací skupinu (sada III, sady IV+V), přestože hodnoty naměřené na vzorku Ctrl, taktéž totožném v obou pokusech, si byly vzájemně podobné. Vzorky byly kultivovány ve 24-jamkových destičkách, odděleně po jednotlivých sadách a typech médií.

Pro charakterizaci osteogenní diferenciaci metodou RT qPCR byly zvoleny tři markery: kolagen typu I (col 1; gen COL1A1) jako časný, alkalická fosfatáza (ALP; gen ALPL) jako střednědobý a osteokalcin (OC; gen BGLAP) jako pozdní marker diferenciaci (**Graf 17, Graf 18**).

Buňky na modifikovaných vzorcích sady III (5, 6, 12, 15), vyjma vzorku FAS, nedosahovaly po 7 dnech kultivace v médiu NORM ještě konfluenci. Buňky na vzorcích č. 5 a 6 se blížily subkonfluentnímu stavu, avšak na vzorcích č. 12 a 15 rostly stále relativně odděleně nebo v ostrůvcích (**Obr. 20**). Tyto buňky začaly diferencovat později, a proto i jejich exprese kolagenu je nižší ve srovnání s referenčními vzorky (PS, sklo) i Ctrl, a relativně nižší ve srovnání se vzorky č. 5 a 6. Z modifikovaných vzorků nejvíce podporoval časnou diferenciaci vzorek FAS. Po 14 dnech kultivace v médiu NORM se však tato situace obrátila a na FAS byl zaznamenán útlum genové exprese kolagenu, zatímco na ostatních anodizovaných vzorcích její nárůst. Buňky kultivované v diferenciacním médiu vykazovaly velmi obdobnou míru exprese kolagenu, což znamená, že se dostaly již do pokročilejšího stádia diferenciaci (**Graf 17**).

Míra exprese střednědobého markeru ALP dále zvýraznila rozdíl v diferenciacní aktivitě vzorků Ctrl, PS, sklo a FAS, ve srovnání s nimiž byla exprese po 7 dnech kultivace v médiu NORM na vzorcích č. 5, 6, 12 a 15 byla velmi nízká. Tento rozdíl se 14. den kultivace vyrovnal mezi všemi hodnocenými vzorky a statisticky významný rozdíl v expresi ALP nebyl nalezen ani u buněk kultivovaných v médiu DIF (**Graf 17**).

Expresi pozdního markeru diferenciaci – osteokalcinu – byla překvapivě vyšší na vzorcích č. 5 a 6, které 14. den kultivace v médiu NORM překročily hodnoty exprese na PS a byly také statisticky významně vyšší než na vzorku Ctrl. Buňky kultivované v médiu DIF vykazovaly velmi vyrovnanou expresi OC bez statisticky významných rozdílů.

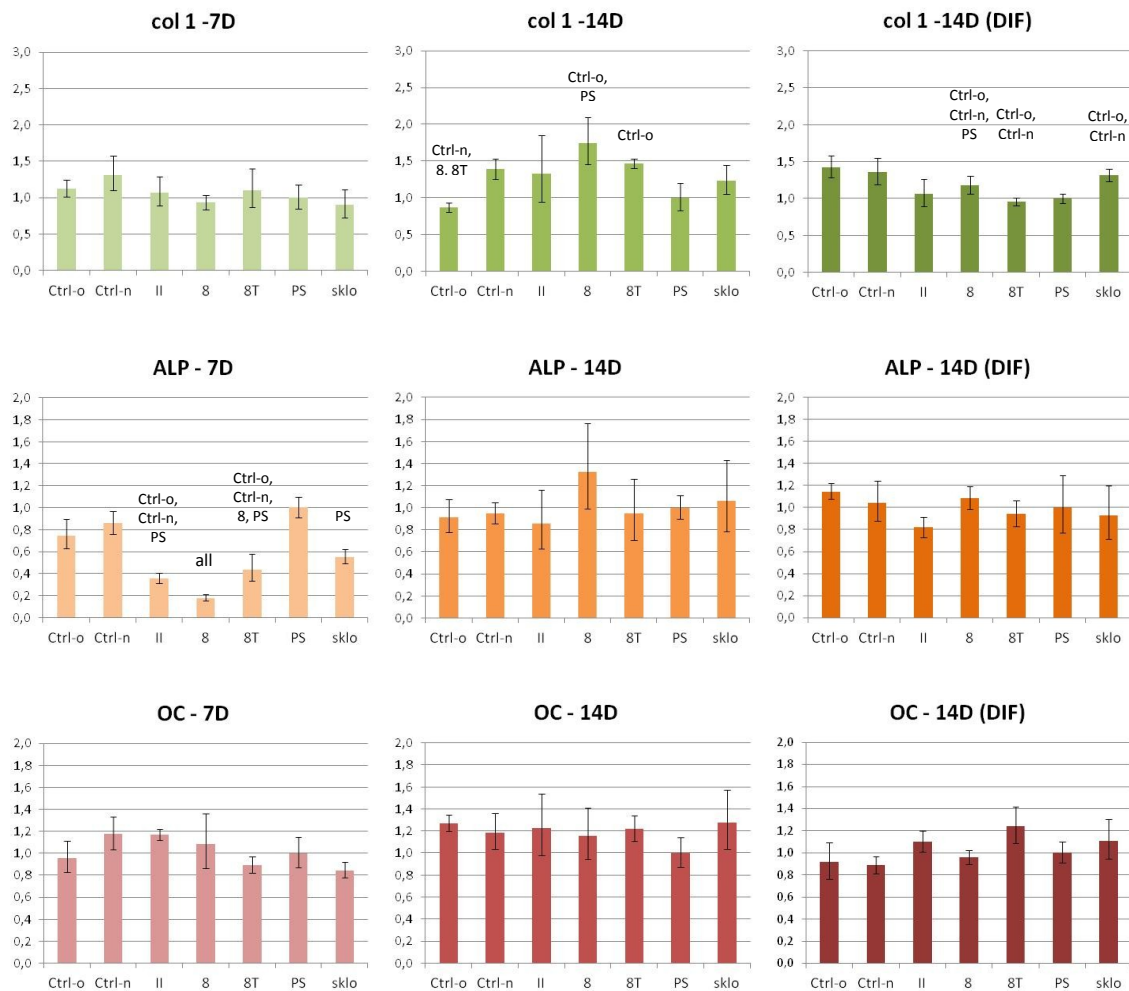


Graf 17: Kvantifikace genové exprese kolagenu typu I (col 1), alkalické fosfatázy (ALP) a osteokalcinu (OC) osteoblasty linie Saos-2 na vzorcích sady III. (Ctrl, 5, 6, 12, 15, FAS). Grafy zobrazují expresi měřenou po 7 dnech (7D) a 14 dnech (14D) kultivace ve standardním médiu nebo médiu s přidavkem osteogenních faktorů (14D (DIF)). Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo toto médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Průměr ± SD ze 4 měření na 2 nezávislých vzorcích pro každou skupinu vzorků. Data normalizována podle míry exprese sledovaných genů buňkami Saos-2 rostoucími na polystyrenu (PS, kalibrátor) ve stejných časových intervalech kultivace pro každý typ média. ANOVA, metoda Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,001$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám).

Buňky na modifikovaných vzorcích IV. a V. sady (II, 8, 8T) nevykazovaly 7. den kultivace v médiu NORM odlišnosti v míře exprese časného diferenciačního markeru kolagenu typu I. V souladu s jejich nižší rychlostí proliferace a pozdějším dosažením konfluence však bylo možné pozorovat statisticky významně vyšší expresi kolagenu typu I po 14 dnech kultivace v tomto médiu, a to u vzorků č. 8 a 8T ve srovnání s PS a nemodifikovaným kontrolním vzorkem sady IV, upraveným omíláním (Ctrl-o). Ve stejném intervalu u buněk kultivovaných v médiu DIF byl zaznamenán rychlejší pokles exprese kolagenu právě na těchto vzorcích (vz. 8 a 8T; **Graf 18**).

Střednědobý marker ALP, stejně jako u předchozí hodnocené sady vzorků (sada III) rovněž ukázal po 7 dnech kultivace v médiu NORM významný vzestup exprese u buněk diferencujících na vzorcích, kde bylo dosahováno vyšší populační hustoty a dřívější konfluence (**Obr. 23, Obr. 27**). Přesto však exprese na vzorku č. 8T byla statisticky významně vyšší než na vzorku č. 8 a mírně zvýšená oproti vzorku č. II. Po 14 dnech kultivace exprese ALP na vzorku č. 8 stoupla a vyrovnala se hodnotami zjištěnými na všech ostatních vzorcích. Z grafu kvantifikace exprese buněk kultivovaných v médiu DIF vidíme, že rozdíly v naměřených hodnotách se dále stíraly a exprese ALP buňkami kultivovanými v médiu DIF byla v tomto intervalu kultivace již vyrovnaná mezi všemi hodnocenými vzorky (**Graf 18**).

V expresi pozdního diferenciačního markeru osteokalcinu na vzorcích nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v žádném z hodnocených kultivačních intervalů ani u jednoho z typů kultivačních médií (**Graf 18**).



Graf 18: Kvantifikace genové exprese kolagenu typu I (col 1), alkalické fosfatázy (ALP) a osteokalcinu (OC) osteoblasty linie Saos-2 na vzorcích sady IV. (Ctrl-o, Ctrl-n, II) a sady V. (Ctrl, 8, 8T). Grafy zobrazují expresi měřenou po 7 dnech (7D) a 14 dnech (14D) kultivace ve standardním médiu nebo médiu s přidavkem osteogenních faktorů (14D (DIF)). Po 7 dnech kultivace ve standardním médiu bylo médium vyměněno za médium o stejném složení (NORM) nebo za médium doplněné osteogenními faktory (DIF). Průměr ± SD ze 4 měření na 2 nezávislých vzorcích pro každou skupinu vzorků. Data normalizována podle míry exprese sledovaných genů buňkami Saos-2 rostoucími na polystyrenu (PS, calibrator) ve stejných časových intervalech kultivace pro každý typ média. ANOVA, metoda Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,001$. Statisticky významné rozdíly vůči ostatním skupinám vyznačeny nad sloupci grafu („all“ označuje významnost vůči všem ostatním skupinám).

10. DISKUSE

Titan a jeho slitiny mají dnes v biomedicíně široké využití ve formě dočasných či trvalých implantátů. Díky vysoké biokompatibilitě, výborné korozní odolnosti v prostředí tělních tekutin a mechanickým vlastnostem jsou vhodné pro aplikaci v tvrdých tkáních, a jejich použití je tedy rozšířené především v oblastech ortopedie a stomatologie. Za účelem vylepšení přirozených vlastností bývají často ošetřovány různými druhy povrchových úprav, které modifikují jeho charakter a složení, díky čemuž je možné ovlivnit buněčné interakce na povrchu implantátu po jeho vložení do organismu.

Slitina Ti-6Al-4V ELI se vyznačuje velmi dobrou stálostí oxidických vrstev i ve velmi náročných prostředích. V prostředí těla zajišťuje korozní odolnost především právě pasivní oxidická vrstva na jejím povrchu. Ta je u slitiny Ti-6Al-4V tvořena převážně TiO_2 s malým podílem TiO , Ti_2O_3 . Hliník je přítomen buď ve formě Al_2O_3 nebo jako součást TiO_2 , přičemž poměr Ti/Al může být různý v závislosti na podmínkách vzniku vrstvy. Vanad ve vnější povrchové oxidické vrstvě nebyl vůbec detekován (Ask *et al.* 1989), ale jeho výskyt byl zaznamenán ve velmi malém množství v oblasti mezi oxidickou vrstvou a samotným materiálem (Manivasagam *et al.* 2003). Stabilita oxidů záleží na strukturním složení a tloušťce vrstvy (de Viteri *et Fuentes* 2013).

Při biomedicínských aplikacích je pro biokompatibilitu důležitá nejen morfologie povrchu a jeho fyzikální vlastnosti, ale i chemické složení povrchových oxidů a fyziologického prostředí, kterému je implantát vystaven. Nejrozšířenější úpravou povrchu titanových slitin je oxidace anodizací (de Viteri *et Fuentes* 2013). Technologie plazmatické elektrolytické oxidace (PEO) slouží k vytvoření tenké porézní oxidické vrstvy (se strukturou podobnou keramickým materiálům) o požadovaných vlastnostech na povrchu materiálu. Je považována za ekonomicky efektivní metodu, s nízkými provozními náklady, snadnou kontrolou parametrů procesu a variabilitou v produkci různých typů povlaků. Výhodou je také to, že při ní nedochází ke vzniku toxických zplodin (Wang *et al.* 2005).

V rámci této práce bylo v podmínkách *in vitro* hodnoceno pět sad materiálů ze slitiny Ti-6Al-4V ELI, z nichž 10 vzorků bylo povrchově upravených kombinací metody PEO v prostředí alkalických elektrolytů o různém složení a následných mechanických úprav povrchu (**Příloha A**). Tři vzorky první sady byly anodizovány v nízkonapěťovém

režimu klasické anodické oxidace. Vliv povrchových charakteristik materiálu, jako je jeho topografie, drsnost, smáčivost a povrchová energie byl interpretován na základě chování buněk linie Saos-2 na upravených vzorcích slitiny. Jako referenční materiály byly použity kontrolní nemodifikované vzorky slitiny (Ctrl) a také dna standardních polystyrenových kultivačních komůrek (PS) a mikroskopická krycí sklíčka (sklo), která svojí mírnou hydrofilitou odpovídají smáčivosti povrchu považované za optimální pro adsorpci proteinů z média a buněčnou adhezi (Bačáková *et al.* 2014; Liu *et al.* 2007).

V případě anodizovaných **vzorků I. sady (vz. 5.1, 6.1, 7.1)** se parametr drsnosti R_a pohyboval na rozmezí submikrodrsnosti ($R_{a_{5.1}} = 0,89 \mu\text{m}$) a mikrodrsnosti ($R_{a_{7.1}} = 2,28 \mu\text{m}$), což byla celkově nejvyšší naměřená drsnost ze všech testovaných vzorků. Jako první byla pozornost věnována ploše rozprostření a morfologii buněk, která je důležitým indikátorem buněčné adheze a má vliv na následnou proliferaci buněk (He *et al.* 2008). Výrazné změny v morfologii a snížená schopnost adheze mohou být prvními známkami nepříznivého účinku materiálu na buňky (Kirkpatrick *et Mittermayer* 1990). Buňky se jevily od prvního dne spíše menší, tj. méně rozprostřené na povrchu materiálu, a protáhlé oproti referenčním vzorkům, což bylo nejvíce zřetelné na vz. 6.1, na němž byla rovněž zaznamenána nejpomalejší proliferace. Povrchová vrstva na materiálu byla u všech vzorků velice porézní, u vz. 6.1 a 7.1 značně nehomogenní, vytvářející nerovnoměrně rozloženou síť nerovností v podobě zaoblených vrcholků a prohlubní. Byla zaznamenána tendence buněk se svou morfologií přizpůsobovat rozložení nerovností na povrchu materiálu – v některých oblastech se vyskytovaly buňky více rozprostřené, jinde více protáhlé. Tento jev, označovaný jako „contact guidance“, tj. řízení tvaru, orientace, migrace a proliferace buněk povrchovou topografií materiálu, je znám již dlouho a existují snahy o jeho využití pro vylepšení buněčné adheze specifickými modifikacemi topografie povrchu (Myllymaa *et al.* 2009). Orientace buněk tímto způsobem byla pozorována i na dalších vzorcích v rámci této práce – nejlépe na kontrolních vzorcích slitiny (Ctrl), upravovaných jemným soustružením, ve srovnání s PS, kde byly buňky orientovány nahodile a rozprostíraly se vždy stejným způsobem. V průběhu kultivace vz. 5.1, 6.1 a 7.1 bylo pozorováno ve značné míře odlupování částic materiálu do média, což jasně naznačovalo nestabilitu oxidické vrstvy v důsledku její nedostatečné adheze k základnímu podkladovému materiálu (substrátu) a tím i nevhodnost použité povrchové úpravy. V prostředí těla by uvolňování částic ve větším množství mělo za následek zánětlivou reakci a poškození okolní tkáně (Alvarez *et Nakajima* 2009), s možnými

genotoxickými a dalšími negativními projevy, přisuzovanými hliníku a vanadu (Biesiekierski *et al.* 2012; Gomes *et al.* 2011), v této slitině obsaženým. Také na základě výsledků elektrochemických zkoušek a instrumentálních hodnocení provených našimi spolupracovníky z VÚHŽ, a.s. bylo konstatováno, že získané modifikované povrchy neodpovídají svými vlastnostmi požadavkům pro své potenciální uplatnění v oblasti povrchových úprav traumatologických implantátů. Tyto vzorky byly z dalšího hodnocení vyřazeny a bylo přistoupeno k úpravě metody povrchové modifikace i samotného složení elektrolytů.

Při úpravě **II. sady vzorků (vz. 1 a 2)** byla již použita PEO, s níž bylo dosaženo ztenčení povrchové oxidické vrstvy, takže její tloušťka i další parametry již byly spolehlivě měřitelné, i zlepšení její homogenity. Rovněž nanoindentační a adhezní zkoušky provedené ve VÚHŽ, a.s. potvrdily, že takto připravené tenké vrstvy vyhovují vlastnostem požadovaným u zdravotnických aplikací. Po konečné úpravě omíláním a tryskáním dosáhly parametry drsnosti Ra anodizovaných vzorků této sady submikronové drsnosti (0,12 – 0,15 μm), v podstatě srovnatelné s drsností kontrolních nemodifikovaných vzorků Ctrl z I. sady (Ra = 0,16 μm), což je činilo relativně hladké. Výsledky různých studií (Nebe *et al.* 2007; Eisenbarth *et al.* 2002) ukázaly, že osteoblasty lépe adherují na povrchy zdrsňelé (Ra > 0,5 μm) než na velmi hladké leštěné povrchy (Ra < 0,07 μm). Buňky Saos-2 na oba námi sledované materiály adherovaly velmi dobře, s obdobnou iniciální plochou rozptřeni jako standardní kultivační materiály (PS, sklo), v časných fázích kultivace pomaleji proliferovaly, avšak dosahovaly konfluency zhruba ve stejnou dobu. Výsledky měření fluorescenčního signálu produkce kolagenu typu I nasvědčují, že oba vzorky podporují časnou osteogenní diferenciaci rozsahu obdobném nebo vyšším ve srovnání s PS a sklem. V pozdějších intervalech kultivace dosahoval lepších výsledků vz. 1, který se vyznačoval o něco vyššími parametry drsnosti, větší smáčivostí a značně vyšší hodnotou povrchové energie než vz. 2. Hlavní oxid povrchové vrstvy, TiO_2 , se na obou vzorcích vyskytoval především v krystalické formě anatasu. Je známo, že anatas stimuluje osídlení povrchu buňkami díky své mírné hydrofilitě (kontaktní úhel cca 60° u čistého anatasu; He *et al.* 2008) a v prostředí tělních tekutin (pH = 7,4) má mírný záporný náboj (Marcolongo *et al.* 1998). Záporný povrchový náboj mají také osteoblasty, které se k takto nabitému povrchu vážou přes proteiny s pozitivně nabitými skupinami (Gongadze *et al.* 2011). Literatura uvádí, že adheze a proliferace osteoblastů je podporována spíše přítomností kladně nabitých skupin na povrchu

materiálu, zatímco se zdá, že záporně nabitě skupiny podporují spíše osteogenní diferenciaci v pozdějších stádiích kultivace, což je v souladu s předchozími studiemi naší skupiny (Jirka *et al.* 2013; Vandrovcová *et al.* 2014).

III. sadou vzorků pokračovalo testování účinků různých typů elektrolytů při současném ověřování reprodukovatelnosti výsledků výroby povrchových vrstev. Je známo, že nejen způsob úpravy povrchu, ale i složení je faktorem, který může ovlivnit architekturu, morfologii, tloušťku a další fyzikálně-chemické vlastnosti vrstvy (Zhang *et al.* 2010; Yao *et al.* 2006). V rámci této sady bylo připraveno pět vzorků (**vz. 5, 6, 12, 15, FAS**), z nichž první čtyři jmenované byly modifikovány PEO v elektrolytech o rozdílných složeních (**Příloha A**). Vzorek FAS vznikl vystavením vzorku č. 5 roztoku 1 hm. % fluoroalkylsilanu (tj. (tridecafluorooctyl)-triethoxysilanu) v ethanolu. Cílem této úpravy bylo ovlivnit smáčivost materiálu směrem k hydrofobicitě snížením jeho povrchové energie a sledovat jeho vliv na chování buněk. Uvádí se, že adheze a růst buněk je optimální na mírně hydrofilních površích, na něž se proteiny zprostředkující buněčnou adhezi adsorbují ve flexibilní konformaci, výhodné pro vazbu adhezních receptorů buněk, přičemž uchycení proteinů je relativně pevné a stabilní. Námi pozorovaná adheze a proliferace však byla vysoká i na vysoce hydrofobních vzorcích FAS (kontaktní úhel s vodou $112,6 \pm 4,8^\circ$, celková povrchová energie $9,5 \pm 5,8$ mN/m), které dosahovaly od 4. dne kultivace hodnot statisticky významně vyšších než na ostatních PEO upravených vysoce hydrofilních vzorcích 5, 6, 12, 15. Podle odborné literatury se na vysoce hydrofobní vzorky (kontaktní úhel s vodou $> 100^\circ$) proteiny zprostředkující buněčnou adhezi v rigidní a denaturované konformaci, nevýhodné pro vazbu buněčných adhezních receptorů (Vasita *et al.* 2008; Vagaská *et al.* 2009; Bačáková *et al.* 2011). Např. silikonové substráty pokryté fluoroalkylsilanem (kontaktní úhel $112,2 \pm 2,6^\circ$) výrazně redukovaly růst astrocytů (Patel *et al.* 2006). Tyto materiály rovněž měly vliv na redukci adheze a proliferace bakterií jako *Staphylococcus epidermidis* (Tang *et al.* 2009) nebo *Escherichia coli* (Cao *et al.* 2006). Bakteriologické testy s *Escherichia coli*, provedené na vzorcích FAS externím spolupracovníkem však jejich antibakteriální účinek neprokázaly (tyto výsledky nejsou součástí práce). Také velice nízké hodnoty polární povrchové energie měly za následek zhoršenou proliferaci osteoblastů (Kubies *et al.* 2011). Příčiny zvýšené proliferace kostních buněk na površích vystavených FAS v naší studii je však nutné dále zkoumat, a to především z hlediska fyzikálně-chemických vlastností tohoto povrchu, jako je jeho drsnost, morfologie a změny chemismu povrchové

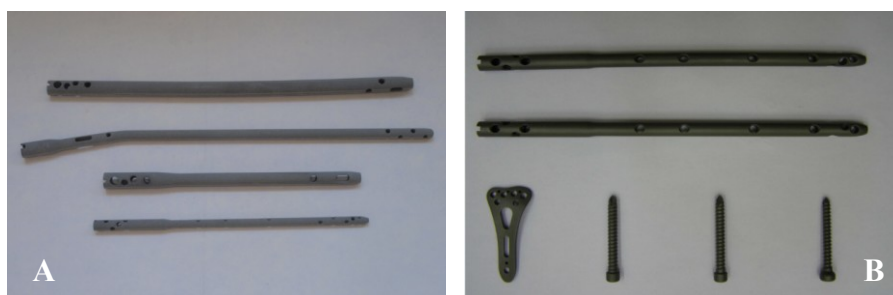
vrstvy po fluorinaci povrchu fluoroalkylsilanem. Silany se používají k vytvoření tzv. samoskladných monovrstev (self-assembled monolayers, SAMs) na povrchu materiálů, sloužící k jejich funkcionalizaci biomolekulami. Je proto možné, že právě změněný charakter chemických skupin zlepšuje interakci osteoblastů s povrchem implantátu (Mastrangelo 2011). Dodatečná úprava povrchové vrstvy může tedy výrazně ovlivnit buněčnou odpověď.

IV. sada vzorků (vz. II) byla použitým typem elektrolytu návratem k látkám testovaným v rámci sady II (**Příloha A**). S touto sadou byly testovány nejen nemodifikované kontrolní vzorky slitiny Ti-6Al-4V bez finální povrchové úpravy (Ctrl-n), ale i tytéž kontrolní vzorky, avšak opracované omíláním keramickými tělísky (Ctrl-o). Omílání vedlo ke změně obou hodnocených parametrů drsnosti (snížení Ra i Rz), snížení kontaktních úhlů s testovacími kapalinami (z 86° na 69° s vodou a ze 73° na 71° s glycerolem), ale i snížení povrchové energie (**Tab. 7**, str. 66). Charakter povrchové vrstvy vzorku II po aplikaci PEO a omletí ve vibračně žlabovém stroji byl méně homogenní než v předchozí hodnocené sadě i sadě II, což se odrazilo také ve zvýšení drsnosti povrchu. Především parametr Rz vzorku II ($9,62 \pm 1,08 \mu\text{m}$) byl nejvyšší ze všech vzorků hodnocených v rámci této práce. Vzorek zároveň vykazoval výraznou smáčivost, pravděpodobně podpořenou zatékáním kapaliny do prohlubní na jeho povrchu. Některé studie (Sawase *et al.* 2008; Yamauchi *et al.* 2017) udávají, že superhydrofilita (kontaktní úhel $< 5^\circ$) povrchu příznivě ovlivňuje osteointegraci především v časných fázích vhojování implantátu. Tuto tendenci jsme však v podmínkách *in vitro* nepozorovali. Přestože viabilita buněk na všech hodnocených vzorcích byla výborná, iniciační adhezní plochy, proliferační dynamika i časná osteogenní diferenciace byla u vz. II obdobná jako na standardních kultivačních materiálech, avšak horší než na kontrolním omletém vzorku slitiny (Ctrl-o). Na vysoce hydrofilních vzorcích totiž mohou být proteiny uchyceny slabě a nestabilně, a proto jsou buňky náchylné k odloučení v pozdějších kultivačních intervalech (Bačáková *et al.* 2011). Domníváme se také, že výrazná povrchová topografie vede k nutnosti buněk přizpůsobovat se nerovnostem a omezuje tak rychlost jejich růstu.

Nedostatky v parametrech procesu PEO a finální mechanické úpravy vzorků byly odstraněny při výrobě **V. sady vzorků (vz. 8, 8T)**. Povrchová vrstva měla homogenní charakter a dobrou adhezi k základnímu substrátu. Tloušťka vytvořených povrchových vrstev dosahovala hodnot do 1 μm . Úprava tryskáním (vz. 8T) měla pozitivní dopad jak

na sjednocení povrchu vzorku a parametry drsnosti, tak na odstranění krystalické fáze TiO_2 ve formě rutilu. Oba vzorky dosahovaly dobré úrovně smáčivosti s hodnotami polární složky povrchové energie vyššími než standardní kultivační materiály (PS, sklo) i kontrolní vzorky slitiny (Ctrl). Vzorek 8T dosahoval kontaktního úhlu vody $35,4^\circ$ (středně hydrofilní), vzorek 8 kontaktního úhlu $15,6^\circ$ (vysoce hydrofilní). Adheze a proliferace buněk Saos-2 na vzorcích 8 a 8T byla obdobná nebo nižší než na Ctrl, PS a skle. Rozdíly v proliferaci mezi oběma vzorky byly patrné až po 7 dnech kultivace, kdy buňky na vz. 8T dospěly dříve do stádia konfluence. Oba vzorky zhruba ve stejné míře podpořily časnou osteogenní diferenciaci buněk.

Ze závěrečných pokusů, provedených společně na vzorcích sady III, IV a V vyplývá, že buňky na vzorcích č. II, 8 a 8T modifikovaných PEO mineralizovaly svoji ECM rychleji než buňky na ostatních hodnocených anodizovaných vzorcích. Rovněž jejich genová exprese sledovaných diferenciačních markerů (kolagenu typu I, alkalické fosfatázy a osteokalcinu) se už v časných fázích diferenciaci blížila více expresi buněk kultivovaných na kontrolních vzorcích (Ctrl) a standardních kultivačních materiálech (PS, sklo). Vzorky č. 8 a 8T dosahovaly relativně dobrých výsledků ve všech buněčných testech, čímž prokázaly tím dobrý osteointegrační potenciál. Na rozdíl od vzorku č. II u nich bylo dosaženo optimalizace postupu finální mechanické úpravy povrchové vrstvy, jehož výsledkem bylo její ztečnění a sjednocení, aniž by došlo k jejímu místnímu poškození touto úpravou. Jako nejvhodnější materiály pro výrobu krátkodobých implantátů byly proto vyhodnoceny právě vzorky č. 8 a 8T (**Obr. 30**). Domníváme se také, že vzorky FAS se díky výrazné podpoře proliferace buněk a míře exprese diferenciačních markerů buněk blízké referenčním vzorkům hodí spíše k výrobě výrobě implantátů trvalých. Jak však již bylo řečeno, vliv fluoroalkylsilanu a důvody pozitivního vlivu na chování buněk na těchto vzorcích však bude nutné dále zkoumat.



Obr. 30: Finální povrchy dočasných implantátů po aplikaci procesu PEO. A) Vzorek 8 (netryskaný); B) Vzorek 8T (tryskaný). Sjednocené povrchy implantátů mají po anodizaci a následném otryskání vnější vrstvy matný charakter (médiu balotina 65-105, pracovní vzdálenost 15 cm, tlak 1,5 bar). VÚHŽ a.s., 2017.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyhodnotit biokompatibilitu materiálů ze slitiny Ti-6AL-4V, modifikovaných anodizací a plazmatickou elektrolytickou oxidací (PEO) o různých parametrech procesu s následnými mechanickými úpravami, v prostředí *in vitro*, a posoudit, který materiál se jeví jako nejvhodnější pro aplikaci v dočasných implantátech do kostní tkáně. Vliv vlastností materiálu na buněčnou odpověď v rámci osteointegrace je nejvýrazněji ovlivněn kombinací faktorů, jako je smáčivost povrchu (reprezentovaná jeho kontaktním úhlem s kapalinami a povrchovou energií) drsnost, topografie, chemické složení a povrchový náboj. Všechny materiály, které jsme pomáhali vyvíjet, umožňovaly v různé míře adhezi, proliferaci i diferenciaci lidských kostních buněk linie Saos-2 podobným osteoblastům, aniž by výrazně ovlivnily jejich životaschopnost. Materiály sady I byly z pokusů vyřazeny z důvodu nedostatečné adheze povrchové oxidické vrstvy k podkladovému materiálu, avšak potvrdily nutnost úpravy výrobního procesu povrchové vrstvy a finálního mechanického opracování. Materiály sady II po aplikaci upraveného postupu PEO ukázaly dobrou adhezi, proliferaci i časnou osteogenní diferenciaci buněk i na relativně hladkých materiálech o submikronové drsnosti. Větší vliv v tomto případě měla mírná hydrofilita materiálů, podobná standardním kultivačním materiálům, stejně jako vysoké hodnoty polární složky povrchové energie, jejíž příznivý vliv na buněčnou adhezi je z literatury obecně znám. V rámci materiálů sady III byly hodnoceny vzorky dodatečně vystavené roztoku fluoroalkylsilanu s ethanolem. Navzdory vysoce hydrofobnímu charakteru povrchu vzorků s extrémně nízkou hodnotou povrchové energie, jejichž vliv na buněčnou adhezi a proliferaci byl v mnoha studiích hodnocen jako spíše inhibiční, vykazovaly tyto materiály zcela opačné výsledky. Přesné mechanismy působící při zmíněné kombinaci úprav a charakteru povrchu na zvolený buněčný model takto neočekávaným způsobem však v tuto chvíli nejsme schopni zcela jednoznačně vysvětlit. Díky lepšímu osteointegračnímu potenciálu vzorků s FAS, charakterizovaným zvýšenou podporou proliferace i diferenciaci (při srovnání genové exprese vybraných diferenciacních markerů s ostatními vzorky stejné sady), ovšem vykazují určitý potenciál pro použití v implantátech dlouhodobého charakteru, a proto považujeme za vhodné příčiny pozitivního vlivu této úpravy dále zkoumat. V rámci IV. sady vzorků byla prozkoumána naopak vysoká hydrofilita, která v kombinaci se výrazným rozdíly mezi prohlubněmi a výstupky v topografii vzorků však podle našich pozorování vedla spíše ke ztížení jak podmínek pro adhezi, tak i proliferaci a diferenciaci ve srovnání s referenčními

materiály. Nejvhodnějšími vlastnostmi podle našich pozorování disponovaly vzorky V. sady. Současně došlo k odstranění nedostatků v parametrech procesu PEO i optimalizaci finální mechanické úpravy, vedoucí k dobré reprodukovatelnosti výsledků povrchové modifikace. Oba vzorky testované v rámci této sady dosahovaly dobré úrovně smáčivosti v obou hodnocených parametrech a vykazovaly dobrou iniciální adhezi a obdobnou nebo mírně nižší proliferaci buněk ve srovnání s referenčními materiály (kontrolní vzorky slitiny, dna polystyrenových kultivačních jamek a sklo). Také úroveň mineralizace i exprese vybraných osteogenních markerů se u těchto vzorků nejvíce blížila referenčním materiálům. Můžeme proto shrnout, že vzorky 8 a 8T prokázaly dostatečný osteointegrační potenciál pro použití v dočasných implantátech do kostí a je možné je doporučit k intenzivnějšímu testování, a to i formou preklinických studií v podmínkách *in vivo*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*. 10: 96–101.

ALVAREZ, K.; NAKAJIMA, H. (2009). Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials*. 2(3): 790–832.

ANDERSON, J. M. (2001). Biological Responses to Materials. *Annual Review of Materials Research*. 31(1): 81–110.

ANITUA, E.; PIÑAS, L.; MURIAS, A.; PRADO, R.; TEJERO, R. (2015). Effects of calcium ions on titanium surfaces for bone regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 130: 173–181.

ANSELME, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 21(7):667–681.

ANSELME, K.; BIGERELLE, M. (2014). On the relation between surface roughness of metallic substrates and adhesion of human primary bone cells: Relation surface roughness/cell adhesion. *Scanning*. 36(1): 11–20.

ARMENTANO, I.; DOTTORI, M.; FORTUNATI, E.; MATTIOLI, S.; KENNY, J.M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*. 95, 2126–2146.

ASK, M.; LAUSMAA, J.; KASEMO, B. (1989). Preparation and surface spectroscopic characterization of oxide films on Ti6Al4V. *Applied Surface Science*. 35(3): 283–301.

BAČÁKOVÁ, L.; FILOVÁ, E.; PAŘÍZEK, M.; RUML, T.; ŠVORČÍK, V. (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 29(6): 739–767.

BAČÁKOVÁ, L.; FILOVÁ, E.; RYPÁČEK, F.; ŠVORČÍK, V.; STARÝ, V. (2004). Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research*. 53(Supplement 1): 35–45.

BAČÁKOVÁ, L.; ŠVORČÍK, V. (2008). Cell colonization control by physical and chemical modification of materials. In: KIMURA, D. (Ed.). *Cell Growth Processes: New Research*. Nova Science Publishers, Inc., USA. Pp. 5–56.

BELL, B.F.; SCHULER, M.; TOSATTI, S.; TEXTOR, M.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. (2011). Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics: Osteoblast response to ligand-functionalized titanium. *Clinical Oral Implants Research*. 22(8): 865–872.

BIESIEKIERSKI, A.; WANG, J.; ABDEL-HADY GEPREEL, M.; WEN, C. (2012). A new look at biomedical Ti-based shape memory alloys. *Acta Biomaterialia*. 8(5): 1661–1669.

BURNETTE, D.M.; RATKAY, J.; CHEHROUDI, B. (1991). Behavior of osteoblasts on micromachined surfaces. In: Davies, J. E. (Ed.) *The Bone-Biomaterial Interface*. University of Toronto Press, Toronto 1991. Pp. 170-180.

- BUSER, D.; SCHENK, R.K.; STEINEMANN, S.; FIORELLINI, J.P.; FOX, C.H.; STICH, H. (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research*. 25(7): 889–902.
- CAO, T.; TANG, H.; LIANG, X.; WANG, A.; AUNER, G. W.; SALLEY, S. O.; NG, K. Y.S. (2006). Nanoscale investigation on adhesion of *E. coli* to surface modified silicone using atomic force microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*. 94(1): 167–176.
- CLARKE, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 3(Supplement 3): 131–139.
- COLNOT, C.; ROMERO, D. M.; HUANG, S.; RAHMAN, J.; CURREY, J. A.; NANCI, A.; BRUNSKI, J. B.; HELMS, J. A. (2007). Molecular Analysis of Healing at a Bone-Implant Interface. *Journal of Dental Research*. 86(9): 862–867.
- CZEKANSKA, E.; STODDART, M.; RICHARDS, R.; HAYES, J. (2012). In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells and Materials*. 24: 1–17.
- CZEKANSKA, E.; STODDART, M.; RICHARDS, R.; HAYES, J. (2014). A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing: Phenotypic Comparison of Osteoblast Cell Lines. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 102(8): 2636–2643.
- DEMNATI, I.; GROSSIN, D.; COMBES, C.; REY, C. (2014). Plasma–Sprayed Apatite Coatings: Review of Physical–Chemical Characteristics and Their Biological Consequences. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 34(1): 1–7.
- DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D.S. (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*. 2011: 1–19.
- DISEGI, J. A. (2000). Titanium alloys for fracture fixation implants. *Injury*. 31: 14–17.
- ECHEVERRY–RENDÓN, M.; GALVIS, O.; QUINTERO GIRALDO, D.; PAVÓN, J.; LÓPEZ–LACOMBA, J.L.; JIMÉNEZ–PIQUÉ, E.; ANGLADA, M.; ROBLEDO, S.M.; CASTAÑO, J.G.; ECHEVERRÍA, F. (2015). Osseointegration improvement by plasma electrolytic oxidation of modified titanium alloys surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 26(2): 72.
- EISENBARTH, E.; LINEZ, P.; BIEHL, V.; VELTEN, D.; BREME, J.; HILDEBRAND, H. (2002). Cell orientation and cytoskeleton organisation on ground titanium surfaces. *Biomolecular Engineering*. 19(2-6): 233–237.
- EVERTS, V.; DELAISSÉ, J. M.; KORPER, W. *et al.* (2002). The bone lining cell: Its role in cleaning howship’s lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 17(1): 77–90.
- FENG, B.; WENG, J.; YANG, B.C.; QU, S.X.; ZHANG, X.D. (2003). Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials*. 24(25): 4663–4670.
- FERNÁNDEZ–TRESGUERRES–HERNÁNDEZ–GIL, I.; ALOBERA–GRACIA, M. A.; DEL–CANTO–PINGARRÓN, M. *et al.* (2006a). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 11(1): E47–51.

FERNÁNDEZ–TRESGUERRES–HERNÁNDEZ–GIL, I.; ALOBERA–GRACIA, M. A.; DEL–CANTO–PINGARRÓN, M. *et al.* (2006b). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 11(2): E151–157.

FERRARIS, S.; SPRIANO, S. (2016). Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Materials Science and Engineering: C*. 61: 965–978.

FRANZ, S.; RAMMELT, S.; SCHARNWEBER, D.; SIMON, J.C. (2011). Immune responses to implants: A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 32: 6692–6709.

GEETHA, M.; SINGH, A.K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A.K. (2009). Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants. *Progress in Materials Science*. 54: 397–425.

GENTLEMAN, M. M.; GENTLEMAN, E. (2014). The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions. *International Materials Reviews*. 59(8): 417–429.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. (2005). Bone substitutes: An update. *Injury*. 36, 20–27.

GIORDANO C.; SAINO E.; RIMONDINI L.; PEDEFERRI M.P.; VISAI L.; CIGADA A.; CHIESA R. (2011). Electrochemically induced anatase inhibits bacterial colonization on Titanium Grade 2 and Ti6Al4V6 alloy for dental and orthopedic devices. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 88(2): 648–655.

GOMES, C. C.; MOREIRA, L. M.; SANTOS, V. J. S. V.; RAMOS, A. S.; LYON, J. P.; SOARES, C. P.; SANTOS, F. V. (2011). Assessment of the genetic risks of a metallic alloy used in medical implants. *Genetics and Molecular Biology*. 34(1): 116–121.

GONGADZE, E.; KABASO, D.; BAUER, S.; SCHMUKI, P.; SLIVNIK, T.; VAN RIENEN, U.; IGLIČ, A. (2011). Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface. *International Journal of Nanomedicine*. 6: 1801 – 1816.

HANAWA, T. (2004). Metal ion release from metal implants. *Materials Science and Engineering: C*. 24: 745–752.

HAUSSER, H.-J.; BRENNER, R. E. (2005). Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 333(1): 216–222.

HAYAKAWA, T.; YOSHINARI, M.; NEMOTO, K.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. (2000). Effect of surface roughness and calcium phosphate coating on the implant/bone response. *Clinical Oral Implants Research*. 11(4): 296–304.

HAYES, J. S.; CZEKANSKA, E. M.; RICHARDS, R. G. (2012). The Cell–Surface Interaction. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 126: 1–31.

HE, J.; ZHOU, W.; ZHOU, X.; ZHONG, X.; ZHANG, X.; WAN, P.; ZHU, B.; CHEN, W. (2008). The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 19(11): 3465–3472.

JIRKA, I.; VANDROVCOVÁ, M.; FRANK, O.; TOLDE, Z.; PLŠEK, J.; LUXBACHER, T.; BAČÁKOVÁ, L.; STARÝ, V. (2013). On the role of Nb-related sites of an oxidized β -TiNb alloy surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells. *Materials Science & Engineering: C, Materials for Biological Applications*. 33(3): 1636–1645.

- JØRGENSEN, N. R.; HENRIKSEN, Z.; SØRENSEN, O.H.; CIVITELLI, R. (2004). Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids*. 69(4): 219–226.
- KARTSOGIANNIS, V.; NG, K. W. (2004). Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 228(1–2): 79–102.
- KASEMO, B. (2002). Biological surface science. *Surface Science*. 500: 656–677.
- KESELOWSKY B. G.; COLLARD D. M.; GARCIA A. J. (2004). Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Material Research: Part A*. 66: 47–259.
- KHURANA, J. S.; FITZPATRICK, L. A. (2009). Osteoporosis and metabolic bone disease. In: KHURANA, J. S. (ed.) *Bone pathology*. New York: Humana Press, Springer. Pp. 217–237.
- KIM, H.-G.; AHN, S.-H.; KIM, J.-G.; JUN PARK, S.; LEE, K.-R. (2005). Corrosion performance of diamond-like carbon (DLC)-coated Ti alloy in the simulated body fluid environment. *Diamond and Related Materials*. 14(1): 35–41.
- KIM, Y.-W. (2010). Surface Modification of Ti Dental Implants by Grit-Blasting and Micro-Arc Oxidation. *Materials and Manufacturing Processes*. 25(5): 307–310.
- KING, A.; PHILLIPS, J. R. A. (2016). Total hip and knee replacement surgery. *Surgery* (Oxford). 34: 468–474.
- KIRKPATRICK, C. J.; MITTERMAYER, C. (1990). Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1(1): 9–13.
- KRZĄKAŁA, A.; KAZEK-KĘSIK, A.; SIMKA, W. (2013). Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys. *RSC Advances*. 3(43): 19725–19743.
- KŘIVOHLÁVEK, M.; TALLER, S.; LUKÁŠ, R.; DRÁČ, P. (2014). Anatomické poznámky k miniinvazivní dlahové osteosyntéze proximálního humeru kadaverózní studie. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Českoslovaca*. 81: 63–69, (Obr. 3a).
- KUBIES, D.; HIMMLOVÁ, L.; RIEDEL, T.; CHÁNOVÁ, E.; BALÍK, K.; DOUDĚROVÁ, M.; BÁRTOVÁ, J.; PEŠÁKOVÁ, V. (2011). The interaction of osteoblasts with bone-implant materials: 1. The effect of physicochemical surface properties of implant materials. *Physiological Research*. 60(1): 95–111.
- KUMAR, P.; FATHIMA, G.; VINITHA, B. (2013). Bone grafts in dentistry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 5(Supl. 1): 125–127.
- KUO, Y.-C.; RAJESH, R.; (2017). Guided differentiation and tissue regeneration of induced pluripotent stem cells using biomaterials. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 77: 41–53.
- KUROMOTO, N. K.; SIMÃO, R. A.; SOARES, G. A. (2007). Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. *Materials Characterization*. 58: 114–121.

- KUZYK, P.; SCHEMITSCH, E. (2011). The basic science of peri-implant bone healing. *Indian Journal of Orthopaedics*. 45(2): 108–115.
- LANGER R.; VACANTI J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*. 260: 920–926.
- LE GUILLOU-BUFFELLO, D.; BAREILLE, R.; GINDRE, M.; SEWING, A.; LAUGIER, P.; AMÉDÉE, J. (2008). Additive Effect of RGD Coating to Functionalized Titanium Surfaces on Human Osteoprogenitor Cell Adhesion and Spreading. *Tissue Engineering Part A*. 14(8): 1445–1455.
- LI, X.-J.; JEE, W. S. S. (2005). Integrated bone tissue anatomy and physiology. In: DENG, H.-W.; LIU, Y.-Z. (eds.) *Current Topics in Bone Biology*. Singapore: World Scientific Publishing. Pp. 11-56.
- LIU, X.; CHU, P.; DING, C. (2004). Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 47: 49–121.
- LIU, X.; LIM, J. Y.; DONAHUE, H. J.; DHURJATI, R.; MASTRO, A. M.; VOGLER, E. A. (2007). Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. *Biomaterials*. 28(31): 4535–4550.
- LIU, X.; LIM, J.Y.; DONAHUE, H.J.; DHURJATI, R.; MASTRO, A. M.; VOGLER, E. A. (2007). Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. *Biomaterials*. 28(31): 4535–4550.
- LIU, X.; MA, P. X. (2004). Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. 32: 477–486.
- LÜLLMANN–RAUCH, R. (2012). *Histologie*. 1. české vyd. Přeložili R. ČIHÁK *et al.* Překlad 3. vyd. Praha: Grada. Str. 137–138, Fig. 8.26.
- MANIVASAGAM, G.; MUDALI, U. K.; ASOKAMANI, R.; RAJ, B. (2003). Corrosion and Microstructural Aspects of Titanium and its Alloys as Orthopaedic Devices. *Corrosion Reviews*. 21: 125 – 159.
- MANOLAGAS, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 21(2): 115–137.
- MARCOLONGO, M.; DINARDO, N.J.; HICKOK, N.; TUAN, R.; POUREZZAEI, K.; BEARD, R.; BRENNAN, D.; HEIPP, P.; PHAN, T. (1998). Osteoblast Attachment on Biomaterials as a Function of Surface Charge. *Material Research Society Proceedings*. 550: 121–126.
- MASTRANGELO, F.; FIORAVANTI, G.; QUARESIMA, R.; VINCI, R.; GHERLONE, E. (2011). Self-Assembled Monolayers (SAMs): Which Perspectives in Implant Dentistry? *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2(5): 533–543.
- MESCHER, A. L. (2010). *Junqueira's basic histology: text & atlas*. 12th ed. New York: McGraw–Hill Medical. Pp. 121–139.

- MICHAEL, H.; HÄRKÖNEN, P. L.; VÄÄNÄNEN, H. K.; *et al.* (2005). Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*. 20(12): 2224–2232.
- MINAGAR, S.; WANG, J.; BERNDT, C. C.; IVANOVA, E. P.; WEN, C. (2013). Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys: Cell Response of Anodized Titania Nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 101A(9): 2726–2739.
- MITTAL, Y.; JINDAL, G.; GARG, S. (2016). Bone manipulation procedures in dental implants. *Indian Journal of Dentistry*. 7(2): 86–94.
- MYLLYMAA, K.; MYLLYMAA, S.; KORHONEN, H.; LAMMI, M.J.; SAARENPÄÄ, H.; SUVANTO, M.; PAKKANEN, T.A.; TIITU, V.; LAPPALAINEN, R. (2009). Improved adherence and spreading of Saos-2 cells on polypropylene surfaces achieved by surface texturing and carbon nitride coating. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 20: 2337–2347.
- NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTANO, O.; PLANELL, J. (2008). Biomaterials in orthopaedics. *Journal of The Royal Society Interface*. 5(27): 1137–1158.
- NEBE, J. G. B.; LUETHEN, F.; LANGE, R.; BECK, U. (2007). Interface Interactions of Osteoblasts with Structured Titanium and the Correlation between Physicochemical Characteristics and Cell Biological Parameters. *Macromolecular Bioscience*. 7(5): 567–578.
- NIINOMI, M. (1998). Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Materials Science and Engineering: A*. 243(1-2): 231–236.
- NING, C.; ZHOU, L.; TAN, G. (2016). Fourth-generation biomedical materials. *Materials Today*. 19: 2–3.
- PARFITT, Michael A. (2002). Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*. 30(1): 5–7.
- PARK, J-B.; KIM, Y. S.; LEE, G.; YUM, B. G.; KIM, CH-H. (2013). The Effect of Surface Treatment of Titanium with Sand-Blasting/Acid-Etching or Hydroxyapatite-Coating and Application of Bone Morphogenetic Protein-2 on Attachment, Proliferation, and Differentiation of Stem Cells Derived from Buccal Fat Pad. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 10(3): 115–121.
- PATEL, K. R.; TANG, H.; GREVER, W. E.; NG, K. Y. S.; XIANG, J.; KEEP, R. F.; CAO, T. MCALLISTER II, J. P. (2006). Evaluation of polymer and self-assembled monolayer coated silicone surfaces to reduce neural cell growth. *Biomaterials*. 27:1519–1526.
- PATTANAYAK, D. K.; YAMAGUCHI, S.; MATSUSHITA, T.; NAKAMURA, T.; KOKUBO, T. (2012). Apatite-forming ability of titanium in terms of pH of the exposed solution. *Journal of the Royal Society Interface*. 9: 2145–2155.
- PAUTKE, C.; SCHIEKER, M.; TISCHER, T.; KOLK, A.; NETH, P.; MUTSCHLER, W.; MILZ, S. (2004). Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts. *Anticancer Research*. 24, 3743–3748.
- POCOCK, N. A.; EISMAN, J. A.; HOPPER, J. L.; *et al.* (1987). Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *Journal of Clinical Investigation*. 80(3): 706–710.
- PULEO, D. A.; NANCI, A. (1999). Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*. 20(23-24): 2311–2321.

QIN, Q. H. (2013). *Mechanics of cellular bone remodelling: Coupled Thermal, Electrical and Mechanical Field Effects*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis. Pp. 1–22.

RAHAMAN, M. N.; YAO, A.; BAL, B. S.; GARINO, J. P. AND RIES, M. D. (2007). Ceramics for Prosthetic Hip and Knee Joint Replacement. *Journal of the American Ceramic Society*. 90: 1965–1988.

REINUS, W. R.; BARBE, M. F.; BARNEY, S.; KHURANA, J. S. (2009). Arthropathies. In: KHURANA, J. S. (ed.) *Bone pathology*. New York: Humana Press, Springer. Pp. 187–207.

RHO, J.-Y.; TSUI, T.Y.; PHARR, G.M. (1997). Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials*. 18(20): 1325–1330.

RIBEIRO, C.; SENCADAS, V.; CORREIA, D. M.; LANCEROS-MÉNDEZ, S. (2015). Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 136: 46–55.

RUPP, F.; GITTENS, R. A.; SCHEIDELER, L.; MARMUR, A.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z.; GEIS-GERSTORFER, J. (2014). A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects. *Acta Biomaterialia*. 10(7): 2894–2906.

SAFADI, F. F.; BARBE, M. F.; ABDELMAGID, S. M. *et al.* (2009). Bone structure, development and bone biology. In: KHURANA, J. S. (ed.) *Bone pathology*. New York: Humana Press, Springer. Pp. 1–50.

SAJESH, K.M.; JAYAKUMAR, R.; NAIR, S. V.; CHENNAZHI, K. P. (2013). Biocompatible conducting chitosan/polypyrrole–alginate composite scaffold for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 62: 465–471.

SALDAÑA, L; BENSAMAR, F.; BORÉ, A.; VILABOIA, N. (2011). In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomaterialia*. 7(12): 4210–4221.

SAWASE, T.; JIMBO, R.; BABA, K.; SHIBATA, Y.; IKEDA, T.; ATSUTA, M. (2008). Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clinical Oral Implants Research*. 19(5): 491–496.

SELHUBER-UNKEL, C.; ERDMANN, T.; LÓPEZ-GARCÍA, M.; KESSLER, H.; SCHWARZ, U. S.; SPATZ, J. P. (2010). Cell Adhesion Strength Is Controlled by Intermolecular Spacing of Adhesion Receptors. *Biophysical Journal*. 98(4): 543–551.

SETZER, B.; BÄCHLE, M.; METZGER, M. C.; *et al.* (2009). The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. *Biomaterials*. 30(6): 979–990.

SEVILLA, P.; VINING K.V.; DOTOR J.; RODRIGUEZ D.; GIL F.J.; APARICIO C. (2016). Surface immobilization and bioactivity of TGF- β 1 inhibitor peptides for bone implant applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 104(2): 385–394.

SHAMOS, M. H.; LAVINE, L. S. (1967). Piezoelectricity as a Fundamental Property of Biological Tissues. *Nature*. 213: 267–269.

SCHIERANO, G.; MUSSANO, F.; FAGA, M.G.; MENICUCCI, G.; MANZELLA, C.; SABIONE, C.; GENOVA, T.; DEGERFELD, M.M. VON, PEIRONE, B.; CASSENTI, A.; CASSONI, P.; CAROSSA, S. (2015). An Alumina Toughened Zirconia Composite for Dental Implant Application: *In Vivo* Animal Results. *BioMed Research International*. 2015: 1–9.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA–CARRERAS, I.; FRISE, E. *et al.* (2012). Fiji: an open–source platform for biological–image analysis. *Nature methods*. 9(7): 676–682.

SCHULTZ, L. B.; CHEHAB, N. H.; MALIKZAY A.; HALAZONETIS T. D. (2000). p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. *Journal of Cell Biology*. 151: 1381–1390.

SLONE, R. M.; HEARE, M. M.; VANDER GRIEND, R. A.; MONTGOMERY, W. J. (1991). Orthopedic fixation devices. *RadioGraphics*. 11: 823–847.

STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. (2005). Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science*. 310(5751): 1135–1138.

TAN, D. S.; VRIES, T. J. DE; KUIJPERS–JAGTMAN, A. M. *et al.* (2007). Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone*. 41(5): 745–751.

TANG, H.; CAO, T.; WANG, A.; LIANG, X.; SALLEY, S.O.; MCALLISTER, J.P.; NG, K.Y.S. (2007). Effect of surface modification of silicone on *Staphylococcus epidermidis* adhesion and colonization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 80A(4): 885–894.

TEIXEIRA, R. L. P.; GODOY, G. C. D., PEREIRA, M. M. (2004). Calcium phosphate formation on alkali–treated titanium alloy and stainless steel. *Materials Research*. 7(2): 299–303.

TEMIYASATHIT, S.; JACOBS Ch. R. (2010). The osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1192: 422–428.

TURNER, C. (2004). Biomechanical aspects of bone formation. In: BRONNER, F.; FARACH–CARSON, M. C. (eds.) *Bone formation*. London: Springer. Pp. 79–105.

VAGASKÁ, B.; BAČÁKOVÁ, L.; FILOVÁ, E.; BALÍK, K. (2010). Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiological Research*. 59: 309–322.

VANDROVCOVÁ, M.; JIRKA, I.; NOVOTNÁ, K.; LISÁ, V.; FRANK, O.; KOLSKÁ, Z.; STARÝ, V.; BAČÁKOVÁ, L. (2014). Interaction of human osteoblast-like Saos-2 and MG-63 cells with thermally oxidized surfaces of a titanium–niobium alloy. *PLoS One*. 9(6): e100475.

VASITA, R.; SHANMUGAM, K.; KATTI, D. (2008). Improved Biomaterials for Tissue Engineering Applications: Surface Modification of Polymers. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 8(4): 341–353.

VISSER, R.; RICO-LLANOS, G.A.; PULKKINEN, H.; BECERRA, J. (2016). Peptides for bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 244: 122–135.

VITERI, V. S.; FUENTES, E. (2013). Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials. In: GEGNER, J. (ed.). *Tribology – Fundamentals and Advancements*. InTech. Pp. 155–181.

WANG, Y. M.; JIA, D. C.; GUO, L. X.; LEI, T. Q.; JIANG, B. L. (2005). Effect of discharge pulsating on microarc oxidation coatings formed on Ti6Al4V alloy. *Materials Chemistry and Physics*. 90: 128–133.

WILLIAMS, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 29: 2941–2953.

YAMAUCHI, R.; ITABASHI, T.; WADA, K.; TANAKA, T.; KUMAGAI, G.; ISHIBASHI, Y. (2017). Photofunctionalised Ti6Al4V implants enhance early phase osseointegration. *Bone and Joint Research*. 6(5): 331–336.

YAO, Z.; JIANG, Z.; ZHANG, X. (2006). Effect of Na₂SO₄ on Structure and Corrosion Resistance of Ceramics Coatings Containing Zirconium Oxide on Ti-6Al-4V Alloy. *Journal of the American Ceramic Society*. 89(9): 2929 – 2932.

ZHANG, X. L.; JIANG, Z. H.; YAO, Z. P.; WU, Z. D. (2010). Electrochemical study of growth behaviour of plasma electrolytic oxidation coating on Ti6Al4V: Effects of the additive. *Corrosion Science*. 52(10): 3465–3473.

ZHAO, F.; WANG, J.; GUO, H.; LIU, S.; HE, W. (2015). The Effects of Surface Properties of Nanostructured Bone Repair Materials on Their Performances. *Journal of Nanomaterials*. 2015: 1–12, Fig. 5.

ZHAO, G.; SCHWARTZ, Z.; WIELAND, M.; RUPP, F.; GEIS-GERSTORFER, J.; COCHRAN, D.L.; BOYAN, B.D (2005). High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 74(1): 49–58.

ZILBERMAN, M.; ELSNER, J. (2008). Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *Journal of Controlled Release*. 130(3): 202–215.

Internetové zdroje

Fiji – ImageJ [online]. Poslední revize 16. prosince 2016 [Cit. 2017–03–01]. Dostupné na [www: < https://imagej.net/Fiji >](http://www.imagej.net/Fiji).

Major Differences. Difference between Bone and Cartilage [online]. c2013–2017 [Cit. 2017–05–29]. Dostupné na [www: < http://www.majordifferences.com/2013/02/difference-between-bone-and-cartilage.html >](http://www.majordifferences.com/2013/02/difference-between-bone-and-cartilage.html).

Material Properties Database [online]. c2009–2017 [Cit. 2017–06–27]. Dostupné na [www: < http://www.makeitfrom.com/compare/Grade-23-Ti-6Al-4V-ELI-R56407-Titanium/Grade-5-Ti-6Al-4V-3.7165-R56400-Titanium >](http://www.makeitfrom.com/compare/Grade-23-Ti-6Al-4V-ELI-R56407-Titanium/Grade-5-Ti-6Al-4V-3.7165-R56400-Titanium).

MEDIN, a.s. *Traumatologie* [online]. c2017 [Cit. 2017–02–21]. Dostupné na [www: < http://medin.cz/traumatologie >](http://medin.cz/traumatologie).

Symposium na téma trochatetické zlomeniny. *Zdravotnické noviny*. Praha: Mladá fronta [online]. 2012, č. 4. [Cit. 2017–02–21]. Dostupné na [www: < http://zdravi.euro.cz/clanek/mlada-fronta-zdravotnicke-noviny-zdn/symposium-na-tema-trochantericke-zlomeniny-463580 >](http://zdravi.euro.cz/clanek/mlada-fronta-zdravotnicke-noviny-zdn/symposium-na-tema-trochantericke-zlomeniny-463580).

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A Charakteristika testovaných vzorků.

Příloha B Makro pro automatické počítání jader buněk v programu FIJI – ImageJ.

Příloha C Prezentace dílčích výsledků práce na vědeckých konferencích a spoluúčast na člancích.