



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra biomedicínské techniky

Dynamická kultivace buněk na titanových matricích

Dynamic cultivation of cells on titanium substrates

Dizertační práce

Doktorský studijní program: Biomedicínská a klinická technika:

Studijní obor: Biomedicínská a klinická technika:

Školitel: prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA

Ing. Jana Štěpanovská

Kladno 2020

Prohlašuji, že jsem dizertační práci s názvem *Dynamická kultivace buněk na titanových maticích* vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k dizertační práci.

V Kladně dne 5. října 2020

.....

Ing. Jana Štěpanovská

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Jozefu Rosinovi, Ph.D., MBA za vedení a pomoc při řešení mé dizertační práce. Stejně tak bych ráda poděkovala i doc. Ing. Jiřímu Hozmanovi, Ph.D., který mi působil jako školitel dizertační práce první roky mého doktorského studia.

Dále děkuji prof. Ing. Peteru Kneppovi, DrSc. za možnost realizace technických řešení v laboratořích KBT FBMI ČVUT a doc. MUDr. Lucii Bačákové, CSc. za její pomoc i cenné rady a možnost realizace buněčných experimentů v laboratořích FGÚ AV ČR v.v.i., oddělení Biomateriálů a tkáňového inženýrství.

V neposlední řadě patří veliké poděkování také příteli Romanovi za podporu při studiu i tvorbě dizertační práce. Podporou mi též byli další členové týmu *Bioreaktory pro tkáňové a orgánové náhrady*, za což jim také děkuji.

Tato práce vznikla za podpory projektů Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-29153A, NV18-02-00422 a NV19-02-00068, dále projektu SGS SGS19/088/OHK4/1T/17 a projektu „BIOCEV“ CZ.1.05/1.1.00/02.0109.

Abstrakt

Dynamická kultivace buněk na titanových maticích

Mnoho traumatických i netraumatických poškození kostí vyžaduje léčbu pomocí kostních náhrad nebo štěpů, dle rozsahu defektu a ztráty objemu kosti. Nejčastěji používaným materiálem pro kostní implantáty jsou slitiny titanu, konkrétně Ti6Al4V, vzhledem k jejich síle v tahu, široké využitelnosti, vysoké odolnosti vůči korozi a biokompatibilitě. Modifikace topografie a morfologie povrchu implantátů navíc zlepšuje jeho osteointegraci. I přes to se však vyskytují časté komplikace – infekce, záněty, nedostatečná osteointegrace implantátu, aseptické uvolnění, které vyžadují reoperaci implantátu. Východiskem z tohoto problému může být kolonizace povrchu implantátu autologními buňkami pacienta a implantace modifikované náhrady.

Cílem práce je kolonizovat modelovou titanovou maticí kmenovými buňkami, diferencovanými do osteoblastů, s využitím dynamické kultivace, která simuluje fyziologické podmínky organismu a přispívá k rychlejší osteogenezi. Práce je rozdělena na tři části. První část práce popisuje návrh systému pro dynamickou kultivaci buněk za fyziologických podmínek, jež stimuluje osteogenní buněčnou diferenciaci tlakovým namáháním. Součástí systému je přepínač pro 4 skupiny komor, který automaticky řídí stimulaci každé skupiny unikátními parametry tlaku. Systém je doplněn o dva typy komor – pro testování substrátů a matic a pro kultivaci více vzorků pomocí standardních kultivačních desek.

V další části práce jsou testovány Ti6Al4V substráty s různými povrchovými úpravami (leštění, tryskání, kartáčování, anodizace a pokrytí uhlíkem podobným diamantu) z hlediska jejich vlivu na proliferaci a osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně. Na základě buněčných experimentů byl zvolen anodizovaný substrát, neboť bylo zjištěno, že substráty s drsností v řádu několika desítek nanometrů nejvíce podporují osteogenezi i proliferaci buněk.

Anodizovaný povrch byl nakonec osazen kulturou kmenových buněk, přičemž část vzorků byla pokryta fibrinovým gely o koncentraci fibrinu 1 a 5 mg/ml, v němž byly buňky inkorporovány. Vzorky byly kultivovány 7 dní za působení pulsatilního tlaku (0/40 kPa, 0,5 Hz po dobu 1 hod./den). U dynamických kultur byla zvýšená exprese osteogenních markerů ve srovnání se statickými kulturami, buňky v gelu o koncentraci fibrinu 5 mg/ml byly navíc orientovány paralelně se siločarami tlakového namáhání, podobně jako ve fyziologickém prostředí. Nejvyšší osteogeneze bylo dosaženo v gelu s 5 mg/ml fibrinu, avšak proliferace byla nižší, než u 1 mg/ml. Osteogenní diferenciaci

dynamických 2D vzorků byla několikanásobně vyšší, než u statických kultur. Bylo tedy prokázáno, že použití gelů o koncentraci fibrinu 5 mg/ml, případně přímo násada buněk na substrát bez gelu, je optimální pro kolonizaci titanového povrchu. Výsledky dizertační práce mohou přispět ke zlepšení osteointegrace titanových implantátů.

Klíčová slova

Kolonizace implantátů buňkami, dynamická kultivace, tlakové namáhání, kmenové buňky, osteointegrace, osteogeneze, povrchové modifikace implantátů.

Abstract

Dynamic cultivation of cells on titanium substrates

Many traumatic and non-traumatic bone injuries require treatment with bone replacements or grafts, depending on the extent of the defect and the loss of bone volume. The most commonly used material for bone implants are titanium alloys, specifically Ti6Al4V, due to their tensile strength, wide applicability, high corrosion resistance and biocompatibility. In addition, modification of the topography and morphology of the implant surface improves its osteointegration. Nevertheless, there are frequent complications - infection, inflammation, insufficient osseointegration of the implant, aseptic loosening, which require reoperation of the implant. The starting point for this problem may be the colonization of the implant surface by the patient's autologous cells and the implantation of a modified prosthesis.

The aim of this work is to colonize the model titanium matrix with stem cells differentiated into osteoblasts using dynamic cultivation, which simulates the physiological conditions of the organism and contributes to faster osteogenesis. The work is thus divided into three parts. First, a system for dynamic cell culture under physiological conditions was designed, which stimulates osteogenic cell differentiation by compressive stress. The system includes a switch for 4 groups of chambers, which automatically controls the stimulation of each group with unique pressure parameters. The system is supplemented by two types of chambers - for testing substrates and for culturing multiple samples using standard culture plates.

In the next part of the work, Ti6Al4V substrates with various surface treatments (polishing, blasting, brushing, anodization and diamond-like carbon coating) are tested in terms of their effect on proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue. Based on cell experiments, an anodized substrate was chosen, as it was found that substrates with a roughness in the order of several tens of nm most support osteogenesis and cell proliferation.

The anodized surface was finally seeded with a stem cell culture, and some of the samples were covered with fibrin gels at fibrin concentrations of 1 and 5 mg/ml, in which the cells were incorporated. Samples were cultured for 7 days under pulsatile pressure (0/40 kPa, 0.5 Hz for 1 hour/day). In dynamic cultures, the expression of osteogenic markers was increased compared to static cultures, and the cells in the gel with a fibrin concentration of 5 mg/ml were, in addition, oriented against the direction of compressive stress, similar to the physiological environment. The highest osteogenesis was achieved

in the 5 mg/ml fibrin gel, but the proliferation was lower than in 1 mg/ml gel. Osteogenic differentiation of dynamic gel-free samples was several times higher than in static cultures. Thus, it has been shown that the use of gels with a fibrin concentration of 5 mg/ml, resp. direct cell loading on a gel-free substrate is optimal for colonization of the titanium surface. The results of the dissertation can contribute to the improvement of osteointegration of titanium implants.

Keywords

Colonization of implants by cells, dynamic cultivation, compressive stress, stem cells, osteointegration, osteogenesis, surface modification of implants.

Obsah

Seznam symbolů a zkratek.....	11
1 Úvod	12
2 Přehled současného stavu.....	13
2.1 Titanové implantáty.....	15
2.1.1 Modifikace povrchu titanových implantátů.....	16
2.1.2 Přehled povrchových modifikací titanových implantátů.....	18
2.2 Kolonizace povrchu implantátu kmenovými buňkami a jejich diferenciaci na osteoblasty	22
2.2.1 Účinky působení tlakových sil na diferenciaci kmenových buněk do osteoblastů.....	23
2.2.2 Systémy pro dynamickou kultivaci buněk s tlakovým namáháním ...	25
3 Hypotézy a cíle práce.....	28
4 Systém pro dynamickou kultivaci kmenových buněk s tlakovým namáháním	29
4.1 Metody	29
4.1.1 Kultivační komory pro tlakovou stimulaci kmenových buněk na planárních substrátech	30
4.1.2 Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk	32
4.1.3 Programovací přepínací systém pro distribuci tlakového namáhání ..	34
4.2 Výsledky.....	37
4.3 Diskuze.....	38
4.4 Závěr.....	39
5 Vlastnosti titanových povrchů s různou povrchovou úpravou a jejich vliv na osteogenní diferenciaci	40
5.1 Metody	40
5.1.1 Ti6Al4V substráty – jejich modifikace, charakterizace a čištění	40
5.1.2 Izolace a kultivace kmenových buněk pro buněčné experimenty	42
5.1.3 Imunofluorescenční barvení, barvení jader a cytoskeletu buněk	43
5.1.4 Stanovení počtu buněk, metabolické aktivity a buněčné morfologie.	44
5.1.5 Stanovení koncentrace kalcia v kultivačním médiu	45

5.1.6	Příprava buněčných lyzátů a Western blot analýza	45
5.1.7	Stanovení aktivity alkalické fosfatázy	46
5.1.8	Statistická analýza	46
5.2	Výsledky.....	46
5.2.1	Drsnost a smáčivost titanových vzorků	47
5.2.2	Počet a metabolická aktivita buněk	48
5.2.3	Morfologie buněk a jejich orientace	51
5.2.4	Markery osteogenní diferenciace	53
5.2.5	Spotřeba kalcia a aktivita alkalické fosfatázy	60
5.2.6	Shrnutí výsledků analýz po 8 dnech kultivace	62
5.3	Diskuze.....	62
5.4	Závěr.....	65
6	Dynamická kultivace buněk na titanových maticích	67
6.1	Metody	68
6.1.1	Příprava buněčných suspenzí v hydrogelech a parametry dynamické kultivace	68
6.1.2	Imunofluorescenční barvení	70
6.1.3	Stanovení počtu buněk, metabolické aktivity.....	71
6.1.4	Stanovení koncentrace kalcia a aktivity alkalické fosfatázy	71
6.1.5	Analýza osteogenních diferenciačních markerů.....	71
6.1.6	Statistická analýza	72
6.2	Výsledky.....	72
6.2.1	Morfologie a počet buněk, metabolická aktivita	72
6.2.2	Markery osteogenní diferenciace	77
6.2.3	Spotřeba kalcia a aktivita alkalické fosfatázy	82
6.3	Diskuze.....	83
6.4	Závěr.....	84
7	Shrnutí výsledků práce a aplikace výsledků	85
8	Souhrnný závěr	87
	Seznam použité literatury	88

Příloha A: Vlastní publikace autora	98
Příloha B: Signifikance výsledků experimentů	102
Příloha C: Obsah CD.....	109

Seznam symbolů a zkratek

ABAM	Antibiotic Antimycotic solution – antibiotikum
ALP	Alkalická fosfatáza
AND	Anodizovaný povrch
ASC	Mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně
BMP2	Bone morphogenetic protein 2 - kostní morfogenický protein 2
BMPs	kostní morfogenické proteiny
BR	Kartáčovaný povrch
COL I	Kolagen typu I
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole – barvivo buněčných jader
DLC	Uhlík podobný diamantu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium – kultivační médium
ECM	Extracelulární hmota
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay – imunologická metoda
F	Fyzikální úprava
F/CH	Úprava na pomezí fyzikálních a chemických metod
F1D	Vzorek s fibrinovým gelem o c = 1 mg/ml kultivovaný dynamicky
F1S	Vzorek s fibrinovým gelem o c = 1 mg/ml kultivovaný staticky
F5D	Vzorek s fibrinovým gelem o c = 5 mg/ml kultivovaný dynamicky
F5S	Vzorek s fibrinovým gelem o c = 5 mg/ml kultivovaný staticky
FBS	Fetální bovinní sérum
FGF2	Fibroblast growth factor – růstový faktor
GL	Kontrolní povrch – krycí sklo
CH	Chemická úprava
LENS	Laser engineered net shaping - spékání kovového prášku laserem
M	Mechanická úprava
M/CH	Úprava na pomezí mechanických a chemických metod
modSLA	Vyrobený metodou SLA, po výrobě je implantát ponořen do izotonického roztoku
OCN	Osteokalcin
OPN	Osteopontin, též sialoprotein I
PBS	Phosphate Buffered Saline – fosfátový pufr
PL	Leštěný povrch
pNPP	Para-Nitrophenylphosphate – substrát pro imunologii
R_a	Průměrná aritmetická úchylka posuzovaného profilu
R_q	Průměrná kvadratická úchylka posuzovaného profilu
RT	Pokožová teplota
RUNX2	Runt-related transcription factor 2 – transkripční faktor
SLA	Sandblasted, large grit, acid-etched – povrch tryskaný velkými částicemi a následně leptaný kyselinou
SLS	Selective Laser Sintering - - spékání kovového prášku laserem
SMAT	Povrchové mechanické odírání
SOL/GEL	Povrch modifikovaný polymerizační reakcí koloidního roztoku
Ti6Al4V	slitina titanu, hliníku a vanadia
TRITC	Tetramethylrhodamin

1 Úvod

Kost je druhou nejčastější transplantovanou tkání [1; 2]. Vyznačuje se výbornými regeneračními a remodelačními schopnostmi a v případě poškození malého rozsahu je kost schopna vlastní regenerace. Při velkých poraněních je však někdy potřeba nahradit tkáň umělým materiálem [3; 4]. Pro tyto účely se používají náhrady vyrobené na bázi kovů, keramiky i polymerů. Po implantaci však mohou nastat komplikace (poruchy hojení rány, infekce, vazivová tkáň mezi kostí a implantátem), které vedou až k nutnosti vyjmutí implantátu a následné reoperace. Např. mezi léty 2002 – 2012 muselo 12 662 pacientů v ČR podstoupit revizní operaci umělého kyčelního kloubu, což pojišťovny stálo 1,1 mld. Kč [5].

Jako materiál pro kostní náhrady se nejčastěji používají slitiny na bázi titanu, zejména kvůli chemické inertnosti vůči tkáním a tělním tekutinám, velké síle v tahu, vysoké odolnosti vůči korozi a zejména kvůli vysoké biokompatibilitě [6]. Titanové slitiny lze také snadno opracovat, je proto možné použít širokou škálu povrchových úprav, kterými lze materiál modifikovat a zvýšit tak pravděpodobnost přijetí implantátu pacientem. Cílem povrchové modifikace materiálu je zvýšit drsnost povrchu, která má vliv na adhezi buněk k implantátu a přispívá k osteointegraci implantátu.

Dalším přístupem ke zvýšení úspěšnosti přijetí implantátu je kolonizace jeho povrchu autologními buňkami pacienta, jež sníží imunitní odpověď organismu na cizí materiál [7]. Po odebrání autologních buněk pacienta jsou buňky namnoženy a následně nasazeny přímo na implantát, společně s růstovými faktory, které zvyšují adhezi buněk. Komplex implantátu s buňkami je dále umístěn do bioreaktoru, kde probíhá maturace buněk a jejich diferenciaci směrem k osteoblastům. Po několika dnech až týdnech kultivace je implantát kolonizovaný buňkami voperován do těla pacienta [7; 8]

Vytvoření kvalitní kultury osteoblastů na povrchu implantátu vyžaduje jak kvalitní substrát, podporující růst a adhezi buněk, tak zejména podmínky podporující vývoj osteoblastů podobně jako v organismu. Toho se dosáhne dynamickým režimem kultivace, kdy jsou na buňky aplikovány fyzikální, chemické a další podněty, které přirozené stimulují buňky k diferenciaci směrem k osteoblastům. Nejčastěji se pro vývoj osteoblastů využívá dvou typů kompresní zátěže – s přímým kontaktem, nebo pomocí hydrostatického tlaku. Méně využívanou alternativou je aplikace tenzní zátěže nebo průtokového napětí [9]. Dynamické podmínky mají zásadní úlohu při kultivaci buněk v třídimenzionálních strukturách (scaffoldech), neboť za statických podmínek je pouhá difuze živin a plynů až do jejich středu nedostačující, což vede k buněčné nekróze [10].

2 Přehled současného stavu

Současnou léčbou degenerativních onemocnění typu artróza či traumatických poškození kosti je v nejzazším případě náhrada kosti implantátem. Kostní tkáň se vyznačuje výbornými regeneračními a remodelačními schopnostmi. V případě poškození tkáně malého rozsahu je kost schopna vlastní regenerace. Mnoho traumatických nebo netraumatických poškození kostí však vyžadují léčbu pomocí kostních náhrad nebo štěpů, dle rozsahu defektu a ztráty objemu kosti [2]. Existuje několik metod, jak léčit onemocnění a úrazy kostí.

Jedním přístupem v léčbě traumatických poškození kosti je transplantace kostního štěpu, jež může být autologního, alogenního nebo xenogenního původu [11]. Tato metoda je nezbytná pro zachování kvality života pacienta, využívá se zejména při ztrátě objemu kosti, např. z důvodu zlomenin, neoplasie kosti, osteomyelitidy, nekrózy, cysty apod. [12]. Jako zlatý standart se využívá štěpu kyčelní kosti, přičemž využití alogenního dárce je 10x častější než použití autologního štěpu [13]. Tyto operace jsou často spojené s problémy při získávání štěpu, morbiditou ze strany dárce, rizikem přenosu choroby a nežádoucí imunologickou odpovědí [4; 12-16].

Vzhledem k rizikům spojeným s transplantací kostního štěpu se častěji využívá léčba pomocí umělých kostních náhrad z tzv. biomateriálů [3; 4]. Po implantaci náhrady do těla pacienta spolu biomateriál a živá tkáň interagují [17]. Reakce je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech materiálu, které mohou vyvolat různou buněčnou odpověď a ovlivní tak adhezi buněk na implantát [18]. Po nějaké době po implantaci se můžou objevit nežádoucí problémy – infekce, zánět, nedostatečné vhojení implantátu, aseptické uvolnění, nebo může dojít až k tzv. stress-shielding efektu, kdy kost degraduje v místě styku s implantátem [19; 20]. Dále také z materiálu mohou unikat toxické látky (hliník, vanad apod.) do okolní tkáně, což vede k jejímu poškození [21; 22]. Syntetické štěpy a implantáty, vyrobené z různých biomateriálů na bázi kovu, keramiky a polymerů, jsou sice snadno dostupné, vyrobitelné na míru a s možností různých úprav, ale také vykazují limity, které vedou k selhání implantátu a potřebě reoperace [12; 23-25].

Biomateriál je definován jako neživý materiál, nevyvolávající nežádoucí reakci organismu, který se používá v medicínských aplikacích s cílem léčby, podpory nebo náhrady tkáně, orgánu nebo funkce lidského organismu [26]. Existuje více druhů materiálů, které se využívají v lidském těle, jsou to zejména různé druhy kovů (nekorozivní ocel, kobaltové slitiny, titanové slitiny, keramika (oxid hlinitý, zirkonium, fosforečnan vápenatý) přírodní nebo umělé polymery [26]. Na biomateriály jsou kladeny požadavky, jako např. dlouhodobá výdrž materiálu, biokompatibilita, odolnost proti korozi a opotřebení, a biomechanická kompatibilita [27]. Implantáty nahrazující chybějící

nebo poškozené kosti nebo spojující kostní úlomky musí být nejen mechanicky odolné, ale musí dojít i k rychlému vhojení (tzv. osteointegraci) do hostitelského organismu, kde musí plnit svoji funkci co nejdříve [2]. Rychlé vhojení implantátu do kosti příjemce neřeší jen zdravotní problém pacienta, ale má také silně socio-ekonomický aspekt. Dostatečně rychlá osteointegrace implantátu do těla pacienta nejen že nezatěžuje organismus příjemce, ale vrací jej zpět do normálního života bez následných komplikací s implantátem.

Materiál, implantovaný do kosti pacienta, lze hodnotit následujícími biologickými vlastnostmi, vyjadřujícími vztah buněk k materiálu implantátu: osteokondukcce, osteoindukce, osteogeneze a osteointegrace. Osteokondukcce vyjadřuje schopnost implantátu k navázání osteoblastů a progenitorových buněk v rámci jeho trojrozměrné struktury s následnou migrací a růstem buněk [28]. Osteoinduktivní materiály primitivní nediferencované buňky stimulují k diferenciaci do kostní tkáně, což vede k osteogenezi [28], neboli diferenciaci buněk a vytváření nové kostní tkáně z buněk od hostitele nebo autologního štěpu [29]. Osteointegrace (vhojení) vyjadřuje schopnost ukotvení implantátu do okolní kostní tkáně bez tvorby mezivrstvy z vláknité tkáně [28].

Po vložení implantátu do kosti nastává série na sobě závislých kroků, jež na konci vytvoří komplex kost – implantát [30]. Okamžitě po implantaci se na povrch začnou adherovat molekuly vody, které začnou tvořit jednoduchou nebo dvojitou vrstvu. Na povrch vrstvy vody jsou inkorporovány hydratované ionty jako Cl^- , Na^+ nebo Ca^{2+} . Dále, dle fyzikálně-chemických, biochemických a topografických vlastností povrchu implantátu, se na vrstvu absorbují a opět desorbují krevní proteiny a další tkáňové proteiny. Buněčnou odpověď lze pozitivně ovlivnit nanesením anorganické vrstvy fosforečnanu vápenatého [25]. Další biomolekulární faktory, jako růstové faktory, vyvolávají buněčnou odpověď v podobě vytváření specifických signálních cest. Biologickou interakci vyvolávají také různé úpravy povrchů, např. výčnělky, dutiny, záhlubně na úrovni makro-, mikro- nebo i nanorozměrů. Ve výsledku se na povrchu implantátu vytvoří film z proteinů o různé konformaci, který ovlivní další adhezi buněk na implantát a buněčnou odpověď. Specifickou funkci zastávají integriny, transmembránové receptory, které vytvářejí spojení proteinů mezi implantátem a cytoskeletem buňky [31]. Makroskopicky pak inkorporace materiálu probíhá v následujících krocích: I) vytvoření hematomu, zánět, uvolnění kosti-indukujících faktorů a buněčná rekrutace, II) vývoj vazivové tkáně, spojující implantát s přilehlou kostí, III) novogeneze cév, IV) migrace a aktivace osteoblast, osifikace V) modelace a remodelace kosti, vytvoření pevného spojení mezi kostí a implantátem [32].

Biokompatibilita implantátu je tedy závislá na schopnosti osteoblastů adherovat na povrch implantátu [33-36]. Schopnost osteoblastů připojit se, adherovat a rozšířit se dále

ovlivňuje jejich schopnost proliferovat a diferenciovat. To je zásadní proces pro vytvoření mechanicky pevného spojení kostní tkáně s implantátem bez vymezené vláknité vrstvy.

2.1 Titanové implantáty

Mezi nejčastěji využívané kostní implantáty patří slitiny titanu, zejména pro netečnost vůči tkáním a tělním tekutinám, velké síle v tahu, široké využitelnosti, vysoké odolnosti vůči korozi a biokompatibilitě [6]. Samotný titan není vzhledem ke svým mechanickým vlastnostem vhodný. Existují však nezávadné materiály jako niob, zirkon a tantal, které se začaly používat pro výrobu slitin titanu s těmito látkami. Tím došlo ke vzniku slitin o vysoké pevnosti a nízké hmotnosti s excelentní korozní odolností a biokompatibilitou [27]. Vzhledem k relativně nízké ceně a dobré opracovatelnosti materiálu je nejčastěji používanou slitinou Ti6Al4V [21].

Bioinertnost titanu je zajištěna zejména jeho vysokou reaktivitou a afinitou ke kyslíku, což způsobí, že na povrchu kovu se vytvoří ochranný film (TiO_2 , Ti_2O_3 nebo TiO), který je neustále obnovován a zároveň je termodynamicky stabilní [37]. Tento film zabraňuje prostupu kovových sloučenin z materiálu implantátu do kultury osteoblastů (ne úplně, pomalá pasivní difúze sloučenin skrz oxidovou vrstvu probíhá neustále) a zároveň je dobře adhezivní pro vápenaté a fosforečné ionty nezbytné pro vývoj kosti [38]. Zároveň však tato oxidová vrstva není dostatečně bioaktivní, aby podpořila přímou vazbu implantátu a kosti. Použití takového implantátu pak vede k vytvoření vláknité tkáně mezi implantátem a kostí, které způsobuje nedostatečnou osteointegraci a může dojít až k uvolnění implantátu po delší době od implantace [39-41].

Titan je tak materiálem nejvyužívanějším pro kloubní náhrady v ortopedii, dále i pro šroubky, destičky a hřebíčky na opravu kostí. Využitelnost titanu není dána jen samotným materiálem, ale také širokou škálou povrchových úprav, kterými lze materiál modifikovat a zvýšit tak jeho využitelnost v praxi. Vhodnou modifikací povrchu lze upravit funkční rozhraní kost – implantát, tedy zvýšit úspěšnost implantace, redukovat dobu osteointegrace implantátu do kosti či umožnit časně zatížení implantátu [39]. Na modifikovaný materiál nesmí organismus reagovat jako na cizí materiál, neboť poté dochází k vytvoření vláknité mezivrstvy, která odděluje implantát od kosti, a dochází k mikropohybům a tedy k odmítnutí implantátu [42].

První aplikace implantátů probíhaly za pomoci leštěných kovových implantátů [43]. Následně byl důraz kladen na úpravu povrchu implantátu, vedoucí ke zrychlení osteointegrace. Například implantát z leštěného titanu neposkytuje dostatečně rychlou osteointegraci pro některé zubní implantáty, proto byl vyvinut jiný druh s velmi hrubým povrchem, čímž došlo k rychlejší osteointegraci [43]. Pro eliminaci problémů při interakci implantátu s okolní tkání se povrchy implantátů upravují modifikací topografie

nebo nanášením různých povrchových vrstev. Klinický úspěch u těchto implantátů je předurčen jejich interakcí s biologickými tekutinami a tkáněmi a podmínkami, které by podporovaly časnou osteointegraci [44]. Momentálně na trhu existuje několik druhů povrchových úprav kovových materiálů. Jejich výhody spočívají v rychlosti hojení, pevnosti kosti po osteointegraci, stejně jako dlouhodobé stability v hostitelské kosti [2; 11].

2.1.1 Modifikace povrchu titanových implantátů

Pozn. Kompletní přehled povrchových modifikací titanových implantátů používaných v klinické praxi je součástí článku autorky STEPANOVSKA, J., R. MATEJKA, J. ROSINA, L. BACAKOVA a H. KOLAROVA Treatments for enhancing the biocompatibility of titanium implants. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2020, 164(1), 23-33.

Rychlost a kvalita osteointegrace souvisí s povrchovými vlastnostmi implantátů, jakými jsou struktura povrchu, topografie, smáčivost, hrubost, chemická struktura povrchu a povrchové elektrické napětí implantátu [45-47]. Jednou z možností zvýšení osteointegrace osteoblastů na povrch titanu je povrchová úprava titanu a jeho slitin na úrovni jeho topografie a morfologie. Úpravy povrchů lze dělit dle více parametrů. Obecně se dělí na aditivní a subtraktivní metody. Aditivní metody lze dělit na dvě skupiny. V prvním případě nanášená látka o libovolné tloušťce může být pouze nanášena na povrch, bez chemické vazby. Do této skupiny patří sprejování plasmou, hydroxyapatitové potahy, aluminiové potahy a kalcio-fosfátové potahy. Druhou možností je impregnace látky do materiálu implantátu, kde dojde k navázání a integraci látky do materiálu. Jde např. o impregnaci kalcio-fosfátových krystalů do vrstvy oxidů TiO₂ na povrchu implantátu, inkorporace fluoridových iontů na povrch titanu apod. Subtraktivní metody odebírají částičky materiálu a plasticky deformují povrch materiálu a tím mění i jeho hrubost [45].

Další možnost dělení vychází z povahy metody a lze tak vytvořit tři skupiny, které se však mezi sebou prolínají: mechanické, chemické a fyzikální úpravy. Mezi základní mechanické úpravy se zařazuje zejména obrábění [48; 49], broušení, leštění [50] a tryskání [51]. Chemické metody – leptání zásadou [52; 53] nebo kyselinou [54; 55], nanášení povrchů s chemickou vazbou na implantát a anodizace [56; 57] – nejsou využívány pouze k zdrsnění povrchu, ale modifikují i složení materiálu implantátu a mají vliv na smáčivost povrchu. Fyzikální metody zahrnují sprejování plazmatu nebo termální sprejování, laserové úpravy povrchů a rozprašování [58-61] či iontové depozice [62]. Další přístupem je vytvoření biologicky aktivního povrchu nanosením další vrstvy na

povrch implantátu fyzikálně-chemickými a biochemickými depozičními metodami [63; 64].

Cílem všech těchto metod je zdrsňení povrchu materiálu, ke kterému poté lépe adherují buňky a vykazují vyšší metabolickou aktivitu, což bylo dokázáno *in vitro*. Na tyto pokusy navazují experimenty *in vivo* za účelem úpravy mikrostruktury povrchu implantátu vedoucí ke zlepšení spojení kosti a implantátu a zvýšení mechanické odolnosti po implantaci. Mnoho studií dokázalo optimalizaci dentálních a ortopedických implantátů modifikováním jejich povrchu chemicky anebo topograficky, např. tryskáním, plazmovým nanášením hydroxyapatitu, pískováním, leptáním nebo anodizací [65-67]. Úpravou povrchu dojde i k dalším změnám mimo změny mikrostruktury, a to zejména k vyšší lokální hustotě elektrostatického náboje a přitažlivých sil [68; 69], přispívajících též k urychlení hojení kosti po implantaci. Níže zmíněné úpravy také vedou k vytvoření chemické oxidové vrstvy na povrchu implantátu, která zvyšuje smáčivost materiálu a tedy i adsorpci vazebných buněčných molekul k povrchu, která vede k buněčné adhezi a růstu [70].

Optimální drsnost titanu pro osteointegraci implantátu nebyla dosud dobře definována. Obecně lze drsnost rozdělit dle velikosti zrn do tří oblastí: makro-, mikro- a nanorozměry. Makrorozměry se pohybují řádově od milimetrů do desítek mikrometrů. Mnoho studií dokázalo pozitivní efekt modifikace zejména při brzké fixaci a dlouhodobé mechanické stabilitě implantátu v kosti ve srovnání s hladkým povrchem [71-74]. Tato úprava také významně zlepšuje rezistenci vůči torzním silám působícím na rozhraní kost-implantát ve srovnání s jinými úpravami [51; 72]. Na druhou stranu se v tomto případě vyskytuje zvýšený výskyt periimplantitidy a uvolňování chemických komponent z implantátu [75]. Dokonce jedna studie neprokázala významný klinický důkaz o významu povrchových úprav implantátů [76].

Větší využití se zdá u implantátů s mírně drsnými povrchy (v mikrometrickém rozmezí) [73; 77]. Mikrostruktury o velikosti zrn přibližně 1 – 10 μm minimalizují výše uvedená rizika a naopak dochází k maximalizaci efektu upevnění implantátu do kosti a osteointegraci [72]. Jako optimální povrch byl určen povrch s hemisférickými dírkami o průměru 4 μm a hloubce 1,5 μm [78]. Jiné zdroje uvádějí, že maximální hrubost implantátu může být 1,5 μm pro získání maximální biologické odpovědi [39]. Avšak ani úpravy titanových implantátů v mikro měřítku nenapodobují povrch a mechanické vlastnosti kosti, což může vést k selhání implantátu vlivem nedostatečné osteointegrace, ztrátou kostní hmoty, uvolněním nebo zlomeninou implantátu [39].

Nejvíce napodobují strukturu kosti úpravy se zrnitostí menší než 100 nm [79]. U těchto materiálů je dosaženo vyšší adheze osteoblastů na povrch implantátu, neboť obsahují vyšší procento nerovností, na které osteoblasty adherují, ve srovnání

s konvenčními kovovými povrchy [79]. Různá drsnost vyvolává variaci adhezní energie, což vede k vysoké adhezi osteoblastů, a tedy i osteointegraci, jak bylo potvrzeno mnoha výzkumy [79-87]. Zatím však nebyla stanovena optimální nanotopografie pro adhezi proteinů vedoucích k adhezi osteoblastů.

Zlepšení vlastností materiálu z hlediska osteointegrace má však své limity, které se týkají zejména dlouhodobé stability implantátu v kosti. Dle studie Jemata et al.[88], nejčastěji používanou metodou je sprejování plasmou, která je použita až u 40% implantátů. Další často využívané metody jsou leptání kyselinou, tryskání a kombinace leptání a tryskání. Ostatní metody jsou zastoupené v menší míře [88].

2.1.2 Přehled povrchových modifikací titanových implantátů

Cílem povrchových úprav je zvýšení osteointegrace implantátu prostřednictvím zvýšením jeho drsnosti. Mikrojamky a nerovnosti povrchu zvyšují vazebné síly povrchu materiálu a přispívají tak k lepší adhezi buněk na povrch implantátu, ke zvětšení plochy povrchu zlepšujícího biomineralizaci [89]. Využívají se mechanické, chemické a fyzikální metody, příp. jejich kombinace. Tyto metody lze také dělit z hlediska procesu výroby na aditivní a subtraktivní, kdy subtraktivními metodami je materiál odebírán, zatímco aditivními dochází naopak k vytváření nových struktur přidáváním materiálu.

Mechanické úpravy zahrnují obrábění, leštění a tryskání, přičemž dochází k odebírání materiálu z povrchu a zároveň jeho tvarování. Dalším účinkem je změna struktury materiálu, kdy krystalická struktura se mění v amorfni a zvyšuje se tvrdost povrchu.

Vzhledem k silné inertnosti titanu k buňkám lze povrch materiálu modifikovat chemickým povlakem, který zvýší osteointegraci buněk na implantát. Chemické povrchy jsou založené na reakci titanu s dalšími chemikáliemi, nejčastěji kyselinami, zásadami, peroxidem vodíku a dalšími pasivujícími reagenty [90]. Jedním z nejpoužívanějších potahů jsou anorganické potahy na bázi apatitu, mezi další metody patří sprejování plasmou, elektrodepozice, adsorpce proteinů apod. Poměrně moderní metodou je nanášení přírodních extracelulárních proteinů tvořících matrici – kolagen, fibronectin, peptidy apod.

Chemické úpravy mají za následek zvýšení biokompatibility, bioaktivity a konduktivity zbavením povrchu titanu kontaminace a oxidačních činidel. Je zde zařazeno několik metod úprav, např. acidické a alkalické modifikace, úprava peroxidem vodíku, potahy na bázi fosforečnanu vápenatého ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), oxidu titaničitého (TiO_2) a křemíku, depozice chemickými parami (TiN, TiC, TiCN, diamant, uhlík podobný diamantu (DLC)), anodová oxidace a biochemické metody.

Fyzikální úpravy nevytvářejí chemickou vazbu potahu na strukturu implantátu. Zahrnují aplikaci termální, kinetické nebo elektrické energie s cílem úpravy topografie a vytvoření mikrostruktur. Kromě úpravy topografie a drsnosti materiálu druhotně dochází ke změně chemické kompozice vzhledem k okolním podmínkám výroby, např. vysoké teplotě. Základními metodami je zejména aplikace laseru, dále nanášení povlaků a potahů sprejováním plasmu nebo anodizací.

Tabulka 1. Přehled modifikací povrchů implantátů vyrobených z Ti6Al4V, podstata metody a vliv na další vývoj po implantaci. M – mechanická úprava, CH – chemická úprava, F – fyzikální úprava, příp. jejich kombinace M/CH, F/CH.

ÚPRAVA	DRUH	PODSTATA	VÝHODY	NEVÝHODY
TRYSKÁNÍ ALUMINOU (Al ₂ O ₃) A OXIDY TITANŮ	M	Vytváření důlků tryskáním tvrdých keramických Al ₂ O ₃ , TiO ₂ částic [91]	Zvýšení biomechanické fixace implantátu Zvýšená osteointegrace [74] Zlepšení vlastností prokázáno i v klinických studiích 10 let od implantace	Rezidua keramických částic i po čištění a sterilizaci snižují osteointegraci Narušení odolnosti titanu vůči korozi ve fyziologickém prostředí Zvýšení mechanické, ne však biologické fixace na kost [92]
	M	Vytváření důlků tryskáním částicemi fosforečnanu vápenatého (hydroxyapatit, beta-trikalciumfosfát) [93]	Tryskací materiál biokompatibilní, jeho rezidua nebrání osteointegraci, jsou resorbovatelné a osteokonduktivní [93] Zvýšená biomechanická fixace na kost	Nerovnoměrný povrch [94] Možnost uvolňování titanové slitiny do organismu [94]
POVRCHOVÉ MECHANICKÉ ODÍRÁNÍ (SMAT)	M	Balotínování povrchu sférickými koulemi z Al ₂ O ₃ [95]	Zvýšení kompresního napětí Zvýšení mechanické odolnosti implantátu Tvorba povrchové nanokrystalické vrstvy se zvýšenou pevností a odolností vůči korozi, indukující buněčnou odezvu [96]	Tvorba vazivové tkáně mezi implantátem a kostí [97]

ÚPRAVA	DRUH	PODSTATA	VÝHODY	NEVÝHODY
LEPTÁNÍ KYSELINOU	CH	Vytváření mikrozáhlubní o průměru 0,5 – 2 μm působením kyselin H ₂ SO ₄ , HNO ₃ , HF apod., případně jejich kombinací [98]	Zvýšení osteointegrace [71] Urychlení buněčné adheze a osteokondukce Podpora apostázy kosti nízká kostní resorpce [99]	Narušení ochranné oxidové vrstvy implantátu Zvýšení únavovou odolnost materiálu [100] Mikrotrhlíky, vedoucí až ke zlomeninám implantátů [101]
		SLA/modSLA	Působení kyseliny na povrch předem upravený tryskáním velkými částicemi vytváří rovnoměrné mikrodůlky o průměru 1 – 2 μm (modSLA – po standardní výrobě SLA implantát ponořen do izotonického roztoku) [102]	Zvýšení osteointegrace [103] Vyšší stabilita implantátu in vivo, rychlejší čas hojení Zvýšení bioaktivity [104]
ANODIZACE	F/CH	Navazování oxidových vrstev pomocí elektrochemické reakce anodizace [107]	Zesílení kostní odezvy Zvýšení biomechanické fixace aparátu Bioaktivní Zvýšená aktivita osteoblastů, buněčné adheze Zvýšení osteokondukce [108]	Nemožnost kontroly procesu výroby Nereprodukovatelnost parametrů výroby a tím i vlastností povrchu [109]
		LASEROVÁ TEXTURIZACE	F	Vytváření určité topografie povrchu laserovým paprskem za současného chlazení proudícím plynem [110]

ÚPRAVA	DRUH	PODSTATA	VÝHODY	NEVÝHODY
LASEROVÁ LITOGRAFIE	F	Odebírání materiálu laserem pomocí litografické masky [112]	Bez chemických reziduí Silná vazba kosti a implantátu Odolnost vůči torzím silám [113]	Nelze vytvářet komplexní topografii s uzavřenými křivkami Mikrotrhlínky a další vady kvůli působení vysoké teploty při výrobě [113]
	F	Laser engineered net shaping (LENS) a Selective Laser Sintering (SLS) - metody, jež obě spočívají ve spékání prekurzorových prášků z titanu a jiných materiálů pomocí 3D tiskáren [114]	Možnost tvorby „libovolných“ tvarů, včetně komplikovaných Usnadnění a urychlení výroby implantátů Snížení množství materiálu potřebného na výrobu [115]	Možné objemové vady implantátu mající vliv na jeho mechanickou pevnost K povrchovým úpravám nutné využít další metody [115]
	F/CH	Sprejování zahřátého hydroxyapatitu a vstříkávání na povrch implantátu, vzniká porézní vrstva [58]	Zvýšení odolnosti vůči korozi, lepší upevnění v kosti Zvýšení mineralizace kosti v okolí Zvýšení mechanické odolnosti a biochemické vazby v kosti Zvýšená proliferace [61] Zvýšená osteointegrace [116] Uvolňování hydroxyapatitu do tkáně podporuje adhezi a růst osteogenních buněk [117]	Delaminace hydroxyapatitové vrstvy, jeho degradace a rozpouštění, následné opotřebení implantátu [118] Uvolňování částic degradovaného implantátu, jež by mohly být zdrojem karcinomů Vysoká drsnost, podporující růst bakterií a následnou periimplantitidu [119]
3D TISK S VYUŽITÍM LASERU				
HYDROXYAPATITOVÉ POVRCHY				

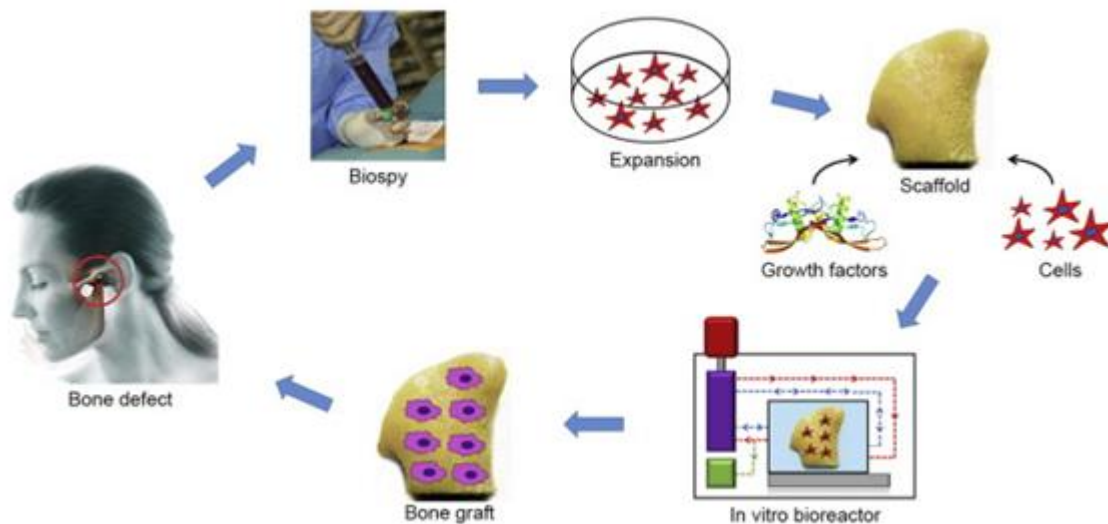
ÚPRAVA	DRUH	PODSTATA	VÝHODY	NEVÝHODY
SOL/GEL	F/CH	Hydrolytická nebo polymerizační reakce koloidního roztoku na pevnou fázi (gel), tvoří potahy, pěny nebo vlákna s definovanou strukturou [120]	Jednoduchá, levná metoda bez zvláštních nároků na technologii výroby Lze pokrýt implantáty komplexních tvarů Možná inkorporace léčiv podporujících osteointegraci implantátu [121]	Netransparentnost Mechanická nestálost vlivem vysychání Křehkost [122]

2.2 Kolonizace povrchu implantátu kmenovými buňkami a jejich diferenciaci na osteoblasty

Nelze říci, že existuje univerzální povrch nebo drsnost, optimální pro jakékoliv aplikace. Všechny typy úprav povrchů stále vykazují určité limity [123]. V oboru tkáňového inženýrství však existuje více možností, jak biokompatibilitu titanu zvýšit.

Jednou z možností je pokrytí materiálu buňkami pacienta před samotnou implantací, což snižuje imunitní odpověď organismu a zvyšuje šance na přijetí implantátu. To spočívá v odběru pacientových buněk a jejich namnožení do většího množství. Následně jsou buňky nasazeny přímo na implantát, společně s růstovými faktory, které zvyšují adhezi buněk. Komplex implantátu s buňkami je dále umístěn do bioreaktoru, kde probíhá maturace buněk a jejich diferenciaci směrem k osteoblastům. Po několika dnech až týdnech kultivace je implantát kolonizovaný buňkami voperován do těla pacienta [7; 8] (Obrázek 1).

Na proliferaci a diferenciaci buněk mají zásadní vliv vlastnosti povrchu implantátu. Dosud bylo provedeno několik experimentů *in vivo* i *in vitro* s cílem stanovit optimální podmínky kultivace a povrchu titanového implantátu pro diferenciaci kmenových buněk do osteoblastů. Bylo prokázáno, že kolonizace prediferencovanými kmenovými buňkami urychluje osteointegraci implantátu oproti kolonizaci nediferencovanými kmenovými buňkami [7].



Obrázek 1. Schéma implantace náhrady pokryté kolonií kmenových buněk prediferencovaných do osteoblastů v bioreaktoru. Obrázek převzat a upraven z [8].

Z hlediska povrchových úprav materiálu, srovnání anodizovaných povrchů titanu s různou porozitou povrchu ukázalo, že velikost pórů mezi 30 a 50 nm nejvíce podporuje ranou diferenciaci do osteoblastů [124]. Ve studii Bollmana a spol. byly titanové implantáty, tvořené 3D tiskem, osazeny mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřeně a kultivovány 3 dny. Poté byly implantáty voperovány do lebek laboratorních zvířat a po dalších 12 týdnech byly vyjmuty. Byly provedeny analýzy na buněčnou proliferaci, metabolismus kalcia a test vazby implantátu na kost pro 2 různé povrchy implantátů [125]. Ve studii dle Yu et al. byly titanové anodizované šroubky pokryty pláty prekulturnovaných mezenchymálních buněk a implantovány do tibie laboratorních potkanů. U potkanů s takto ošetřeným implantátem byl zaznamenán vyšší objem kosti v místě implantátu, tloušťka trabekulární kosti i vyšší osteointegrace implantátu ve srovnání s kontrolní skupinou s klasickými titanovými implantáty [126]. Studie Sushimita et al. ukázala, že je možné vytvořit biologicky modifikovaný implantát, který zlepšuje jeho biokompatibilitu (kmenové buňky ze zubní dřeně byly kultivovány na SLA povrchy a leštěné povrchy). Leštěné povrchy vykazovaly vyšší proliferaci buněk a tvorbu extracelulární hmoty ve srovnání s SLA povrchy [127].

2.2.1 Účinky působení tlakových sil na diferenciaci kmenových buněk do osteoblastů

Další vliv na proliferaci a diferenciaci buněk na povrchu implantátu má i použitá metoda kultivace buněk. Stovky výzkumů dokázaly, že buňky za působení chemických a fyzikálních podmínek diferencují mnohem rychleji do daného buněčného fenotypu než statická kultura. Pěstování buněk za současného působení vnějších sil na buňky je označováno jako dynamická kultivace. Působící síly by měly co nejdříve simulovat

podmínky působící přirozeně v lidském těle na daný typ buněk. U vyvíjejících se osteoblastů je to zejména tíhové přetížení, tlaková síla, v menší míře pak elektrické síly.

Buněčná diferenciací je proces vzniku specializovaných buněk, který se odehrává na pozadí buněčné proliferace. Proces diferenciací se v buňkách projevuje změnou genové exprese a syntézou specifických proteinů. Tyto změny v genové expresy mohou být předány na dceřiné buňky diferencujících buněk, díky čemuž je umožněna ontogeneze a obnova tkání a orgánů při jejich poškození. Buněčnou diferenciací *in vivo* a *in vitro* ovlivňují dva typy signálů – signály biochemické (růstové faktory a hormony) a mechanické. Při navozování diferenciací směrem k osteoblastům se nejčastěji využívá mezenchymálních kmenových buněk, které jsou jejich přirozeným prekurzorem. Zavedeným postupem při navozování diferenciací je kultivace kmenových buněk v médiu obsahujícím příslušné chemické látky, které ovlivňují specifické buněčné signalizační dráhy spojené s diferenciací směrem k požadovanému fenotypu. V rámci diferenciací mezenchymálních buněk směrem k osteoblastům se běžně využívá dexamethason, β -glycerolfosfát a kyselina askorbová. Dexamethason reguluje expresi transkripčního faktoru RUNX2, který je klíčovým faktorem ovlivňujícím expresi proteinů specifických pro osteoblasty [128]. Na podobném principu funguje i β -glycerolfosfát, který slouží jako zdroj pro signalizaci vedoucí k navýšení intracelulární hladiny transkripčního faktoru BMP2, který pozitivně ovlivňuje expresi specifických proteinů pro osteoblasty [129]. Kyselina askorbová pozitivně ovlivňuje expresi kolagenu typu I, který buňka secernuje do mezibuněčného prostoru. Zároveň bylo prokázáno, že buňky potřebují pro nastartování diferenciací směrem ke kostním buňkám kontakt s extracelulární matrix obsahující kolagen. Stupeň diferenciací kmenových buněk se následně hodnotí právě podle produkce proteinů specifických pro daný buněčný typ, tyto proteiny označujeme jako markery diferenciací [130].

Kostní buňky jsou velmi citlivé na mechanické stimuly, jež vyvolávají intracelulární signály vedoucí k remodelaci kosti v průběhu přirozeného stárnutí kosti i léčení fraktur. V kostní tkáni se účastní zejména dva typy mechanických stimulů – namáhání vyvolané deformačními silami (ohyb a stlačení), původem z fyzické aktivity ($<2000 \mu\epsilon$), a smykové tření vyvolané prouděním intersticiální tekutiny v lakunách (0,8 – 3 Pa). Působení mechanických sil na kmenové a progenitorové buňky vede k tzv. mechanotransdukci [131]. Pro vývoj osteoblastů má zásadní vliv dynamický průběh tlaku, neboť na statickou sílu se buňky adaptují, zatímco rychlé změny tlaku vyvolávají vyšší odezvu, než změny pomalé [132].

Z toho důvodu se mechanické stimuly využívají i v rámci tkáňového inženýrství za účelem navození procesu buněčné diferenciací. Kostní tkáň je vysoce mechanosenzitivní dynamická struktura – po celý život dochází k její remodelaci působením osteoklastů a osteoblastů. Počet a aktivitu osteoklastů a osteoblastů ovlivňuje za fyziologických

podmínek množstvím faktorů, mezi které patří kromě hormonů a cytokinů také signální molekuly produkované pod vlivem mechanické stimulace [133]. Příkladem jsou mechanicky stimulované osteocyty, které do svého okolí produkují kostní morfogenické proteiny (BMPs), prostaglandiny a oxid dusnatý, tedy signalizační molekuly podporující diferenciaci okolních osteoblastů [134]. Mechanická stimulace se na úrovni genové exprese projevuje díky procesu mechanotransdukce, kdy jsou mechanické síly převáděny na biochemické signály. Osteoblasty, podobně jako ostatní buňky, interagují s extracelulární matrix pomocí membránových proteinů a receptorů. Důležitou skupinou membránových proteinů jsou integriny, které se na extracelulární straně vážou pevnou vazbou na fibrin a kolagen, intracelulárně jsou napojeny na buněčný cytoskelet. Toto propojení umožňuje přenos mechanických signálů z vnějšího prostředí do buňky. Nejčastějším projevem mechanické stimulace je deformace cytoskeletu, která dále ovlivňuje tvar buněk a jejich orientaci. Cytoskelet je také úzce propojen s buněčným jádrem a jeho deformace a přestavba může vést ke změnám v genové expresi. Kromě integrinů jsou do procesu mechanotransdukce zapojeny také proteiny fokálních adhezí a gap junctions. Tyto mechanismy byly popsány u většiny typů mezenchymálních kmenových buněk [135; 136].

Mechanické stimuly nepřímo vyvolávají další účinky sil na kostní tkáň. Dle některých teorií jde o proudění mezibuněčné tekutiny v kosti způsobené způsobené následujícím mechanismem: síly (např. tíhová) působící na kost vytvářejí mírnou deformaci a napětí v kalcifikované části kosti. Toto napětí je rozdílné v různých částech kosti; diference tak způsobí, že extracelulární tekutina obklopující osteoblasty proudí z míst o vyšším napětí do míst nižšího napětí. Tok tekutiny tak zesílí intenzitu mechanických podnětů, které snímají osteoblasty a reagují na ní vytvářením signálních molekul řídících remodelaci kosti pomocí osteoblastů a osteoklastů [131]. Proudění mezibuněčné tekutiny také vytváří proudové potenciály vzhledem k piezoelektrickému efektu krystalu kostních minerálů [137; 138], nabitým buněčným membránám osteocytů a pohybu elektrolytů ve struktuře kosti [66]. Tyto proudové potenciály tak mohou modulovat pohyb iontů skrz buněčné membrány a jsou tak spojené s vytvářením kostí. Elektrická odpověď při mechanickém zatěžování kosti se považuje za adaptaci kosti jako odpověď na mechanické namáhání [139-141].

2.2.2 Systémy pro dynamickou kultivaci buněk s tlakovým namáháním

Mnoho studií ukázalo závislost mechanické zátěže na stavbu kosti a celé kostry. U osob vytvářejících vysokou zátěž (balet, rugby) byl prokázán nárůst hustoty kostí dolních končetin, jiné sporty (například plavání) tento efekt neměly [142]. V extrémních případech vede nezatěžování kosti k úbytku kostní hmoty a ztrátě objemu kosti, jak je tomu např. u dlouhodobě ležících pacientů [143]. Ačkoliv je tento fenomén dobře znám,

zatím nebyly objeveny všechny procesy probíhající při mechanickém zatěžování kostí. Nelze tedy tak stanovit univerzální podmínky namáhání podporující diferenciaci kmenových buněk směrem k osteoblastům.

Systémy pro kultivaci buněk, bioreaktory, udržují podmínky podobné podmínkám v organismu, ideální pro zdárný růst a vývoj buněk (teplota, pH, koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého v okolí, živiny). Současně stimulují buňky za účelem diferenciaci buněk do požadovaného fenotypu určitým typem namáhání. Cílem aplikace mechanické zátěže během kultivace kmenových buněk je co nejpřesněji napodobit podmínky, kterým jsou buňky přirozeně vystaveny v těle organismu. Mechanická zátěž zároveň pomáhá udržet buňky v diferenciovaném stavu a brání zpětné dediferenciaci, ke které dochází u dlouhodobé statické kultivace. Typ mechanické zátěže je volen podle požadovaného fenotypu a směru diferenciaci. Při diferenciaci směrem k osteoblastům se nejčastěji využívá dvou typů kompresní zátěže – kompresní zátěž s přímým kontaktem, a kompresní zátěž pomocí hydrostatického tlaku [144]. Méně využívanou alternativou je aplikace tenzní zátěže nebo průtokového napětí. Dynamické podmínky kultivace mají i další zásadní výhodu oproti tradičnímu přístupu. Statické podmínky nejsou vhodné pro vytváření štěpů o velikosti několika centimetrů vzhledem k nedostatečnému zásobení výživou a také neodstraňováním metabolických zplodin. Pouhá difuze nedokáže proniknout štěpem až do středu scaffoldu pro zajištění dostatečné proliferace buněk, což vede k nekróze a nevytvoření kvalitní tkáně [145].

Ideální míra zátěže, působící na buňky, nebyla doposud stanovena, obecně by se ale měla pohybovat v rozsahu fyziologických hodnot, které se však, dle literatury, liší. Některé studie považují za fyziologický cyklický tlak až do výše 300 kPa při frekvenci 0,5 Hz, která je odvozená od zátěže dolní končetiny, vykonávající pohyb při chůzi [146]. Jiné studie však považují za optimální frekvence vyšší než 1 Hz [147]. Vzhledem k zátěži končetin pouze část dne byla stanovena optimální doba působení zátěže na jednu hodinu denně, na které se studie převážně shodují [148]. Nadměrná stimulace může způsobit vážné poškození buněk, zastavení diferenciaci, příp. i apoptózu buněčné kultury [149], zatímco vhodná stimulace může vytvářet pozitivní účinky (aktivace proliferace, diferenciaci, zvýšení pohyblivosti apod.). Proto je nutné vytvářet takovou konstrukci bioreaktorů, která minimalizuje poškození buněk, a naopak vyvolá pozitivní účinky [150].

Pozitivní vliv mechanické zátěže na diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk směrem k osteoblastům byl prokázán v mnoha studiích. Studie z roku 2015 popisuje zvýšenou produkci osteoblastových markerů osteokalcinu a alkalické fosfatázy po aplikaci uniaxiální mechanické zátěže po 4. a 7. dnu kultivace. Zvýšená byla i produkce kolagenu typu I [151]. Podobných výsledků dosáhl Friedl a kolektiv, po aplikaci uniaxiální mechanické zátěže došlo v buňkách ke zvýšení exprese genů spojených

s diferenciací osteoblastů včetně alkalické fosfatázy a kolagenu typu I [152]. Goldman a Barabino ve své studii z roku 2016 zkoumali vliv průtokového napětí, které v kombinaci s použitím diferenciačního média vedlo k zvýšené expresi genů pro RUNX2, osteokalcin a kolagen typu I a II [153]. Vliv hydrostatické tlakové zátěže na produkci diferenciačních markerů po 1, 2 a 3 týdnech kultivace studoval Huang a kolektiv v práci z roku 2012. U buněk došlo k zvýšené produkci osteokalcinu, osteopontinu, osteonektinu a kolagenu typu I [154].

Amplituda tlakové zátěže i její průběh jsou také předmětem studií, avšak stále nebyl stanoven optimální tlak ani průběh namáhání. V jedné ze studií byly aplikovány dva typy zátěže na kulturu mezenchymálních kmenových buněk, a to konstantní zátěž 100/200 kPa 1 hod/den a periodická zátěž 10-40 kPa/1 Hz taktéž po dobu 1 hod/den. Druhá studie prováděla podobný pokus, s parametry 23 kPa a 10-36 kPa/0,25 Hz, 1 hod/den [155]. Dle analýzy produkce diferenciačních markerů, buňky diferencovaly pouze ve druhé studii, což může být způsobeno rozdílnou frekvencí periodického namáhání, příp. rozdílnými podmínkami násady buněčné kultury. Parametry použité k dynamické kultivaci jsou tedy velice individuální, v Tabulka 2 jsou uvedeny parametry dynamických kultivací s využitím působení hydrostatického tlaku nepřímo, které byly použity pro úspěšnou diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk, tedy buňky vykazovaly expresi raných diferenciačních markerů RUNX2, ALP, kolagenu I aj.

Tabulka 2. Přehled parametrů tlakové zátěže studií na diferenciaci kmenových buněk do osteoblastů

Tlakový průběh	Amplituda / frekvence	Doba působení	Studie
cyklický	300-375 torr/1 Hz	1 min každých 15 min, 8 hod/den	[146]
cyklický	10-36 kPa/0,25 Hz	1 hod/den	[155]
konstantní	23 kPa	1 hod/den	[155]
cyklický	0-68 kPa/0,5 Hz	1 hod/den	[156]
konstantní	10 kPa	Kontinuálně 21 dní	[157]

Z výše uvedených příkladů tak nelze stanovit přesné podmínky buněčné diferenciace při dynamické zátěži, avšak studie se shodovaly, že větší vliv má na diferenciaci cyklický průběh tlaku, jak již bylo popsáno výše. Mimo mechanického namáhání mají však dále vliv i původ a druh použitých buněk, použité kultivační médium, doba kultivace atp.

3 Hypotézy a cíle práce

Tato práce se zabývá kolonizací titanových povrchů kmenovými buňkami a jejich diferenciací směrem k osteoblastům prostřednictvím dynamické kultivace. Hlavním cílem práce je tak vytvoření kultury raných osteoblastů na vzorku ze slitiny Ti6Al4V jako modelovém materiálu prostřednictvím diferenciaci kmenových buněk získaných z laboratorního potkana.

Cíle práce vycházejí z následujících hypotéz:

- Povrchová úprava Ti6Al4V substrátu má vliv na adhezi, proliferaci a osteogenní diferenciaci kmenových buněk
- Při dynamické kultivaci s mechanickou stimulací existuje významná odlišnost v proliferaci, diferenciaci a viabilitě mezenchymálních kmenových buněk v porovnání se statickou kultivací
- Osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk je podpořena kultivací buněk v prostředí hydrogelu

Diferenciaci buněčné kultury má probíhat za podmínek podobných fyziologickým hodnotám. Vzhledem k tomu, že na trhu se v současnosti nenachází systém pro mechanické namáhání buněk, který by udržoval podmínky podobné fyziologickým, je nutné tento systém navrhnout.

Práce se tak skládá z těchto dílčích cílů (díličí cíle tvoří jednotlivé kapitoly dizertační práce):

- Vytvoření kultivační komory pro dynamickou kultivaci buněk na planárních titanových substrátech tlakovým namáháním. Výroba systému pro paralelní tlakovou stimulaci více kultivačních komor umožňujícího nastavení unikátních parametrů kultivace až pro 4 skupiny kultivačních komor.
- Měření vlastností titanových povrchů (drsnost, smáčivost) a vyhodnocení jejich vlivu na proliferaci a osteogenní diferenciaci kmenových buněk za statických podmínek. Nalezení vhodného povrchu podporujícího osteogenezi pro následnou dynamickou kultivaci.
- Kolonizace titanových substrátů kmenovými buňkami za dynamických podmínek s využitím fibrinových gelů.

4 Systém pro dynamickou kultivaci kmenových buněk s tlakovým namáháním

Pro experimenty s dynamickou kultivací buněk bylo nutné vyvinout systém, který bude do buněčné kultury dodávat mechanické namáhání pro buňky, nepřímo prostřednictvím hydrostatického tlaku o definovaných parametrech. Stimulace nepřímo byla volena zejména kvůli nízkému riziku kontaminace buněčné kultury. Tento systém je doplněn programovatelným přepínacím systémem pro distribuci tlakového namáhání, jež časově řídí dynamickou kultivaci a přepíná stimulované kultivační komory, ve kterých probíhá vývoj buněčné kultury. Tím je zajištěno namáhání buněčné kultury pouze po určitou dobu denně a zároveň je možná kultivace několika komor s unikátními parametry v jednom experimentu. Pro vlastní vývoj buněk jsou k systému navrhnuté dva typy kultivačních komor, jedna slouží pro úvodní testování vzorků, do druhé lze umístit více vzorků a srovnat tak jejich vliv na růst a diferenciaci buněk.

4.1 Metody

Navržený systém se skládá z kultivačních komor pro dynamickou kultivaci vzorků a dvou podsystémů – tlakového stimulatoru a programovatelného distributoru tlaku. Popis všech součástí je obsahem této kapitoly.

Pozn. Tato kapitola je součástí výstupů autora:

České vysoké učení technické v Praze, Institut klinické a experimentální medicíny. Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK. Česká republika Užitný vzor 33917.14.4.2020.

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství. Programovací přepínací systém pro distribuci tlakového namáhání. Původci: ŠTĚPANOVSÁ, J., R. MATĚJKA, M. MAXMILIAN, J. ROSINA a P. KNEPPO. Česká republika. Užitný vzor, ve fázi zapsání na ÚPV, č.j. 0056/20/51940.

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Fyziologický ústav AV ČR. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci buněk na planárních substrátech. Původci: ŠTĚPANOVSÁ, J., R. MATĚJKA, J. ROSINA, P. KNEPPO, M. VANDROVCOVÁ a L. BAČÁKOVÁ. Česká republika. Užitný vzor, ve fázi zapsání na ÚPV, č.j. 0055/20/51940.

České vysoké učení technické v Praze, Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Institut klinické a experimentální medicíny. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSKÁ, Š. PRAŽÁK, L. BAČÁKOVÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK. Česká republika Užitený vzor 33916.14.4.2020.

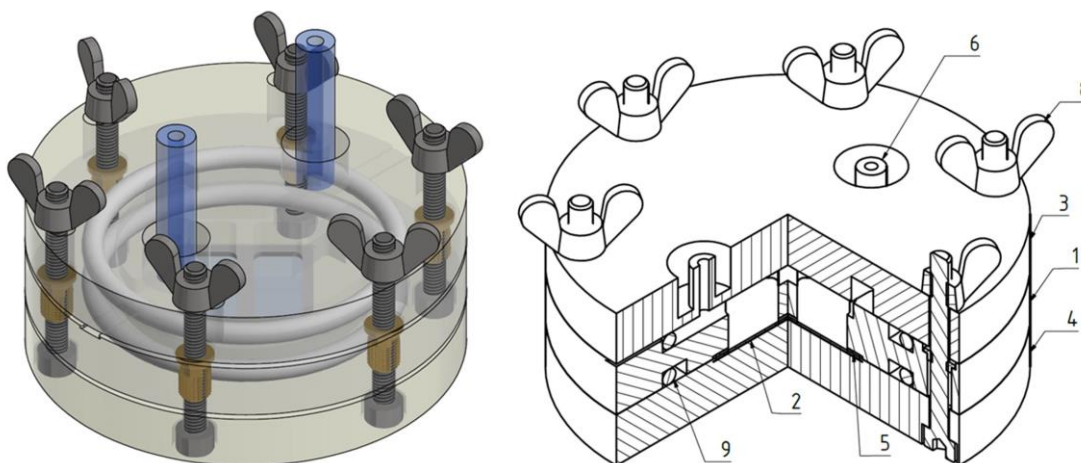
4.1.1 Kultivační komory pro tlakovou stimulaci kmenových buněk na planárních substrátech

Pro účely dynamické kultivace kmenových buněk s tlakovým namáháním byla navrhnutá kultivační komora pro kultivaci buněk na planárních substrátech. Vzhledem k požadavkům je nutné, aby v komoře bylo možné dosáhnout tlaku až 200 kPa a přitom byla komora stále hermeticky uzavřená vůči okolnímu prostředí pro udržení sterility buněčné kultury. Pro následující experimenty byly navrženy dvě varianty kultivačních komor, první byla používána pro otestování metody a primární experimenty, druhá komora pak byla navržena zejména pro účely dynamické kultivace mnoha vzorků pro srovnání parametrů kultivace. Konstrukčním materiálem obou komor je třískově obráběný polykarbonát, silikonové těsnící prvky, vhodné pro styk s potravinami, a nerezový spojovací materiál. Pro ověření nezávadnosti materiálů byly všechny použité materiály testovány na cytotoxicitu a stabilitu po sterilizaci v autoklávu.

Komora pro testování tlakové stimulace kmenových buněk na jednom substrátu

První kultivační komora (Obrázek 2) se skládá ze tří polykarbonátových desek, mezi které se uchycuje titanový substrát. Vnitřním vybráním středního dílu lze vytvořit uchycení pro libovolný tvar substrátu (čtverec, kruh apod.) až do velikosti 30 mm v jednom rozměru. Vytvořením přepážky ve středním dílu lze kultivační plochu rozdělit na dvě oblasti pro porovnání různých podmínek kultivace, např. typu buněk, gelových scaffoldů apod. Těsnost komory zajišťují dva silikonové O-kroužky a těsnění, přiléhající na obvod substrátu. Komora je stažena nerezovými šrouby M4x40 s křídlovými maticemi.

Tlak je do kultivační komory distribuován jednou z připojených silikonových hadiček, která zároveň zajišťuje výměnu plynů. Druhá z hadiček slouží k zaplavení komory kultivačním médiem bez vzduchových bublin a při samotné dynamické kultivaci je zaslepena tlačkou, případně lze řetězit několik kultivačních komor pro simultánní kultivaci. Nedochozí tak k perfuzi média komorou. Pro výměnu kultivačního média je potřeba kultivační komoru rozšroubovat, výměna přes hadičku se nedoporučuje kvůli kontaminaci portů připojených k systému pro tlakovou stimulaci.

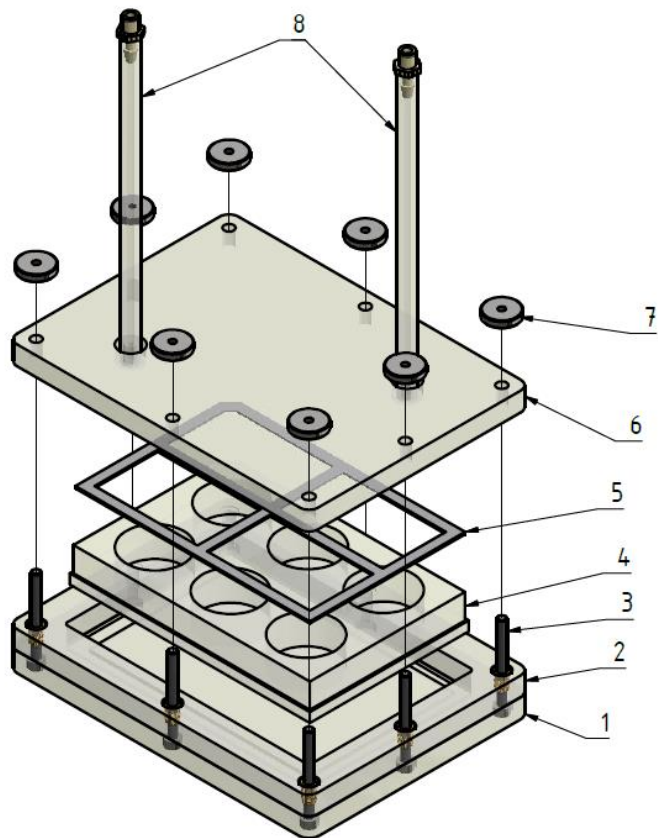


Obrázek 2. Komora pro testování tlakové stimulace kmenových buněk a její řez. Planární substrát (2) je uchycen mezi střední díl (1) a dno komory (4). K substrátu přiléhá silikonové těsnění (5) proti vytečení objemu komory. Komora je uzavřena víkem (3) a stažena nerezovými šrouby M4 s křídlovými maticemi (8). Těsnost komory zajišťují silikonové O-kroužky (9). Tlak je přiváděn jednou ze silikonových hadic (6).

Komora pro tlakovou stimulaci více vzorků

Konstrukce této komory (Obrázek 3) umožňuje dynamicky kultivovat více kultivačních vzorků díky využití komerčně dostupných vícejamkových desek (6, 12, 24 nebo 48 jamek). Deska se umísťuje do základny, ke které je připojen vymezovací člen, vše je pak uzavřeno krytem s připojenými silikonovými hadičkami pro přívod tlakových pulsů a výměnu plynů. Těsnost komory je zajištěna silikonovým těsněním přiléhajícím ke kultivační desce. Komora je stažena nerezovými šrouby M4x45 a rýhovanými maticemi.

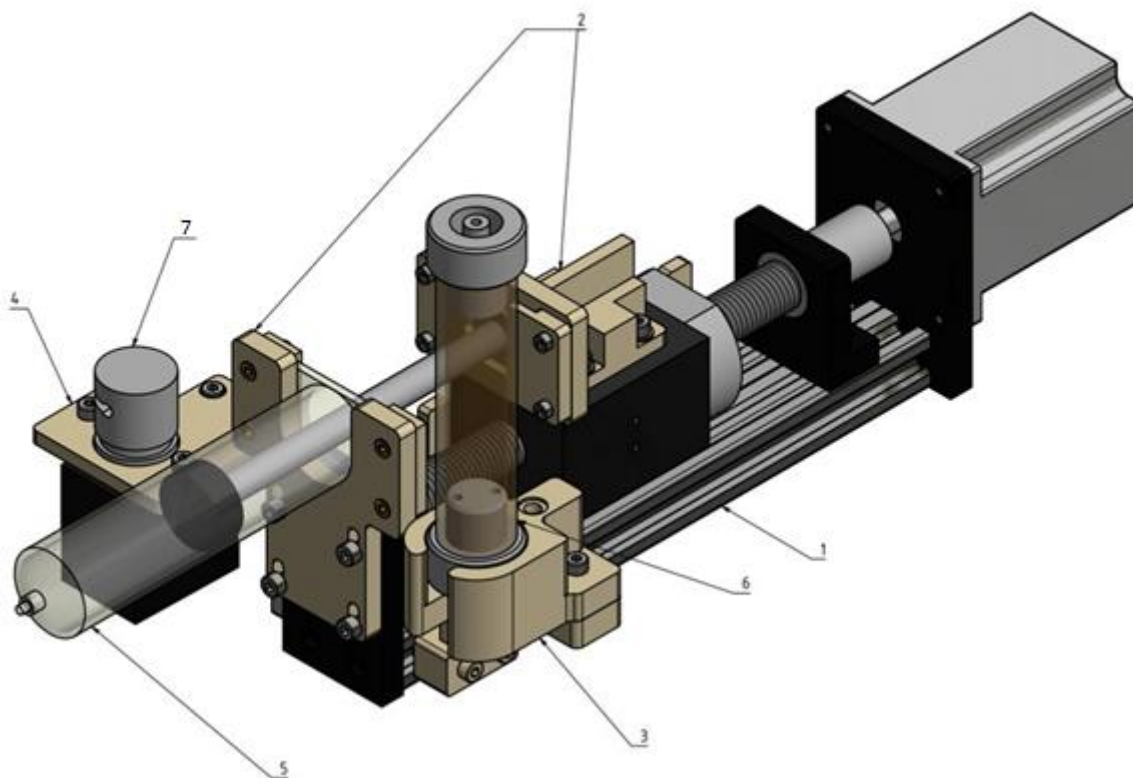
Stejně jako u předchozí komory, jednou z hadiček je distribuován tlak do komory, druhá z hadiček slouží k řetězení více komor pro simultánní kultivaci, případně je hadička zaslepená. K perfuzi komorou nedochází. Pro výměnu média je nutné, vzhledem k tvaru více jamkové desky, komoru otevřít v laminárním boxu.



Obrázek 3. Komora pro tlakovou stimulaci více vzorků. Kultivační deska pro 6 – 48 vzorků (4) se umísťuje do základny (1) s vymezovacím členem (2). Komora se uzavírá víkem (6), těsnost komory je zajištěna silikonovým těsněním (5). Komora je stažena nerezovými šrouby (3) s rýhovanými maticemi (7). Tlak je přiváděn jednou ze silikonových hadic opatřenou rychloupínacím portem Luer-lock (8).

4.1.2 Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk

Navržený systém umožňující tlakovou stimulaci s mikroperfuzí, v závislosti na stavbě komory a účelu využití, je zobrazen na Obrázek 4.



Obrázek 4. Mikroperfuzní systém pro tlakovou stimulaci. Lineární pohybová platforma poháněná servopohonem (1) pohybuje injekční stříkačkou (5) umístěnou v držáku (2). Pro perfuzní mód systému je rezervoár média (6), umístěný v držáku (3) naplněný kultivačním médiem. Kleštinový ventil (7) reguluje směr toku, případně otevírá systém pro dotlakování vzduchem.

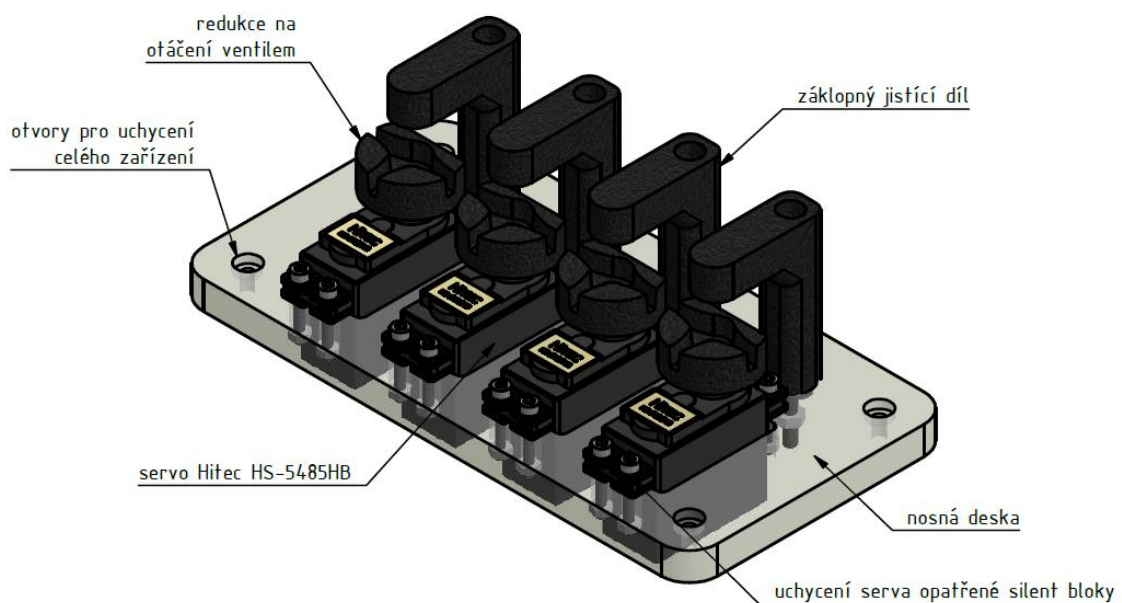
Základním prvkem celého systému je lineární pohyblivá platforma s elektronicky řízeným servopohonem. K této platformě jsou uchyceny držáky injekčních stříkaček. Držáky jsou řešeny jako výměnné a umožňují uchycení jak maloobjemových (5, 10 ml), tak i velkoobjemových a výplachových stříkaček (50, 150 ml). Kromě toho je k pohybové platformě uchycen držák s kleštinovým přepínacím 2cestným ventilem pro dotlakování okruhu, příp. pro změnu směru toku média v případě perfuzního módu.

Systém může fungovat pro tlakovou stimulaci i perfuzi buněk zároveň, nebo pouze s jednou funkcí. Pro experimenty použité v této dizertační práci byla použita pouze tlaková stimulace bez mikroperfuze. Okruh pro distribuci tlaku do kultivační komory je tvořen injekční stříkačkou uchycenou v držáku na pohyblivé platformě, na kterou je připojena silikonová hadička portem Luer-lock. Silikonová hadička je pak napojena na spojku ve tvaru písmena Y, kdy jedna větev vstupuje do kleštinového ventilu, druhá větev pak do portu kultivační komory, příp. portu trojcestného ventilu systému pro distribuci tlaku, který je popsán dále. Tlakové pulsy jsou přenášeny vzduchem, kterým je okruh natlakován. Kleštinový ventil je zvolen cíleně, aby nedocházelo k možné kontaminaci buněčné kultury. Za kleštinovým ventilem je okruh otevřen do okolní atmosféry přes filtr

s póry 0,22 μm , proto je ventil otevřen pouze za účelem dotlakování systému (nasátí vzduchu do injekční stříkačky). Systém je vždy sestaven tak, aby nasávání vzduchu probíhalo vždy z laboratorního inkubátoru, v němž je vzduch sterilizován UV zářením. Materiál všech komponent je volen tak, aby byla možná jejich sterilizace v autoklávu (silikonové hadičky, spojky), případně je používán jednorázový sterilní materiál (stříkačky, filtr). Silikonové hadičky zároveň umožňují výměnu plynů, zejména CO_2 , pro něž je kultivační komora neprostupná. Systém umožňuje dodávat tlak 0 – 200 kPa s konstantním nebo cyklickým průběhem 0,05 – 2 Hz.

4.1.3 Programovací přepínací systém pro distribuci tlakového namáhání

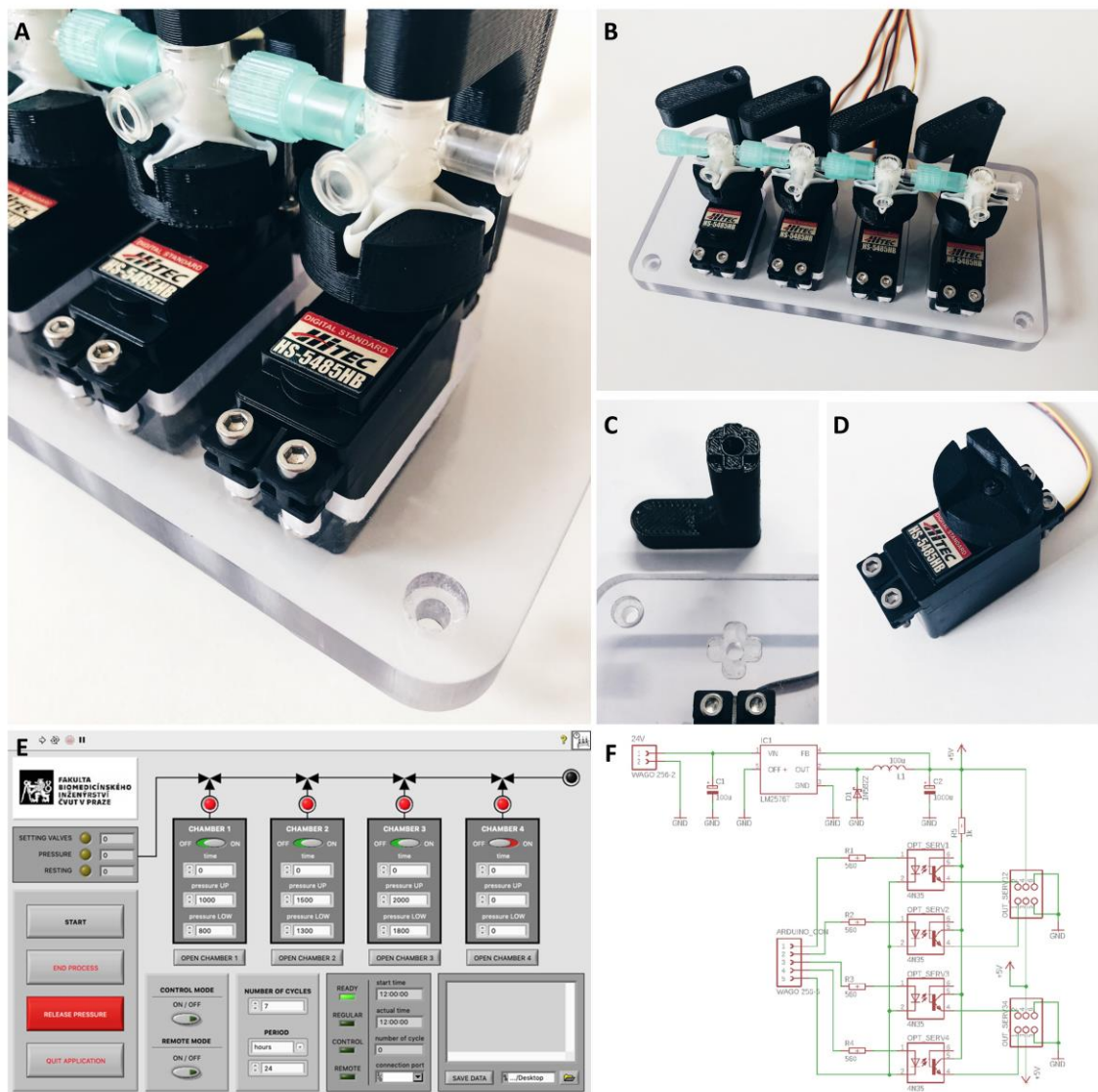
Programovatelný přepínací systém pro distribuci tlakového namáhání je zobrazen na Obrázek 5.



Obrázek 5. Stavba přepínacího systému pro časové řízení tlakového namáhání.

Samotné přepínání kultivačních komor v systému je zajištěno pomocí digitálních servomotorů HS-5485HB (Hitec RCD, CA, USA), na jejichž hřídele jsou připojené trojcestné ventily (Obrázek 6A), které propojují tlakový stimulátor a kultivační komory. Servomotory jsou uchycené do polykarbonátové desky přes silent bloky k omezení pnutí a vytvoření vůle vůči nepřesnosti jednorázových ventilů. Tato sestava tvoří tzv. přepínací jednotku (Obrázek 6B). Na hřídele servomotorů jsou upevněny unašeče, jež jsou navrženy tak, aby do nich zapadly hlavice trojcestných ventilů B. Braun Discifix (Obrázek 6A a Obrázek 6D). Ventily jsou pak přidržovány dílem ve tvaru písmene L, jež je ve vnitřku vybaven pružinou a pomocí kříže vyfrézovaného do polykarbonátové desky lze tento díl

stavět do 4 poloh (Obrázek 6C). Tento systém slouží ke snadné výměně trojcestného ventilu. Na Obrázek 6E je zobrazena řídicí aplikace systému, na Obrázek 6F elektronika pro ovládání chodu servomotorů.

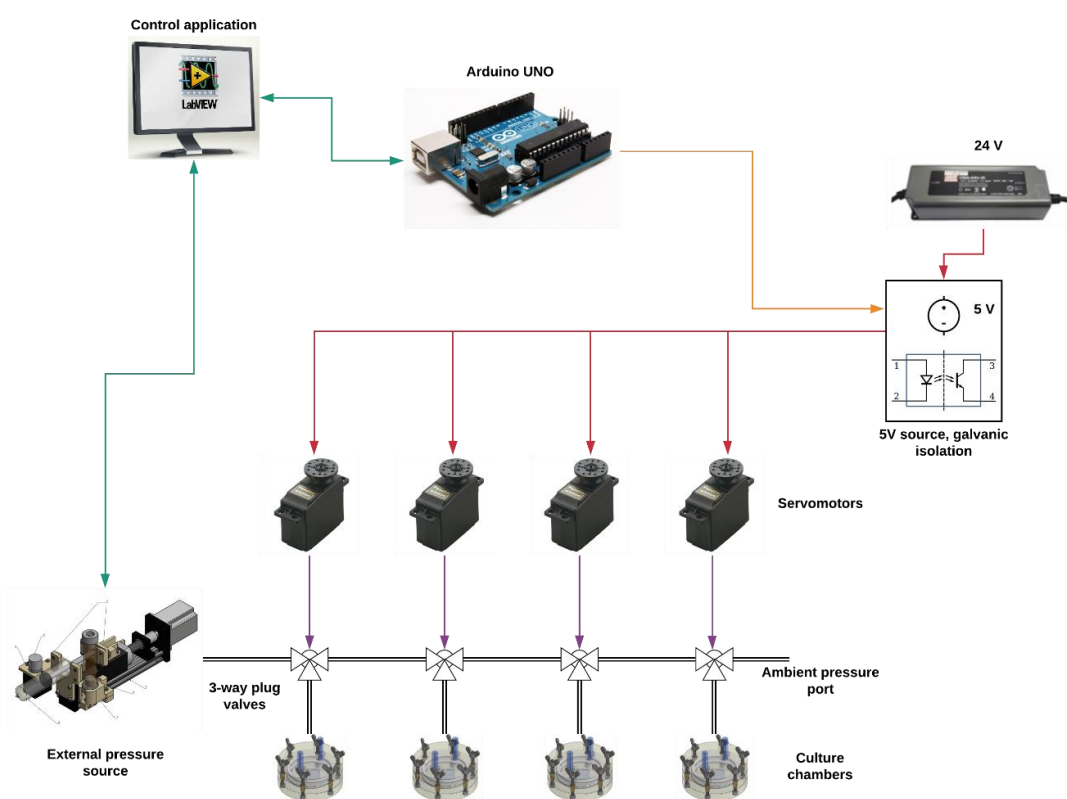


Obrázek 6. Díly pro uchycení trojcestných ventilů k hřídelím servomotorů. A: Detail uchycení 3cestných ventilů. B: Celá sestava. C: Přídržný díl ventilu s vybráním v desce. D: servomotor s dílem pro ovládání ventilu. E: Aplikace pro řízení obou systémů. F: Elektronické schéma napájení a řízení servomotorů.

Vzhledem k tomu, že systém nepřichází přímo do styku s buňkami, není nutná jeho sterilizace a jiné čištění. Pouze trojcestné ventily a přípojné silikonové hadičky k tlakovému systému a kultivačním komorám jsou autoklávatelné, příp. je použit jednorázový materiál.

Schéma celé soustavy, tj. obou systémů a kultivačních komor, je zobrazeno na Obrázek 7. Trojcestné ventily jsou zapojené do série ke zdroji tlaku, přičemž přímý výstup posledního ventilu je otevřen do okolní atmosféry, aby tlak systému mohl být

snížen na okolní úroveň. Tento proces také slouží ke kalibraci tlakových čidel v tlakovém systému. Na 3. výstup ventilu je připojena silikonovými hadičkami a fitinkami typu Luer-lock jedna nebo více kultivačních komor. Vzájemnou změnou poloh ventilů je pak přepínána skupina aktuálně tlakově stimulovaných kultivačních komor. Vzhledem ke čtyřem polohám ventilu lze mít 4 polohy vůči jedné skupině komor, přičemž reálně se využívají pouze 3 polohy – přemostění komory (komora nepřipojena ke zdroji tlaku, ale tlak prochází do dalších komor), stimulace bez průchodu tlaku do dalších komor, stimulace s průchodem tlaku do dalších komor. Na jeden výstup ventilu mohou být připojeny až 4 skupiny komor, které lze následně v rámci skupiny řetězit. Celkově tak lze mít připojených až 16 kultivačních komor při 4 unikátních parametrech stimulace.



Obrázek 7. Blokové schéma systému pro tlakovou stimulaci buněčných kultur.

Ovládání celého systému je realizováno v aplikaci vytvořené v programovacím jazyce LabVIEW (Obrázek 6E). Aplikace komunikuje mezi oběma systémy (s využitím tzv. sdílených proměných – Shared Variable API) a řídí dávkování tlaku do kultivačních komor, přičemž je možné volit tlakovou amplitudu, konstantní nebo cyklický průběh tlaku, periodu a čas, po který je tlak dodáván. Dále řídí činnost 4 servomotorů, kterými lze přepínat mezi stimulací 4 skupin kultivačních komor. Za 24 hodin dynamické kultivace je tak možné dodávat do každé komory tlak až šest hodin při zapojení všech 4 portů. Pokud se používají méně jak 4 komory, je možné porty odpojit, aby nedocházelo

k úniku tlaku. Manuálně lze také otevřít porty komor, což má využití zejména při sestavování systému nebo pro ověření funkčnosti systému.

4.2 Výsledky

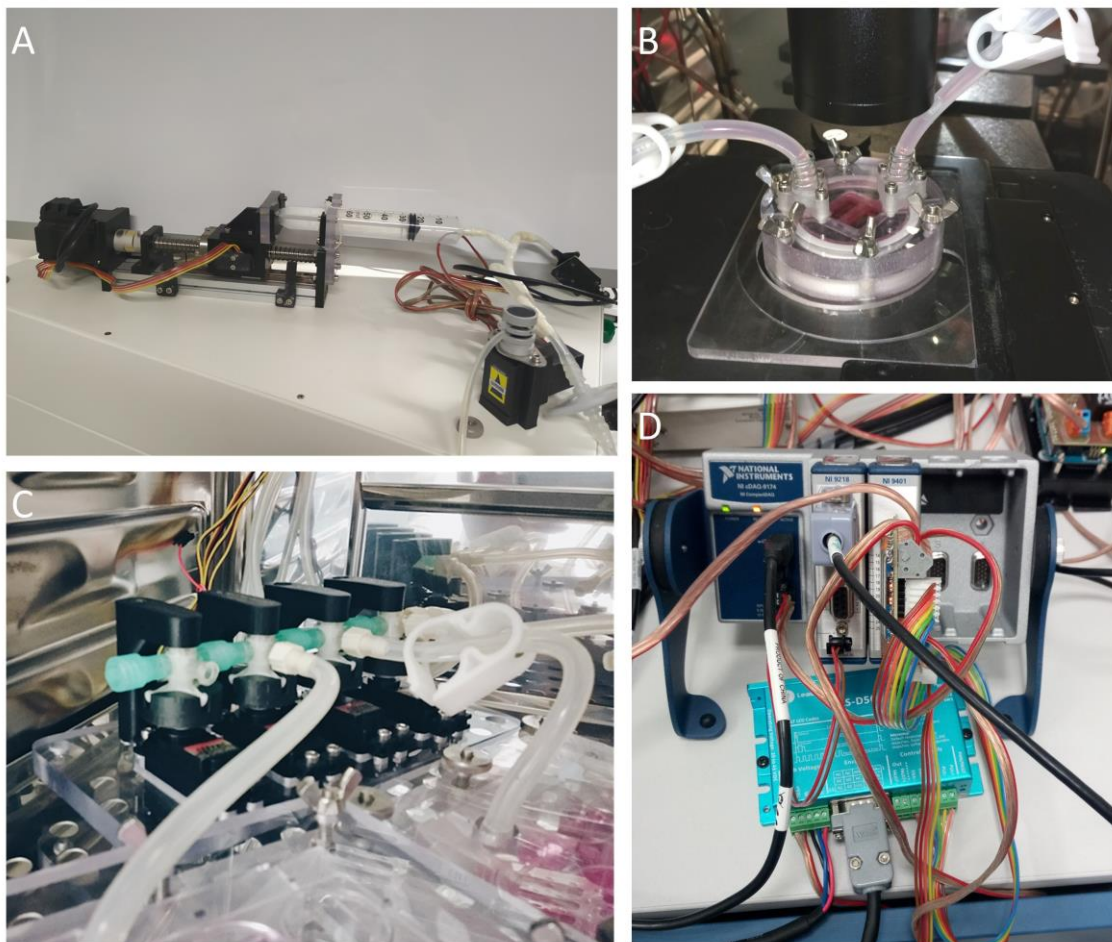
Pro aplikaci fyziologických podmínek na buněčnou kulturu při osteogenních podmínkách byl navrhnout a vyroben systém, jež je doplněn o dva typy komor pro vlastní sterilní buněčnou dynamickou kultivaci. Základem systému je zdroj tlaku (Obrázek 8A), který je tvořen stříkačkou na pohyblivé platformě. Tlak je dále distribuován pomocí přepínací jednotky (Obrázek 8C) dále do kultivačních komor. Přepínací jednotka řídí dobu stimulace a zároveň přepíná až mezi 4 skupinami komor, takže je možné aplikovat různé parametry mechanického namáhání v jeden čas.

Nastavením v softwarové aplikaci lze volit dobu kultivace, typ a velikost a periodu aplikovaného tlaku a počet stimulovaných komor v jednom okamžiku. Titanové substráty s nasazenými buňkami lze kultivovat ve dvou typech komor dle účelu experimentu. Pro primární experimenty byla navržena kultivační komora, do níž je možné vložit libovolný tvar substrátu do rozměru jedné strany až 30 mm (Obrázek 8B). Druhá z komor je určena pro kultivaci buněk na substrátech, jež jsou vloženy do komerčně dostupných kultivačních jamek a tak je možné za stejných podmínek kultivovat až 48 vzorků (Obrázek 8C).

Parametry vyrobeného systému jsou následující:

- Konstantní nebo pulsatilní tlak; 0 – 200 kPa
- Perioda tlaku 0,05 – 2 Hz
- Doba kultivace 0,1 – 24 hod./den, celková doba kultivace až 7 dní
- 4 kanály pro aplikaci unikátních parametrů kultivace (amplituda a perioda tlaku, doba působení)
- Připojení až 16 komor ve 4 skupinách, tj. až 768 vzorků ve 48jamkových deskách
- Zpětnovazební kontrola aplikovaného tlaku s dotlakováváním systému pro zachování konstantních podmínek po celou dobu kultivace

Tyto parametry, nutné pro fyziologické podmínky tlakové zátěže u osteogenní diferenciaci buněk, nedosahuje žádný z běžně dostupných komerčních systémů.



Obrázek 8. Systém pro tlakovou stimulaci s časovým řízením s kultivačními komorami pro tlakové namáhání. **A:** Systém pro tlakovou stimulaci. **B:** Kultivační komora pro testování tlakové stimulace na planárních substrátech. **C:** Přepínací jednotka pro distribuci tlakového namáhání s kultivačními komorami pro stimulaci více vzorků. **D:** Řídící elektronika systému.

4.3 Diskuze

Systém pro dynamickou kultivaci kmenových buněk s tlakovým namáháním tvoří nástroj pro výzkum vlivu mechanického namáhání na buněčnou kulturu a také umožňuje testování materiálů za podmínek podobných v organismu *in vivo*.

Řada studií dospěla k závěru, že osteogenní diferenciaci kmenových buněk podporuje nejvíce pulsatilní tlaková zátěž cca 0/40 kPa aplikovaná po dobu 1 hod./den. Navržený systém umožňuje dynamickou kultivaci buněk za těchto podmínek, navíc, vzhledem k relativně krátké době aplikace tlakového namáhání, systém přepíná mezi více kultivačními komorami, jimž nastavuje unikátní podmínky dynamické kultivace (průběh tlaku, amplituda, délka trvání stimulace) a čas potřebný pro celý experiment je tak významně redukován. Systém obsahuje 4 porty pro připojení kultivačních komor,

v jednom experimentu je tak možná dynamická kultivace až pro 768 vzorků v případě použití 48jamkových desek.

Neexistuje srovnatelný komerční systém, který by výše uvedené vlastnosti splňoval. Výhodou navrženého systému je vysoká automatizace. Většina současných systémů je založena na manuálním připojování a spínání tlakové zátěže a těž doba aplikace tlaku není regulována. Systémy jsou dále stavěny na stimulaci pouze jedné komory, až na výjimky, kdy je kultivováno několik komor zároveň za stejných podmínek, navíc dodávané pulsy mají nízkou amplitudu a nelze ani řídit časový průběh stimulace [158]. Pro porovnání více parametrů stimulace je tak potřeba experiment opakovat. Komerční řešení nabízí např. firma Flexcell (Flexcell® Tension Systems; USA), dokonce je možné i aplikovat různé podmínky na kultivační komory, avšak potom je potřeba zapojit více zdrojů tlaku.

Při dynamické kultivaci s využitím navrženého systému je nutné jen minimálně manipulovat s komorami, což je výhodné, neboť při manipulaci dochází k otřesům majícím negativní vliv na adhezi a růst buněk, navíc může dojít i ke kontaminaci kultivačních komor, hadiček a portů nebo jiných součástí. Podobně jako u jiných systémů však při výměně kultivačního média musí dojít k odpojení komor a přenesení do laminárních boxů, neboť výměna přímo v inkubátoru není vzhledem k riziku kontaminace možná. Potenciálně by mohl být rezervoár s čerstvým médiem napojen paralelně k systému a ten by automaticky médium v daný časový interval vyměnil, avšak při výměně je potřeba vyplavit všechny vzduchové bubliny ze systému, a i tak je tedy nutná přítomnost obsluhy.

Nevýhodou navrženého systému je nemožnost volit unikátní frekvenci pro každý port systému. Nastavení frekvence tlakové pulzní stimulace je realizováno pomocí rychlosti otáček servopohonu, a tedy rychlosti posuvu lineární platformy. Tento parametr nelze v průběhu chodu aplikace měnit a pro všechny porty s komorami je poté frekvence namáhání stejná.

4.4 Závěr

Pro účely dynamické kultivace na titanových substrátech byl vytvořen systém, jenž vytváří tlakové stimuly v kontinuálním nebo pulzním režimu, s amplitudou 0–200 kPa, periodou 0,05 – 2 Hz, s volitelnou dobou stimulace a přepínáním mezi více kultivačními komorami, takže během jednoho experimentu je možné porovnat více parametrů dynamické kultivace. Možnost navolení parametrů respektuje fyziologické podmínky přítomné při maturaci osteoblastů. Tento systém je unikátní, neboť neexistuje žádný jiný komerční systém, kde je možnost navolení těchto parametrů s automatickým provozem.

5 Vlastnosti titanových povrchů s různou povrchovou úpravou a jejich vliv na osteogenní diferenciaci

Pravděpodobnost přijetí titanového implantátu organismem záleží na několika faktorech. Osteoindukce, tedy přilnutí buněk k materiálu a jejich růst na něm, je klíčovým procesem pro úspěšnou osteointegraci implantátu, tedy jeho začlenění do kostní tkáně bez vytvoření vazivové mezivrstvy [97]. Biokompatibilita materiálu je úzce souvisí s jeho vlastnostmi, tj. drsností, smáčivostí, chemickým složením, povrchovou topografií, elektrickým nábojem a vodivostí [47].

Výzkumy, uvedené v kapitole 2.2, potvrdily, že prekulivace buněk na povrch implantátu urychluje osteointegraci implantátu. Vývoj buněk kultivovaných na implantátu je ovlivněn povrchovými vlastnostmi materiálu. Doposud však nebyla provedena rozsáhlá studie, která by porovnávala vliv běžně využívaných metod úprav titanových povrchů na vývoj kmenových buněk. Z tohoto důvodu byly povrchy nejprve otestovány staticky z hlediska jejich vlivu na adhezi, proliferaci a osteogenní diferenciaci kmenových buněk a výsledky byly dále korelovány s drsností a smáčivostí povrchů.

Pozn.: Obsah této kapitoly je součástí článku STEPANOVSKA, J., R. MATEJKA, M. OTAHAL, J. ROSINA a L. BACAKOVA The Effect of Various Surface Treatments of Ti6Al4V on the Growth and Osteogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells. Coatings, 2020, 10(8).

5.1 Metody

Pro korelaci výsledků buněčných pokusů byly povrchy nejprve charakterizovány z hlediska drsnosti a povrchové smáčivosti. Dále byla provedena série 8denních pokusů se statickou kultivací kmenových buněk na testovaných površích, jako kontrolní povrch bylo vybráno podložní sklo jako standard v buněčné biologii.

5.1.1 Ti6Al4V substráty – jejich modifikace, charakterizace a čištění

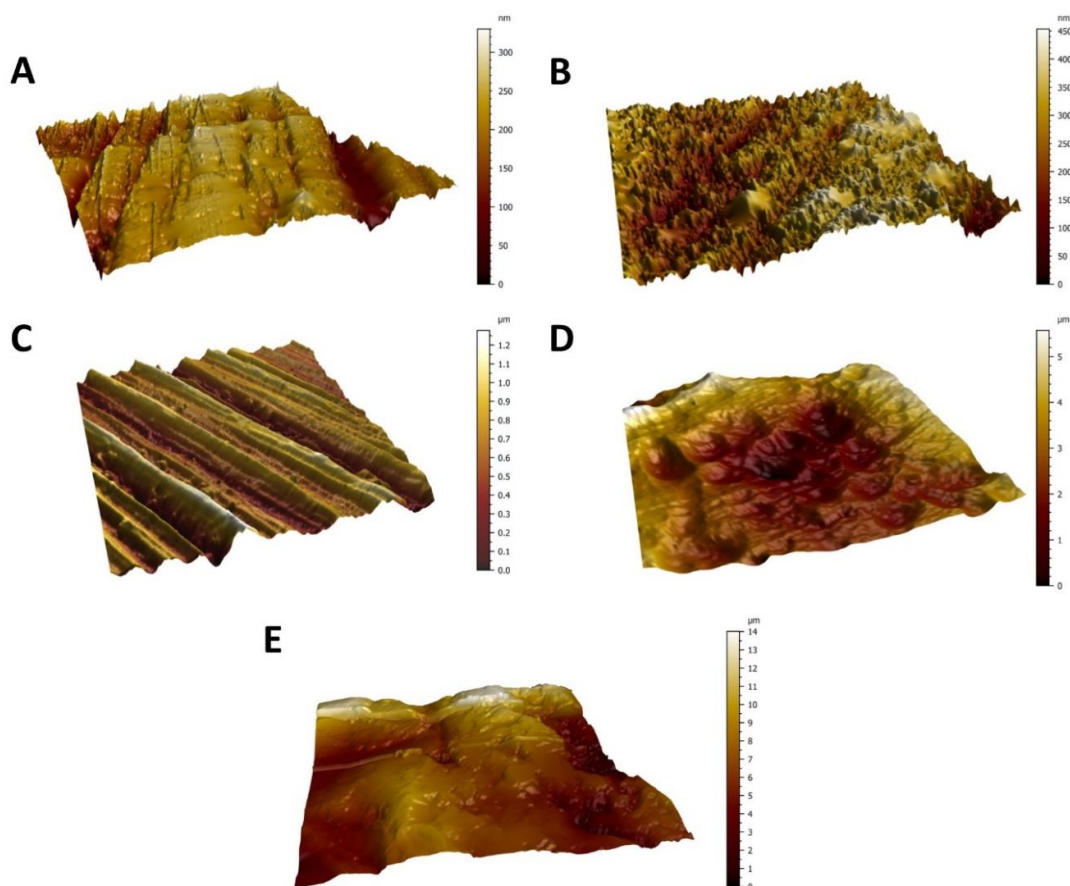
Testované substráty byly vyrobené na zakázku firmou Prospan s.r.o. (Kladno, CZ) včetně povrchových úprav. Materiál substrátů je Ti6Al4V, grade 5 ELI, povrchové modifikace jsou následující: leštění (PL), tryskání (BL), kartáčování (BR), anodizace (AND) a pokrytí uhlíkem podobným diamantu (DLC). Detaily výrobních postupů jednotlivých

vzorků jsou uvedeny v Tabulka 3. Substráty jsou kruhového tvaru s průměrem 15 mm a tloušťkou 1 mm. Mikroskopická krycí skla (GL) byla použita jako referenční substrát.

Tabulka 3 – Metody používané pro povrchové modifikace substrátů

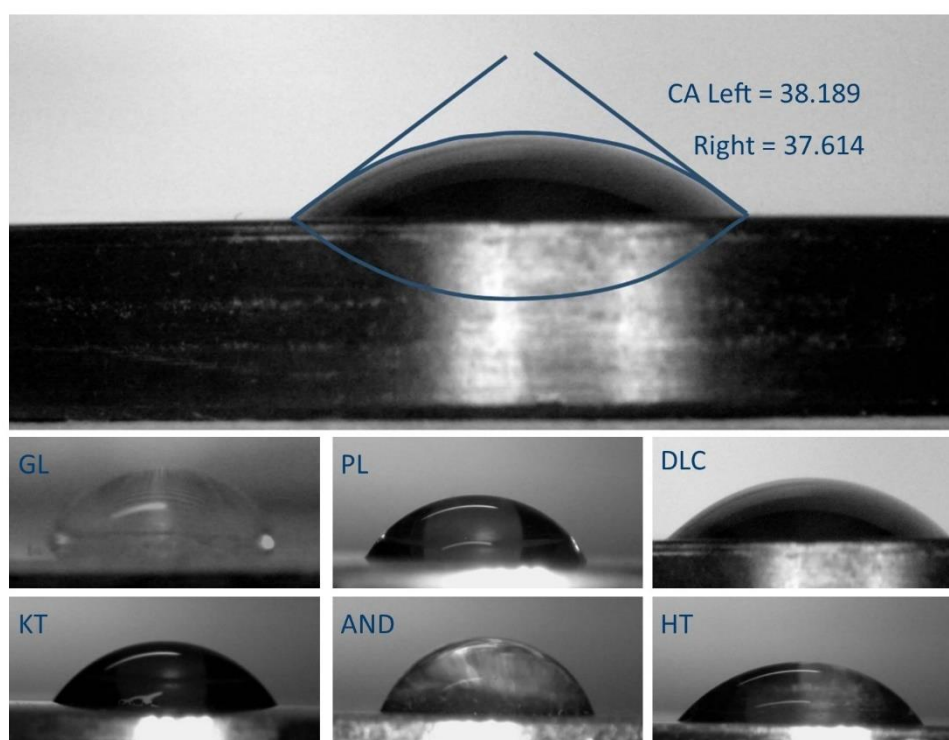
Leštěný	Leštící pasta zelená, zrnitost 3000 + ERNA bavlněné kotoučové plátno, 250 mm průměr kotouče
DLC	Leštící pasta zelená, zrnitost 3000 + ERNA bavlněné kotoučové plátno, 250 mm průměr kotouče + DLC vrstva s podkladem Cr (tl. 2 – 4 μm)
Kartáčovaný	Kartáčovací kotouč MICRON PLUS červený, hrubost P320
Anodizovaný	Leštící pasta zelená, zrnitost 3000 + ERNA bavlněné kotoučové plátno, 250 mm průměr kotouče + oxidační vrstva (napětí 95 V)
Tryskaný	Tryskání bílým korundem F60

Povrchové vlastnosti materiálů byly stanoveny pomocí mikroskopu atomárních sil kontaktní metodou (NanoWizard® 3 NanoOptics AFM System, JPK, DE). Ze snímků (viz Obrázek 9) byla stanovena drsnost materiálu s využitím softwaru SPIP (Image Metrology A/S, DK). Byly nasnímány 3 vzorky od každé povrchové úpravy, analyzováno pak bylo 10 řezů na každém povrchu v různých směrech.



Obrázek 9. AFM snímky povrchové topografie Ti6Al4V substrátů s různou povrchovou úpravou od nejhladšího povrchu po nejdrsnější – leštěný povrch (A), povrch pokrytý DLC (B), kartáčovaný povrch (C), anodizovaný povrch (D), tryskaný povrch (E).

Dále byla hodnocena smáčivost povrchů, parametr ovlivňující buněčnou adhezi, měřením kontaktního úhlu přisedlé kapky vody ve vzduchu (metoda sessile drop). Bylo provedeno 10 měření pro 3 různé povrchy od každé úpravy. Kontaktní úhly byly snímány s využitím mikroskopického systému Dino-Lite Lite (AM4115TF, AnMo Electronics, TW) a analyzovány pomocí pluginu Dropsnake v softwaru ImageJ, jak je zobrazeno na Obrázek 10.



Obrázek 10. Měření smáčivosti Ti6Al4V povrchu metodou přisedlé kapky, tj. kapka vody na vyčištěném DLC povrchu ve vzduchu, v programu ImageJ – Dropsnake.

Před pokusy byly substráty vyčištěny od reziduí cizích látek ponořením do 2% (w/v) roztoku NaOH (75 °C, 30 min), poté byly opláchnuty v ultrazvukové čističce naplněné ultračistou vodou (15 min), dále ponořeny do 2% (w/v) roztoku HNO₃ (75 °C, 30 min) a nakonec znovu opláchnuty v ultrazvukové lázni. Následně byly substráty vysušeny při 60 °C po dobu 20 minut a sterilizovány v autoklávu při 121 °C, čas sterilizačního procesu byl 10 min.

5.1.2 Izolace a kultivace kmenových buněk pro buněčné experimenty

Pro účely výzkumu adheze, růstu a diferenciaci buněk na titanových substrátech, i pro pozdější experimenty dynamické kultivace, byly kmenové buňky izolovány z tuku potkanů. Tuková tkáň potkana, získaná z abdominální oblasti potkanů – samců (Lewis,

500 g), usmrcených předávkováním thiopentalu sodného, byla rozřezána na malé kousky a ponořena po dobu 1 hodiny do 0,1% roztoku kolagenázy typu I, která rozrušila kolagenová vlákna. Poté byl rozvolněný roztok tkáně smíchán s PBS a několikrát stočen na centrifuze (300 g, 5 min), přičemž relativně těžké kmenové buňky byly odebírány zespolu centrifugační zkumavky. Získané buňky byly pěstovány v růstovém médiu, skládajícím se z média DMEM s nízkou koncentrací glukózy (1 g/l, Dulbecco's Modified Eagle Medium) a Ham's F-12 média v poměru 1:1, které bylo obohaceno o fetální bovinní sérum (FBS; 10% v/v), 10 ng/ml FGF2 a 1% (v/v) antibiotiky ABAM (100 IU/mL penicilinu, 100 µg/mL streptomycinu, and 0.25 µg/mL Amphotericinu B; vše Sigma-Aldrich (MO, USA). Buňky byly staticky kultivovány v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂), přičemž každé 3 dny byly buňky omyty sterilním PBS k odebrání nežádoucích tukových buněk a následně bylo vyměněno kultivační médium. Pasážování buněk bylo realizováno při 80% konfluenci s využitím 1 mM roztoku EDTA a směsi 0,05% trypsin/0,5 mM EDTA v PBS.

Při experimentech byly buňky nasazovány na sterilní titanové substráty a kontrolní sklo vložené do 24jamkové kultivační desky (TPP, Trasadingen, CH). Byla použita třetí pasáž buněk, násada byla 10 000 buněk/cm². Osteogenní diferenciaci byla podpořena užitím diferenciacního média, skládajícího se z média DMEM s nízkou koncentrací glukózy 1 g/l, 10% FBS, 1% ABAM, 50 µg/ml kyseliny askorbové, 100 nM dexamethasonu a 10 mM β-glycerolfosfátu.

5.1.3 Imunofluorescenční barvení, barvení jader a cytoskeletu buněk

Bylo provedeno imunofluorescenční barvení buněk za účelem vizualizace raných a střednědobých markerů osteogeneze. Rané markery zahrnují Runt-related transkripční faktor 2 (RUNX2), protein zásadní pro diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk do nezralých osteoblastů, kolagen typu I (COL I), důležitý protein kostní extracelulární hmoty (ECM), jehož exprese je stimulována proteinem RUNX2. Střednědobý marker je reprezentován osteopontinem (OPN), nazývaným také jako sialoprotein 1, jež patří mezi negativně nabitě fosfoglykoprotein ECM, který je přítomný v nemineralizované struktuře před kalcifikací.

Imunofluorescenční barvení bylo provedeno po 3, 6 a 8 dnech kultivace. Buňky byly zafixovány pomocí 4% roztoku paraformaldehydu (Sigma-Aldrich, MO, USA) po dobu 20 min při pokojové teplotě. Poté byly buněčné membrány permeabilizované pomocí 0,1% roztoku Triton X-100 v PBS po dobu 15 min při pokojové teplotě (RT). Za účelem blokování nespecifických vazebných míst pro protilátky, vzorky byly vystaveny po dobu 1 hod. (RT) roztoku s následujícím složením: PBS + 0,1% Tween 20, 1% albuminu z bovinního séra, 22,52 mg/ml glycinu. Poté byly na vzorky aplikovány primární

monoklonální protilátky z myši, konkrétně RUNX2 Antibody (sc-101145, 0.4 µg/ml), COL1A1 Antibody (sc-293182, 0.4 µg/ml) and OPN Antibody (sc-21742, 0.8 µg/ml); všechny byly zakoupeny z firmy Santa Cruz Biotechnology, TX, USA. Protilátky byly aplikovány přes noc při 4°C. Společně s primárními látkami byl aplikován phalloidin konjugovaný s tetramethylrhodaminem (TRITC), barvicí F-aktinová vlákna cytoskeletu (Sigma-Aldrich, Cat. No. P1951, 2 µg/ml). Jako sekundární protilátka byla použita Alexa Fluor 488®-conjugated F(ab') fragment of goat anti-mouse IgG (H1L, Cat. No. A11017; diluted in PBS + 1% BSA, 1 µg/ml) při pokojové teplotě po dobu 180 min. Negativní kontroly byly nabarveny stejným způsobem, ale bez sekundární protilátky. Nakonec byly vzorky přilepeny na tenká krycí skla fixačním gelem s DAPI, barvivem jader (F6057, Sigma-Aldrich, USA). Buňky byly poté vizualizovány v inverzním fluorescenčním mikroskopu (Leica DMi8, DE), byly vybrány obrázky náhodných mikroskopických polí. U osteogenních markerů bylo použito stejné nastavení excitačního paprsku pro všechny skupiny vzorků.

5.1.4 Stanovení počtu buněk, metabolické aktivity a buněčné morfologie

Počty buněk byly stanoveny na základě fluorescenčních snímků buněk s jádry nabarvenými pomocí DAPI. Počet buněk byl stanoven po 3, 6 a 8 dnech kultivace, kdy byla měřena intenzita DAPI ve fluorescenčních snímcích a srovnána s hodnotou na referenčním skle 3. den. Počet buněk byl hodnocen z 15 mikroskopických polí 3 různých vzorků dané skupiny a časového intervalu, poté byla stanovena buněčná hustota na cm² a byly vykresleny dynamické křivky růstu.

Navíc byla stanovena metabolická aktivita buněk (aktivita mitochondriálních enzymů v buňce) pomocí resazurinu. Po 3, 6 a 8 dnech kultivace byly testované vzorky inkubovány v kultivačním médiu s 10% resazurinu (R7017, Sigma-Aldrich) po dobu 2 hodin v laboratorním inkubátoru. Poté bylo médium odebráno do mikrokyvet a byla měřena jeho absorbance při 570 nm pomocí spektrofotometru (WPA Lightwave II, Biochrom, UK). Byly analyzovány 4 vzorky od každé skupiny a časového intervalu. Hodnota absorpce byla normalizována k počtu buněk na testovaném vzorku a hodnota na referenčním skle ve třetí den kultivace byla nastavena jako 100%.

Imunofluorescenční snímky F-aktinových vláken cytoskeletu byly použity pro stanovení tvaru, plochy a orientace buněk po 3, 6 a 8 dnech kultivace na všech testovaných vzorcích.

5.1.5 Stanovení koncentrace kalcia v kultivačním médiu

V každém časovém intervalu (3, 6 a 8 dní) bylo odebráno malé množství kultivačního média ze vzorku a byla z něj stanovena koncentrace kalcia pomocí Calcium Colorimetric Assay (MAK022, Sigma Aldrich). Koncentrace kalcia je nedestruktivní marker osteogeneze, vhodný pro stanovení potenciálu kostních náhrad k osteogenezi před samotnou implantací [159]. Je známo, že úbytek kalcia z média reflektuje jeho vychytávání buňkami, inkorporaci do ECM a formaci nové mineralizované kostní matrix [159]. Pro tuto analýzu byly buňky kultivovány v relativně velkém množství kultivačního média (2 ml na jamku) a médium nebylo po celých 8 dní tedy vyměňováno, takže mohla být stanovena kumulativní změna po celou dobu periody kultivace. Koncentrace kalcia byla měřena dle návodu výrobce. Vzorek média byl naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:9 na finální objem 50 μ l. Poté bylo přidáno 90 μ l Chromogenic Reagent a 60 μ l Calcium Assay Buffer a roztok byl zamíchán. Po 10 minutách při pokojové teplotě ve tmě byla měřena absorbance vzorku při 575 nm. Koncentrace kalcia byla přepočítána na spotřebu kalcia buňkami, tj. byla stanovena inverzní hodnota koncentrace kalcia v médiu (1/c). Všechny hodnoty jsou poměrově vyjádřeny k hodnotě spotřeby kalcia buněk na referenčním skle.

5.1.6 Příprava buněčných lyzátů a Western blot analýza

Za účelem kvantitativní analýzy markerů osteogenní diferenciaci byla provedena gelová elektroforéza buněčných lyzátů a specifické proteiny byly detekovány metodou Western blot. Po 3, 6 a 8 dnech byla připraveny buněčné lyzáty z části vzorků dle následujícího postupu (kultivační jamky se vzorky byly po celou dobu umístěny na ledu pro zabránění denaturace proteinů):

- Odebrání média, 3x oplach vzorků ledovým PBS
- Přidání RIPA puftru (4°C) s inhibitorem proteázy (78430, Thermo Fisher Scientific) (100:1) – 20 μ l
- Seškrábnutí buněčné kultury pomocí škrabky
- Přenos lyzátů do mikrozkušavek, ponechání všech mikrozkušavek v ledu po dobu 30 min
- Centrifugace: 14 000G, 15 min, 4°C
- Pro další analýzy byly vzorky uchovávány při -20°C

Ve vzorcích bylo stanoveno množství proteinu kolorimetrickou metodou (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 23225, Thermo Fisher Scientific). Absorbance vzorků byla měřena při 562 nm. Stanovení množství proteinu bylo měřeno ze 4 vzorků od každé skupiny.

Proteiny byly ve vzorcích separovány pomocí elektroforézy v akrylamidových gelech. Od každé skupiny bylo nasazeno stejné množství proteinu. Zároveň byly do krajů gelu naneseny proteinové markery Rainbow a Kaleidoskop. Proteiny byly z gelů přeneseny na nitrilové membrány, které byly následně k detekci přenesených proteinů barveny pomocí barviva Ponceau S (P7170, Sigma-Aldrich). Nabarvené membrány byly dále digitalizovány pomocí zobrazovacího systému Fusion Solo S (Vilber, FR). Množství proteinu pak bylo kvantifikováno obrazově pomocí softwaru ImageJ. Mimo již zmiňovaných RUNX2, COL I a OPN byly dále analyzovány raný marker alkalická fosfatáza (ALP) a střednědobý marker, specifický pro osteogenní diferenciaci, osteocalcin (OCN).

5.1.7 Stanovení aktivity alkalické fosfatázy

Aktivita alkalické fosfatázy, enzymu podílejícím se na mineralizaci kostní tkáně, byla stanovena na všech vzorcích jako významný faktor osteogenní diferenciaci. Aktivita alkalické fosfatázy byla stanovena z připravených buněčných lysátů pomocí metody ELISA s využitím pNPP substrátu (P7998, Sigma-Aldrich). Reakce byla zastavena po 60 minutách pomocí 5M NaOH. Absorbance byla měřena při 405 nm v readeru Tecan (Infinite 200 PRO, Tecan, CH).

5.1.8 Statistická analýza

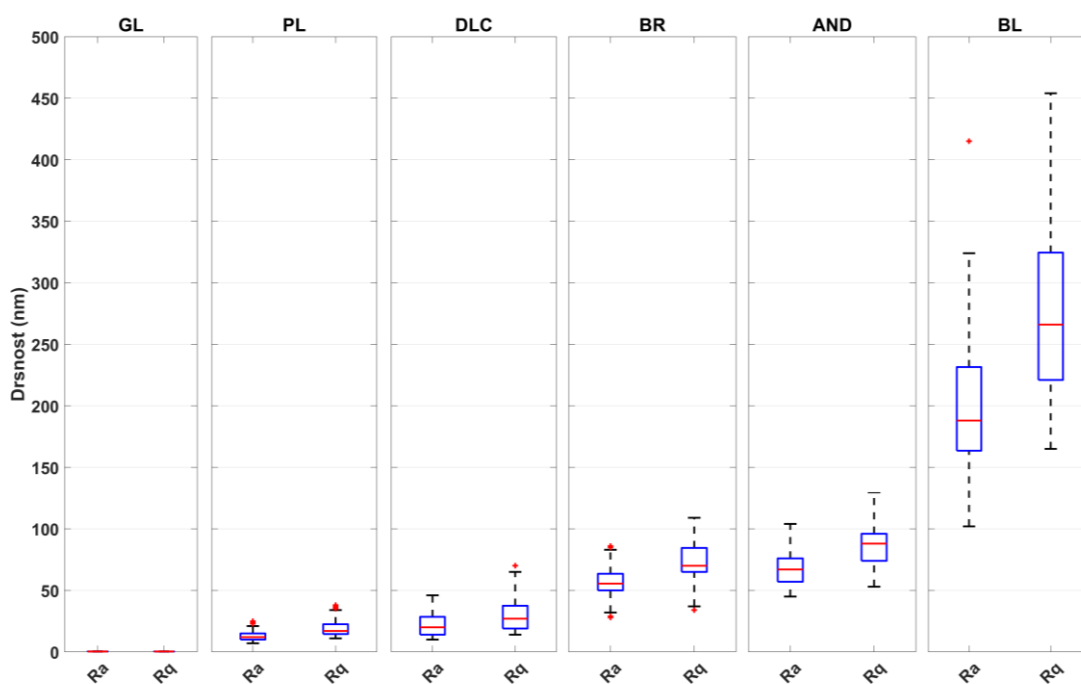
Výsledky jsou vyjádřeny pomocí boxplotů, kde jsou znázorněny mediány (červená čára), 1. a 3. kvartil (hranice boxu) a minima a maxima pomocí fousů, příp. červenými body i odlehle hodnoty. Pro každý experiment byly použity buňky izolované z jednoho zvířete, celkem byly provedeny tři experimenty. Statistická signifikance byla stanovena pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu. Výsledky byly považovány za signifikantní při $p \leq 0,05$.

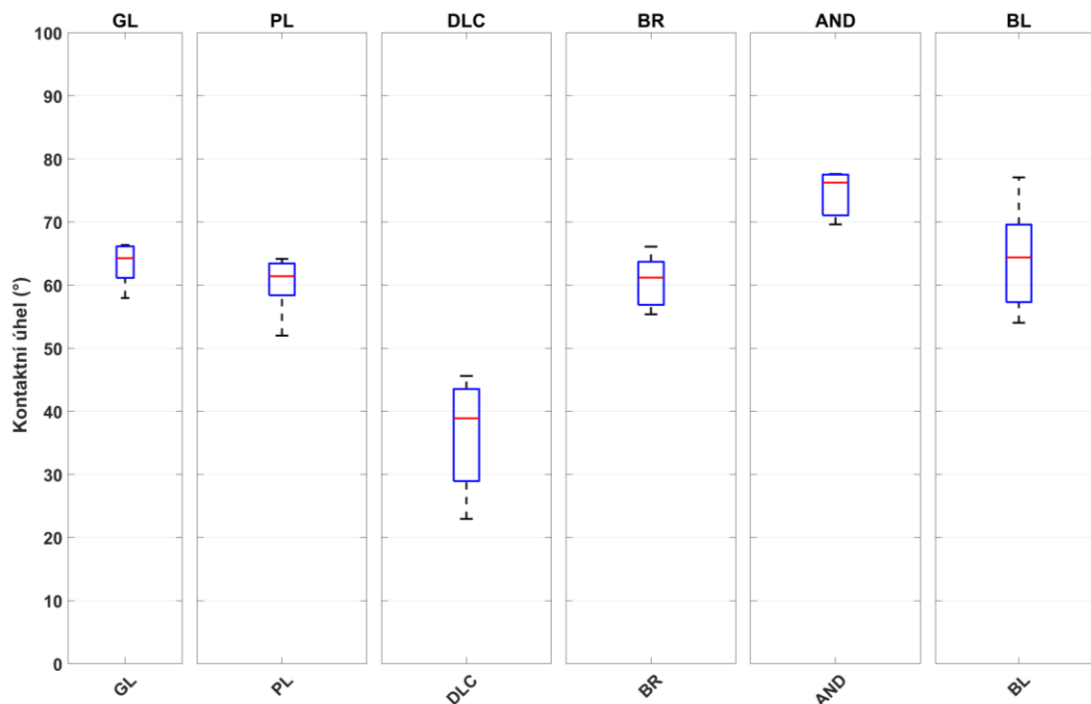
5.2 Výsledky

Výsledky experimentů zabývajících se vlivem povrchových vlastností substrátů jsou uvedeny v následujících podkapitolách dle jednotlivých analýz. Většina analýz je vyjádřena relativně vůči vzorku GL 3. den kultivace, mimo měření OPN, kdy jsou vzorky normalizovány vůči GL vzorku 8. den kultivace. Pro vyšší přehlednost je signifikance mezi jednotlivými vzorky všech grafů vyjádřena v tabulkách v příloze B.

5.2.1 Drsnost a smáčivost titanových vzorků

Vliv povrchových úprav na drsnost a smáčivost titanových vzorků je zobrazen na Obrázek 11. Drsnost (Obrázek 11 nahoře) je popsána parametry R_a , tj. průměrná aritmetická úchylka posuzovaného profilu, a R_q , tj. průměrná kvadratická úchylka posuzovaného profilu. Oba parametry ukázaly, že drsnost modifikovaných vzorků rostla v následujícím pořadí: $PL < DLC < BR < AND < BL$. Pouze drsnost tryskaného povrchu byla v submikronových hodnotách, drsnost dalších povrchů byla v řádu desítek nanometrů. Kontrolní vzorek skla byl téměř úplně hladký, neboť hodnota jeho drsnosti byla v desetinách nanometru.





Obrázek 11. Nahoře: Hodnoty povrchové drsnosti – průměrná aritmetická úchylka posuzovaného profilu (R_a) a průměrná kvadratická úchylka posuzovaného profilu (R_q) na referenčním skle a Ti6Al4V vzorcích. Dole: Smáčivost těchto vzorků měřená metodou přisedlé kapky.

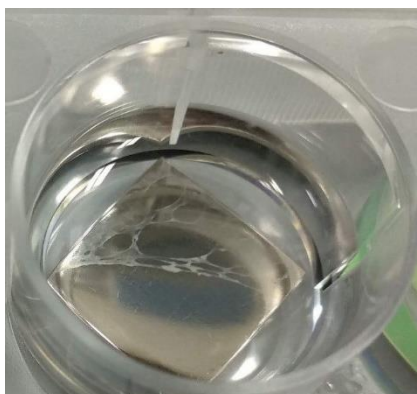
Smáčivost (kontaktní úhel) většiny povrchů se pohyboval mezi 60 a 75°, což znamená, že smáčivost všech povrchů je podobná podložnímu sklu, které je považováno za standardní kultivační substrát (Obrázek 11 dole). Pouze smáčivost anodizovaného povrchu byla lehce nižší (kontaktní úhel 74°), ale tento výsledek nebyl signifikantní vůči sklu. Avšak kontaktní úhel DLC povrchu byl signifikantně nižší než u ostatních vzorků, což značí nejvyšší smáčivost tohoto vzorku.

5.2.2 Počet a metabolická aktivita buněk

Vliv úprav titanových povrchů na proliferaci buněk je zobrazen na Obrázek 13A. Počet buněk byl stanoven na základě fluorescenčních obrázků buněčných jader. Tato analýza ukázala, že třetí den kultivace byl počet buněk na všech vzorcích stejný nebo mírně nižší než na referenčním skle. Avšak šestý a osmý den kultivace počet buněk na všech vzorcích byl výrazně nižší než na kontrolním skle. Na leštěném vzorku byla populace od 3. do 8. dne konstantní, ačkoliv třetí den byla populace relativně vysoká, srovnatelná se sklem. Na dalších vzorcích počet buněk rostl, ale nárůst byl nejvíce patrný mezi 3. a 6. dnem, zatímco od 6. do 8. dne počet buněk spíše stagnoval. Počet buněk na DLC, BR a AND vzorcích byl srovnatelný, zatímco na BL vzorku byl počet buněk nižší.

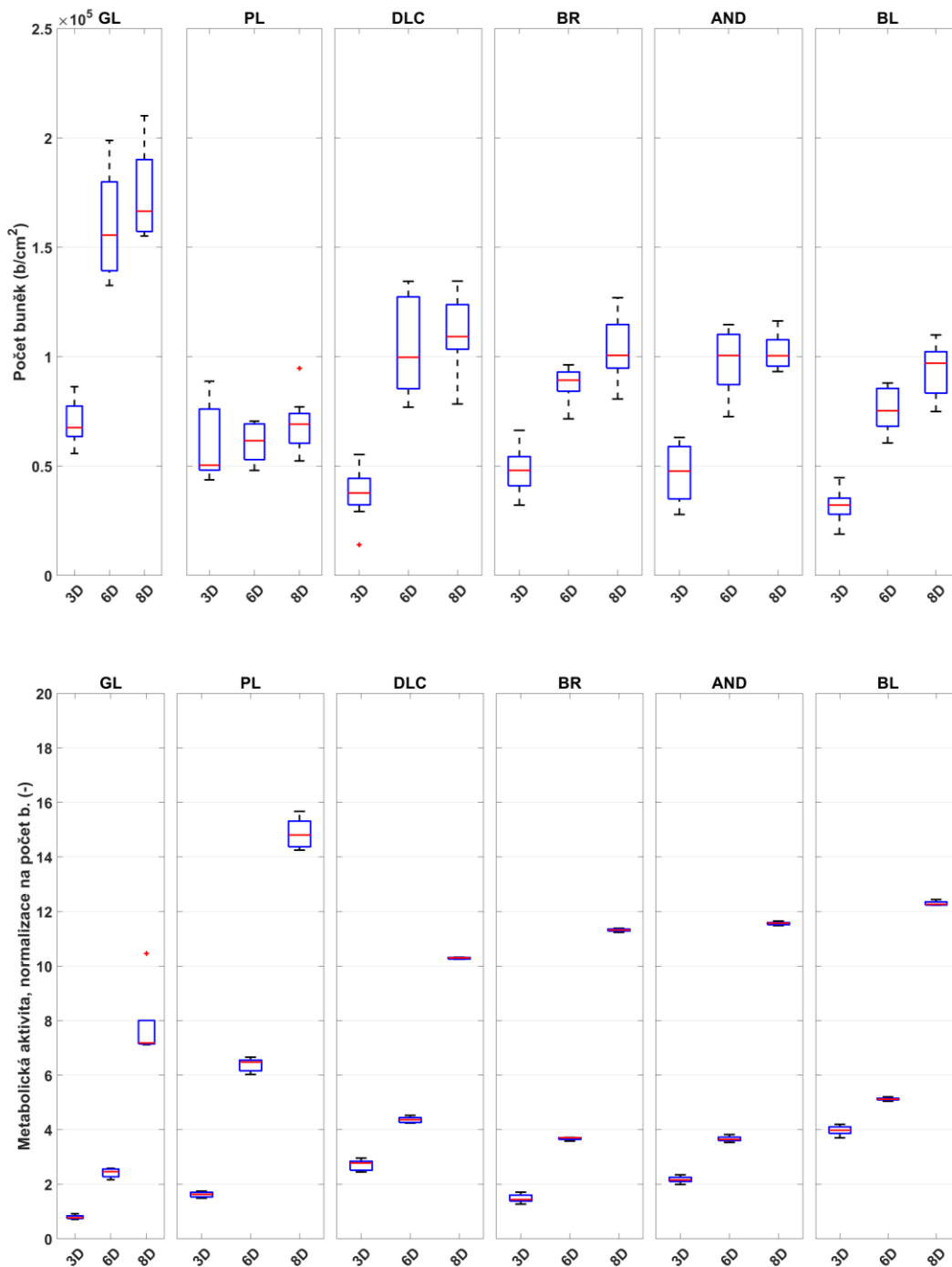
Metabolická aktivita, tj. aktivita mitochondriálních enzymů, je primárně používána jako marker buněčné životaschopnosti – viability a také jako nepřímý marker počtu

buněk. Avšak v této analýze byla tato hodnota normalizována k počtu buněk. Obrázek 13B tak indikuje metabolickou aktivitu na jednu buňku, ovlivněnou vlastnostmi kultivačního substrátu. Tato aktivita byla nejnižší u buněk na referenčním skle, kde počet buněk byl relativně vysoký. Naopak nejvyšší hodnoty byly naměřeny na leštěném povrchu, kde počet buněk byl relativně nízký, pravděpodobně vlivem potrhání buněčné kultury na tomto povrchu (Obrázek 12), ke kterému docházelo při manipulaci se vzorky a při oplachování vzorků při analýzách.



Obrázek 12. Buněčná kultura sloupnutá z povrchu leštěného substrátu. Tento jev byl pozorován u relativně hladkých povrchů – GL, DLC i PL, ale u PL byl nejvíce patrný. Takovéto vzorky byly vyjmuty z analýz.

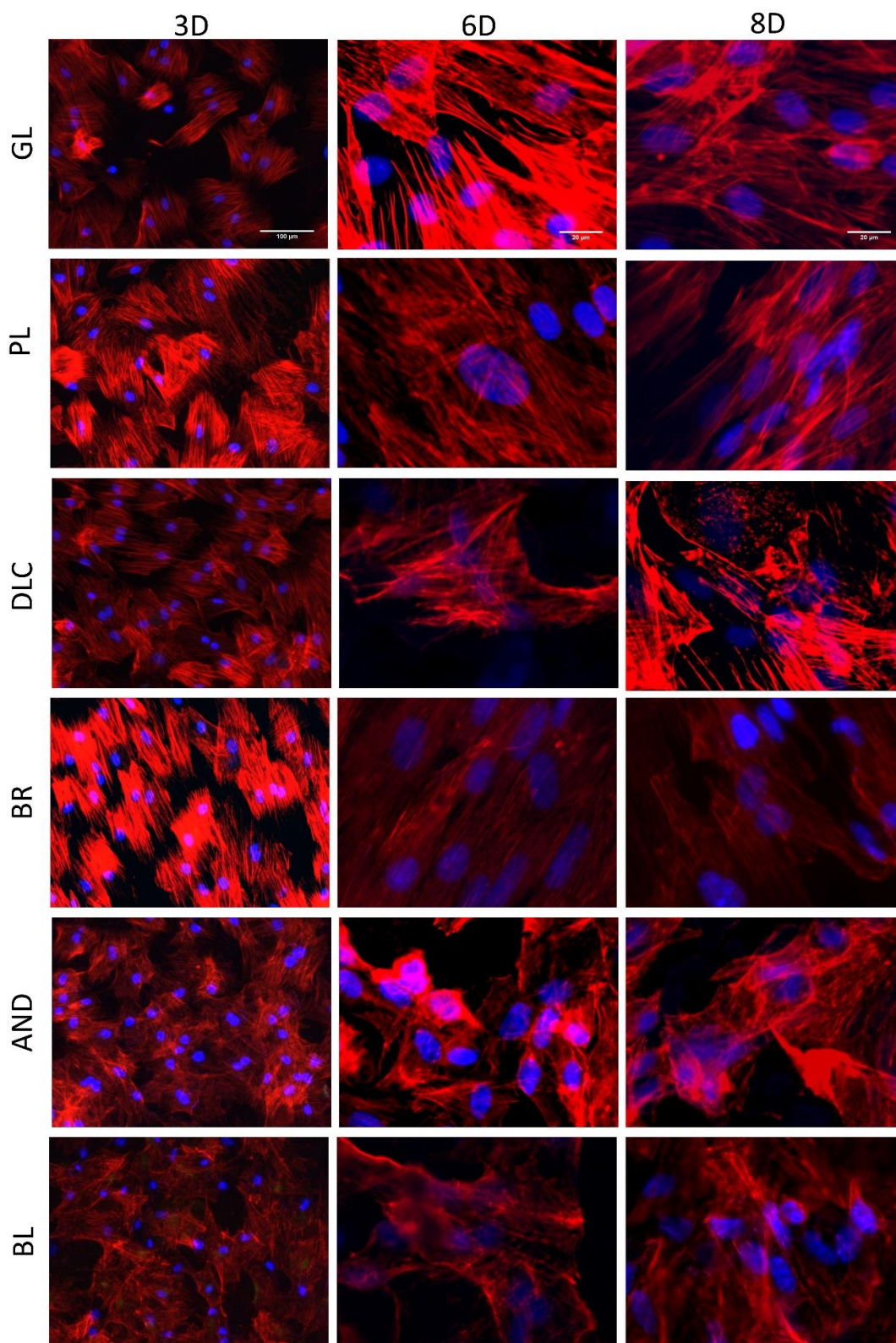
Metabolická aktivita buněk na DLC, BR a AND povrchu dosáhla podobných středních hodnot, stejně jako počet buněk. Metabolická aktivita BL vzorku byla mírně vyšší než na DLC, BR a AND povrchu, zatímco počet buněk byl mírně nižší. Lze tak vytvořit závěr, že metabolická aktivita na jednu buňku je negativně korelována k počtu buněk. Na všech vzorcích byl signifikantní nárůst metabolické aktivity mezi dnem 6 a 8, zatímco nejvyšší nárůst počtu buněk byl mezi dny 3 a 6.



Obrázek 13. A: Počet buněk na testovaných vzorcích po 3, 6 a 8 dnech kultivace; hodnoty jsou normalizovány vůči referenčnímu sklu 3. den kultivace. Proliferace buněk na sklu je signifikantně vyšší než na ostatních vzorcích. Proliferace na hladkých površích ($R_a < 25 \text{ nm}$) ukazuje podobný trend, avšak adheze buněk je nízká a dochází k odlupování buněk z povrchu, počet buněk pak nenarůstá. Data vykazují negativní korelaci mezi počtem buněk a drsností. **B:** Metabolická aktivita buněk na testovaných substrátech. Hodnoty jsou přepočteny na 1 buňku.

5.2.3 Morfologie buněk a jejich orientace

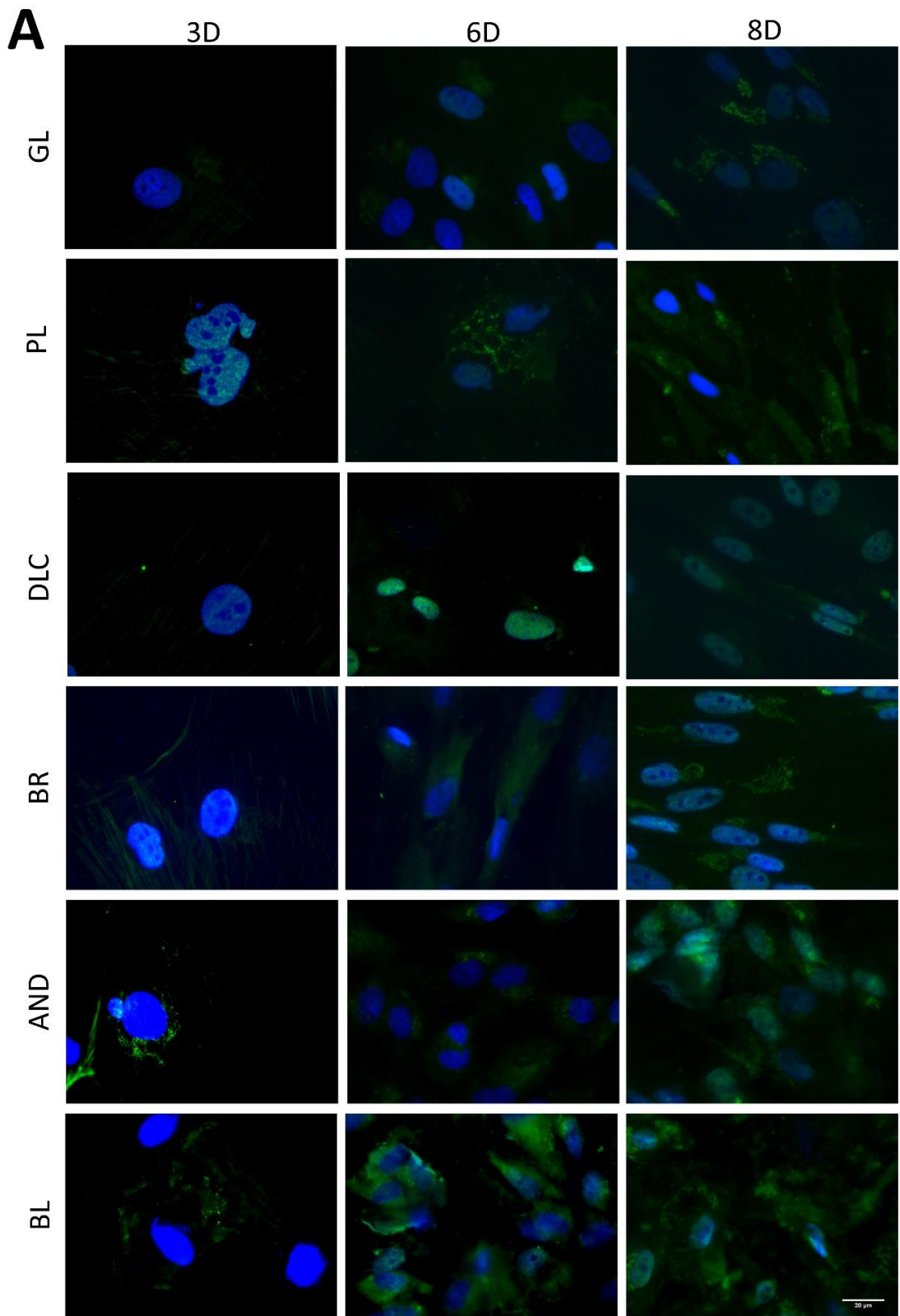
Buněčná morfologie a orientace byla stanovena na základě barvení F-aktinových vláken cytoskeletu (Obrázek 14). Barvení ukázalo, že buňky na všech površích byly rovnoměrně rozprostřené s polygonálním nebo protáhlým tvarem. Protáhlý tvar buněk byl nejvíce patrný na BR povrchu, kdy buňky byly orientovány paralelně k zářezům v materiálu vzorku. Mírně protáhlé, paralelně řazené buňky byly též patrné na PL a GL povrchu 6. a 8. den kultivace, tedy na relativně hladkých površích bez nerovností, jež by ovlivňovaly morfologii buněk. Na ostatních površích byly buňky hlavně polygonální, náhodně orientované.

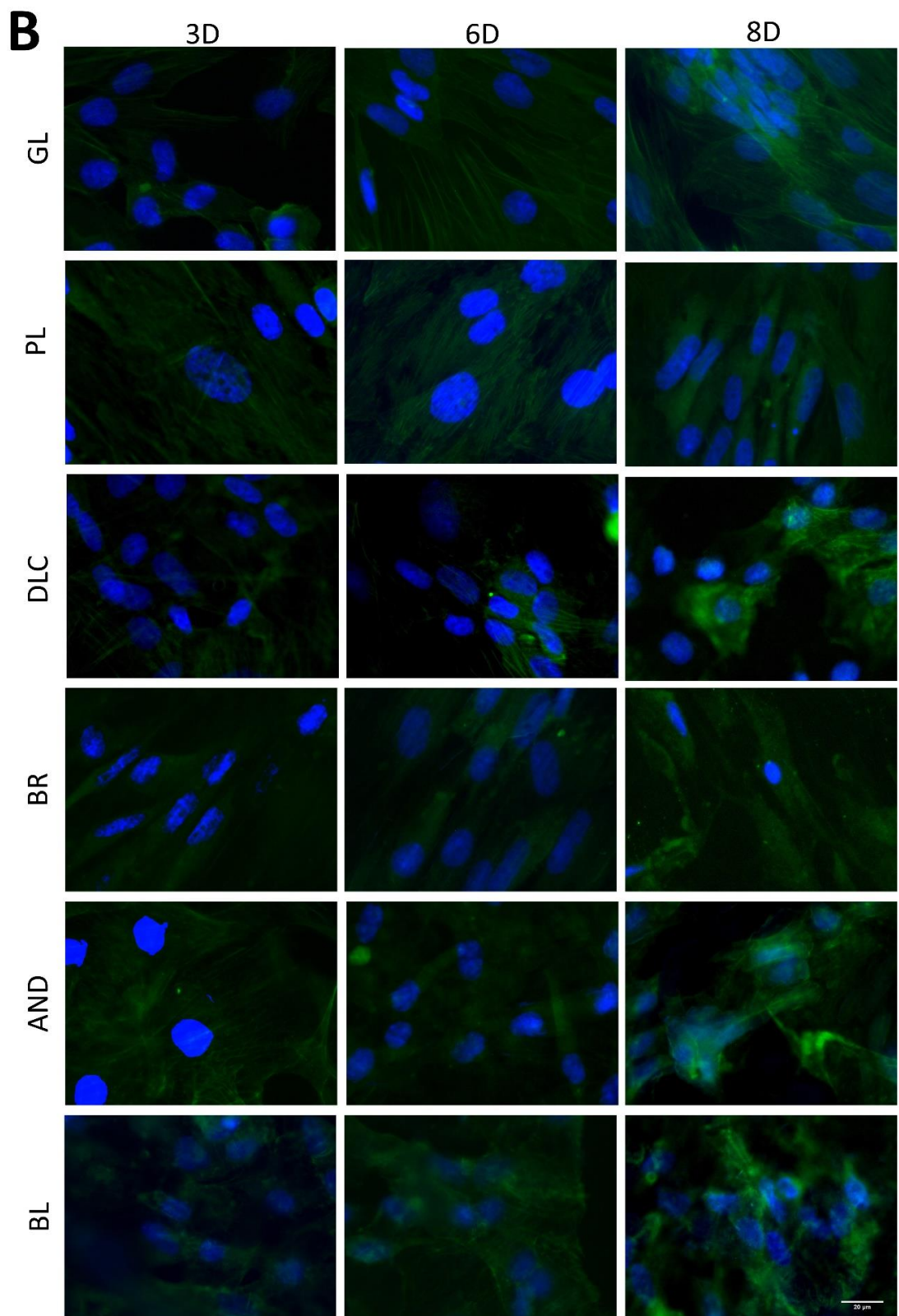


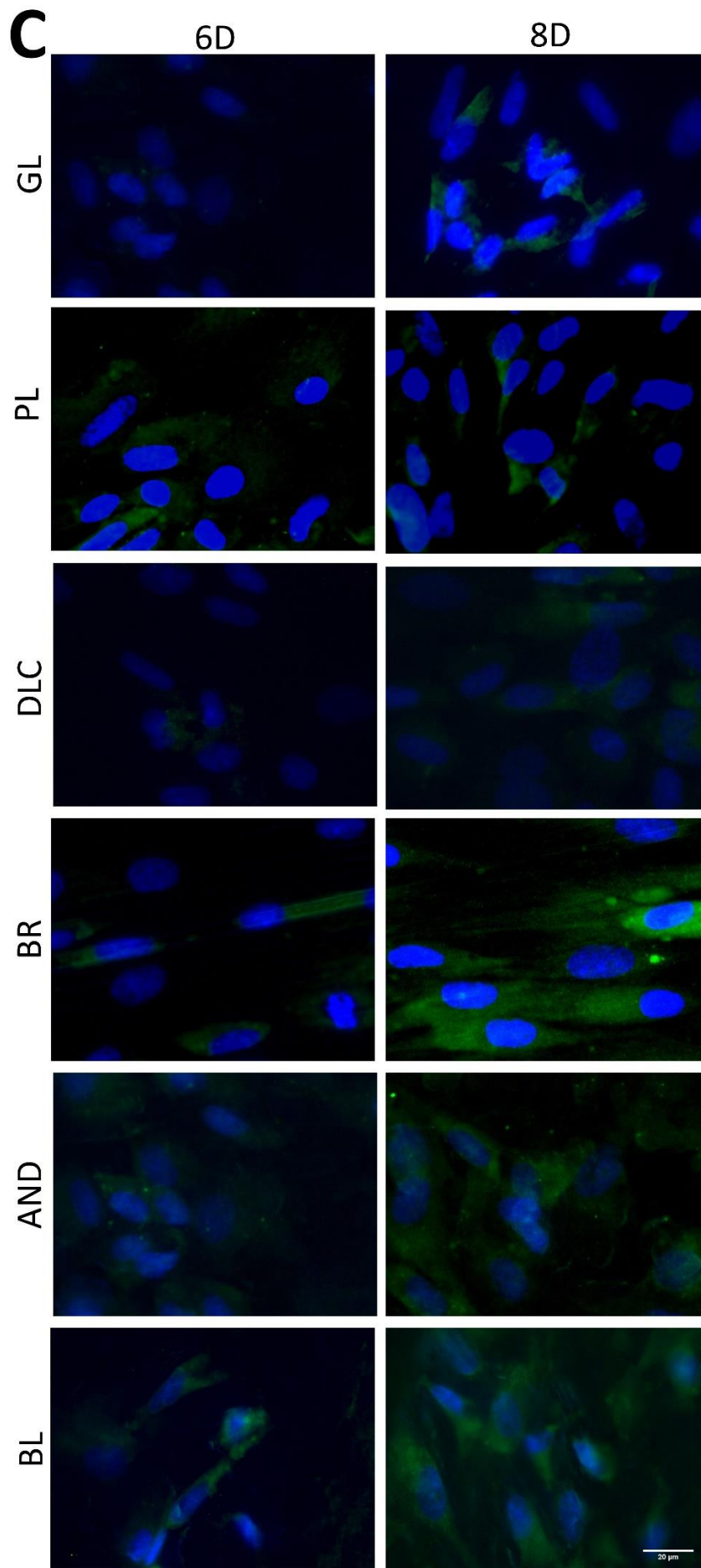
Obrázek 14. Srovnání buněčné morfologie na testovaných substrátech po 3, 6 a 8 dnech kultivace. Buňky na všech površích jsou pravidelně rozprostřené polygonálního nebo protáhlého tvaru, zvláště na BR povrchu. F-aktinová vlákna barvena TRITC-konjugovaným faloidinem (červená), jádra DAPI (modrá). Mikroskop Leica DMI8. 3D: Pohled na celkovou buněčnou kulturu, objektiv 10x, měřítko 100 μm; 6D, 8D: Detaily buněk, objektiv 40x, měřítko 20 μm.

5.2.4 Markery osteogenní diferenciac

Osteogenní diferenciac buněk na testovaných površích byla hodnocena na základě imunofluorescenčního barvení raných osteogenních markerů RUNX2 a kolagenu typu I a střednědobého markeru osteopontinu (Obrázek 15). Tato analýza ukázala, že rané markery byly přítomné u všech vzorků, ale počet pozitivně barvených buněk a intenzita zbarvení závisí na typu modifikace a kultivačním času. Nejnížší fluorescence RUNX2 a COL I byla naměřena na vzorcích GL a PL 3. den kultivace, zatímco nejvyšší hodnota byla u BR, AND a BL vzorku 8. den kultivace (Obrázek 15A, B). OPN byl zřetelně viditelný až 8. den kultivace, zejména na BR, AND a BL vzorku (Obrázek 15C).

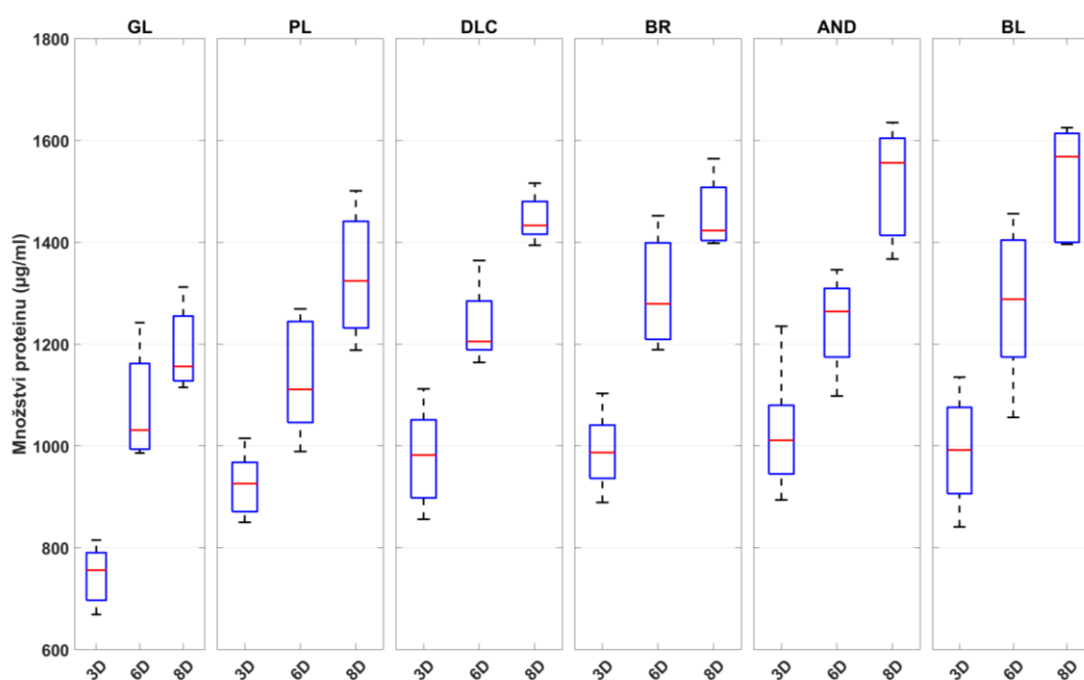






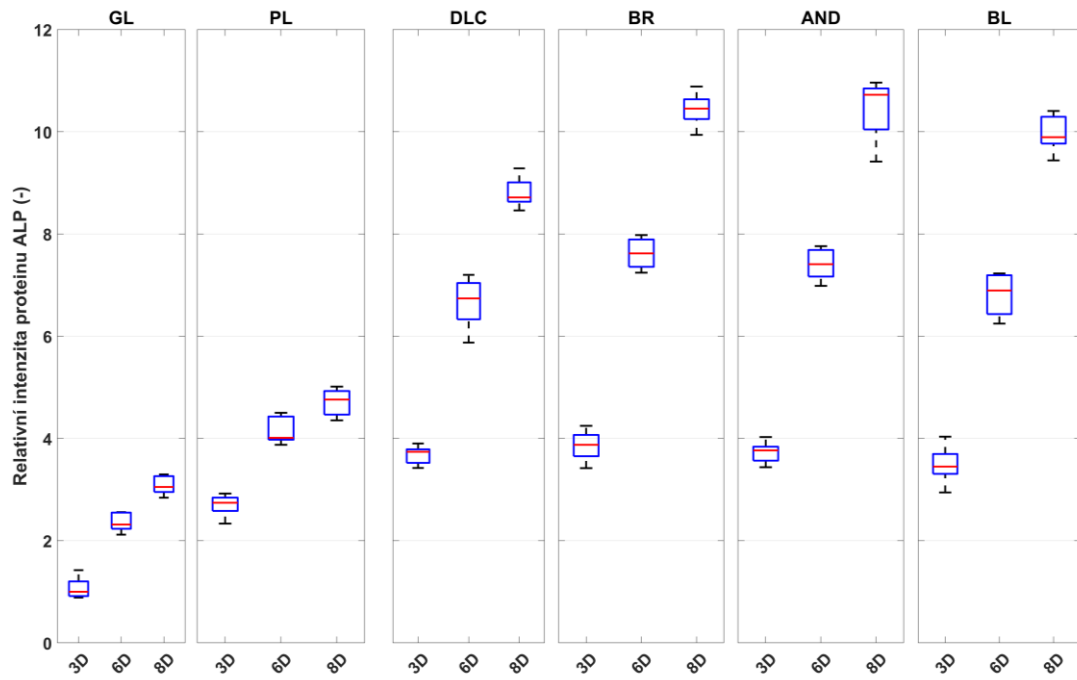
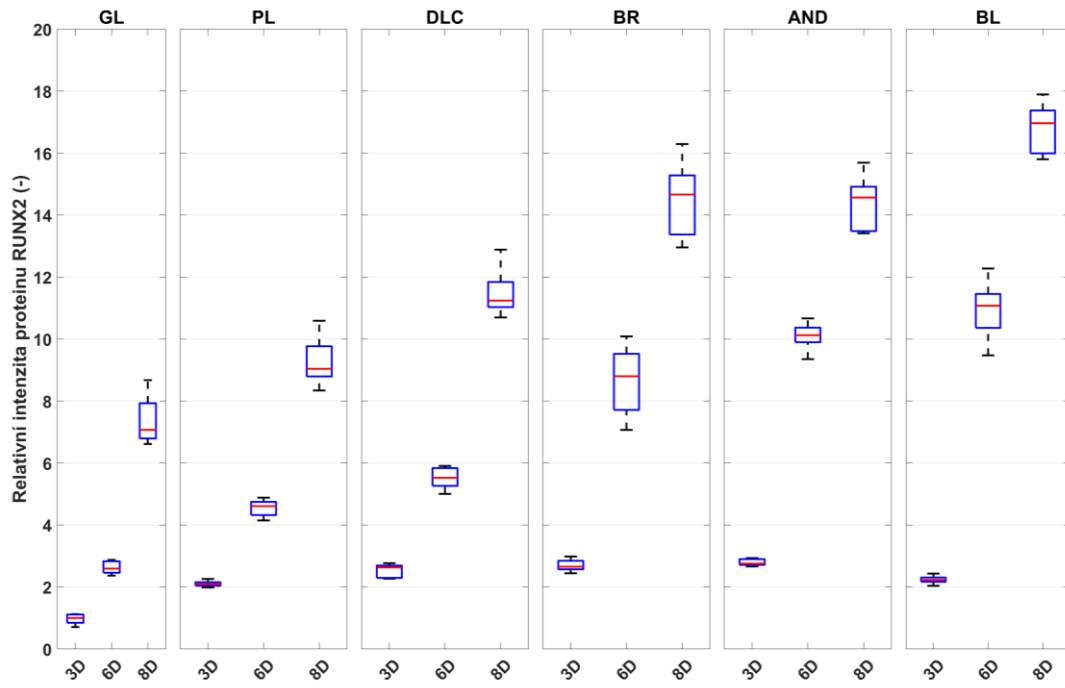
Obrázek 15. Imunofluorescenční barvení raných osteogenních markerů RUNX2 (A) a COL I (B) a střednědobého markeru OPN (C) buněk na testovaných substrátech po 3, 6 a 8 dnech kultivace. Produkce COL I a jeho nárůst v čase je srovnatelná na všech vzorcích, ale produkce RUNX2 a OPN je viditelně vyšší na BR, AND a BL povrchu, zvláště 6. a 8. den kultivace. 3. den nebyl žádný OPN pozorován. Mikroskop Leica DMi8, měřítko 20 μm .

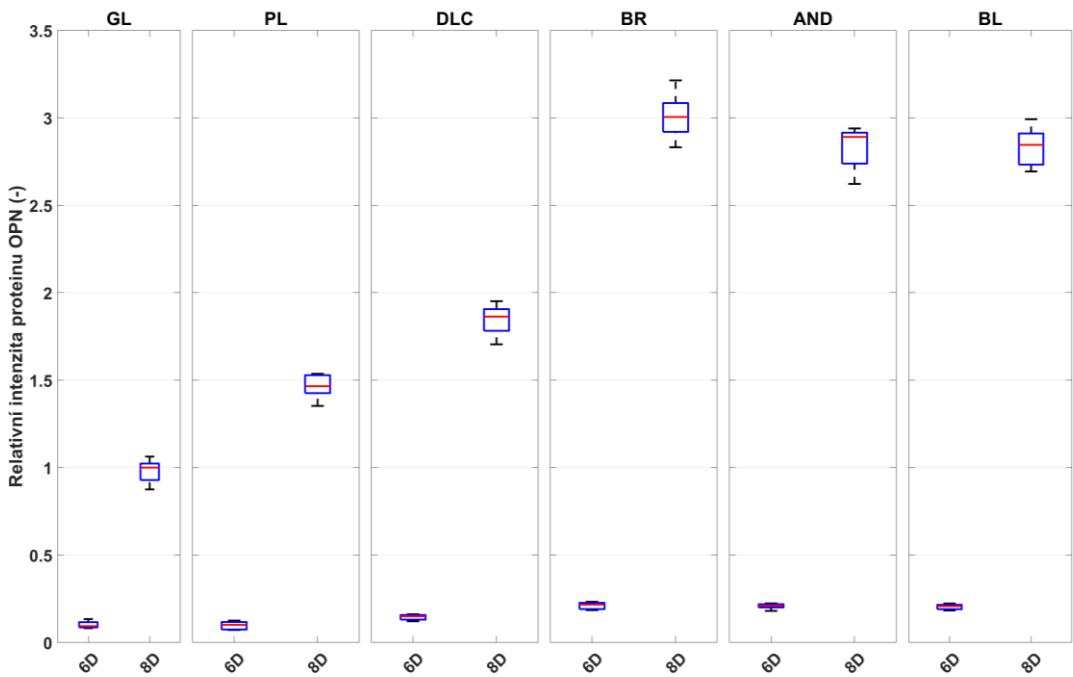
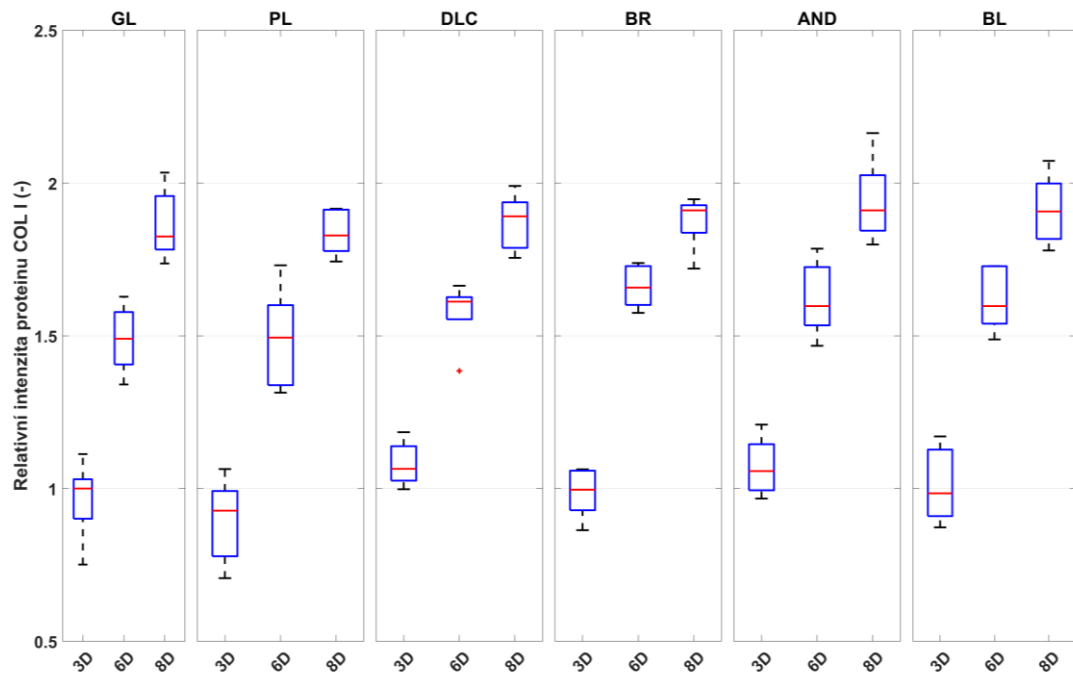
K potvrzení výsledků imunofluorescenčního barvení získaných vizuálně byla provedena i analýza exprese proteinů specifických pro osteogenní diferenciaci po 3., 6. a 8. dnu kultivace. Nejprve byla stanovena koncentrace proteinů v buněčném lyzátu Obrázek 16. Ta ukázala, že množství proteinu přibližně koreluje s drsností povrchu, ačkoliv hodnoty nejsou statisticky významné. U všech vzorků byl pozorován nárůst koncentrace od 3. do 8. dne kultivace, zvláště u skla, které zpočátku obsahovalo velmi málo proteinu.

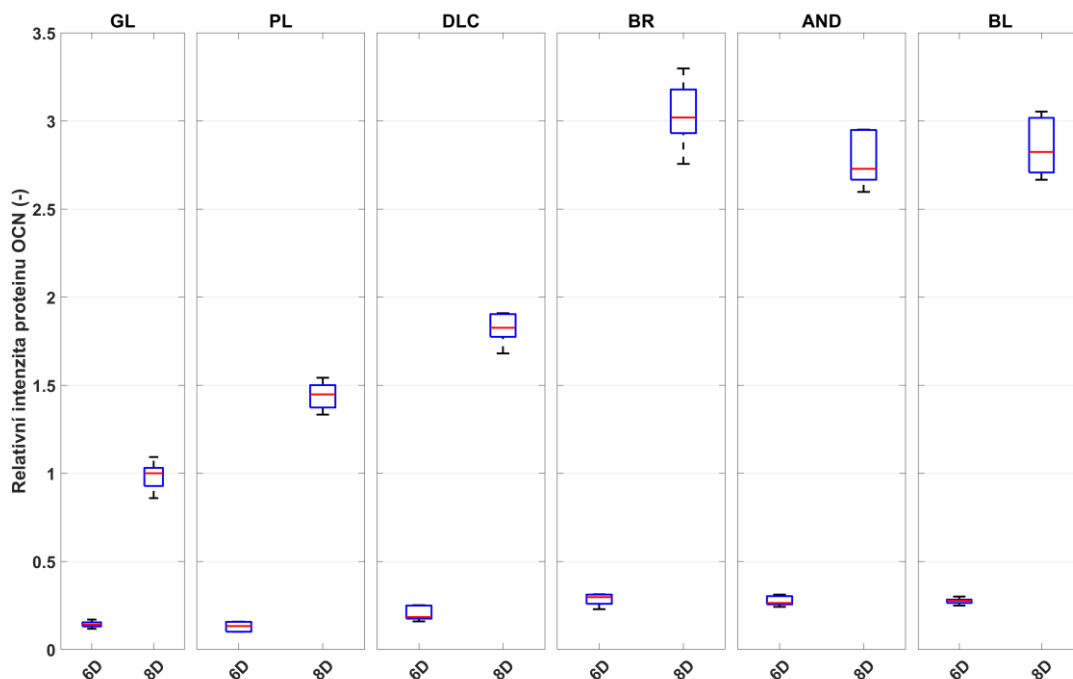


Obrázek 16. Naměřená koncentrace proteinů v buněčných lyzátech.

Dále měření intenzity proužků markerů (Obrázek 17) ukázalo korelaci ranných markerů ALP a RUNX2 s drsností testovaných povrchů, kdy intenzita rostla ve stejném pořadí $GL < PL < DLC < BR < AND < BL$. Intenzita střednědobého markeru COL I se statisticky na žádném povrchu nelišila. Pozdní markery OPN a OCN měly podobný trend jako RUNX2, kdy vyšších hodnot, statisticky významných, opět dosahovaly více drsné povrchy. Ani u jednoho markeru se však hodnota BR, AND a BL statisticky nelišila.



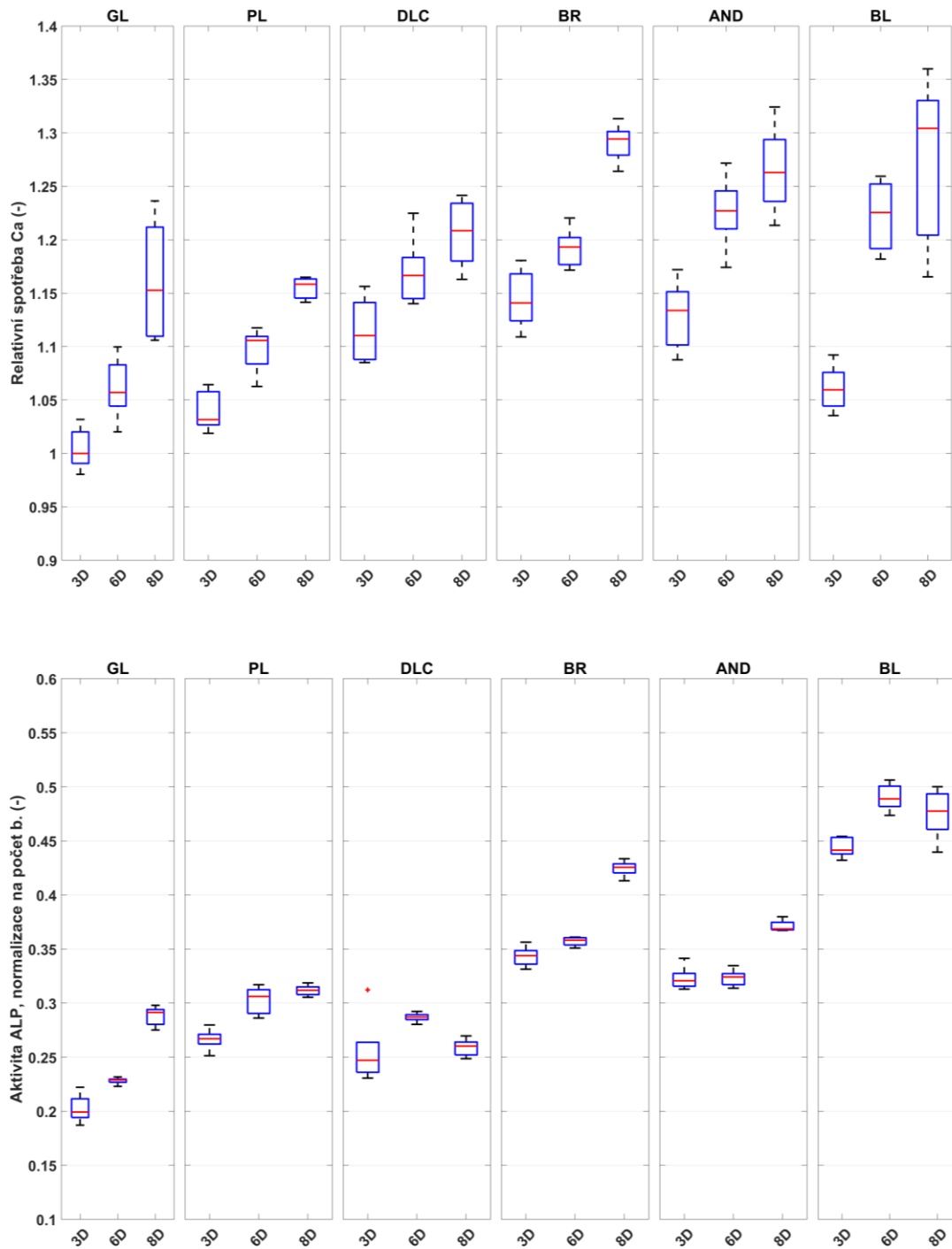




Obrázek 17. Relativní intenzita fluorescence markerů RUNX2, ALP, COL I, OPN a OCN po 3, 6 a 8 dnech kultivace na testovaných substrátech. Produkce všech markerů se zvyšuje od 3. do 8. dne; nejvyšší hodnoty, svědčící o největší osteogenní diferenciaci, jsou u vzorků BR, AND a BL. Hodnoty jsou normalizovány ku referenčnímu sklu 3. den kultivace.

5.2.5 Spotřeba kalcia a aktivita alkalické fosfatázy

Další analýza byla zaměřená na spotřebu kalcia buňkami, která koresponduje s diferenciací buněk směrem k osteoblastům. Lze konstatovat, že úbytek Ca v kulturačním médiu je přímo úměrný inkorporaci kalcia do buňkami nově vytvořené extracelulární hmoty (Obrázek 18 nahoře). Výsledky, normalizované ku počtu buněk, vykazují vzrůstající trend, kdy spotřeba kalcia se zvyšuje s drsností vzorku. Nejnižší úbytek kalcia byl pozorován u GL a PL vzorku, což koresponduje s relativně nízkou metabolickou aktivitou na tomto substrátu. Úbytek kalcia rostl u všech vzorků od 3. do 8. dne kultivace, tento nárůst byl nejvíce patrný u BL vzorku.



Obrázek 18. Nahoře: Spotřeba kalcia buňkami na testovaných substrátech, stanovená úbytkem kalcia v kultivačním médiu 3., 6. a 8. den kultivace. Dole: Aktivita alkalické fosfatázy buněk na všech vzorcích. Oba markery osteogenní diferenciace mají rostoucí trend od 3. do 8. dne kultivace, nejvyšší hodnoty byly naměřeny u AND a BL vzorku. Hodnoty jsou normalizovány ku počtu buněk.

Aktivita alkalické fosfatázy, normalizována k počtu buněk, ukázala rostoucí trend podobně jako úbytek kalcia v médiu (Obrázek 18 dole). Signifikantně nejvyšší aktivita byla změřena u BL vzorku, dále pak u BR a AND vzorku, které byly vzájemně srovnatelné. Nejnížší hodnota aktivity fosfatázy byla u referenčního skla, což

koresponduje s dalšími výsledky svědčícími o nízké osteogenní diferenciaci buněk u tohoto substrátu.

5.2.6 Shrnutí výsledků analýz po 8 dnech kultivace

Závěrečné shrnutí všech popsaných analýz po 8 dnech kultivace je uvedené v Tabulka 4. Drsnost a smáčivost povrchu materiálu, buněčná proliferace, metabolická aktivita a osteogenní diferenciaci, zastoupená osteogenními markery RUNX2, COL I a OPN, spotřebou kalcia a aktivitou ALP jsou srovnány a seřazeny od nejvyšší po nejnižší hodnotu. Je zjevné, že vyšší hodnoty drsnosti (v tabulce znázorněné teplými barvami) jsou v zásadě pozitivně korelovány s markery osteogenní diferenciaci. Naopak, s přihlédnutím ke zkráceným výsledkům vlivem sloupávání buněk, se stoupající drsností byla buněčná proliferace nižší.

Tabulka 4. Shrnutí výsledků analýz po 8 dnech kultivace. Data jsou seřazeny dle hodnoty od nejvyšší po nejnižší (vyšší hodnota znamená lepší proliferaci/osteogenní diferenciaci). Markery ALP a OCN nejsou zařazeny vzhledem k podobnému průběhu jako RUNX2 a OPN. Všechny hodnoty mimo drsnost a kontaktní úhel jsou bezrozměrné a normalizované ku sklu 3. den kultivace (mimo OPN, které je normalizované ku sklu 8. den kultivace). Vzorky jsou rozlišeny pomocí barvy dle následující legendy:

	GL	PL	DLC	BR	AND	BL				
	ROUGHNESS (nm)	CONTACT ANGLE (°)	CELL PROLIFERATION	METABOLIC ACTIVITY	OSTEOGENIC MARKERS			C _a CONSUMPTION	ALP ACTIVITY	
				RUNX2	COL I	OPN				
HIGHEST	200.3	74	2.68	1.78	15.35	1.62	2.82	1.71	0.54	
	67.4	65	1.47	1.37	12.60	1.59	2.54	1.69	0.40	
	58.6	63	1.42	1.13	12.02	1.49	2.51	1.63	0.37	
	22.4	61	1.41	1.09	10.60	1.42	1.75	1.44	0.36	
	13.3	60	1.20	1.07	8.35	1.40	1.52	1.33	0.28	
LOWEST	0.3	37	0.81	0.61	6.32	1.38	1.00	1.32	0.25	

5.3 Diskuze

Pro navazující experimenty s dynamickou kultivací s tlakovým namáháním byly substráty z Ti6Al4V s různou povrchovou modifikací otestovány z hlediska vlivu na adhezi, proliferaci a osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně (ASC). Byly použity modifikace substrátů, které se běžně

využívají v implantologii, tj. leštění (PL), broušení (BR), tryskání (BL), anodizace (AND) a pokrytí uhlíkem podobným diamantu (DLC). Cílem bylo vybrat povrch, na němž bude možné vytvořit kvalitní kulturu ranných osteoblastů pro výrobu komplexu titanového implantátu s kmenovými buňkami, jež vylepšuje biokompatibilitu a zvyšuje osteointegraci implantátu do kosti pacienta. Již bylo provedeno několik výzkumů, kdy bylo zjištěno, že osazení implantátu mezenchymálními kmenovými buňkami před samotnou implantací zlepšuje osteointegraci implantátu v animálních modelech – králíkovi i kryse, zvláště pokud jsou buňky předem diferencovány směrem k osteoblastům [125; 126].

Pro tento pokus byly použity mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně potkanů. Tento typ buněk není typicky používán pro osteogenní diferenciaci, ale několik studií potvrdilo značný potenciál těchto buněk k osteogenní i chondrogenní diferenciaci [160; 161]. Na jednu stranu mají ASC nižší potenciál k diferenciaci do osteoblastů než mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně, na druhou stranu lze izolovat velké množství ASC z tukové tkáně, jejichž odběr na rozdíl od buněk z kostní dřeně není bolestivý a nezvyšuje riziko úmrtí dárce [162].

Není mnoho studií, které by zkoumaly vliv titanových materiálů na adhezi, růst a osteogenní diferenciaci kmenových buněk, ještě méně studií je na implantaci těchto materiálů prekolonizovanými kmenovými buňkami směrem k osteoblastům. Vliv titanových substrátů na buňky je zkoumán zejména na osteoblastech, v liniích získávaných z kostních nádorů. V těchto studiích je zkoumána buněčná reakce na materiály definované drsností, smáčivostí a také krystalografickou orientací a hustotou náboje. Závěry této práce se shodují s několika závěry těchto studií [123; 163; 164]. Na základě počtu buněk, relativně ploché substráty s Ra od 0,3 do 20 nm byly optimální pro buněčnou adhezi a růst, nejvyšší počet buněk byl patrný na skle a DLC vzorku. Zajímavostí však je, že na jiném plochem vzorku – leštěném, počet buněk byl stagnující v průběhu celého experimentu. To lze vysvětlit náchylností buněk k odtržení od hladkých povrchů, což bylo právě nejvíce patrné na leštěných substrátech, vlivem nízké adheze buněk k substrátu. Tento jev byl také patrný na DLC i GL substrátu, zvláště při manipulaci se substráty (přendávání vzorků z jamek do barvicích misek apod.) a omývání puřem. Z tohoto důvodu jsou pro růst buněk vhodnější povrchy s drsností v desítkách nanometrů (60 – 70 nm), jak bylo patrné na BR, AND a BL vzorku, které měly počet buněk srovnatelný s DLC. Na těchto vzorcích byl nárůst buněk nejvíce patrný mezi dny 3 a 6, u AND a BR vzorku nárůst i lehce pokračoval do dne 8. Počet buněk na DLC vzorku měl tendenci klesat. U BL vzorku, vlivem submikronové (tj. stovky nm) drsnosti, počet buněk byl nižší než substrátech s drsností v desítkách nanometrů. Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi, kdy drsnost materiálu v desítkách nanometrů je považována za nejvíce podobnou přirozené kostní tkáni [165].

Dalším parametrem ovlivňujícím interakce buňky a materiálu je smáčivost povrchu materiálu. Tento faktor je úzce spjat s drsností povrchu, avšak i další vlastnosti mohou ovlivnit hydrofilnost materiálu, zejména chemické složení. Povrchová drsnost materiálů má však větší vliv na adhezi a proliferaci buněk než chemické složení materiálů [164]. Smáčivost měřených vzorků se pohybovala mezi 60° a 75° mimo DLC povrch, který měl smáčivost pouze 38°. Mnoho studií popsalo smáčivost jako faktor přispívající adhezi a proliferaci buněk. Tento jev má být způsoben adsorpcí vazebných proteinů vitronectinu a fibronectinu pocházejících ze séra kultivačního média, které se nacházejí ve vhodné flexibilní konformaci, takže jsou rozpoznatelné pro receptory buněk a mohou být dále remodelovány. V případě hydrofobního povrchu však oba vazebné proteiny jsou adsorbovány v rigidní, denaturované, formě a vazba k buňkám je tak omezena [166; 167]. Avšak výsledky ukázaly, že nízká hodnota smáčivosti DLC povrchu má negativní vliv na adhezi, proliferaci i osteogenní diferenciaci kultury ASC. K podobným závěrům došli i v jiných studiích zaměřených na buněčnou adhezi na materiály s různou úrovní smáčivosti. Ve studii adheze na plazmou ošetřených substrátech z hexamethyldisiloxanu se smáčivostí od 0° do 100° byla nejvyšší adheze preosteoblastů myši MC3T3-E1 dosažena u vzorků se smáčivostí 60° až 80° [168]. Příliš vysoká smáčivost totiž způsobuje sníženou adsorpci vazebných proteinů ze séra kultivačního média k vazebným receptorům buněk [169]. Buněčná adheze je tedy optimální na středně smáčivých substrátech, jak je patrné z výsledku experimentu. Na DLC substrátech docházelo též k odtrhávání buněčné kultury z povrchu, avšak ne v takové míře, jako u PL povrchu. Odtrhávání buněčné kultury tak bude spíše způsobeno nízkou drsností povrchu než vysokou smáčivostí.

Dále byl sledován vliv drsnosti a smáčivosti materiálu na metabolickou aktivitu buněk, která byla přepočtena na 1 buňku. Ačkoliv tedy kontrolní skleněný substrát vykazoval původně relativně vysokou metabolickou aktivitu, vlivem velkého počtu buněk na vzorcích je výsledná aktivita velmi malá. Naopak nejvyšší hodnoty byly naměřené na PL vzorcích, což je však způsobeno odlupováním buněk z jejich povrchu a výsledná metabolická aktivita je tak nereálná.

Na ostatních vzorcích, DLC, BR, BL a AND, byla metabolická aktivita i počet buněk relativně srovnatelné. Mezi 6. a 8. dnem, kdy se počet buněk příliš nezvyšoval, metabolická aktivita výrazně stoupla. To svědčí o vysoké aktivitě vlivem osteogenní diferenciaci, která byla dokázána i jinými analýzami, zejména nárůstem intenzity střednědobého markeru osteopontinu mezi 6. a 8. dnem kultivace, zvláště u BR substrátu. Další markery osteogenní diferenciaci (RUNX2, COL I, ALP, OPN, OCN, spotřeba Ca a aktivita ALP) rostly rovnoměrněji od 3. do 8. dne kultivace. Všechny tyto markery jsou pozitivně korelovány s drsností materiálu. Nejvyšší hodnoty byly obvykle u vzorků BR, BL a AND, tedy vzorků s nejvyšší drsností, zatímco hodnoty u ostatních vzorků (PL a

DLC, včetně kontrolního skla (GL)) byly výrazně nižší. To je v souladu s dalšími autory, kdy drsnost v řádu submikronů a mikronů, tj. od stovek nm výše, jsou považovány za vhodné pro osteogenní diferenciaci, ale méně podporující buněčnou proliferaci [170-172]. Pokles proliferace buněk může být i tak velký, že není možné vytvořit dostatek buněčné hmoty v okolí implantátu [170]. To je většinou způsobené tím, že nepravidelnosti na povrchu materiálu snižují mezibuněčný kontakt nutný pro růst a dělení buněk [170]. Tento jev nenastal ani u BL vzorku, který měl nejvyšší drsnost, na základě fluorescenčních snímků jader a cytoskeletu, kde je kultura konfluentní (Obrázek 14).

V souhrnu, všechny testované povrchy byly vůči buňkám netoxické, podporující adhezi, proliferaci i osteogenní diferenciaci buněk. Buněčná proliferace byla nejvyšší u relativně hladkých povrchů s drsností Ra v rozmezí desetin nm až do jednotek nm, tj. u GL, PL a DLC. Avšak tyto povrchy byly také náchylné k odtrhávání buněčné kultury vlivem slabých adhezních sil, naměřené počty buněk tak byly často menší, což zkreslilo další výsledky. Nízký počet buněk byl relativně i na BL povrchu s drsností v řádech stovek nm. U BR a AND povrchu (Ra desítky nm) byl počet vyšší, ale nedosahoval počtů buněk na hladkých substrátech. Na těchto površích však buňky vykazovaly vysoký počet markerů osteogenní diferenciaci, zejména produkci střednědobého markeru osteopontinu. Na základě těchto výsledků tak anodizace a kartáčování povrchu se zdá jako vhodná úprava materiálu Ti6Al4V pro osazení substrátu buňkami před implantací do pacienta.

V závěru je nutné ještě zmínit několik nedostatků v této studii. Experimenty trvaly po dobu pouhých 8 dní, přitom osteogeneze trvá i několik týdnů. Při krátkodobé kultivaci lze pozorovat pouze rané a střednědobé markery osteogeneze (osteocalcin, osteopontin). Dlouhodobá kultivace je těžko dosažitelná klasickými metodami statické kultivace, kdy buňky rychle proliferují a relativně brzy dosahují konfluency. Po krátké stacionární fázi pak dochází k buněčné apoptóze, pokud nedojde k zásahu do experimentu a např. k pasážování. Východiskem je nasazení kultury do trojdimenzionálního nosiče v dynamickém kultivačním systému, který simuluje podmínky a prostředí podobné *in vivo*. Společně s biochemickými podněty z kultivačního média tak dochází k pozvolné diferenciaci buněk k danému fenotypu.

5.4 Závěr

Tato část dizertační práce byla zaměřena na testování vlivu vlastností Ti6Al4V substrátů s různými povrchovými úpravami, užívanými v implantologické praxi, na adhezi, růst a diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně (ASC). Cílem bylo vybrat povrch, jenž bude vhodný pro prekolonizaci implantátu kulturou raných osteoblastů za účelem zlepšení osteointegrace implantátu. Jako modelové

povrchy byly vybrány substráty z materiálu Ti6Al4V s následujícími povrchovými úpravami: leštění (PL), tryskání (BL), anodizace (AND), kartáčování (BR) a pokrytí uhlíkem podobným diamantu (DLC). Jako kontrolní materiál byla použita podložní skla (GL). Základní vlastnosti materiálu (drsnot, smáčivost) byly korelovány s růstem a diferenciací ASC po 3, 6 a 8 dnech kultivace v osteogenním diferenciačním médiu. Na materiálech s relativně nízkou drsnotí (Ra od desetin nm do 1-2 desítek nm), tj. GL, PL a DLC povrchu byla vysoká adheze i proliferace buněk, avšak při nepatrném otřesu a také při manipulaci se vzorky se buněčná kultura odtrhávala od substrátu. Materiály s vyšší drsnotí (60 – 70 nm), tj. BR a AND, stále měly relativně vysokou proliferaci buněk, navíc vykazovaly mnohem více markerů osteogenní diferenciaci než předchozí skupiny. Vzorky v submikronové úrovni (stovky nm), tj. BL, vykazovaly nižší proliferaci než předchozí dvě skupiny, ale úroveň buněčné diferenciaci byla nejvyšší ze všech skupin ve většině sledovaných markerů. Všechny vzorky, mimo DLC, měly střední hodnotu smáčivosti 60-80°. Pouze DLC povrch dosahoval vyšší hydrofilicity, kdy kontaktní úhel dosahoval pouze 38°. Nebyla však prokázána závislost smáčivosti na růstu buněk. Lze tak stanovit, že anodizovaný a kartáčovaný povrch mají největší potenciál pro následné osazení a diferenciaci kmenových buněk za účelem prekolonizace implantátů před implantací do kosti. Pro následné pokusy s dynamickou kultivací byl proto vybrán anodizovaný povrch.

6 Dynamická kultivace buněk na titanových maticích

Pro vývoj kvalitní kultury raných osteoblastů jsou nutné dynamické podmínky kultivace, simulující přirozené prostředí lidského organismu. Bylo provedeno již mnoho studií na sledování důsledků mechanického zatěžování kostních buněk, a to s využitím zejména smykového napětí a hydrostatického tlaku. Většina těchto studií však zkoumala buněčné kultury na planárních substrátech. Pro lepší porozumění je ale nutné sledovat buněčnou odezvu ve 3D prostředí, v nosiči, který lépe simuluje fyziologické prostředí. Jedině tak lze dosáhnout poznání o chování buněk při mechanické zátěži a využít tyto znalosti při léčbě kostních defektů, a i pro další vývoj na poli tkáňového inženýrství.

Pro vývoj osteoblastů se nejčastěji využívají nosiče na bázi hydroxyapatitu [154], titanových sítí [173], hydrogelů [174] a kostních (trabekulárních) nosičů izolovaných z pokusných zvířat [175]. Jako hydrogely jsou označovány hydrofilní sítě polymerních řetězců, které bobtnají s vodou. Využívají se jak přírodní, tak syntetické polymery. Výhodou syntetických polymerů je kontrolovatelnost výroby, a tedy i vlastností polymerů, jako je degradabilita nebo mechanické vlastnosti [174]. Mezi nejčastěji používané syntetické polymery pro biomedicínské aplikace patří polyethylenglycol (PEG), polyhydroxyetyl metakrylát (polyHEMA) a polyvinylalkohol (PVA). Syntetické polymery se více využívají pro jiné aplikace, např. výrobu kontaktních čoček než pro buněčné scaffoldy. Jejich nevýhodou je přítomnost toxických reziduí po výrobě, která ovlivňuje proliferaci kmenových buněk a může způsobit i jejich apoptózu. Většina syntetických polymerů také není schopna degradovat v organismu [176].

Přírodní polymery jsou tvořeny přirozeně se vyskytujícími polymery, jsou bioaktivní, tedy podporují adhezi a růst buněk. Jejich nevýhodou je však špatná kontrolovatelnost polymerace, a tak i nestálé mechanické vlastnosti. Jsou však dobře biologicky odbouratelné a velmi biokompatibilní [177]. Přírodní polymery lze získat jak z živočichů, tak rostlin. Do první skupiny patří zejména kolagen, hyaluronát, glykosaminoglykan, fibrin a chitosan. Nejčastěji používaným rostlinným polymerem je pak alginát izolovaný z hnědých mořských řas. Nejčastěji se využívají hydrogely na bázi kolagenu, neboť jde o látku vyskytující se v extracelulární hmotě všech typů tkání (kůže, kosti, šlachy, bazální membrány apod.). V závislosti na pH rozpouštědla vykazují kolagenové hydrogely různé reologické vlastnosti [178].

Fibrinové hydrogely jsou založeny na reakci fibrinogenu s trombinem, která je přítomná v koagulační kaskádě při hojení ran. Katalytickým působením trombinu dochází k odštěpení několika peptidů z fibrinogenu a vzniká fibrin, který polymerizuje za vzniku

fibrinové sítě [179]. Fibrinové gely jsou viskoelastické polymery, přičemž převažují elastické vlastnosti gelu (pružnost) nad viskózními (plasticita). Při vyšších rychlostech deformace (vyšší frekvence mechanického namáhání) se zvyšuje viskózní charakteristika gelu [180].

Elastické vlastnosti fibrinových gelů jsou však nelineární. Jde o přirozenou vlastnost biologických hydrogelů, nazývanou anglickým výrazem „strain hardening“, kdy modul pružnosti gelu při vyšších deformacích rapidně roste [180]. Tato vlastnost se projevuje i při zatěžování fibrinových gelů tlakem, kdy gel se nejprve mírně změkčuje a následně prudce tuhne [180].

Změnou poměrů koncentrací fibrinu a trombinu lze vytvořit gel s variabilními reologickými vlastnostmi. Fibrinové gely jsou tak vhodným hydrogelem pro vytvoření prostředí simulujícího jak měkké (kůže, svalovina), tak tvrdé tkáně (šlachy, kost). Na základě dostupné literatury byly voleny fibrinové gely o koncentraci fibrinu 1 a 5 mg/ml, se složkami v poměru 1:0,8 ve prospěch fibrinogenu, které by měly mít reologické vlastnosti odpovídající podmínkám pro vývoj osteoblastů [181].

6.1 Metody

V kapitole jsou popsány metody přípravy fibrinových gelů s buňkami, metodika buněčných experimentů a provedené analýzy, které se často odkazují na předchozí kapitolu, kde je uveden celý popis metody.

Pozn. Výsledky z této kapitoly jsou součástí plánovaného článku autora: The colonization of Ti6Al4V substrates by stem cells under dynamic conditions.

6.1.1 Příprava buněčných suspenzí v hydrogelech a parametry dynamické kultivace

Buněčné experimenty probíhaly v navržených komorách s využitím obou systémů pro tlakovou stimulaci. Vlastní vývoj buněk probíhal jak na samotných titanových substrátech (dále označováno jako 2D vzorky), tak byly buňky nasazeny v nosičích z fibrinových gelů, neboť pro buňky, zvláště osteoblasty, je přirozenější vývoj v trojdimenzionálním prostředí. Tyto přírodní polymery byly připraveny reakcí fibrinu a trombinu, které tvoří jeden ze stupňů koagulační kaskády. Pro pokusy byly zvoleny anodicky barvené titanové substráty, které dle výsledků uvedených v kapitole 5 nejvíce podporují osteogenní diferenciaci. Pro sledování buněk v reálném čase světelným mikroskopem s fázovým kontrastem byly také použity jako substráty podložní skla.

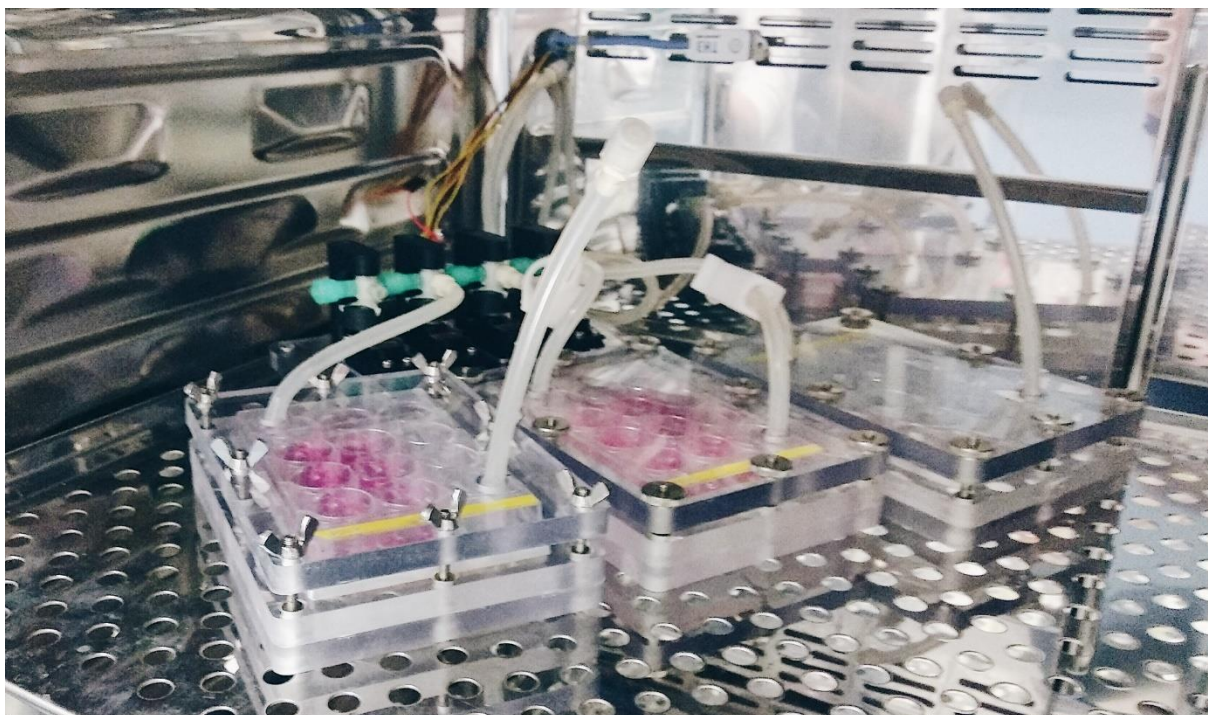
Pro vytvoření gelového podpůrné struktury (scaffoldu) bylo využito tkáňové lepidlo Tisseel Lyo (Baxter, USA). Lyofilizované prášky fibrinu a trombinu byly rozmíchány do

roztoků dle návodu výrobce, avšak bez přidání aprotininu, který zabraňuje buňkám metabolizovat gel a přetvářet ho na vlastní extracelulární matrix. Koncentrace pracovních roztoků byly 91 mg/ml v případě fibrinogenu a 100 IU/ml v případě trombinu.

Pro buněčné experimenty byly použité mezenchymální kmenové buňky izolované z tuku potkana, jež byly izolovány dle postupu popsáném v kapitole 5.1.2. Buňky použité pro experimenty se nacházely v 2.-3. pasáži. Pro rozpěstování buněk bylo použito růstové médium, skládající se z média DMEM s nízkou koncentrací glukózy (1 g/l, Dulbecco's Modified Eagle Medium) a Hamova F-12 média v poměru 1:1, které bylo obohaceno o fetální bovinní sérum (FBS; 10% v/v), 10 ng/ml FGF2 a 1 % (v/v) antibiotiky ABAM (100 IU/mL penicilinu, 100 µg/mL streptomycinu, and 0.25 µg/mL amphotericinu B; vše Sigma-Aldrich, MO, USA). Při pokusech s dynamickou kultivací bylo použito diferenciační médium DMEM s nízkou koncentrací glukózy 1 g/l, obohacené o 10 % FBS, 1 % ABAM, 50 µg/ml kyseliny askorbové, 100 nM dexamethasonu a 10 mM β-glycerolfosfátu. Část vzorků byla za účelem dalších analýz závislých na zbarvení hydrogelů kultivována v bezbarvém diferenciačním médiu DMEM, které bylo za tímto účelem připraveno bez přidání fenolové červeni. Médium bylo připraveno z prášku (D5030, Sigma-Aldrich), po rozmíchání byly přidány následující látky dle doporučení výrobce: hydrogenuhličitan sodný (3,7 g/l), L-glutamin (0,584 g/l), glukóza (1 g/l) a sodium pyruvát (0,11 g/l).

Byly připraveny buněčné gelové suspenze o koncentraci fibrinu 1 a 5 mg/ml, které byly připraveny následujícím způsobem: do buněčné suspenze v osteogenním kultivačním médiu o koncentraci buněk 1 mil. b./ml byl přidán koncentrovaný roztok fibrinu pro vytvoření požadované koncentrace 1 nebo 5 mg/ml. 0,6 ml této směsi bylo nasazeno do kultivačních jamek 24jamkové kultivační desky na sterilní titanové substráty/podložní skla, výsledná výška gelu s buňkami pak byla 3 mm. Nakonec byl do směsi přidán trombin do finální koncentrace 0,8 UI/ml nebo 4 UI/ml, který způsobil polymerizaci gelu. Gel byl ponechán 45 minut v laboratorním inkubátoru k úplnému vytuhnutí, poté bylo do jamky přidáno 0,8 ml osteogenního kultivačního média. Zároveň byly nasazeny buňky (30 000/cm²) na 2D vzorky bez gelů, na titanové substráty a na krycí skla.

Vzorky byly kultivovány v dynamickém systému po dobu 7 dní, kdy po 3 a 5 dnech kultivace bylo vyměněno u všech vzorků médium za čerstvé. Pro kontrolu byly všechny vzorky nasazeny duplicitně a polovina z nich byla kultivována staticky. Buňky byly stimulovány cyklickým tlakovým namáháním 0/40 kPa s frekvencí 0,5 Hz po dobu jedné hodiny denně (fotografie experimentální soustavy viz Obrázek 19). Následně byla část vzorků fixována a nabarvena jádra a cytoskelet. U 2D vzorků byly nabarveny osteogenní diferenciační markery ALP a COL I. Část vzorků byla „zlyzována“ pro kvantitativní analýzu diferenciačních markerů metodou Western blot.



Obrázek 19. Experimentální sestava s kultivačními komorami v laboratorním inkubátoru.

6.1.2 Imunofluorescenční barvení

Bylo provedeno imunofluorescenční barvení buněk za účelem vizualizace buněčných jader, cytoskeletu a raných markerů osteogeneze. Rané markery zahrnují kolagen typu I (COL I), důležitý protein kostní extracelulární hmoty (ECM) a alkalickou fosfatázu (ALP), enzym zásadní pro mineralizaci tkáně.

Imunofluorescenční barvení bylo provedeno po 7 dnech kultivace. Buňky na 2D vzorcích i v gelech byly zafixovány pomocí 4% roztoku paraformaldehydu (Sigma-Aldrich, MO, USA) po dobu 20 min (2D), resp. 1 hod (3D) při pokojové teplotě. Poté byly buněčné membrány permeabilizované pomocí 0,1% roztoku Triton X-100 v PBS po dobu 15 min (2D), resp. 45 min (3D) při pokojové teplotě. Za účelem blokování nespecifických vazebných míst pro protilátky, vzorky byly vystaveny po dobu 1 hod. (2D), resp. 2 hod. (3D) roztoku s následujícím složením: PBS + 0,1% Tween 20, 1% albuminu z bovinního séra, 22,52 mg/ml glycinu. Poté byly na 2D vzorky aplikovány primární monoklonální protilátky z myši, konkrétně COL1A1 Antibody (sc-293182, 0.4 $\mu\text{g/ml}$) a ALP Antibody (sc-271431, 0.8 $\mu\text{g/ml}$); všechny byly zakoupeny z firmy Santa Cruz Biotechnology, TX, USA. Protilátky byly aplikovány přes noc při 4°C. Společně s primárními látkami byl aplikován phalloidin konjugovaný s tetramethylrhodaminem (TRITC), barvicí F-aktinová vlákna cytoskeletu (Sigma-Aldrich, Cat. No. P1951, 2 $\mu\text{g/ml}$). Jako sekundární protilátka byla použita Alexa Fluor 488®-conjugated F(ab') fragment of goat anti-mouse IgG (H1L, Cat. No. A11017; v PBS + 1% BSA, 1 $\mu\text{g/ml}$) při pokojové teplotě po dobu 180 min. Negativní kontroly byly nabarveny stejným způsobem, ale bez sekundární

protilátky. Nakonec byly vzorky přilepeny na tenká krycí skla fixačním gelem s DAPI, barvivem jader (F6057, Sigma-Aldrich, USA).

Na 3D vzorky byly aplikovány protilátky phalloidin s konjugovaným tetramethylrhodaminem (TRITC), barvicí F-aktinová vlákna cytoskeletu, a DAPI (D9542, Sigma-Aldrich, 0,2 µg/ml). Vzhledem k nespecifičnosti barvení markerů osteogeneze nebyla tato analýza provedena.

Buňky byly poté vizualizovány v inverzním fluorescenčním mikroskopu DMi8 (Leica, DE) a konfokálním mikroskopu LSM 880 NLO (Carl Zeiss, DE). Byly vybrány obrázky náhodných mikroskopických polí.

6.1.3 Stanovení počtu buněk, metabolické aktivity

Tato metoda je popsána v odstavci 5.1.4.

6.1.4 Stanovení koncentrace kalcia a aktivity alkalické fosfatázy

Tato metoda je popsána v odstavci 5.1.5 a 5.1.7.

6.1.5 Analýza osteogenních diferenciačních markerů

Za účelem kvantitativní analýzy markerů osteogenní diferenciace byla provedena gelová elektroforéza buněčných lysátů a specifické proteiny byly detekovány metodou Western blot. Po 7 dnech kultivace byly připraveny lysáty 2D i 3D vzorků dle následujícího postupu (kultivační desky se vzorky byly po celou dobu umístěny na ledu pro zabránění denaturace proteinů):

- Odebrání média, 3x oplach vzorků ledovým PBS
- Přenos gelů s buňkami do mikrozkušavek
- Přidání RIPA pufru (4°C) s inhibítozem proteázy (100:1) – 20 µl 2D vzorky, 50 µl 3D vzorky
- Seškrábnutí buněčné kultury pomocí škrabky (2D), sonifikace gelu a buněk po dobu 30 s (3D)
- Přenos lysátů 2D vzorků do mikrozkušavek, ponechání všech mikrozkušavek v ledu po dobu 30 min
- Centrifugace: 14 000 G, 15 min, 4 °C
- Pro další analýzy byly vzorky uchovávány při -20 °C

Ve vzorcích bylo stanoveno množství proteinu kolorimetrickou metodou (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 23225, Thermo Fisher Scientific). Absorbance vzorků byla

měřena při 562 nm. Stanovení množství proteinu bylo měřeno ze 4 vzorků od každé skupiny.

Gelová elektroforéza a přenos na membránu byly realizovány dle postupu uvedeného v kapitole 5.1.6.

6.1.6 Statistická analýza

Výsledky jsou vyjádřeny pomocí boxplotů, kde jsou znázorněny mediány (červená čára), 1. a 3. kvartil (hranice boxu) a minima a maxima pomocí fousů, příp. červenými body i odlehlé hodnoty. Pro každý experiment byly použity buňky izolované z jednoho zvířete, celkem byly provedeny dva experimenty. Statistická signifikance byla stanovena pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu. Výsledky byly považovány za signifikantní při $p \leq 0,05$.

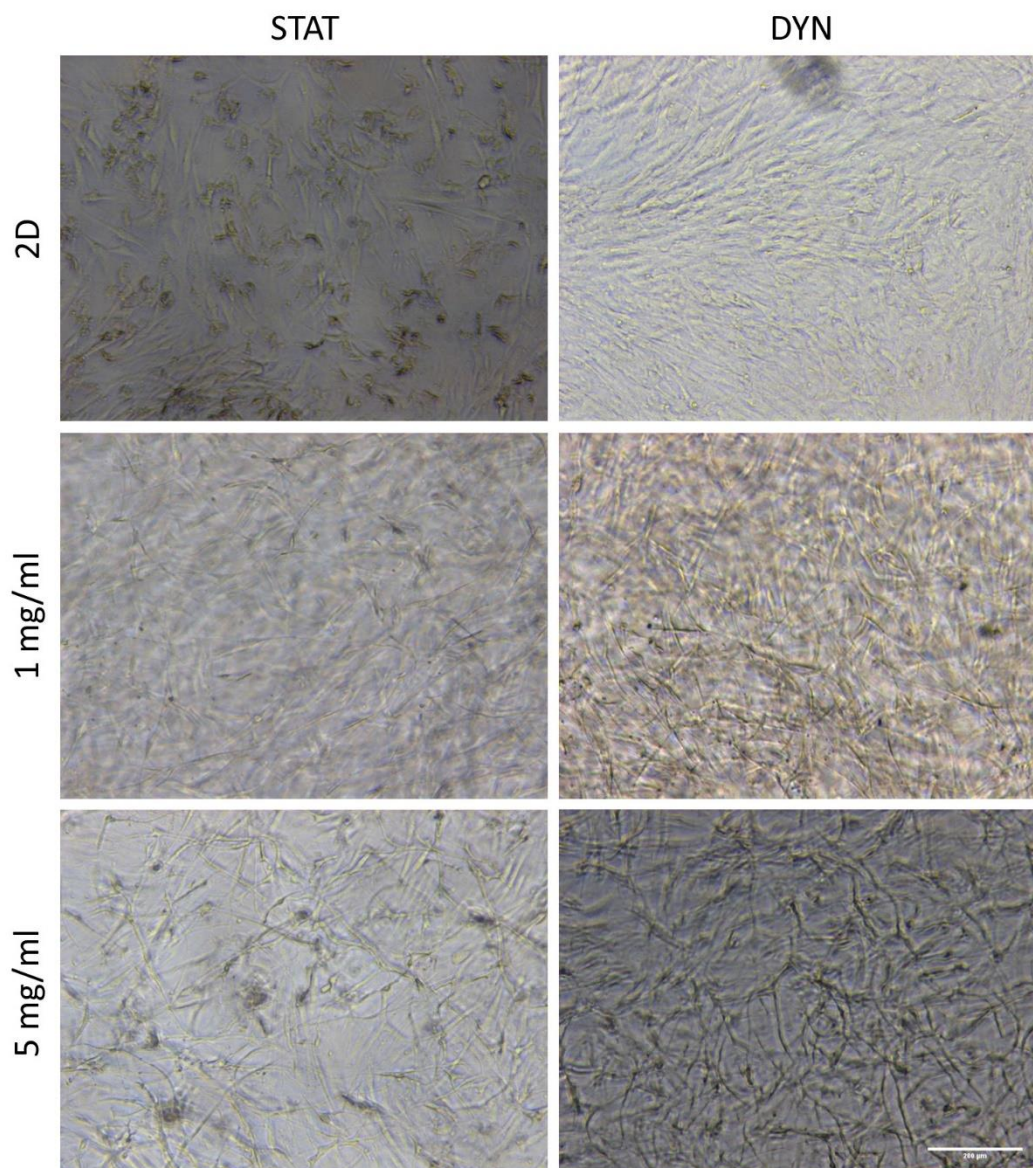
6.2 Výsledky

Bylo hodnoceno 6 skupin vzorků – buňky ve fibrinových gelech o koncentraci fibrinu 1 a 5 mg/ml a na anodizovaném Ti6Al4V substrátu bez gelu, při statických a dynamických podmínkách. Vzorky mají následující označení: F1S, F1D, F5S, F5D a 2DS a 2DD, kdy F1 značí fibrinový gel s koncentrací 1 mg/ml, F5 značí 5 mg/ml, 2D jsou vzorky bez gelu; poslední písmenko S značí statickou kulturu, D dynamickou.

Vzhledem k odlišným podmínkám kultivace jsou vždy 2D i 3D vzorky hodnoceny zvlášť, příp. jsou srovnány pouze relativní hodnoty, kdy 2D vzorky jsou normalizovány vůči vzorku 2DS, 3D vůči vzorku F1S. Pro vyšší přehlednost je signifikance mezi jednotlivými vzorky všech grafů vyjádřena v tabulkách v příloze B.

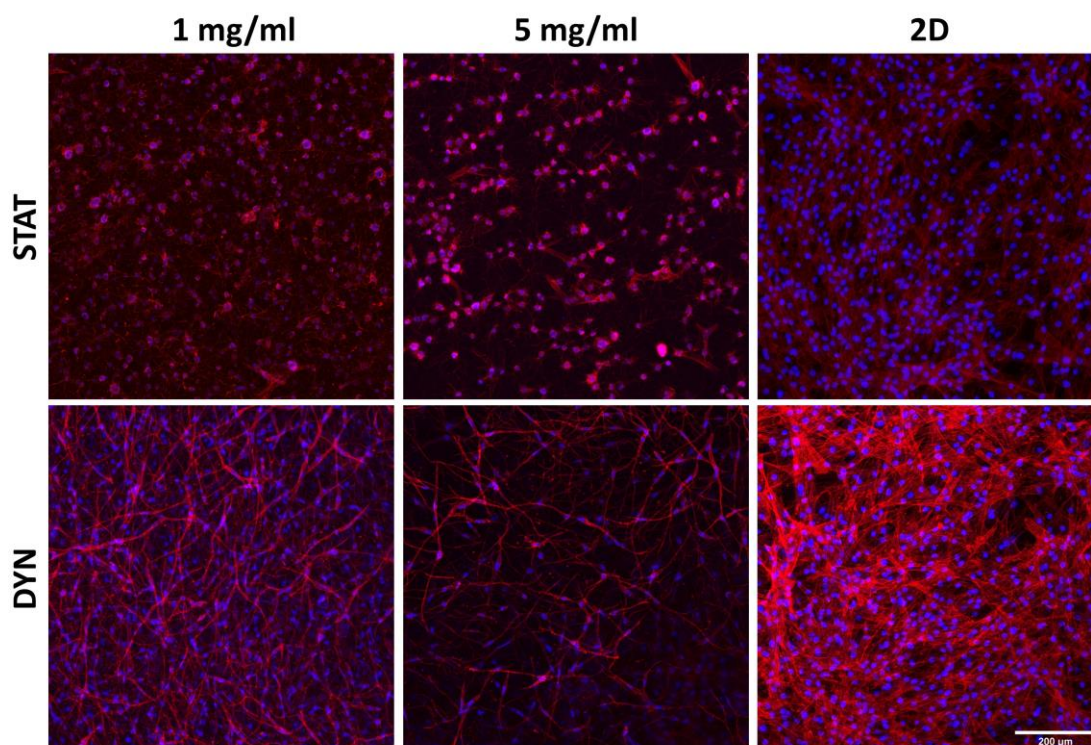
6.2.1 Morfologie a počet buněk, metabolická aktivita

Morfologie buněk je patrná již ze snímků v režimu světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Obrázek 20), kdy byly kultury pěstovány na skleněných substrátech. U 2D vzorků i obou gelů jsou buňky ve statické kultuře v menší hustotě, méně rozprostřené a protáhlé. Naopak buňky v dynamické kultuře mají protáhlý tvar, zaplétají se do sebe a vytváří komunikační kanály. Již po 7 dnech kultura vytváří základ tkáně.

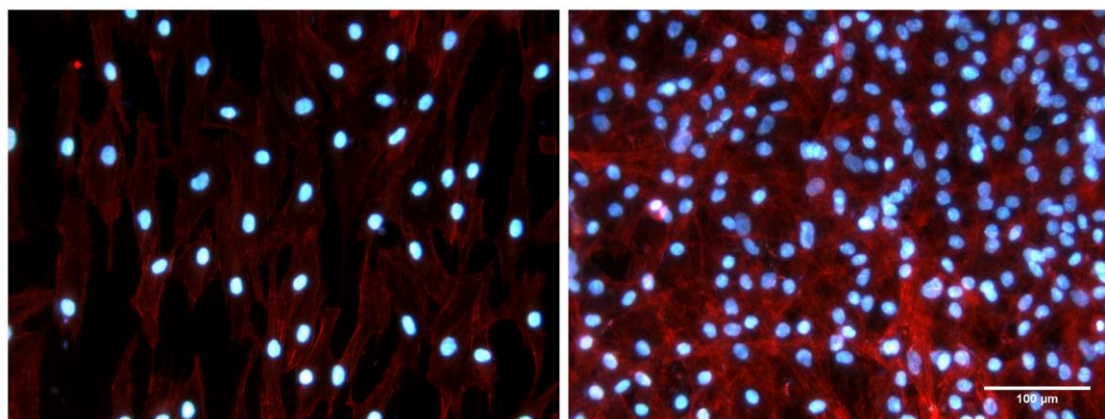


Obrázek 20. Srovnání morfologie buněk statické a dynamické kultury na skleněném substrátu (2D) a na titanovém substrátu s fibrinovým gelem o koncentracích 1 a 5 mg/ml. V dynamické kultuře jsou buňky protáhlejší a orientované, jejich hustota je vyšší. Je patrný nižší počet buněk u tužšího gelu.

Tento jev je ještě více patrný na fluorescenčních snímcích. Obrázek 21 znázorňuje buňky s nabarvenými jádry (modře) a cytoskeletem. Je patrné, že míra proliferace u méně hustého gelu je mnohem vyšší, než u gelu s 5mg fibrinu na ml. U dynamické kultury na 2D vzorku se buňky překrývají a kultura je tak celkově hustší. To je ještě více patrné na detailu kultury (Obrázek 22), kde buňky ve statické kultuře tvoří tzv. morfologii kočičích hlav – dlaždicová morfologie, tedy buňky rostou převážně izolovaně, tvoří pouze malé výběžky.

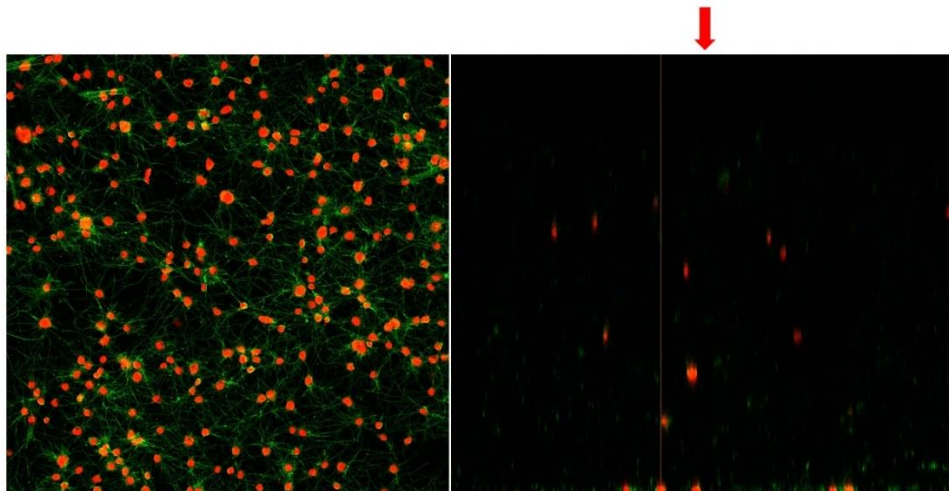


Obrázek 21. Buněčná morfolgie ve statické a dynamické kultuře (modře jádra, červeně cytoskelet). Buňky v dynamických kulturách jsou protáhlé, vytvářejí spleť síť, buňky ve statické kultuře jsou spíše izolované, kulatého tvaru s malými výběžky. S rostoucí hustotou gelu klesá počet buněk.

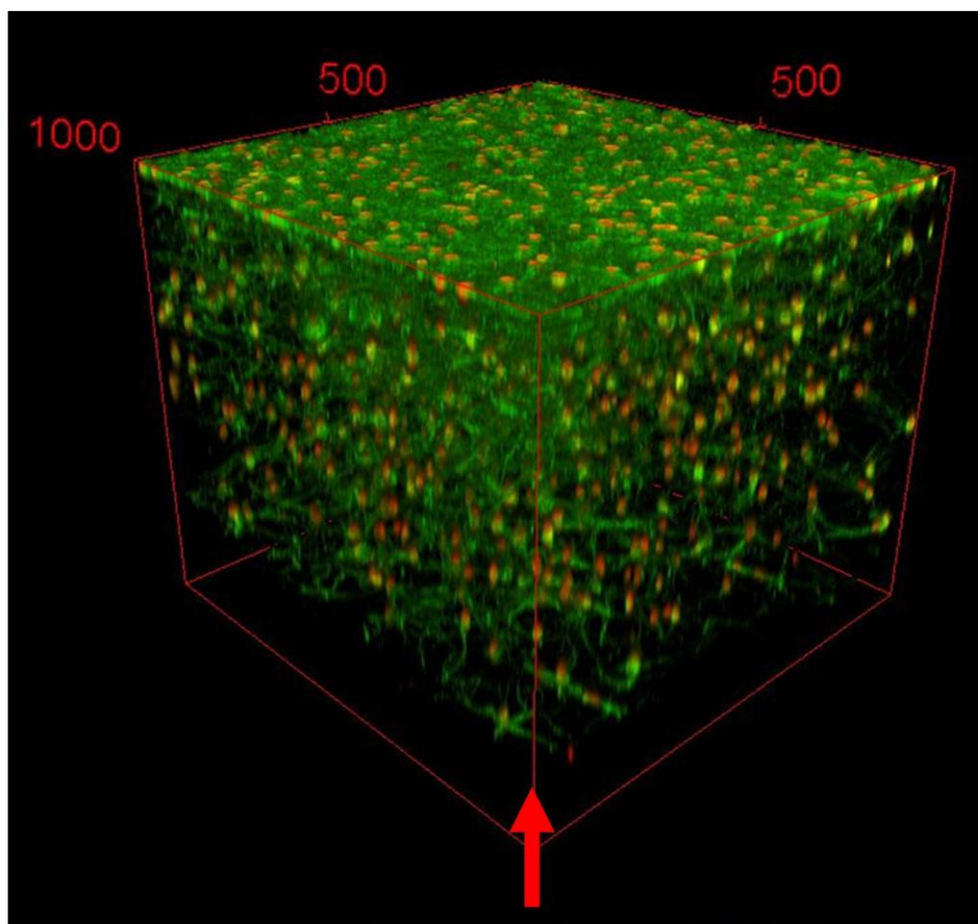


Obrázek 22. Detail 2D kultury na fluorescenčním mikroskopu – vlevo statická, vpravo dynamická. Buňky ve statické kultuře jsou hodně izolované, mají tzv. morfologii kočičích hlav. Buňky v dynamické kultuře jsou hodně propletené, komunikující, vytvářející budoucí tkáň.

3D vzorky byly také nasnímány na konfokálním mikroskopu k hodnocení orientace buněk. Ta ukázala orientaci buněk F5D vzorku paralelně se siločarami tlakového namáhání, jak je patrné v řezu na Obrázek 23 a také v 3D projekci buněčné kultury na Obrázek 24. U ostatních kultur 3D vzorků orientace patrná nebyla.

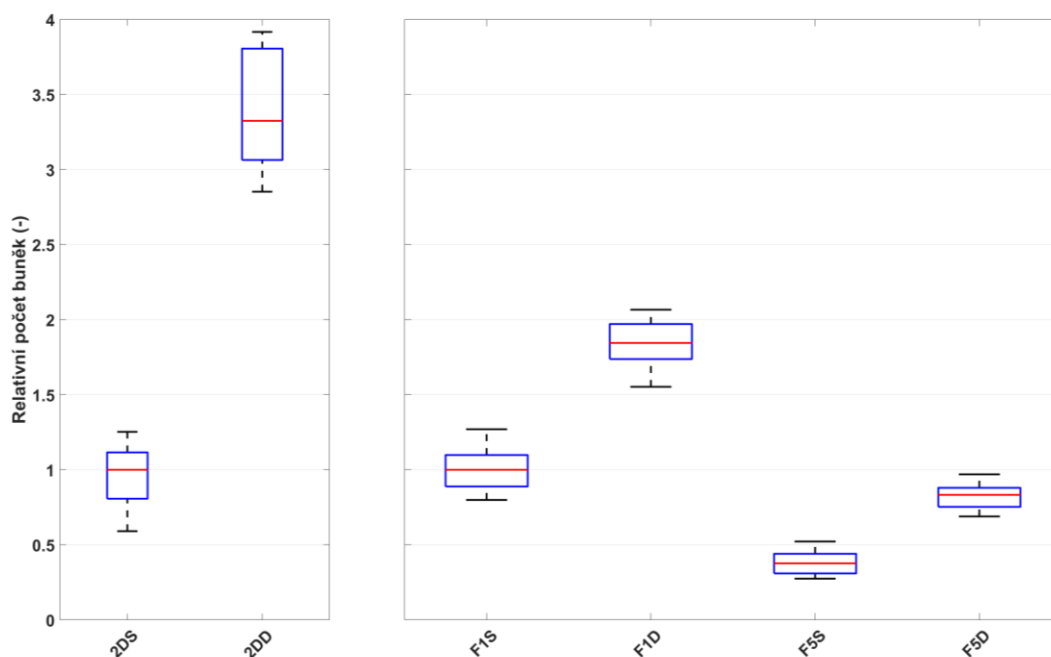


Obrázek 23. Snímek buněk v 5 mg gelu (vlevo) a příčný průřez tohoto snímku. Jádra jsou obarvena červeně, cytoskelet zeleně. Na pravém snímku je patrný protáhlý tvar jader, orientovaný ve směru tlakového namáhání (směr označen červenou šipkou).



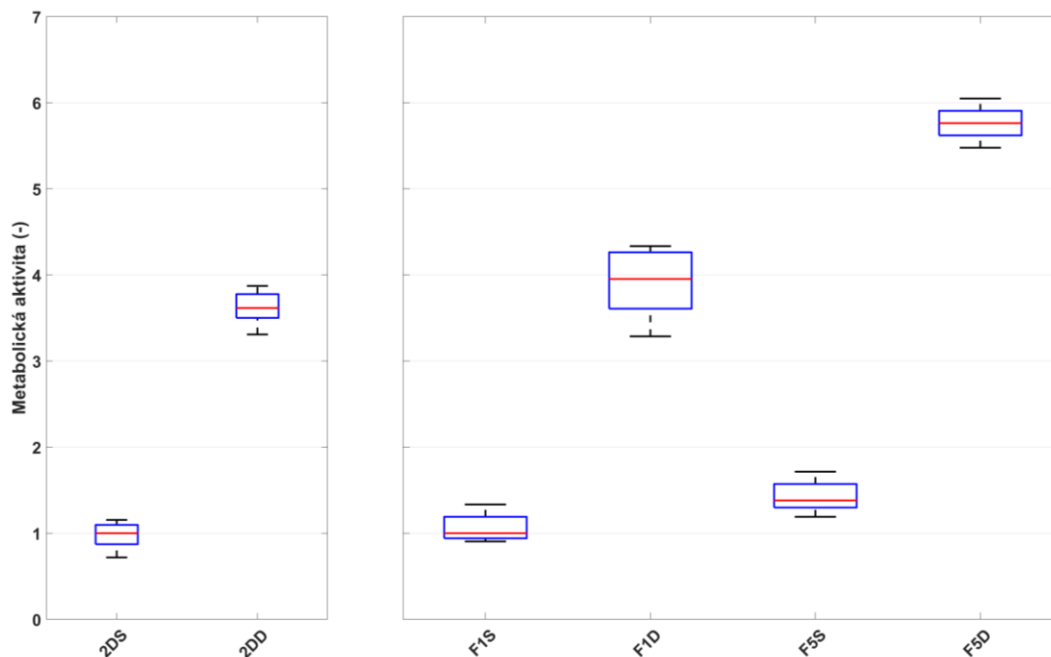
Obrázek 24. 3D projekce dynamické kultury buněk v gelu 5 mg/ml. Směr namáhání je znázorněn červenou šipkou. Buňky se orientují, podobně jako v organismu, paralelně k siločarám tlakového namáhání (znázorněné červenou šipkou), což bylo patrné pouze u tohoto vzorku.

Relativní počet buněk byl hodnocen na základě fluorescenčních snímků z 2D i 3D vzorků, přičemž je hodnocen nárůst u 2D i 3D vzorků zvlášť. U 3D vzorků bylo nasnímáno několik náhodných rovin. Výsledky jsou zobrazené v grafu (Obrázek 25), kdy počet buněk u dynamické kultury 2D vzorku je statisticky významně vyšší, než u statické. Stejných výsledků bylo dosaženo i u 3D vzorků. V porovnání obou gelů byl vyšší počet naměřen u fibrinu 1 mg/ml v obou režimech kultivace, což je způsobeno nižší hustotou gelu a tedy snazším růstem a rozptřením buněk v něm.



Obrázek 25. Relativní počet buněk na kultivovaných vzorcích, hodnoty jsou relativní vůči 2DS, event. F1S. Nejvyšší proliferace je u 2D vzorků. Proliferace u 5 mg/ml gelu je výrazně nižší než u 1 mg/ml vzhledem k jeho vysoké hustotě a tím obtížnějšímu rozptření a růstu buněk.

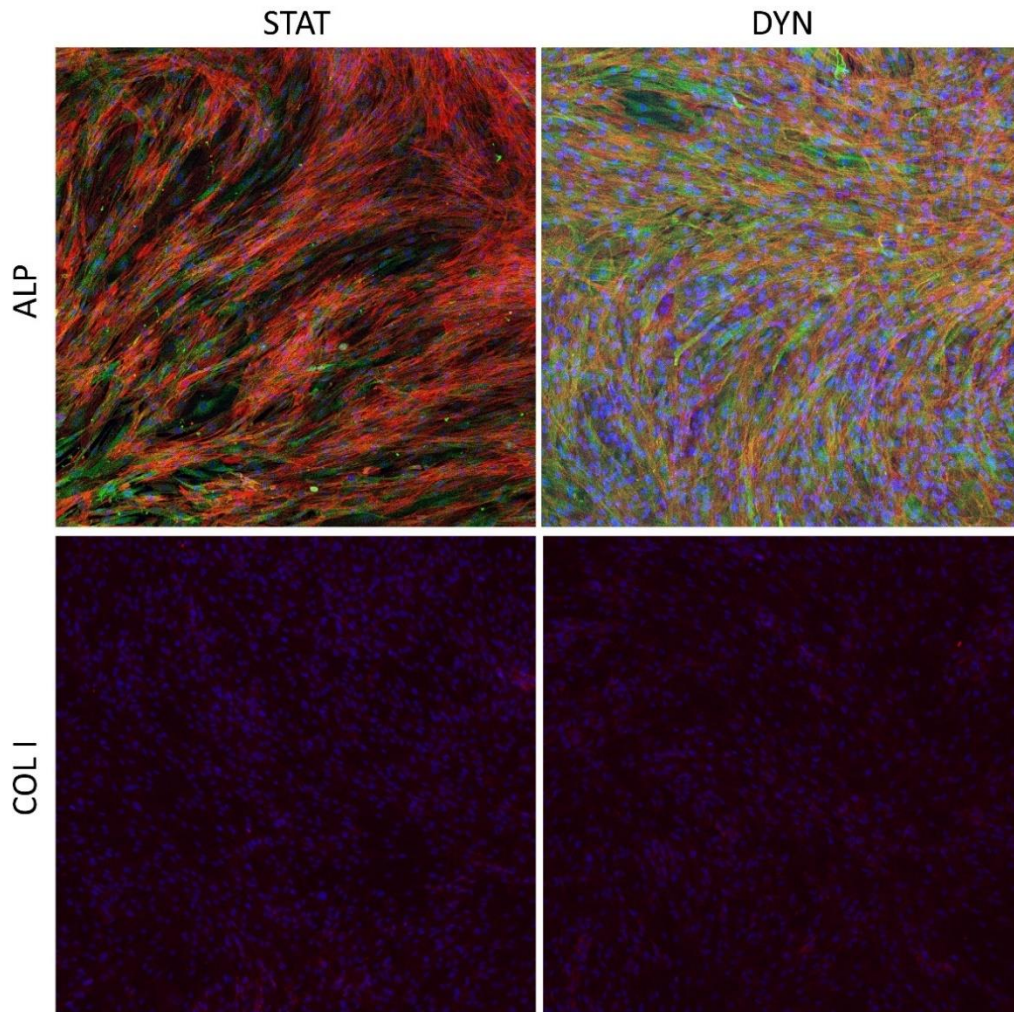
Metabolická aktivita přepočtená na jednu buňku (Obrázek 26) svědčí o osteogenní diferenciaci kultivovaných buněk. U všech vzorků je aktivita vyšší u dynamické kultury, u 3D vzorků pak je aktivita vyšší u hustšího gelu. Nárůst u gelu s 1 mg/ml fibrinu byl překvapivě stejný, jako u 2D vzorků, což svědčí o vysoké diferenciaci i 2D vzorků při dynamické kultivaci.



Obrázek 26. Metabolická aktivita přepočtená na 1 buňku. Relativní nárůst u 2D vzorků je překvapivě srovnatelný s F1X vzorky. Nejvyšší aktivita, svědčící o nejvyšší osteogenní diferenciaci, je naměřena u vzorku F5D.

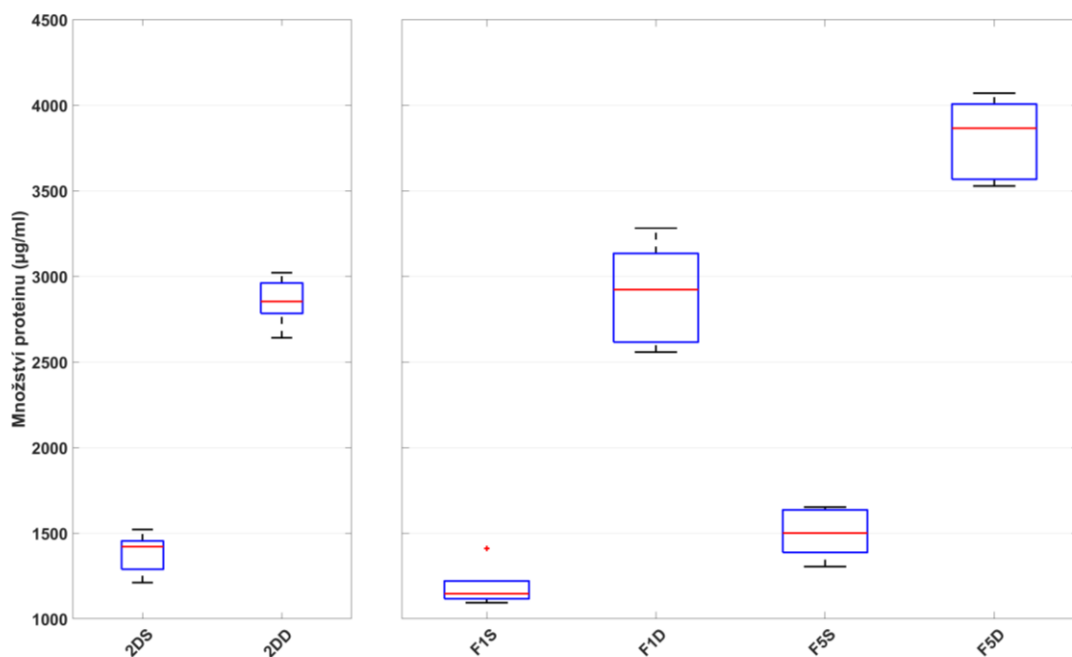
6.2.2 Markery osteogenní diferenciaci

Barvení raných osteogenních markerů ALP a COL I u 2DS a 2DD je zobrazeno na Obrázek 27. U markeru ALP, znázorněného zeleně, je patrná jeho vyšší produkce u dynamické kultury. U markeru COL I není vizuálně patrný žádný rozdíl.



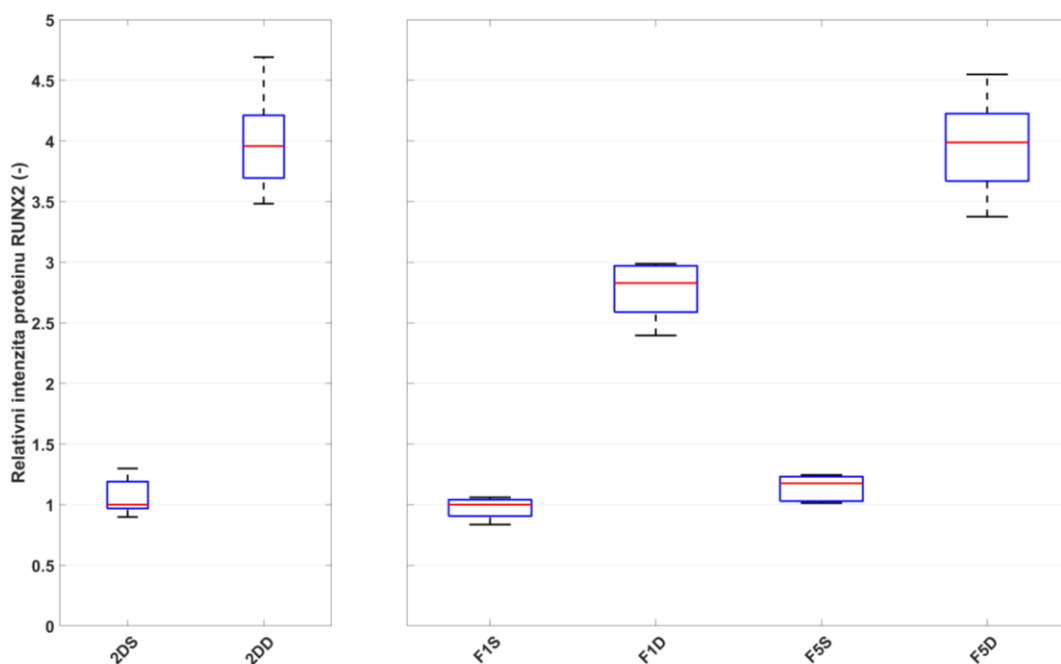
Obrázek 27. Imunofluorescenční barvení raných osteogenních markerů alkalické fosfatázy (nahore) a kolagenu typu I (dole) ve statické a dynamické 2D kultuře. Nahoře: vlákna ALP barvena zeleně, aktinová vlákna cytoskeletu červeně, jádra modře. Dole: kolagenová vlákna barvena červeně, jádra modře. U dynamické kultury je viditelně vyšší produkce ALP, zatímco u COL I není rozdíl na první pohled patrný.

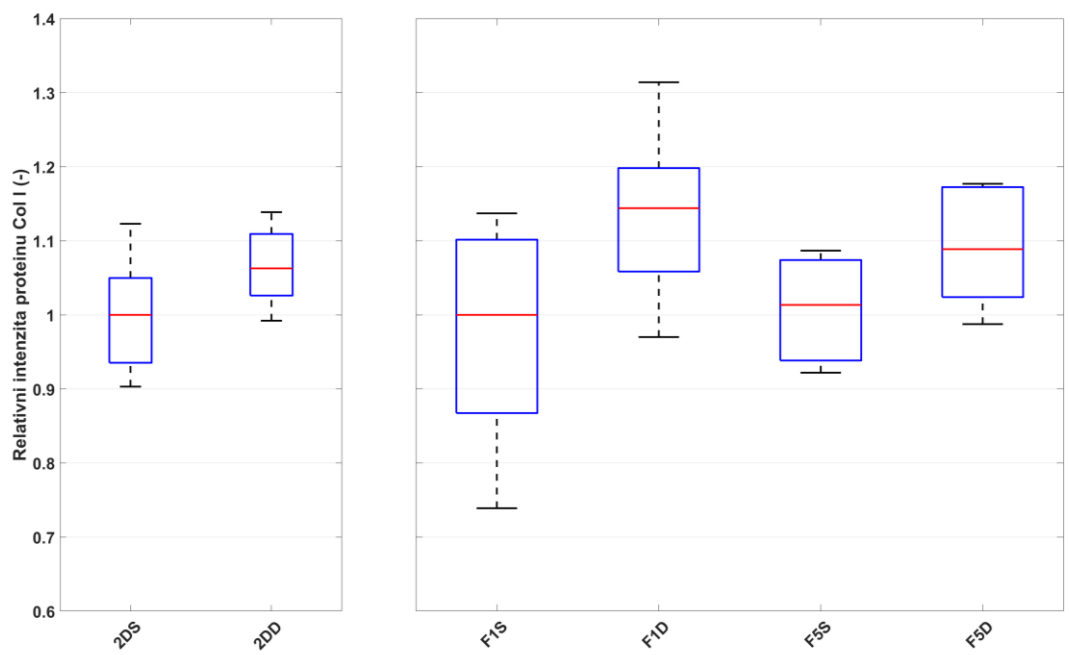
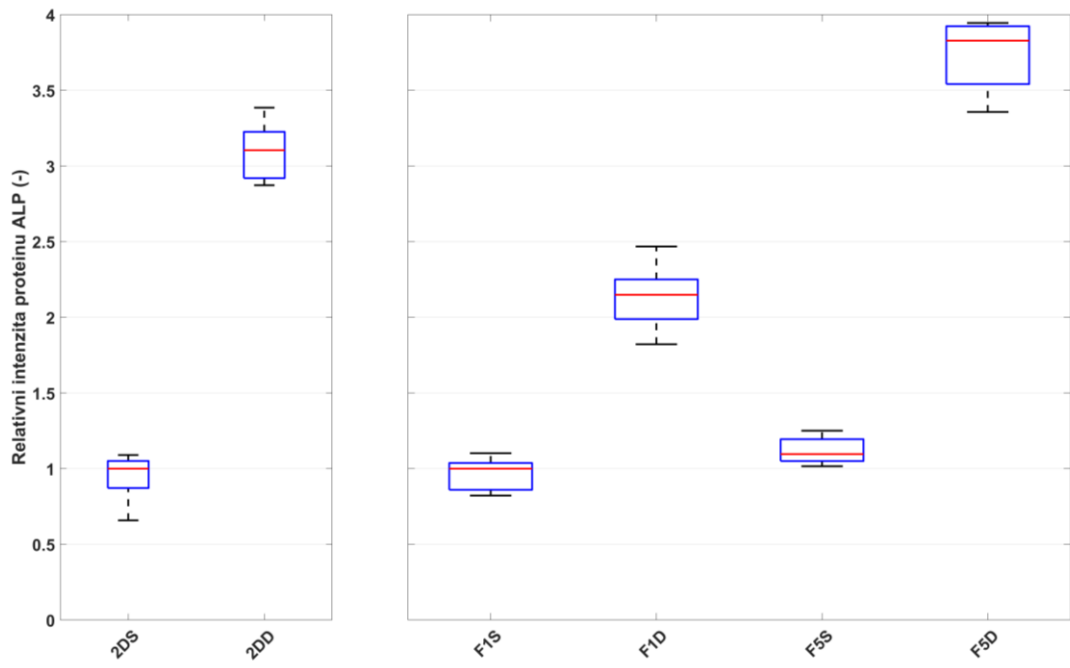
Pro kvantitativní hodnocení u všech vzorků bylo provedeno hodnocení osteogenních markerů RUNX2, ALP, COL I, OPN a OCN. Měření množství proteinu (Obrázek 28) ukázalo vyšší produkci proteinu dynamickými kulturami ve všech případech. Koncentrace u vzorku F1D je překvapivě stejná jako u 2DD. Nejvyšší koncentrace byla naměřena u vzorku F5D.

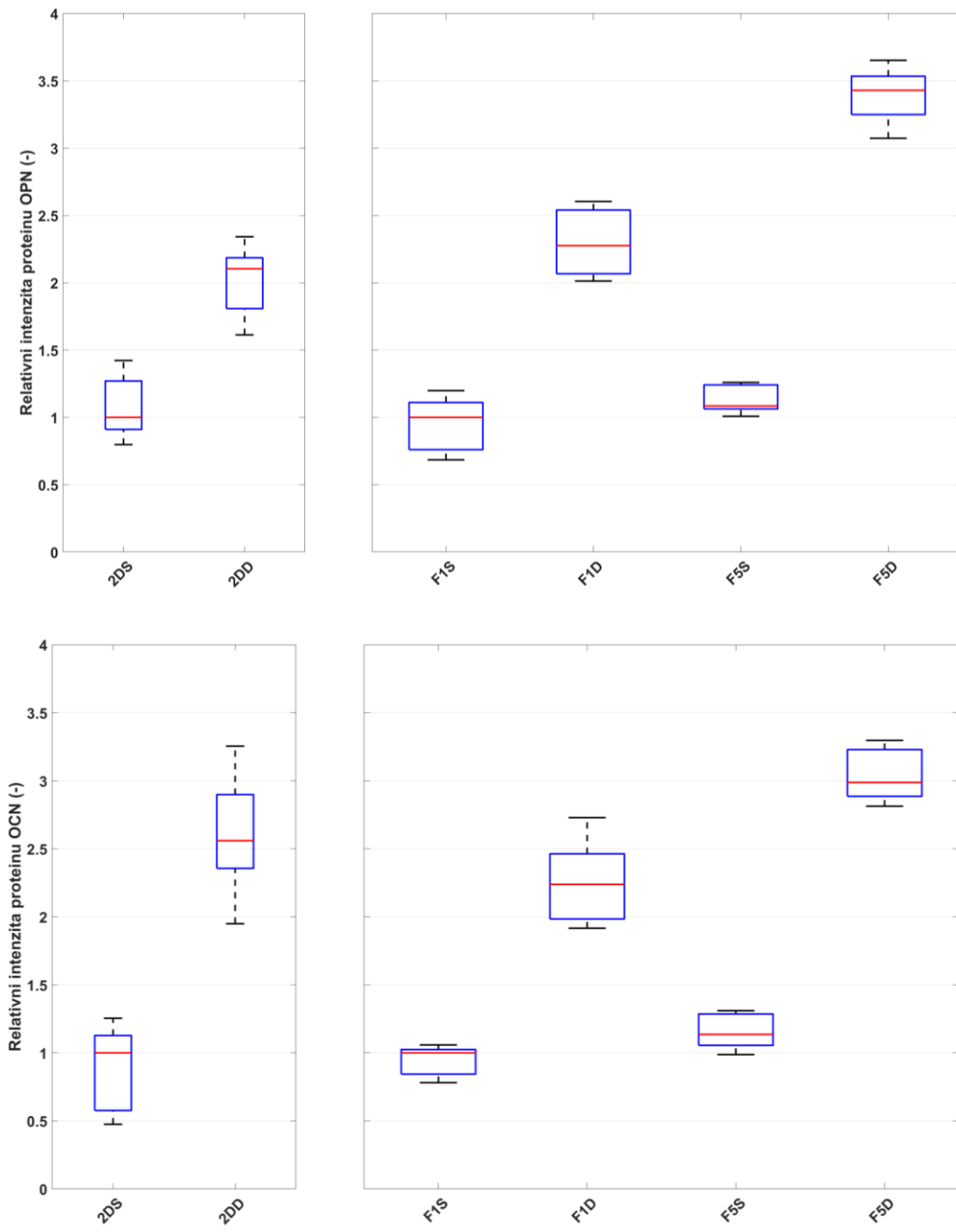


Obrázek 28. Koncentrace proteinů v buněčných lyzátech vzorků připravených po 7 dnech kultivace. U dynamické kultivace je výrazný nárůst, zvláště u vzorku F5D. Statické kultury jsou relativně vyrovnané, u vzorku F5S je jen mírný nárůst.

Intenzita téměř všech markerů u 3D vzorků byla v pořadí $F1S < F5S < F1D < F5D$, přičemž rozdíly byly statisticky významné. Stejně tak pravidlem byl poměr $2DS < 2DD$. Jedinou výjimkou byl marker COL I, kde rozdíly hodnot byly u všech vzorků statisticky nevýznamné. Z těchto výsledků je patrné, že dynamická kultivace podporuje osteogenní diferenciaci více než statický způsob kultivace.



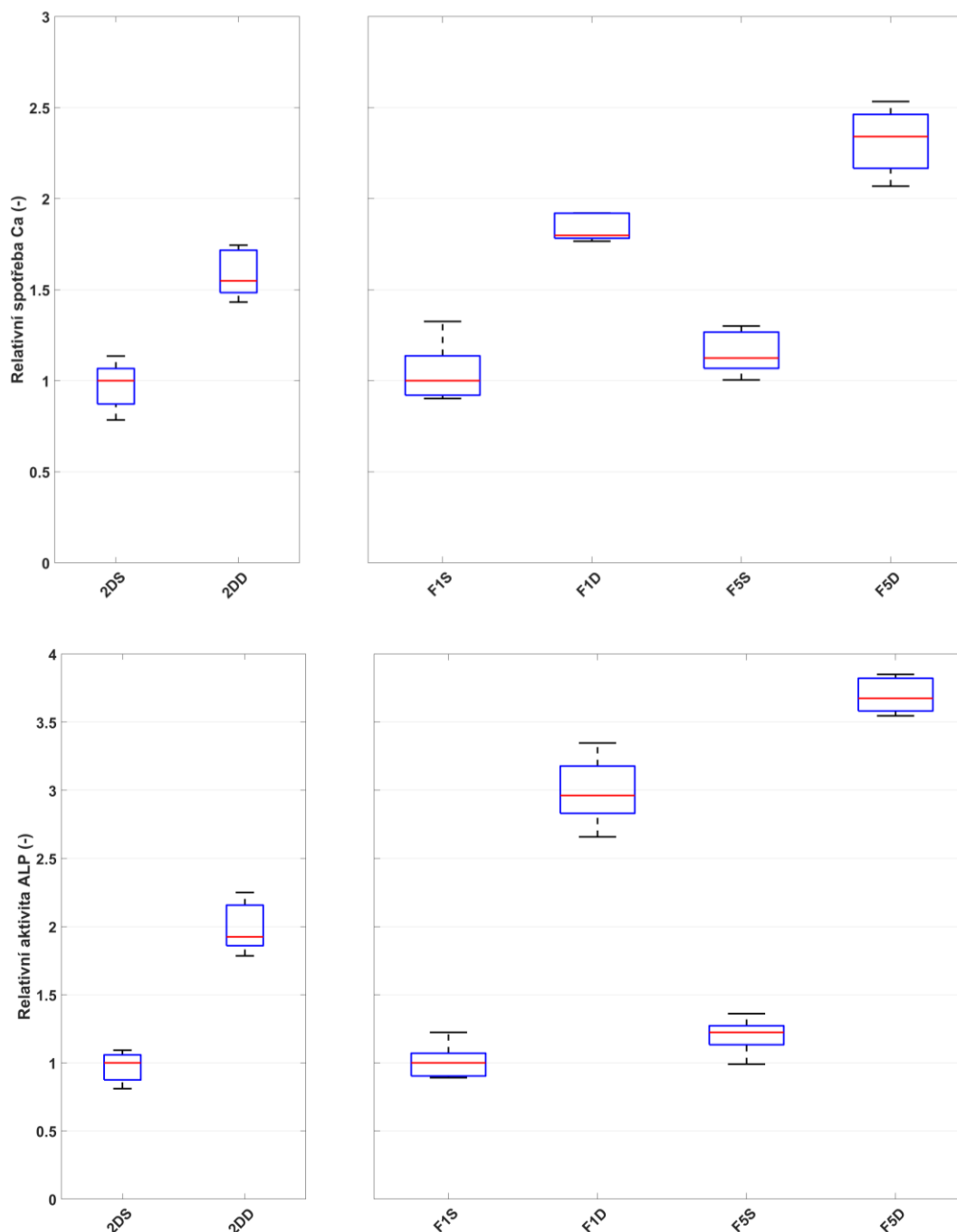




Obrázek 29. Relativní intenzita sledovaných markerů osteogenní diferenciace – RUNX2, ALP, COL, OPN a OCN. Mimo COL je průběh podobný, kdy F1S < F5S < F1D < F5D, byť u S vzorků nejsou rozdíly většinou staticky významné. U 2D vzorků je intenzita markerů u 2DD vzorku několika násobně vyšší než u 2DS.

6.2.3 Spotřeba kalcia a aktivita alkalické fosfatázy

Jako další markery osteogenní diference byly měřeny spotřeba kalcia buněk a aktivita ALP. Oba markery vykazují stejné výsledky, jako u metody Western blot, tedy spotřeba kalcia i aktivita ALP stoupají v pořadí $F1S < F5S < F1D < F5D$ u 3D vzorků a $2DS < 2DD$ u 2D.



Obrázek 30. Relativní spotřeba kalcia (nahore) a aktivita ALP (dole). Půběh relativních hodnot je podobný jako u ostatních markerů osteogenní diference, tj. $F1S < F5S < F1D < F5D$ a $2DS < 2DD$. Nárůst 2D vzorků je relativně nízký vůči F1 vzorkům, což se liší od výsledků předchozích analýz.

6.3 Diskuze

Tato část dizertační práce se zabývala samotnou dynamickou kultivací buněk na Ti6Al4V substrátech s anodizovaným povrchem, který byl v kapitole 5 zvolen jako nejoptimálnější povrch pro růst a diferenciaci buněk do osteoblastů. Buňky byly nasazeny jednak přímo na titanový substrát, dále však byly připraveny fibrinové gely, kterými byl substrát potažen a ve kterých byly buňky zanořeny. Pro vývoj buněk jsou trojdimenzionální struktury mnohem přirozenější než růst buněk na planárním substrátu [182].

Buňky byly stimulovány nepřímo pomocí tlakových pulsů šířícími se kultivačním médiem s amplitudou 0/40 kPa, frekvencí 0,5 Hz a dobou stimulace 1 hod./den. Ideální parametry tlakového namáhání pro osteogenní diferenciaci nelze s jistotou stanovit, proto byla tato hodnota zvolena na základě výsledků dynamické kultivace z literatury. Vhodnějším postupem by bylo otestovat vliv různých parametrů tlakového namáhání na osteogenní diferenciaci, avšak vzhledem k časové náročnosti to nebylo jedním z cílů práce. Avšak vzhledem k výsledkům se zdají uvedené parametry jako optimální, neboť u všech vzorků byla dynamická kultura více diferencována, a i proliferace byla vyšší.

Nepřímým důkazem osteogenní diferenciaci je orientace buněk u vzorku F5D, kdy byly dle buňky orientovány paralelně se siločarami působící tlakové síly, kdy podobný jev je pozorován i ve fyziologickém prostředí [132]. U vzorku F1D i obou statických vzorků byly buňky orientovány náhodně, což svědčí o tom, že diferenciaci probíhala na mnohem nižší úrovni. Tuto teorii potvrzuje i analýza diferenciacních markerů, kdy byly kvantitativně srovnány markery rané i střednědobé osteogeneze. Vzorek F5D dosahoval nejvyšší hodnot ve všech sledovaných markerech, mimo COL I, který byl srovnatelný u všech vzorků. Stejně tak u 2D kultury byla dle vizuálního srovnání markeru ALP (Obrázek 27) dynamická kultura více diferencována, což potvrdilo i kvantitativní měření, kdy všechny markery, opět mimo COL I, dosahovaly vyšších hodnot. U 3D vzorků druhé nejvyšší hodnoty byly naměřeny u F1D, což svědčí o tom, že způsob kultivace má větší vliv na osteogenní diferenciaci než typ použitého nosiče.

Relativně zajímavé výsledky poskytuje srovnání F1D a 2DD vzorku, byť podmínky kultivace jsou odlišné, a proto lze srovnávat pouze relativní hodnoty nárůstu 2DD vůči 2DS a F1D vůči F1S. Nárůst u většiny těchto hodnot je srovnatelný tedy metabolická aktivita i produkce proteinů je podobná, 2DD vzorek má potom mírně vyšší nárůst raných markerů ALP a RUNX2, naopak F1D má vyšší střednědobý marker OCN a aktivitu ALP a spotřebu kalcia. Na těchto výsledcích je zjevné, že dynamická kultivace významně podporuje osteogenní diferenciaci i na 2D vzorcích, které nejsou příliš fyziologické z hlediska vývoje osteoblastů. Naopak lze konstatovat, že relativně málo hustý gel o koncentraci složek fibrinu a trombinu 1 mg/ml a 0,8 IU/ml příliš nepodporují osteogenní diferenciaci.

Na základě měření počtu buněk lze konstatovat, že dynamický způsob kultivace podporuje buněčnou proliferaci. Větší počet buněk byl naměřen jak u 2D vzorků, tak i 3D, v porovnání statické a dynamické kultivace. U gelových nosičů byl větší počet buněk naměřen u méně hustého gelu o koncentraci fibrinu 1 mg/ml, kdy nižší hustota gelu podporuje růst buňky dělení a migraci gelem. Hustota buněk v gelu o koncentraci 5 mg/ml byla mnohem nižší, ale buňky byly převážně orientované paralelně se siločarami tlaku, jak svědčí Obrázek 24.

Jedním z limitů tohoto pokusu je fakt, že fibrinový gel není nijak pevně navázán na titanový substrát. Velmi snadno může tedy dojít k odloučení gelové suspenze s buňkami, což není žádoucí. Buňky však fibrinový gel metabolizují a přetvářejí ho na vlastní ECM. Pokud tak doba *in vitro* kultivace bude dostatečně dlouhá (v řádu několika týdnů), výsledná kultura tvořená ranými osteoblasty již bude dostatečně upevněná k povrchu substrátu. V případě kolonizace povrchů implantátů s využitím gelových nosičů je však vhodnější vytvořit vazbu gelového nosiče na povrch implantátu, aby pravděpodobnost odloučení byla minimalizována.

6.4 Závěr

Tato část dizertační práce byla zaměřena na vlastní dynamickou kultivaci buněk s cílem kolonizovat modelový substrát kulturou kmenových buněk diferencovaných směrem k osteoblastům. Byly použity Ti6Al4V substráty s modifikací povrchu anodizací, přičemž buňky byly nasazeny přímo na jejich povrch, případně byly připraveny buněčné suspenze ve fibrinovém gelu o koncentracích fibrinu 1 a 5 mg/ml, jimiž byl substrát pokryt. Výsledky ukázaly, že dynamická kultivace podporuje proliferaci i osteogenní diferenciaci nezávisle na použitém nosiči buněk. Již po 7 dnech kultivace byla u dynamických kultur zvýšená exprese osteogenních markerů, buňky v gelu o koncentraci fibrinu 5 mg/ml byly navíc orientovány paralelně se siločarami tlakového namáhání, podobně jako ve fyziologickém prostředí. U tohoto gelu byla naměřena vyšší diferenciaci buněk, ale nižší proliferace vlivem vysoké hustoty gelu. Proliferace u 1mg gelu byla sice vysoká, ale diferenciaci byla srovnatelná s 2D vzorky. Použití 5mg gelů, příp. přímo násada buněk na substrát bez gelu, je optimální pro kolonizaci titanového povrchu.

7 Shrnutí výsledků práce a aplikace výsledků

Tato dizertační práce se zabývá možností kolonizace titanových náhrad buňkami pacienta před samotnou implantací. Jde o metodu zvýšení biokompatibility titanového implantátu, kdy by měla být snížena imunitní odpověď organismu a zvýšena šance osteointegrace implantátu. Cíl práce je tedy vytvořit kulturu raných osteoblastů, diferencovaných z kmenových buněk, na modelových substrátech z Ti6Al4V za podmínek dynamické kultivace. Z toho byly stanoveny tři dílčí cíle, na něž jsou zaměřeny kapitoly práce – stavba systému a kultivačních komor pro mechanické namáhání buněk za fyziologických podmínek; vliv parametrů titanových substrátů na proliferaci a osteogenní diferenciaci buněk, a nakonec kolonizace titanových substrátů kmenovými buňkami a jejich diferenciaci za dynamických podmínek kultivace.

První dva dílčí cíle byly stanoveny za účelem realizace třetího, hlavního cíle. V rámci práce byl sestaven programovatelný systém pro tlakové namáhání, dodávající tlakové pulsy o zvolené amplitudě, frekvenci a době trvání stimulace, simulující fyziologické podmínky působící na vyvíjející se osteoblasty v organismu. Pro redukci času potřebného pro experimenty byla vyvinuta komora pro kultivaci ve standardních jamkových deskách (6 – 48 jamek), navíc byl navrhnout i přepínací systém, který přepíná mezi 4 skupinami až 4 řetězených komor a mění parametry tlaku, takže je během experimentu možné kultivovat až 768 vzorků při 4 různých režimech tlakového namáhání.

Dále byly testovány Ti6Al4V substráty s různými povrchovými úpravami z hlediska vlivu jejich povrchových vlastností na proliferaci a osteogenní diferenciaci kmenových buněk. Jako optimální byl zvolen anodizovaný povrch, neboť substráty s malou drsností (leštěný povrch, povrch pokrytý uhlíkem podobným diamantu a kontrolní sklo) vykazovaly dobrou proliferaci, ale nízkou adhezi (buněčná kultura se odlupovala ze substrátů) a také osteogenní diferenciaci. Oproti tomu substráty s vysokou drsností (tryskaný povrch) měly velmi dobrou diferenciaci, ale sníženou proliferaci. Jako optimální proto byly vybrány substráty se střední drsností povrchu, tj. anodizovaný a kartáčovaný povrch, přičemž anodizovaný povrch dosahoval lepších výsledků. Při těchto pokusech se také ukázalo, že smáčivost nemá velký vliv na proliferaci ani diferenciaci buněk. Těmito pokusy byla potvrzena hypotéza, že povrchová úprava substrátu Ti6Al4V má vliv na proliferaci i diferenciaci buněk.

Na základě výsledků těchto dílčích cílů byly realizovány pokusy s dynamickou kultivací s cílem kolonizovat povrch anodizovaného substrátu ranými osteoblasty diferencovanými z kmenových buněk za dynamických podmínek v navrženém systému. Buňky byly nasazeny přímo na povrch substrátu a dále do fibrinových gelů s různou hustotou pro zajištění více přirozených podmínek pro růst osteoblastů. Výsledky

dokázaly pozitivní vliv dynamické kultivace na proliferaci i diferenciaci osteoblastů. Hypotézu, že dynamická kultivace podporuje proliferaci i osteogenní diferenciaci buněk, lze tak potvrdit. Byla vytvořena kultura raně diferencovaných osteoblastů přímo na anodizované matrici, čímž byl splněn cíl práce. U gelu s koncentrací fibrinu 5 mg/ml byla sledována vysoká osteogeneze, kdy dokonce docházelo k orientaci buněk v gelu podél směru tlakového namáhání, k čemuž dochází i ve fyziologickém prostředí. Hypotéza, že prostředí hydrogelu podporuje osteogenní diferenciaci, je rovněž platná.

Po replikaci těchto výsledků může dojít k další fázi výzkumu, a to sice ke kolonizaci více komplexních tvarů a finálně ke kolonizaci titanového implantátu – plíšku, drátu, šroubku apod., který se v následné fázi bude testovat implantováním do pokusného organismu.

Výsledky práce však mají i další aplikace, které nebyly původně cílem práce. Systém, jenž byl v rámci práce vytvořen, má významný potenciál v redukcii počtu animálních experimentů, potřebných pro testování nejen titanových substrátů, ale i jiných biomateriálů. Doposud je standardem testování biomateriálů implantací do pokusného zvířete a následně usmrcení zvířete a hodnocení odezvy organismu. To ale neodpovídá zásadě 3R (reduce, refine, replace, tj. snížení, zjemnění, náhrada), kdy mají být preferovány *in vitro* pokusy s buňkami před experimenty s pokusnými organismy. V navrženém systému je tedy možné testovat biokompatibilitu a další vlastnosti umělých materiálů v simulovaném prostředí podobným fyziologickému, a tak jsou materiály testovány dle principu 3R, tj. otestovat nejprve reakci *in vitro* s buňkami, substráty s dobrými výsledky až poté otestovat *in vivo* a redukovat tak počet potřebných laboratorních zvířat pro pokusy.

Navržený systém simuluje fyziologické podmínky působící na buňky, nejenom osteoblasty, ale i na diferenciaci kmenových buněk do jiných fenotypů. Doposud byl systém použit pro další aplikace, a to pro osazení vaskulárních náhrad kmenovými buňkami a jejich diferenciaci do buněk hladké svaloviny cév, viz článek *MATĚJKA, R., M. KOŇAŘÍK, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. LIPENSKÝ, et al. Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. Applied Sciences, 2020, 10(16)*. Dále byl systém použit pro osazení nanovláknenných nosičů kmenovými buňkami s diferenciací do hladké svaloviny, viz článek *BACAKOVA, L., J. PAJOROVA, M. TOMKOVA, R. MATEJKA, et al. Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. Nanomaterials (Basel), Jan 23 2020, 10(2)*.

8 Souhrnný závěr

V práci byl navržen systém pro dynamickou kultivaci buněk za fyziologických podmínek, jež stimuluje osteogenní buněčnou diferenciaci tlakovým namáháním. Pro experimenty je možné volit konstantní nebo pulsatilní průběh tlaku s amplitudou 0-200 kPa, frekvencí 0,05 – 2 Hz, dobou kultivace 0,1 – 24 hod./den. Vzhledem k integrovanému přepínači dochází automaticky k nastavení unikátních podmínek tlakového namáhání až u 4 skupin komor, mezi kterými systém přepíná. K systému byly navrženy dvě komory, z nichž jedna je určena pro iniciální testování substrátů a matric, druhá pak pro paralelní dynamickou kultivaci více vzorků ve standardních více jamkových kultivačních deskách. Při využití druhé komory lze tak paralelně kultivovat až 768 vzorků při 4 různých režimech tlakového namáhání.

Jako nejvhodnější povrch pro kolonizaci kmenovými buňkami byl zvolen substrát ze slitiny Ti6Al4V s povrchovou úpravou anodizací, vzhledem k optimální drsnosti jeho povrchu na proliferaci i diferenciaci buněk. Tato matrice byla proto následně použita pro kolonizaci povrchu za dynamických podmínek.

Již po 7 dnech dynamické kultivace, o zátěži 0/40 kPa, 0,5 Hz po dobu 1 hod./den, byla u dynamických kultur byla zvýšená exprese osteogenních markerů, buňky v gelu o koncentraci fibrinu 5 mg/ml byly navíc orientovány paralelně se siločarami tlakového namáhání, podobně jako ve fyziologickém prostředí. U tohoto gelu byla naměřena vyšší diferenciaci buněk, ale nižší proliferace vlivem vysoké hustoty gelu. Proliferace u gelu s koncentrací fibrinu 1 mg/ml byla sice vysoká, ale diferenciaci byla srovnatelná s 2D vzorky. Použití 5mg gelů, příp. přímo násada buněk na substrát bez gelu, je optimální pro kolonizaci titanového povrchu.

Seznam použité literatury

- 1 SAMIT KUMAR, N., M. PRASENJIT, R. S a K. BISWANATH Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: A review. *The Indian journal of medical research.*, 2010, 7(132), 15-30.
- 2 BANCROFT, G. N. a A. G. MIKOS Bone Tissue Engineering by Cell Transplantation. *Polymer Based Systems on Tissue Engineering, Replacement and Regeneration*, 2002, 251-263.
- 3 MASSIA, S. P., M. M. HOLECKO a G. R. EHTESHAMI In vitro assessment of bioactive coatings for neural implant applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2004, 68A(1), 177-186.
- 4 GREENWALD, A. S., S. D. BODEN, V. M. GOLDBERG, Y. KHAN, et al. Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions, and Applications. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 2001, 83, 98-103.
- 5 GALLO, J. Endoprotéza kyčelního kloubu – přežití výsledku, komplikace, socioekonomický dopad. *Lékařské listy*, 2012, 13(11), 16-19.
- 6 WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 2008, 29(20), 2941-2953.
- 7 PERCZEL-KOVACH, K. E., S. FARKASDI, K. KALLO, O. HEGEDUS, et al. Effect of stem cells of dental pulp origin on osseointegration of titanium implant in a novel rat vertebra model. *Fogorv Sz*, 2017, 110(1), 7-14.
- 8 HUANG, R.-L., E. KOBAYASHI, K. LIU a Q. LI Bone Graft Prefabrication Following the In Vivo Bioreactor Principle. *EBioMedicine*, 2016, 12, 43-54.
- 9 DIEDERICHS, S., S. RÖKER, D. MARTEN, A. PETERBAUER, et al. Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z RP platform. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(6), 1762-1771.
- 10 TRISIC, D., V. JOKANOVIĆ, D. ANTONIJEVIC a D. MARKOVIĆ Stem cells in tissue engineering: Dynamic cultivation requirement. *Stomatoloski glasnik Srbije*, 2018, 65.
- 11 DEL FABBRO, M., G. ROSANO a S. TASCHIERI Implant survival rates after maxillary sinus augmentation. *European Journal of Oral Sciences*, 2008, 116(6), 497-506.
- 12 LIU, W., W. ZHANG a Y. CAO. Chapter Fifty-Seven - Bone and Cartilage Reconstruction. R. LANZA, R. LANGER AND J. VACANTI eds. *Principles of Tissue Engineering (Third Edition)*. Burlington: Academic Press, 2007, 861-875.
- 13 ALBERT, A., T. LEEMRIJSE, V. DRUEZ, C. DELLOYE, et al. Are bone autografts still necessary in 2006? A three-year retrospective study of bone grafting. *Acta orthopaedica Belgica* 2007, 72(6).
- 14 HING, K. A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 2005, 2(3), 184-199.
- 15 KANCZLER, J. a R. OREFFO Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *European Cells and Materials*, 2008, 15, 100-114.
- 16 LAURENCIN, C., Y. KHAN a S. F. EL-AMIN Bone graft substitutes. *Expert Review of Medical Devices*, 2014, 3(1), 49-57.
- 17 OKUMURA, A., M. GOTO, T. GOTO, M. YOSHINARI, et al. Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2). *Biomaterials*, 2001, 22(16), 2263-2271.
- 18 EASTLUND, T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: Reducing the risk through donor selection. *Cell Transplantation*, 1995, 4(5), 455-477.
- 19 ZHANG, L. a T. J. WEBSTER Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*, 2009, 4(1), 66-80.

- 20 BJURSTEN, L. M., L. RASMUSSEN, S. OH, G. C. SMITH, et al. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 9999A.
- 21 PRODANA, M., M. CAPOSI a D. IORDACHESCU Ions Release from Ti Implant Alloys in Simulated Bioliquids. 14th Nordic-Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics, 2008, 60-63.
- 22 BACAKOVA, L., F. ELENA, R. F. S. V, et al. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological research*, 2004, 53(1), 35-45.
- 23 KAIGLER, D., G. PAGNI, C.-H. PARK, S. A. TARLE, et al. Angiogenic and Osteogenic Potential of Bone Repair Cells for Craniofacial Regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 2010, 16(9), 2809-2820.
- 24 BUENO, E. M. a J. GLOWACKI Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration: revue littéraire mensuelle. *Nature Reviews Rheumatology*, 2009, 5(12), 685-697.
- 25 LEGEROS, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clinical Materials*, 1993, 14(1), 65-88.
- 26 WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 2009, 30(30), 5897-5909.
- 27 NIINOMI, M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2008, 1(1), 30-42.
- 28 ALBREKTSSON, T. a C. B. JOHANSSON Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, 2001, 10(1), 96-101.
- 29 ROBERTS, T. T. a A. J. ROSENBAUM Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics. *Organogenesis*, 2014, 8(4), 114-124.
- 30 HENCH, L. L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, 1998, 81(7), 1705-1728.
- 31 PULEO, D. A. a M. V. THOMAS Implant Surfaces. *Dental Clinics of North America*, 2006, 50(3), 323-338.
- 32 ELSALANTY, M. a D. GENECOV Bone Grafts in Craniofacial Surgery. *Craniofacial Trauma and Reconstruction*, 2009, 2(03), 125-134.
- 33 ANSELME, K., B. NOËL a P. HARDOUIN Human osteoblast adhesion on titanium alloy, stainless steel, glass and plastic substrates with same surface topography. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2000, 10(12), 815-819.
- 34 ZINGER, O., K. ANSELME, A. DENZER, P. HABERSETZER, et al. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials*, 2004, 25(14), 2695-2711.
- 35 MORRA, M. Biomolecular modification of implant surfaces. *Expert Review of Medical Devices*, 2014, 4(3), 361-372.
- 36 SCHULER, M., D. TRENTIN, M. TEXTOR a S. G. TOSATTI Biomedical interfaces: titanium surface technology for implants and cell carriers. *Nanomedicine*, 2006, 1(4), 449-463.
- 37 ADYA, N., M. ALAM, T. RAVINDRANATH, A. MUBEEN, et al. Corrosion in titanium dental implants: literature review. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*, 2005, 5(3), 126-.
- 38 HIROMOTO, S. Composition of surface oxide film of titanium with culturing murine fibroblasts L929. *Biomaterials*, 2004, 25(6), 979-986.
- 39 LIU, X., P. CHU a C. DING Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2004, 47(3-4), 49-121.
- 40 ANDERSON, J. M., A. G. GRISTINA, S. R. HANSON, L. A. HARKER, et al. Host Reactions to Biomaterials and Their Evaluation. *Biomaterials Science*, 1996, 165-214.
- 41 LEGEROS, R. Z. a R. G. CRAIG Strategies to affect bone remodeling: Osteointegration. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1993, 8(S2), S583-S596.
- 42 MAS-MORUNO, C., M. ESPANOL, E. B. MONTUFAR, G. MESTRES, et al. Bioactive Ceramic and Metallic Surfaces for Bone Engineering. *Biomaterials Surface Science*, 2013, 337-374.

- 43 FRANCHI, M., E. ORSINI, A. TRIRÉ, M. QUARANTA, et al. Osteogenesis and Morphology of the Peri-Implant Bone Facing Dental Implants. *The Scientific World JOURNAL*, 2004, 4, 1083-1095.
- 44 LE GUÉHENNEC, L., A. SOUEIDAN, P. LAYROLLE a Y. AMOURIQ Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 2007, 23(7), 844-854.
- 45 BAGNO, A. a C. DI BELLO Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004, 15(9), 935-949.
- 46 CITEAU, A., J. GUICHEUX, C. VINATIER, P. LAYROLLE, et al. In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials*, 2005, 26(2), 157-165.
- 47 XIAO, J., H. ZHOU, L. ZHAO, Y. SUN, et al. The effect of hierarchical micro/nanosurface titanium implant on osseointegration in ovariectomized sheep. *Osteoporos Int*, 2011, (22), 1907-1913.
- 48 LUCCHINI, J.-P., J.-L. AURELLE, M. THERIN, K. DONATH, et al. A pilot study comparing screw-shaped implants. Surface analysis and histologic evaluation of bone healing. *Clinical Oral Implants Research*, 1996, 7(4), 397-404.
- 49 WATANABE, I., S. KIYOSUE, C. OHKUBO, T. AOKI, et al. Machinability of cast commercial titanium alloys. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 63(6), 760-764.
- 50 BARBOUR, M. E., D. J. O'SULLIVAN, H. F. JENKINSON a D. C. JAGGER The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2007, 18(7), 1439-1447.
- 51 WENNERBERG, A., T. ALBREKTSSON, B. ANDERSSON a J. J. KROL A histomorphometric study of screw-shaped and removal torque titanium implants with three different surface topographies. *Clinical Oral Implants Research*, 1995, 6(1), 24-30.
- 52 NISHIGUCHI, S., H. KATO, H. FUJITA, H. M. KIM, et al. Enhancement of Bone-Bonding Strengths of Titanium Alloy Implants by Alkali and Heat Treatments. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999, 48(5), 689-696.
- 53 NISHIGUCHI, S., S. FUJIBAYASHI, H.-M. KIM, T. KOKUBO, et al. Biology of alkali- and heat-treated titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2003, 67A(1), 26-35.
- 54 CHO, S. The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials*, 2003, 24(20), 3611-3617.
- 55 SZMUKLER-MONCLER, S., D. PERRIN, V. AHOSSI, G. MAGNIN, et al. Biological properties of acid etched titanium implants: Effect of sandblasting on bone anchorage. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2004, 68B(2), 149-159.
- 56 PARK, K. H., S. J. HEO, J. Y. KOAK, S. K. KIM, et al. Osseointegration of anodized titanium implants under different current voltages: a rabbit study. *J. Oral Rehabilitation*, 2007, (34), 517-527.
- 57 SON, W.-W., X. ZHU, H.-I. SHIN, J. L. ONG, et al. In vivo histological response to anodized and anodized/hydrothermally treated titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2003, 66B(2), 520-525.
- 58 DARIMONT, G. L., R. CLOOTS, E. HEINEN, L. SEIDEL, et al. In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: a quantitative study in the rabbit. *Biomaterials*, 2002, 23(12), 2569-2575.
- 59 OCHSENBEIN, A., F. CHAI, S. WINTER, M. TRASNEL, et al. Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol-gel process on titanium substrates. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4(5), 1506-1517.
- 60 SIMMONS, C. A., N. VALIQUETTE a R. M. PILLIAR Osseointegration of sintered porous-surfaced and plasma spray-coated implants: An animal model study of early postimplantation healing response and mechanical stability. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 47(2), 127-138.

- 61 XIE, Y., X. LIU, X. ZHENG, C. DING, et al. Improved stability of plasma-sprayed dicalcium silicate/zirconia composite coating. *Thin Solid Films*, 2006, 515(3), 1214-1218.
- 62 BRACERAS, I., J. I. ALAVA, J. I. OÑATE, M. BRIZUELA, et al. Improved osseointegration in ion implantation-treated dental implants. *Surface and Coatings Technology*, 2002, 158-159, 28-32.
- 63 MORRA, M. Biochemical modification of titanium surfaces: Peptides and eCM proteins. *European Cells and Materials*, 2006, 12, 1-15.
- 64 NARAYANAN, R., S. K. SESHADRI, T. Y. KWON a K. H. KIM Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2008, 85B(1), 279-299.
- 65 ACTIS, L., L. GAVIRIA, T. GUDA a J. L. ONG Antimicrobial surfaces for craniofacial implants: state of the art. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2013, 39(2), 43-47.
- 66 PETERSEN, R. C. Bisphenyl-Polymer/Carbon-Fiber-Reinforced Composite Compared to Titanium Alloy Bone Implant. *International Journal of Polymer Science*, 2011, 2011, 1-11.
- 67 SAKKA, S. a P. COULTHARD Implant failure: Etiology and complications. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2009, 16(1), 42-44.
- 68 KOKUBO, T. a H. TAKADAMA How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 2006, 27(15), 2907-2915.
- 69 DE GROOT, K., R. GEESINK, C. P. A. T. KLEIN a P. SEREKIAN Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1987, 21(12), 1375-1381.
- 70 BACAKOVA, L., E. FILOVA, M. PARIZEK, T. RUMIL, et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 2011, 29(6), 739-767. ISSN 07349750.
- 71 L COCHRAN, D., R. K SCHENK, A. LUSSI, F. HIGGINBOTTOM, et al. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible: A histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998, 40(1), 1-11.
- 72 WENNERBERG, A., C. HALLGREN, C. JOHANSSON a S. DANELLI A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clinical Oral Implants Research*, 1998, 9(1), 11-19.
- 73 BUSER, D., R. K. SCHENK, S. STEINEMANN, J. P. FIORELLINI, et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1991, 25(7), 889-902.
- 74 GOTFREDSON, K., A. WENNERBERG, C. JOHANSSON, L. T. SKOVGAARD, et al. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1995, 29(10), 1223-1231.
- 75 BECKER, W., B. E. BECKER, A. RICCI, O. BAHAT, et al. A Prospective Multicenter Clinical Trial Comparing One- and Two-Stage Titanium Screw-Shaped Fixtures with One-Stage Plasma-Sprayed Solid-Screw Fixtures. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2000, 2(3), 159-165.
- 76 ESPOSITO, M., Y. ARDEBILI a H. V. WORTHINGTON Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2005, 4(1).
- 77 ONG, J. L., D. L. CARNES a K. BESSHO Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials*, 2004, 25(19), 4601-4606.
- 78 HANSSON, S. a M. NORTON The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model. *Journal of Biomechanics*, 1999, 32(8), 829-836.
- 79 WEBSTER, T. J. a J. U. EJIOFOR Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*, 2004, 25(19), 4731-4739.

- 80 BRETT, P. M., J. HARLE, V. SALIH, R. MIHOC, et al. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone*, 2004, 35(1).
- 81 PEGUEROLES, M., C. APARICIO, M. BOSIO, E. ENGEL, et al. Spatial organization of osteoblast fibronectin matrix on titanium surfaces: Effects of roughness, chemical heterogeneity and surface energy. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(1), 291-301.
- 82 BOYAN, B. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 1996, 17(2), 137-146.
- 83 MARTIN, J. Y., Z. SCHWARTZ, T. W. HUMMERT, D. M. SCHRAUB, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *Journal of Biomedical Materials Research*, 1995, 29(3), 389-401.
- 84 COCHRAN, D. L., D. BUSER, C. M. TEN BRUGGENKATE, D. WEINGART, et al. The use of reduced healing times on ITIR implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: . Early results from clinical trials on ITIR SLA implants. *Clinical Oral Implants Research*, 2002, 13(2), 144-153.
- 85 IVANOFF, C.-J., G. WIDMARK, C. HALLGREN, L. SENNERBY, et al. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 2001, 12(2), 128-134.
- 86 RUPP, F., L. SCHEIDELER, N. OLSHANSKA, M. DE WILD, et al. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 76A(2), 323-334.
- 87 GONGADZE, E., D. KABASO, S. BAUER, J. PARK, et al. Adhesion of Osteoblasts to a Vertically Aligned TiO₂ Nanotube Surface. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, 13(2), 194-200.
- 88 JEMAT, A., M. J. GHAZALI, M. RAZALI a Y. OTSUKA Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. *BioMed Research International*, 2015, 2015, 1-11.
- 89 IGLIC, A., GONGADZE, D. KABASO, BAUER, et al. Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6(1), 1801-1816.
- 90 LI, P., I. KANGASNIEMI, K. DE GROOT a T. KOKUBO ChemInform Abstract: Bonelike Hydroxyapatite Induction by a Gel-Derived Titania on a Titanium Substrate. *ChemInform*, 1994, 25(40).
- 91 CHOI, C.-R., H.-S. YU, C.-H. KIM, J.-H. LEE, et al. Bone Cell Responses of Titanium Blasted with Bioactive Glass Particles. *Journal of Biomaterials Applications*, 2009, 25(2), 99-117.
- 92 APARICIO, C., F. JAVIER GIL, C. FONSECA, M. BARBOSA, et al. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials*, 2003, 24(2), 263-273.
- 93 NOVAES-JR, A., S. L S SOUZA, P. OLIVEIRA a A. M M S SOUZA. Histomorphometric Analysis of the Bone-Implant Contact Obtained with 4 Different Implant Surface Treatments Placed Side by Side in the Dog Mandible. *he International journal of oral & maxillofacial implants*. 2002, 17(3), 377-383.
- 94 SINGH, A. V. *Clinical implantology*. Edtion ed. New Delhi: Elsevier, 2013. ISBN 9788131233245.
- 95 ZHU, K. Y., A. VASSEL, F. BRISSET, K. LU, et al. Nanostructure formation mechanism of α -titanium using SMAT. *Acta Materialia*, 2004, 52(14), 4101-4110.
- 96 WEN, M., G. LIU, J.-F. GU, W.-M. GUAN, et al. The tensile properties of titanium processed by surface mechanical attrition treatment. *Surface and Coatings Technology*, 2008, 202(19), 4728-4733.
- 97 ZHANG, S. *Biological and biomedical coatings handbook: Applications*. edited by S. ZHANG. Edtion ed. London: CRC Press, 2011. ISBN 143984996X.
- 98 MASSARO, C., P. ROTOLO, F. DE RICCARDIS, E. MILELLA, et al. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2002, 13(6), 535-548.

- 99 TRISI, P., C. MARCATO a M. TODISCO. Bone-to-implant apposition with machined and MTX microtextured implant surfaces in human sinus grafts. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2003, 23(5), 427-437.
- 100 SMEETS, R., B. STADLINGER, F. SCHWARZ, B. BECK-BROICHSITTER, et al. Implant surface modification and osseointegration - Past, present and future. *BioMed Research International*, 2016, 2016(8), 113-118.
- 101 YOKOYAMA, K. I., T. ICHIKAWA, H. MURAKAMI, Y. MIYAMOTO, et al. Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implant. *Biomaterials*, 2002, 23(12), 2459-2465.
- 102 KIM, H., S.-H. CHOI, J.-J. RYU, S.-Y. KOH, et al. The biocompatibility of SLA-treated titanium implants. *Biomedical Materials*, 2008, 3(2), 025011-.
- 103 MONETTA, T. a F. BELLUCCI The effect of sand-blasting and hydrofluoric acid etching on Ti CP2 and Ti CP4 surface topography. *Open Journal of Regenerative Medicine*, 2012, 01(03), 41-50.
- 104 GOEL, M., R. MEHTA, A. KUMAR, G. BHAYANA, et al. Implant Surface Modification and Osseointegration-Past, Present and Future. *Journal of Oral Health & Community Dentistry*, 2014, 8(2), 113-118.
- 105 CHAKRAVORTY, N., A. JAIPRAKASH, S. IVANOVSKI a Y. XIAO. Implant Surface Modifications and Osseointegration. *Biomaterials for Implants and Scaffolds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, 107-131.
- 106 CIRANO, F. R., A. Y. TOGASHI, M. M. MARQUES, F. E. PUSTIGLIONI, et al. The Effects of Different Titanium Surfaces on the Behaviour of Osteoblast-Like Cells. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 2015, 8(6), 380-388. ISSN 1937-6871.
- 107 SUL, Y.-T., C. B. JOHANSSON, K. RÖSER a T. ALBREKTSSON Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomaterials*, 2002, 23(8), 1809-1817.
- 108 ROCCI, A., M. MARTIGNONI a J. GOTTLLOW Immediate loading of Branemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2003, 5, 57-63.
- 109 ZHAO, L., L. LIU, Z. WU, Y. ZHANG, et al. Effects of micropitted/nanotubular titania topographies on bone mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biomaterials*. 2012, 33(9), 2629-2641. ISSN 01429612.
- 110 ULERICH, J., L. IONESCU, J. CHEN, W. SOBOYEJO, et al. Modifications of Ti-6Al-4V surfaces by direct-write laser machining of linear grooves. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 2007, 6458.
- 111 BABUSKA, V., J. PALAN, J. KOLAJA DOBRA, V. KULDA, et al. Proliferation of Osteoblasts on Laser-Modified Nanostructured Titanium Surfaces. *Materials*. 2018, 11(10). ISSN 1996-1944.
- 112 CHAUVY, P. F., P. HOFFMANN a D. LANDOLT. Applications of laser lithography on oxide film to titanium micromachining. *Applied Surface Science*. 2003, 208-209(165-170). ISSN 01694332.
- 113 SOBOYEJO, W. O., C. MERCER, S. ALLAMEH, B. NEMETSKI, et al. Multi-Scale Microstructural Characterization of Micro-Textured Ti-6Al-4V Surfaces. *Key Engineering Materials*. 2001, 198-199(203-230). ISSN 1662-9795.
- 114 SHISHKOVSKY, I. V., M. V. KUZNETSOV a Y. G. MOROZOV. Porous titanium and nitinol implants synthesized by SHS/SLS. *International Journal of Self-Propagating High-Temperature Synthesis*. 2010, 19(2), 157-167. ISSN 1061-3862.
- 115 VINEY, C. Chapter I.1.3 - Bulk Properties of Materials. B.D. RATNER, A.S. HOFFMAN, F.J. SCHOEN AND J.E. LEMONS eds. *Biomaterials Science (Third Edition)*. Academic Press, 2013, 9-21.

- 116 LI, L.-H., Y.-M. KONG, H.-W. KIM, Y.-W. KIM, et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials*, 2004, 25(14), 2867-2875.
- 117 TELLEMAN, G., T. ALBREKTSSON, M. HOFFMAN, C. B. JOHANSSON, et al. Peri-Implant Endosseous Healing Properties of Dual Acid-Etched Mini-Implants with a Nanometer-Sized Deposition of CaP: A Histological and Histomorphometric Human Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2010, 12(2), 153-160.
- 118 YU-LIANG, C., D. LEW, J. B. PARK a J. C. KELLER Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying crystallinity. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1999, 57(9), 1096-1108.
- 119 MARTINI, D., M. FINI, M. FRANCHI, V. D. PASQUALE, et al. Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants. *Biomaterials*, 2003, 24(7), 1309-1316.
- 120 HENCH, L. L. a J. K. WEST. The sol-gel process. *Chemical Reviews*. 1990, 90(1), 33-72. ISSN 0009-2665.
- 121 WARD, D. A. a E. I. KO. Preparing Catalytic Materials by the Sol-Gel Method. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 1995, 34(2), 421-433. ISSN 0888-5885.
- 122 KANDIMALLA, V. B., V. S. TRIPATHI a H. JU. CHAPTER 16 - Biosensors based on immobilization of biomolecules in sol-gel matrices. X. ZHANG, H. JU AND J. WANG eds. *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. San Diego: Academic Press, 2008, 503-529.
- 123 TAHMASBI RAD, A. a S. FAGHIHI On the Relation Between Surface Texture of Metallic Implants and Their Bioactivity. *Surface Innovations*, 2019, 7, 1-31.
- 124 LAVENUS, S., V. TRICHET, S. LE CHEVALIER, A. HOORNAERT, et al. Cell differentiation and osseointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces. *Nanomedicine (Lond)*, 2012, 7(7), 967-980.
- 125 BOLLMAN, M., R. MALBRUE, C. LI, H. YAO, et al. Improvement of osseointegration by recruiting stem cells to titanium implants fabricated with 3D printing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2019, 1463(1).
- 126 YU, M., W. ZHOU, Y. SONG, F. YU, et al. Development of mesenchymal stem cell-implant complexes by cultured cells sheet enhances osseointegration in type 2 diabetic rat model. *Bone*, 2011, 49(3), 387-394.
- 127 SUSHMITA, V., J. CHETHAN KUMAR, C. HEGDE a B. KURKALLI Interaction of dental pulp stem cells in bone regeneration on titanium implant. An in vitro study. *Journal of Osseointegration*, 2019, 11(4), 553-560.
- 128 HAMIDOUCHE, Z., E. HAY, P. VAUDIN, P. CHARBORD, et al. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *Faseb j*, 2008, 22(11), 3813-3822.
- 129 FRANCESCHI, R. T., C. GE, G. XIAO, H. ROCA, et al. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs*, 2009, 189(1-4), 144-152.
- 130 XIAO, G., R. GOPALAKRISHNAN, D. JIANG, E. REITH, et al. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(1), 101-110.
- 131 LIEDERT, A., D. KASPAR, P. AUGAT, A. IGNATIUS, et al. Mechanobiology of Bone Tissue and Bone Cells. A. KAMKIN ed. *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*. Moscow: Academia, 2005.
- 132 EHRLICH, P. J. a L. E. LANYON Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int*, 2002, 13(9), 688-700.

- 133 VEZERIDIS, P. S., C. M. SEMEINS, Q. CHEN a J. KLEIN-NULEND Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 348(3), 1082-1088.
- 134 YOU, L., S. TEMIYASATHIT, P. LEE, C. H. KIM, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone*, 2008, 42(1), 172-179.
- 135 SHIH, Y. R., K. F. TSENG, H. Y. LAI, C. H. LIN, et al. Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(4), 730-738.
- 136 TAYLOR, A. F., M. M. SAUNDERS, D. L. SHINGLE, J. M. CIMBALA, et al. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, 292(1), C545-C552.
- 137 FUKADA, E. a I. YASUDA On the Piezoelectric Effect of Bone. *Journal of the Physical Society of Japan*, 1957, 12, 1158-1162.
- 138 FUKADA, E. a I. YASUDA Piezoelectric Effects in Collagen. *Japanese Journal of Applied Physics*, 1964, 3, 117.
- 139 HASTINGS, G. W. a F. A. MAHMUD The electromechanical properties of fluid-filled bone: A new dimension. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1991, 2(2), 118-124.
- 140 RAMTANI, S. Electromechanics of bone remodelling. *International Journal of Engineering Science - INT J ENG SCI*, 2008, 46, 1173-1182.
- 141 FERNANDEZ, J. R., J. M. GARCIA-AZNAR a R. MARTINEZ Piezoelectricity could predict sites of formation/resorption in bone remodelling and modelling. *J Theor Biol*, 2012, 292, 86-92.
- 142 MOREL, J., B. COMBE, J. FRANCISCO a J. BERNARD Bone mineral density of 704 amateur sportsmen involved in different physical activities. *Osteoporos Int*, 2001, 12(2), 152-157.
- 143 JUDEX, S., S. GUPTA a C. RUBIN Regulation of mechanical signals in bone. *Orthod Craniofac Res*, 2009, 12(2), 94-104.
- 144 BROWN, T. D. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of Biomechanics*, 2000, 33(1), 3-14.
- 145 EGGER, D., C. TRIPISCIANO, V. WEBER, M. DOMINICI, et al. Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Bioengineering*, 2018, 5, 48.
- 146 HESS, R., T. DOUGLAS, K. A. MYERS, B. RENTSCH, et al. Hydrostatic pressure stimulation of human mesenchymal stem cells seeded on collagen-based artificial extracellular matrices. *J Biomech Eng*, 2010, 132(2), 021001.
- 147 KASPAR, D., W. SEIDL, C. NEIDLINGER-WILKE, A. BECK, et al. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *J Biomech*, 2002, 35(7), 873-880.
- 148 STAVENSCHI, E., M. A. CORRIGAN, G. P. JOHNSON, M. RIFFAULT, et al. Physiological cyclic hydrostatic pressure induces osteogenic lineage commitment of human bone marrow stem cells: a systematic study. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1), 276.
- 149 HORNER, C. B., K. HIROTA, J. LIU, M. MALDONADO, et al. Magnitude-dependent and inversely-related osteogenic/chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under dynamic compressive strain. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(2), e637-e647.
- 150 VUNJAK-NOVAKOVIC, G., K. O. LUI, N. TANDON a K. R. CHIEN Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine. *Annual review of biomedical engineering*, 2011, 13, 245-267.
- 151 GUO, Y., Y. WANG, Y. LIU, H. WANG, et al. Effect of the same mechanical loading on osteogenesis and osteoclastogenesis in vitro. *Chinese Journal of Traumatology*, 2015, 18(3), 150-156.
- 152 FRIEDL, G., H. SCHMIDT, I. REHAK, G. KOSTNER, et al. Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2007, 15(11), 1293-1300.

- 153 GOLDMAN, S. M. a G. A. BARABINO Hydrodynamic loading in concomitance with exogenous cytokine stimulation modulates differentiation of bovine mesenchymal stem cells towards osteochondral lineages. *BMC biotechnology*, 2016, 16, 10-10.
- 154 HUANG, C. a R. OGAWA Effect of hydrostatic pressure on bone regeneration using human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(19-20), 2106-2113.
- 155 LIU, W., Z. ZHAO, C. LE, L. ZOU, et al. Hydrostatic pressures promote initial osteodifferentiation with ERK1/2 not p38 MAPK signaling involved. *Journal of cellular biochemistry*, 2009, 107, 224-232.
- 156 GARDINIER, J. D., S. MAJUMDAR, R. L. DUNCAN a L. WANG Cyclic Hydraulic Pressure and Fluid Flow Differentially Modulate Cytoskeleton Re-Organization in MC3T3 Osteoblasts. *Cell Mol Bioeng*, 2009, 2(1), 133-143.
- 157 ZHAO, Y.-H., X. LV, Y.-L. LIU, Y. ZHAO, et al. Hydrostatic pressure promotes the proliferation and osteogenic/chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: The roles of RhoA and Rac1. *Stem Cell Research*, 2015, 33.
- 158 MCMULLEN, S., E. MAGGIO, N. MILLARD, A. DENNIS, et al. Development and verification of a hydrostatic pressure chamber for determining the effect of pressure on liver progenitor cells. *Biomed Sci Instrum*, 2014, 50, 68-76.
- 159 TANIKAKE, Y., M. AKAHANE, A. FURUKAWA, Y. TOHMA, et al. Calcium Concentration in Culture Medium as a Nondestructive and Rapid Marker of Osteogenesis. *Cell Transplantation*, 2017, 26(6), 1067-1076.
- 160 IM, G., II, Y.-W. SHIN a K.-B. LEE Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and Cartilage*, 2005, 13(10), 845-853.
- 161 GROTTKAU, B. E. a Y. LIN Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells. *Bone research*, 2013, 1(2), 133-145.
- 162 AUQUIER, P., G. MACQUART-MOULIN, J. P. MOATTI, J. L. BLACHE, et al. Comparison of anxiety, pain and discomfort in two procedures of hematopoietic stem cell collection: leukocytapheresis and bone marrow harvest. *Bone Marrow Transplant*, 1995, 16(4), 541-547.
- 163 VANDROVCOVA, M., J. HANUS, M. DRABIK, O. KYLIAN, et al. Effect of different surface nanoroughness of titanium dioxide films on the growth of human osteoblast-like MG63 cells. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100(4), 1016-1032.
- 164 PIVODOVA, V., J. FRANKOVA, P. DOLEZEL a J. ULRICHOVA The response of osteoblast-like SaOS-2 cells to modified titanium surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 2013, 28(5), 1386-1394.
- 165 KALBACOVA, M., B. REZEK, V. BARESOVA, C. WOLF-BRANDSTETTER, et al. Nanoscale topography of nanocrystalline diamonds promotes differentiation of osteoblasts. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5(8), 3076-3085.
- 166 GODDARD, J. M. a J. H. HOTCHKISS Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 2007, 32(7), 698-725.
- 167 XU, L.-C. a C. A. SIEDLECKI Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 2007, 28(22), 3273-3283.
- 168 WEI, J., T. IGARASHI, N. OKUMORI, T. IGARASHI, et al. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater*, 2009, 4(4), 045002.
- 169 PRZEKORA, A., M. VANDROVCOVA, M. TRAVNICKOVA, J. PAJOROVA, et al. Evaluation of the potential of chitosan/ β -1,3-glucan/hydroxyapatite material as a scaffold for living bone graft production in vitro by comparison of ADSC and BMDSC behaviour on its surface. *Biomed Mater*, 2017, 12(1), 015030.
- 170 ZHAO, L., S. MEI, P. K. CHU, Y. ZHANG, et al. The influence of hierarchical hybrid micro/nano-textured titanium surface with titania nanotubes on osteoblast functions. *Biomaterials*, 2010, 31(19), 5072-5082.

- 171 GITTENS, R. A., T. MCLACHLAN, R. OLIVARES-NAVARRETE, Y. CAI, et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*, 2011, 32(13), 3395-3403.
- 172 MOON, B. S., S. KIM, H. E. KIM a T. S. JANG Hierarchical micro-nano structured Ti6Al4V surface topography via two-step etching process for enhanced hydrophilicity and osteoblastic responses. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 73, 90-98.
- 173 WALBOOMERS, X. F., S. E. ELDER, J. D. BUMGARDNER a J. A. JANSEN Hydrodynamic compression of young and adult rat osteoblast-like cells on titanium fiber mesh. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 76(1), 16-24.
- 174 PEPPAS, N., J. HILT, A. KHADEMHOSEINI a R. LANGER Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials - ADVAN MATER*, 2006, 18.
- 175 TAKAI, E., R. L. MAUCK, C. T. HUNG a X. E. GUO Osteocyte viability and regulation of osteoblast function in a 3D trabecular bone explant under dynamic hydrostatic pressure. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(9), 1403-1410.
- 176 LEE, K. Y. a D. J. MOONEY Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*, 2001, 101(7), 1869-1879.
- 177 HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(1), 3-12.
- 178 DINESCU, S., M. ALBU KAYA, L. CHITOIU, S. IGNAT, et al. Collagen-Based Hydrogels and Their Applications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. M.I.H. MONDAL ed. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*. Cham: Springer International Publishing, 2019, 1643-1664.
- 179 WANG, X. a C. LIU Fibrin Hydrogels for Endothelialized Liver Tissue Engineering with a Predesigned Vascular Network. *Polymers*, 2018, 10(10), 1048.
- 180 LITVINOV, R. I. a J. W. WEISEL Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 2017, 60-61, 110-123.
- 181 DUONG, H., B. WU a B. TAWIL Modulation of 3D fibrin matrix stiffness by intrinsic fibrinogen-thrombin compositions and by extrinsic cellular activity. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(7), 1865-1876.
- 182 DAWSON, E., G. MAPILI, K. ERICKSON, S. TAQVI, et al. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(2), 215-228.

Příloha A: Vlastní publikace autora

Výstupy související s tématem DP:

Články s IF

STEPANOVSKA, J., R. MATEJKA, M. OTAHAL, J. ROSINA a L. BACAKOVA. The Effect of Various Surface Treatments of Ti6Al4V on the Growth and Osteogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Coatings*, 2020, 10(8).

STEPANOVSKA, J., R. MATEJKA, J. ROSINA, L. BACAKOVA a H. KOLAROVA. Treatments for enhancing the biocompatibility of titanium implants. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2020, 164(1), 23-33.

Užitné vzory

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství. Programovací přepínací systém pro distribuci tlakového namáhání. Původci: ŠTĚPANOVSKÁ, J., R. MATĚJKA, M. MAXMILIAN, J. ROSINA a P. KNEPPO. Česká republika. Užitný vzor, ve fázi zapsání na ÚPV, č.j. 0056/20/51940

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, Fyziologický ústav AV ČR. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci buněk na planárních substrátech. Původci: ŠTĚPANOVSKÁ, J., R. MATĚJKA, J. ROSINA, P. KNEPPO, M. VANDROVCOVÁ a L. BAČÁKOVÁ. Česká republika. Užitný vzor, ve fázi zapsání na ÚPV, č.j. 0055/20/51940

České vysoké učení technické v Praze, Institut klinické a experimentální medicíny. Mikroperfuzní systém s tlakovou stimulací pro sterilní dynamickou kultivaci buněk. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSKÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK. Česká republika Užitný vzor 33917.14.4.2020.

České vysoké učení technické v Praze, Fyziologický ústav AVČR, v.v.i., Institut klinické a experimentální medicíny. Kultivační komora pro tlakovou stimulaci v kultivačních jamkách. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSKÁ, Š. PRAŽÁK, L. BAČÁKOVÁ, P. KNEPPO, M. KOŇAŘÍK, J. CHLUPÁČ a J. PIRK. Česká republika Užitný vzor 33916.14.4.2020.

Příspěvky ve sborníku (konference)

ŠTĚPANOVSÁ, J., R. MATĚJKA, L. BAČÁKOVÁ a J. ROSINA. Simulace podmínek v bioreaktoru pro osteogenezi mezenchymálních kmenových buněk. In *Bioimplantologie*. Brno, ČR: ČVUT, 2018.

ŠTĚPANOVSÁ, J., R. MATĚJKA, L. BAČÁKOVÁ, J. ROSINA a P. KNEPPO. Fibrinové gely s různou tuhostí pro vývoj a diferenciaci kmenových buněk. In *Bioimplantologie*. Brno, ČR: ČVUT, 2019.

Výstupy s aplikací výsledků DP:

Články s IF

MATĚJKA, R., M. KOŇAŘÍK, J. ŠTĚPANOVSÁ, J. LIPENSKÝ, J. CHLUPÁČ, D. TUREK, Š. PRAŽÁK, A. BROŽ, Z. ŠIMŮNKOVÁ, I. MRÁZOVÁ, S. FOROSTYAK, P. KNEPPO, J. ROSINA, L. BAČÁKOVÁ a J. PIRK. Bioreactor Processed Stromal Cell Seeding and Cultivation on Decellularized Pericardium Patches for Cardiovascular Use. *Applied Sciences*, 2020, 10(16).

BACAKOVA, L., J. PAJOROVA, M. TOMKOVA, R. MATEJKA, A. BROZ, J. STEPANOVSKA, S. PRAZAK, A. SKOGBERG, S. SILJANDER a P. KALLIO. Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(2).

Kapitoly v knihách

BACAKOVA, L., M. TRAVNICKOVA, E. FILOVA, R. MATEJKA, J. STEPANOVSKA, J. MUSILKOVA, J. ZARUBOVA a M. MOLITOR. Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) in Blood Vessel Tissue Engineering: The Use of Differentiated Cells or Stem Cells as VSMC Precursors. K. SAKUMA ed. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. IntechOpen, 2018.

BACAKOVA, L., M. ZIKMUNDOVA, J. PAJOROVA, A. BROZ, E. FILOVA, A. BLANQUER, R. MATEJKA, J. STEPANOVSKA, P. MIKES, V. JENCOVA, E. K. KOSTAKOVA a A. SINICA. Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Based on Synthetic Polymers. M.S.A.R. ZLATEV ed. *Applications of Nanobiotechnology*. IntechOpen, 2019.

Ostatní výstupy:

Články s IF

PROCHAZKA, V., R. MATEJKA, T. IZAK, O. SZABO, J. STEPANOVSKA, E. FILOVA, L. BACAKOVA, V. JIRASEK a A. KROMKA. Nanocrystalline diamond-based impedance sensors for real-time monitoring of adipose tissue-derived stem cells. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2019, 177, 130-136.

Filova, E., Steinerova, M., Travnickova, M., Knitlova, J., Musilkova, J., Eckhardt, A., Hadraba, D., Matejka R., Prazak, S., Stepanovska, J., Kucerova, J., Riedel, T., Brynda, E., Lodererova, A., Honsova, E., Pirk J., Konarik, M., Bacakova, L. Accelerated in vitro recellularization of decellularized porcine pericardium for cardiovascular grafts. *Biomedical materials*, 2020. (Dosud nepublikováno, manuscript přijat X/2020).

Recenzované časopisy

VRANOVA, J., R. MATĚJKA, J. STEPANOVSKA, L. KOLOMAZNÍKOVÁ a J. ROSINA. Fantom pro diagnostický ultrazvuk a dopplerovské vyšetření. *Lekar a Technika*, 2013, 42, 23-27.

Užitné vzory

České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Systém pro rotační endotelizaci cévních protéz. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ a J. ZÁRUBOVÁ. Česká Republika Užitný vzor 31066.3.10.2017.

České vysoké učení technické v Praze, Národní Centrum Tkání a Buněk a.s., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro dynamickou kultivaci buněk na tubulárních nosičích. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. ROSINA, D. HRŮZOVÁ, J. ZÁRUBOVÁ a E. FILOVÁ. Česká Republika Užitný vzor 30441.7.3.2017.

České vysoké učení technické v Praze, Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i., Fyziologický ústav AVČR, v. v. i. Kultivační komora pro stimulaci planárních vzorků decelularizovaného perikardu. Původci: MATĚJKA, R., J. ŠTĚPANOVSKÁ, J. ROSINA, P. KNEPPO, E. BRYNDA, T. RIEDEL, E. FILOVÁ, M. TRÁVNÍČKOVÁ, J. ZÁRUBOVÁ a Z. RIEDELOVA. Česká republika Užitný vzor 30705.30.5.2017.

Fyzikální ústav AV ČR. v. v. i., Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i. Kultivační komora pro in-vitro opticko-elektrické monitorování biologických kultur s impedančními

opticky-transparentními diamantovými elektrodami. Původci: MATĚJKA, R., V. PROCHÁZKA, T. IŽÁK, J. ŠTĚPANOVSÁ, A. KROMKA, M. TRÁVNÍČKOVÁ a L. BAČÁKOVÁ. Česká republika Užitný vzor 30691.15.5.2017.

Kapitoly v knihách

BACAKOVA, L., M. TRAVNICKOVA, E. FILOVA, R. MATĚJKA, J. STEPANOVSKA, J. MUSILKOVA, J. ZARUBOVA a M. MOLITOR. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. K. SAKUMA ed. Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field. IntechOpen, 2018.

Příspěvky ve sborníku (konference)

MATEJKA, R., J. ROSINA, E. FILOVA, J. HAVLIKOVA, J. CHLUPAC a J. STEPANOVSKA. Automated dynamic bioreactor for 2D endothelial structures. In 2013 E-Health and Bioengineering Conference, EHB 2013. 2013.

PROCHÁZKA, V., R. MATĚJKA, T. IŽÁK, O. SZABÓ, J. ŠTĚPANOVSÁ, L. BAČÁKOVÁ a A. KROMKA. Real-Time Monitoring of Stem Cells by Diamond-Based Impedance Sensors. Proceedings, 2017, 1(4).

Příloha B: Signifikance výsledků experimentů

Legenda: + statisticky významný

- statisticky nevýznamný

Kapitola 5

	GL	PL	DLC	BR	AND	BL		GL	PL	DLC	BR	AND	BL			
11A	x	+	+	+	+	+	GL	11B	x	-	+	-	+	-	GL	
		x	-	+	+	+	PL			x	+	-	+	-	PL	
			x	+	+	+	DLC				x	+	+	+	DLC	
				x	-	+	BR					x	+	-	BR	
					x	+	AND						x	-	AND	
						x	BL							x	BL	
13A		3D	x													
	GL	6D		x												
		8D			x											
		3D	-			x										
	PL	6D		+			x									
		8D			+			x								
		3D	+			-			x							
	DLC	6D		+		+				x						
		8D			+		+				x					
		3D	-			-		-				x				
	BR	6D		+		+		-					x			
		8D			+		+		-					x		
		3D	-			-		-							x	
	AND	6D		+		+		-		-						
		8D			+		+		-							
		3D	+			+		-		+						
	BL	6D		+		-		-		-						
		8D			+		+		-		-					
		3D	6D	8D	3D	6D	8D	3D	6D	8D	3D	6D	8D	3D	6D	8D
			GL			PL			DLC		BR		AND		BL	

13B	3D	x																
	GL	6D	x															
		8D		x														
	3D	+			x													
	PL	6D	+			x												
		8D		+			x											
	3D	+			+			x										
	DLC	6D	+			+			x									
		8D		+			+			x								
	3D	+			-		+				x							
	BR	6D	+			+		+				x						
		8D		+			+		+				x					
	3D	+			+		-		+					x				
	AND	6D	+			+		+		-					x			
		8D		+			+		+		+					x		
	3D	+			+		+		+			+					x	
	BL	6D	+			+		+		+		+		+				x
		8D		+			+		+		+		+		+			
			3D	6D	8D	3D	6D	8D	3D	6D	8D	3D	6D	8D	3D	6D	8D	
				GL			PL			DLC			BR		AND			BL

16	3D	x																
	GL	6D		x														
		8D			x													
	3D	+				x												
	PL	6D		-			x											
		8D			-			x										
	3D	+				-			x									
	DLC	6D			-					x								
		8D			+			-			x							
	3D	+				-						x						
	BR	6D		+			-						x					
		8D			+			-						x				
	3D	+				-									x			
	AND	6D			-			-								x		
		8D				+			-								x	
	3D	+				-												x
	BL	6D			-			-										
		8D			+			-										
			3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	
			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
				GL			PL			DLC			BR		AND			BL

17A
(RUNX2
)

	3D	x																	
GL	6D	x																	
	8D		x																
	3D	+		x															
PL	6D		+		x														
	8D			+		x													
	3D	+			+		x												
DLC	6D		+		+			x											
	8D			+		+			x										
	3D	+			+		-			x									
BR	6D		+		+			+			x								
	8D			-		+			+			x							
	3D	+			+		-			+			x						
AN	6D		+		+			+			+			x					
D	8D			+		+			+			-			x				
	3D	+			-		+			-			+				x		
BL	6D		+		+			+		+				-				x	
	8D			+		+			+		+				+			x	
		3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8
		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
			GL			PL			DLC		BR		AND					BL	

17B (ALP)

	3D	x																	
GL	6D	x																	
	8D		x																
	3D	+		x															
PL	6D		-		x														
	8D			+		x													
	3D	+			+		x												
DLC	6D		+		+			x											
	8D			+		+			x										
	3D	+			+		-			x									
BR	6D		+		+			+			x								
	8D			+		+			+			x							
	3D	+			+		-			-			x						
AN	6D		+		+			-			-			x					
D	8D			+		+			+			-			x				
	3D	+			+		-			-							x		
BL	6D		+		+			-			+			-				x	
	8D			+		+			+			-			-			x	
		3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8
		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

		GL	PL	DLC	BR	AND	BL									
17C (COL I)	GL	3D	x													
		6D		x												
		8D			x											
	PL	3D	-		x											
		6D	-			x										
		8D	-				x									
	DLC	3D	-	-		x										
		6D	-	-			x									
		8D	-	-	-			x								
	BR	3D	-	-	-		x									
		6D	-	-	-			x								
		8D	-	-	-	-			x							
	AND	3D	-	-	-	-			x							
		6D	-	-	-	-				x						
		8D	-	-	-	-	-				x					
	BL	3D	-	-	-	-	-					x				
		6D	-	-	-	-	-	-					x			
		8D	-	-	-	-	-	-	-						x	
		3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8
		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
			GL		PL		DLC		BR		AND		BL			

		GL	PL	DLC	BR	AND	BL							
17D (OPN)	GL	6D	x											
		8D		x										
	PL	6D	-		x									
		8D	+			x								
	DLC	6D	+	+		x								
		8D	+	+			x							
	BR	6D	+	+	+		x							
		8D	+	+	+			x						
	AND	6D	+	+	+	-		x						
		8D	+	+	+	-			x					
	BL	6D	+	+	+	-	-		x					
		8D	+	+	+	-	-			x				
			6D	8D	6D	8D	6D	8D	6D	8D	6D	8D		
				GL		PL		DLC		BR		AND		BL

17E
(OCN)

GL	6D	x																
	8D		x															
PL	6D	-		x														
	8D		+		x													
DLC	6D	+		+		x												
	8D		+		+		x											
BR	6D	+		+		+		x										
	8D		+		+		+		x									
AND	6D	+		+		-		-		x								
	8D		+		+		+		-		x							
BL	6D	+		+		-		-		-		x						
	8D		+		+		+		-		-		x					
		6	8	6D	8D	6D	8D	6D	8D	6D	8D	6D	8D	6D	8D			
		D	D															
				GL		PL		DLC		BR		AND		BL				

18A (Ca)

GL	3D	x																
	6D		x															
PL	8D			x														
	3D	-			x													
DLC	6D	-			x													
	8D		-			x												
BR	3D	+		+			x											
	6D		+					x										
AND	8D		-			+			x									
	3D	-		-			+			x								
BL	6D	-		+				+			x							
	8D		-			+			-			+		x				
	3D	+		+			+			+		+			x			
	6D		+		+			-			+		-			x		
	8D			-		+			-			+		-			x	
		3	6	8	3	6	8D	3D	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6
		D	D	D	D	D			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
				GL		PL		DLC		BR		AND		BL				

18A
(ALPa)

	3D	x																	
GL	6D		x																
	8D			x															
	3D	+			x														
PL	6D		+			x													
	8D			+			x												
	3D	+			-			x											
DLC	6D		+		-				x										
	8D			+		+				x									
	3D	+			+			+			x								
BR	6D		+			+			+			x							
	8D			+			+			+			x						
	3D	+			+			+			-			x					
AN	6D		+		-			+			+				x				
D	8D			+		+			+			+				x			
	3D	+			+			+			+		+				x		
BL	6D		+			+			+		+		+					x	
	8D			+			+			+		+		+					x
		3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8
		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
			GL			PL			DLC			BR		AND				BL	

Kapitola 6

25	2DS	x	+	F1S	x														
	2DD	+	x	F1D	+	x													
	2DS	2DD		F5S	+	+	x												
				F5D	+	+	+	x											
					F1S	F1D	F5S	F5D											

26	2DS	x	+	F1S	x														
	2DD	+	x	F1D	+	x													
	2DS	2DD		F5S	+	+	x												
				F5D	+	+	+	x											
					F1S	F1D	F5S	F5D											

28	2DS	x	+	F1S	x														
	2DD	+	x	F1D	+	x													
	2DS	2DD		F5S	+	+	x												
				F5D	+	+	+	x											
					F1S	F1D	F5S	F5D											

29									
(RUNX2)	2DS	x	+	F1S	x				
	2DD	+	x	F1D	+	x			
	2DS		2DD	F5S	-	+	x		
				F5D	+	+	+	x	
				F1S	F1D	F5S	F5D		
29 (ALP)	2DS	x	+	F1S	x				
	2DD	+	x	F1D	+	x			
	2DS		2DD	F5S	-	+	x		
				F5D	+	+	+	x	
				F1S	F1D	F5S	F5D		
29 (COL I)	2DS	x	-	F1S	x				
	2DD	-	x	F1D	-	x			
	2DS		2DD	F5S	-	-	x		
				F5D	-	-	-	x	
				F1S	F1D	F5S	F5D		
29 (OPN)	2DS	x	+	F1S	x				
	2DD	+	x	F1D	+	x			
	2DS		2DD	F5S	-	+	x		
				F5D	+	+	+	x	
				F1S	F1D	F5S	F5D		
29 (OCN)	2DS	x	+	F1S	x				
	2DD	+	x	F1D	+	x			
	2DS		2DD	F5S	-	+	x		
				F5D	+	+	+	x	
				F1S	F1D	F5S	F5D		
30 (Ca)	2DS	x	+	F1S	x				
	2DD	+	x	F1D	+	x			
	2DS		2DD	F5S	-	+	x		
				F5D	+	+	+	x	
				F1S	F1D	F5S	F5D		
30 (ALP)	2DS	x	+	F1S	x				
	2DD	+	x	F1D	+	x			
	2DS		2DD	F5S	+	+	x		
				F5D	+	+	+	x	
				F1S	F1D	F5S	F5D		

Příloha C: Obsah CD

Příložené CD obsahuje následující položky:

Dizertační práci ve formátu PDF

Teze dizertační práce ve formátu PDF

Elektronické verze vybraných publikací autora