

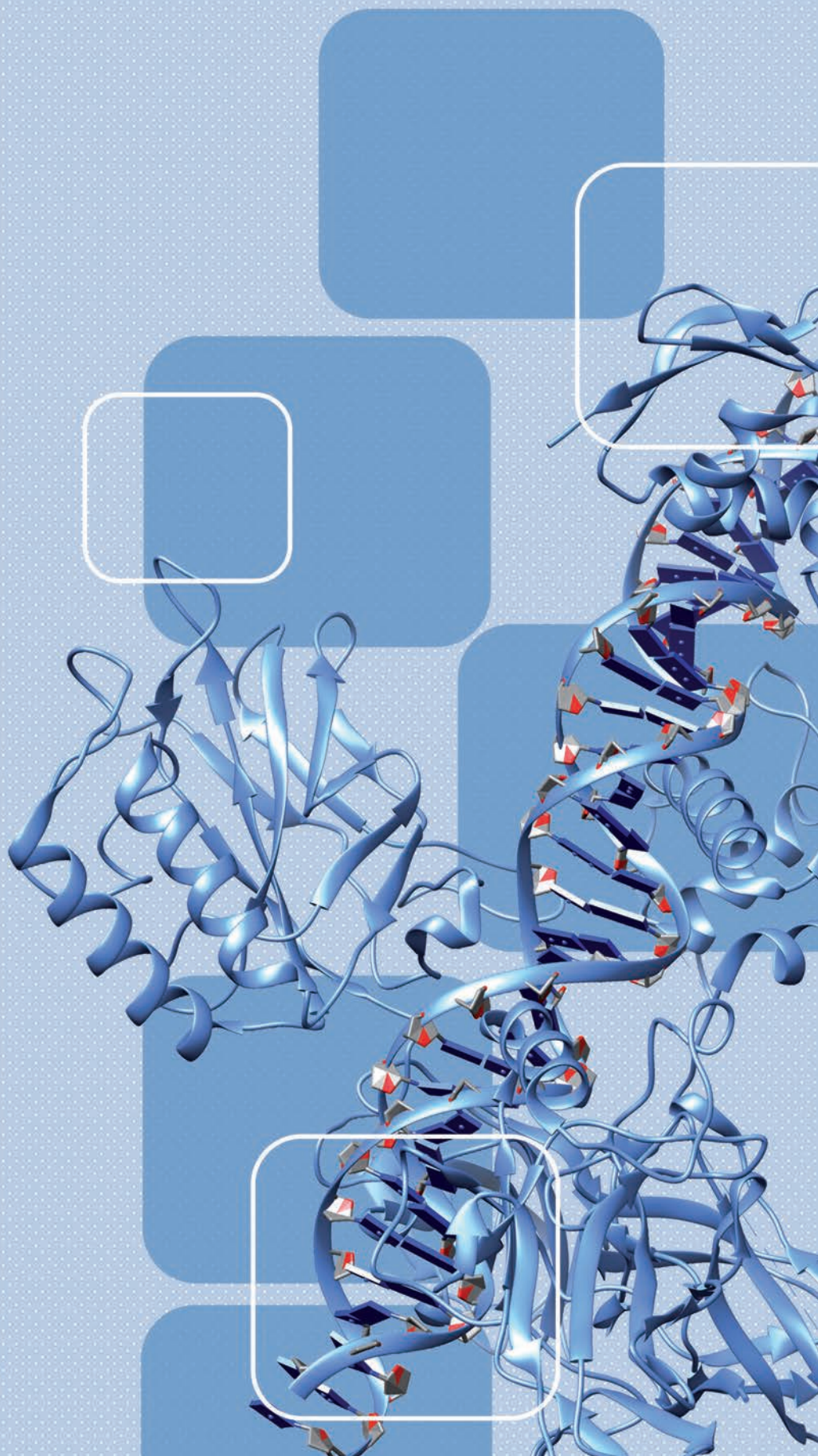
Bio

Ročník 25 • Číslo 2/2015

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)
a
člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

and

**member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 443 028

e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

Jak jste jistě zaznamenali, na květnovém semináři jsme si připomněli 25 let naší společnosti i zahájení publikování našeho časopisu Biopropect. Ve druhém čísle prvního ročníku Biopropectu jsme, mimo jiné, publikovali přehled o založení 14 sekcí biotechnologií. Dovolujeme si zde uvést jejich protagonisty a připomenout si zde jména těch, kteří stáli u zrodu naší společnosti.

1. Přenos embryí:

doc. MUDr. František Jílek, DrSc., VÚ živočišné výroby, Praha - Uhřetěves

2. Biologické rozpoznávání (Člen International Recognition Group):

Ing. Jaroslava Turková, DrSc., ÚOCHB ČSAV, Praha
RNDr. Ljuba Rexová, DrSc. Chemický ústav, SAV, Bratislava

3. Rostlinné biotechnologie:

RNDr. Zdeněk Opatrný, CSc., VÚ rostlinné výroby, Praha – Ruzyně

4. Potravinářské biotechnologie:

Ing. Jiří Kučera, CSc., VÚ potravinářského průmyslu, Praha
Ing. Valovičová, VÚ potravinářsky, Bratislava

5. Lékařské biotechnologie:

doc. MUDr. Evžen Weigl, CSc., Biotechnologický ústav, Lékařská fakulta, Universita Palackého, Olomouc

6. Přístrojová technika biotechnologií:

Ing. Vladimír Sláma, ÚCHTZ Brno, Křižíkova 70, Brno 602 00
doc. Ing. František Kaštánek, DrSc., Ústav teoretických základů chem. techniky, ČSAV, Praha - Suchdol

7. Podnikatelská skupina:

RNDr. Karel Zelený, CSc., Slušovice

8. Farmaceutické biotechnologie:

RNDr. Jiří Plachý, DrSc. VÚAB Roztoky u Prahy
Ing. Zdenko Zibrin, Biotika, Slovenská Lupča

9. Výchova, výuka, kursy v biotechnologiích:

doc. RNDr. Jaroslav Drobník, Biotechnologický ústav UK, Praha
doc. RNDr. Miloslav Kocúr, CSc., PF, Masarykova univerzita, Brno
doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc., CHF – Slovenská Technická univerzita, Bratislava

10. Biotechnologické informace:

Ing. Václav Štulík, UVTEI, Praha
Ing. Miloš Chlouba, VÚ LIKO, Bratislava

11. Bioanalytické metody:

RNDr. Milan Fránek, CSc., VU veterinárního lékařství, Brno
prof. Ing. Stanislav Miertuš, DrSc., CHF - Slovenská Technická univerzita, Bratislava

12. Separační techniky:

RNDr. Tomáš Vaněk, CSc., ÚOCHB ČSAV, Praha
RNDr. Gabriel Halát, CSc., Ústav neurobiologie, CFUSAV, Košice

13. Technologie genových manipulací:

doc. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc., ÚMG, ČSAV, Praha

14. Biotechnologie v ekologii:

Ing. Bořivoj Šarapatka, CSc., Katedra ekologie PF UP, Olomouc
doc. Ing. Mečislav Kuraš, CSc., VŠCHT, Praha

Bohužel velké změny, které zasáhly strukturu naší biotechnologické základny (zánik mnoha výrobních podniků či změny v jejich zaměření, zrušení rezortních výzkumných ústavů, transformace v oblasti zemědělství, vysokých škol i ústavů ČSAV i rozdělení Československa), nové výzvy i možnosti v personálních oblastech a další okolnosti obecně utlumily zájem mnoha lidí o spolkovou činnost. Ta se také nestala atraktivní pro mladou generaci. Tento trend postihl prakticky všechny odborné společnosti, naší společnost nevyjimaje. Biotechnologie mají navíc ještě paradoxně jednu velkou nevýhodu v tom, že zasahují prakticky do všech oblastí lidské činnosti. Každý biotechnolog má ještě „jinou profesi“, kterou často považuje za hlavní. Tato skutečnost se obráží v „barevnosti biotechnologií“. I na mnoha kongresech se program dělí podle uvedených barev:

Barevné označení biotechnologií

(podle Electronic Journal of Biotechnology – 2005)

Červené: lékařské aplikace, včetně dianostiky

Zelené: zemědělství, životní prostředí, geomikrobiologie

Bílé: průmyslové (založené na genovém inženýrství)

Šedivé: klasické fermentace a bioproceny

Modré: akvakultury, oceány a pobřeží

Žluté: potravinářské a výživa

Zlaté: bioinformatika a nanobiotechnologie

Fialové: patenty, vynálezy, publikace

Hnědé: biotechnologie pouští a vyprahlých území

Tmavé: bioterorismus, biologické zbraně

Tato pestrost biotechnologií je často důvodem obtížnosti udržet společný zájem biotechnologů různého zaměření, zejména v tak malém státě jako je Česká republika.

Přes všechny tyto problémy můžeme však konstatovat, že naše Biotechnologická společnost si vede velmi dobře. Domníváme se, že můžeme být hrdí zejména

na počet a kvalitu mezinárodních setkání, která jsme organizovali. Všechny tyto akce byly zvládnuty jen našimi členy, aniž bychom k tomu potřebovali specializované organizace. Již v roce našeho založení jsme pořádali v tehdejší Slovanském domě v ulici Na Příkopěch první mezinárodní „Symposium o bioanalytických metodách“, které bylo zaměřeno především na imunochemické techniky a biosensory. Tyto dvě významné tematiky se pak rozdělily do dvou pravidelných kongresů. Na Novotného lávce jsme pořádali symposium o enkapsulacích s významnou a velmi aktivní mezinárodní organizací Encapsulation Group. V pozdější době jsme se pak orientovali na společné pořádání symposií se švýcarskými biotechnologiemi, která se z původně výhradně bilaterálních setkání transformovala na významná mezinárodní biotechnologická symposia.

Naše publikační aktivity se neomezují pouze na vydávání Bioprospectu. Z našich seminářů o pokrocích v genetických modifikacích jsme vydali několik CD a z posledních mezinárodních symposií pak speciální čísla prestižního biotechnologického časopisu vydávaného nakladatelstvím Elsevier „Biotechnology Advances“ (IF 9,015), Biotechnology Advances“ (JBA) – IF 9,015. Vybrané články ze symposia BioTech 2011 byly publikovány v JBA, Vol. 31, č. 1, 2013, ze symposia Plant Biotechnology – Green for Food konaném v Olomouci v JBA, Vol. 33 a konečně z BioTech 2014 bylo speciální číslo JBA nedávno uzavřeno a vyjde ještě v letošním

roce. Více o tomto posledním mezinárodním symposiu se můžete dozvědět na stále aktuálních webových stránkách www.biotech2014.cz. Všechna čísla Bioprospectu od r. 2006 jsou k dispozici na webových stránkách společnosti <http://bts.vscht.cz>.

Naše společnost patří k zakládajícím členům ČSVTS a snaží se tuto střešní organizaci (v současnosti 68 samostatných vědeckých a technických společností) všemožně podporovat a cítí se dobře v tomto širokém svazku představitelů vědy a techniky v ČR. V mezinárodním měřítku udržujeme intenzivní spolupráci se švýcarskými biotechnologiemi, s European Biotechnology Federation (EFB) a IUPAC, který se snaží spojit biotechnologii z celého světa pořádáním Biotechnologických kongresů, každé 3 roky, na jiném kontinentu.

Na domácí půdě se snažíme o úzkou spolupráci s různými profesními sdruženími a vládními i nevládními institucemi, které se zajímají o biotechnologie.

V závěru našeho úvodníku bychom Vám rádi popřáli příjemné počtení článků, které jsme do tohoto čísla zařadili, příjemné prožití dovolených a pohodu po celé léto. Těšíme se na další spolupráci a na Vaše příspěvky.

Se srdečnými pozdravy
Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová

ERRATA:

Autoři článků „Huntingtonova nemoc“, „Proteolytické enzymy v patogenezi HN“ a „Vliv mutantního huntingtinu na mechanismus signalizace odpovědi buňky na poškození DNA a opravy poškozené DNA“ publikovaných v Bioprospectu číslo 1, 2015 se omlouvají, že u článků nebyly uvedeny zdroje podpory jejich výzkumu a poděkování. Touto formou by rádi informovali čtenáře, že všechny výše uvedené publikace vznikly za podpory Česko-norského výzkumného programu (7F14308) a výzkumného Centra PIGMOD (C2. 1. 05 12. 1. 00103.0124).

TITAN A JEHO SLITINY S NANOTUBULÁRNÍ POVRCHOVOU ÚPRAVOU S POTENCIÁLNÍM VYUŽITÍM V ORTOPEDII

Eva Jablonská

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze; eva.jablonska@vscht.cz

Úvod

Biomateriály jsou dnes velmi populární a potřebnou oblastí výzkumu, jak se můžeme přesvědčit z množství vědeckých skupin, odborných časopisů a vědeckých konferencí spatých s tímto tématem. Je to podníceno rostoucími požadavky na kvalitu života a umožněno vývojem nových technologií. Jednou z oblastí zájmu je ortopedie a biomateriály používané pro výrobu ortopedických endoprotéz.

Biomateriály nové generace

Každý chce být po operaci co nejdříve v kondici, a proto je požadováno rychlé zhojení a zároveň je s rostoucí délkou života (ale i v souvislosti se sportovními zraněními vedoucími k aplikaci implantátů mladým pacientům) kladen požadavek na delší životnost biomateriálů. V důsledku toho se dramaticky mění pohled na biomateriály. Dříve na ně bylo pohlíženo jako na pasivní náhrady plnicí pouze mechanické funkce, které mají s tělem interagovat v co nejmenší možné míře a především tělu neškodit, tzn. chovat se jako bioinertní. Tyto požadavky v současné době plní v ortopedii nejčastěji používané kovové materiály, kterými je korozivzdorná ocel, kobalt-chromové slitiny a titan a jeho slitiny¹. Poslední zmíněné materiály jsou v ortopedii považovány za zlatý standard, neboť mají velmi dobrou korozní odolnost, jsou v těle dobře snášeny a jejich mechanické vlastnosti (zejména modul pružnosti) jsou v porovnání s ocelí a CoCr-slitinami bližší vlastnostem kosti, což vede k méně častému výskytu nežádoucího „stress-shielding“ efektu pozorovaného např. u korozivzdorné oceli. Tento jev znamená „odstínění“ kosti od mechanického zatížení, které plně přejímá implantát, což následně vede k nežádoucímu úbytku kostní hmoty. Nejčastěji používanou slitinou v ortopedii je Ti-6Al-4V. V současné době je však snaha vyvíjet nové slitiny bez obsahu hliníku a vanadu, které zároveň budou mít ještě nižší modul pružnosti (tzv. beta-titanové slitiny). Slibně se jeví zejména slitiny s niobem, zirkoniem a tantalem².

Navíc se však od biomateriálů očekává, že kromě vyhovujících mechanických vlastností a netoxicity budou spouštět specifickou odpověď hostitele. Tato odpověď by měla být adekvátní dle účelu biomateriálu a biomateriál by měl interagovat specificky s různými typy buněk³ – v případě ortopedických aplikací preferenčně podporovat adhezi a proliferaci osteoblastů (být osteokonduktivní) a diferenciaci kmenových buněk migrujících do místa poškození (být osteoinduktivní), dále nespouštět obranné reakce hostitele nevhodnou interakcí s buňkami imunitního systému a také nepodporovat adhezi fibroblastů, která vede ke tvorbě nežádoucího vazivového pouzdra na rozhraní implantát – kost. Právě tyto odpovědi hostitele na biomateriál mohou pomoci

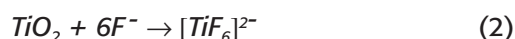
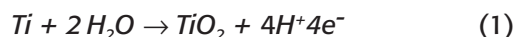
ci k rychlejšímu zhojení a ke stabilnějšímu zakotvení implantátu (osteointegraci) v kosti a následnému prodloužení jeho životnosti⁴.

Jak lze však tohoto požadovaného jevu docílit? Ideální úprava by měla být snadno a levně připravená a mít dobrou údržnost. Vzhledem ke skutečnosti, že adhezi, proliferaci i osud kmenových buněk lze ovlivnit nanotopografií povrchu^{5,6}, se nabízí možnost úpravy nanotopografie titanových materiálů.

Příprava nanotrubek a jejich vlastnosti

Anodická oxidace *in situ* (neboli přímo na materiálu) za specifických podmínek je jednou z nejlépejších a nejjednodušších metod, kterými lze na některých kovech včetně titanu připravit vysoce organizované, samovolně vznikající porézní povrchové nanostruktury s kontrolovatelnými parametry a dobrou údržností^{7,8}. Na titanu byly poprvé připraveny již v roce 1984⁹ a poté byl nápad znovu oživen v roce 2001¹⁰.

Na povrchu titanu se ve většině prostředí přirozeně vyskytuje tenká (2 – 5 nm) pasivní vrstva oxidu. Ve většině elektrolytů po vložení napětí dochází k růstu podstatně silnější kompaktní vrstvy oxidu (rovnice 1). Pokud jsou však přítomny fluoridové ionty, dojde nejen k anodické tvorbě oxidu, ale zároveň i ke kompetitivnímu rozpouštění oxidu za tvorby rozpustných fluoridových komplexů (rovnice 2). Fluoridový anion má malý iontový poloměr, což mu umožňuje pronikat skrz vznikající vrstvu oxidu na rozhraní kovu a oxidu. To, že vzniká uspořádaná struktura, je dáno kompeticí jednotlivých mělkých pórů o dostupný proud za ustáleného stavu. Vlivem rozpouštění oblastí bohatých na fluor vznikají následně z pórů nanotrubky (Obr. 1 a 2). Nanostruktura vzniká přímo na povrchu, který během elektrochemického procesu sloužil jako anoda⁷. Vzniklá nanostruktura je superhydrofilní, tzn. vysoce smáčivá, charakterizovaná vysokou povrchovou energií a malým kontaktním úhlem ($\theta \sim 0^\circ$)¹¹.

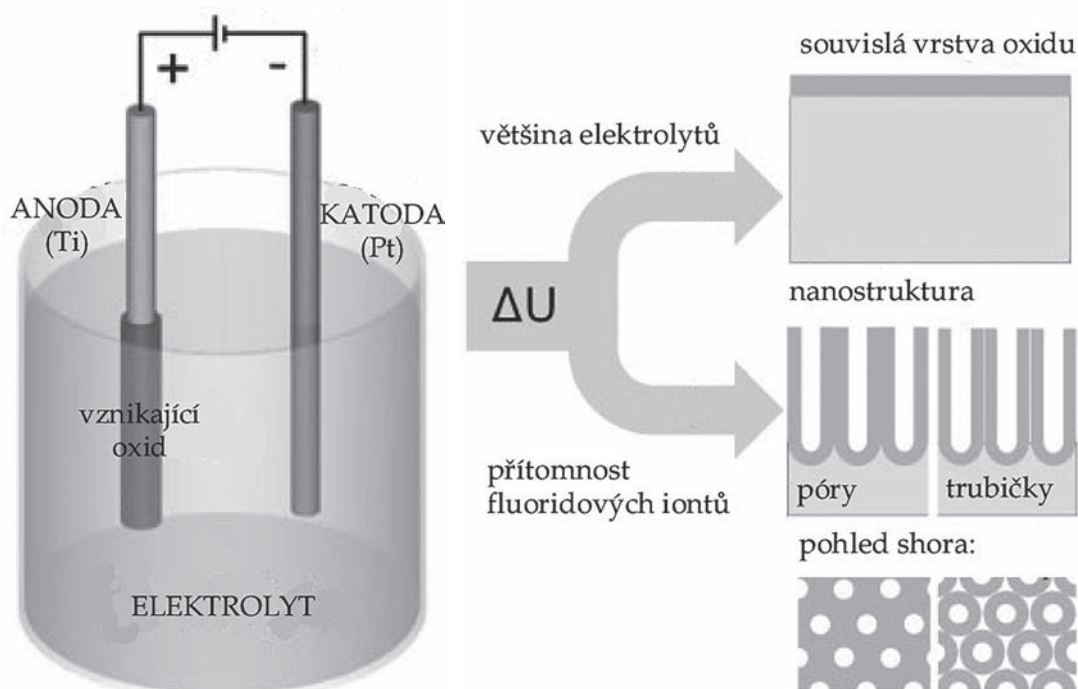


Podmínky přípravy, tj. elektrochemické podmínky a složení elektrolytu (použitá napětí, vzdálenost elektrod, čas a teplota reakce, obsah vody v elektrolytu, přítomnost organického rozpouštědla, koncentrace fluoridových iontů a následné tepelné zpracování, tzv. annealing, neboli žihání) mají vliv na výsledné vlastnosti povrchové struktury (viz tabulka I)⁸.

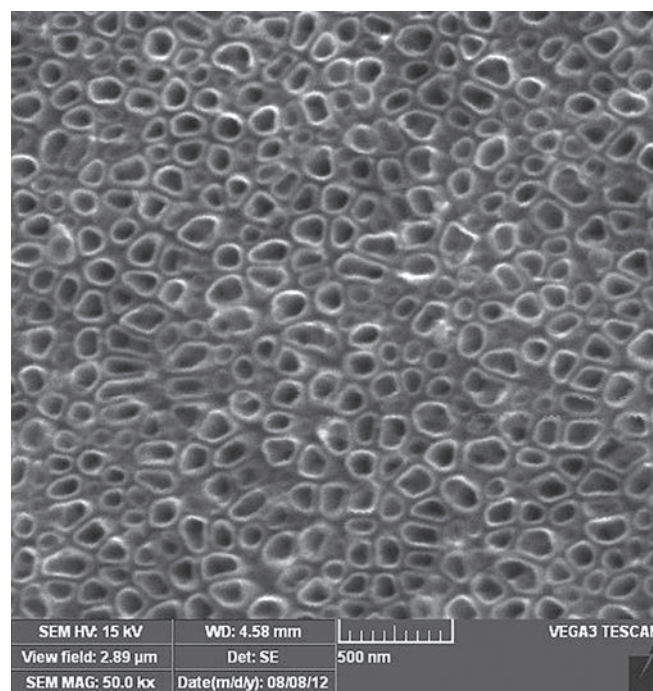
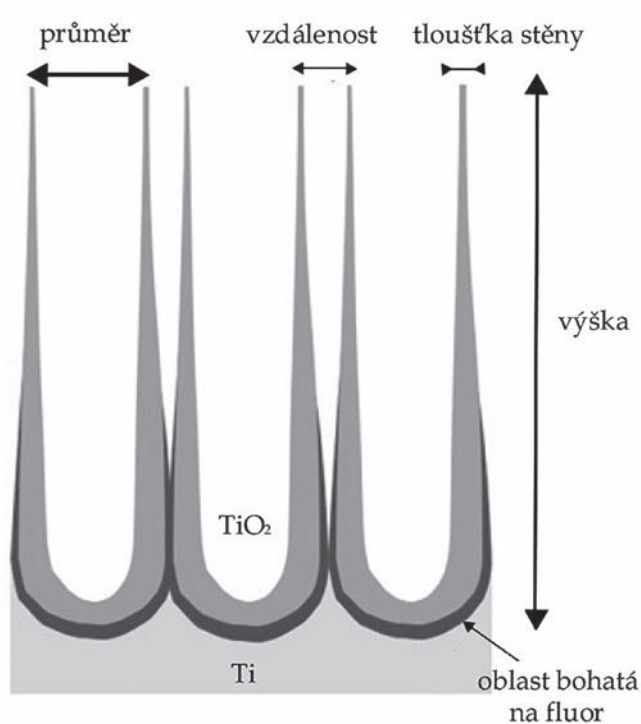
Při tepelném zpracování TiO₂ dochází k přechodu z amorfní formy na krystalickou. Je známo, že již při teplotě nad 280 °C se začíná tvořit anatasová forma, nad 500 °C se objevuje navíc i rutilová forma. Se stoupající teplotou se zvyšuje poměr rutilové formy,

ale okolo 700 °C již dochází ke kolapsu nanotubulární struktury. Žíhání se provádí nejčastěji při 450 °C za účelem dosažení anatasové formy¹²⁻¹⁴. Lewandowska a kol. (2015) navíc zjistili, že krystalinita jimi připravených TiO₂ nanotrubeček záležela i na použitém napětí: 20 a 30 nm nanotrubečky byly amorfni, větší (40, 90, 100 a 150 nm) již byly krystalické¹⁵.

Po anodizaci v elektrolytu s obsahem fluoru zůstává část fluoridových iontů zabudována do nanostruktury. Autoři uvádějí obsah fluoru 4 – 14 (at.) %. Následným tepelným zpracováním se obsah fluoru snižuje (po ošetření nad 400 °C je jeho koncentrace již zanedbatelná)^{16, 17}.



Obr. 1: Schéma přípravy nanotubulární povrchové vrstvy pomocí anodické oxidace za specifických podmínek. Vložené napětí způsobí růst oxidické vrstvy TiO₂ na povrchu titanu a přítomnost fluoridových iontů zároveň vede k vyleptání pórů a následnému vzniku nanotrubeček. Upraveno dle Bergera a kol.¹².



Obr. 2: (a) schematické znázornění nanotubulární vrstvy (boční pohled) s vyznačenými parametry (průměr nanotrubeček – obvykle desítky nanometrů, výška nanotrubeček – obvykle stovky nanometrů, vzdálenost nanotrubeček a tloušťka stěny nanotrubeček – obvykle jednotky nanometrů), (b) snímek z elektronového mikroskopu nanotubulární povrchové vrstvy na slitině Ti-6Al-4 V, pohled shora, měřítko = 500 nm, průměr nanotrubeček 50 nm (Dr. Fojt, Ústav kovových materiálů a korozního inženýrství, VŠCHT Praha).

Tab. I: Podmínky anodické oxidace a jimi ovlivněné parametry vzniklé nanostruktury⁸

Parametr reakce	Ovlivněná vlastnost vrstvy
Použité napětí	Průměr nanotrubeček (roste s rostoucím napětím)
Obsah vody v elektrolytu	Vytvoření mezery mezi jednotlivými nanotrubečkami (póry → nanotrubečky)
Přítomnost organického rozpouštědla	Výška nanotrubeček (roste v přítomnosti org. rozp.)
pH	Výška nanotrubeček (roste v neutrálním pH)
Čas reakce	Uniformita vrstvy (roste s časem)
Teplota reakce	Tloušťka stěn nanotrubeček (roste s klesající teplotou) Délka nanotrubeček (roste s klesající teplotou)
Následné tepelné zpracování (žhánání, angl. annealing)	Krystalická forma (přechod z amorfni přes anatasovou na rutilovou se zvyšující se teplotou)

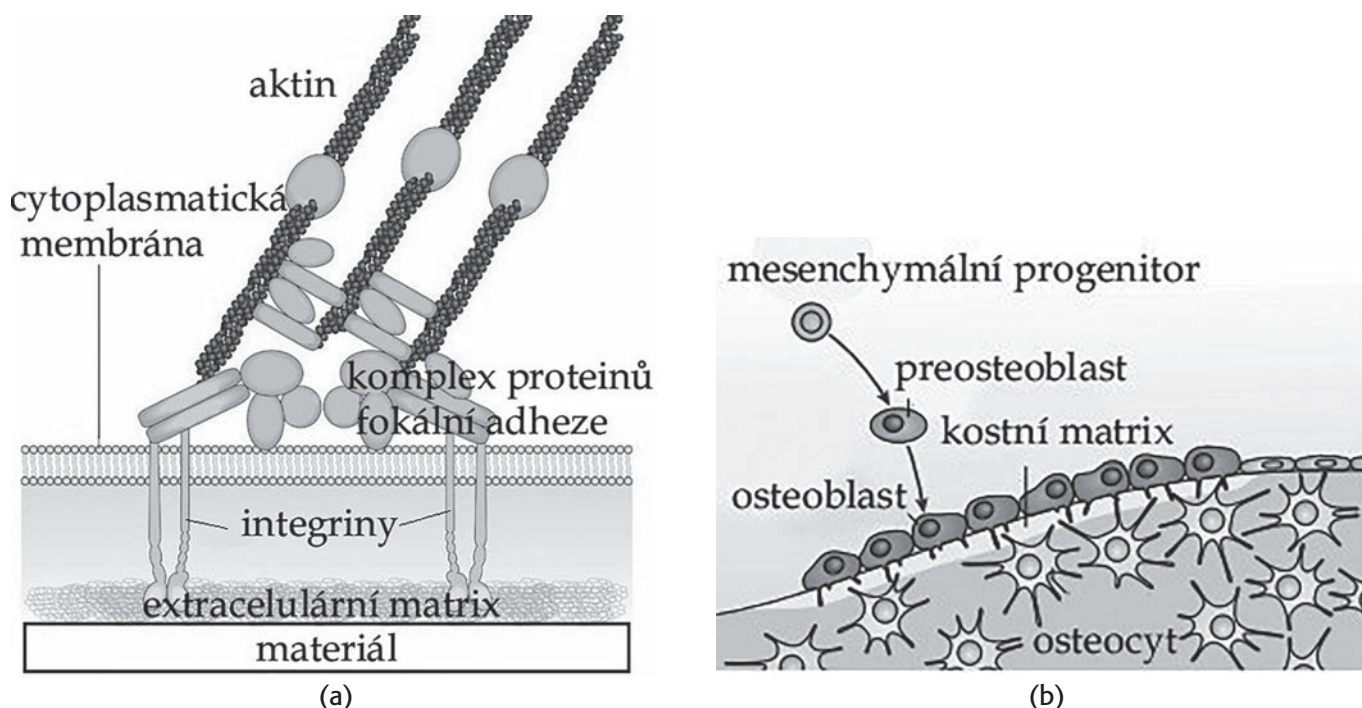
Buněčná adheze, proliferace a osteodiferenciace a metody jejich studia

Při testování materiálů *in vitro* jsou používány různé buněčné modely: buněčné linie (např. MG-63, MC3T-3-E1), jejichž výhodou je neomezené pasážování a nižší variabilita, či primární osteoblasty nebo kmenové buňky, které sice tyto atributy nemají, ale zase představují mnohem vhodnější buněčný model¹⁸.

Interakce buněk s biomateriály probíhá v několika krocích. Nejprve dochází k adsorpci proteinů z média na materiál a následně k adhezi buněk zprostředkovanou integrinovými receptory. Integrinové receptory rozpoznávají svou vnější částí specifické vazebné motivy extracelulární matrix (ECM) a jejich intracelulární část je asociována s dalšími proteiny, které následně interagují s cytoskeletem a dochází k přenosu signálu do jádra¹⁹. Tato místa se nazývají fokální kontakty (obr 3a). Po adhezi může docházet k buněčné proliferaci. Adheze je obvykle sledována pomocí skenovací elek-

tronové mikroskopie a fluorescenční mikroskopie (vizualizace cytoskeletu a proteinů účastnících se fokální adheze).

Proces osteodiferenciace spočívá v přeměně mesenchymálního progenitoru v preosteoblast a následně v osteoblast. Zralý osteoblast produkuje velké množství extracelulární matrix, jež je následně mineralizována. Z osteoblastů se po zabudování do mineralizované matrix stávají osteocyty (Obr. 3 b)²⁰. Osteodiferenciaci lze studovat sledováním aktivity alkalické fosfatasy (ozn. ALP, enzym produkovaný preosteoblasty a osteoblasty v časnější fázi diferenciaci), sledováním hladiny různých proteinů, např. osteokalcinu (nejhojněji zastoupený nekolagenní protein ECM kosti produkovaný zralými osteoblasty v pozdní fázi diferenciaci) jak na proteinové úrovni pomocí imunofluorescenční mikroskopie, tak na úrovni transkripce pomocí RT-qPCR, a také pomocí histologických technik založených na vizualizaci mineralizované kostní matrix (barvení metodou von Kossa, či pomocí barviva Alizarin red).



Obr. 3: (a) Fokální adheze osteoblastu, upraveno dle Mitra a kol.²¹, (b) proces osteodiferenciace, upraveno dle Long a kol.²⁰.

Nanotrúbky a jejich interakce s kostními buňkami

Anodizační techniky vedoucí k nanostruktúře s organizovanou geometrií a velkým povrchem nachází využití v řadě odvětví, jako je fotokatalýza, samočištění, solární články a biomedicína⁷. Autory vedla k využití titanových nanotrúbek v medicíně zjištění prof. Webstera a jeho nanomedicínské skupiny, která již v roce 2004 pozorovala pozitivní reakci osteoblastů (jejich zvýšenou adhezi) na nanostrukturované (tj. s velikostí částic či zrn menší než 100 nm) povrchy, včetně kovových slitin, které připravila s využitím nanočástic a práškové metalurgie²².

TiO₂ nanotrúbky a první studie *in vitro*

Jako první publikovali Oh a kol. (korejsko-americká vědecká skupina) v roce 2006 dvě studie zabývající se interakcí titanových nanotrúbek s buňkami. Použili myší preosteoblasty MC3T3-E1 a TiO₂ nanotrúbky (vnitřní průměr 70 nm, vnější průměr 100 nm). Zjistili, že míra tvorby hydroxyapatitu v simulované tělní tekutině i počet preosteoblastů byly signifikantně zvýšeny u nanostruktury v porovnání s titanem bez nanostruktury²³ a také, že nanotrúbky poskytovaly lepší buněčnou odpověď (počet buněk, metabolická aktivita, aktivita ALP) po teplotním ošetření (anatasová krystalická forma) než bez něj (amorfní forma). Přičetli to možnému vlivu reziduálního fluoru v případě struktury bez teplotního ošetření²⁴.

Popat a kol. (2007) zkoumali krysí mesenchymální kmenové buňky a jejich odpověď na TiO₂ nanotrúbky o průměru 80 nm v anatasové krystalické formě. Autoři zjistili zvýšenou adhezi, lepší rozprostření buněk, vyšší aktivitu ALP a zvýšenou produkci ECM na nanostruktúře v porovnání s kontrolou bez nanostruktury²⁵.

Také Yao a kol. (2007) připravili TiO₂ nanotrúbky s vnitřním průměrem 70 – 80 nm bez teplotního ošetření a při testech s lidskými primárními osteoblasty zjistili zvýšenou mineralizaci ECM²⁶.

Das a kol. (2008) publikovali studii, kde testovali TiO₂ nanotrúbky s vnitřním průměrem 50 nm s využitím lidské buněčné linie prekursorů osteoblastů (OPC1). Autoři uvádí, že adheze, proliferace a ALP (a tedy i míra osteodiference) byla signifikantně zvýšena na povrchu s nanostruktúrou v porovnání s povrchem bez nanostruktury díky vyšší drsnosti a nižšímu kontaktnímu úhlu nanostruktury²⁷.

Vliv geometrie nanotrúbek na buněčnou odpověď

Lze tedy říci, že autoři se v počátcích výzkumu shodli ve zjištění, že nanostruktúra má pozitivní vliv na buněčnou odezvu. Heterogenních výsledků však různí autoři dosahovali při snaze nalézt ideální průměr nanotrúbek.

Park a kol. (německá skupina) v roce 2007 publikovali v časopise *Nanoletters* (červen 2015 – 649 citací) studii zabývající se odezvou krysích mesenchymálních kmenových buněk na TiO₂ nanotrúbky o průměru 15, 20, 30, 50, 70 a 100 nm. Zjistili, že menší průměr (15 – 30 nm) způsoboval zvýšenou adhezi, rozprostření a růst v porovnání s povrchem bez nanostruktury a naopak na větším průměru (100 nm) buňky rostly hůře

a podléhaly apoptose²⁸. Stejná skupina autorů o dva roky později provedla experimenty s týmiž materiály s využitím lidských osteoblastů a osteoklastů a došla k obdobným závěrům – trubky menšího průměru indukovaly diferenciaci lidských hematopoetických kmenových buněk v osteoklasty, zatímco na větších průměru byla diferenciaci dočasně znemožněna. Také lidské osteoblasty vykazovaly nejvyšší míru adheze, mineralizace a produkce osteogenních markerů na trubkách menšího průměru (15 nm). Autoři proto vyhodnotili nanotrúbky o průměru 15 nm jako nejvhodnější pro více typů kostních buněk, což zdůvodňují podobností s průměrem integrinové extracelulární domény a vyzovují, že vhodná vzdálenost nanostruktur (menší než 70 nm) podporuje shlukování integrinových receptorů do fokálních kontaktů, čímž spouští další signalizační kaskády a buněčné odpovědi²⁹.

V roce 2009 vyšla v časopise *PNAS* (červen 2015 – 617 citací) studie, kde korejsko-americká skupina zjišťovala interakci lidských kmenových buněk s TiO₂ nanotrúbkami o průměru 30, 50, 70 a 100 nm. Zde na rozdíl od německé skupiny uvádí, že trubky malého průměru (30 nm) podporují adhezi bez zjevné diferenciaci, zatímco trubky většího průměru (70 – 100 nm) způsobují elongaci buněk vedoucí k osteodiferenciaci³⁰. K podobným závěrům došla tato skupina v případě myších preosteoblastů MC3T3-E1³¹. Výsledky autoři vysvětlují rozdílným mechanismem adsorpce proteinů – na nanotrúbky o malém průměru adsorbují proteiny rovnoměrně, zatímco na větší průměr adsorbují pouze na stěny nanotrúbek, což nutí buňky rozprostřít filopodia a zaujmout protáhlý tvar.

Na tuto studii ihned reagovala německá skupina dopisem v časopise *PNAS* s vyjádřením, že by měly být provedeny další experimenty za účelem vyřešení tohoto problému s diametrálně odlišnými zjištěními³².

Korejská skupina promptně odpověděla dopisem v časopise *PNAS*, že experimenty s protichůdnými výsledky (německá vs. korejská skupina) se lišily v několika ohledech - byly prováděny na jiném typu buněk (krysí vs. lidské kmenové buňky), lišilo se růstové médium (s diferenciacními faktory vs. bez přídavku diferenciacních faktorů), také charakter nanotrúbek byl odlišný (amorfní vs. krystalická anatasová forma) a lišil se i obsah fluoru (5 % fluoru vs. pouhých 0,4 % fluoru)³³.

Ještě v témže roce publikovala německá skupina studii v časopise *Nanoletters*, kde se zabývala vlivem obsahu fluoru a vlivem krystalické formy nanotrúbek na buněčnou odpověď krysích mesenchymálních kmenových buněk a lidských endoteliálních buněk. Zjistili, že obsah fluoru neovlivňuje počáteční adhezi a naopak může podporovat proliferaci po třech dnech. Také zjistili převažující vliv velikosti nanotrúbek nad vlivem krystalické formy, i když v případě většího průměru nanotrúbek (70 – 100 nm) pozorovali menší míru proliferace kmenových buněk na anatasové formě v porovnání s amorfní. Také pozorovali zvýšenou motilitu kmenových i endoteliálních buněk na nanotrúbkách o menším průměru (15 – 20 nm)³⁴. Lze tedy říci, že buněčná odpověď závisí na mnoha faktorech, nejen průměru nanotrúbek, což bylo předmětem dalších studií.

Další faktory při testování nanotubulárních vrstev na buněčnou odpověď

Vlivem krystalických forem se následně podrobněji zabývali Yu a kol. Nejprve studovali TiO₂ nanotrubky o průměru 20, 50, 70, 100 a 120 nm v anatasové krystalické formě a došli opět k poněkud odlišným závěrům, než předchozí skupiny: buňky lépe adherovaly na nanotrubky menšího průměru (stejně jako byla na nanotrubkách o menším průměru zvýšená aktivita ALP a míra mineralizace), zatímco proliferace stoupala se stoupajícím průměrem nanotrubek, což autoři přičítají různým tloušťkám nanovrstvy a nanodrsnosti povrchu (obojí roste s rostoucím průměrem nanotrubek)³⁵. V témže roce (2010) publikovala tato skupina práci, kde porovnávala buněčnou odpověď na TiO₂ nanotrubky o průměru 80 nm (které v předchozí studii vyhodnotila jako nevhodnější) v různých krystalických formách s použitím myších preosteoblastů MC3T3-E1. Autoři zjistili, že obě krystalické formy (anatasová i anatasová/rutilová) podporovaly proliferaci a mineralizaci preosteoblastů vyšší měrou než amorfni forma¹³.

K obdobným závěrům došli i Bai a kol. v roce 2011, kdy zkoumali vliv krystalické formy na tvorbu hydroxyapatitu a na buněčnou odpověď myších preosteoblastů MC3T3-E1. Nanotrubky měly 50 nm v průměru a anatasovou a anatasovo/rutilovou krystalickou formu. Nanotrubky po teplotním ošetření vykazovaly vyšší schopnost tvorby hydroxyapatitu po ponoření do SBF v porovnání s amorfni nanostrukturou, kdy anatasová/rutilová forma byla efektivnější než anatasová. Také buňky vykazovaly vyšší míru adheze a růstu na nanotrubkách v porovnání s kontrolou bez nanotrubek a krystalická forma vykazovala lepší odpověď než amorfni. Autoři uvádějí, že směs anatasové a rutilové krystalické formy se zdá být nevhodnější vzhledem k buněčné odpovědi, tvorbě hydroxyapatitu a také vzhledem k vyšší korozní odolnosti krystalických forem¹⁴.

Co se týče obsahu fluoru, je možno také zmínit, že na titanu (bez tubulární nanostruktury) bylo prokázáno, že fluoridové ionty mohou mít stimulační vliv na osteoblasty, podporovat jejich diferenciaci a usnadnit osteointegraci implantátu^{36, 37}.

Záleží také na výchozím stavu materiálu, který byl nanostrukturován – zda byl před anodizací leštěn, nebo naopak drsněn (pískováním nebo leptáním) a také na tom, co autoři v experimentu použijí jako kontrolní materiál (leštěná či drsněná kontrola). Například Zhao a kol. (2010) se proto zabývali kombinovaným vlivem mikro- a nanostruktury materiálu. Uvádějí, že kostní tkáň má také nanostrukturu (ECM) i mikrostrukturu (na úrovni lamel a osteonů) a proto by bylo vhodné tuto komplexní hierarchickou topografii mimikovat. Proto nejprve vytvořili leptáním povrchu mikrodrsnost a tento povrch následně nanostrukturovali. Následně s využitím krysích primárních osteoblastů porovnávali mikro/nanostrukturu s mikrostrukturou a s broušenou kontrolou. Pozorovali zvýšenou adhezi na mikrostrukturou v porovnání s mikro/nanostrukturou, ale ostatní testy (proliferace, mineralizace ECM a hladina transkripce osteogenních markerů) dopadly naopak lépe pro mikro/nanostrukturu³⁸.

Vliv složení nanostrukturovaného materiálu, nanostrukturování slitin

Dosud byly zmíněny pouze studie na čistém titanu, což je však materiál, který nemá pro většinu ortopedických aplikací uspokojivé mechanické vlastnosti a je tudíž nutno používat titanové slitiny. Byla zde tedy snaha zjistit, zda má na buněčnou odpověď vliv pouze topografie, nebo i složení. Výsledky dvou již dříve zmíněných vědeckých skupin na modelových systémech byly opět protichůdné.

Bauer a kol. (německá skupina) v roce 2009 připravili amorfni TiO₂ a ZrO₂ nanotrubky o průměru 15, 20, 30, 50, 70 a 100 nm (TiO₂) a o průměru 10, 15, 30 a 50 nm (ZrO₂) a také TiO₂ nanotrubky pokovené vrstvou AuPd reprezentující zcela odlišný typ materiálu, než jsou dva předchozí oxidy. Tyto vzorky testovali s využitím krysích mesenchymálních kmenových buněk a zjistili, že hlavním faktorem ovlivňujícím chování buněk byla geometrie povrchu (autoři opět potvrdili 15 nm nanotrubky jako nevhodnější), nikoliv složení³⁹.

Naopak Brammer a kol. (2011, korejská skupina) při testování TiO₂ nanotrubek o vnějším průměru 100 nm v krystalické formě s a bez naprášené uhlíkové vrstvy na myších preosteoblastech MC3T3-E1 a lidských mesenchymálních kmenových buňkách zjistili, že buněčná odpověď se lišila dle složení vrstvy i buněčného typu. Aktivita ALP byla v případě preosteoblastů zvýšena na TiO₂, zatímco mineralizace a produkce proteinů ECM byla v případě kmenových buněk vyšší na uhlíkové vrstvě. Autoři tyto rozdíly přičítaly zejména charakteru materiálu ve smyslu krystalinity (anatasová krystalická forma TiO₂ vs. amorfni uhlíková vrstva)⁴⁰.

To, že byla většina *in vitro* studií nejprve provedena nejprve na titanu a nikoliv na jeho slitinách využívaných v ortopedii, je dáno jednodušší přípravou nanostruktury na čistém titanu a také lepší uniformitou nanostruktury v případě čistého titanu, kdy lze následně sledovat buněčnou odpověď na nanotopografii. Titanové slitiny lze také nanostrukturovat, může to však být poněkud problematické, neboť obsahují více metalických fází, což může vést ke vzniku neuniformní nanostruktury. Podmínky anodizace lze nicméně optimalizovat vhodným výběrem podmínek pro daný typ slitiny, o čemž svědčí velké množství publikací zabývajících se přípravou a následným testováním titanových slitin o různém složení s nanotubulární povrchovou úpravou⁴¹.

Macak a kol. (2005) například jako jedni z prvních připravili nanotrubky na slitinách Ti-6Al-7Nb a Ti-6Al-4V. Jak již bylo zmíněno, slitiny obsahují více metalických fází, které mají při anodizaci v přítomnosti fluoridů odlišnou stabilitu, což v případě slitiny Ti-6Al-7Nb vedlo ke vzniku oblastí s různým průměrem nanotrubek (v oblastech bohatých na Nb se tvořily nanotrubky o menším průměru) a v případě slitiny Ti-6Al-4V vedlo ke vzniku neuniformní povrchové nanostruktury s vyleptanými oblastmi bohatými na vanad, což bylo způsobeno vyšší rozpustností oxidu vanadu v daném prostředí⁴². Dále byly nejčastěji nanostrukturovány slitiny s různými kombinacemi a poměry prvků zmíněných v úvodu (Nb, Ta, Zr)⁴¹. Cytokompatibilita byla následně testována v případě slitin Ti-6Al-4V⁴³⁻⁴⁵, Ti-6Al-7Nb⁴³, Ti-50Zr^{46, 47}.

Mechanismus působení

Pokud si položíme otázku, čím je způsobeno, že kostní buňky reagují na titanové trubky tak pozitivně, odpověď bude velmi komplexní. Když se vrátíme k již popsaným studiím, dočteme se, že Macak a kol. (2005) předpokládají pozitivní efekt nanostruktury díky větší tloušťce oxidické vrstvy v porovnání s tenkou a méně stabilní přirozeně se tvořící oxidickou vrstvou, neboť TiO₂ je do určité míry osteointegrativní sám o sobě⁴². Oh a kol. vidí hlavní přínos v samovolné tvorbě nano-hydroxyapatitu na nanotrůbkách⁴⁸ a v tom, že mezi nanotrůbkami je umožněno proudění média, což usnadňuje přísun živin²³. Dále kladou důraz na filopodiální signalizaci spuštěnou nanostrukturou, jež vede ke změně morfologie i směru diferenciaci³⁰. Park a kol. spatřují hlavní efekt nanostruktury ve spuštění shlukování integrinových receptorů, kdy optimální aktivace integrinů je dosaženo na malém průměru (15 nm), což odpovídá velikosti fokálních míst^{28, 29}. Yu a kol. přikládají pozitivní vliv nanotrůbek jejich velkému povrchu a výrazné hydrofilicitě^{35, 49}.

Gongadze a kol. (2011) přišli s hypotézou, že za lepší adhezi na titanové nanotrůbky je zodpovědná vyšší hustota povrchového náboje na okrajích nanotrůbek. Adheze negativně nabitých buněk na negativně nabitý povrch je podle nich zprostředkována kladně nabitými proteiny nebo kationty⁵⁰.

Autoři se snaží objasnit vliv nanotrůbek na buňky i na molekulární úrovni. Yu a kol., 2012 testovali TiO₂ nanotrůbky o průměru 70 nm v anatasové krystalické formě s použitím lidské linie osteoblastů MG-63. Pomocí DNA čipu sledovali celogenomovou expresi genů v buňkách po týdenním růstu na nanostruktuře v porovnání s kontrolou bez nanostruktury. Zjistili sníženou imunoreaktivitu, což může být výhodné při implantaci (sníží se riziko odmítnutí implantátu), a také zvýšenou proliferaci a diferenciací aktivitu, což přičítají zejména zvýšené expresi genu pro beta-catenin⁵¹.

Lv a kol. (2015) testovali TiO₂ nanotrůbky o průměru 50, 70 a 100 nm v anatasové krystalické formě s použitím komerčních lidských kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně. Jako optimální průměr z hlediska adheze i osteogenní diferenciaci (ALP, mineralizace ECM) uvádějí 70 nm. Pozitivní vliv vysvětlují tím, že adsorpce proteinů je prvním krokem adheze – vyšší míra adsorpce tedy podpoří adhezi. Autoři se pokusili o objasnění molekulárního mechanismu působení. Vyšší míru osteodiferenciaci vysvětlují epigenetickou regulací – zjistili, že nanotrůbky mohou inhibovat expresi histondemethylasy, což vede ke zvýšené metylaci histonu H3K4, což může podporovat expresi genů asociovaných s osteogenezí⁵².

Studie in vivo

Byly provedeny nejen studie *in vitro*, ale také *in vivo*. Von Wilmsky a kol. (2009, německá skupina) sledovali reakci na vzorky s TiO₂ nanotrůbkami o průměru 30 nm v porovnání se vzorky bez nanostruktury po implantaci do přední části lebky prasat domácích. Zjistili dobrou údržnost nanostruktury a zvýšenou produkci kolagenu I – proteinu ECM kostní hmoty⁵³.

S *in vivo* studií přišla posléze i korejská skupina (2010). Titanové disky s nanotrůbkami o vnějším průměru 100 nm a vnitřním průměru 80 nm v anatasové krystalické formě byly implantovány ke stehenní kosti králíků. Vzorky s nanostrukturou vykazovaly lepší osteointegraci v porovnání s materiálem bez nanostruktury⁵⁴.

Také Wang a kol. (2011) provedli studii *in vivo*. Použili TiO₂ nanotrůbky o vnějším průměru 30, 70 a 100 nm v anatasové krystalické formě, vzorky implantovali do přední části lebky miniprasat a sledovali genovou expresi. Zjistili, že zejména nanotrůbky o průměru 70 nm podporovaly tvorbu kostní hmoty na rozhraní implantát-kost⁵⁵.

Lv a kol. (2015) implantovali vzorky s TiO₂ nanotrůbkami o průměru 50, 70 a 100 nm do myši a zjistili, že průměr 70 nm byl pro novotvorbu kosti nejvhodnější⁵².

Další možnosti modifikace a využití nanotrůbek v biomedicině

Nanotrůbky nabízejí řadu dalších možností, co se týče jejich modifikace a využití v biomedicině, např. inkorporace vápenatých a fosforečnanových iontů za účelem zvýšení bioaktivity materiálu, příprava vícevrstevných nanotrůbek, aplikace antibiotik do nanotrůbek, což zajistí jejich postupné uvolnění v kritické době po implantaci a může zabránit pooperační infekci^{56, 57}, nebo aplikace dalších molekul, například protizánětlivých léčiv^{58, 59}, možná je i funkcionalizace povrchu, např. pomocí osteogenních faktorů⁶⁰.

Antibakteriální vlastnosti nanotrůbek

Někteří autoři popisují i antibakteriální působení nanotrůbek *per se*, bez dopování antibiotiky. Zdá se však, že i tato oblast je poněkud kontroverzní. Popat a kol. (2007) nepozorovali sníženou adhezi *Staphylococcus epidermidis* na nanotrůbky (TiO₂, vnitřní průměr 80 nm, tepelná úprava) v porovnání s titanem bez nanostruktury, adheze byla snížena pouze v případě nanotrůbek nadopovaných gentamycinem⁵⁶. Puckett a kol. (2010, skupina prof. Webstera) testovali TiO₂ nanotrůbky o průměru 60 – 70 nm bez teplotního ošetření (obsah fluoru 9 % at., amorfní fáze) a zjistili, že adheze *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* a *Pseudomonas aeruginosa* byla zvýšená na nanotrůbkách v porovnání s titanem bez nanostruktury, ale procento živých bakterií bylo naopak sníženo. Oba jevy připisují obsahu fluoridových iontů, které zvyšují adhezi a snižují viabilitu bakterií. Dalším faktorem je podle autorů krystalická forma (anatasovou považují za antibakteriální, amorfní formu nikoliv)⁶¹. Ercan a kol. (2011, skupina prof. Webstera) testovali TiO₂ nanotrůbky po teplotním ošetření o průměru 20 nm (anatasová forma), 40 a 60 nm (anatasová/rutilová forma) a 80 nm (rutilová forma). Nanotrůbky bez teplotního ošetření byly naproti tomu amorfní a měly obsah fluoru 13, 8, 4, resp. 12 at. %. Autoři zjistili, že zejména teplotně ošetřené nanotrůbky o průměru 80 nm v porovnání s kontrolou bez nanostruktury snížily adhezi *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*¹⁷ a také snížily tvorbu biofilmu *S. aureus*¹⁶. K podobným závěrům došli i Lin a kol. (2014), kdy adheze bakterií *S. aureus* a *S. epidermidis* a tvorba biofilmu byla do určité míry inhibována i na kontrolních nanotrůbkách

(80 a 120 nm, tentokrát bez teplotního ošetření) bez antibiotika v porovnání se vzorkem bez nanostruktury⁵⁷. Také Lewandowska a kol. (2015) testovali antibakteriální vlastnosti TiO₂ nanotrubeček o průměru 20, 30, 40, 90, 100 a 150 nm vůči *S. aureus* (20 a 30 nm nanotrubečky byly amorfny, větší již byly krystalické). Autoři pozorovali antibakteriální působení (včetně inhibice tvorby biofilmu) v případě nanotrubeček o průměru 20 – 30 nm¹⁵.

Závěr

Nanostrukturování titanu pomocí anodické oxidace je jednou ze slibných možností přípravy biomateriálů nové generace. Bylo publikováno mnoho studií *in vitro* a také *in vivo* a výsledky byly často protichůdné, neboť se zde vyskytuje velké množství faktorů, které ovlivňují výslednou buněčnou odpověď. Jedná se zejména

o charakter výchozího materiálu, způsob anodizace a jeho vliv na geometrii nanotrubeček, především jejich průměr, délku a tloušťku jejich stěny (většina autorů se shoduje, že menší až střední průměr nanotrubeček – cca do 80 nm – poskytuje lepší buněčnou odezvu), následně tepelné zpracování a jeho vliv na krystalickou formu (anatasová/rutilová a anatasová je lepší než amorfny forma^{13, 14, 35}), a obsah fluoru (tolerovatelný obsah je 9 at. %³⁴) a dalších aniontů⁶², způsob sterilizace⁶³ a další modifikace. Roli hraje samozřejmě i použitý biologický model. Předmětem dalšího výzkumu se zdá být hlubší porozumění mechanismu působení nanotubulární vrstvy, vývoj nových slitin s nižším modulem pružnosti, jejich nanostrukturování a testování a zejména zavedení těchto postupů do praxe.

Literatura

1. Mantripragada VP, Lecka-Czernik B, Ebraheim NA, et al.: *J Biomed Mater Res A*. 101, 3349 (2013).
2. Rack HJ, Qazi JI: *Mat Sci Eng C-Bio S*. 26, 1269 (2006).
3. Williams DF: *Biomaterials*. 29, 2941 (2008).
4. Albrektsson T, Johansson C: *Eur Spine J*. 10, S96 (2001).
5. Biggs MJP, Richards RG, Dalby MJ: *Nanomed-Nanotechnol*. 6, 619 (2010).
6. Dalby MJ, Gadegaard N, Oreffo ROC: *Nature Mater*. 13, 558 (2014).
7. Macak JM, Tsuchiya H, Ghicov A, et al.: *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 11, 3 (2007).
8. Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, et al.: *Nanotechnology*. 26, 062002 (2015).
9. Assefpour-Dezfuly M, Vlachos C, Andrews E: *J Mater Sci*. 19, 3626 (1984).
10. Gong D, Grimes CA, Varghese OK, et al.: *J Mater Res*. 16, 3331 (2001).
11. Balaur E, Macak JM, Tsuchiya H, et al.: *J Mater Chem*. 15, 4488 (2005).
12. Berger S, Hahn R, Roy P, et al.: *Physica Status Solidi B*. 247, 2424 (2010).
13. Yu WQ, Zhang YL, Jiang XQ, et al.: *Oral, DiS*. 16, 624 (2010).
14. Bai Y, Park IS, Park HH, et al.: *Surf Interface Anal*. 43, 998 (2011).
15. Lewandowska Z, Piszczek P, Radtke A, et al.: *J Mater Sci Mater Med*. 26, 163 (2015).
16. Ercan B, Kummer KM, Tarquinio KM, et al.: *Acta Biomater*. 7, 3003 (2011).
17. Ercan B, Taylor E, Alpaslan E, et al.: *Nanotechnology*. 22, 295102 (2011).
18. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, et al.: *Eur Cells Mater*. 24, 1 (2012).
19. Anselme K: *Biomaterials*. 21, 667 (2000).
20. Long FX: *Nat Rev Mol Cell Bio*. 13, 27 (2012).
21. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD: *Nat Rev Mol Cell Bio*. 6, 56 (2005).
22. Webster TJ, Ejiófor JU: *Biomaterials*. 25, 4731 (2004).
23. Oh S, Jin S: *Mater Sci Eng C*. 26, 1301 (2006).
24. Oh S, Daraio C, Chen LH, et al.: *J Biomed Mater Res A*. 78, 97 (2006).
25. Popat KC, Leoni L, Grimes CA, et al.: *Biomaterials*. 28, 3188 (2007).
26. Yao C, Slamovich EB, Webster TJ: *J Biomed Mater Res A*. 85 A, 157 (2008).
27. Das K, Bose S, Bandyopadhyay A: *J Biomed Mater Res A*. 90, 225 (2009).
28. Park J, Bauer S, von der Mark K, et al.: *Nano Lett*. 7, 1686 (2007).
29. Park J, Bauer S, Schlegel KA, et al.: *Small*. 5, 666 (2009).
30. Oh S, Brammer KS, Li YSJ, et al.: *P Natl Acad Sci USA*. 106, 2130 (2009).
31. Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, et al.: *Acta biomaterialia*. 5, 3215 (2009).
32. von der Mark K, Bauer S, Park J, et al.: *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, E60 (2009).
33. Oh S, Brammer KS, Li YJ, et al.: *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, E61 (2009).
34. Park J, Bauer S, Schmuki P, et al.: *Nano Lett*. 9, 3157 (2009).
35. Yu WQ, Jiang XQ, Zhang FQ, et al.: *J Biomed Mater Res A*. 94 A, 1012 (2010).
36. Lamolle SF, Monjo M, Rubert M, et al.: *Biomaterials*. 30, 736 (2009).
37. Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, et al.: *Prog Mater Sci*. 58, 261 (2013).
38. Zhao L, Mei S, Chu PK, et al.: *Biomaterials*. 31, 5072 (2010).
39. Bauer S, Park J, Faltenbacher J, et al.: *Integr Biol-Uk*. 1, 525 (2009).
40. Brammer KS, Choi C, Frandsen CJ, et al.: *Acta Biomater*. 7, 2697 (2011).
41. Minagar S, Berndt CC, Wang J, et al.: *Acta Biomater*. 8, 2875 (2012).
42. Macak JM, Tsuchiya H, Taveira L, et al.: *J Biomed Mater Res A*. 75, 928 (2005).
43. Roman I, Trusca RD, Soare M-L, et al.: *Mater Sci Eng C*. 37, 374 (2014).
44. Yavari SA, Chai YC, Böttger AJ, et al.: *Mater Sci Eng C*. 51, 132 (2015).

Literatura (pokračování)

45. Yao C, Perla V, McKenzie JL, et al.: *J Biomed Nanotechnol.* 1, 68 (2005).
46. Grigorescu S, Pruna V, Titorencu I, et al.: *Bioelectrochemistry.* 98, 39 (2014).
47. Minagar S, Li Y, Berndt CC, et al.: *Acta Biomater.* 12, 281 (2015).
48. Oh SH, Finones RR, Daraio C, et al.: *Biomaterials.* 26, 4938 (2005).
49. Yu WQ, Zhang YL, Jiang XQ, et al.: *Oral, DiS.* 16, 624 (2010).
50. Gongadze E, Kabaso D, Bauer S, et al.: *Int J Nanomedicine.* 6, 1801 (2011).
51. Yu W, Zhang Y, Xu L, et al.: *Colloids Surf B Biointerfaces.* 93, 135 (2012).
52. Lv L, Liu Y, Zhang P, et al.: *Biomaterials.* 39, 193 (2015).
53. von Wilmsowky C, Bauer S, Lutz R, et al.: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 89, 165 (2009).
54. Bjursten LM, Rasmusson L, Oh S, et al.: *J Biomed Mater Res A.* 92, 1218 (2010).
55. Wang N, Li H, Lu W, et al.: *Biomaterials.* 32, 6900 (2011).
56. Popat KC, Eltgroth M, Latempa TJ, et al.: *Biomaterials.* 28, 4880 (2007).
57. Lin WT, Tan HL, Duan ZL, et al.: *Int J Nanomedicine.* 9, 1215 (2014).
58. Peng L, Mendelsohn AD, LaTempa TJ, et al.: *Nano Lett.* 9, 1932 (2009).
59. Lee Y-H, Bhattarai G, Park I-S, et al.: *Biomaterials.* 34, 10199 (2013).
60. Lai M, Cai K, Zhao L, et al.: *Biomacromolecules.* 12, 1097 (2011).
61. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, et al.: *Biomaterials.* 31, 706 (2010).
62. Kim SE, Lim JH, Lee SC, et al.: *Electrochim Acta.* 53, 4846 (2008).
63. Oh S, Brammer KS, Moon K-S, et al.: *Mater Sci Eng C.* 31, 873 (2011).

Souhrn

Jablonská E.: Titan a jeho slitiny s nanotubulární povrchovou úpravou s potenciálním využitím v ortopedii

Na biomateriály jsou v dnešní době kladeny mnohé požadavky. Jedním z potenciálních biomateriálů nové generace je titan a jeho slitiny s nanotubulární povrchovou úpravou, kterou lze připravit poměrně levně a jednoduše metodou anodické oxidace za vhodných podmínek. Tato nanostruktura má osteoinduktivní a osteokonduktivní vlastnosti. Výběr nejvhodnější geometrie a přesný mechanismus působení teprve čeká na objasnění.

Klíčová slova: biomateriály v ortopedii, titanové slitiny, nanotubulární topografie, osteodiferenciace

Summary

Jablonská E.: Titanium and its alloys with a nanotubular surface modification for orthopaedic applications

Biomaterials nowadays should meet various criteria. One of the promising biomaterials of the new generation is titanium and its alloys with a nanotubular surface modification prepared by anodic oxidation at appropriate conditions. This relatively inexpensive and simple method leads to the nanostructure with osteoinductive and osteoconductive properties. Selection of the most suitable geometry and exact mechanism of action has to be elucidated.

Keywords: biomaterials in orthopaedics, titanium alloys, nanotubular topography, osteodifferentiation

NANOČÁSTICE VYKAZUJÍCÍ FOTONOVOU UP-KONVERZI: NOVÝ TYP LUMINISCENČNÍ ZNAČKY PRO ZOBRAZOVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH BIOMOLEKUL?

Antonín Hlaváček

Nanobiotechnologie, CEITEC Středoevropský technologický institut, Brno; ahlavacek@mail.muni.cz

Úvod

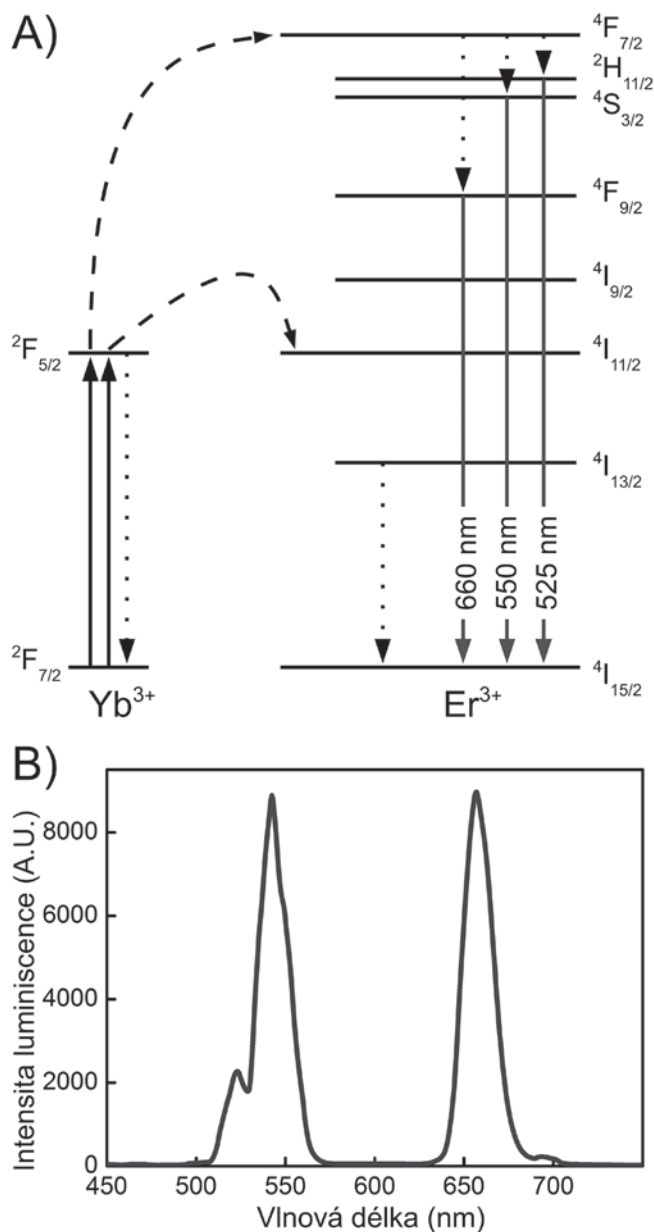
Metody pro studium jednotlivých molekul pomáhají objasnit dynamiku interakcí biomolekul, přítomnost konformačních stavů a subpopulací proteinů, které jsou skryté v klasických experimentech. Tyto metody tak dovolují objasnit například evoluci enzymů a molekulární základy některých nemocí.^{1,2,3,4} Luminiscenční mikroskopie je jednou z nejdůležitějších metod pro studium jednotlivých biomolekul.^{3,4} Nicméně omezená dostupnost a fyzikální vlastnosti současných luminiscenčních značek, které jsou pro experimenty nezbytné, brání

dalšímu rozvoji. Anti-Stokesova luminiscence, zvláště pak fotonová up-konverze (FU), v poslední době vzbuzuje stále větší pozornost.^{5,6} Očekává se, že především nová generace nanočástic vykazujících fotonovou up-konverzi (FUN) povede k rozvoji metod pro biologické zobrazování, cílený transport léčiv a detekčních metod v bioanalytické chemii.^{7,8} Pro optickou mikroskopii biologických vzorků představují FUN novou generaci luminiscenčních značek.⁷ Dosavadní výsledky naznačují, že FUN by mohly sloužit jako vysoce kvalitní luminiscenční značky pro zobrazování jednotlivých biomolekul.

Chemické a fyzikální vlastnosti FUN

FU je typem anti-Stokesovy luminiscence, která je charakteristická přeměnou dlouhovlnného elektromagnetického záření na krátkovlnné.⁹ FU vykazují krystalické materiály dopované d a zejména f prvky (lanthanoidy).^{6,8} Tyto materiály jsou schopné při laboratorní teplotě absorbovat infračervené záření a vyzařovat viditelné světlo. První materiály vykazující FU byly připraveny již v 60. letech. V 90. letech se pak začaly využívat pro biologické detekce. Částice s velikostí přibližně jednoho mikrometru byly nejdříve získávány mletím. Ačkoli byly tyto materiály nehomogenní, ukázaly potenciál těchto nových luminiscenčních značek především pro vývoj citlivých detekčních metod.^{10,11} Velké úsilí pak bylo věnováno přípravě homogenních nanočástic, tak aby bylo možné FU využít pro biologická zobrazování, včasnou diagnostiku a terapeutické účely.⁸ Tohoto cíle bylo dosaženo kolem roku 2000 s využitím poznatků moderní materiálové chemie.⁸ Nyní je možné připravovat chemicky homogenní a monodisperzní FUN s velikostí v rozsahu jednotek až stovek nm. Povrch FUN je také možné vhodně chemicky modifikovat a zajistit tak jejich kompatibilitu s biologickým prostředím.^{12,13}

V současné době jsou nejvíce zkoumány a používány FUN, které jsou tvořené nanokrystaly NaYF_4 dopovanými Yb^{3+} a Er^{3+} ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$). Ačkoli přímé srovnání účinnosti FU napříč různými materiály je náročné a pro většinu materiálů nebylo provedeno, je proces FU v těchto nanočásticích považovaný za jeden z nejúčinnějších.⁶ Mechanismus FU v nanokrystalech $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ lze popsat diagramem na Obr 1 a). Ion Yb^{3+} ve FUN absorbuje jeden foton při 980 nm a excituje se do stavu $^2\text{F}_{5/2}$. Následně je excitační energie přenesena do stavu $^4\text{I}_{11/2}$ iontu Er^{3+} , který je v blízkosti excitovaného iontu Yb^{3+} . Může dojít i k dalšímu přenosu energie z dalšího blízkého excitovaného iontu Yb^{3+} . Tím dochází k postupné excitaci Er^{3+} do stavu $^4\text{F}_{7/2}$. Po rychlé nezářivé relaxaci do jednoho ze tří stavů s mírně nižší energií může dojít k emisi fotonů s vlnovou délkou přibližně 525 nm, 550 nm (zelená) a 660 nm (červená). V emisním spektru se pak nacházejí maxima, která odpovídají těmto přechodům (Obr. 1 b). Velmi podobně probíhá FU v nanokrystalech $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$. Tento materiál při excitaci laserem 980 nm emituje záření s vlnovou délkou 450 nm, 475 nm (modrá) a 800 nm (infračervená). Kromě tohoto typu FU existuje i několik dalších, které se navzájem odlišují vzájemnou interakcí kovových iontů v krystalické mřížce. Vlastnosti nosné krystalové mřížky, vzájemná poloha a množství iontů určují podobu emisních a absorpčních spekter a také účinnost FU. Účinnost FU je také závislá na velikosti nanočástic. Zatímco pro makroskopické krystaly dosahuje FU účinnosti několika procent, u velmi malých nanokrystalů (~10 nm) s velkým měrným povrchem se jedná typicky o zlomky procenta. Tento jev lze vysvětlit především nezářivými přechody, ke kterým dochází na povrchu FUN. Účinnost emise FUN také závisí na symetrii krystalu hostitelského materiálu. Šesterečné nanokrystaly NaYF_4 poskytují asi desetkrát účinnější FU než kubické, což je dáno různými prostorovým uspořádáním kovových iontů v těchto materiálech.



Obr. 1: Fotonová up-konverze v nanokrystalech $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$. (A) Ionty Yb^{3+} absorbují záření s vlnovou délkou 980 nm (plné šipky) a postupně excitují ionty Er^{3+} (čárkované šipky). Excitované ionty Er^{3+} pak přecházejí do základního stavu zářivými (plné šipky) a nezářivými procesy (tečkované šipky). (B) V emisním spektru se objevují maxima, která odpovídají těmto přechodům.

Dostatečně kvalitní, chemicky homogenní, monodisperzní a malé FUN (~10 nm v průměru) jsou v současné době připravovány v organických rozpouštědlech s vysokým bodem varu, jako je kyselina olejová a okta-decen.¹⁴ Při vysokých teplotách (kolem 300 °C) dochází k pomalé přeměně reaktantů a rovnoměrnému růstu nanokrystalů. Připravené nanokrystaly jsou vysoce monodisperzní a také nevyhnutelně silně hydrofobní. Pro bioanalytické aplikace jsou však vyžadovány nanomateriály s hydrofilním povrchem.^{12,13} Vhodným řešením tohoto problému je vytváření silikátového obalu na povrchu FUN.¹⁵ Pro vytvoření silikátového obalu na povrchu hydrofobních FUN se nejčastěji používá reverz-

ní mikroemulze. Tato mikroemulze umožňuje vytvářet hydrofilní silikátovou vrstvu na povrchu FUN, jejíž tloušťku lze měnit v rozsahu od desetin až po desítky nm. Silikátová vrstva také umožňuje kovalentní připojení různých funkčních skupin a polymerních řetězců, které brání agregaci FUN a řídí jejich interakce s okolím. Dále silikátová vrstva umožňuje na povrch FUN zavést reaktivní skupiny, které mohou specificky reagovat s biomolekulami. Takto modifikované FUN lze již přímo použít pro luminiscenční značení biomolekul, jako jsou například protilátky a nukleové kyseliny.^{12,15}

Ve srovnání s jinými anti-Stokesovými procesy, například dvoufotonovou luminiscencí, které jsou v současnosti v mikroskopii rovněž využívány, FUN mohou být excitovány infračerveným zářením s řádově až milionkrát nižší intenzitou.⁹ Díky tomu není nutné používat nákladné femtosekundové lasery, ale postačují levné polovodičové lasery. Další výhody charakteristické pro FUN jsou (A) velký anti-Stokesův posun umožňující vynikající odstínění excitujícího záření a (B) možnost nastavovat emisní maxima FUN změnou chemického složení. Je tedy možné vytvářet spektrálně odlišitelné – „barevné“ – nanočástice. Pro mikroskopii biologických vzorků má význam především skutečnost, že biologický materiál v interakci s infračerveným excitačním zářením nevytváří rušivé luminiscenční pozadí, což je častý problém Stokesových značek (organické fluorofory a kvantové tečky). Dalšími příznivými vlastnostmi, kterými se FUN odlišují od klasických Stokesových značek, jsou nižší rozptyl dlouhovlnného excitačního záření, nízké fotochemické poškození biomolekul, ke kterému jinak dochází působením krátkovlnného záření, hlubší penetrace excitačního infračerveného záření do biologického materiálu, vysoká fotostabilita, a absence kolísání intenzity emitovaného záření („blinking“).^{7,8,16,17}

Mikroskopie s využitím fotonové up-konverze

Ve srovnání s dvoufotonovou mikroskopií je mikroskopie využívající FU méně instrumentálně náročná. Není nutné používat úzce zaostřený paprsek femtosekundového laseru a mikroskopie tak není omezena na konfokální skenující uspořádání. Jako excitační zdroj postačují polovodičové lasery, jejichž intenzita je v čase stálá. FUN je tak možné využít i v uspořádání epifluorescenční mikroskopie a mikroskopie využívající úplný vnitřní odraz světla (TIRM).

Literatura

1. Kusumi A, Tsunoyama TA, Hirose S, et al.: *Nat. Chem. Biol.* 10, 524 (2014).
2. Liebherr RB, Renner M, Gorris HH: *J. Am. Chem. Soc.* 136, 5949 (2014).
3. Walt DR: *Anal. Chem.* 85, 1258 (2013).
4. Holzmeister P, Acuna GP, Grohmann D, Tinnefeld P: *Chem. Soc. Rev.* 43, 1014 (2014).
5. Gorris HH, Wolfbeis OS: *Angew. Chem., Int. Ed.* 52, 3584 (2013).
6. Haase M, Schäfer H: *Angew. Chem., Int. Ed.* 50, 5808 (2011).

Ačkoli je epifluorescenční mikroskopie a TIRM méně náročnou metodou než konfokální mikroskopie, byla využita jako první pro zobrazování jednotlivých FUN a umožnila zobrazit i velmi malé FUN s velikostí ~5 nm.¹⁸ Tato velikost se přibližně shoduje s velikostí proteinů, například zeleného fluoreskujícího proteinu nebo lidského sérového albuminu. Konfokální mikroskopie je typem skenující mikroskopie. To znamená, že při vytváření snímku je zapotřebí zaměřit laserový paprsek do oblasti vzorku, změřit intenzitu luminiscence v daném bodě a takto postupovat přes celou zobrazovanou plochu bod za bodem. Výsledná doba pro získání celého snímku je tak u konfokálního mikroskopu poměrně dlouhá. Konfokální mikroskopie se tak hodí především pro zobrazování statických struktur, jako je například struktura buňky. Epifluorescenční mikroskopie a TIRM se zatím ve srovnání s konfokální mikroskopií jeví jako poněkud méně citlivé. S jejich pomocí bylo dosaženo zobrazování na úrovni jednotlivých FUN přibližně o velikosti 20 nm.¹⁹ Nicméně, s pomocí těchto metod je možné dosáhnout vyšší frekvence snímkování než je tomu u konfokální mikroskopie. Epifluorescenční mikroskopie a TIRM se tak hodí pro záznam dynamických procesů, jako jsou interakce jednotlivých biomolekul, kde je zapotřebí snímkovat s frekvencí 10 – 100 s⁻¹.¹⁹ Takto vysokých frekvencí lze dosáhnout, protože v jednom okamžiku je osvětlována celá plocha vzorku a současně je ukládán i celý obraz.

Závěr

V textu jsou popsány vlastnosti FUN a naznačeny možnosti jejich využití v optické mikroskopii biologických vzorků. FUN jako luminiscenční značky jsou kompatibilní se skenující konfokální mikroskopií, která je vhodná pro zobrazování statických struktur i epifluorescenční mikroskopií a TIRM, které jsou vhodné pro pozorování rychlých dějů vyžadujících vysokou frekvenci snímkování. Na základě jejich vlastností – především zobrazování s nízkým luminiscenčním pozadím a vysoké stabilitě – lze předpokládat budoucí využití těchto nanočástic pro zobrazování jednotlivých biomolekul a sledování jejich interakcí v reálném čase. Připojením FUN na biomolekuly se tak luminiscenční mikroskopie využívající FU může stát významnou metodou pro vizualizaci jednotlivých biomolekul, například membránových receptorů, studium interakcí jednotlivých biomolekul a rovněž metodou umožňující detekci jednotlivých biomolekul.

7. Park YI, Lee KT, Suh YD, Hyeon T: *Chem. Soc. Rev.* 44, 1302 (2015).
8. Zhou J, Liu Q, Feng W, et al.: *Chem. Rev.* 115, 395 (2015).
9. Cohen BE: *Nature* 467, 407 (2010).
10. Zijlmans HJMAA, Bonnet J, Burton J, et al.: *Anal. Biochem.* 267, 30 (1999).
11. Van De Rijke F, Zijlmans H, Li S, et al.: *Nat. Biotechnol.* 19, 273 (2001).
12. Sedlmeier A, Gorris HH: *Chem. Soc. Rev.* 44, 1526 (2015).

Literatura (pokračování)

- Muhr V, Wilhelm S, Hirsch T, Wolfbeis OS: *Acc. Chem. Res.* 47, 3481 (2014).
- Wang F, Han Y, Lim CS, et al.: *Nature* 463, 1061 (2010).
- Hlaváček A, Sedlmeier A, Skládal P, Gorris HH: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 6930 (2014).
- Liu H, Xu CT, Dumlupinar G, et al.: *Nanoscale* 5, 10034 (2013).
- Xia A, Chen M, Gao Y, et al.: *Biomaterials* 33, 5394 (2012).
- Gargas DJ, Chan EM, Ostrowski AD, et al.: *Nat. Nanotechnol.* 9, 300 (2014).
- Zhan Q, He S, Qian J, et al.: *Theranostics* 3, 306 (2013).

Souhrn

Hlaváček A.: Nanočástice vykazující fotonovou up-konverzi: nový typ luminiscenční značky pro zobrazování jednotlivých biomolekul?

Metody pro studium jednotlivých biomolekul pomáhají objasnit jejich vlastnosti jinak skryté při měřeních v celém objemu vzorku. Velmi významnou metodou pro výzkum chování jednotlivých biomolekul je luminiscenční mikroskopie. Luminiscenční značky, které vykazují fotonovou up-konverzi, přináší nové možnosti v této oblasti. Předpokládá se, že zjednoduší a přinesou větší rozšíření metod pro vizualizaci jednotlivých biomolekul, např. membránových receptorů, studium jejich interakcí v reálném čase a rovněž nové možnosti pro detekci jednotlivých biomolekul.

Klíčová slova: Fotonová up-konverze, mikroskopie

Summary

Hlaváček A.: Photon upconversion nanoparticles: a new type of luminescent labels for single biomolecule imaging?

Single molecule methods allow us to explain properties of biomolecules on single molecule level, which are not apparent from bulk experiments. Luminescence microscopy is a very important method for single molecule experiments. Novel luminescent labels, which exhibit photon up-conversion, revealed new possibilities in this field. It is considered that photon up-conversion nanoparticles will allow for next development of single molecule methods and facilitate for visualization of individual biomolecules, e.g., membrane receptors, studies of their interactions in real time and also provide new possibilities for the detection of individual biomolecules.

Keywords: Photon upconversion, microscopy

ODPOVĚĚ NA POŠKOZENÍ DNA V OOCYTECH

Alexandra Mayer, Petr Šolc

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR, v. v. i., mayer@iapg.cas.cz

Úvod

Vývoj oocytů začíná již během prenatálního vývoje savců a je dočasně zastaven v průběhu profáze I. meiotického dělení. V tomto stádiu mohou oocyty přetrvávat až několik desítek let. Následně po jejich růstu a získání meiotické a vývojové kompetence dochází pod vlivem luteinizačního hormonu (LH) ke znovuzahájení meiózy, jejich zrání (meiotická maturace) a ovulaci ve stadiu metafáze II (MII) kdy je oocyt plně připraven k oplodnění. Po celou dobu vývoje je oocyt vystaven řadě exogenních a endogenních rizikových faktorů narušujících integritu genomu, což může vést k infertilitě nebo ke vzniku embryí s genetickými abnormalitami. Řada žen také podstupuje chemoterapii, jejímž následkem je vznik dvouřetězcových zlomů DNA (DSBs – angl. *double strand DNA breaks*) v oocytech a značně snížená schopnost reprodukce¹⁻³. Navíc *in vitro* manipulace oocytů při asistované reprodukci představuje další rizikový faktor pro integritu DNA, např. v důsledku kyslíkového stresu. Pochopení mechanismů detekce a opravy poškozené DNA v oocytech může proto také přispět ke zlepšení efektivity a bezpečnosti asistované reprodukce.

Signální dráhy odpovědi na poškození DNA

Integrita genomu oocytů může být narušena vlivem různých faktorů, zahrnujících jak endogenní poškození v důsledku vlastního metabolismu, tak exogenní poškození vyvolané chemicky nebo UV/IR zářením⁴. Jedním z nejnebezpečnějších druhů DNA poškození je právě vznik DSBs, avšak jednořetězcové zlomy nebo mezivláčkové spoje také přispívají k narušení chromozomové stability^{5,6}.

V somatických buňkách byla zjištěna řada mechanismů umožňující rozeznání DNA poškození⁷. V místě vzniku DSBs dochází k autofosforylaci a aktivaci kinázy ATM, která pak lokálně fosforyluje histon H2AX na zbytku Ser 139 (γ H2AX)^{8,9}. Forma γ H2AX je rozpoznána adaptorovým proteinem MDC1, který interaguje s komplexem MRE11/RAD50/NBS1 (MRN), který do míst DSBs pomáhá koncentrovat další molekuly ATM^{10,11}. Dochází tak k následné fosforylaci histonu H2AX v širokém okolí DSBs¹². Jednotlivé DSBs lze v jádře buňky mikroskopicky detekovat imunofluorescenčním barvením γ H2AX, přičemž jsou většinou pozorovány morfologicky specifické tečkovité útvary (angl. *foci*)⁹ v místech zlomů.

MRN komplex dokáže během S- a G2-fáze navíc DSBs zpracovat na jednořetězcové DNA přesahy, které vedou k aktivaci kinázy ATR^{13,14}. Senzorické kinázy ATM a ATR pak fosforylaci aktivují efektorové kinázy CHK1 a CHK2, jejichž aktivita vede k zastavení buněčného cyklu a indukci opravy DNA¹⁵. Pokud je poškození DNA masivní, spouští se apoptóza, programovaná buněčná smrt. Jedná se o přirozený mechanismus eliminace poškozených buněk pomocí proteáz a endonukleáz¹⁶.

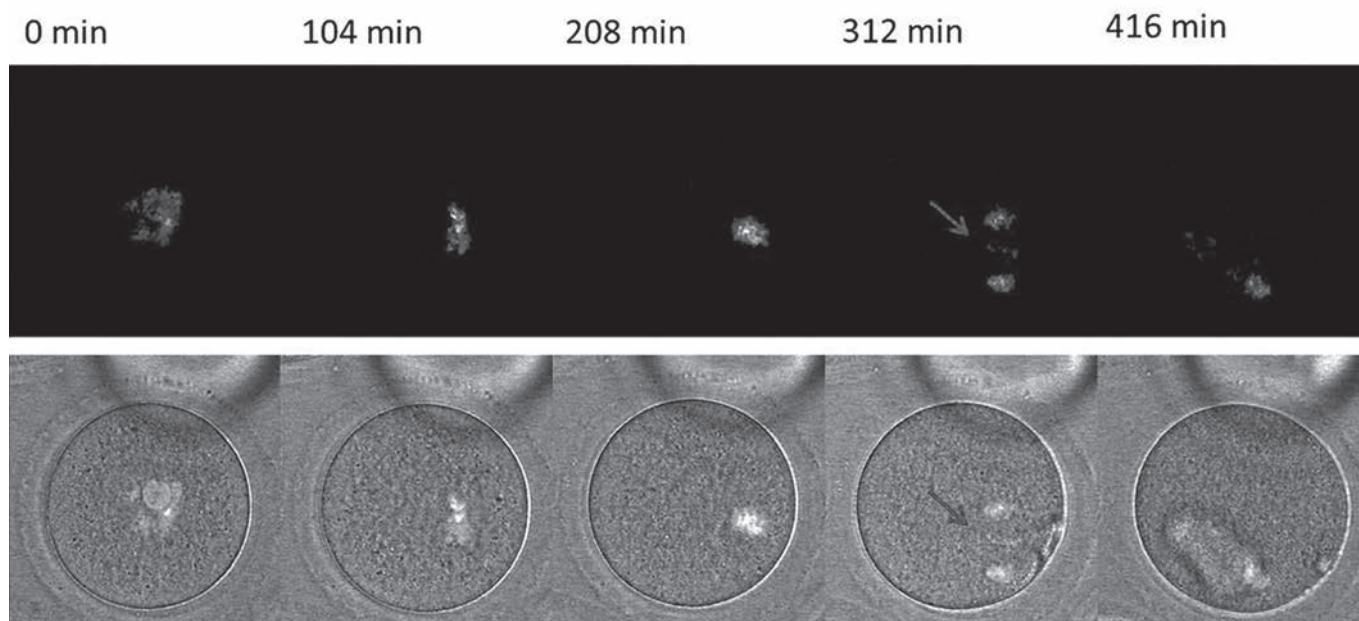
Nízká citlivost kontrolních bodů aktivovaných po DSBs v meioticky kompetentních oocytech

Oocyty, jako pohlavní buňky přenášející genetickou informaci na další potomstvo, musí efektivně chránit integritu svého genomu. Dostupné znalosti o odpovědi na poškození DNA v meioticky kompetentních oocytech jsou velmi omezené, avšak většina studií uvádí, že reakce oocytů je odlišná od reakce somatických buněk. Přestože DSBs představují značné nebezpečí, oocyty nereagují zastavením buněčného cyklu. Vznik dsDNA zlomů v důsledku inhibice topoizomerázy II spouští aktivaci G2 kontrolního bodu u somatických buněk, nicméně oocyty znovu zahajují meiózu bez omezení ve stejných experimentálních podmínkách^{17,18}. Jakmile se po znovuzahájení meiózy rozpadne jaderná membrána, přítomnost dsDNA zlomů nebrání ani průchodu meiózou I: výstavba dělicího vřeténka probíhá srovnatelně s kontrolními oocyty a dokonce i vstup do meiózy II a vydělení pólového tělíska není blokováno zvýšeným množstvím DSBs⁵ (Obr. 1). Zvýšené množství DSBs však vede ke vzniku chromozomálních fragmentů^{5,18}. Oocyty jsou schopny zastavit buněčný cyklus v profázi (odpovídající aktivaci G2 kontrolního bodu u somatických buněk) nebo MI fázi pouze při extrémně vysokém poško-

zení DNA, vyvolaném buď drogami (etoposid, neocarzinostatin, bleomycin, atd), nebo intenzivním UV-A ozáření^{5,6,18,19}. Příčinou nízké citlivosti kontrolních bodů u oocytů je snížená schopnost aktivace ATM a CHK1 kináz, a pravděpodobně také nedostatečná amplifikace signálu¹⁸. Na rozdíl od somatických buněk, kde aktivace G2 kontrolního bodu je důsledkem CHK1-dependenční fosforylace a destrukce CDC25A, oocyty využívají CHK1-dependenční inhibici CDC25B k navození kontrolního bodu buněčného cyklu^{18,20}. CDC25A a B jsou proteinfosfatázy, které se účastní aktivace CDK1, nezbytné pro vstup do mitózy a meiózy²⁰⁻²².

Oprava poškozené DNA v oocytech

Ačkoli v oocytech kontrolní body buněčného cyklu nejsou příliš citlivé na přítomnost poškozené DNA, není vyloučeno, že malá míra tohoto poškození je opravena během relativně dlouhé meiotické maturace. Expozice oocytů UV záření v různých fázích meiotické maturace vede k inkorporaci ³H-tymidinu, což indikuje schopnost oocytů opravovat DNA během meiotického zrání; nejvíc zlomů se však opravuje ještě během profáze I před znovuzahájením meiózy²³. Oocyty z mladých myší izolované v metafázi II jsou schopné opravit endogenní poškození DNA po několikahodinové inkubaci *in vitro*. Na opravě se nejspíš podílí mechanismy homologní rekombinace, protože RAD51 (marker homologní rekombinace) se akumuluje v místech dvouvláknových zlomů³. Je známo, že ve stárnoucích lidských a myších oocytech dochází k poklesu exprese genů, jejichž produkty jsou zapojeny do opravy DNA. Tento pokles je spojen se zvýšeným výskytem DSBs ve stárnoucích oocytech. Experimentálně bylo prokázáno, že působení genotoxického stresu v oocytech po inhibici genů podílejících se na rozeznání a opravě DSBs (MRE11,



Obr. 1: Maturace oocyty za přítomnosti dvouvláknových zlomů. Zrání oocyty pozorované pomocí konfokálního mikroskopu. DNA je značena pomocí histonu H2B-EGFP (růžově). Obrázky představují z-projekce H2B-EGFP kanálu a jednotlivé vybrané řezy ve světlém poli. Časování je uvedeno v minutách. Šipka ukazuje na výskyt segregačních problémů v anafázi I.

ATM, RAD51) vede k nárůstu poškození DNA ve srovnání s kontrolou, aktivaci apoptotické dráhy a snížení míry přežití oocytů²⁴. Nárůst γ H2AX (DSBs) v profázi I byl také zjištěn v oocytech z BRCA1 deficientních myší a u pacientek s BRCA1 mutací²⁴. BRCA1 je klíčový protein ATM-dependentní signální dráhy, a jeho mutace zvyšuje riziko rakoviny prsů a ovarií. Tato data svědčí o přítomnosti funkční signální dráhy opravy poškození DNA pomocí homologní rekombinace v oocytech.

Alternativní dráhy opravy DNA

Oocyty reagují na poškození DNA fosforylací histonu H2AX, ale na druhou stranu ATM kináza začíná být plně aktivována až v raném embryu. Zůstává tedy otázkou, jaké další kinázy přispívají k této fosforylaci¹⁸. Vzhledem k odlišné regulaci kontrolních bodů je proto možné, že v oocytech jsou funkční jiné signální dráhy, než ATM-dependentní, anebo efektivní oprava DNA poškození probíhá až po oplození během raného embryonálního vývoje. Ve prospěch poslední teorie svědčí některé studie: v případě reakce oocytů na tvorbu mezivláknových

spojů (ICL– angl. *interstrand crosslinks*), indukovaných mitomycinem C, opravný protein FANCD2 se nepřesunuje do míst DNA poškození v oocytech, ale až v jednobuněčném embryu⁶.

Závěr

DNA poškození představuje hrozbu pro přežití, a také pro správný vývoj embrya. Na rozdíl od somatických buněk, oocyty reagují zastavením buněčného cyklu pouze na větší míru DNA poškození, přičemž dvouvláknové zlomy DNA mohou být částečně tolerovány a mohou přetrvávat až do embryonálního vývoje. Mechanismy odpovědi na narušenou integritu DNA v oocytech a efektivita opravy stále zůstávají nedostatečně prozkoumány, přestože jejich význam pro reprodukční medicínu je značný.

Poděkování: poskytovateli (MŠMT) v rámci institucionální podpory výzkumu a vývoje č. MSMT-28477/2014, a projektu ExAM (CZ.1.05/2. 1. 00/03.0124).

Literatura

1. Arnon J, Meirou D, Lewis-Roness H, et al.: *Hum. Reprod. Update* 7, 394 (2001).
2. Iorio R, et al.: *Curr. Pharm. Des.* 20, 5388 (2014).
3. Kujjo LL, et al.: *PloS One* 5, e9204 (2010).
4. Mehta A, Haber JE: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016428 (2014).
5. Ma JY, et al.: *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1233 (2013).
6. Yuen WS, Merriman JA, O'Bryan MK, et al.: *PloS One* 7, e43875 (2012).
7. Harper JW, Elledge SJ: *Mol. Cell* 28, 739 (2007).
8. Burma S, Chen BP, Murphy M, et al.: *J. Biol. Chem.* 276, 42462 (2001).
9. Rogakou EP, Pilch DR, et al.: *J. Biol. Chem.* 273, 5858 (1998).
10. Lee JH, Paull TT: *Science* 304, 93 (2004).
11. Stucki M, Jackson SP: *DNA Repair* 3, 953 (2004).
12. Rogakou EP, Boon C, et al.: *J. Cell Biol.* 146, 905 (1999).
13. Hopkins BB, Paull TT: *Cell* 135, 250 (2008).
14. Williams RS, Tainer JA: *Mol. Cell* 19, 724 (2005).
15. Stracker TH, Roig I, et al.: *Front. Genet.* 4, 37 (2013).
16. Labi V, Erlacher M: *Cell Death, Dis.* 6, e1675 (2015).
17. Mailhes JB, Marchetti F, et al.: *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 14, 39 (1994).
18. Marangos P, Carroll J: *Curr. Biol. CB* 22, 989 (2012).
19. Lin F, et al.: *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 2674 (2014).
20. Mailand N, et al.: *Science* 288, 1425 (2000).
21. Solc P, et al.: *Dev. Biol.* 317, 260 (2008).
22. Lincoln AJ, et al.: *Nat. Genet.* 30, 446 (2002).
23. Masui Y, Pedersen R: *Nature* 257, 705 (1975).
24. Titus S, et al.: *Sci. Transl. Med.* 5, 172ra21 (2013).

Souhrn

Mayer A., Šolc P. : Odpověď na poškození DNA v oocytech

Důležitou úlohou oocytů je zajištění přenosu genetické informace do dalších generací. Narušení integrity DNA oocytů může představovat riziko pro zrání oocytů a vývoj embrya, a aktivní mechanismy detekce a opravy poškozené DNA jsou proto nezbytné pro přežití potomstva. Nejnovější studie však ukazují, že oocyty jsou schopné zrát i za přítomnosti poškozené DNA až do embryonálního stádia a reagují pouze na větší míru poškození. Nicméně oocyty mají kapacitu průběžně opravovat DNA během zrání, otázkou však zůstává efektivita této opravy.

Klíčová slova: oocyt, poškození DNA, dvouvláknové zlomy, meióza

Summary and key words

Mayer A., Šolc P. : The DNA damage response in oocytes

An important role of oocytes is transmission of genetic information to the next generations. Disruption of DNA integrity may affect maturation of oocytes and embryo development and active mechanisms of DNA damage detection and repair are thus needed for the successful reproduction. However, the recent studies show that oocytes are able to mature in the presence of damaged DNA until the embryonic stage and respond only to higher levels of damage. Nevertheless, the oocytes have the capacity to repair DNA throughout meiotic maturation, however the effectivity of the process remains unclear.

Keywords: oocyte, DNA damage, double strand breaks, meiosis

MELANOMA BEARING LIBECHOV MINIPIGS – ZVÍŘECÍ MODEL SPONTÁNNÍ REGRESE MELANOMU

Jana Čížková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Katedra veterinárních disciplín ČZU v Praze; cizkova@iapg.cas.cz

Úvod

Melanom patří mezi jeden z nejrozšířenějších typů nádorů s neustále se zvyšující incidencí nových případů. Přesné mechanismy předcházející iniciaci vzniku melanomu jsou zatím neznámé a z tohoto důvodu i nové imunoterapeutické metody léčby nejsou dostatečně účinné. Je tedy žádoucí, aby se výzkum dále zaměřoval na vývoj nových možností léčby. V tomto směru je určitě výhodné použití zvířecích modelů s co největší anatomickou, fyziologickou i genetickou podobností k člověku a právě tato kritéria splňuje prase, které má potenciál stát se spojovacím článkem mezi výzkumem a klinickou praxí při léčbě melanomu.

Melanom

Melanomy vznikají maligní transformací melanocytů, což jsou přirozeně se vyskytující buňky v epidermis, kde jsou zodpovědné za produkci melaninu, což je endogenní pigment, který chrání pokožku před škodlivým ultrafialovým zářením¹. Mimo kůži se melanocyty vyskytují i v jiných tkáních obsahujících pigment, a tudíž lze melanom rozdělit podle místa svého vzniku na nejčastěji se vyskytující kožní melanom, slizniční melanom a uveální melanom². Jako faktory ovlivňující rozvoj melanomu se uvádějí: míra pigmentace pokožky, délka vystavení pokožky UV záření^{3,4} a dědičná predispozice, jelikož zhruba 10 % melanomů je dědičného původu⁵.

Kožní melanom je jedním z nejzávažnějších kožních nádorů u lidí i zvířat se zvyšující se incidencí v bílé populaci v posledních desetiletích. Je také nejběžnějším typem melanomu zahrnující více než 90 % ze všech případů. Melanom vzniká v důsledku značného počtu změn v genetické výbavě melanocytu. Jedná se o složitý proces, který směřuje od benigního melanomu, přes melanom *in situ* až k heterogenní populaci nádorově transformovaných buněk invazivního nádoru, které se zcela vymanily kontrolním regulujícím mechanismům buněčného dělení, diferenciaci, a odumírání¹.

Histologicky se podle své struktury růstu a umístění dělí invazivní melanomy na 4 hlavní podtypy – nejčastěji se vyskytující superficiálně se šířící melanom (SSM), vertikálně prominující nodulární melanom (NM), lenti-go maligna melanom a akrolentiginózní melanom (AM). Jako pátý podtyp se uvádí vzácně se vyskytující desmoplastický melanom¹.

Zvířecí modely melanomu

V současné době se možnost využití experimentálních zvířecích modelů kožních nádorů pocházejících z melanocytů omezuje pouze na několik možností, z nichž mnohé požadují kombinaci karcinogenu a UV záření nebo vložení známého onkogenu⁶.

Kříženci ryb z rodu *Xiphophorus* jsou náchylní k spon-

tánním stejně jako k UV zářením vyvolaným melanomům. Tento model je cenný pro studium genetické a environmentální kontroly melanomu, ale rozdílné původy vzniku melanomu a nízké procento výskytu nádorů omezují možnosti využití tohoto modelu v klinických studiích^{7,8}.

U hlodavců jsou spontánně vzniklé melanomy vzácné, s výjimkou některých kmenů křečka Syrského, u kterého může být melanom indukován buď samotnými karcinogeny nebo v kombinaci s UV zářením^{8,9,10} a dvou spontánně vzniklých melanomových buněčných linií u myši – Cloudman S91 melanomová linie¹¹ a Harding-Passey melanomová linie¹².

V dnešní době se používají geneticky modifikované myši, které mají homologní melanomové léze k lidskému onemocnění. Ty by mohly být užitečné pro studium molekulárních mechanismů melanomové predispozice a role některých genů v melanomové progresi^{13,14,15}. Nicméně původ prekursoru melanomové buňky se liší od člověka, jelikož nepochází z bazální vrstvy epidermis nýbrž z dermis⁸. Kožní melanomy se objevují i u domácích zvířat, kdy poměrně běžně se s nimi setkáváme u psů, koní a některých plemen prasat¹⁶. U psů a koní se melanomy objevují až v pozdějším věku a histopatologickou charakteristikou jsou odlišné od lidských melanomů^{17,18,19}.

Melanomy u prasat byly pozorovány ve formě vrozených zhoubných nádorů především u dvou plemen – duroc a hampshire, ale s nízkým výskytem^{20,21,22,23,24,25,26}. Nicméně melanom je též dědičně založen u Hormel, Sinclair, MMS Troll a MeLiM (Melanoma bearing Libechov minipigs) prasat. Vlivem selekce se dnes v chovech těchto prasat vyskytuje vysoký výskyt melanomu před 3. měsícem věku^{27,28,29,30,31,32,33}. Bohužel tvorba transgenního melanomového prasete s jasně definovaným genetickým pozadím není možná, jelikož v současné době jsou známy pouze rizikové faktory vzniku melanomu, které ale nejsou kauzální. Nicméně určitým příslibem ve výzkumu melanomu by mohlo být prase s onkogenní mutantní formou proteinu p53 kódovaný genem TP53, jehož nemutovaná forma se podílí na supresi nádorů^{34,35}.

Model MeLiM (Melanoma bearing Libechov minipigs)

Miniaturní prasata z linie MeLiM (Melanoma bearing Libechov minipigs), která byla vyšlechtěna v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., mají genetickou predispozici pro onemocnění melanomem, a proto se u nich tento typ nádoru objevuje s vysokou mírou výskytu již v časném období života. U zvířat s kožním melanomem jsou též pravidelně pozorovány orgánové metastázy především do sleziny, lymfatických

uzlin a plic a zhruba 5 % zvířat umírá na progresi melanomu^{30,36}. Histologickou analýzou byl potvrzen výskyt tří hlavních typů lidského melanomu u těchto prasat – SSM, NM a AM. Výhodou tohoto modelu je možnost kontinuálně sledovat průběh onemocnění od zcela benigních až po plně maligní léze, přičemž je ale odlišeni různých fází malignity obtížné. Dále je možné pozorovat různé typy lézí na jednom zvířeti⁶.

Na první pohled jsou nádory velice tmavé, až černé, z důvodu vysokého obsahu melaninu v melanosomech, což přispívá i k jejich silné mechanické odolnosti. Důležitou vlastností popisovaného modelu je i to, že nádory exprimují typické lidské melanomové enzymy – tyrosinasy, α manosidázou a γ -glutamyltransferázu³⁷ a melanomové antigeny - MITF, MLANA, SILV, TYR, TYRP1, TYRP2 and SLC24A5³⁸.

Charakteristickým rysem MeLiM melanomů je jejich sklon k spontánní regresi, která je pozorována zhruba v 75 % případů^{30,36}. Tímto jevem se rozumí částečné nebo úplné vymizení melanomových buněk bez jakékoliv terapeutické intervence. To souvisí se schopností melanomu indukovat imunitní odpověď pravděpodobně skrze schopnost rozeznat nádorově-specifické nebo nádorově-asociované antigeny^{39,40}. Částečná spontánní regrese je u lidí popsána v 10 - 35 % všech případů. Naopak kompletní spontánní regrese melanomu je velmi vzácná. Je popisováno pouze kolem 40 dobře zdokumentovaných případů⁴¹. Konkrétní mechanismy zapojené do spontánní regrese nejsou zatím detailně známy, ale předpokládá se vliv mnoha faktorů např. stav endokrinního systému, výživa, genetické predispozice, vliv infekce, psychologické intervence a především vý-

znamná role imunitního systému. Předběžné výsledky ukázaly infiltraci nádorů cytotoxickými T lymfocyty. Tyto buňky specificky rozpoznávají nádorové antigeny prezentované na povrchu nádorových buněk a navozují jejich lýzu. Tuto teorii v případě MeLiM modelu podporuje velice často pozorovaná depigmentace štětín a kůže v bezprostředním okolí regredujících nádorů jakožto následek imunitní reakce proti melanocytům procesem haptence, jelikož nádorové melanosomy vykazují časté abnormality včetně povrchových defektů⁴².

Závěr

Spontánní regrese je zajímavý fenomén, který ale lze pouze velmi obtížně studovat v lidské populaci, jelikož pacienty s již diagnostikovaným melanomem nelze ponechat bez léčby. Zvířecí model MeLiM představuje jedinečnou příležitost, jak se lze této problematice detailněji věnovat. Naše laboratoř se v dalším výzkumu zaměřuje nejen na vliv imunitního systému proti samotným melanomovým buňkám, nýbrž i na interakce imunitní systém – mikrobiom – melanom, kdy z dostupných studií vyplývá, že bakteriální infekce může mít značný vliv při indukci spontánní regrese melanomu.

Z výše uvedených důvodů je zřejmé, že prasata z linie MeLiM jsou vhodná pro použití ve výzkumu časových aspektů spontánní regrese melanomu.

Poděkování: Tato práce vznikla za podpory poskytovatele (MŠMT) v rámci institucionální podpory výzkumu a vývoje č. MSMT-28477/2014, a projektu ExAM (CZ.1.05/2. 1. 00/03.0124).

Literatura

1. Dunki-Jacobs EM, Callendar GG, McMasters KM: *Current Problems in Surgery*. 50, 351 (2013)
2. Ali Z, Yousaf N, Larkin J: *Eur. J. Cancer Suppl.* 11, 81 (2013)
3. Lea CS, Scotto JA, Buffler PA, et al.: *Annals of Epidemiology*. 17, 447 (2007)
4. Gilcrest BA, Geller AC: *N. Engl. J. Med.* 341, 766 (1999)
5. Rivers JK: *The Lancet*. 347,803 (1996)
6. Vincent-Naulleau S, Le Chalony C, Leplat JJ, et al: *Pigm. Cell Res.* 17, 24 (2004)
7. Berkelhammer J, Hook RR: *Transplantation*. 29, 193 (1980)
8. Berkelhammer J, Ensign BM, Hook RR, et al: *J. Natl. Cancer Inst.* 68, 461 (1982)
9. Bardeesy N, Wong KK, DePinho RA, et al: *Adv. Cancer Res.* 79, 123 (2000)
10. Tietze MK, Chin L: *Mol. Med. Today*. 6, 408 (2000)
11. Pawelek JM: *J. Invest. Dermatol.* 66, 201 (1976)
12. Sugiura K: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 100, 334 (1963)
13. Bodey B: *Expert Opin. Biol. Ther.* 2, 459 (2002)
14. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE: *In Vivo*. 12, 107 (1998)
15. Boisgard R, Vincent-Naulleau S, Leplat JJ, et al: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 30, 826 (2003)
16. Clark WH: *Adv. Cancer Res.* 65, 113 (1994)
17. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC: *Hum. Pathol.* 30, 543 (1999)
18. Cui J, Chen DL, Misfeldt ML, et al: *Pigm. Cell Res.* 8, 60 (1995)
19. Dasgupta TK, Ronan SG, Beattie CW, et al: *Pediatric Dermatology*. 6, 289 (1989)
20. Dennis LK: *Arch. Dermatol.* 135, 275 (1999)
21. Dooley TP: *Oncol. Res.* 6,1 (1994)
22. Fisher LF, Olander HJ: *J. Comp. Pathol.* 88, 505 (1978)
23. Fleury C, Berard F, Balme B, et al: *Pigm. Cell Res.* 13, 39 (2000)
24. Garmaavina A, Valli VE, Lumsden JH: *J. Cutaneous Pathol.* 8, 3 (1981)
25. Geffroin C, Horak V, Crechet F, et al: *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 1524, 196 (2000)
26. Greene JF, Townsend JS, Amoss MS: *Lab. Invest.* 71, 17 (1994)
27. Halliday GM, Patel A, Hunt MJ, et al: *World J. Surg.* 19, 352 (1995)
28. Hjerpe CA, Theilen GH: *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 144, 1129 (1964)
29. Hook RR, Aultman MD, Adelstein EH, et al: *Int. J. Cancer*. 24, 668 (1979)
30. Horak V, Fortyn K, Hruban V: *Cell. Mol. Biol.* 45, 1119 (1999)

Literatura (pokračování)

31. Hordinsky MK, Ruth G, King R: *J. Hered.* 76, 385 (1985)
32. Hurwitz PJ: *Ann. Plast. Surg.* 26, 403 (1991)
33. King M, Spooner D, Rowlands DC: *Clinical Oncology.* 13, 466 (2001)
34. Flisikowska T, Kind A, Schnieke A: *Transgenic Res.* 22, 673 (2013)
35. Leuchs S, Saalfrank A, Merkl C, et al: *PLoS One.* 7, e43323 (2012)
36. Fortyn K, Hruban V, Horak V, et al: *Veterinarni Medicina.* 39, 597 (1994)
37. Borovansky J, Horak V, Elleder M, et al: *Melanoma Res.* 13, 543 (2003)
38. Rambow F, Malek O, Geffrotin C, et al: *Pigm. Cell Melanoma Res.* 21, 147 (2008)
39. Fang L, Lonsdorf AS, Hwang ST: *J. Invest. Dermatol.* 128, 2596 (2008)
40. Paredes BE: *Pathologie.* 28, 453 (2007)
41. Menzies SW, McCarthy WH: *Arch. Surg.* 132, 553 (1997)
42. Westerhof W, Manini P, Napolitano A, et al: *Exp. Dermatol.* 20, 376 (2011)

Souhrn

Čížková J.: Melanoma bearing Libechov minipigs – zvířecí model spontánní regrese melanomu

Maligní melanom je jedním z nezávažnějších kožních nádorů u lidí i zvířat. Je vysoce odolný vůči konvenčním terapiím a i přes velké úsilí při vývoji nových imunoterapií došlo jen k jejich drobným vylepšením. Proto se jako ideální směr dalšího výzkumu jeví možnost vývoje imunoterapií, které by byly schopné navodit kompletní regresi nádoru, což je ideální výsledek při léčbě jakéhokoliv nádoru. Bohužel podmínky potřebné k dosažení úplné regrese nejsou dosud dobře známé. V laboratoři biologie nádorů v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR je k dispozici model melanomu u miniaturních prasat, u kterého dochází k spontánní regresi nádorů po období progresi spojené s metastázami především do sleziny, plic a lymfatických uzlin, kdy dojde k vyléčení většiny zvířat a pouze asi 5 % umírá na progresi nádoru nebo přidružené komplikace. Další výzkum MeLiM modelu umožní získat nové poznatky o spontánní regresi melanomu a nabídne nové možnosti pro tvorbu účinnějších imunoterapií.

Klíčová slova: MeLiM, velký zvířecí model, melanom, spontánní regrese

Summary

Čížková J.: Melanoma bearing Libechov minipigs – animal model of spontaneous regression of melanoma

Malignant melanoma is one of the most serious skin cancer diseases in humans and animals. It is highly resistant to conventional therapies and despite major efforts in development of novel immunotherapies there have been only minor improvements. Therefore, an ideal further research should be led towards developing immunotherapies that would be capable of inducing a complete tumor regression. This is the ideal result of the treatment of all tumor. Unfortunately, the conditions required to achieve complete regressions are not well known yet. In the laboratory of tumor biology at the Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR an animal model of melanoma is being researched, ie melanoma bearing Libechov minipigs, in which spontaneous tumor regression occurs after a period of progression associated with organ metastases - mainly in the spleen, lungs and lymph nodes. Most animals are completely cured, but around 10 % die of tumor progression or associated complications. Further research of MeLiM model will provide new knowledge about the spontaneous regression of melanoma and offer new possibilities for creating more effective immunotherapy.

Keywords: MeLiM, large animal model, melanoma, spontaneous regression

LETNÍ OSMISMĚRKA

C K Q L H Z J N D P S L A E P
F H O Z N E I I V A U D I P S
F Z O Z C M V E J C H F P F P
B T X L A H L J I B A G P P Y
I H V I E G N F D R M U B N O
O T H B O S E Y G Y F P U O M
R T V E O R T O L R X L S C Z
E F Q R A H T E Y P H L Y S Á
A G T S H A X B R V O J F I S
K A A K M R R P U O E I G B A
T A S O T P O P A B L K B U D
O M R K W C E B I U R E T R A
R H F O T O L I T H O T R O F
C G V U L P T N B Q H G V L R
L G X I T U F B C I E T N T X

Najděte níže definovaná hesla:

1. skupina fyzikálně-chemických separačních metod
2. organismus, který využívá světelné záření k získávání energie a redukčních ekvivalentů a anorganické látky jako zdroj uhlíku
3. nejvýznamnější steroidní sloučenina vyšších živočichů, patřící mezi isoprenoidy. U člověka je syntetizována téměř ve všech tkáních (zejména v játrech); je obsažena v buněčných membránách a v krevních lipoproteinech, a to jak volná, tak ve formě esterů s vyššími mastnými kyselinami. Snižuje fluiditu membrán, a tím i jejich propustnost pro malé molekuly. Je prekursorem biosynthese steroidních hormonů.
4. souhrnný název pro enzymy umožňující vznik bioluminiscence; oxidoreduktasa katalyzující oxidaci specifického substrátu kyslíkem za spolupůsobení ATP a hořčnatých iontů.
5. zařízení, kde probíhá růst buněk a tvorba produktů nebo konverze substrátu na jeden či více produktů.
6. řízená smrt buňky, způsobená „naprogramovanou sebevraždou“; vychází z jejího genetického programu nebo je vyvolána vnějším podnětem.
7. enzym ze třídy lyas, který v temné fázi fotosynthese katalyzuje připojení CO_2 k molekule ribulosa-1,5-bisfosfátu a následné rozštěpení vzniklého meziprojektu na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Kromě této karboxylační reakce (fixace CO_2) katalyzuje oxygennační reakci při níž se na molekulu stejného akceptoru váže molekulový kyslík a kromě 3-fosfoglycerátu vzniká fosfoglykolát.
8. vitamin rozpustný ve vodě. Typickým projevem avitaminosy je nemoc beri-beri, charakteristická poruchami funkce srdce a centrálního i periferního nervstva; vyskytuje se v oblastech, kde základem stravy je loupaná rýže.
9. plyn produkovaný během anaerobní degradace organických materiálů a skládající se zejména z metanu (CH_4) a oxidu uhličitého (CO_2)
10. kondenzační produkt dvou molekul močoviny používaný k průkazu peptidů a bílkovin a ke stanovení koncentrace bílkovin.
11. látka schopná přijímat proton
12. molekula DNA, do níž může být inkorporována určitá sekvence a která může být následně vnesena do buňky, jež pak vnesenou sekvenci uchovává, replikuje a realizuje.
13. konjugovaný pár kyseliny (nebo zásady), který je schopný udržovat v jistém rozmezí stabilní pH i po přidání silné kyseliny či zásady do systému.

zdroj: Wikipedia; Kodíček M.: Biochemické pojmy, Vydavatelství VŠCHT Praha, 2007

OBSAH

Úvod	29
Errata	30
Jablonská E.: Titan a jeho slitiny s nanotubulární povrchovou úpravou s potenciálním využitím v ortopedii	31
Hlaváček A.: Nanočástice vykazující fotonovou up-konverzi: nový typ luminiscenční značky pro zobrazování jednotlivých biomolekul?	38
Mayer A., Šolc P.: Odpověď na poškození DNA v oocytech	41
Čížková J.: Melanoma bearing Libechev minipigs – zvířecí model spontánní regrese melanomu	44

CONTENTS

Editorial	29
Errata	30
Jablonská E.: Titanium and its alloys with a nanotubular surface modification for orthopaedic applications	31
Hlaváček A.: Photon upconversion nanoparticles: a new type of luminescent labels for single biomolecule imaging?	38
Mayer A., Šolc P.: The DNA damage response in oocytes	41
Čížková J.: Melanoma bearing Libechev minipigs – animal model of spontaneous regression of melanoma	44

REDAKČNÍ RADA

Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PŘF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
Doc. RNDr. Marek Petřivalský, PhD., Katedra biochemie, PŘF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PŘF UK, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i. Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PŘF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: Trends Biotechnol. 28, 485 (2010)

Lowestein KA: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 2006

Fujiki M. (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry 248. (Soai K. ed.), Springer, Berlin, 119-201.

Novák Z.: Disertační práce. VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obř. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nevkládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: Trends Biotechnol. 28, 485 (2010)

Lowestein KA: Silicones. A Story of Research. Wiley, New York 2006

Fujiki M. (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry 248. (Soai K. ed.), Springer, Berlin, 119-201.

Novak Z.: Diploma Thesis, ICT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydávaných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).