

BIOMATERIAŁY STOSOWANE W INŻYNIERII KOMÓRKOWEJ I MEDYCYNIE REGENERACYJNEJ

BIOMATERIALS FOR TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE

Maria Nowacka

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, Polska
e-mail: mnowacka@cbmm.lodz.pl*

Abstract

Wstęp

1. Polimery stosowane w medycynie
2. Biologia oddziaływań komórka-podłoże
3. Czynniki wpływające na zachowanie komórek
 - 3.1. Wpływ topografii powierzchni
 - 3.2. Wpływ szorstkości powierzchni
 - 3.3. Sztywność podłoża
 - 3.4. Wpływ hydrofilowości powierzchni i obecności specyficznych grup funkcyjnych
 - 3.5. Wpływ ładunku powierzchniowego

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



mgr Maria Nowacka, absolwentka wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę dyplomową pt. „Chromatograficzna detekcja i oznaczanie związków arsenu i krzemu” wykonała w Katedrze Chemii Analitycznej i Nieorganicznej, w Zakładzie Analizy Instrumentalnej. Od 2011 roku jest słuchaczką studium doktoranckiego Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, gdzie pracuje pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Kowalewskiej. Prowadzone przez nią badania dotyczą syntezy i właściwości nowych biomateriałów do zastosowań jako specyficzne podłoża

do hodowli komórek macierzystych.

ABSTRACT

Tissue engineering is a very rapidly developing domain of science. There is a huge interest in the biology of stem cells, especially in their proliferation, differentiation and spreading in the response to different factors. Biomaterials with properties similar to the natural environment of human body (accelerating wounds healing and not causing immunological response) as well as these that can control cells behavior are in constant need. This review presents the most popular polymeric biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine [3–5, 8–20], explains interactions between cells and biomaterials [3, 13, 22–33], describes the most important surface properties that can have an influence on cells i.e. topography [36, 43–47, 53–72], roughness [1, 5, 31, 51, 66, 73–84], stiffness [54, 84–102], hydrophobicity, chemistry [4, 11, 16, 20, 27, 31, 32, 36–38, 42, 58, 103–112] and surface charge [18, 37, 113–116].

Keywords: biomaterials, biopolymers, surface specificity, tissue engineering

Słowa kluczowe: biomateriały, biopolimery, inżynieria komórkowa, specyfika powierzchni

WSTĘP

Naukowcy poszukują biomateriałów o właściwościach imitujących naturę, o właściwościach maksymalnie zbliżonych do naturalnych warunków panujących w organizmie człowieka. Celem tych badań jest stworzenie materiału przyspieszającego gojenie się ran oraz niepowodującego odpowiedzi immunologicznej organizmu pacjenta. Idealnym rozwiązaniem byłoby stworzenie biomateriału o właściwościach zbliżonych do właściwości narządu, który ma zastępować lub wspomagać.

Konwencjonalnym materiałem na protezy, używanym od wielu lat są metale. Są one stosowane w celu uzupełnienia m.in. ubytków kostnych u pacjentów po skomplikowanych złamaniach kończyn lub operacjach kręgosłupa. Materiałem stosowanym od dawna standardowo w implantologii są stopy tytanu [1, 2]. Mają one dobre właściwości mechaniczne, jednak ich użycie wiąże się z ryzykiem odrzucenia implantu. Przede wszystkim jednak materiały te nigdy nie zastąpią utraconych tkanek i nigdy nie będą w pełni biokompatybilne z organizmem chorego. Dlatego w ostatnich latach rozpoczęto badania nad zastosowaniem materiałów polimerowych, jako tworzyw do produkcji implantów i protez. W konsekwencji, coraz szersze zastosowanie w chirurgii, medycynie i transplantologii znajduje wiele materiałów polimerowych [3–9]. Biomateriały te mogą być wykonane z polimerów czystych jak i kompozytów, czyli mieszanin kilku polimerów z dodatkiem metali (tj. srebro, złoto, cynk, chrom, miedź, kobalt, tytan), materiałów ceramicznych itp. [5, 9].

1. POLIMERY STOSOWANE W MEDYCYNIE

Polimery, zarówno pochodzenia naturalnego (np. kolagen, fibrynogen, kwas hialuronowy, chityna, chitozan), jak i te otrzymane sztucznie (np. polichlorek winylu PVC, polichlorek winylidenu PVDC, polialkohol winylowy PVAL, polietylen PE, polistyren PS, politetrafluoroetylen (teflon) PTEE, polipropylen PP, polimetakrylan metylu PMMA, poliwęglany PC, PA, politereftalan etylenu PET, silikon, poliuretany PU, żywice epoksydowe), znalazły szerokie zastosowanie w medycynie [5, 10]. Są one stosowane zarówno do wyspecjalizowanych zadań (implanty, nici chirurgiczne, soczewki kontaktowe, a także środki krwiozastępcze czy pomocnicze środki farmakologiczne), jak również wykonywane są z nich narzędzia chirurgiczne czy dreny. Biomateriały, zależnie od sposobu kontaktu z organizmem, powinny oprócz odpowiednich właściwości fizyczno-chemicznych, spełniać określone wymogi [3, 11, 12]. Polimery mające długotrwały kontakt z wewnętrznymi tkankami organizmu, np. implanty czy nici chirurgiczne lub wykorzystywane, jako leki, środki krwiozastępcze oraz pomocnicze środki farmakologiczne powinny być nietoksyczne. Polimery mające kontakt z zewnętrznymi częściami organizmu ludzkiego, muszą dodatkowo charakteryzować się odpornością na działanie środków czyszczących, odkażających oraz środków fizycznych m.in. wysokiej temperatury, które są niezbędne do ich wyjaławiania.

Ostatnio badania skupiają się na możliwości zastosowania w pełni biodegradowalnych, biokompatybilnych i bioresorbowalnych materiałów polimerowych: polilaktydu, polikaprolaktonu i poliglikolidów [13]. Monomery do ich syntezy mają centra chiralne, a czas rozkładu oraz właściwości polimerów zależą, oprócz masy cząsteczkowej, również od formy stereoizomeru [13]. Ponadto, polimery te mogą mieć specyficzne właściwości – na przykład racemiczna forma L,D-polilaktydu ma właściwości osteoindukcyjne [14].

Udoskonalą się także biodegradowalne materiały, które są wykorzystywane w przypadku uszkodzeń tkanki kostnej i chrzęstnej. Materiały polimerowe stosowane w ortopedii powinny ulegać rozkładowi powoli, stopniowo pozwalając na odtwarzanie się tkanki kostnej chorego i nie tracąc zbyt szybko swych właściwości mechanicznych [15–17]. Muszą się one charakteryzować odpowiednią sztywnością, odpornością mechaniczną oraz ulegać degradacji w określonym czasie, aby zapewnić prawidłową odbudowę uszkodzonych tkanek. Korzystne jest stosowanie materiałów o właściwościach mechanicznych, które nie będą lepsze od naturalnych właściwości tkanki kostnej. Dzięki temu rosnące komórki muszą od samego początku pracować, przez co nie ulegają osłabieniu, tak jak w przypadku implantów metalowych [15–17]. Inną dziedziną medycyny, gdzie korzysta się z bioresorbowalnych implantów jest kardiologia i neurochirurgia. Materiały tego typu stosuje się w procesach wymagających regeneracji małych naczyń krwionośnych i nerwów [15]. Obecnie produkowane są również stenty stosowane w kardiologii, które uwalniają w określonych odstępach czasowych różne substancje lecznicze [5]. Ze względu na wagę tych badań poszukuje się nie tylko materiałów, które nie powodowałyby odpowiedzi immunologicznej układu odpornościowego, ale także substancji, których zastosowanie zmniejszałoby właściwości trombogenne danego materiału [3]. Jedną z takich substancji jest od dawna stosowany polisacharyd – heparyna [3]. Znane i ogólnie stosowane są także polimery zawierające fosforylocholinę 2-metakryloksyetylu MPC [18]. Dzięki obecności zwitterjonu w grupach fosfolipidowych, które występują naturalnie w błonach komórkowych polimer ten jest nietrombogeniczny oraz wysoce biokompatybilny [18].

Stosunkowo nowym pomysłem jest wykorzystanie klatkowych polisilsekwioksanów (POSS), jako dodatku do polimerów używanych, jako biomateriały. Na przykład zbadana została biokompatybilność poliwęglanourethanów z bocznymi ugrupowaniami silsekwioksanowymi (POSS-PCU) z uwzględnieniem ewentualnej toksyczności oraz wpływu na czynności życiowe komórek [19]. Zgodnie z przedstawionymi wynikami badań materiały wykonane z POSS-PCU charakteryzowały się znacznie mniejszą hydrofobowością niż standardowo stosowane materiały tj. tytan, teflon, Dacron. Ułatwiały również adhezję komórek śródbłonna do powierzchni [20]. POSS-PCU został wykorzystany, jako surowiec do produkcji sztucznych zastawek serca [4, 8]. Polimerowe zastawki mają przewagę nad wszczepianymi często naturalnymi zastawkami, ponieważ nie ulegają one zwapnieniu ani degradacji, przy jednoczesnym niewielkim ryzyku odrzucenia ich przez organizm pacjenta [4, 8, 9]. Zastosowanie, jako materiału polimeru zawierającego POSS zamiast naturalnych

zwierzęcych tkanek, zwiększyło hydrofobowość powierzchni, tym samym zmniejszając podatność związków wapnia do adhezji, przy jednoczesnym wzroście wytrzymałości mechanicznej zastawki [4].

Pomimo ciągłego postępu badań, wciąż nierozwiązanym problemem pozostaje kwestia odrzucania implantów przez organizm pacjenta. Niezbędne jest też potwierdzenie braku właściwości toksycznych, mutagennych, nie powodowanie zmian chorobowych, nie zmienianie składu płynów ustrojowych zarówno przez sam polimer, jak i przez produkty jego rozkładu [3, 5]. W przypadku wielu chorób i uszkodzeń narządów wewnętrznych często jedynym możliwym rozwiązaniem jest transplantacja. Ma to miejsce m.in. w przypadku uszkodzeń serca, wątroby, skóry, małych naczyń krwionośnych [13]. Idealnym przypadkiem byłaby możliwość wyhodowania z komórek pacjenta nowych, zdrowych tkanek bądź też nawet całych narządów, którymi można by zastąpić uszkodzone bądź chore. Dlatego w ostatnich latach ogromnym zainteresowaniem cieszą się badania nad zastosowaniem komórek macierzystych w medycynie [21]. Związane jest to z ich wyjątkową zdolnością do różnicowania się na inne typy komórek występujące w ludzkim organizmie. Ma to szczególne znaczenie dla medycyny regeneracyjnej i rekonstrukcji patologicznych tkanek, powstałych na skutek chorób lub wad wrodzonych. Ogromną szansą dla chorych jest stworzenie biomateriałów w pełni biokompatybilnych, które będą mogły tworzyć środowisko sprzyjające rozwojowi komórek macierzystych. Z tego względu jednocześnie z badaniami nad implantami prowadzi się badania nad rozwojem komórek macierzystych.

W tym celu poszukuje się nie tylko idealnego materiału do produkcji trójwymiarowych rusztowań (*scaffolds*) do hodowli komórkowej, ale również ocenia się wpływ różnych czynników środowiskowych na funkcje życiowe różnych rodzajów komórek oraz możliwości sterowania ich wzrostem, podziałem i różnicowaniem się. Stwarza to również możliwość rozwoju badań nad transportem leków do organizmu pacjenta, gdzie badania prowadzone na zwierzętach nie dają wyników odzwierciedlających zachowanie organizmu człowieka [13].

2. BIOLOGIA ODDZIAŁYWAŃ KOMÓRKA-PODŁOŻE

Badania nad wytworzeniem biomateriałów, mogących służyć do kontrolowanej hodowli komórek macierzystych skupiają się nad wytworzeniem podłoża naśladujących struktury macierzy pozakomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM), znajdującej się w organizmach żywych. Macierz pozakomórkowa jest to substancja wytwarzana przez komórki, wypełniająca przestrzeń między nimi. Zespala ją komórki sieć ECM jest swoistym rusztowaniem dla komórek i częścią składową tkanek. Jest zbudowana z makrocząsteczek kolagenu, proteoglikanów oraz białek wiążących integryny. Składa się z formy upostaciowionej (włókien) i bezpostaciowej.

Większość komórek występujących w organizmach ssaków wymaga przyłączenia się do podłoża dla prawidłowego funkcjonowania. Jedynie komórki zaadsorbo-

wane na powierzchni są zdolne do wzrostu, podziału i różnicowania się. W naturalnych warunkach jest to możliwe właśnie dzięki obecności macierzy pozakomórkowej [22]. ECM na całej swojej powierzchni zawiera różne domeny funkcyjne, tj. regiony odpowiedzialne za wysyłanie innych sygnałów warunkujących m.in. wzrost i adhezję komórek. Najlepiej poznanym regionem odpowiedzialnym za adhezję komórek do podłoża jest tripeptyd RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy) [13, 23]. Taka sekwencja aminokwasów została określona, jako minimalna niezbędna do pośredniczenia w adhezji komórek do cząsteczek ECM.

Komórki posiadają na swej powierzchni transbłonowe białka adhezyjne, które uczestniczą w procesach łączenia między komórkami oraz ich oddziaływań z ECM [24]. Dzięki tym specyficznym oddziaływaniom, działają one, jako receptory i umożliwiają uzyskiwanie informacji z otoczenia. Do białek adhezyjnych zalicza się integryny, kadheryny, selektyny oraz białka immunoglobulinopodobne (z rodziny IgSF). Integryny łączą komórki z glikoproteinami podłoża (fibronektyną i lamininą) [13, 24–30]. Adhezja komórek przez integryny jest niezmiernie istotna dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Są one receptorami, które mogą wiązać nie tylko pojedyncze komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (oddziaływania *cell-matrix*), ale jednocześnie mogą wiązać kilka różnych komórek (oddziaływania *cell-cell*) [26]. Ponadto, integryny wraz z selektynami oddziałują z leukocytami biorąc udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu na infekcję [29]. Kadheryny są glikoproteinami uczestniczącymi w oddziaływaniach między komórkami [26]. Są zdolne do rozpoznawania i tworzenia połączeń z kadherynami tego samego rodzaju. Główną ich rolą jest ułatwianie przylegania do siebie komórek tego samego typu (oddziaływania kadheryna-katenina-filamenty aktynowe). Te procesy życiowe mają niezwykle ważny wpływ na wynik oddziaływań między tworzywami sztucznymi a organizmami żywymi – zarówno w hodowlach komórek macierzystych jak i w implantologii.

Początkowa odpowiedź układu immunologicznego polega na wytworzeniu na powierzchni zetknięcia implantu z tkanką słabo unaczynionej, włóknistej warstwy komórek wskutek adhezji m.in. płytek krwi na powierzchni materiału [3, 13]. Wiadomo, że po umieszczeniu implantu w ciele, w ciągu kilku nanosekund pokrywa się on cienką warstwą wody. Oddziaływania woda–powierzchnia materiału zależą od jego charakteru i właściwości. Następnie obserwowane jest powstanie warstwy specyficznych białek, co trwa od kilku sekund do kilku godzin [31]. W płynach fizjologicznych znajduje się wiele różnych, rozpuszczalnych rodzajów białek, które mogą oddziaływać z powierzchnią podłoża [32]. Od zaadsorbowanej warstwy białek występujących naturalnie w serum w dużej mierze zależy zdolność komórek organizmu do adhezji, a także sposób ich późniejszego zachowania. Jednak należy podkreślić, że spośród ponad 200 rodzajów białek najłatwiej zachodzi adhezja albuminy, która nie sprzyja adhezji komórkowej lub nawet ją uniemożliwia. Kolejnym etapem jest pojawienie się oddziaływań komórki - białka związane z powierzchnią materiału, który może trwać od kilku minut do nawet kilku dni [31]. Ostatnim eta-

pem następującym po przyłączeniu się komórki do podłoża jest reorganizacja jej cytoszkieletu, która prowadzi m.in. do wypłaszczenia komórki [33].

Przedmiotem badań jest określenie wpływu różnych czynników na poszczególne etapy rozwoju komórek macierzystych [23]. Stwierdzono, że umieszczenie domen adhezyjnych na powierzchniach syntetycznych biomateriałów umożliwia regulowanie funkcjonowania integryn, a tym samym wpływa na zachowanie się komórek [13]. Udało się również ustalić, iż włączając fibronektynę w matrycę wykonaną z alkoholu poliwinylowego, można regulować adhezję i wzrost komórek śródbłónka [29].

4. CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA ZACHOWANIE KOMÓREK

W przypadku stosowania podłoży syntetycznych ważne jest zoptymalizowanie warunków dla hodowli komórkowej bądź wzrostu komórek na powierzchni implantu. Najważniejszymi parametrami charakteryzującymi powierzchnię są jej:

- specyfika chemiczna (hydrofilowość/hydrofobowość, obecność grup funkcyjnych),
- topografia (rodzaj wzorów, sposób rozmieszczenia, wielkość).

Przez długi okres czasu pomimo wiedzy, iż komórki macierzyste potrafią różnicować się na dowolny inny typ komórek, nie potrafiono określić, jakie czynniki i w jaki sposób wpływają na ich zachowanie. Wiele publikowanych obecnie artykułów naukowych dotyczy właśnie tego zagadnienia, przy czym najczęściej badany jest wpływ topografii powierzchni materiału, jej hydrofilowości, rodzaju grup funkcyjnych oraz środowiska [34, 35].

Modyfikacja powierzchni materiału może być przeprowadzona przez jej funkcjonalizację z wykorzystaniem różnych grup organicznych naturalnie występujących w organizmie tj. CH_3 , OH , NH_2 , COOH [31, 32, 36–38]. Stosując różne podstawniki funkcyjne można jednocześnie uzyskać pożądany wzór na powierzchni materiału, a przez to kontrolę stopnia adhezji komórek do podłoża. Wiadomo, że zdolność komórek do adhezji maleje na powierzchniach hydrofobowych, a rośnie na powierzchniach hydrofilowych [31, 39]. Na wzrost komórek wpływa również swobodna entalpia powierzchni i zwilżalność, jednak nie mają one wpływu na kształt komórek ani na ich orientację [40–42]. Zgodnie z wynikami badań przeprowadzonymi na powierzchni wykonanej z nanokrystalicznego diamentu, osteoblasty przyłączają się chętniej do powierzchni o wyższej entalpii swobodnej [40]. Dla takiego podłoża zaobserwowano także wzrost szybkości różnicowania się i namnażania tych komórek [40]. Podobny wynik uzyskano dla podłoża tytanowego [41]. Badania nad wpływem entalpii swobodnej powierzchni na adhezję białek oraz komórek kostnych przeprowadzono także dla podłoży wykonanych z polimerów [42]. Wykorzystano do tego celu polidimetylosiloksan PDMS, PMMA oraz PS [42]. Wyniki eksperymentu były zbieżne z opisanymi wcześniej [42].

Zwilżalność powierzchni jest bardzo ważna, ponieważ wpływa na zdolność białek adhezyjnych do przyłączania się do podłoża [31]. W czasie tego procesu następują po sobie etapy przyłączania mniejszych białek, które szybciej docierają do powierzchni, odrywania ich i zastępowania większymi [31]. Na ostateczną budowę i skład warstwy białek wpływa powinowactwo między tymi białkami a powierzchnią materiału [31]. Najważniejsze dla zdolności komórek do przyłączania się do podłoża, fibronektyna i witronektyna, przyłączają się znacznie łatwiej do powierzchni hydrofilowych [31].

Oprócz specyfiki chemicznej materiału, który w przyszłości mógłby zostać wykorzystany w produkcji biomateriałów na implanty ważne są też właściwości jego powierzchni. Topografia powierzchni w mikroskali odgrywa znaczącą rolę w procesie adhezji białek i tworzeniu wiązań, co jest ściśle związane z biokompatybilnością materiału [31, 39]. Od topografii powierzchni zależy zdolność komórek do adhezji, ich morfologia, orientacja w przestrzeni, podział i sposób różnicowania. Na zachowanie komórek wpływa nie tylko rodzaj wzorów na powierzchni, ale także jego wielkość, kształt oraz szorstkość [43–46].

4.1. WPŁYW TOPOGRAFII POWIERZCHNI

Istnieje wiele technik uzyskiwania powierzchni pokrytej wzorami w mikro- i nanoskali [47–51]. Tworzenie wzoru komórek na podłożu może być uzyskane na dwa sposoby: poprzez pokrycie wybranych fragmentów materiału czynnikiem ułatwiającym adhezję komórek lub zastosowanie warstwy materiału, która nie będzie sprzyjała przyłączaniu się do niej komórek, a następnie jej usunięciu [47]. Jedną z najbardziej popularnych metod tworzenia wzoru powierzchni jest litografia. W ogólnym podejściu polega ona na pokryciu podłoża substancją ochronną, której nadaje się pożądaný wzór. Jednym z rodzajów litografii jest fotolitografia [47–49, 51]. Polega ona na poddawaniu działaniu promieniowania UV fotoczułego polimeru [47–49, 51]. Cechuje się ona możliwością uzyskania różnego rodzaju wzorów z dużą rozdzielczością [51]. Wadą tej techniki jest możliwość jej stosowania tylko dla podłoży w stanie stałym, wysoka cena oraz używanie toksycznych odczynników, które mogą doprowadzić do denaturacji białka [49]. Znana jest także litografia, w której stosuje się promieniowanie RTG lub wiązkę elektronów [47–49, 51]. Bardziej biologicznie-przyjazną techniką tworzenia wzorów jest tzw. miękka litografia [47, 49, 51]. Polega ona na wytworzeniu stempla z PDMS, przy pomocy, którego tworzony jest następnie wzór na powierzchni podłoża [49, 51]. W ten sposób można uzyskać wzory o wielkości od 30 nm do 100 μm [49]. Ponieważ raz przygotowane stemple mogą być używane wielokrotnie, koszty wytwarzania ulegają obniżeniu w porównaniu z wcześniej wspomnianymi technikami [49]. W drukowaniu mikro-kontaktowym stemple z PDMS pokrywa się warstwą tioli, następnie przykłada do powierzchni złota [49, 52]. Można również wykorzystać stemple pokryte warstwą alkilosiłoksanów do utworzenia warstwy samoorganizujących się cząstek SAM na

powierzchni szkła (lub krzemionki) z grupami hydroksylowymi [49]. W ten sposób utworzona warstwa SAM układa się w taki wzór jak ten na stemplu. Rozdzielczość nie jest tak dobra jak w przypadku wzorów otrzymanych z użyciem stempla, ale udaje się otrzymać wzory o wielkości rzędu 50 nm [52]. W przypadku tej metody należy zawsze brać pod uwagę możliwość, iż komórki reagują nie tylko na wzór powierzchni, ale także na grupy funkcyjne na powierzchni materiału [47]. W niektórych tego typu przypadkach wzór powierzchni może okazać się wręcz bez znaczenia [47]. W mikroformowaniu kapilarnym stempel przykładają się do powierzchni polimeru w stanie ciekłym [52]. Wzór powierzchni utrwała się podczas twardnienia polimeru [52].

Topografia powierzchni materiału poprzez regulację czynności odpowiednich białek transmembranowych wpływa na zdolność komórek do adhezji [43]. Po raz pierwszy jej wpływ na zachowanie się komórek zaobserwował Carter w 1967 roku prowadząc badania nad fibroblastami [47]. W naturalnym środowisku komórki są poddawane wpływowi topografii w mikroskali i nanoskali, co związane jest z obecnością białek ECM oraz otoczeniem innych komórek [53]. Wyniki badań przeprowadzonych nad wpływem wielkości i rodzaju wzorów na powierzchni biomateriałów na czynności życiowe komórek (Tab. 1.) wskazują na dostosowywanie się komórek do specyfiki powierzchni materiału [36, 44, 45, 54, 55]. Biomateriały z kontrolowaną topografią w mikroskali stosowane są do kontroli kształtu oraz rozmieszczenia komórek na ich powierzchni [53]. Topografia w nanoskali dotyczy wzorów, których wielkość odpowiada rozmiarom pojedynczych białek. Wzór powierzchni w zakresie 0–250 nm wpływa przede wszystkim na adsorpcję i konformację białek w macierzy pozakomórkowej ECM, a co za tym idzie na ich funkcje biologiczne [53]. Wpływa to na przyłączenie oraz stopień rozpląszczenia komórek na powierzchni podłoża [53].

Tabela 1. Wzory powierzchni stosowane do hodowli komórkowych
Table 1. Nanopatterned surfaces for cell cultures

Odnosiłnik literaturowy	Tworzywo sztuczne = podłoże	Rodzaj wzoru powierzchni	Rodzaj badanych komórek
[45]	poliakrylamid	wzór plastra miodu, siatka	komórki macierzyste
[46]	poli(ϵ -kapolakton)	wzór plastra miodu	hepatocyty, komórki nerwowe, komórki skóry, komórki nowotworowe,
[54]	kopolimer blokowy PS-2-winylopirydyna	paski	komórki macierzyste
[56]	szkło pokryte filmem złota	paski, poduszki, siatka	komórki macierzyste
[57]	PS	kwadraty	osteoblasty
[58]	PDMS, PLLA, kopolimer politereftalanu tlenku etylenu z politereftalanem butylenu PEOT/PBT	paski	komórki macierzyste
[59]	Złoto lub srebro pokryte warstwą alkanotiolanów	paski	mioblasty

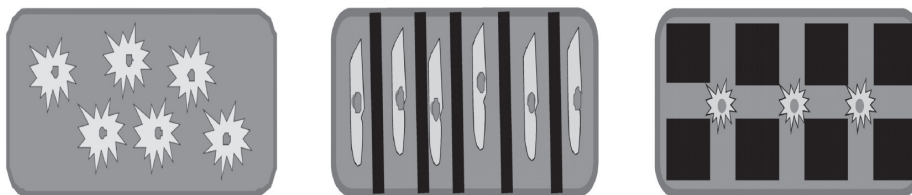
Odnosićnik literaturowy	Tworzywo sztuczne = podłoże	Rodzaj wzoru powierzchni	Rodzaj badanych komórek
[60]	PDMS, PET, PS, PMMA, polifluorek winylidenu PVDF, poli(N-izopropylakrylamid) PNIPAM	paski	komórki macierzyste
[61]	tytan, stop złoto-pallad	paski, dołki, poduszki, pory, cylindry, schody	fibroblasty, makrofagi, osteoblasty, neutrofile, komórki skóry, komórki nerwowe
[62]	PMMA, PDMS	paski	neutrofile
[63]	PS	paski	komórki mięśni gładkich
[64]	PMMA	paski	osteoblasty
[65]	PLLA	wyspy, paski, dołki	fibroblasty
[66]	PS	paski	osteoblasty
[67]	kopolimer laktydowo-glikolidowy PLGA	paski	fibroblasty
[68]	PDMS	paski	komórki macierzyste myszy
[69]	PU	paski	komórki macierzyste
[70]	PMMA, PDMS	paski	komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych
[71]	porowaty i nanokrystaliczny krzem	paski, poduszki	komórki macierzyste

Badania prowadzone *in vitro* nad wpływem nanotopografii powierzchni na komórki budzą duże zainteresowanie ze względu na podobieństwo do warunków *in vivo*, panujących w organizmie człowieka [70]. Określenie jak różne rodzaje komórek reagują na określony typ podłoża mogłoby pozwolić na przygotowanie konkretnego typu komórek lub też całych tkanek poza organizmem chorego. Dzięki temu można byłoby zrezygnować z konieczności podawania środków farmaceutycznych, których zadaniem jest stymulacja komórek do podziału i różnicowania się na określony typ [72].

W badaniach prowadzonych nad wpływem rozmiaru wzoru powierzchni na zachowanie się komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych na dwóch rodzajach podłoży użyto różniących się sztywnością polimerów: PDMS i polimetakrylanu metylu PMMA [70]. Zbliżone wyniki uzyskano dla obu typów podłoża. Odkryto, iż wzór odgrywał większą rolę niż właściwości zastosowanego polimeru. W przeciwieństwie do komórek na powierzchni gładkiej (Rys. 1a), na powierzchni pokrytej paskami zarówno całe badane komórki, jak i ich jądra komórkowe miały wydłużony kształt (Rys. 1b) [70]. Zaobserwowano także zorientowanie komórek równoległe do wzoru podłoża. Ponieważ komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych naturalnie mają wydłużony kształt stwierdzono, iż badania z ich udziałem powinny być prowadzone na wzorzystej powierzchni [70]. Negatywnym skutkiem wzrostu komórek

na wzorzystym podłożu był znaczny spadek szybkości podziału w porównaniu do komórek na gładkiej powierzchni, z $56.6 \pm 10.7\%$ na $47.7 \pm 12\%$. Zmianę kształtu oraz występowanie orientacji zaobserwowano także badając komórki macierzyste człowieka. Sprawdzono ich zachowanie się na podłożu z wzorem 1D (paski) oraz 2D (poduszki) [71]. Wypukłe części były wykonane z porowatego krzemu, natomiast pozostałe (wgnębienia) z mikrokrystalicznego krzemu. W przypadku wzoru 2D komórki lokowały się w przestrzeni pomiędzy poduszkami, na mikrokrystalicznym krzemie (Rys. 1c). Zbadano też zachowanie się komórek na podłożu pokrytym paskami o stałej szerokości $25 \mu\text{m}$ oraz o różnej szerokości zagłębień: 35 , 50 , $100 \mu\text{m}$ [71]. Na powierzchniach z dołkami $100 \mu\text{m}$ komórki przyłączały się wyłącznie do wypukłych pasków wykonanych z porowatego krzemu. Zmniejszenie rozmiaru wzoru do $50 \mu\text{m}$ skłaniało komórki do zajmowania również zagłębień powierzchni. Dla ostatniego typu wgnębień, spostrzeżono, iż szkielet aktynowy komórek znajdował się w zagłębieniu, podczas gdy jądro wraz z bliskim jego otoczeniem przyłączało się do wypukłych części powierzchni. Oprócz wpływu wzoru na ludzkie komórki macierzyste zbadano także jak wpływa on na zdolność tych komórek na różnicowanie się na osteoblasty [69]. Rozpatrywanym wzorem podłoża były paski o różnej szerokości na powierzchni PU [69]. Wraz ze wzrostem szerokości pasków obserwowano wzrost ilości przyłączonych do podłoża komórek. Stwierdzono, iż rozmiar wzoru ma wpływ na zdolność komórek do różnicowania się na komórki kostne, bez względu na to czy eksperyment prowadzony był w czy bez obecności czynnika stymulującego osteogenezę. Wzór o wielkości 400 nm (200 nm dołek i 200 nm górka) najefektywniej stymulował komórki do różnicowania się na osteoblasty. Podobne badania przeprowadzono na komórkach macierzystych myszy umieszczonych na wzorzystej powierzchni wykonanej z PDMS [68]. Udało się stwierdzić, iż wraz ze wzrostem odległości między kolejnymi elementami wzoru kształt komórek jest coraz bardziej kulisty. Jednocześnie okazało się, że najwięcej komórek różnicuje się na osteocyty przy najgęściej rozłożonych fragmentach wzoru.

W badaniach nad wpływem mikrotopografii na zachowanie się komórek nerwowych odkryto, że wraz ze zmniejszeniem powierzchni kontaktu między komórkami wzrasta liczba komórek różnicujących się na astrocyty, a maleje liczba tworzących się neuronów [56]. Stwierdzono także, że w sytuacji, kiedy powierzchnia materiału nie została wcześniej pokryta białkiem (lamininą) komórki nerwowe obumierały nie mogąc przyłączyć się do podłoża. Wykazano również, że w przypadku wzorów o rozmiarach powyżej $50 \mu\text{m}$ komórki nerwowe zachowywały się identycznie jak na powierzchni gładkiej.



Rysunek 1. Przykłady kształtów komórek na różnych powierzchniach a) gładka powierzchnia, b) paski, c) poduszki

Figure 1. Exemplary cell shapes on different micropatterned surfaces a) smooth surface, b) ridges, c) pillows

Wzór zawierający kwadraty sprzyja bardziej wydłużeniu kształtu komórek niż ten zawierający sześciokąty (tak jak w przypadku plastra miodu) [45]. Wynika to z faktu, że w przypadku sześciokątów komórki częściej muszą zmieniać kierunek swojego ruchu, co jest dla nich dodatkowym utrudnieniem. Ostatnio pojawia się jednak coraz więcej prac poświęconych wpływowi topografii o wzorze podobnym do plastra miodu na zachowanie się komórek. Przeprowadzono badania sprawdzające jak taki wzór powierzchni wpływa na funkcje życiowe komórek skóry, komórek nerwowych, hepatocytów, oraz zachowanie się komórek nowotworowych [46]. Wykazano przyspieszenie wzrostu oraz podziału zdrowych komórek oraz skuteczne spowolnienie wzrostu i podziału komórek patologicznych.

Oprócz wpływu samego wzoru istotna jest również jego wielkość. Komórki przyłączając się do powierzchni mają kontakt tylko z niewielkim fragmentem powierzchni, dlatego przy zastosowaniu wzorów o dużej wielkości komórki odbierają taką powierzchnię, jako całkowicie gładką. Podobna sytuacja ma miejsce, jeżeli wzór jest bardzo mały. Wówczas warstwa białek powoduje, że jest on praktycznie nierozpoznawalny dla komórek [43].

4.2. WPŁYW SZORSTKOŚCI POWIERZCHNI

Kolejnym czynnikiem, który może wpływać na zachowanie się komórek jest szorstkość powierzchni [1, 5, 31, 73, 74]. Większość badań prowadzona jest na podłożach wykonanych z tytanu, ale sprawdzany był także wpływ szorstkości na podłożach polimerowych, np. z PLLA, czy PS. Szorstkość powierzchni jest związana z topografią podłoża. Szorstkość jest to trójwymiarowy układ wzorów o różnych kształtach, wielkości i periodyczności występowania, podczas, gdy w przypadku topografii powierzchni wszystkie te elementy są dobrze określone i charakteryzują się regularnością występowania [51].

Powierzchnie materiałów wykorzystywanych w medycynie rzadko są gładkie na poziomie molekularnym. Znanych jest wiele sposobów ich modyfikacji, np. przez dodatek substancji aktywnych powierzchniowo, litografia, pokrycie materiału filmem samoorganizujących się cząsteczek (ang. *self assembling molecules*, SAM)

[31, 75, 76]. Adhezja komórek jest trudniejsza na bardziej gładkich powierzchniach ze względu na mniejszą rzeczywistą powierzchnię niż w przypadku podłoża szorstkiego [66]. Jednocześnie w wielu badaniach dowiedziono, że w początkowym etapie adhezja komórek zachodzi znacznie łatwiej na powierzchniach gładkich, po czym ta zależność ulega odwróceniu [1]. Wpływ szorstkości podłoża na czynności życiowe oraz morfologię komórek zależy przede wszystkim od rodzaju rozpatrywanych komórek. Szorstkość powierzchni znacząco wpływa na zdolność do osteointegracji implantu z tkankami kostnymi i chrzęstnymi [1]. W eksperymentach porównujących zachowanie się osteoblastów i fibroblastów na powierzchniach o różnej szorstkości wykazano, że preferują one podłoża o innych właściwościach [77]. Zgodnie z badaniami, osteoblasty wybierają powierzchnie o dużej szorstkości, ich podział następuje znacznie szybciej w takich warunkach niż na powierzchniach gładkich [77–79]. Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku fibroblastów. Te komórki najszybciej namnażają się na powierzchniach gładkich [80–84]. Elementem wspólnym dla komórek jest spadek spłaszczenia wraz ze wzrostem szorstkości powierzchni podłoża [77, 79, 80, 82]. Przyczyną takiego zjawiska mogą być ograniczenia przestrzenne na powierzchniach szorstkich, jak również fakt, iż na powierzchniach gładkich komórki potrzebują przyłączyć się do większej ilości punktów na podłożu, żeby móc się na nim utrzymać [77]. Inną cechą wspólną jest spadek ruchliwości komórek na powierzchniach szorstkich [78, 81].

Stwierdzono też, że adhezja komórek nerwowych do powierzchni jest możliwa dla chropowatości w zakresie $R_a = 20\text{--}50\ \mu\text{m}$ [73]. W przypadku $R_a < 10\ \mu\text{m}$ lub $R_a > 70\ \mu\text{m}$ zdolność do adhezji była zdecydowanie zmniejszona. Jednocześnie stwierdzono, iż neurony samodzielnie potrafią rozpoznać fragmenty powierzchni o optymalnej dla siebie szorstkości i przemieszczają się w ich kierunku [73].

W przypadku badań nad wpływem szorstkości na zachowania komórek istnieje wiele sprzecznych wyników badań eksperymentalnych, czego przyczyną jest zastosowanie różnych typów komórek, różnych metali, stopów metali, polimerów, co znacząco utrudnia porównanie rezultatów. Jedną z rzeczy, które jednak potwierdzają wszystkie doniesienia jest fakt wpływu szorstkości powierzchni na orientację komórek. W przypadku szorstkości $R_a = 0,43\ \mu\text{m}$ orientacja komórek jest dobrze widoczna, dla szorstkości $R_a = 0,30\ \mu\text{m}$ słabo zauważalna, a dla powierzchni o $R_a < 0,16\ \mu\text{m}$ zanika [1].

4.3. SZTYWNOŚĆ PODŁOŻA

Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż na funkcje życiowe oraz morfologię komórek wpływa także sztywność podłoża, z którym mają kontakt [84–99]. Różne typy komórek charakteryzują się różną elastycznością [84, 87–96, 98, 99]. Przykładowo najbardziej miękkimi, delikatnymi tkankami są te tworzone przez komórki nerwowe, dla których moduł sprężystości wynosi w granicach $0,1\text{--}10\ \text{kPa}$ [84, 90, 91, 94, 98]. W przypadku tkanek kostnych są to wartości $15\text{--}30\ \text{GPa}$ [90, 91, 94,

98]. Pośrednie właściwości sprężyste mają tkanki mięśni, dla których moduł Younga wynosi 10–100 kPa [90, 91, 94, 98]. Komórki odczuwają sztywność materiału podłoża poprzez oddziaływania z macierzą pozakomórkową ECM oraz z innymi komórkami [88, 98]. Dzięki oddziaływaniom międzykomórkowym wpływ otoczenia jest obserwowany nie tylko w najbliższym sąsiedztwie, ale ma charakter dalekozasięgowy [95]. Oprócz swoich naturalnych, charakterystycznych właściwości komórki mogą ulegać również usztywnieniu [88]. Ma to miejsce nie tylko na skutek chorób, ale także gojenia się ran [88]. Negatywnym skutkiem gojenia ran jest powstawanie blizn, które w niektórych miejscach organizmu nie mają większego znaczenia poza estetycznym, np. skóra [88]. Jednak w niektórych sytuacjach mogą być one bardzo groźne [88]. Szczególnie niebezpieczne są blizny powstające w centralnym układzie nerwowym, w mózgu i w rdzeniu kręgowym, ponieważ prowadzą do zaburzenia przewodzenia sygnałów nerwowych [88]. Nienaturalne usztywnienie komórek obserwuje się także w przypadku zmian nowotworowych, np. guzy piersi [91].

W celu badania wpływu elastyczności otoczenia na tkanki wykorzystuje się modele 2D i 3D [88–96, 100]. Do tworzenia modeli dwuwymiarowych wykorzystuje się najczęściej syntetyczne polimery np. poliakrylamid PA, PDMS, politlenek etylenu PEG, wielowarstwowe filmy polielektrolitów (ang. *polyelectrolyte multilayers*) PEM oraz naturalne substancje tj. kolagen, fibrynogen czy kwas hialuronowy [91]. W przypadku modeli trójwymiarowych, czyli syntetycznych macierzy pozakomórkowych ECM zastosowanie znalazły poliakrylamidy pokryte kolagenem oraz politlenek etylenu PEG [89, 92]. Główną wadą modeli 3D jest brak możliwości określenia jedynie wpływu sztywności takiego otoczenia z pominięciem wpływu właściwości biochemicznych oraz wpływu transportu substancji odżywczych [90, 96]. Dodatkowo wyniki eksperymentów prowadzonych z wykorzystaniem modeli 2D i 3D często nie są ze sobą zbieżne [90, 93, 96].

W wielu przypadkach stwierdzono różną zdolności komórek do różnicowania się wraz ze wzrostem sztywności materiału, jednak nie jest to regułą [87–96]. Przykładem odstępstwa od takiego założenia są neutrofile, które zachowują się tak samo bez względu na sztywność podłoża oraz miocyty, których zmiany cytoszkieletu są obserwowane jedynie powyżej określonej wartości sztywności [96, 99]. Komórki rosnące na sztywnym podłożu są sztywniejsze niż te znajdujące się na podłożu bardziej elastycznym [53, 90, 97]. Wraz ze wzrostem sztywności materiału podłoża rośnie organizacja cytoszkieletu komórkowego oraz oddziaływania komórki–podłoże [88, 90, 91, 95–98]. Budowa cytoszkieletu wpływa na kształt komórki oraz wpływa na jego zdolność do przekształcania sygnałów mechanicznych w chemiczne (transdukcja) [88, 90, 98]. Podczas badania wpływu sztywności podłoża na komórki macierzyste stwierdzono, że w zależności od elastyczności powierzchni materiału różnicowały się one na inne typy komórek [84, 98]. Do eksperymentu zastosowano żel z poliakrylonitrylu [84, 98]. Kiedy komórki znajdowały się na miękkim podłożu, o elastyczności odpowiedniej dla komórek nerwowych (0,1–10 kPa) różnicowały się

na neurocyty, dla żeli o elastyczności 11 kPa - w komórki mięśniowe, a dla 34 kPa w komórki kostne [84, 98].

Sztywne podłoże sprzyja też spłaszczeniu komórek, podczas gdy na miękkim przyjmują one kształt bardziej kulisty [88, 90, 91, 93–96, 101, 102]. Związane jest to właśnie z oddziaływaniem komórek z powierzchnią podłoża [87–96, 102]. Zaobserwowano, że fibroblasty rosnące na miękkim podłożu stykają się ze sobą i tworzą agregaty o strukturze przypominającej tkanki, natomiast wraz ze wzrostem sztywności materiału lokują się one z dala od siebie [90, 96, 102]. Takie zachowanie jest najprawdopodobniej spowodowane tym, że komórki „porównują” intensywność sygnałów, jakie odbierają z otoczenia [102]. Jeżeli rosną na sztywnej powierzchni wówczas oddziaływania komórka–podłoże są większe niż oddziaływania komórka–komórka, co powoduje, że unikają one kontaktu ze sobą [102]. Podobne wyniki uzyskano dla komórek naczyń krwionośnych oraz komórek śródbłonna [96, 102]. Sztywność otoczenia odgrywa również duże znaczenie w zdolności komórek do migracji [92, 93, 95, 96]. Ruchliwość komórek jest istotna dla procesów fizjologicznych [92, 93]. Jej zaburzenia prowadzą m.in. do chorób układu krwionośnego, immunologicznego, nowotworzenia komórek, jak również mogą być przyczyną chorób umysłowych [93]. Ciekawym zjawiskiem jest durotaksja (mechanotaksja), czyli przemieszczanie się komórek w kierunku fragmentów podłoża o większej sztywności [88, 90, 92, 93, 96, 100, 101]. Takie zjawisko obserwuje się dla fibroblastów oraz komórek mięśni gładkich [88, 90, 92, 93, 96, 100, 101]. Ogólnie przyjmuje się, iż wraz ze wzrostem sztywności podłoża zdolność komórek do migracji maleje [96]. Różnice we wpływie podłoża na różne typy komórek ma szczególne znaczenie w neurologii [99]. Komórki glejowe odpowiedzialne za tworzenie blizn w centralnym układzie nerwowym wymagają do przetrwania podłoża o dużej sztywności. Neurony preferują natomiast materiały elastyczne, miękkie. Doświadczalnie potwierdzono, iż zastosowanie miękkiego hydrożelu na miejsca uszkodzenia tkanki mózgu zapobiegło tworzeniu blizn [96, 101].

Dodatkowo przeprowadzając badania nad wpływem sztywności podłoża na zachowanie się komórek należy pamiętać, iż różne typy komórek są w różnym stopniu czułe na zmiany elastyczności materiału [99]. Przykładowo fibroblasty są komórkami bardzo czułymi, podczas gdy na neutrofile podłoże ma niewielki wpływ [99].

4.4. WPŁYW HYDROFILOWOŚCI POWIERZCHNI I OBECNOŚCI SPECYFICZNYCH GRUP FUNKCYJNYCH

Hydrofobowość i hydrofilowość powierzchni są cechami charakteryzującymi biomateriały i bezpośrednio wpływającymi na sposób oddziaływania komórek żywych z ich powierzchnią [4]. Hydrofilowość i hydrofobowość można regulować poprzez zastosowanie odpowiednich grup funkcyjnych na powierzchni materiału użytego do hodowli komórek. Do badań wykorzystuje się grupy funkcyjne, które

normalnie występują w organizmie człowieka. Generalnie komórki preferencyjnie przyłączają się, dzielą i rosną na hydrofilowych częściach powierzchni materiału [20, 31, 32, 36–38, 58, 103]. W badaniach komórek nerwowych myszy na powierzchniach o różnej topografii (pokrytych dwoma wzorami: poduszki i paski), stwierdzono, że komórki te przyłączają się wyłącznie do części hydrofilowych bez względu na wzór oraz to, która część wzoru była hydrofilowa (grupy hydroksylowe) a która hydrofobowa (grupy metylowe) [36]. Zaobserwowano też, że kiedy cała powierzchnia była hydrofilowa komórki przyłączały się równomiernie, a wzór nie miał istotnego znaczenia [36].

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na zasadnicze różnice w zachowaniu różnych typów komórek na różnych powierzchniach. Wynika to najprawdopodobniej z obecności różnych białek adhezyjnych na powierzchni komórek. Jednymi z najważniejszych komórek, których zachowanie bada się w oddziaływaniu z różnymi powierzchniami są leukocyty [104]. Są one szczególnie ważne ze względu na fakt, iż biorą one udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu na wszczepiony implant lub urządzenie medyczne mające bezpośredni kontakt z krwią pacjenta, np. przy hemodializach. W badaniach nad oddziaływaniem leukocytów z powierzchniami posiadającymi grupy CH_3 , COOH i OH stwierdzono, że adhezja komórek zachodzi najłatwiej na powierzchniach hydrofobowych z grupami metylowymi, a najtrudniej na powierzchniach zawierających grupy hydroksylowe [104]. Limfocyty B posiadają na powierzchni immunoglobulinę G, która najchętniej oddziałuje z powierzchniami zawierającymi grupy: $\text{CH}_3 > \text{C}_6\text{H}_5\text{OH} > \text{COOH} > \text{NH}_2$ [104, 105]. Sugeruje to stosowanie w celu uniknięcia odpowiedzi immunologicznej organizmu materiałów zawierających grupy silnie hydrofilowe, które zdecydowanie utrudniają przyłączenie się leukocytów do powierzchni [104].

W przypadku albuminy obserwowane są stosunkowo niewielkie zmiany oddziaływań ze zróżnicowanymi chemicznie powierzchniami (grupy funkcyjne COOH , CH_3 , OH , COOCH_3) [106]. Inaczej dzieje się w przypadku fibronektyny, która jest dominującym czynnikiem odpowiadającym za adhezję komórek do podłoża. Najwięcej zaadsorbowanego białka stwierdzono na powierzchniach hydrofilowych zawierających grupy karboksylowe ($\text{COOH} > \text{CH}_3 > \text{OH} > \text{COOCH}_3$) [106]. W innych badaniach stwierdzono, że adhezja fibronektyny do powierzchni zachodzi najłatwiej dla materiału zawierającego następujące grupy funkcyjne: $\text{COOH} = \text{OH} > \text{CH}_3 = \text{NH}_2$ [27]. Fibronektyna jest głównym białkiem odpowiedzialnym za wiązanie osteoblastów do powierzchni materiału, podczas gdy w przypadku chondrocytów dominującą rolę dla adhezji ma witronektyna [37].

Adhezja fibroblastów zachodzi najłatwiej dla powierzchni zawierających grupy $\text{NH}_2 > \text{COOH} > \text{CH}_3 > \text{OH}$ [32, 107]. Z kolei mioblasty najchętniej przyłączają się do powierzchni zawierającej grupy: $\text{COOH} > \text{NH}_2 > \text{OH} > \text{CH}_3$, a różnicują się preferencyjnie na podłożach zawierających: $\text{OH} > \text{CH}_3 > \text{NH}_2 > \text{COOH}$ [38]. Adhezja komórek nabłonka rogówki jest znacznie łatwiejsza w obecności grup COOH i NH_2 niż dla bardziej hydrofobowych grup CH_3 i CF_3 [108].

Komórki kościotwórcze – osteoblasty – najsilniej wiążą się z powierzchnią zawierającą grupy: $\text{OH} > \text{COOH} > \text{NH}_2 > \text{CH}_3$ [103]. Komórki macierzyste najczęściej różnicują się na osteoblasty na powierzchniach zawierających grupy aminowe NH_2 [37]. Spowodowane to być może tym, że przeważający wpływ na adhezję osteoblastów do podłoża ma obecność witronektyny. Ponieważ w przypadku obecności na powierzchni materiału grup aminowych zdolność fibronektyny do przyłączenia się maleje, tym samym wzrasta prawdopodobieństwo adhezji witronektyny. W takich warunkach preferowane jest różnicowanie się komórek macierzystych na osteoblasty. W przypadku obecności grup NH_2 komórki były spłaszczone, podczas, gdy na podłożu z grupami COOH były kuliste [37]. Dodatkowo okazało się, iż w przypadku podłoża zawierającego grupy COOH zaobserwowano dominujące różnicowanie się komórek macierzystych w chondrocyty [37]. Przyczyną takiego zjawiska może być silny wpływ fibronektyny, która łatwo przyłącza się do tego typu powierzchni, na adhezję właśnie komórek chrzęstnych. W takich warunkach wykryto zwiększone wydzielanie markerów chondrogenyzy [37]. Pozostałe badane grupy tj. OH , SH , CH_3 nie wpływały na morfologię i zachowanie komórek – w badanych warunkach nie obserwowano różnicowania się komórek macierzystych [37].

Specyficzne chemicznie powierzchnie mają wpływ na zachowanie się komórek macierzystych w obecności oraz bez czynników stymulujących chondro- i osteogenezę [109]. Zgodnie z wynikami, można wyróżnić trzy kategorie oddziaływań. Na powierzchniach z grupami NH_2 i SH łatwiej zachodziła osteogeneza zarówno w obecności jak i bez czynnika biologicznie stymulującego różnicowanie się komórek. Chondrogenyza była z kolei wspierana przez obecność na powierzchni grup OH oraz COOH . W przypadku grup CH_3 oraz powierzchni niezmodyfikowanego szkła borokrzemowego komórki miały zdolność do różnicowania się zarówno na osteoblasty jak i na chondrocyty w zależności od obecności odpowiedniego czynnika stymulującego [109].

Oprócz badań nad wpływem określonego rodzaju grup funkcyjnych na zachowanie komórek nerwowych, przeprowadzone zostały też badania nad wpływem gęstości grup COOH na powierzchniach wykonanych z politereftalanu etylu szczepionego kwasem poliakrylowym (PAA-PET) [11]. W odpowiedzi, komórki preferowały miejsca o mniejszej gęstości grup COOH . Dzięki takiemu zachowaniu komórek zaobserwowano gradient ilości zaadsorbowanych neuronów wzdłuż gradientu gęstości grup karboksylowych na powierzchni materiału. Komórki rosnące przeciwko gradientowi stężenia grup funkcyjnych były dłuższe niż te rosnące zgodnie z gradientem (w kierunku obszarów o większej gęstości grup COOH) [11]. Podobne badania nad wpływem gęstości rozmieszczenia grup karboksylowych na powierzchni podłoża z poli(kwasu winylooctowego) na komórki śródbłonka wykazały, że wzrost stężenia badanych grup funkcyjnych poprawiał zdolność komórek śródbłonka do adhezji i różnicowania się [110].

Pomimo dużego wpływu hydrofilowości powierzchni na funkcje życiowe komórek nie jest to jedyny czynnik warunkujący ich zachowanie [16]. Stwierdzono,

że w niektórych przypadkach dla komórek nie jest korzystny zarówno zbyt silny charakter hydrofobowy powierzchni, jak i zbyt silne właściwości hydrofilowe [16]. Zaobserwowano, iż komórki nie przylegały do podłoża, dla których kąt zwilżania wynosił powyżej 80° lub poniżej 15° [16]. Wynik badań nie był jednoznaczny dla wszystkich przebadanych rodzajów podłoża [16]. Komórki chętnie przyłączały się do hydrofilowej powierzchni podłoża wykonanego z kwasu poliakrylowego PAA/bentonit oraz powierzchni modyfikowanych kolagenem pomimo kąta zwilżalności mniejszego niż 15° [16].

Inne badania wykazały, iż hydrofobowość powierzchni może w początkowym etapie sprzyjać adhezji komórek, ale ich podział i namnażanie zachodzi łatwiej na powierzchniach bardziej hydrofilowych i niewzorzystych [58]. Takie zachowanie można uzasadnić termodynamicznie [42]. Adhezja białek do podłoża wpływa na zdolność komórek do przyłączania się do materiału [13, 24–32, 42, 49]. W warunkach środowiska wodnego grupy polarne białek skierowane są na zewnątrz, podczas, gdy grupy apolarne skierowane są do wewnątrz cząsteczki [42]. W pobliżu powierzchni o właściwościach hydrofobowych cząsteczki białek zmieniają swoją konformację, kierując na zewnątrz (w kierunku powierzchni podłoża) swoje grupy apolarne [42]. W czasie adsorpcji białka do podłoża zarówno powierzchnia materiału jak i cząsteczka białka ulegają przynajmniej częściowej dehydratacji, która zachodzi najłatwiej, dla układów hydrofobowych [42].

Na powierzchniach hydrofobowych wzór powierzchni nie wpływał w początkowym etapie na zdolność komórek do przyłączenia się do podłoża [58]. Zbadano wpływ odstępów między wzorem poduszek na materiałach wykonanych z różnych polimerów tj. PDMS, poli-L-laktydu PLLA oraz kopolimeru politlenek etylenu/politereftalan butylenu TEOT/PBT na zachowanie się mioblastów [58]. Obecność poduszek o różnej wysokości, rozmieszczonych w różnej odległości od siebie wpływała na zwilżalność powierzchni badanego materiału. Okazało się, że na morfologię komórek wpływ miała topografia podłoża oraz właściwości samego materiału. W przypadku niewzorzystego podłoża wykonanego z PDMS komórki miały kształt kulisty i były słabo rozplaszczone, ale dobrze przylegały do podłoża z PLLA. W zależności od odstępów między wzorami komórki przyłączały się do powierzchni poduszek bądź lokowały się w przestrzeni między nimi. W przypadku odstępów $2\ \mu\text{m}$, czyli mniejszych niż szerokość pojedynczej komórki, mioblasty lokowały się na powierzchni poduszek. Podczas gdy komórki były spłaszczone i układały się na powierzchni kilku poduszek ich filopodia pozostawały pomiędzy wzorem, na podstawie materiału, rozciągając się w poszukiwaniu innych komórek. Dla większych odstępów, $14\ \mu\text{m}$, całe komórki znajdowały się na dolnej części materiału. W sytuacji, kiedy podłoże wykonane było z PDMS komórki dążyły do zmniejszenia powierzchni kontaktu z podłożem i zawsze przyłączały się do powierzchni poduszek, bez względu na odległość między nimi.

Obecnie pracuje się nad różnymi metodami pozwalającymi zmniejszyć hydrofobowość materiałów wykonanych z polimerów [112]. Jednymi z takich technik

jest poddanie materiału działaniu plazmy tlenowej (ang. *oxygen-plasma*) lub ozonu generowanego pod wpływem promieniowania UV (ang. *UV-ozone*) [112]. Ze względu na obecność cząstek o wysokiej energii kinetycznej ta pierwsza metoda utleniania jest bardziej drastyczna. Materiały zmienione w taki sposób nadal pozostają w pełni biokompatybilne. Używane do badań nad komórkami PC, PMMA, PDMS, PS oraz cykliczne kopolimery olefinowe COC są hydrofobowe [112]. Najczęściej stosowany PDMS jest popularny ze względu na niski koszt, łatwość otrzymania, dobrą przepuszczalność gazów oraz biokompatybilność. Jego wadą jest duże prawdopodobieństwo uwalniania do układu krótkich, nieusieciowanych oligomerów [112]. Właściwości powierzchni można zmienić utleniając ich powierzchnię, ale jest to zmiana czasowa. Materiały zawsze powracają do swojej pierwotnej hydrofobowości (ang. *hydrophobic recovery*), jedynie czas, na jaki udaje się zmienić właściwości powierzchniowe jest różny dla różnych materiałów. Uzyskana hydrofilowość najszybciej zanika dla PS, a najwolniej dla polimetakrylanu metylu [112]. W badaniach porównujących zdolność komórek wątrobiaka do adhezji i podziału na utlenionych obiema metodami powierzchniach wymienionych materiałów polimerowych stwierdzono, że najmniej komórek przyłączyło się do powierzchni wykonanej z PDMS, więcej do PMMA, a najwięcej do przygotowanej z PS, PC oraz cyklicznych kopolimerów olefinowych COC [112]. Dodatkowo stwierdzono, iż około 12% przyłączonych komórek obumarło na powierzchni PMMA. Zdolność do przepuszczalności gazu malała w szeregu PDMS>COC>PC>PS>PMMA. Udało się w ten sposób potwierdzić, iż takie polimery jak PS, PC i COC mogą stanowić alternatywę dla używanego najczęściej PDMS.

4.5. WPŁYW ŁADUNKU POWIERZCHNIOWEGO

W wielu pracach zajmowano się dodatkowo wpływem ładunku powierzchniowego na zachowanie komórek. Ogólnie, ładunek powierzchniowy powoduje niespecyficzne wiązanie białek z podłożem na podstawie oddziaływań elektrostatycznych [18]. Może być to niepożądanym zjawiskiem ze względu na gromadzenie się komórek w określonych rejonach podłoża, co z kolei może prowadzić do zbierania się komórek w grupy wewnątrz organizmu i wywołania odpowiedzi immunologicznej organizmu [18].

Grupami funkcyjnymi stosowanymi w tym celu do badań osteocytów i chondrocytów były dodatnio naładowane grupy NH_2 oraz ujemnie naładowane grupy COOH (przy $\text{pH} \approx 7,4$) rozmieszczone na płytkach szklanych modyfikowanych odpowiednimi silanami [37]. Wyniki badań wskazują, że osteocyty preferują powierzchnie naładowane dodatnio, a chondrocyty ujemnie. W badanych warunkach zaobserwowano nie tylko większą ilość przyłączonych komórek, ale także łatwiejsze warunki do podziału i różnicowania [37].

Szczególną uwagę należy poświęcić hydrożelom, które są syntetycznymi materiałami mogącymi naśladować funkcje, które w organizmie pełni ECM. Hydrożele

są idealnym materiałem w inżynierii tkankowej, są resorbowalne i znacznie obniżają ryzyko reakcji immunologicznej organizmu [113]. Dlatego są bardzo popularne i znalazły wiele zastosowań we współczesnej medycynie [113–115]. Badania porównawcze nad zachowaniem się chondrocytów na takich podłożach polimerowych prowadzono wykorzystując biodegradowalny, biokompatybilny i bioresorbowalny oligo[fumaran poli(glikolu etylenowego)] (OPF), jako matrycę obojętną elektrycznie [116]. Po zmodyfikowaniu OPF przy użyciu takich monomerów jak metakrylan sodu (SMA) czy chlorek 2-metakryloksyetylo-trimetyloamonowy (MAETAC) uzyskano hydrożele naładowane odpowiednio ujemnie i dodatnio. We wszystkich przypadkach, po podziale komórek, wykryto na powierzchni matrycy kolagen II, przy czym jego ilość na podłożu naładowanym ujemnie była większa. Podobna sytuacja miała miejsce przy badaniu obecności glikanu glukozaminy [116]. Odpowiedzialny za regulację ekspresji kolagenu typu I i II łańcuch odwrotnej transkryptazy powodował zwiększoną produkcję kolagenu II oraz zmniejszoną kolagenu I na hydrożelach z ładunkiem ujemnym na powierzchni. Obniżona ilość kolagenu II na hydrożelach naładowanych dodatnio została powiązana z anaplazją – odróżnicowywaniem się komórek charakterystycznym dla procesów nowotworzenia. Chondrocyty różnicowały się na coraz mniej wyspecjalizowane, aż do utworzenia fibroblastów.

Odwrotne wyniki uzyskano podczas badania wpływu ładunku powierzchniowego polimerowych hydrożeli HEMA (2-hydroksymetakrylan etylu) i PEG (poliglikol etylenowy) na osteocyty i fibroblasty pochodzące od myszy [113]. HEMA i PEG w normalnych warunkach są obojętne elektrycznie i nie oddziałują z komórkami. Jednak poprzez włączenie w ich strukturę naładowanych monomerów można zastosować je do badań nad wpływem ładunku powierzchniowego. Istnieje również możliwość włączenia w ich strukturę pożądaných ligandów adhezyjnych tj. tripeptydu RGD. Zgodnie z przeprowadzonymi badaniami oba hydrożele (HEMA i PEG) z ładunkiem dodatnim ułatwiały adhezję i rozplaszczanie się osteoblastów, w porównaniu z powierzchnią neutralną i ujemnie naładowaną. Jednocześnie stwierdzono, że badane hydrożele lepiej wspierają adhezję osteoblastów niż fibroblastów [113].

W czasie podobnych badań, w których zastosowano PU i PDMS stwierdzono, że dla tego pierwszego fibroblasty preferują dodatni ładunek powierzchni, podczas gdy przy zastosowaniu matrycy PDMS sytuacja ulegała odwróceniu [116]. W obu przypadkach zdolność komórek do adhezji była większa dla naładowanego podłoża niż dla obojętne elektrycznie.

PODSUMOWANIE

Pomimo prowadzonych badań nad zastosowaniem biomateriałów w inżynierii tkankowej nie udało się jak dotąd jednoznacznie wykryć wszystkich czynników wpływających na zachowanie się komórek oraz odpowiedzieć na pytanie, które z nich mają decydujący wpływ na procesy rozwoju komórek. Wszystkie dotychczasowe prace potwierdzają, że w czasie projektowania materiałów do hodowli komór-

kowej oraz materiałów na implanty należy brać pod uwagę wpływ topografii, hydrofilowości, szorstkości, grup końcowych, rodzaju materiału, ładunku powierzchni. Należy również mieć na uwadze inne czynniki oraz fakt, że reakcja komórek na poszczególne bodźce zależy przede wszystkim od typu badanych komórek.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H.-H. Huang, C.-T. Ho, T.H. Lee, T.-L. Lee, *Biomol. Eng.*, 2004, **21**, 93.
- [2] K. Anselme, H. Biggerelle, *Acta biomaterialia*, 2005, **1**, 3, 211.
- [3] *Chemia polimerów. Polimery naturalne i polimery o specjalnych właściwościach*, Z. Florjańczyk, S. Penczka [Eds], tom III, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999, str. 159–178.
- [4] H. Ghanbari, H. Ghanbari, A.G. Kidane, G. Buriesci, B. Ramesh, A. Darbyshire, A.M. Seifalian, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 11, 4249.
- [5] E. Ołędzka, M. Sobczak, W.L. Kołodziejski, *Polimery*, 2007, **11–12**, 793.
- [6] S. Słomkowski, *Polimery*, 2006, **2**, 87.
- [7] A.G. Kidane, G. Burriesci, P. Cornejo, A. Dooley, S. Sarkar, P. Bonhoeffer, M. Edirisinghe, A.M. Seifalian, *J. Biomed. Mat. Res. B: Appl. Biomater.*, 2008, **88B**, 1, 290.
- [8] A.G. Kidane, G. Burriesci, P. Cornejo, A. Dooley, S. Sarkar, P. Bonhoeffer, M. Edirisinghe, A.M. Seifalian, *Acta Biomaterialia*, 2009, **5**, 7, 2409.
- [9] M.S. Motwani, Y. Rafiei, A. Tzifa, A.M. Seifalian, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2011, **58**, 1, 2.
- [10] B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 2011, **49**, 12, 832.
- [11] B. Li, Y. Ma, S. Wang, P.M. Moran, *Biomaterials* 2005, **26**, 4956.
- [12] M. Vert, *Macromol. Biosci.*, 2011, **11**, 1653.
- [13] L.G. Griffith, *Acta Mater.*, 2000, **48**, 263.
- [14] B.P. Robinson, J.O. Hollinger, E.H. Szachowicz, J. Brekke, *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995, **112**, 707.
- [15] Y.H. An, S.K. Woolf, R.J. Friedman, *Biomaterials*, 2000, **21**, 2635.
- [16] W. Fabianowski, B. Polak, M. Lewandowska-Szumiel, *Polimery*, 2004, **49**, 7–8, 522.
- [17] J.C. Middleton, A.J. Tipton, *Biomaterials*, 2000, **21**, 2335.
- [18] Y. Xu, M. Takai, K. Ishihara, *Biomaterials*, 2009, **30**, 4930.
- [19] R.Y. Kannan, H.J. Salacinski, K.M. Sales, P.E. Butler, A.M. Seifalian, *Cell Biochem. Biophys.*, 2006, **45**, 129.
- [20] K. Sakakibara, J.P. Hill, K. Ariga, *Small*, 2011, **7**, 10, 1288.
- [21] O. Guillame-Gentil, O. Semenov, A.S. Roca, T. Groth, R. Zahn, J. Vörös, M. Zenobi-Wong, *Adv. Mater.*, 2010, **22**, 5443.
- [22] M. Mrksich, *Chem. Soc. Rev.*, 2000, **29**, 267.
- [23] S. Petersen, M. Gattermayer, M. Biesalski, *Adv. Polym. Sci.*, 2011, **240**, 35.
- [24] R.O. Hynes, *Trends Cell Biol.*, 1999, **9**, 12, M33.
- [25] A.J. Garcia, M.D. Vega, D. Boettiger, *Mol Biol Cell*, 1999, **10**, 3, 785.
- [26] G. Fuller, D. Shields, *Podstawy molekularne biologii komórki*, rozdział 8 (2005) Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- [27] M.H. Lee, P. Ducheyne, L. Lynch, D. Boettiger, R.J. Composto, *Biomaterials*, 2006, **27**, 1907.
- [28] B.J. Spargo, M.A. Testoff, T.B. Nielsen, D.A. Stenger, J.J. Hickman, A.S. Rudolph, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 11070.
- [29] D.S.W. Benoit, K.S. Anseth, *Biomaterials* 2005, **26**, 5209.

- [30] K.C. Dee, T.T. Andersen, R. Bizios, *Biomaterials*, 1999, **20**, 221.
- [31] P. Roach, D. Eglin, K. Ronde, C.C. Perry, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2007, **18**, 1263.
- [32] K.B. McClary, T. Ugarova, D.W. Grainger, *J. Biomed. Res.*, 2000, **50**, 428.
- [33] C.A. Scotchford, C.P. Gilmore, E. Cooper, G.J. Leggett, S. Downes, *J. Biomed. Mat. Res.*, 2002, **59**, 1, 84.
- [34] Y. Xu, Y. Shi, S. Ding, *Nature*, 2008, **453**, 338.
- [35] A.M. Ross, Z. Jiang, M. Bastmeyer, J. Lahann, *Small*, 2012, **8**, 336.
- [36] K. Faid, R. Voicu, R. Tremblay, M. Bani-Yaghoub, R. Tremblay, G. Mealing, C. Py, R. Barjovanu, *Biomed. Microdev.*, 2005, **7**, 3, 179.
- [37] J.M. Curran, R. Chen, J.A. Hurt, *Biomaterials*, 2005, **26**, 7057.
- [38] M.A. Lan, C.A. Gersbach, K.E. Michael, B.G. Keselowsky, A.J. Garcia, *Biomaterials*, 2005, **26**, 4523.
- [39] P. Roach, T. Parker, M.R. Alexander, N. Gadegaard, *Surf. Sci. Rep.*, 2010, **65**, 145.
- [40] L. Yang, Y. Li, B.W. Sheldon, T.J. Webster, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 205.
- [41] H.-C. Lai, L.-F. Zhuang, X. Liu, M. Wieland, Z.-Y. Zhang, Z.-Y. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2009, **93A**, **1**, 289.
- [42] J. Comelles, M. Estévez, E. Martínez, J. Samitier, *Nanomed. Nanotech. Biol. Med*, 2010, **6**, 1, 44.
- [43] Y. Yang, K.W. Leong, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2010, **2**, 478.
- [44] D. Zahor, A. Radko, R. Vago, L.A. Gheber, *Mat. Sci. Eng. C*, 2007, **27**, 117.
- [45] M.J. Poellmann, P.A. Harrell, W.P. King, A.J. Wagoner Johnson, *Acta Biomaterialia*, 2010, **6**, 3514.
- [46] M. Tanaka, *Biochimica et biophysica acta*, 2011, **1810**, 3, 251.
- [47] A. Folch, M. Toner, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2000, **02**, 227.
- [48] S. Tawfick, M. De Volder, D. Copic, S.J. Park, C.R. Oliver, E.S. Polsen, M.J. Roberts, A.J. Hart, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 1628.
- [49] F.L. Yap, Y. Zhang, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 775.
- [50] D. Falconnet, G. Csucs, H.M. Grandin, M. Textora, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3044.
- [51] P.J. Hesketh, *BioNanoFluidic MEMS*, Springer, 2008, Chapter 10.
- [52] R. Sulima, *Prace instytutu Elektrotechniki*, 2003, **zeszyt 213**, 17.
- [53] C. Atwood, *Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications*, InTech, 2011, Chapter 8.
- [54] T. Eklblad, B. Liedberg, *Curr. Opin. Coll. Int. Sci.*, 2010, **15**, 499.
- [55] G.R. Owen, J. Jackson, B. Chehroudi, H. Burt, D.M. Brunette, *Biomaterials*, 2005, **26**, 7447.
- [56] A. Solanki, S. Shah, K.A. Memoli, S.Y. Park, S. Hong, K.B. Lee, *Small*, 2010, **6**, 22, 2509.
- [57] E. Lamers, R. van Horssen, J. te Riet, R. Luttge, X.F. Walboomers, J.A. Jansen, *Eur. Cell Mater.*, 2010, **20**, 329.
- [58] B.J. Papenburg, E.D. Rodrigues, M. Wessling, D. Stamatialis, *Soft Matter*, 2010, **6**, 4377.
- [59] M. Mrksich, L.E. Dike, J. Tien, D.E. Ingber, G.M. Whitesides, *Exp. Cell Res.*, 1997, **235**, 305.
- [60] R.G. Flemming, C.J. Murphy, G.A. Abrams, S.L. Goodman, P.F. Nealey, *Biomaterials*, 1999, **20**, 573.
- [61] J. Tan, W.M. Saltzman, *Biomaterials*, 2002, **23**, 3215.
- [62] E.K.F. Yim, R.M. Reano, S.W. Pang, A.F. Yee, C.S. Cheng, K.W. Leong, *Biomaterials*, 2005, **26**, 5403.
- [63] K. Matzusaka, X.F. Walboomers, M. Yoshinari, T. Inoue, J.A. Jansen, *Biomaterials*, 2003, **24**, 2711.
- [64] M.J. Dalby, C.C. Berry, M.O. Riehle, D.S. Sutherland, H. Agheli, A.S. Curtis, *Exp. Cell Res.*, 2004, **295**, 387.
- [65] K. Matsuzaka, X.F. Walboomers, J.E. de Ruijter, J.A. Jansen, *Biomaterials*, 1999, **20**, 1293.
- [66] J.L. Ricci, J.C. Grew, H. Alexander, *J. Biomed. Mat. Res. A*, 2007, **85A**, 2, 313.

- [67] C.Y. Tay, M. Pal, H. Yu, S. Leong, N.S. Tan, K.W. Ng, S. Venkatraman, F. Boey, D.T. Leong, L.P. Tan, Small, 2011, 7, 10, 1416.
- [68] S.H. Seo, K. Furukawa, Y. Suzuki, N. Kasagi, T. Ichiki, T. Ushida, Macromol. Biosci. 2011, 11, 938.
- [69] S. Watari, K. Hayashi, J.A. Wood, P. Russell, P.F. Nealey, C.J. Murphy, D.C. Genetos, Biomaterials, 2012, 33, 128.
- [70] E.K.F. Yim, R.M. Reano, S.W. Pang, A.F. Yee, C.S. Chen, K.W. Leong, Biomaterials, 2005, 26, 5405.
- [71] V. Torres-Costa, G. Martínez-Munoz, V. Sánchez-Vaquero, A. Muñoz-Noval, L. González-Méndez, E. Punzón-Quijorna, D. Gallach-Pérez, M. Manso-Silván, A. Climent-Font, J.P. García-Ruiz, R.J. Martín-Palma, Int. J. Nanomed., 2012, 7, 623.
- [72] L.E. McNamara, R.J. McMurray, M.J.P. Biggs, F. Kantawong, R.O.C. Oreffo, M.J. Dalby, J. Tissue Eng., 2010, Article ID 120623, doi:10.4061/2010/120623.
- [73] Y.W. Fan, F.Z. Cui, S.P. Hou, Q.Y. Xu, L.N. Chen, I.S. Lee, J. Neurosci. Meth., 2002, 120, 17.
- [74] A. Diener, B. Nebe, P. Becker, U. Bech, F. Lüthen, H.G. Neumann, J. Rychly, Biomaterials, 2005, 26, 383.
- [75] W.A. Loesberg, *Mechanosensitivity of Fibroblasts Interaction between altered gravity conditions and surface topography*, PhD thesis (2008) Chapter 1, Radboud University Nijmegen, The Netherlands.
- [76] M.J.P. Biggs, R.G. Richards, M.J. Dalby, Nanomed. Nanotech. Biol. Med., 2010, 6, 619.
- [77] T.P. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, N.D. Spencer, Biomaterials, 2007, 28, 2175.
- [78] N.R. Washburn, K.M. Yamada, C.G. Simon Jr., S.B. Kennedy, E.J. Amis, Biomaterials, 2004, 25, 1215.
- [79] K. Kieswetter, Z. Schwartz, T.W. Hummert, D.L. Cochran, J. Simpson, S.D.D. Dean, B.D. Boyan, J. Biomed. Mater. Res., 1996, 32, 55.
- [80] C. Xu, F. Yang, S. Wang, S. Ramakrishna, J. Biomed. Mater. Res., Part A, 2004, 71A, 154.
- [81] J.M. Łopacińska, C. Gradinaru, R. Wierzbicki, C. Købler, M.S. Schmidt, M.T. Madsen, M. Skolimowski, M. Dufva, H. Flyvbjerg, K. Mølhave, Nanoscale, 2012, 4, 3739.
- [82] E.R. Takamori, R. Cruz, F. Gonçalves, R.V. Zanetti, A. Zanetti, J.M. Granjeiro, Artif. Organs, 2008, 32, 4, 305.
- [83] T.-W. Chung, S.-S. Wang, Y.-Z. Wang, C.-H. Hsieh, E. Fu, J. Mater. Sci. Mater. Med., 2009, 20, 397.
- [84] R.A. Marklein, J.A. Burdick, Adv. Mater., 2010, 22, 175.
- [85] T. Danino, D. Volfson, S.N. Bhatia, L. Tsimring, J. Hasty, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103, 10889.
- [86] Y.A. Miroshnikova, D.M. Jorgens, L. Spirio, M. Auer, A.L. Sarang-Sieminski, V.M. Weaver, Phys Biol., 2011, 8, 2, 026013.
- [87] M.P. Lutolf, P.M. Gilbert, H.M. Blau, Nature, 2009, 462, 433.
- [88] S.K. Bhatia, *Engineering biomaterials for regenerative medicine: novel technologies for clinical applications*, Springer Science+Business Media, 2012, Chapter 2.
- [89] M. Ehrbar, A. Sala, P. Lienemann, A. Ranga, K. Mosiewicz, A. Bittermann, C.S. Rizzi, F.E. Weber, M.P. Lutolf, Biophys. J., 2011, 100, 2, 284.
- [90] R.G.M. Breuls, T.U. Jiya, T.H. Smit, The Open Orthopaedics Journal, 2008, 2, 103.
- [91] F. Rehfeldt, A.J. Engler, A. Eckhardt, F. Ahmed, D.E. Discher, Adv. Drug Deliv. Rev., 2007, 59, 1329.
- [92] C.M. Lo, H.B. Wang, M. Dembo, Y.-L. Wang, Biophys. J., 2000, 79, 144.
- [93] H.D. Kim, S.R. Peyton, Integr. Biol., 2012, 4, 37.
- [94] S.W. Moore, M.P. Sheetz, Dev. Neurobiol., 2011, 71, 11, 1090.

- [95] P. Kollmannsberger, C.M. Bidan, J.W.C. Dunlop, P. Fratzl, *Soft Matter*, 2011, **7**, 9549.
- [96] S. Nemir, J.L. West, *Ann. Biomed. Eng.*, 2010, **38**, 1, 2.
- [97] A.J. Engler, M.A. Griffin, S. Sen, C.G. Bönnemann, H.L. Sweeney, D.E. Discher, *The Journal of Cell Biology*, 2004, **166**, 6, 877.
- [98] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, *Cell*, 2006, **126**, 4, 677.
- [99] R.G. Wells, *Hepatology*, 2008, **47**, 4, 1394.
- [100] R.D. Sochol, A.T. Higa, R.R.R. Janairo, S. Lib, L. Lin, *Soft Matter*, 2011, **7**, 4606.
- [101] P.C. Georges, P.A. Janmey, *J. Appl. Physiol.*, 2005, **98**, 1547.
- [102] W.-h. Guo, M.T. Frey, N.A. Burnham, Y-l. Wang, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 6, 2113.
- [103] B.G. Keselowsky, D.M. Collard, A.J. Garcia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **25**, 5947.
- [104] J.N. Barbosa, M.A. Barbosa, A.P. Aguas, *J. Biomed. Mat. Res. A*, 2003, **65**, 4, 429.
- [105] V. Silin, H. Weetall, D.J. Vanderah, *J. Coll. Int. Sci.*, 1997, **185**, 1, 94.
- [106] B. Tarasevich, C. Tidwell, S.I. Ertel, S. Atre, *Langmuir*, 1997, **13**, 3404.
- [107] N. Faucheux, R. Schweiss, C. Werner, T. Groth, *Biomaterials*, 2004, **25**, 2721.
- [108] M. Franco, P.F. Nealey, *J. Biomed. Mat. Res. A*, 2000, **52**, 2, 261.
- [109] J.M. Curran, R. Chen, J.A. Hunt, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4783.
- [110] D. Bhattacharyya, H. Xu, R.R. Deshmukh, R.B. Timmons, *J. Biomed. Mat. Res. A*, 2010, **94A**, 2, 640.
- [111] P.M. van Midwoud, A. Janse, M.T. Merema, G.M.M. Groothuis, E. Verpoorte, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 3938.
- [112] G.B. Schneider, A. English, M. Abraham, R. Zaharias, *Biomaterials*, 2004, **25**, 3023.
- [113] M.S. Shoichet, *Macromolecules*, 2010, **43**, 581.
- [114] B.V. Slaughter, S.S. Khurshid, O.Z. Fisher, A. Khademhosseini, N.A. Peppas, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 3307.
- [115] M. Dadsetan, M. Pumberger, M.E. Casper, K. Shogren, M. Giuliani, T. Ruesink, T.E. Hefferan, B.L. Currier, M.J. Yaszemski, *Acta Biomaterialia*, 2011, **7**, 5, 2080.
- [116] M.T. Khorasani, S. Moemenbellah, H. Mirzadeh, B. Sadatnia, *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, 2006, **51**, 112.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 lipca 2012

