

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

Materiály pro kultivaci buněk

Kateřina Černá

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Černá**
Osobní číslo: **C16226**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Materiály pro kultivace buněk**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na přehled materiálů a nanomateriálů používaných při kultivacích buněk. V bakalářské práci se nejprve zaměřte na uvedení přehledu typů nanomateriálů dosud používaných pro buněčné kultivace. V této části práci uveďte charakteristiky daných materiálů, např. včetně druhu, typu povrchu. V další části se zaměřte na uvedení přehledu buněk (vyjma těch kostního původu), jež byly při takovýchto kultivacích dosud využity, kdy se zaměřte na jejich typ, původ, a další specifické charakteristiky, včetně uvedení typických testů, jež se pro hodnocení kultivace buněk na nanomateriálech *in vitro* využívají.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, *apod.*

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jana Báčová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Kateřina Černá

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za poskytnutí užitečných rad, připomínek a možností k vypracování závěrečné práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a příteli za podporu, kterou mi věnovali během studia.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na nanomateriály, které jsou aktuálně horkými kandidáty při hledání nových materiálů pro kultivace buněk, nebo se pro tento účel již používají. Nejprve jsou popsány obecné principy tkáňového inženýrství a jeho možné užití v blízké době. V další části se práce zabývá scaffoldem, jeho vlastnostmi a způsoby, jakými lze scaffold vyrobit. Poté jsou popsány vybrané nanomateriály, které jsou doposud největšími kandidáty v tomto oboru. U každého nanomateriálu jsou uvedeny jeho vlastnosti, výhody a nevýhody a možnosti jeho výroby. Nakonec se práce zmiňuje o kmenových buňkách, které se zdají být pro obor tkáňového inženýrství nejvhodnější a o kokultivacích buněk, jakožto způsobu vytváření *in vivo* tkání.

KLÍČOVÁ SLOVA

Tkáňové inženýrství, scaffold, nanomateriály, grafen, uhlíkové nanotrubicce, nanodiamant, nano-hydroxyapatit, oxid křemičitý, zlaté nanočástice, kmenové buňky

TITLE

Nanomaterials for cell cultivation

ANNOTATION

The bachelor thesis is focused on nanomaterials that are currently hot candidates in search new materials for cell cultivation or have been used for this purpose. First, the general principles of tissue engineering and their possible use in near future are described. In the next part, the thesis deals with scaffolds, their properties and the ways in which the scaffold can be made. Then, selected nanomaterials are described. The properties, advantages, disadvantages and possibilities of production are noted for each nanomaterial. Finally, the paper mentions stem cells that seem to be the most suitable model for the field of tissue engineering and co-cultivations.

KEYWORDS

Tissue engineering, scaffold, nanomaterials, graphene, carbon nanotubes, nanodiamond, nano-hydroxyapatite, silica, gold nanoparticles, stem cells

OBSAH

Seznam obrázků	8
Seznam tabulek	9
Seznam zkratk	10
Úvod	11
1. Teoretická Část	12
1.1 Tkáňové inženýrství	12
1.2 Scaffold	14
1.3 Nanomateriály	17
1.3.1 Grafen	19
1.3.2 Uhlíkové nanotrubičky	23
1.3.3 Nanodiamanty	25
1.3.4 Nano-Hydroxyapatit	28
1.3.5 Oxid křemičitý.....	31
1.3.6 Zlaté nanočástice	33
1.4 Kmenové buňky.....	35
1.5 Hodnocení kultivace buněk na nanomateriálech	38
2. Závěr	40
3. Použitá Literatura	41

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma postupu v tkáňovém inženýrství	12
Obrázek 2: Bioarteficiální umělá krysí končetina	13
Obrázek 3: Cévní štěp	14
Obrázek 4: Příklad decelularizace	16
Obrázek 5: Decelularizace	16
Obrázek 6: Porovnání velikosti nanočástic s velikostí jiných objektů	17
Obrázek 7: Schéma využití nanomateriálů v regenerativní medicíně	18
Obrázek 8: Grafen a jeho modifikace.....	19
Obrázek 9: Přehled dalších modifikací grafenu	20
Obrázek 10: Příklad funkcionalizace uhlíkové nanotrubic.....	24
Obrázek 11: Struktury nanodiamatu	25
Obrázek 12: Alotropické formy uhlíku	26
Obrázek 13: Prostorové uspořádání hydroxyapatitu	29
Obrázek 14: Struktura mezoporézních nanočástic oxidu křemičitého.....	31
Obrázek 15: Vlákenný scaffold posetý částicemi oxidu křemičitého	32
Obrázek 16: Buňky rostoucí na scaffoldu posetým oxidem křemičitým	32
Obrázek 17: Struktury nanočástic zlata	34
Obrázek 19: Schéma úloh kmenových buněk.....	38
Obrázek 20: Mikroskopický obraz.....	39
Obrázek 21: Imunofluorescenční barvení proti kolagenu typu II	39

SEZNAM TABULEK

Tabulka I: Přehled dostupných strategií syntézy nanodiamantů	28
Tabulka II: Metody syntézy hydroxyapatitu	30

SEZNAM ZKRATEK

CVD	chemická depozice par (<i>Chemical Vapor Deposition</i>)
DDS	doprava léčiv do tkání (<i>Drug Delivery System</i>)
ECM	extracelulární matrice (<i>Extra-Cellular Matrix</i>)
ESC	embryonální kmenové buňky (<i>Embryonic Stem Cells</i>)
FLG	vícevrstvý grafen (<i>Few-Layer Graphene</i>)
GNP	zlaté nanočástice (<i>Gold Nano-Particles</i>)
GO (rGO)	oxid grafenu (redukovaný GO) (<i>Graphene Oxide</i>)
HA (nHA)	hydroxyapatit (nanoHA) (<i>Hydroxy-Apatite</i>)
HPHT	vysokotlaká vysokoteplotní syntéza (<i>High Pressure High Temperature</i>)
LHDP	laserové techniky (<i>Light Hydro-Dynamic Pulse</i>)
MSN	mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého (<i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i>)
ND	nanodiamant (<i>Nano-Daimond</i>)
SC	kmenové buňky (<i>Stem Cells</i>)
TE	tkáňové inženýrství (<i>Tissue Engineering</i>)

ÚVOD

V několika posledních letech dochází k rozvoji tzv. regenerativní medicíny, kde za pomoci biologických, chemických, lékařských a dalších principů dochází k obnovení, restaurování a regeneraci tkání.

Některé tradiční implantáty mohou být tělem odmítány, a tak se moderní tkáňové inženýrství snaží vyvíjet nové materiály, které budou organismem lépe přijímány. Tento postup, by v budoucnu mohl zcela nahradit transplantace orgánů, či používání umělých implantátů.

Cílem je vytvořit takový materiál, který má na rozdíl od těch tradičně používaných pozměněnou strukturu tak, aby jeho fyzikálně-chemické vlastnosti vedly k větší adhezi, růstu, diferenciaci a životaschopnosti buněk různých druhů, a který zároveň samovolně degraduje, čímž dochází k jeho plnému nahrazení tkání tělu vlastní.

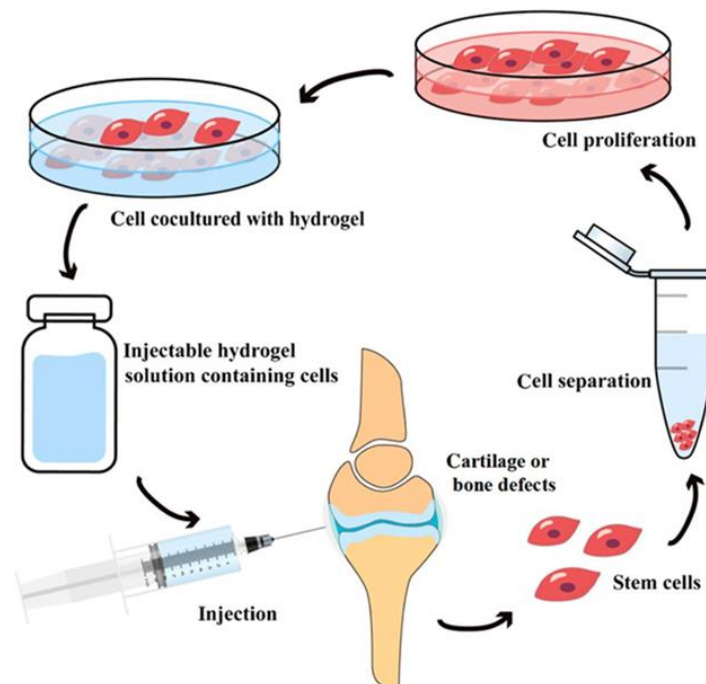
1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Tkáňové inženýrství

Transplantace orgánů a tkání patří již dnes mezi běžné zákroky. Vhodných transplantátů však není dostatečné množství, a ne všechny tradiční implantáty jsou tělem dobře přijímány. Tkáňové inženýrství (TE) je poměrně nová interdisciplinární oblast, která sjednocuje principy biologických věd, materiálové chemie a příslušných technických předmětů, a míří tak k vývoji biologických náhrad, které obnovují, udržují nebo zlepšují funkci tkání (Jain K. K., 2008).

Tato oblast se zabývá třemi hlavními odvětvími a to: základními materiály pro výrobu tzv. scaffoldu (2D filmy, 3D sítě, nanovláčna, hydrogely, nanočástice, mikrokapsle, biogel pro 3D tisk atd.), buňkami (především kmenovými a progenitorovými) a doprovodnými bioaktivními molekulami (růstové hormony, signalizační látky a léky), které umožňují/urychlují regeneraci tkání (Aramwit P., 2017).

Koncept byl formalizován v roce 1993, kdy Langer a Vacanti publikovali historický milníkový dokument ve vědě, ve kterém byly poprvé podrobně popsány charakteristiky a aplikace biologicky rozložitelných 3D lešení (Vacanti J. P. et Langer R., 1993).



Obrázek 1: Schéma postupu v tkáňovém inženýrství (s příkladem na kmenových buňkách za použití hydrogelu) (Převzato z Liu M. et al., 2017).

Vlastí postup v TE je odběr buněk, jejich izolace, vsazení buněk na nosič a následná kultivace a konečná implantace narostlých buněk do těla pacienta (podrobněji znázorněno na obr. 1) (Liu M. et al., 2017).

Úkolem je napodobit to, co se děje v přírodě. Jsou prováděny pokusy vytvořit *in vitro* prakticky každou tkáň v těle. Horkými kandidáty pro oblast TE jsou především kůže, cévy, nervy, ledviny, játra, srdce, chrupavka a kost. Produkce náhražek kůže hrála důležitou roli při zlepšování úspěšnosti operací kožního štěpu, zejména u komplexních ran, jako jsou popáleniny. Náhradní tkáň ledvinového systému, včetně močových měchýřů a močových cest, byly také úspěšně upraveny a transplantovány, čímž se rozšířily terapeutické možnosti komplikovaných renálních poruch. Scaffoldy a umělé biologické tkáně jsou zkoumány pro jejich použití při vývoji funkčních umělých končetin (první taková bioarteficiální končetina, která byla úspěšně vyvinuta byla noha potkana s fungujícími svaly a žilami - hlášena v roce 2015) (Rogers K., 2018).



Obrázek 2: Bioarteficiální umělá krysí končetina - suspendovaná v bioreaktoru, který obsahuje nutriční roztok a elektrickou stimulaci pro podporu a podporu růstu nové tkáně (Převzato z Rogers K., 2018).



Obrázek 3: Cévní štěp (Převzato a upraveno z Rogers K., 2018).

1.2 Scaffold

Scaffold je základní kámen tkáňového inženýrství. V obecném významu to může být jakákoli struktura poskytující podporu. V biologii se jedná o 2D či 3D struktury, sloužící jako matrice pro tvorbu tkání. Jejich povrch se typicky naočkuje buňkami, poté se příležitostně přidají růstové faktory, nebo se podrobí biofyzikálním podnětům ve formě bioreaktoru (zařízení nebo systém, který aplikuje různé typy mechanických nebo chemických podnětů na buňky) (Martin I., 2004). Tyto struktury jsou buď kultivovány *in vitro*, aby syntetizovaly tkáň, které pak mohou být implantovány do poškozeného místa, nebo jsou implantovány přímo do poraněného místa za použití vlastních systémů těla, kde je *in vivo* indukována regenerace tkání či orgánů. Tato kombinace buněk, signálů a scaffoldu je často označována jako *triáda TE* (O'Brien F. J., 2011).

Důležité vlastnosti, které musí každý scaffold splňovat, aby bylo možné jej spolehlivě využít, jsou: biokompatibilita (imunitní odpověď), biodegradabilita (rychlost degradace úměrná rychlosti formování tkáně), mechanická podpora (dočasná), porézní struktura, 2D a 3D struktura a přirozené prostředí (O'Brien F. J., 2011).

Klasické materiály využívané v TE lze podle jejich původu rozdělit do tří typů: přirozené a jejich modifikované materiály, umělé a kompozitní (Gao Q. et al., 2016). Dále je možné materiály rozdělit na *mikro* a *nano* v závislosti na tom, z jak velkých částic je materiál sestaven.

Mezi přírodní materiály, které mohou být využívány v TE patří především kolagen, různé proteoglykany a substráty na bázi alginátu a chitosanu. Přírodní polymery jsou biologicky aktivní a podporují vynikající buněčnou adhezi a růst. Kromě toho jsou také biologicky rozložitelné, a tak umožňují hostitelským

buňkám v průběhu času vytvářet vlastní extracelulární matici a nahradit degradovaný skelet. Vyrobení lešení z biologických materiálů s homogenními a reprodukovatelnými strukturami však představuje výzvu. Kromě toho mají tyto scaffoldy obecně špatné mechanické vlastnosti, což omezuje jejich použití například v nosných ortopedických aplikacích (O'Brien F. J., 2011).

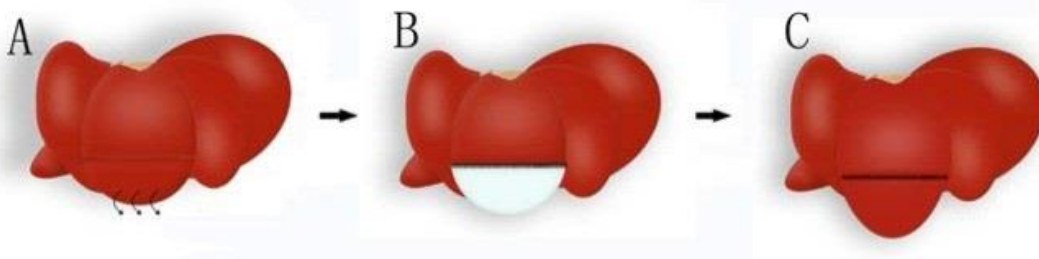
Na rozhraní přírodního a syntetického materiálu se nachází biokeramika. Keramické lešení se typicky vyznačují vysokou mechanickou tuhostí (Youngův modul), velmi nízkou elasticitou a tvrdým křehkým povrchem z čehož vyplývá, že není vhodným kandidátem pro reparaci měkkých tkání, existuje však množství keramických scaffoldů, tvořené např. hydroxyapatitem, nebo tri-fosforečnanem vápenatým, které mají široké použití pro opravu a rekonstrukci nemocných nebo poškozených částí muskuloskeletálního systému. Aplikace zahrnují náhrady za kyčle, kolena, zuby, šlachy, vazy atd. (Hench L. L., 1998; Ambrosio A. M. A., 2001).

Mezi běžně používané syntetické materiály v TE patří například polymery jako jsou: polystyren, kyselina poly-L-mléčná, polyethylenglycol, kyselina polyglykolová a kyselina poly-DL-mléčná-ko-glykolová. I když tyto látky vykazují velký úspěch, protože mohou být vyrobeny s přizpůsobenou architekturou a slibnými vlastnostmi, mohou mít ale i mnoho nevýhod, včetně rizika odmítnutí v důsledku snížení biologické aktivity (O'Brien F. J., 2011). Kromě toho existují obavy o procesu degradace kyseliny poly-L-mléčné a kyseliny polyglykolové, protože se degradují hydrolýzou, produkují oxid uhličitý a tím snižují lokální pH, což může mít za následek nekrózu buněk a tkání (Liu H. L., 2016). Dále mezi syntetické materiály patří: materiály z uhlíku, kovů, křemíku a atd.

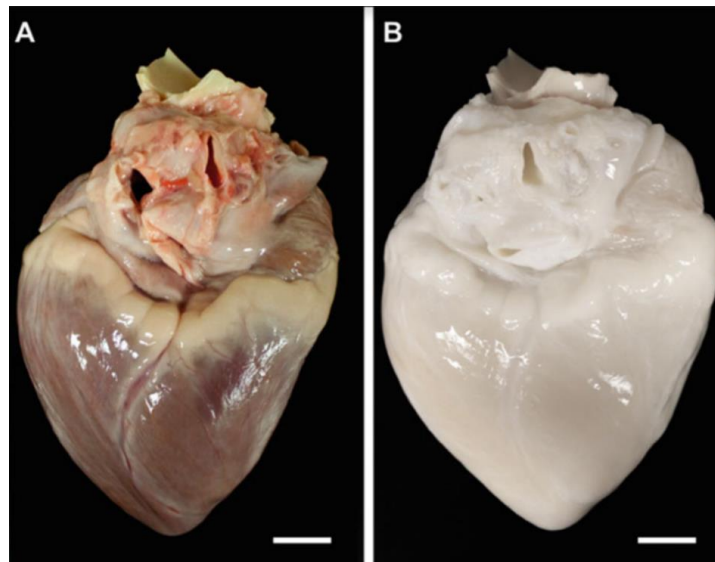
Jak již bylo popsáno, výše uvedené materiály většinou nesplňují všechny výše uvedené podmínky. Vědci se proto nadále snaží vyvinout nové alternativy za použití moderních technik, které v posledních letech udělaly velký krok vpřed a otevřely tak nové okno nejen oboru TE.

Jedním z novodobých způsobů, jak získat scaffold splňující vypsané požadavky je tzv. decelularizace. Jedná se o metodu, která odstraňuje rezidentní buňky a velkou část hlavního histokompatibilního komplexu z tkáně nebo celého orgánu prostřednictvím optimalizovaných protokolů, které významně spoléhají na perfúzi s detergenty (Macchiarini P. et al., 2008). U takto vzniklé extracelulární matrice může být kompletně zachován tvar i přirozené anatomické vlastnosti a

dá tak vzniku přírodního scaffoldu, který je využit k opětovnému naočkování buňkami což vede ke znovuobnovení tkáně či orgánu (obr. 4,5) (Yu Y. et al., 2016).



Obrázek 4: Příklad decelularizace: A) částečná resekce na jednom jaterním laloku, B) poškozená část je nahrazena decelularizovaným scaffoldem, C) jaterní buňky přecházejí skrz steh a regenerují se na jaterním skeletu (Převzato z Yu Y. et al., 2016).

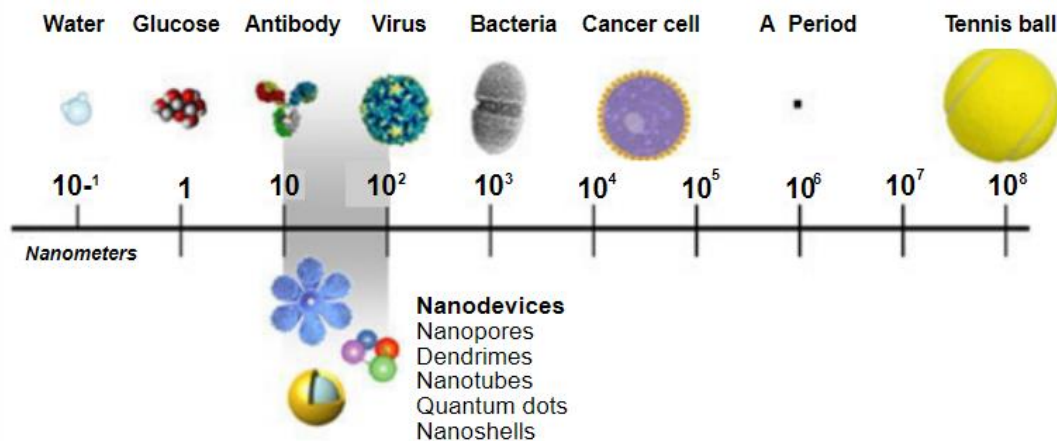


Obrázek 5: Decelularizace: A – zdravé prasečí srdce, B – decelularizované prasečí srdce (Převzato z Hodgson M. J. et al., 2018).

Další metodu, kterou výzkumníci navrhli pro tvorbu materiálů použitelných v TE, je použití 3D tisku. Cílem je, syntéza materiálu splňující uvedené vlastnosti a zároveň podmínku, aby mohl být materiál převeden z kapalné formy do pevné bez změny oněch požadovaných vlastností. Výsledkem by poté měl být scaffold s řízenou velikostí a strukturou pórů (Yeong W. Y. et al., 2004). Vzhledem ke slibným vizím se ve druhé dekádě oboru TE (2003–2012) počet studií v oblasti 3D tisku pro TE rychle zvýšil. Tyto studie se týkaly konstrukce lešení, modelování a optimalizace procesů, porovnávání metod 3D tisku, následného zpracování a charakterizace 3D tištěných scaffoldů, *in vitro* a *in vivo* aplikací atd. To vše dalo vzniknout i novému odvětví tzv. 3D-biotisk nebo také orgánový tisk, který je nyní aktuálním a budoucím tématem výzkumu (An J. et al., 2015).

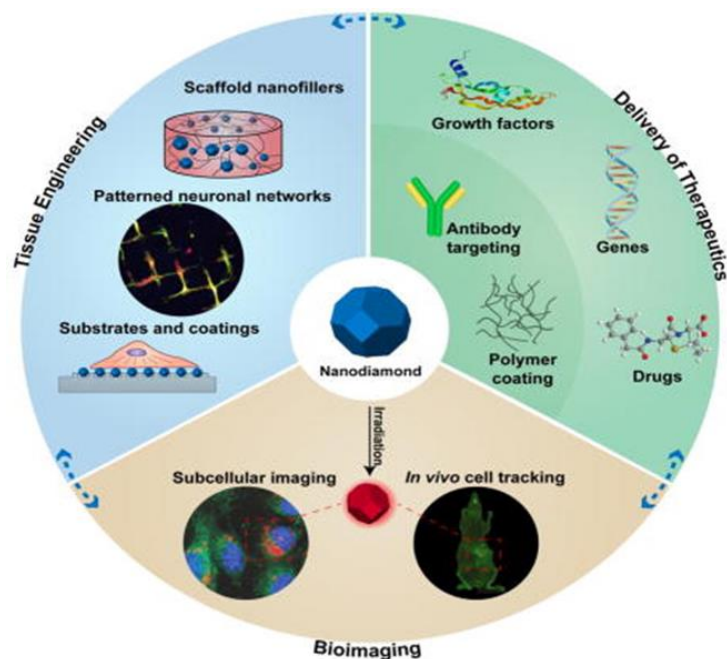
1.3 Nanomateriály

Pojem „nanomateriály“ definuje materiály a chemické látky, které se skládají z částic (nanočástic), jejichž velikost se minimálně v jednom rozměru pohybuje od 1 do 100 nanometrů (Buzea C., 2007).



Obrázek 6: Porovnání velikosti nanočástic s velikostí jiných objektů: od molekuly vody po tenisový míček (Převzato z Chakraborty A. et al., 2016).

Vzhledem k tomu, že velikosti funkčních prvků v biologii jsou v rozsahu nanometrového měřítka, není překvapující, že nanomateriály interagují s biologickými systémy na molekulární úrovni (Bogunia-Kubik K.; Sugisaka M., 2002). Kromě toho mají nanomateriály nové elektronické, optické, magnetické a strukturální vlastnosti, které nelze získat ani z jednotlivých molekul, ani na úrovni mikro a vyšší (např. u 4nm nanočástice je až 50% atomů na povrchu částice; s klesajícím rozměrem roste plocha povrchu ku objemu, atd.) Tyto jedinečné vlastnosti mohou být snadno funkcionalizovány pomocí biomolekul přes kombinované metodologie z bioorganické, bioanorganické a povrchové chemie (Emerich D. F.; Thanos Ch. G., 2003) Nicméně, při aplikaci nanotechnologií na biologii musí být zvaženo několik dalších podmínek: nanomateriály musí být navrženy tak, aby spolupracovaly s buňkami bez rušení jejich biologických aktivit, musí po úpravě povrchu zachovat své fyzikální vlastnosti, nesmí být toxické (Solanki A. et al.: 2008). Jestliže nanomateriály tyto vlastnosti a podmínky splňují, stává se z nich dokonalý nástroj pro mnoho podoborů v regenerativní medicíně (obr. 7).



Obrázek 7: Schéma využití nanomateriálů v regenerativní medicíně: TE, Delivery of Therapeutics (or Drug Delivery System, DDS), bioimaging (Převzato z Whitlow J. et al., 2017).

V biomedicínské oblasti jsou nanočástice používány pro cílenou a kontrolovanou dopravu léčiv do nitra buněk (DDS), v oblasti bioimagingu (k zobrazování specifických míst v buňkách, sondování DNA struktur, k biomolekulárnímu snímání atd.) a v poslední době v oblasti TE. Navíc mnoho terapií využívá nanočástice pro léčbu rakoviny, diabetu, alergií, infekcí a zánětů (Hasan A. et al., 2018).

Nanomateriály mohou být použity v TE přímo jako scaffold, nebo jako součást kompozitních skeletů, kde upravují vlastnosti jiného materiálu (např. zvyšují mechanické vlastnosti, upravují rychlost biologického rozkladu atd.) Nanoporézní materiály poskytují zvýšený povrch, který zlepšuje buněčnou integraci, adhezi proteinů a dalších organických látek a mění difúzní vlastnosti, které jsou závislé na velikosti pórů. Nanočásticové potahy obsahují struktury, jako jsou sloupy, hřebeny a další topografické znaky s laditelnými mechanickými vlastnostmi. Ukázalo se, že tyto povrchy vyvolávají rozsáhlé buněčné odpovědi od diferenciací kmenových buněk po prevenci tkáňové fibrózy (Padmanabhan J.; Kyriakides T. R., 2015).

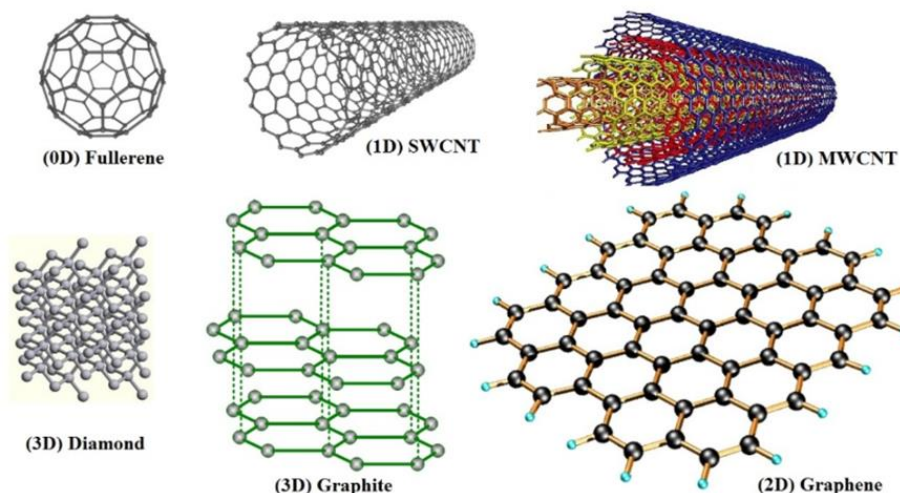
Nanomateriály mohou být ve formě polymerů, dendrimerů, hydrogelů, nanovláken, nanoprášek, nanotrubic atd. (Verma S. et al., 2001). Mezi tyto nanomateriály řadíme např. částice na bázi uhlíku, biokeramiku, některé kovy a

jejich oxidy, magnetické nanočástice, biodegradabilní nanokompozity na bázi kolagenu, sklo pokryté poly-lysinem a/nebo silanem, nanočástice fosforečnanu vápenatého, polystyren, polyethylenglycol, kyselina poly-L-mléčná, kyselina polyglykolová, kyselina poly-DL-mléčná-ko-glykolová a další. V následujících podkapitolách jsou některé z uvedených nanomateriálů podrobněji rozebrány.

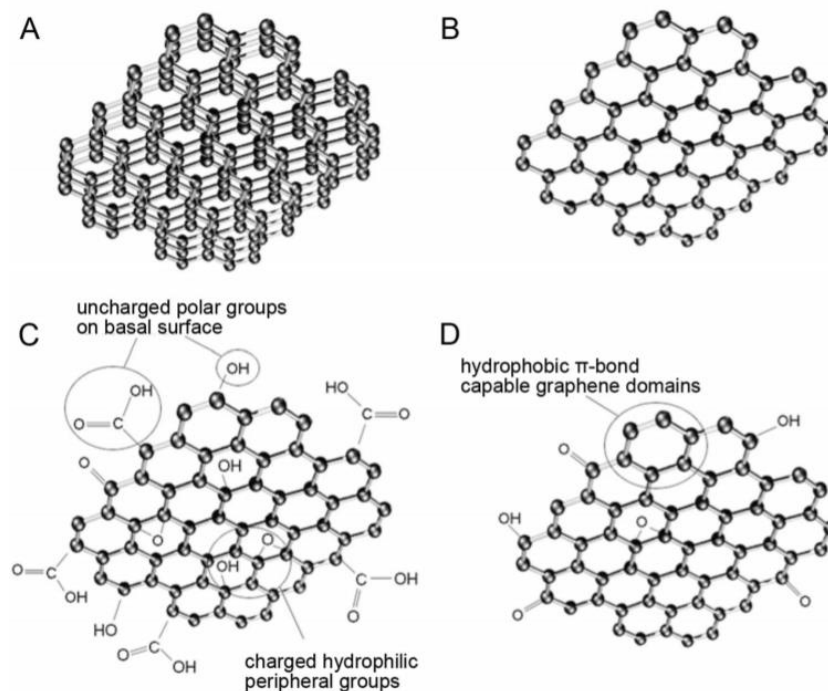
1.3.1 Grafen

Velkou skupinou zkoumaných materiálů vhodných pro TE jsou nanomateriály složené z molekul uhlíku. Jejich různorodé uspořádání poskytuje širokou škálu vlastností, které v posledních letech našly upotřebení v mnoha vědních oblastech.

Grafen je jednou z krystalických forem uhlíku. Jedná se o jedinou vrstvu sp^2 hybridizovaných orbitalů těsně zabalených do 2D hexagonové mřížky (obr. 8). Každý atom uhlíku má tři σ -vazby a jednu π -vazbu mimo rovinu, která se může vázat na sousední atomy. Navíc, chemickými a fyzikálními modifikacemi, mohou být grafenové pláty transformovány do jiných konformací, jako je například vícevrstvý grafen (FLG), oxid grafenu (GO) (obr. 9) a redukovaný GO (rGO). Dále může být grafen zabalen tak, aby vytvořil nanomateriál s nulovou dimenzí (0D), jako jsou fullereny, nebo válcovaný do nanotrubic (1D), nebo může být upravený do 3D grafitu (obr. 8). Každá z těchto modifikací má své jedinečné laditelné vlastnosti (Shin S. R. et al., 2017; Geim A. K.; Novoselov K. S., 2009).



Obrázek 8: Grafen a jeho modifikace: Fullerene (Fulleren), SWCNT (single-wall carbon nanotube – jednovrstvá uhlíková nanotrubička), MWCNT (multi-wall carbon nanotube – vícevrstvá uhlíková nanotrubička), diamond (diamant), graphite (grafit), graphene (grafen) (Převzato z Atta N. F.; et al., 2015).



Obrázek 9: Přehled dalších modifikací grafenu: A) FLG, B) jednovrstevný grafen C) GO a D) rGO. (Převzato z Jastrzebska A. M. et al., 2012)

Již zmíněná unikátní atomová struktura grafenu, kombinovaná s elektronovou distribucí, má za následek vysokou tepelnou elektrickou vodivost (téměř třináctkrát vyšší než měď), vynikající mechanické vlastnosti (tvrdost vyšší než diamant, modul pružnosti až 1 TPa), extrémní chemickou stabilitu, velkou plochu povrchu a dobrou optickou transparentnost s propustností $\sim 97,7\%$. Aby se mechanické a elektrické vlastnosti grafenu ještě více posílily, může být smíšen s jinými materiály, jako jsou syntetické nebo přírodní polymery. Stejně tak může být grafen přidáván k jiným materiálům, aby zlepšil právě jejich vlastnosti (Balandin A. A. et al.: 2008; Sheehy D. E.; Schmalian J.: 2009).

Zatímco vynikající optické vlastnosti jsou vhodné pro bioimaging, velká plocha povrchu grafenu (cca $2630\text{ m}^2/\text{g}$) a dostupnost volných π elektronů činí grafen dobrým materiálem pro DDS. Plocha totiž poskytuje vhodné podmínky pro navázání velkého množství bioaktivních sloučenin a zároveň může být vyladěna tak, aby uvolňovala bioaktivní sloučeniny řízeným způsobem chemicko-fyzikální modifikací. Kromě toho vynikající mechanická pevnost, tuhost a elektrická vodivost činí materiály na bázi grafenu dobrým kandidátem pro inženýrství kostní, nervové a srdeční tkáně (Paul A. et al., 2014; Shin S. R. et al., 2017). Například byl grafen začleněn do jiných materiálů, jako je poly-L-lysin,

aby významně snížil jejich elektrický odpor a stimuloval adhezi a růst neuritů neuronů (Zhou K. et al., 2012). Dále je známo, že povrchové vlastnosti biomateriálu, jako je topografie a tuhost, mohou regulovat buněčné chování, včetně adheze nebo diferenciací. Bylo prokázáno, že když je vrstva grafenu potažena na povrchu oxidem křemičitým, podporuje natahování a proliferaci lidských mezenchymálních kmenových buněk (Kalbacova M. et al., 2010). Obecně jsou nanomateriály na bázi grafenu aplikovány především v srdečním, nervovém, kostním, chrupavkovém, muskuloskeletálním a kožním/tukovém TE. Ačkoli v této oblasti existuje velké nadšení při používání těchto materiálů, stále existují mezi vědeckými a veřejnými komunitami obavy ohledně potenciální toxicity a biokompatibility těchto materiálů (Shin S. R. et al., 2017).

Problémy týkající se bezpečnosti a toxicity materiálů na bázi grafenu (a celkově i na bázi uhlíku) nebyly zatím důkladně vyřešeny, proto je třeba věnovat velkou pozornost hodnocení jejich biokompatibility a toxicity. Pro vyhodnocení toxicity byly studovány interakce mezi grafenem nebo listy oxidu grafenu a cílovými buňkami včetně plicních epitelálních buněk, fibroblastů a nervových buněk. Bylo zjištěno, že účinky GO na buňky jsou závislé především na velikosti dávky (Chang Y. et al., 2011). Výsledky *in vitro* ukázaly, že jednovrstvé vrstvy GO mohou vyvolat toxicitu, jestliže dávky po 24 hodinách byly vyšší než 20 $\mu\text{g/ml}$ (Li X. et al., 2011). V jiné studii, Zhang et al. uvádí, že FLG indukuje mitochondriální poškození a zvyšuje intracelulární tvorbu reaktivních forem kyslíku v nervových buňkách po 4 a 24 hodinách při dávce 10 $\mu\text{g/ml}$ (Zhang Y.; et al., 2010). Dále bylo zjištěno, že kromě velikosti dávky, je také toxicita závislá na velikosti částic, ze kterých je materiál složen. Například Yue et al. zkoumali účinek velikosti GO v reakci na různé typy buněk. Výsledky ukázaly, že mikročástice GO indukovaly mnohem silnější odezvy zánětu ve srovnání s nano velikostí GO (Yue H. et al., 2012). Další testy provedli Makharza et al., kteří zjistili, že GO vzorky s průměrnou šířkou 200 a 300 nm vykazovaly cytotoxický účinek na mezenchymální kmenové buňky a HeLa buňky, zatímco GO vzorky s průměrnou šířkou 100 nm nevykazovala žádnou významnou cytotoxicitu (Makharza S. et al., 2013). Dalším faktorem, který významně ovlivňuje toxicitu grafenu, je jeho povrchová modifikace, např. rGO a karboxylovaný grafen jsou méně toxické než GO nebo čistý grafen (Ding X. et al., 2015).

Důležitým faktorem, který udává vlastnosti grafenu je výroba. Mnoho výzkumníků použilo pro výrobu jednovrstvého grafenového scaffoldu různé metody jako je potahování, míchání hydrogelu, mokré/suché zvláknování a 3D tisk. Může být syntetizován opakovaným mechanickým odlupováním grafitových fólií, nebo kontrolovaným růstem na substrátech chemickou depozicí par. Grafen v jeho původní, čisté, neoxidované formě má lepší vlastnosti než jeho oxidovaný protějšek, ale je obtížné ho syntetizovat. Navíc je vzhledem k jeho reaktivnímu povrchu velmi obtížné ho suspendovat v rozpouštědlech. Tato negativa brzdila vývoj grafických funkčních zařízení, a tak byla velká pozornost v biologických aplikacích věnována FLG a GO. Avšak v poslední době byla pro konstrukci 2D grafenu navržena metoda 3D tisku, díky níž lze dosáhnout velmi přesné konstrukce 3D lešení a poskytuje tak nový rozvoj tohoto materiálu (Ding X. et al., 2015; Jakus A. E.; Shah R. N., 2017).

Vícevrstvý grafen je definován jako vločkovitý útvar složený z 2-10 grafenových vrstev, který je na počátku vyroben jako vedlejší produkt při výrobě jednovrstvého grafenu. Mezi vrstvami grafitu se zavádějí dusičnanové, sulfátové nebo jiné ionty, které se pak zpracovávají rychlým tepelným ohřevem, což vede k obrovskému roztažení a nárůstu vnitřního tlaku vrstvené struktury grafitu. Tato tepelná exfoliace vytvoří suché prášky, které mohou být rozptýleny do FLG vzorků nebo dále zpracovány do grafenu nebo GO (Novoselov K. S. et al., 2004; Sanchez V. C. et al., 2012).

GO je generován silnou oxidací grafitu následovanou sonikací za vzniku jednovrstvého materiálu. GO se skládá z jedné atomové vrstvy grafenových vrstev s karboxylátovými skupinami na periferii. Karboxylátové skupiny poskytují koloidní stabilitu a pH závislý negativní povrchový náboj (Park S. et al., 2009). Hydroxylové a epoxidové funkční skupiny přítomné v bazální rovině jsou bez náboje, ale polární. Nemodifikované grafitové domény jsou také obsaženy v bazálních rovinách a jsou hydrofobní a schopné interakce $\pi - \pi$, které mohou adsorbovat některé léky a suché molekuly. GO je tedy amfifilní plastická makromolekula a může působit jako povrchově aktivní látka např. pro stabilizaci hydrofobních molekul v roztoku (Ding X. et al., 2015). Vysoká hustota defektů je způsobena přítomností funkčních skupin v GO, což vede ke snížení jeho mechanických, elektrických a tepelných vlastností (Karlický F. et al., 2013).

rGO se může získat zpracováním GO za redukčních podmínek, které zahrnují vysokoteplotní tepelné zpracování a chemická zpracování s hydrazinem nebo jinými redukčními činidly (Park S. et al., 2009). Cílem redukce GO je obnovit elektrickou vodivost. Zvyšuje však hydrofobnost a snižuje obsah kyslíku v důsledku uvolňování oxidu uhelnatého či uhlíčitého. Navíc snižuje schopnost dispergovat vodu a povrchový náboj (Ding X. et al., 2015).

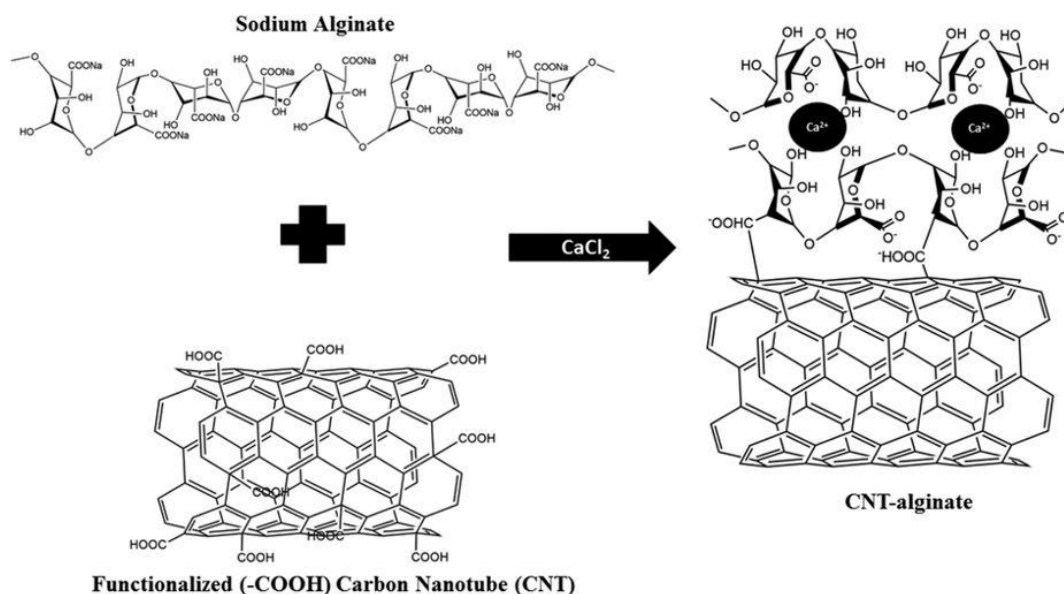
1.3.2 Uhlíkové nanotrubičky

Uhlíkové nanotrubičky (CNT) jsou nanomateriály odvozené od grafenu. Atomy uhlíku v CNT jsou uspořádány tak, aby tvořily válec z grafitových vrstev. Existují dva typy CNT: jednotěnné nanotrubičky, které jsou tvořeny jednou vrstvou grafenu a vícevrstvé nanotrubičky, které jsou tvořené více vrstvami grafenu, jak je znázorněno na obr. 8. Jejich průměr je přibližně 1 nm (u jednotěnných nanotrubiček, u vícevrstevných může být mnohonásobně větší) a jejich délka se pohybuje od 1 do 100 μm . Mezi jejich jedinečné vlastnosti patří, stejně jako u grafenu, jejich jedinečná struktura, která vede k mimořádné kombinaci mechanických, elektrických a optických vlastností (Kuzmann A. et al., 2011; Dresselhaus, M. S. et al., 1996).

Problémem CNT je, že na rozdíl od mnoha z jejich protějšků chemického činidla nemusí vždy přijít s dobře definovanou strukturou a čistotou. CNT se mohou významně lišit ve velikosti, morfologii, struktuře a čistotě na základě metody přípravy, purifikace a funkcionalizace použité k jejich syntéze. Interakce mezi CNT a biologickým prostředím je proto velmi složitá a někdy nepředvídatelná. Další překážkou je, že jsou hydrofobní. Právě jejich špatná rozpustnost představuje velké omezení pro jejich biomedicínské aplikace. Vyrobené CNT jsou téměř zcela nerozpustné v jakémkoliv vodném roztoku nebo organickém rozpouštědle. Výzkumníci navíc zjistili, že CNT mohou vykazovat různé úrovně toxicity v závislosti na způsobu jejich výroby, poměru povrchu k objemu, tvaru, koncentraci, poměru stran, rozsahu oxidace, složení, funkční skupině (skupinách) a aplikované dávce. CNT také mají schopnost poškodit DNA a buněčnou membránu (Alshehri R. et al., 2016). Mezi nejběžnější mechanismy CNT, které vedou k cytotoxicitě, patří také nekróza a apoptóza (Singh S. et al., 2012). Aby se minimalizovala vypsaná negativa, je důležité do CNT zavést funkcionalizační skupiny. Ty specificky interagují s receptory na povrchu buněk

a mohou vést jejich internalizaci. Funkcionalizace CNT vede k tomu, aby byly rozpustnější, a aby umožnily jejich integraci do mnoha organických, anorganických a biologických systémů a aplikací (Bianco A. et al., 2005; Tasis D. et al., 2006). Avšak i tyto funkcionalizace právě někdy mohou přispívat k další toxicitě.

CNT se vyrábí třemi různými technikami: technikou uhlíkového obloukového výboje, technikou laserové ablace; a technika chemické depozice par (Alshehri R. et al., 2016). Dále existují tři hlavní přístupy pro modifikaci CNT, konkrétně: kovalentní funkcionalizace π -konjugované kostry CNT s použitím různých chemických skupin a reakcí; nekovalentní adsorpce mnoha funkčních bio/molekul; a endohedrání vyplnění jejich vnitřní prázdné dutiny. Například 1,3-dipolární cykloadice azomethinylidů na CNT je jedním z jednoduchých, silných a vysoce využívaných funkcionalizačních přístupů, které vedou k rozpustným CNT, které mohou být použity pro další reakce a řadu funkčních skupin a biomedicínských aplikací (Bianco A. et al., 2005; Tasis D. et al., 2006).



Obrázek 10: Příklad funkcionalizace uhlíkové nanotrubičky: Chemické schéma tvorby CNT-alginátu (CNT se váže na alginát prostřednictvím kovalentní vazby) (Převzato z Joddar B. et al., 2016).

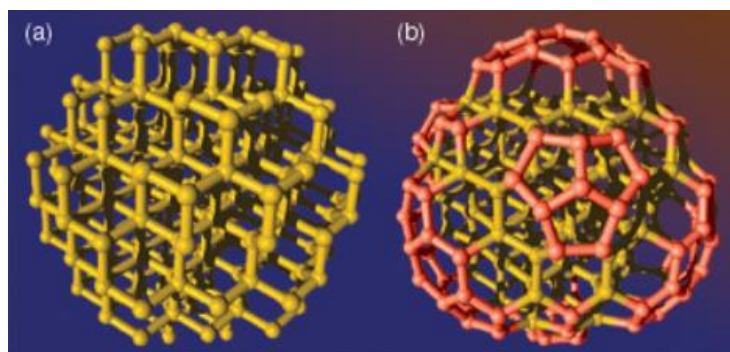
Úspěch některých studií při použití CNT pro růst nervů in vitro otevřelo nový horizont v neurálním TE. Bylo popsáno, že použití scaffoldů založených na CNT zlepšuje neurální růst, růst kostí a růst srdeční tkáně (Alshehri R. et al., 2016). Zatímco v růstu nervové a srdeční tkáně jsou CNT obecně používány jako zesilovač elektrických vlastností skeletů, růst kostí může být dosažen

funkcionalizací CNT se skupinami přitahujícími kationty vápníku. Další možné aplikace CNT v TE je inženýrství biohybridních tkáňových ovladačů, nebo například použití elektrospunových želatinových MWCNT vláken jako lešení pro růst myoblastů (Zhao B. et al.: 2005).

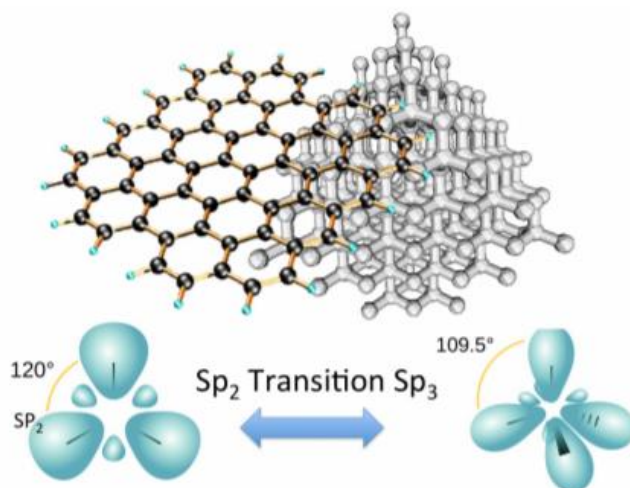
1.3.3 Nanodiamanty

Nanodiamanty (ND) byly poprvé objeveny v roce 1963 vědci v SSSR, kteří prováděli detonační testy s výbušninami na bázi uhlíku. Při odpálení směsi 2,4,6 - trinitrotoluenu a 1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazinu ve výbušné komoře vědci zjistili, že saze obsahují 4-5 nanometrů diamantové částice doprovázené grafitem a jinými ne-diamantovými částicemi uhlíku (Danilenko V. V., 2004). Navzdory jejich časnému objevu nebyly vlastnosti ND v kombinaci s biomedicínskými aplikacemi zkoumány až do počátku 21. století.

ND označované také jako ultra-disperzní diamanty jsou částice o velikosti 1-10 nm. Jsou často popsány jako krystalické diamantové jádro (obr. 11,a) s perfektní diamantovou sp^3 mřížkou obklopené amorfní skořápkou složenou z kombinací sp^2 a sp^3 vazeb či ze skořáčky grafitové a různými okysličenými funkčními skupinami (El-Say K. M., 2011). Tuto strukturu tzv. bucky-diamantu (obr. 11,b) zaujímá ND z následujících důvodů. Grafit je termodynamicky stabilnější při normálních teplotách a tlacích, zatímco diamantová forma uhlíku je stabilnější při vysokých hodnotách a může za normálních podmínek existovat pouze v metastabilním stavu. Rozdíly ve stabilitě těchto alotropických forem jsou důsledkem vysokoenergetické bariéry, která odděluje grafitickou sp^2 a diamantovou sp^3 konfiguraci (obr. 12) (Aversa R. et al. 2018).



Obrázek 11: Struktury nanodiamantu: (a) ND o rozměrech 1,4 nanometru s 275 atomy; (b) bucky-diamant (druh fullerenu), do kterého spontánně přeskupuje na ND asi při 300 kelvinech (tyto uhlíkové klastry mají diamantové jádro (žlutá) a plnohodnotný rekonstruovaný povrch (červená) (Převzato z Wlater K., 2003).



Obrázek 12: Alotropické formy uhlíku (grafit vlevo, ND vpravo): přechod vazby sp^2 v sp^3 a opačně (Převzato z Aversa R. et al. 2018).

Vazby grafitové a diamantové jsou vzájemně zaměnitelné a mohou za specifických podmínek přecházet jedna v druhou. Tato zaměnitelnost umožňuje, aby částice ND byly flexibilní šablony, zejména kolem zakřiveného povrchu, kde jsou elektrony nestabilní (El-Say K. M., 2011).

Objev zlepšených purifikačních metod a strategií povrchové modifikace také usnadnil produkci ND s přesnými a přizpůsobitelnými vlastnostmi (Iakubovskii K. et al., 2000). Inherentní fyzikální a chemické vlastnosti ND z nich činí vhodné kandidáty ve všech oblastech regenerativní medicíny. Například jejich vysoký poměr povrchu ku objemu a laditelná povrchová chemie umožňuje absorbovat vysokou kapacitu malých molekul obsahujících aminoskupiny nebo jiné polární skupiny. Po této reverzibilní zátěžové technice mohou být špatně rozpustné léky, jako jsou antracykliny, nekovalentně vázány na ND, které mají na svém povrchu hydroxylové nebo karboxylové skupiny (Wang X. et al., 2014). Kromě toho ND prokázaly, že zlepšují terapeutickou účinnost mnoha chemoterapeutických činidel zvýšením jejich dispergace ve vodě, což usnadňuje jejich trvalé uvolňování, stínění léčiva před inaktivací a obcházení mechanismů chemorezistence (Whitlow J. et al., 2017). Tato významná zlepšení v dodávání chemoterapeutických činidel inspirovala výzkumné pracovníky ke studiu ND pro trvalé uvolňování jiných terapeutických molekul, jako jsou růstové faktory, peptidy a geny (Zhang X.-Q. et al., 2009). Kromě toho přítomnost polárních skupin na povrchu ND umožňuje nanočástice adsorbovat pozitivně nabitě polymery, jako je

polyethylenimin nebo polylysin, které slouží jako intermediální kationtové vrstvy pro podporu adsorpce DNA a RNA (Kaur R. et al., 2012).

Při využití v TE se během přípravy scaffoldu z ND zavádějí kovalentní či iontové vazby pro tvorbu polymerních řetězců a tím se upraví mechanické vlastnosti tak, aby měly vhodnou strukturu pro růst měkkých i tvrdých tkání lidského těla. Vysoká biokompatibilita ND ve srovnání s jinými uhlíkovými nanomateriály, jako je GO nebo CNT, představuje významnou výhodu a naznačuje vysokou pravděpodobnost klinického užití (Zhu Y. et al., 2012). ND byly navrženy jako nanovýplně pro zesílení mechanických vlastností kompozitních skeletů a jako bioaktivní povlaky ke zlepšení vlastností a snížení mechanického opotřebení ortopedických implantátů (Whitlow J. et al., 2017; Catledge S. A. et al., 2013).

Velikost diamantového jádra, distribuce oblastí sp² ve vnějším obalu, stejně jako různorodost reaktivních funkčních skupin na povrchu ND, jsou podstatně ovlivněny cestou syntézy a složením reaktantů. Kromě toho mohou být fyzikálně-chemické vlastnosti také ovlivněny čistícími kroky, které jsou nezbytné pro odstranění nežádoucích nečistot, které se zavádějí během syntézy. Pro výrobu ND je k dispozici několik metod, včetně detonační syntézy, chemické depozice par (CVD), vysokotlaké vysokoteplotní syntézy (HPHT) a laserových technik (Whitlow J. et al., 2017).

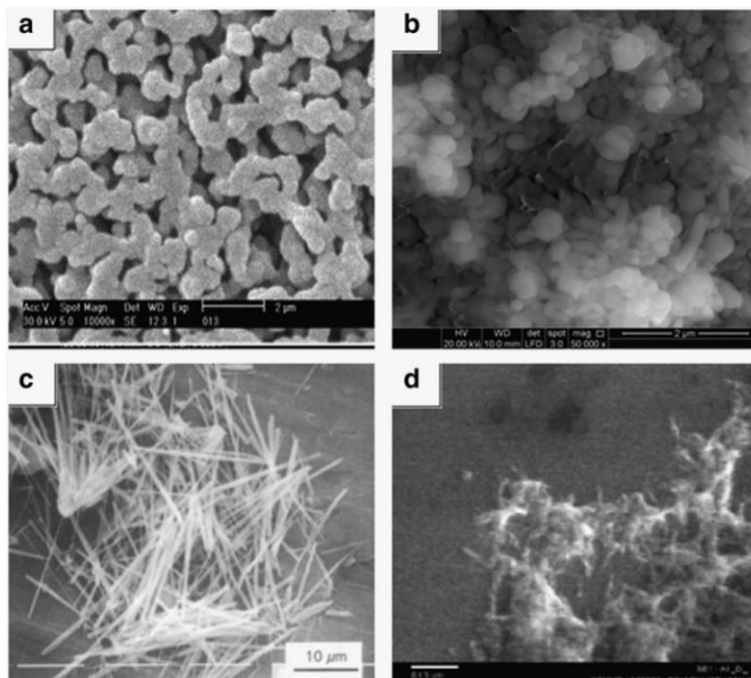
Tabulka I: Přehled dostupných strategií syntézy ND (Převzato a upraveno z Whitlow J. et al., 2017).

Technika syntézy	Průměrná velikost ND	Morfologie	Chemický povrch	Výhody	Limitace
Detonační syntéza	4-5 nm	Zkrácená oktaedrická morfologie	Heterogenní s sp^2 hybridizovaným uhlíkem a jinými kovovými nečistotami. Kyslíkové funkční skupiny.	Výroba v průmyslovém měřítku.	Jsou požadovány různé kroky čištění. Vysoké náklady. Nebezpečná, znečišťující technologie
CVD	5-100 nm	Filmy z ND	Hydrogenovaný povrch	Absence kovových nečistot. Užitečné pro výrobu filmů.	Strategie omezená na produkci filmů. Vysoké náklady.
HPHT	>20 nm	NDs s ostrohrannými vnějšími povrchy	Absence sp^2 defektů na povrchu	Jednotná velikost. Vyšší obsah dusíku vhodného pro imaging.	Vysoké náklady.
LHDP	4-5 nm nebo 250-300 nm	NDs s podobnou morfologií detonačních NDs	Kontrolovaná chemie povrchů	Technologie šetrná k životnímu prostředí. Kontrola nad velikostí. Produkce ND s vysokou čistotou s vysokou homogenitou.	Předčasná technologie s omezeným přechodem na sériovou výrobu.

1.3.4 Nano-Hydroxyapatit

Hydroxyapatit (HA) jehož chemický vzorec je $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, je syntetický biomateriál spadající do skupiny resorbovatelných biokeramik. Jedná se o materiál, který získal rozsáhlé uplatnění v pokročilém inženýrství tvrdých tkání, jelikož je jeho chemické složení srovnatelné s minerální složkou přírodní kosti (Kim H.-W.; et al., 2005). V podstatě 70% přírodní kosti se skládá z nanokrystalického HA (nHA), který je 20–80 nm dlouhý a 2–5 nm široký (Zhang L. et Webster T. J., 2009). Syntetický HA, který je komerčně vyráběn v prášcích, sypkých materiálech a vláknech, však vykazuje větší velikost, než je velikost přírodního nHA, a právě díky své velikosti není zcela vhodný pro medicínské užití. Vykazuje totiž špatnou biologickou vstřebatelnost a je velmi křehký. Vytvoření

nanofázového HA vedlo k potlačení negativních vlastností a přiblížení se struktuře přírodní kosti. Obr. 13 ukazuje fotografie z rastrovacího elektronového mikroskopu, kde jsou zachyceny přírodní nHA a nHA vyrobené různými metodami (Zakaria S. M. et al., 2013).



Obrázek 13: Prostorové uspořádání hydroxyapatitu (HA): (a) přírodní HA, (b) syntetické nanočástice HA vyrobené elektrosponingem, (c) HA „nanovousy“ vyrobené hydrotermální metodou a (d) agregáty nanočástic HA získaných mokřým chemickým srážením. (Převzato z Zakaria S. M. et al., 2013).

V různých studiích bylo zjištěno, že nHA poskytují vysokou povrchovou plochu ku objemu, což má za následek zvýšenou buněčnou adhezi, proliferaci a adhezi osteoblastů (tyto vlastnosti nebyly u HA s většími částicemi pozorovány). Aplikace nHA může vést k rychlé tvorbě kostí a pevné biologické fixaci na kostní tkáň díky jejímu povzbudivému osteokonduktivnímu a bioaktivnímu chování (Suchanek W.; Yoshimura M., 1998). Jak již bylo řečeno, nHA patří do skupiny resorbovatelných biokeramik, u kterých na rozdíl od keramik *bioaktivních* či *bioinertních*, dochází k neustálé degradaci a jsou postupně nahrazeny přírodními tkáněmi. Výsledek tedy nepřináší náhradu kosti, ale dochází k postupné obnově funkční tkáně, čímž se odstraní dlouhodobé problémy s biokompatibilitou. Navíc nHA nevykazuje žádné cytotoxické vlastnosti (Zakaria S. M. et al., 2013).

Stejně jako je tomu u ostatních materiálů, je i u nHA důležitá modifikace povrchu vedoucí k vylepšení jeho dosavadních vlastností. Povrchová modifikace

přispívá ke zvýšení bioaktivity nHA, zlepšení stability koloidů a dobré tvorbě mezifázových vazeb. Kromě toho může povrchová modifikace také ovlivnit fyzikální vlastnosti HA regulováním délkového měřítka, drsnosti povrchu, topografie a krystalického řádu HA (Liu Y.; Nancollas G. H., 1997). Modifikace mohou být provedeny za pomoci nejrůznějších kyselin, alkoholů, bází, polymerů atd. Mezi nejčastější však patří úpravy pomocí laserového záření, vazby se silanem a vazby s vodními polyelektrolyty. Laserové záření vytváří hrubou sloupcovitou topografii povrchu, která vede ke zvýšení plochy povrchu. Vazba se silanem zabraňuje aglomeraci, která zlepšuje mezifázové vazebné vlastnosti rekonstituovaných materiálů. Vazbou s vodními polyelektrolyty je zlepšena mezifázová vazba a také schopnost nHA být velmi dobře snášený s vodou. (Zakaria S. M. et al., 2013).

Výroba nHA není nijak zvlášť složitá, u všech metod je ale velmi důležitá přesnost. Pečlivé řízení parametrů, jako je pH, reakční doba, teplota a koncentrace reaktantů, spolu se správným výběrem prekurzorových materiálů jsou během syntézy mimořádně důležité, protože tyto parametry a materiály mohou ovlivnit složení a vlastnosti konečného produktu (Kim H.-M. et al., 2000). Bylo identifikováno několik postupů přípravy HA, které zahrnují metodu hydrotermální; sol-gel; mokré chemické metody a metody biomimetické depozice, jak je uvedeno v tabulce II (Zakaria S. M. et al., 2013).

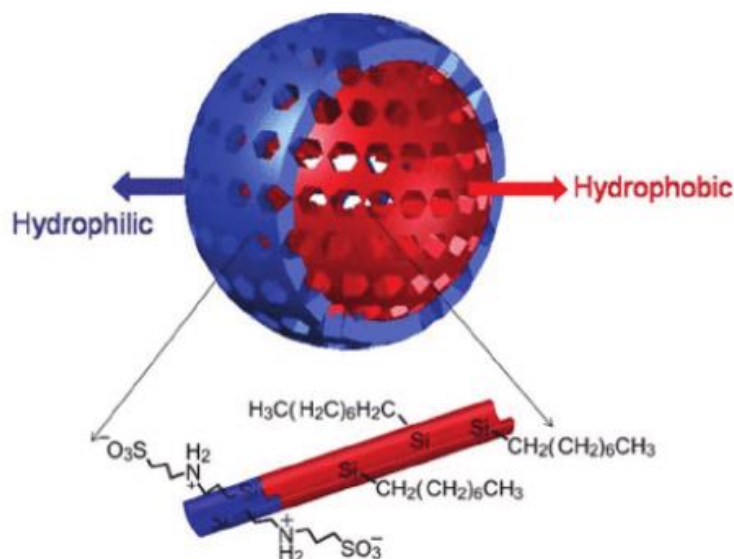
Tabulka II: Metody syntézy HA (převzato a upraveno z Zakaria S. M. et al., 2013)

Metoda	Reakce	Specifikace	Charakteristika HA
Hydrotermální	Za přítomnosti vody a relativně vysokého tlaku	Teplota 80 °C – 400 °C, tlak 100 MPa	HA vousy s 20 – 30 µm délkou a 0,1–1 µm šířkou
Sol-gel	Zahrnuje míchání vápníku a fosforu na molekulární úrovni a umožňuje tvorbu krystalů apatitu s vysokou reaktivitou	Teplota 65 °C – 600 °C	HA o průměru 20 – 50 nm.
Mokrá chemická	Zahrnuje jednoduché nastavení, nízkou provozní teplotu a vysoký výtěžek čistého produktu	Teplota 140 °C, tlak 0,3 MPa	HA s dvoufázovou strukturou ve tvaru tyče.
biomimetická depozice	Nukleace a růst HA podporovaný simulovanou tělní tekutinou	Teplota 37 °C	Vznik apatitové vrstvy podobné kostní tkáni.

Jak již z textu vyplývá, nHA je tedy užíván hlavně v kostním TE především díky jeho tvrdosti. Je často primární volbou pro konstrukci kostních výplní nebo jako povlak na protetických implantátech pro zlepšení inkorporace implantátu s hostitelem. Mimo to je ale také používán například pro řízené uvolňování léčiv, jako aditivum zubních past a zubních implantátů. (Zakaria S. M. et al., 2013).

1.3.5 Oxid křemičitý

Výzkum mezoporézních nanočástic oxidu křemičitého (MSN) (obr. 14) v biomedicínských aplikacích během posledního desetiletí doslova explodoval. Schopnost vytvářet porézní a dispergovatelné nanočástice s jednotnou velikostí vedla MSN k mnoha aplikacím v medicíně. Velikost a tvar částic jsou snadno laditelné, vysoký objem pórů a povrchová plocha umožňují možnost navázání mnoha účinných složek. Díky flexibilitě platformy a širokým možnostem další funkcionalizace nabízejí schopnost cíleného dodávání a řízeného uvolňování různých molekul, obcházení nežádoucích biologických interakcí a podporu interakcí požadovaných. Tyto vlastnosti se dají využít pro cílené, časově a prostorově řízené dodávání léčiv a přizpůsobený terapeutický účinek při regeneraci tkání (Rosenholm J. M. et al., 2016).

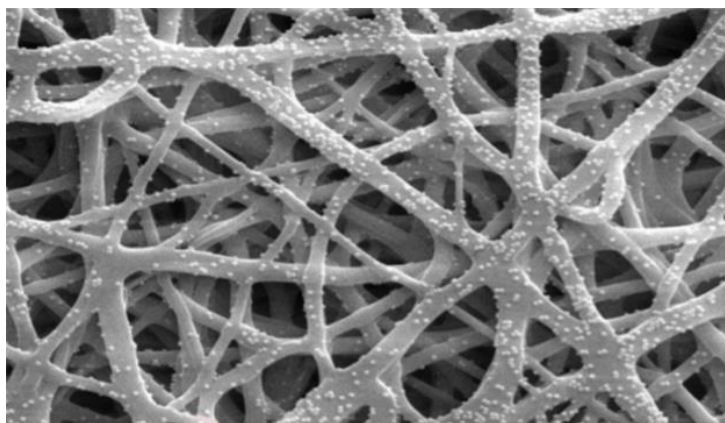


Obrázek 14: Struktura mezoporézních nanočástic oxidu křemičitého – znázornění hydrofilní a hydrofobní vrstvy (Převzato z Jadhav S. A., 2014)

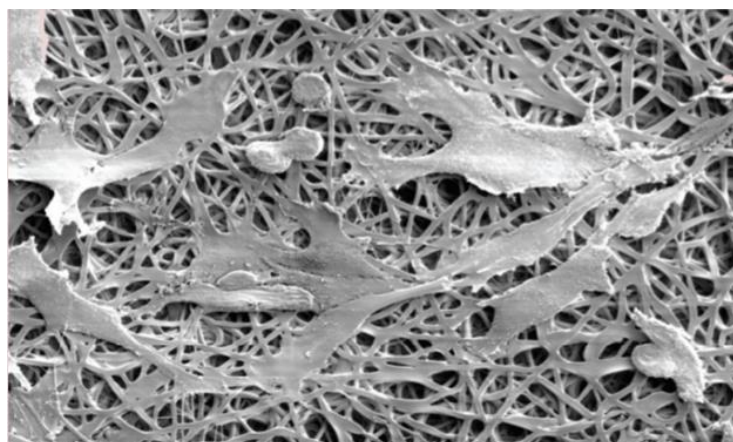
Lékařské aplikace MSN se dosud zaměřovaly převážně na terapii a diagnostiku rakoviny a použití MSN v regenerativní medicíně je stále rozvíjející

se oblastí. Znalosti o biologickém chování a vývoji chemického designu vytvářeného výzkumnými činnostmi v nanoterapii rakoviny však mají zásadní význam pro použití MSN v TE (Wicki A. et al., 2015).

Mezoporézní částice oxidu křemičitého mohou být využity pro: kontrolovaný DDS; morfologickou, mechanickou a chemickou kontrolu buněk; zvyšování citlivosti některých molekul; imaging kmenových buněk. Časové a prostorové podávání podnětů je zlatým standardem pro získání účinné tvorby tkáně z kmenových buněk (SC). Mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého bývají v tkáňovém inženýrství využívány především pro funkcionalizaci jiných nanomateriálů (obr. 14,15). Jejich sloučením tedy vzniká nový kompozitní nanomateriál s novými vlastnostmi. MSN mohou regulovat uvolňování biologických podnětů, které pak působí na prekursorové/kmenové buňky v trojrozměrném růstovém prostředí (Rosenholm J. M. et al., 2016).



Obrázek 15: Vlákenný scaffold posetý nanočásticemi oxidu křemičitého (Převzato z Rosenholm J. M. et al., 2016)



Obrázek 16: Buňky rostoucí na scaffoldu posetým oxidem křemičitým (Převzato z Rosenholm J. M. et al., 2016).

Většina výzkumu MSN v TE se zaměřila na osteogenní diferenciaci a tvorbu kostní tkáně. Jednou z prvních demonstrací mezoporézních částic oxidu křemičitého ve tkáňovém inženýrství bylo jejich vrstvení na titanové substráty s cílem využití pro implantační technologie (Hu I. et al., 2010). Modifikovaný povrch poté zlepšil biologické chování osteoklastů. Dále bylo prokázáno, že MSN zlepšují mechanické vlastnosti PLGA v hydrogelech, což je důležité pro regeneraci tvrdých tkání, jako jsou kosti (Mehrša M. et al., 2015). Dále byl vyvinut nanovláknitý hybridní skelet polykaprolaktonu pokrytého MSN nebo skelet z CNT s navrstvenými MSN, za cílem, aby se zlepšily profily uvolňování léčiva. Bylo prokázáno, že aminované MSN s velkými póry a pozitivně nabitým povrchem fungují jako účinné nosiče genů v mesenchymálních KB s následným použitím v kostním TE (Rosenholm J. M. et al., 2016; Kim T.-H. et al., 2013). Böcking a kol. vyvinuly buněčné substráty založené na filmech z MSN naložených γ -sekretázovými inhibitory, pro podporu diferenciaci svalových kmenových buněk, nebo bylo prokázáno, že dodávání kyseliny askorbové pomocí MSN stimuluje tvorbu kardiomyocytů z kmenových buněk. Studie tedy ukazují, že MSN mají širší použití než inženýrství kostní tkáně a mohou být využity pro zlepšení diferenciaci střevních, svalových a srdečních tkání (Böcking D. et al., 2014; Paul A. et al., 2014).

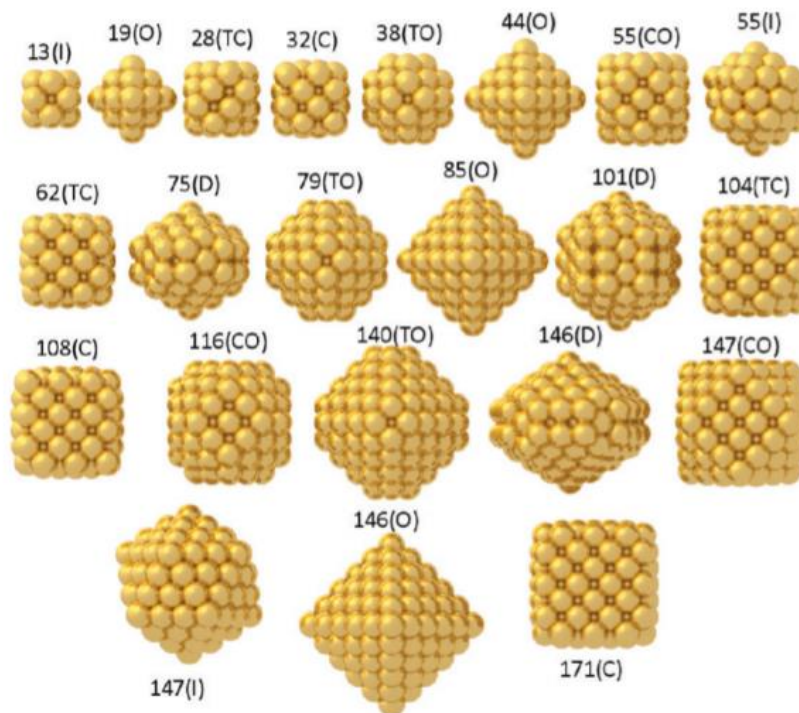
V rámci toxicity byly studována životaschopnost buněk, disrupce membrány, oxidační stres a buněčná absorpce. Bylo zjištěno, že rozsah a mechanismus MSN cytotoxicity jsou nejen závislé na velikosti a dávce, ale také vysoce závislé na typu buněk (podobně jako u grafitu).

Pro mezoporézní syntézu nanočástic oxidu křemičitého se používá několik různých přístupů, což má za následek různé velikosti částic a pórů. Například MSN se syntetizují na základě modifikované Stöberovy syntézy nebo použitím triblokových kopolymerů jako templátů pro dobře uspořádané hexagonální mezoporézní struktury oxidu křemičitého s póry až 30 nm (Watermann A.; Brieger J., 2017).

1.3.6 Zlaté nanočástice

Zlaté nanočástice (GNP) jsou, spolu s dalšími kovy (např. titan, stříbro aj.) a jejich oxidy, dalším kandidátem v oblasti TE a mnoha dalších medicínských oborech. Tyto nanočástice mohou mít různé tvary, s různým počtem atomů,

závisejících především na způsobu výroby (obr. 17). Důvodem využití GNP jsou především jejich povrchové konjugace, pevnost, vodivost, biokompatibilita nebo například antimikrobiální vlastnosti. Navíc u nich lze poměrně snadno provádět povrchové modifikace, které jejich využití ještě více rozšiřují. (Hasan A. et al., 2018).



Obrázek 17: Struktury nanočástic zlata – označení N(X) označuje velikost a tvar, kde N je počet atomů, I = ikosaedr (dvacetistěn), O = oktaedr (osmistěn), TO = zkrácený oktaedr, CO = kubický oktaedr, TC = zkrácená kostka, C = krychle a D = dekaedr (desetistěn) (Převzato z Barnard A. S., 2012).

Zlaté nanočástice byly použity pro zvýšení rychlosti buněčné proliferace při regeneraci kostní a srdeční tkáně. Bylo pozorováno, že podporují osteogenní diferenciaci buněčné linie prekursorů osteoblastů (MC3T3-E1), ovlivňují tvorbu osteoklastů z hematopoetických buněk a zároveň poskytují ochranné účinky mitochondriální dysfunkce v osteoblastických buňkách. Další zpráva ukázala, že GNP mohou podporovat osteogenní a adipogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk. Bylo však zjištěno, že tato osteogenní diferenciaci závisí na velikosti GNP. Jedna studie prokázala, že GNP s průměry 30–50 nm jsou příznivé a účinnější pro funkci kmenových buněk odvozených z lidské tukové tkáně (ADSC), zatímco další studie ukázala, že pro buňku podobnou osteoblastům typu MC3T3-E1 je výhodná velikost GNP 20 a 40 nm (Hasan A. et al., 2018). Další

uplatnění GNP, by mohlo být nahrazení kostních morfogenetických proteinů. Ačkoliv mají tyto proteiny příznivé účinky na regeneraci a opravu kostí, mají také mnoho nevýhod. Jejich vysoké náklady a náchylnost vést k nežádoucí tvorbě kostí a lokálním zánětlivým reakcím jsou jedním z hlavních důvodů, které vedly výzkumníky k hledání alternativních materiálů pro růst kostí, přičemž jsou GNP slibným kandidátem (Benglis D. et al., 2008). Mnoho dokumentů poskytuje slibné *in vitro* experimentální výsledky s použitím GNP. Při pokusech na zvířatech však byly v těchto experimentálních výsledcích pozorovány značné rozdíly (Lin Z. et al., 2013). K překonání tohoto problému byly (pro jejich účinnost) studovány hybridní skelety složené z GNP a želatiny, za podmínek *in vivo*, při zahájení osteogenní diferenciaci v důsledku lidských ADSC. Hydrogely byly umístěny do parietální kosti králíků, kde byly před aplikací hydrogelu provedeny kostní defekty. Studie ukázala zvýšenou proliferaci osteoblastů, spolu se vzrůstajícím obsahem GNP v hydrogelech (Heo D. N. et al., 2014). V jiných studiích měly GNP a zlaté nanodrátky umístěné v lešení významný vliv na buněčnou proliferaci a tvorbu synapse, která je klíčem k funkčnímu transplantaci orgánů. Navíc tyto materiály mohou také řídit diferenciaci kmenových buněk, bez použití růstových faktorů, čímž se minimalizují/vyhýbají četným vedlejším účinkům aplikace růstových faktorů v těle (Subbiah R. et al., 2010). GNP se také úspěšně používají v srdečním TE. Nanovlákná zatížená GNP vedla ke zvýšení kardiomyogenní diferenciaci, a tak pomohla regeneraci myokardu (Hasan A. et al., 2018).

1.4 Kmenové buňky

Kmenové buňky (SC) jsou samoobnovující se buňky, které se mohou diferencovat na specializované typy buněk. U savců se nachází dva typy SC, a to embryonální kmenové buňky (ESC - v blastocystě) a dospělé kmenové buňky (ve tkáních dospělých organismů – kostní dřev, tuková tkáň, krev). Dále je možné SC rozdělit, podle schopnosti jejich diferenciaci. Pluripotentní SC, tj. ESC se diferencují na buňky všech tří embryonálních linií (ektoderm, endoderm, mesoderm). Multipotentní SC, jako jsou např. buňky hematopoetické, se mohou vyvinout do více specializovaných buněk ve specifické tkáni. Progenitorové (Unipotentní) SC se diferencují pouze do jednoho buněčného typu, např. satelitní buňky kosterního svalu. Multipotentní a progenitorové patří mezi dospělé SC,

zatímco dospělé pluripotentní buňky se nachází v těle jen velmi vzácně (mohou být nalezeny např. v pupečnickové krvi) (Dulak J. et al., 2015).

Již dlouhou dobu se dospělé kmenové buňky využívají v mnoha medicínských oblastech např. pro léčbu leukémií, anémií nebo imunodeficiencí, které vychází z transplantace kostní dřeně. Kmenové buňky získané z kůže se používají k léčení těžkých popálenin, limbální kmenové buňky mohou regenerovat poškozenou rohovku atd. (Dulak J. et al., 2015).

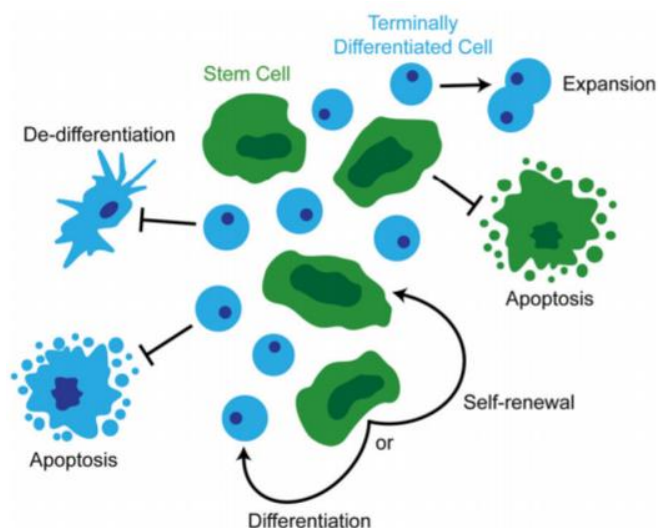
Buňky jako takové mohou být v tkáňovém inženýrství použity pro různé funkce; mezi ně patří syntéza většiny tkáňových matic, integrace s existujícími nativními tkáněmi, udržování tkáňové homeostázy obecně a poskytování různých metabolických služeb ostatním tkáním a orgánům (Paschos N. K. et al., 2015). Ačkoli terminálně diferencované buňky jsou běžně používány pro syntézu matic, které skládají objem tkání, kmenové buňky, konkrétně dospělé kmenové buňky, získávají díky svým příznivým vlastnostem na popularitě (Paschos N. K. et al., 2014).

Metody, které se v TE využívají pro růst buněk jsou tzv. kokultivace. Jedná se o kultivace více, odlišných buněčných typů, přímo nebo nepřímo, ve stejném kultivačním prostředí. V přímých kokultivacích se buňky smísí v kultivačním prostředí a umožní přímému kontaktu. V nepřímých kokultivacích jsou buněčné typy odděleny v kultivačním prostředí a dochází k interakci buněk prostřednictvím rozpustných faktorů. Kokultivace se používají pro dva účely. První a nejběžnější účel je řídit tvorbu tkáně s přímou nebo nepřímou interakcí více typů buněk. Druhým je zachování účinnosti kmenových buněk během jejich expanze. Principem je implementování vyživující vrstvy, ve které je jedna buněčná populace, obvykle diferencovaných buněk. Tato populace vylučuje signální faktory a cytokiny pro kondicionování média vedoucí k expanzi SC. Společná kultura může účinně rekapitulovat vztahy mezi typy buněk uvnitř nativní tkáně, procesy, které jsou často neúčinné, když se spoléhají pouze na lešení a rozpustné faktory (Paschos N. K. et al., 2014).

Typy buněk v kokultuře jsou označovány jako buňky cílové a buňky pomocné. Obecně jsou cílové buňky ty, které budou nakonec skládat upravenou tkáň a jsou odpovědné za funkci tkáně (např. Metabolické, mechanické). Když se kultivuje více typů cílových buněk, může každý také sloužit jako pomocné buňky druhé. Pomocné buňky vedou cílové buňky k dosažení požadovaného chování.

Mezi ně patří proliferace nebo diferenciací, produkce matrice nebo organizace přímý kontakt buňka-buňka, adheze buněk k extracelulárním matricím (produkovaným pomocnými buňkami) a / nebo sekrece signálních molekul. Intimní interakce mezi pomocnými a cílovými buňkami jsou často příliš složité na to, aby mohly být prováděny prostřednictvím exogenní kontroly. Pomocné buňky neustále monitorují a reagují na potřeby cílových buněk a účinně slouží jako kontrolní systém zpětné vazby, který je neustále zapnut a okamžitě reaguje a vytváří tak ideální prostředí pro řízení kultury (Paschos N. K. et al., 2014).

V tradiční monokultuře je použití SC žádoucí vzhledem k jejich schopnosti podrobit se expanzi při zachování nediferencovaného stavu, schopnosti diferencovat se do buněk různých typů tkání a jejich imunomodulačních vlastností. Použití SC může omezit nebo eliminovat problémy spojené se získáváním buněk, jako je morbidita dárcovského místa a omezená dostupnost primárních buněk, protože mohou být izolovány z embryonálních a mnoha typů dospělých tkání. Často v kokulturních systémech jsou SC cílové buňky, které diferencují, a nakonec syntetizují extracelulární matici (ECM) nebo jejich metabolity umožňují funkci tkáni. Pokud působí jako pomocné buňky, mohou kmenové buňky také vytvořit vhodné prostředí pro homeostázu upravených tkání (obr. 18) (Paschos N. K. et al., 2014). Například SC mají schopnost podporovat obnovu tkání, a to nejen přímo, ale také nepřímo. Jejich nepřímá role spočívá v lokálním potlačení imunitního systému, inhibici apoptózy a podpoře proliferace a diferenciací, která je v současné době popsána jako trofické mediátorové účinky. Ať už slouží v cílových nebo asistenčních rolích, SC jsou klíčové pro růst tkání, metabolismus, zrání a opravu (Scadden D. T., 2006).

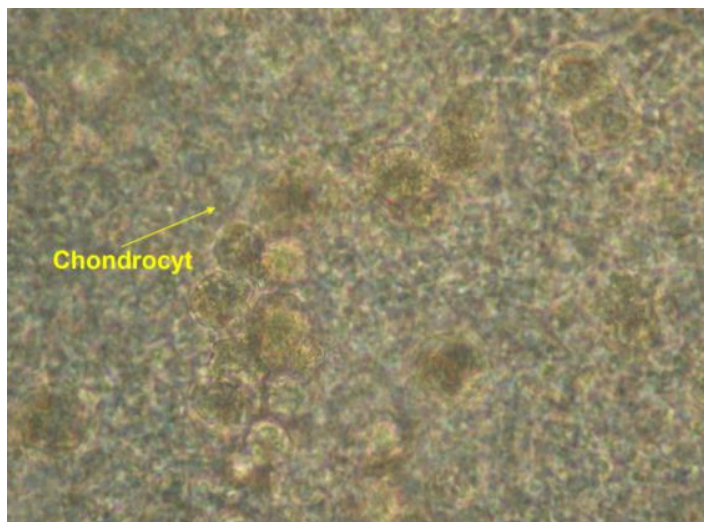


Obrázek 18: Schéma úloh kmenových buněk (Převzato z Paschos N. K. et al., 2014).

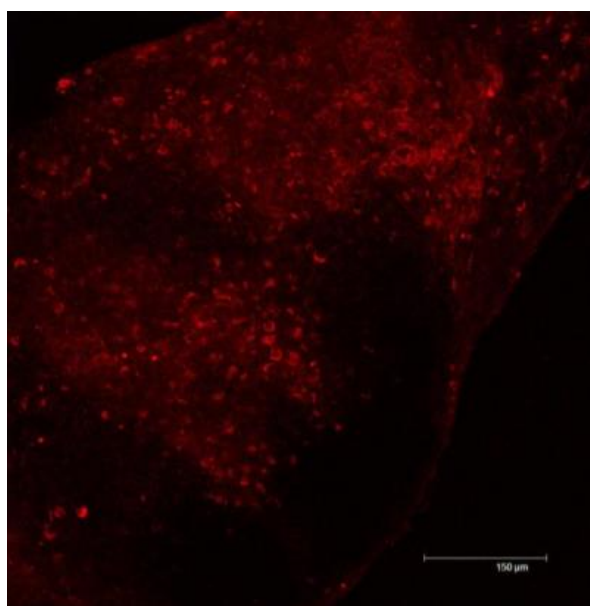
V posledních letech byly vytvořeny různé tkáně včetně chrupavky, šlachy, kosti, kardiovaskulární tkáni, jater a ledvin. Všechny tyto příklady využívají pro dosažení tohoto cíle právě ko-kultury SC a terminálně diferencovaných buněk (Paschos N. K. et al., 2014).

1.5 Hodnocení kultivace buněk na nanomateriálech

Hodnocení *in vitro* vytvořených tkání je nutno testovat. Jsou prováděny testy buněčné adheze, proliferace a diferenciace buněk, a testy na cytotoxicitu a hemokompatibilitu materiálu. K těmto testům se využívají především mikroskopy, a to jak optické (obr. 20), tak elektronové či fluorescenční, a to většinou za použití specifického barvení (imunofluorescence, imunohistochemie) (obr. 21). Dále se provádí nejrůznější metabolické testy a v posledních letech se využívá i molekulárně biologických metod. Výroba ortopedických materiálů je navíc obohacena o testy biomechanické. Mezi *in vivo* testy, které mohou následovat po implantaci a uchycení nové tkáně, patří histologie a imunohistologie (Guvendiren M. et al., 2017).



Obrázek 19: Mikroskopický obraz - hodnocení kompozitního nosiče osazeného chondrocyty (Dostupné z Amler E. et Koláčná L.).



Obrázek 20: Imunofluorescenční barvení proti kolagenu typu II (Dostupné z Amler E. et Koláčná L.).

2. ZÁVĚR

Tkáňové inženýrství je inovativní obor, který by v budoucnu mohl usnadnit, a dokonce i nahradit klasické transplantace tkání a vyhnout se tak problémům s nimi spojenými. Právě nedostatek vhodných transplantátů a špatná biokompatibilita s mnohými umělými implantáty posouvá vědu dál ve vývoji matic, pomocí kterých by mohly vznikat tkáně tělu vlastní. „Nanosféra“ otevřela velké okno mnoha vědním oborům od klasického inženýrství, přes výpočetní techniku až po medicínu, a umožňuje tak výrobu nespočtu materiálů se zcela jedinečnými vlastnostmi. Velkou skupinou nanomateriálů vhodných pro kultivaci buněk byly zvoleny částice na bázi uhlíku jako je grafen a jeho modifikace, nebo například nanodiamant. Grafen a uhlíkové nanotrubičky mají vynikající vodivost a také tvrdost a díky těmto vlastnostem mohou být používány pro tkáňové inženýrství s nervovou, srdeční a kostní tkání. Avšak u těchto materiálů bývají problémy s biokompatibilitou, proto je především nutná jejich správná funkcionalizace, která vede k omezení negativních vlastností. Nanodiamant má zase vynikající mechanické vlastnosti, které se využívají například v ortopedii. Vzhledem k tomu, že je jeho biokompatibilita na vysoké úrovni, představuje vysokou pravděpodobnost klinického užití. Dalšími zkoumanými materiály jsou nano-hydroxyapatit a kovové nanočástice, včetně zlatých, jež jsou pro svou tvrdost využívány hlavně v kostním inženýrství. Stejně tak mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého se využívají jak v inženýrství kostní, tak ale i svalové tkáně. Mnohé z těchto materiálů, a to především zlaté nanočástice a částice oxidu křemičitého, dokonce podporují buněčnou proliferaci a diferenciaci, což jsou velmi žádané účinky. Naopak většina materiálů má problémy s biokompatibilitou až toxicitou, a to jsou doposud největší problémy, které brání nanomateriálům v jejich plném využití. Prozkoumání a pochopení vlastností a funkcí kmenových buněk bylo v minulosti také zásadní věcí pro rozvoj medicíny a jejich nynější aplikace v kombinaci s vhodným nanomateriálem dává velkou naději, že by mohly v blízké době zcela změnit pohled na regenerativní medicínu a usnadnit tak život mnohým z nás.

3. POUŽITÁ LITERATURA

1. Alshehri R.; Ilyas A. M.; Hasan A.; Arnaout A.; et al.: Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, 59(18), str. 8149-8167.
2. Ambrosio A. M. A.; Sahota J. S.; Khan Y. K.; Laurencin C. T.: A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001, 58(3), str. 295-301.
3. Amler E.; Koláčná L.: Tkáňové inženýrství. In: [Www.nanoed.tul.cz](http://www.nanoed.tul.cz) [online]. 2012 [cit. 2019/6/12]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/1557/mod_resource/content/0/Tkáňové%20inženýrství.pdf
4. An J.; Teoh J. E. M.; Suntornnond R.: Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering*. 2015, 1(2), str. 261-268..
5. Aramwit P.; Motta A.; Kundu S. C.: Tissue Engineering: From Basic Sciences to Clinical Perspectives. *BioMed Research International*. 2017, 2017. str. 1-2.
6. Atta N. F.; Galal A.; El-Ads E. H.: Graphene — A Platform for Sensor and Biosensor Applications. *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*. InTech, 2015, 2015. ISBN 978-953-51-2173-2.
7. Aversa R.; Petrescu R. V. V.; Petrescu F. I. T.; Apicella A.: Nanodiamond for Structural Biomimetic Scaffolds. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*. 2018, 06(04), str. 6-17.
8. Balandin A. A.; Ghost S.; Bao W.; Calizo I.; et al.: Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene. *Nano Letters*. 2008, 8(3), str. 902-907.
9. Barnard A. S.: Direct Comparison of Kinetic and Thermodynamic Influences on Gold Nanomorphology. *Accounts of Chemical Research*. 2012, 45(10), str. 1688-1697.
10. Benglis D.; Wang M. Y.; Levi A. D.: A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Operative Neurosurgery*. 2008, 62(5), str. 423-431.

11. Bianco A.; Kostarelos K.; Partidos Ch. D.; Prato M.: Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical Communications*. 2005, (5), str. 571-577.
12. Böcking D.; Wiltschka O.; Niinimäki J.; Shokry H.; et al.: Mesoporous silica nanoparticle-based substrates for cell directed delivery of Notch signalling modulators to control myoblast differentiation. *Nanoscale*. 2014, 6(3), str. 1490-1498.
13. Bogunia-Kubik K.; Sugisaka M.: From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *Biosystems*. 2002, 65(2-3), str. 123-138.
14. Buzea C.; Pacheco I. I.; Robbie K.: Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007, 2(4), str. 17-71.
15. Catledge S. A.; Thomas V.; Vohra Y. K.: Nanostructured diamond coatings for orthopaedic applications. *Diamond-Based Materials for Biomedical Applications*. 2013, 2013, str. 105-150.
16. Danilenko V. V.: On the history of the discovery of nanodiamond synthesis. *Physics of the Solid State*. 2004, 46(4), str. 595–599.
17. Ding X.; Liu H.; Fan Y.: Graphene-Based Materials in Regenerative Medicine. *Advanced Healthcare Materials*. 2015, 4(10), str. 1451-1468.
18. Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Eklund, P. C.: *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes: Their Properties and Applications*; Academic Press: New York, NY, 1996. ISBN 9780122218200.
19. Dulak J.; Szade K.; Szade A.; Nowak W.; Józkowicz A.: Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*. 2015, 62(3), str. 329-337.
20. Emerich D. F.; Thanos Ch. G.: Nanotechnology and medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2003, 3(4), str. 655-663.
21. El-Say K. M.: Nanodiamond as a drug delivery system: Applications and prospective. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011, 1(6), str. 29-39.
22. Gao Q.; Zhu X.; Xiang J.; Lü Y.; Li J.: Strategies to choose scaffold materials for tissue engineering. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2016, 32(2), str. 172-84.

23. Geim A. K.: Graphene: status and prospects. *Science*. 2009, 324(5934), str. 1530-1534.
24. Geim A. K.; Novoselov K. S.: The rise of graphene. *Nature materials*. 2007, (6), str. 183-191.
25. Guvendiren M.; Fung S.; Kohn J.; De Maria C.: The control of stem cell morphology and differentiation using three-dimensional printed scaffold architecture. *MRS Communications*. 2017, 7(3), str. 383-390.
26. Hasan A.; Morshed M.; Memic A.; Hassan S.; Webster T.: Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. *International Journal of Nanomedicine*. 2018, 13, str. 5637-5655.
27. Hench L. L.: Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. 1998, 81(7), str. 1705-1728.
28. Heo D. N.; Ko W.-K.; Bae M. S.; Lee J. B.; et al.: Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle–hydrogel complex. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014, 2(11), str. 1584-1593.
29. Hodgson M. J.; Knutson Ch. C.; Momtahan N.; Cook A. D.: Extracellular Matrix from Whole Porcine Heart Decellularization for Cardiac Tissue Engineering. *Decellularized Scaffolds and Organogenesis*. 2018, 1577, str. 95-102.
30. Hu Y.; Cai K.; Luo Z.; Jandt K. D.: Layer-By-Layer Assembly of β -Estradiol Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles on Titanium Substrates and Its Implication for Bone Homeostasis. *Advanced Materials*. 2010, 22(37), str. 4146-4150.
31. Chang Y.; Yang S.-T.; Liu J.-H.; Dong E.; et al.: In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology Letters*. 2011, 200(3), str. 201-210.
32. Chakraborty A. S.; Roy T.; Mondal S.: Development of DNA Nanotechnology and Uses in Molecular Medicine and Biology. *Insights in Biomedicine* [online]. 2016, 1(2). str. 1.
33. Iakubovskii K.; Baidakova M. V.; Wouters B. H.; Stesmans A.; et al.: Structure and defects of detonation synthesis nanodiamond. *Diamond and Related Materials* [online]. 2000, 9(3-6), str. 861-865.
34. Jadhav S. A.: Incredible Pace of Research on Mesoporous Silica Nanoparticles. ResearchGate [online]. Piedmont, Italy Join institution:

- Università degli Studi di Torino Turin, 2014. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/266685132_Incredible_Pace_of_Research_on_Mesoporous_Silica_Nanoparticles
35. Jain K. K.: *The Handbook of Nanomedicine* [online]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2008. ISBN 978-1-60327-319-0.
 36. Jakus A. E.; Shah R. N.: Multi and mixed 3D-printing of graphene-hydroxyapatite hybrid materials for complex tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017, 105(1), str. 274-283.
 37. Jastrzebska A. M.; Kurtycz P.; Olszyna A. R.: Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012, 14(12), str. 2.
 38. Joddar B.; Garcia E.; Casas A.; Stewart C. M.: Development of functionalized multi-walled carbon-nanotube-based alginate hydrogels for enabling biomimetic technologies. *Scientific Reports*. 2016, 6(1), str. 1-2.
 39. Kalbacova M.; Broz A.; Kong J.; Kalbac M.: Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. *Carbon*. 2010, 48(15), str. 4323-4329.
 40. Karlický F.; Kumara Ramanatha Datta K.; Otyepka M.; Zbořil R.: Halogenated Graphenes: Rapidly Growing Family of Graphene Derivatives. *ACS Nano*. 2013, 7(8), str. 6434-6464.
 41. Kaur R.; Chitanda J. M.; Michel D.; Maley J.; et al.: Lysine-functionalized nanodiamonds: synthesis, physiochemical characterization, and nucleic acid binding studies. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, 7, str. 3851-3866.
 42. Kim H.-M.; Kim Y.; Park S.-J.; Rey C.; et al.: Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature. *Biomaterials*. 2000, 21(11), str. 1129-1134.
 43. Kim H.-W.; Song J.-H.; Kim H.-E.: Nanofiber Generation of Gelatin-Hydroxyapatite Biomimetics for Guided Tissue Regeneration. *Advanced Functional Materials*. 2005, 15(12), 1988-1994.
 44. Kuzmann A.; Andersson B.; Thurnherr T.; Krug H.; et al.: Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2011, 1810(3), str. 361-373.

45. Li X.; Huang X.; Liu D.; Wang X.; et al.: Synthesis of 3D Hierarchical Fe₃O₄/Graphene Composites with High Lithium Storage Capacity and for Controlled Drug Delivery. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2011, 115(44), str. 21567-21573.
46. Lin Z.; Fateh A.; Salem D. M.; Intini G.: Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *Journal of Dental Research*. 2013, 93(2), str.109-116.
47. Liu M.; Zeng X.; Ma Ch.; Yi H.: Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Research* [online]. 2017, 5. str. 1-2.
48. Liu H.-L.; Liu S.-J.; Xiao Z.-L.; Chen Q.-Y.; Yang D.-W.: Excess molar enthalpies of binary mixtures for (tributyl phosphate methanol/ethanol) at 298.15 K. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2006, 85(3), str. 541-544.
49. Liu Y.; Nancollas G. H.: Crystallization and Colloidal Stability of Calcium Phosphate Phases. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997, 101(18), str. 3464-3468.
50. Macchiarini P.; Jungebluth P.; Go T.; Asnaghi M. A.; et al.: Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet*. 2008, 372(9655), str. 2023-2030.
51. Makharza S.; Cirillo G.; Bachmatiuk A.; Vittorio O.; et al.: Size-dependent nanographene oxide as a platform for efficient carboplatin release. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013, 1(44), str. 6107–6114.
52. Martin I.; Wendt D.; Heberer M.: The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in biotechnology* [online]. 2004, 22(2), str. 80-86.
53. Mehra M.; Asadollahi M. A.; Ghaedi K.; Salehi H.; Arpanaei A.: Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, 79, str. 687-695.
54. Novoselov K. S.; Geim A. K.; Morozov S. V.; Jiang D.; et al.: Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science*. 2004, 306(5696), str. 666-669.
55. O'Brien F. J.: Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011, 14(3), str. 88-95. str. 88-95.

56. Padmanabhan J.; Kyriakides T. R.: Nanomaterials, Inflammation, and Tissue Engineering. Wiley Interdisciplinary Reviews: *Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2015, 7(3), str. 355-370.
57. Park S.; An J.; Jung I.; Piner R. D.; et al.: Colloidal Suspensions of Highly Reduced Graphene Oxide in a Wide Variety of Organic Solvents. *Nano Letters*. 2009, 9(4), str. 1593-1597.
58. Paschos N. K.; Brown W. E.; Eswaramoorthy R.; Hu J. C.; Athanasiou K. A.: Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014, 9(5), str. 488-503.
59. Paul A.; Hasan A.; Kindi H. A.; Gaharwar A. K.; et al.: Injectable Graphene Oxide/Hydrogel-Based Angiogenic Gene Delivery System for Vasculogenesis and Cardiac Repair. *ACS Nano*. 2014, 8(8), str. 8050-8062.
60. Ren M.; Han Z.; Li J.; Feng G.; Ouyang S.: Ascorbic acid delivered by mesoporous silica nanoparticles induces the differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Materials Science and Engineering: C*. 2015, 56, str. 348-355.
61. Rogers K.: Tissue engineering. Encyclopædia Britannica. *Encyclopædia Britannica* [online]. 2018 [cit. 2019-05-14]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/tissue-engineering>
62. Rosenholm J. M.; Zhang J.; Linden M.; Sahlgren C.: Mesoporous silica nanoparticles in tissue engineering – a perspective. *Nanomedicine*. 2016, 11(4), str. 391-402.
63. Sanchez V. C.; Jachak A.; Hurt R. H.; Kane A. B.: Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review. *Chemical Research in Toxicology*. 2012, 25(1), str. 15-34.
64. Scadden D. T.: The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006, 441(7097), str. 1075-1079.
65. Sinha N.; Yeow J. T. - W.: Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. 2005, 4(2), str. 180-195.
66. Shadjou N.; Hasanzadeh M.; Khalilzadeh B.: Graphene based scaffolds on bone tissue engineering. *Bioengineered*. 2017, 9(1), str. 38-47.

67. Sheehy D. E.; Schmalian J.: Optical transparency of graphene as determined by the fine-structure constant. *Physical Review B*. 2009, 80(19). str. 1-4.
68. Shin S. R.; Li Y.-Ch.; Jang H. L.; Khoshakhlagh P.; et al.: Graphene-based materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 105, str. 255-274.
69. Singh S.; Vardharajula S.; Tiwari P.; Dennis V.; et al.: Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, 7, str. 5361-5361.
70. Solanki A.; Kim J. D.; Lee K.-B.: Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging. *Nanomedicine*. 2008, 3(4), str. 567–578. str. 12.
71. Subbiah R.; Veerapandian M.; Yun K. S.: Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Current Medicinal Chemistry*. 2010, 17(36), str. 4559-4577.
72. Suchanek W.; Yoshimura M.: Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*. 1998, 13(1), str. 94-117.
73. Tasis D.; Tagmatarchis N., Bianco A.; Prato M.: Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chemical Reviews*. 2006, 106(3), str. 1105-1136.
74. Vacanti J. P.; Langer R.: Tissue engineering. *Science*. 1993, 260(5110), str. 920-926.
75. Verma S.; Domb A. J.; Kumar N.: Nanomaterials for regenerative medicine. *Nanomedicine*. 2001, 6(1), str. 157-181.
76. Walter K. When semiconductors go nano: At the nanoscale, silicon, germanium, and diamond take on unexpected characteristics. *Science & Technology* [online]. Lawrence Livermore National Laboratory, 2003 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://str.llnl.gov/str/November03/vanBuuren.html>
77. Wang X.; Low X. C.; Hou W.; Abdullah L. N.; et al.: Epirubicin-Adsorbed Nanodiamonds Kill Chemoresistant Hepatic Cancer Stem Cells. *ACS Nano*. 2014, 8(12), str. 12151-12166.
78. Watermann A.; Brieger J.: Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles in Cancer. *Nanomaterials*. 2017, 7(7), str. 189.

79. Whitlow J.; Pacelli S.; Paul A.: Multifunctional nanodiamonds in regenerative medicine: Recent advances and future directions. *Journal of Control Release*. 2017, 261, str. 62-86.
80. Wicki A.; Witzigmann D.; Balasubramanian V.; Huwyler J.: Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*. 2015, 200, str. 138-157.
81. Yeong W.-Y.; Chua Ch.-K.; Leong K.-F.; Chandrasekaran M.: Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology*. 2004, 22(12), str. 643-652.
82. Yu Y.; Alkhawaji A.; Ding Y.; Mei J.: Decellularized scaffolds in regenerative medicine. *Oncotarget*. 2016, 7(36), str. 58671-58683.
83. Yue H.; Wei W.; Yue Z.; Wang B.; et al.: The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials*. 2012, 33(16), str. 4013-4021.
84. Zakaria S. M.; Sharif Zein S. H.; Othman M. R.; Yang F.; Jansen J. A.: Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering: A Review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2013, 19(5), str. 431-441.
85. Zhang L.; Webster T. J.: Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*. 2009, 4(1), str. 66-80.
86. Zhang Y.; Ali S. F.; Dervishi E.; Xu Y.; et al.: Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells. *ACS Nano*. 2010, 4(6), str. 3181-3186.
87. Zhang X.-Q.; Chen M.; Lam R.; Xu X.; et al.: Polymer-Functionalized Nanodiamond Platforms as Vehicles for Gene Delivery. *ACS Nano*. 2009, 3(9), str. 2609-2616.
88. Zhao B.; Hu H.; Mandal S. K.; Haddon R. C.: A Bone Mimic Based on the Self-Assembly of Hydroxyapatite on Chemically Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes. *Chemistry of Materials*. 2005, 17(12), str. 3235-3241.
89. Zhou K.; Thouas G. A.; Bernard C. C.; Nisbet D. R.; et al: Method to Impart Electro- and Biofunctionality to Neural Scaffolds Using Graphene–

Polyelectrolyte Multilayers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012, 4(9), str. 4524-4531.

90. Zhu Y.; Li J.; Li W.; Zhang Y.; et al.: The Biocompatibility of Nanodiamonds and Their Application in Drug Delivery Systems. *Theranostics*. 2012, 2(3), str. 302-312.