

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

Využití nanomateriálů pro kultivaci kostních buněk

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Kateřina Mackurová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

The Use of Nanomaterials in Cultivation of Bone Cells

BACHELOR THESIS

Author: Kateřina Mackurová

Supervisor: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2019

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Mackurová**
Osobní číslo: **C16192**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Využití nanomateriálů pro kultivaci kostních 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 možnosti kultivací kostních buněk *in vitro*. V práci se nejprve zaměřte na popis různých typů kostních buněk a jejich fyziologických funkcí. Následně se detailněji zaměřte na osteocyty, osteoblasty a osteoklasty. Po uvedení morfologických vlastností těchto buněk a jejich funkcí uveďte také možnosti jejich kultivace *in vitro* včetně přehledu buněčných kultur, jež jsou od nich odvozeny. Hlavní zřetel při tom dejte na uvedení přehledu mikro- a nanomateriálů, na nichž je kultivace kostních buněk v laboratořích testována.
- 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 Mackurová

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za vybrání tématu, odborné vedení, trpělivost, metodickou pomoc a poskytnutí užitečných rad pro napsání bakalářské práce.

Souhrn

Tato bakalářská práce je zaměřena na nanomateriály vhodné pro kostní buňky. První část práce se týká popisu kostních buněk, co se týče jejich stavby, procesu diferenciaci a jejich funkci v těle. Druhá část obsahuje vztah mezi buňkami a materiálem. Třetí část je zaměřena na materiály vhodné pro kultivaci těchto buněk, jak *in vitro*, tak *in vivo*. Zaměřuje se na popis vlastností samostatného materiálu a také na kombinace dvou odlišných materiálů.

Klíčová slova: kostní buňky, nanomateriály, tkáňové inženýrství, proliferace

Summary

This bachelor thesis focuses on nanomaterials suitable for cultivation of bone cells. The first part of the thesis deals with the description of bone cells in terms of their structure, the process of differentiation and their function in the body. The second part comprises the relationship between cells and material. The third part focuses on materials suitable for cultivation of these cells, both *in vitro* and *in vivo*. It focuses on the description of the characteristics of a separate material as well as on the combinations of two or more different materials, which, when combined, become more advantageous for tissue engineering.

Keywords: *bone cells, nanomaterials, tissue engineering, proliferation*

Obsah

| | |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Úvod | 12 |
| 2. Teoretická část | 13 |
| 2.1 Kostní buňky | 13 |
| 2.1.1 Osteoblasty..... | 13 |
| 2.1.2 Osteoklasty..... | 14 |
| 2.1.3 Osteocyty | 16 |
| 2.2 Nanomateriály | 17 |
| 2.2.1 Adheze buněk | 18 |
| 2.2.2 Vlastnosti povrchu | 19 |
| 2.2.3 Buněčná opora – scaffold | 20 |
| 2.3 Kostní náhrady využívané pro buněčnou regeneraci | 21 |
| 2.3.1 Polymery | 22 |
| 2.3.1.1 Kolagen..... | 23 |
| 2.3.1.2 Chitosan | 24 |
| 2.3.1.3 Polykaprolakton | 25 |
| 2.3.1.4 Hedvábný fibroin (SF-silk fibroin) | 26 |
| 2.3.1.5 Kyselina polyglykolová | 27 |
| 2.3.1.6 Kyselina polymléčná..... | 27 |
| 2.3.1.7 Kyselina polymléčno-ko-glykolová..... | 29 |
| 2.3.2 Keramika..... | 30 |
| 2.3.2.1 Fosforečnan vápenatý | 31 |
| 2.3.2.2 Hydroxyapatit | 31 |
| 2.3.2.3 Bioaktivní sklo | 33 |
| 2.3.3 Kovy..... | 33 |
| 2.3.3.1 Titan | 33 |
| 2.3.3.2 Zinek | 35 |
| 3. Závěr | 37 |
| 4. Seznam použité literatury | 38 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|-----|---------------------------------------------------------------|
| ALP | alkalická fosfatáza (<i>alkaline phosphatase</i>) |
| COL | kolagen (<i>colagen</i>) |
| CTS | chitosan |
| HAP | hydroxyapatit |
| MSC | mesenchymální kmenové buňky (<i>mesenchymal stem cells</i>) |
| PCL | polykaprolakton (<i>polycaprolaktone</i>) |
| PGA | polykyselina glykolová |
| PLA | polykyselina mléčná |
| SF | hedvábný fibroin (<i>silk fibroin</i>) |
| TCP | fosforečnan vápenatý (<i>tricalcium phosphate</i>) |

Seznam obrázků

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 1: Volné osteoblasty bez využití nanomateriálu..... | 14 |
| Obrázek 2: Osteoklasty | 15 |
| Obrázek 3: Diferenciace osteoblastu a osteoklastu. | 16 |
| Obrázek 4: Proces tkáňového inženýrství. | 18 |
| Obrázek 5: Adheze buněk na materiál | 19 |
| Obrázek 6: Scaffold s nanovláčnou matricí | 21 |
| Obrázek 7: Imunofluorescenčně obarvené iPSC-MSC..... | 24 |
| Obrázek 8: PCL scaffold. | 25 |
| Obrázek 9: SF s deponitním materiálem | 27 |
| Obrázek 10: PLLA scaffold | 29 |
| Obrázek 11: Srovnání COL, HAP a kompozitního kolagenu | 32 |
| Obrázek 12: Povrch titanu po alkalickém a tepelném zpracování | 34 |
| Obrázek 13: Osteoblasty na TiO ₂ | 35 |
| Obrázek 14: Buněčná adheze MSC na čistém Ti, Zn, Ag a Zn/Ag | 36 |

Seznam tabulek

| | |
|-----------------------------------------------------------|----|
| Tabulka 1: Rozdělení kostních náhrad podle materiálu..... | 22 |
|-----------------------------------------------------------|----|

1. Úvod

Kost je základní tkání lidského těla. Hlavní funkcí je podpora a ochrana ostatních orgánů. Hraje důležitou roli v pohybu, ale také při tvorbě krevních buněk. Kosti tvoří dva hlavní typy kostní tkáně: 1) hutná kostní tkáň, jejíž základní stavební jednotkou jsou osteony, které tvoří tzv. Haversův systém, a 2) houbovitá kostní tkáň, která vytváří architektoniku kostí. Buňky, které tvoří kostní tkáň, jsou osteoblasty, osteoklasty a osteocyty. Osteoblasty zajišťují tvorbu kostní hmoty, osteoklasty naopak odbourávají kostní hmotu a osteocyty jsou buňky, ze kterých je kostní tkáň tvořena. Osteocyty se vytvářejí z osteoblastové linie. Při defektech či onemocněních kostí se na řadu dostává tkáňové inženýrství, které se snaží pomocí různých materiálů kost nahradit. Cílem tkáňového inženýrství je nahradit tradiční implantáty, což by eliminovalo pacienta podrobit druhé operaci a vyhnout se problémům s infekcí organismu. Základem tohoto oboru je trojrozměrný porézní materiál nazývaný scaffold. Scaffold v podstatě funguje jako templát pro tvorbu tkání, a měl by splňovat biokompatibilitu, biodegradaci, mechanickou pevnost a poréznost struktury s propojenou sítí. U scaffoldu se bere v potaz také jeho složení, tvar a schopnost podporovat množení buněk. Významným kritériem je také reakce hostitele na daný materiál. Tuto reakci je vhodné hodnotit až po 2 až 10 letech po implantaci do těla.

2. Teoretická část

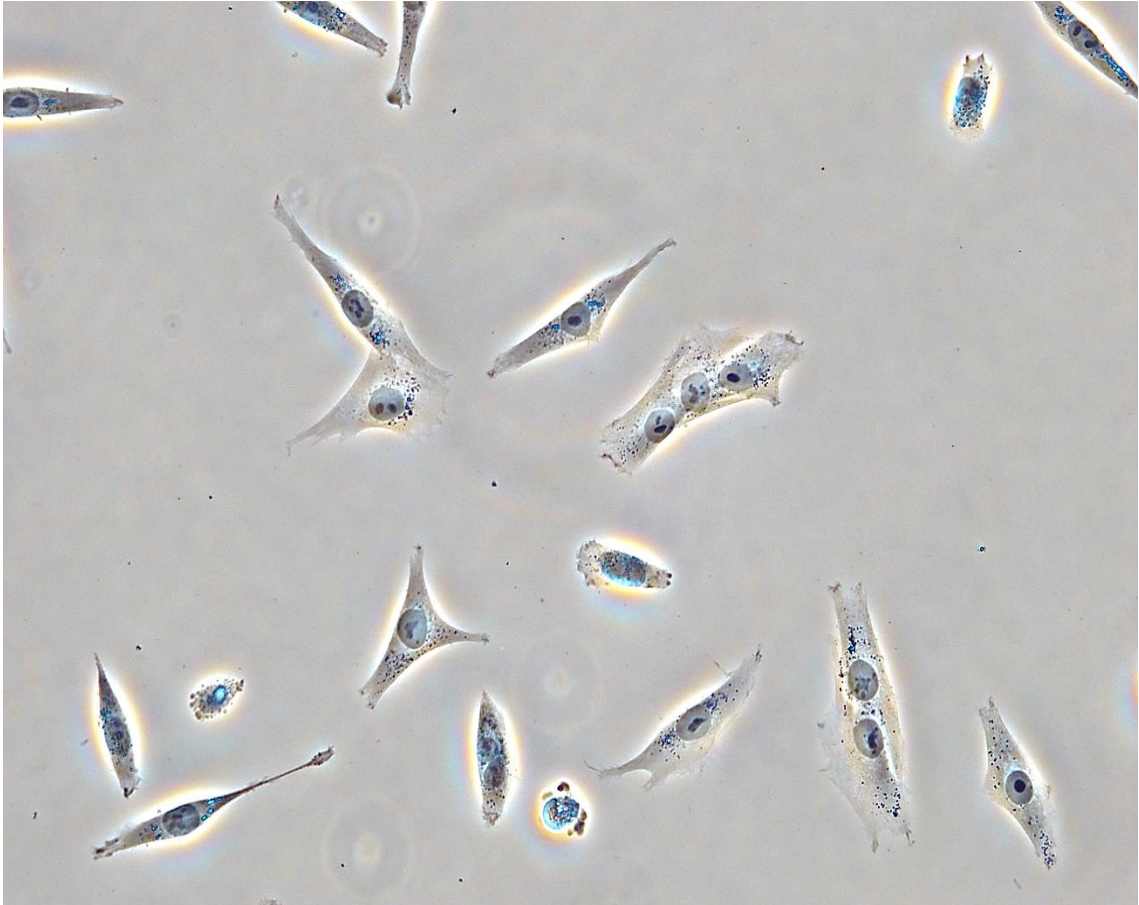
2.1 Kostní buňky

Existují tři typy diferencovaných kostních buněk: osteoblasty, osteocyty a osteoklasty. Osteoblasty a osteoklasty, které mají odlišný původ a funkci, jsou rozhodující pro remodelaci kostí (Marquis M. E. et al., 2009).

2.1.1 Osteoblasty

Osteoblasty jsou specializované, kulaté, jednojaderné fibroblastové buňky. Vyuvíjejí se z preosteoblastů, které se diferencují z mesenchymálních kmenových buněk (MSC) v kostní dřeni a periostu (Kushwaha P., Wolfgang M.J., Riddle R.C., 2018). Mají výrazný Golgiho aparát a dosahují velikosti 20-30 μm . Důkaz MSC jako prekurzorů osteoblastů je založen na schopnosti kosti regenerovat se jak *in vivo*, tak i *in vitro* pomocí buněčných populací. Osteogenní diferenciaci *in vitro* vyžaduje přítomnost růstových faktorů, jako je například glycerofosfát a kyselina askorbová. Důležitou součástí je také dexametazon, patřící do skupiny glukokortikoidů. V poslední transformaci na osteoblasty je nutná regulace pomocí transkripčních faktorů, jako je Runx5 (také nazývaný jako Cbfa-1) a Osterix. Během osteogeneze se mění repertoár kadherinů, což jsou membránové glykoproteiny, které zprostředkovávají Ca^{2+} dependentní buněčnou adhezi (Marquis M.E. et al., 2009). V aktivní formě mají osteoblasty tvar kvádru a nacházejí se na kostním povrchu, kde dochází k aktivní tvorbě kostí. Osteoblasty se neobjevují ani nepůsobí samostatně, ale vždy v klastrech podél kostních povrchů. Jsou to specializované buňky, jejichž primární úlohou je syntetizovat kostní komponenty, které tvoří extracelulární matici kosti (Favus M.J., 2010). Patří mezi ně strukturní makromolekuly, jako je kolagen (COL) typu I, který tvoří asi 90 % organické matrice, stejně jako řada proteoglykanů, proteinů, které netvoří kolagenní a buněčné vazby. Osteoblasty také podporují mineralizaci organické matrice matricovými vezikuly, které obsahují alkalickou fosfatázu (ALP), ATP-ázu a anorganickou pyrofosfatázu. Po skončení přestavby kosti se některé osteoblasty mění v buňky lemující kost, některé z nich jsou usmrceny pomocí apoptózy, řada z nich se po obklopení mezibuněčné hmoty stává osteocyty (Mohamed A.M., 2008). Jejich úkolem je také udržování kostního anabolismu. Tato funkce je ovlivněna inzulínem, jehož sekrece je regulována osteoblasty (Clemens T.L., Karsenty G., 2011). Osteoblasty nejsou tradičně považovány za součást

imunitního systému, nicméně bylo zjištěno, že jsou tyto buňky schopny navodit imunitní reakci pomocí cytokinů a chemokinů při zánětu způsobeného bakterií *Staphylococcus aureus* (Bost K.L. et al., 1999).

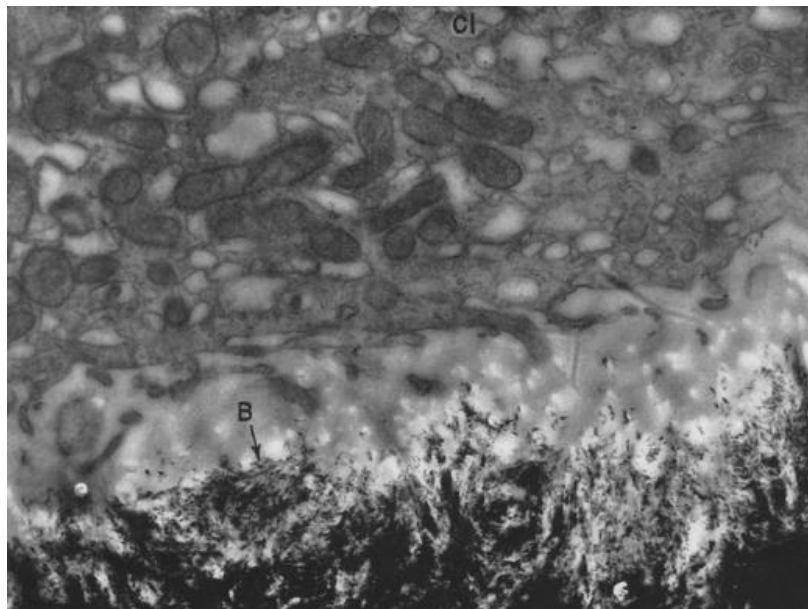


Obrázek 1: Volné osteoblasty bez využití nanomateriálu, foceně ve fázovém kontrastu pod zvětšením 200x.

2.1.2 Osteoklasty

Osteoklasty jsou gigantické, pohyblivé, mnohojaderné fagocytující buňky, odvozené od hematopoetických prekurzorů z linie makrofágových monocytů (Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L., 2003). Migrují z kostní dřeně do určitého místa skeletu. Mohou se spojit buď s existujícími mnohojadernými osteoklasty, nebo se spojí navzájem, aby vytvořily *de novo* mnohojaderné osteoklasty. Poslední možností jejich výskytu v organismu je, že zůstávají jako mononukleární buňky. Kostní mikroprostředí hraje důležitou roli při tvorbě a funkci osteoklastů. Je závislé na lokálních signálech z jiných buněk a růstových faktorech v kostní matrici. Příkladem takovýchto růstových

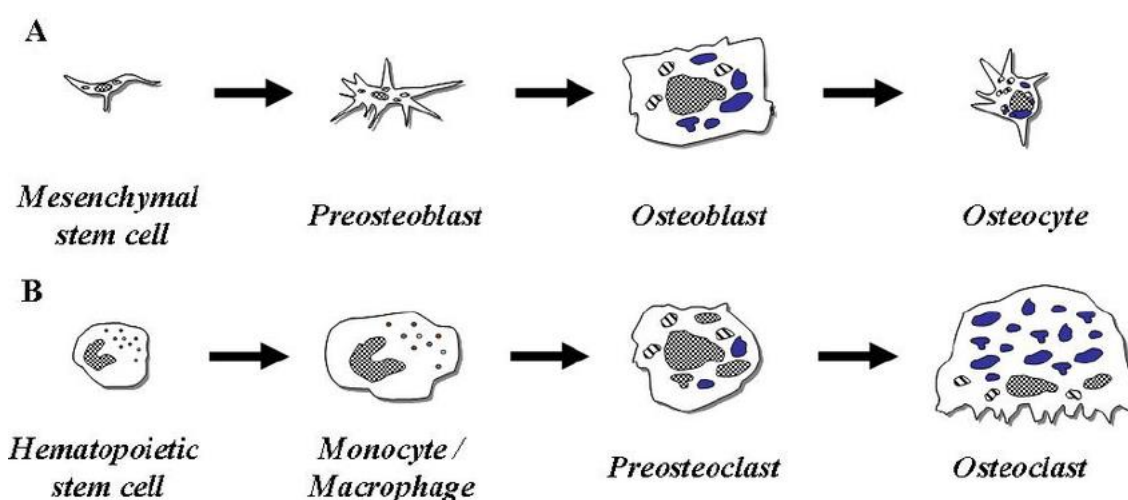
faktorů jsou například cytokiny. Ty ovlivňují jak funkci osteoblastů, tak i osteoklastů, což znamená, že jsou funkčně úzce propojené. Osteoklasty obsahují kyselou fosfatázu, a tím okyselují extracelulární kompartment. V prostředí o nízkém pH se rozpouštějí krystaly hydroxyapatitu, a v důsledku toho se odkrývá matrix. Osteoklasty jsou vysoce specializované buňky, které jsou schopné degradovat mineralizované tkáně, podílejí se na resorpci kostí, která přispívá k jejich remodelaci. Osteoklasty se také podílejí na dlouhodobém udržování homeostázy vápníku v krvi. Udržování homeostázy je regulováno hormonálně pomocí parathormonu, kalcitoninu, vitamínem D, nebo pomocí cytokinů (Clarke B., 2008). Osteoklastogeneze, ať už normální nebo patologická, je závislá na podpoře pomocných buněk, které exprimují cytokiny, potřebné pro diferenciaci osteoklastů. Jeden z nich je nezbytný pro formování osteoklastu v průběhu života. Jedná se o receptorový aktivátor NFκB ligand, jinak známý jako RANKL. Ten je sekretován všemi typy buněk. RANKL náleží k rodině tumor nekrotizující faktor. Má tři izoformy, a to RANKL1, RANKL2 a RANKL3-solubilní. Parathormon a glukokortikoidy podporují produkci RANKL (O'Brien C.A., 2010). Když osteoklast dokončí svůj resorpční cyklus, vylučuje proteiny, které slouží jako substrát pro připojení osteoblastů (Mohamed A.M., 2008).



Obrázek 2: Osteoklasty – Cl představuje volný osteoklast, v jehož blízkosti jsou pozorovatelné další osteoklasty, v některých jsou také pozorovatelná jádra, B (bone) je označení pro kost, světlé zóny představují vakuoly (Dudley H.R., Spiro D., 1961).

2.1.3 Osteocyty

Osteocyty jsou tvořeny z osteoblastů, tzn., že jsou původem z buněk osteoblastové linie, kdy z MSC vzniká preosteoblast, z něj osteoblast, ze kterého se vyvíjí osteocyt. Díky jejich dlouhé délce života a akumulaci v kostech představují nejhojnější skupinu buněk a několikrát převyšují množství ostatních kostních buněk. Délka života se odhaduje na 10-20 let a jejich počet na 19000-28000 buněk/mm³ (Riddle R.C., Clemens T.L., 2017). V osteocytu se nachází jedno jádro, na jehož membráně se vyskytují jaderné póry, anebo jedno či dvě jádérka. Jejich součástí je taktéž granulární endoplazmatické retikulum (Dudley H.R. et al., 1961). Tyto buňky jsou morfologicky i funkčně jedinečné. Obsahují metabolicky aktivní složky skeletu. Osteocyty exprimují několik matricových proteinů, které podporují intercelulární adhezi a regulují výměnu minerálů. Osteocyty jsou aktivní během osteolýzy a mohou fungovat jako fagocytující buňky, jelikož obsahují lysozomy. Většina studií naznačuje, že osteocyt má funkci senzorické buňky a je také hlavním zdrojem fosfát regulujícího hormonu FGF23, což je fibroblastový růstový faktor, který je syntetizovaný v kostech, a zároveň působí v ledvinách. Dále je zdrojem sklerostinu, což je antagonist Wnt. Wnt je důležitá signalizační kaskáda. Díky tomu je u osteocytů předpoklad, že mohou mít endokrinní funkci (Riddle R.C., Clemens T.L., 2017). Přítomnost prázdných mezer v kosti staršího člověka nasvědčuje tomu, že jsou tyto buňky schopny apoptózy či autofágie (Clarke B., 2008). Apoptóza osteocytů se uskutečňuje například při léčbě glukokortikoidy nebo při snížené hladině estrogenu (Bonewald L.F., 2011).



Obrázek 3: Diferenciace osteoblastu a osteoklastu – (A) Diferenciace osteoblastu z mesenchymálních buněk, který se dále vyvíjí v osteocyt, (B) Stádiový vývoj osteoklastu z hematopoietické kmenové buňky (Marquis M.E. et al., 2009).

2.2 Nanomateriály

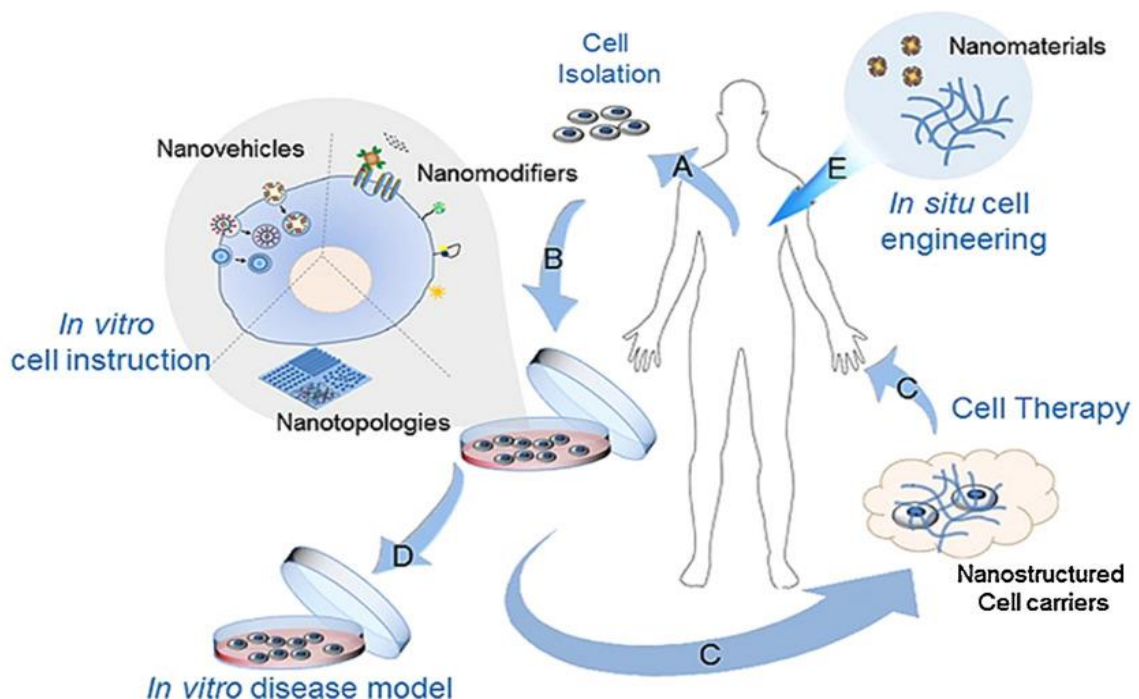
Nanomateriály jsou definované tak, že mají minimálně jeden ze svých rozměrů menší než 100 nm. Vykazují jedinečné fyzikální a chemické vlastnosti, které se liší od běžných materiálů. Ve srovnání s materiály o velikosti mikrometrů disponují například lepšími funkcemi v přesnějším napodobení struktury kosti. Avšak problémem se může jevit fakt, že nanočástice by mohly působit vyšší toxicitu než mikronové částice. Důvodem vzniku nanotoxicity je produkce reaktivních kyslíkových radikálů. Tyto chemické interakce mohou indukovat apoptózu *in vitro* vznikem kyslíkových radikálů, jejich akumulací a vyčerpáním antioxidantů. Avšak údaje, které se projevily *in vitro*, se nemusí projevit *in vivo* (Wang Q. et al., 2016). V posledních letech vývoj anorganických a organických nanomateriálů vedl také k novým strategiím poskytování léků pomocí materiálu pro léčbu chorob kostí (Cheng H. et al., 2017).

Některé zlomeniny kostí a nestabilní kostní struktury jsou v současné době léčeny kostními štěpy nebo kostními materiály (Marquis M.E. et al., 2009). Materiály používané k opravě zlomenin kostí zahrnují autoštěpy, aloštěpy, xenoštěpy a syntetické kostní materiály. Některé kostní vady mohou využívat tyto materiály pouze jako nosiče. Za takzvaný „zlatý standard“ materiálu pro opravu kostí je považován autoštěp, který splňuje všechny nezbytné vlastnosti vyžadované při regeneraci kosti z hlediska osteokondukce, osteoindukce a osteogeneze (Wang W., Yeung K.W.K., 2017). Avšak autoštěp může způsobit nové komplikace nebo traumata. Implantace aloštěpů a xenoštěpů může být náchylná pro vyvolání imunitní reakce, kdy může dojít k odmítnutí tkáně (Wang Q. et al., 2016). Aby se předešlo těmto nepříjemnostem, začaly se používat syntetické kostní štěpy, což znamená vytvoření scaffoldu, který může dočasně stimulovat a podporovat regeneraci kostí (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018).

Po vývoji se materiály určené pro biomedicínské účely rozdělily do třech odlišných generací. První generace byla tvořena ze snadno dostupných materiálů. Hlavním předpokladem materiálů první generace je, aby byly bioinertní, a to proto, aby se snížila jejich koroze. Dále pak vykazují minimální nebo žádnou interakci s hostitelskou tkání. Druhá generace je definována vývojem schopností bioaktivních materiálů interagovat s prostředím a schopností degradovat, zatímco se nová tkáň regeneruje. Třetí generace představuje nejnovější pokrok v materiálech, ty jsou totiž schopné stimulovat specifické buněčné odpovědi na molekulární úrovni (Navarro M., Michiardi A., Castano O., Planell J.A., 2008). Dle Williamse (Williams D.F., 2009)

existuje rozdělení podle vazby, kdy rozlišujeme tři skupiny. Kovové, které jsou založené na kovové vazbě, keramické, založené na iontových vazbách, a polymerní, založené na kovalentních vazbách. Kromě toho pak existují hybridy, které jsou zcela syntetické nebo kompozity, což je obvykle kombinace keramiky, polymeru nebo přírodního materiálu (Williams D.F., 2009).

I přesto žádná z uvedených generací nepředstavuje předpoklad pro vznik ideálního materiálu. Ideální materiál, který by splňoval všechny níže uvedené požadavky, neexistuje. Obecně, aby se materiály přiblížily k ideálnímu materiálu, měly by splňovat určité vlastnosti jako jsou: atoxicity, biologická degradace, plasticita, osteokonduktivita, sterilizovatelnost a možnost zpracovatelnosti do 3D struktury, která napodobuje strukturu kostí (Wang Q. et al., 2016).



Obrázek 4: Proces tkáňového inženýrství – (A) izolace cílových buněk z heterogenní populace (B) spojení *in vitro* s nanomateriály (C) přenesení buněk do cílových tkání pro regenerační terapii (D) buňky použité na *in vitro* modelování patologických onemocnění a pro screening léků (E) buněčné inženýrství *in situ* (Wang Q. et al., 2016).

2.2.1 Adheze buněk

Během regenerace kostí kostní buňky, jako jsou MSC, úzce spolupracují, aby zajistily úspěšnou regeneraci tkáně (Tautzenberger A., Kovtun A., Ignatius A., 2012). Interakce mezi buňkami a materiály hraje také klíčovou roli v celistvosti a opravě tkání.

Ovlivňují přežití buněk, proliferaci, diferenciaci a migraci. Integriny jsou hlavními buněčnými receptory, které se účastní adheze buněk k biomateriálům. Buněčné povrchové integriny interagují s biomateriály přes extracelulární ligandy, což mohou být proteiny adsorbované ze séra nebo extracelulární proteiny sekretované buňkami. Tyto interakce mohou také zahrnovat adhezni peptidy z povrchu materiálu. Kostní extracelulární proteiny nejsou pouze strukturální proteiny, regulují také fyziologický stav buněk a jejich okolí (Marquis M.E. et al., 2009). Chování adsorpčních proteinů je závislé na různých vlastnostech daného povrchu, jako je chemické složení, elektrostatický náboj, topografie, smáčivost a povrchovému napětí. Tyto vlastnosti dále určují množství adsorbovaných proteinů, typ a také jejich konformaci (Coutinho D. et al., 2011).



Obrázek 5: Adheze buněk na materiál – zjednodušené schéma po sobě jdoucích událostí, které se odehrávají na biomateriálu po implantaci. Samotná adsorpce proteinů na povrchu materiálu z okolního prostředí je poměrně složitý proces (Coutinho D. et al., 2011).

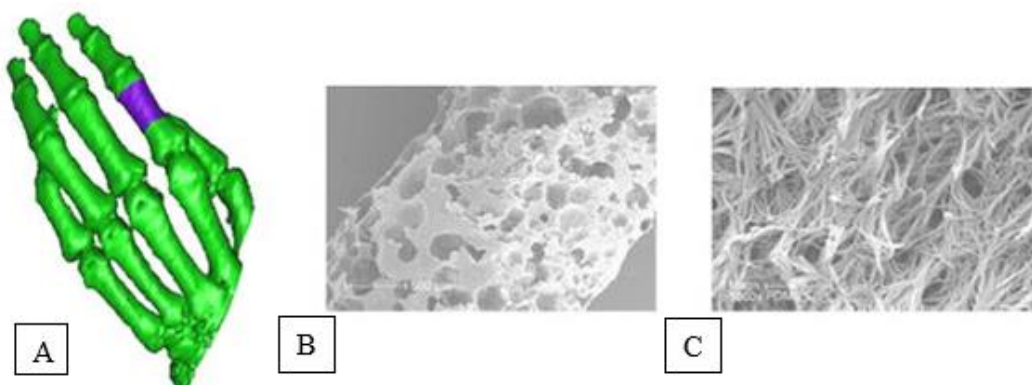
2.2.2 Vlastnosti povrchu

Děje vedoucí k integraci biomateriálů na kost probíhají primárně na bázi kostního rozhraní. Tyto události vyžadují počáteční adhezi buněk a jejich rozšíření po povrchu přes extracelulární proteiny. Přílnavost buněk k biomateriálu a jejich následné chování závisí na vlastnostech povrchu biomateriálu, jako je topografie, smáčivost, náboj, chemická a povrchová energie. To vše ovlivňuje konformaci, orientaci a množství adhezních bílkovin. Adhezní bílkoviny jsou například vitronektin nebo fibronektin, které jsou adsorbovány, a tím zprostředkovávají interakce mezi buňkami a implantovaným materiálem (Marquis M.E. et al., 2009).

2.2.3 Buněčná opora – scaffold

Potencionální alternativou k transplantaci orgánů je tkáňové inženýrství, kdy základním kamenem úspěchu jsou dva prvky, a to buňky a scaffold. Vytváří se za účelem 3D struktury s určitým tvarem, velikostí, architekturou a fyzikálními vlastnostmi. Scaffold poskytuje vhodné prostředí intercelulárního kontaktu (Zhao Ch. et al., 2013). Tento scaffold v podstatě funguje jako templát pro tvorbu tkání. Buněčné struktury jsou buď kultivovány *in vitro*, aby nasyntetizovaly tkáň, která je dále implantována do poraněného místa anebo jsou implantovány přímo do poraněného místa, kde dochází *in vivo* k regeneraci tkáně (O'Brien F.J., 2011). Scaffold musí být biokompatibilní, biologicky odbouratelné a bioabsorbovatelné, tzn., že se degraduje stejnou rychlostí, jako se nová kost tvoří. Vlivem prostředí a časem se stav scaffoldu zhoršuje, a tím ztrácí svou mechanickou pevnost. Avšak pokud je tato degradace řízená, dochází k postupnému přemísťování mechanických vlastností ze scaffoldu na nově vytvořenou kostní tkáň. Dalším požadavkem je degradace pouze na tělu netoxické produkty, které organismus snadno absorbuje nebo vylučuje (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018). V některých případech buňky a scaffold spolupracují s faktory indukující diferenciaci. Mezi tyto faktory patří například růstové faktory a chemické induktory. Mezi nejsilnější růstové faktory patří kostní morfologické proteiny (BMP), jako jsou BMP-2 a BMP-7, které řídí osteogenezi kmenových buněk. Chemické látky se často používají při diferenciaci *in vitro*, patří sem například dexamethazon, kyselina askorbová a β -merkapt ethanol. Vzhledem k tomu, že kostní matrice je převážně složena z COL a hydroxyapatitu (HAP), tak se v kostním inženýrství napodobuje tato struktura pro vznik a vývoj scaffoldu. Nevýhodou COL je špatná strukturální stabilita a nano-HAP je velmi křehký. Pro celkovou stabilizaci scaffoldu je výhodné přidat biologicky odbouratelný polymer (Zhao Ch. et al., 2013). 3D scaffold hraje důležitou roli při manipulaci s funkcemi osteoblastů a při tvorbě nové kosti. Materiály buněčné opory by měly být osteokonduktivní, aby osteoprogenitorové buňky mohly přilnout a migrovat na scaffoldu, diferencovat se a vytvořit novou kost (Wei G. et al., 2004). 3D modely tkání lépe reprezentují prostorovou a chemickou složitost živé tkáně než jejich 2D protějšky (Jang J. et al., 2018). 2D a 3D systémy se liší hlavně v typu buněčné adheze a buněčné polarizaci. Tvorba a studium kostí tkáně v 3D polymerových strukturách dostaly značné množství pozornosti v posledních letech. Jedna velká nevýhoda těchto struktur se týká omezené přepravy živin, O_2 a odstranění nežádoucích látek. V důsledku toho buňky

kolonizují pouze povrch struktur, protože v hlubších lokalitách se stávají nekrotickými. Ideální 3D kostní štěp je proto ten, který má vysoký poměr povrchu k objemu, díky umožnění připojení buněk a látkovou výměnu, a to nejen difuzí. Tento scaffold by také měl fungovat jako struktura, na které mohou buňky proliferovat a diferencovat se (Marquis M.E. et al., 2009). Důležitou roli při určování mechanických vlastností scaffoldu je porézita a velikost pórů. Poréznost napomáhá migraci a proliferaci buněk, což dále ovlivňuje přenos živin do struktur. Zvýšená pórovitost scaffoldu má několik výhod, avšak ohrožuje pevnost scaffoldu, což vede ke snížení mechanických vlastností. Průměrná pórovitost se pohybuje v rozmezí od 50 % do 90 % (Prasadh S., Wong R.Ch.W., 2018).



Obrázek 6: Scaffold s nanovláčennou maticí – (A) Obraz kosti ženské levé ruky (fialová barva označuje vadnou část), (B) SEM obrazy vnějšího povrchu a průřezu scaffoldu při malém zvětšení, (C) Obrázek SEM (skenovací elektronová mikroskopie) scaffoldu, který ukazuje strukturu nanovláčenné matrice pozorovanou při vysokém zvětšení (Wang P., Hu J., Ma P.X., 2009).

2.3 Kostní náhrady využívané pro buněčnou regeneraci

Materiály určené pro opravu kostí mohou být rozděleny do dvou skupin, a to na biologicky inertní a biologicky rozložitelné. Bio-inertní jsou většinou implantáty, které zůstávají v těle do chirurgického odstranění, proto hlavním cílem výzkumu je rozvoj biologicky rozložitelných materiálů, které nevyžadují druhou chirurgickou akci pro odstranění materiálu (Sheikh Z. et al., 2015). V tkáňovém inženýrství by měl být ideální scaffold osteokonduktivní, osteoinduktivní a osteogenní. Pokud jsou tyto podmínky splněny, jedná se o tzv. biomimetický materiál, který je přítomný v nativní kosti (např. HAP a COL) (Gong T. et al., 2015). Cílem těchto materiálů je zlepšení spojitosti mezi biomateriálem a buňkami, které napodobují úlohu extracelulárních proteinů. Proteiny jako fibronectin, osteopontin, vitronektin, laminin a kolagen jsou

všechny použity k výrobě funkčních biomateriálů. Tyto proteiny jsou však extrahovány z jiných než lidských druhů, což zvyšuje riziko nežádoucích imunitních odpovědí a infekcí. Biomimetická strategie se zaměřuje na použití krátkých bioadhezivních oligopeptidů na neznečištěných površích. Hlavním problémem s náhradami kostí jsou jejich mechanické vlastnosti, jako jsou modul pružnosti, únava materiálu či permeabilita (Marquis M.E. et al., 2009).

Tabulka 1: Rozdělení kostních náhrad podle materiálu

| Polymery | Přírodní | Syntetické |
|-----------------|----------------------|----------------------------|
| | kolagen | kys. polyglyková |
| | poly kaprolakton | kys. polymléčná |
| | chitosan | kys. polymléčno-ko-glyková |
| | hedvábný fibroin | |
| Keramika | fosforečnan vápenatý | |
| | hydroxyapatit | |
| | bioaktivní sklo | |
| Kovy | titan | |
| | zinek | |

2.3.1 Polymery

Na základě jejich původu mohou být polymery klasifikovány jako přírodní nebo syntetické. Polymery splňují odbouratelnost a biokompatibilitu, avšak žádný polymerní materiál nemůže dosáhnout mechanických vlastností podobných kostem. Z toho důvodu byly vytvořeny polymerní nanokompozity, které se skládají z keramických či kovových nanočástic, a ty jsou rozptýleny v polymerní matici (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018).

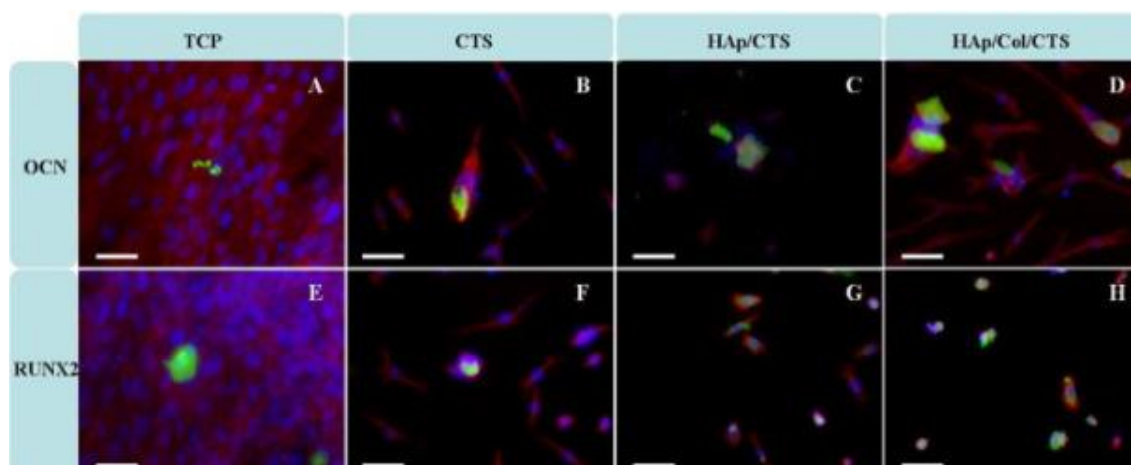
Přírodní polymery jsou tvořeny polysacharidy (kyselina hyaluronová, alginát, škrob, chitosan) nebo proteiny (COL, fibrin). Vykazují dobrou buněčnou adhezi a růst, jsou biologicky rozložitelné a umožňují tak nahrazení degradovaného skeletu (O'Brien F.J., 2011). Tyto polymery mají osteokonduktivní vlastnosti, ale nevýhodou jsou špatné mechanické vlastnosti a špatná zpracovatelnost (Marquis M.E. et al., 2009). Mohou být použity spolu se syntetickými polymery k překonání jejich nevýhod. Syntetické polymery mohou zlepšit rychlost degradace a mechanické vlastnosti (Kenar H. et al., 2019).

Syntetické, biologicky odbouratelné polymery, zejména polyestery, jako je kyselina polymlečná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a jejich kopolymery (PLGA), jsou široce používány k rozvoji porézního 3D scaffold. Tyto syntetické materiály vykazují vysokou míru biokompatibility (Wei G. et al., 2004). Jsou široce studovány, jelikož jsou snadněji zpracovatelné a oproti keramice a kovům a mají vyšší mechanickou odolnost než přírodní polymery. Při použití těchto materiálů je možné lépe kontrolovat konečné vlastnosti scaffoldu, jako je stupeň krystalinity či molární hmotnost (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018). Dále syntetické materiály zahrnují polyethylenglykol, poloxamer, polyalfa-hydroxykyseliny, polyortoester, polyanhydrid, polyfosfazen a polyfosfonát. Chování buněk vzniklých pomocí odbourávání polymerů závisí také na jejich chemickém složení, molekulové hmotnosti a možnosti krystalizovat. Degradace polymeru může vést k uvolňování produktů, jako jsou katalyzátory, aditiva, vedlejší produkty a zbytkové monomery, které mohou vyvolat zánětlivé reakce a ovlivnit adhezi, přežití a proliferaci buněk (Marquis M.E. et al., 2009). Kromě toho existují obavy o proces degradace PLLA a PGA, jelikož se degradují na oxid uhličitý, čímž se snižuje pH v těle, což může mít za následek nekrózu buněk a tkání (O'Brien F.J., 2011). Pro překonání nevýhod mohou být syntetické polymery kombinovány s jinými kopolymery pro zlepšení vlastností určitého materiálu (Prasadh S., Wong R.Ch.W., 2018).

2.3.1.1 Kolagen

COL je nejhojnější protein v lidském těle a je hlavní složkou kostí a kožních tkání (Sheikh Z. et al., 2015). V tkáňovém inženýrství je jedním z nejpoužívanějších přírodních polymerů (Kenar H. et al., 2019). Je biokompatibilní, biologicky odbouratelný a osteokonduktivní (Sheikh Z. et al., 2015). Vysoká pevnost v tahu umožňuje, aby byl zpracován do různých forem, jako jsou trubky, desky, pěny, prášky, roztoky nebo nanovláknité matrice. Ostatní vlastnosti mu však nedovolují, aby byl použit sám pro regeneraci kostí (Prasadh S., Wong R.Ch.W., 2018). Za nejvíce používaný systém pro náhradu a regeneraci kostí je kompozit skládající se z HAP a především COL. Ty dohromady tvoří snadno tvarovatelné biomateriály pro klinické použití. Kolagenové povlaky na substrátech a implantátech fosforečnanu vápenatého zlepšují buněčnou adhezi a proliferaci matrice (Sheikh Z. et al., 2015). A to díky některým zbytkům kolagenu, jako jsou lysin a arginin, které adhezi podporují. Získání kolagenu z xenogenních tkání

vyvolává imunitní reakci, proto je vhodnější využít lidskou pupečnickovou šňůru, kterou lze považovat za potencionální zdroj biomateriálu používaného v tkáňovém inženýrství (Kenar H. et al., 2019). Dalším kompozitem vhodným pro regeneraci kostních tkání je kombinace hydroxyapatitu, kolagenu a chitosanu. Scaffold z tohoto kompozitu vykazuje příznivé účinky na připojení a proliferaci buněk, byla také zvýšena exprese osteogenních genů Runx2 a Ocn (viz obr.7) (Xie J. et al., 2016).



Obrázek 7: Imunofluorescenčně obarvené iPSC-MSC (indukované pluripotentní kmenové buňky) buňky na trikalciium fosfát (TCP), chitosan (CTS), HAP/CTS a HAP/COL/CTS pro detekci proteinové exprese Ocn a Runx2 po 14 dnech kultivace. Barvení buněčného skeletu faloidinem (červená), barvení jádra pomocí DAPI (fluorescenční barvivo-modré), specifické barvení osteogenního proteinu Ocn (A-D) (zelená) a (E-H) Runx2 (zelená) (Xie J. et al., 2016).

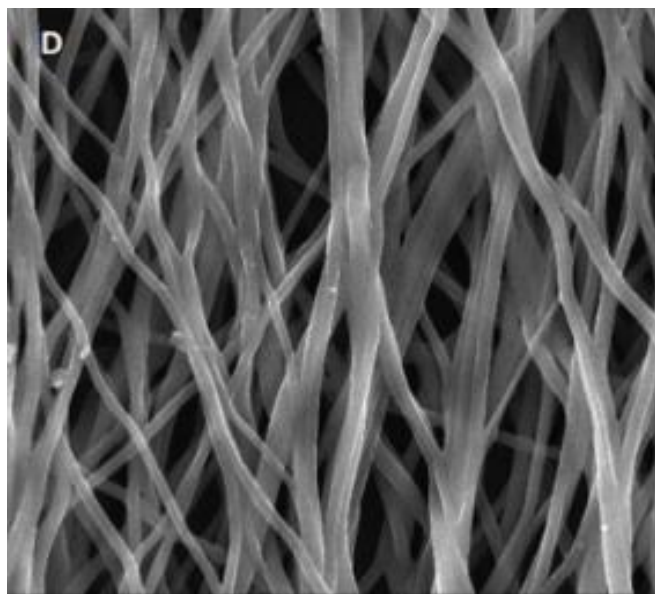
2.3.1.2 Chitosan

Chitosan je biopolymer odvozený od chitinu. Jedná se o lineární polysacharid, který je nerozpustný ve vodných roztocích nad pH 7 (Sheikh Z. et al., 2015). Jedná se o druhý nejlépe dostupný biopolymer vyskytující se v přírodě (Prasadh S., Wong R.Ch.W., 2018). Může se extrahovat z koryšů nebo se vyrábět deacetylací chitinu (Soundarya S.P. et al., 2018). Je biokompatibilní a může být tvarován tak, aby vytvářel scaffold, který má porézní mikroarchitekturu, která podporuje osteokondukci (Sheikh Z. et al., 2015). Není toxický a je hydrofilní, což usnadňuje buněčnou přilnavost k povrchu. Z tohoto důvodu je používán v tkáňovém inženýrství. Velkou výhodou tohoto materiálu je, že může být zpracován do různých podob, jako je například gel, mikročástice, nanočástice či nanovlákná (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018). Scaffold s chitosanem o vyšší molekulové hmotnosti vykazuje lepší mechanické vlastnosti než konstrukce s chitosanem o střední molekulové hmotnosti. CTS spolu s fosfáty vápníku nebo s kolagenem po přidání HAP zlepšuje mechanickou pevnost matrice

(Sheikh Z. et al., 2015). Pro zvýšení mechanické pevnosti se do CTS přidávají také polymery, kovy či biokeramika (Soundarya S.P. et al., 2018).

2.3.1.3 Polykaprolakton

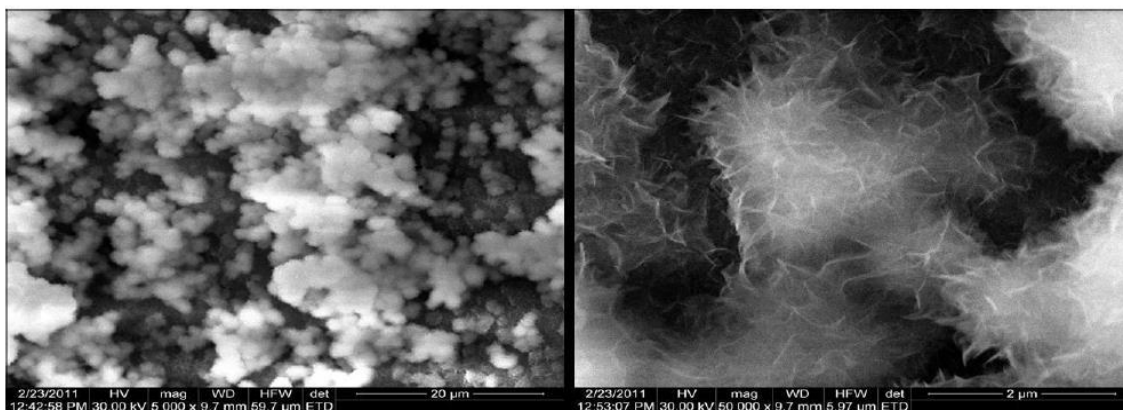
Polykaprolakton (PCL) je polykrystalický lineární polyester, který se používá jako materiál scaffoldu pro inženýrství kostních tkání, a to kvůli dobré biokompatibilitě a pomalé biologické rozložitelnosti (Yang X., Chen X., Wang H., 2009). PCL se degraduje do produktů, které lze snadno vyloučit nebo se mohou využít v Krebsově cyklu. Nevýhodou PCL je hydrofobní povaha, která zabraňuje interakci s tělními tekutinami a následně zabraňuje buněčné adhezi a proliferaci (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018). Pro zlepšení osteogenní kapacity PCL nanovláken jsou přidávány další stimulující složky, jako je například chitosan. CTS je polysacharid, který zvyšuje tvorbu kosti jak *in vitro*, tak *in vivo* studiích. Podporuje upevnění a rozšiřování osteoblastů. Zahrnutí chitosanu do PCL nanovláken zvyšuje adhezi a proliferaci preosteoblastů a dále urychluje diferenciaci na kostní tkáň se zvýšenou aktivitou ALP (Yang X., Chen X., Wang H., 2009). Gi Hoon Yang vyrobil 3D PCL scaffold se spirálovitou vzpěrou. Buněčná reakce prováděna *in vitro* s buňkami podobným osteoblastům (MG63) vykazovala indikativní výsledky na buněčné proliferaci a diferenciaci buněk ve srovnání s běžnými vzpěrami (Yang G.H., Kim M., Kim G.H., 2016).



Obrázek 8: PCL scaffold – Morfologie a vyrovnání vláken pozorováno v SEM na PCL scaffoldu, vlákna se příležitostně spojila, což zvýšilo průměr vlákna (Kenar H. et al., 2019).

2.3.1.4 Hedvábný fibroin (*SF-silk fibroin*)

SF je extrahovaný ze zámotků bource morušového a skládá se ze dvou hlavních proteinů: sericinu (globulárního) a hedvábného fibroinu (vláknitého). Odstranění sericinu z hedvábného fibroinu může být prováděno odstraněním slizovitých látek, přičemž zůstává pouze hedvábný fibroin. Hedvábné fibroinové aminokyseliny jsou složené ze dvou odlišných řetězových dílčích složek, tj. lehkých řetězců, obsahujících neopakující se hydrofobní vazby, a těžkých řetězců, ve kterých jsou opakující se hydrofobní aminokyseliny. Nekovalentní P25 glykoprotein je vázán na předem uspořádanou šestici lehkých a těžkých řetězců. Hedvábní představuje jedinečnou rodinu strukturálních proteinů, které jsou biokompatibilní a degradovatelné. Nabízí také řadu vynikajících mechanických vlastností. Tyto vlastnosti, které mohou být přizpůsobeny pro úpravu vodných rozpouštědel a mohou se chemicky přizpůsobit tak, aby vyhovovaly různým aplikacím. Jako biomateriál poskytuje vlastnosti, které funkčně podporují fungování orgánů v lidském těle. Hedvábný fibroin je vynikající přírodní polymer, který je široce používán jako biomateriál. Díky svým vynikajícím vlastnostem, ať už mechanickým či biomedicínským, je používán jako kostní implantát. Vykazuje biokompatibilitu a nemá žádné cytotoxické účinky na fenotyp či na funkci buňky (Purnomo P., Putu H.S., Ana M., 2018). MSC kultivované na hedvábných vláknech vykazovaly zvýšení ALP a po 12 dnech léčby byla zvýšená mineralizace (Soundarya S.P. et al., 2018). Je považován za slibný materiál pro náhradu kostní tkáně, například pro opravu chrupavky (Purnomo P., Putu H.S., Ana M., 2018). Mezi výrobní metody patří sušení pomocí vymrazování a solné louhování (Karageorgiou V., Kaplan D., 2005). SF použitý s jinými materiálem vykazuje zvýšenou regeneraci kostí. Například SF s HAP zvyšuje buněčnou proliferaci, ALP aktivitu, mineralizaci a expresi osteokalcinu, což dokazuje, že podporuje tvorbu kostí (Soundarya S.P. et al., 2018). SF byl také součástí výzkumu, kdy byl vyvinut hydrogelový kompozit na bázi hedvábného fibroinu s výztuží uhlíkových nanotrubiček (Purnomo P., Putu H.S., Ana M., 2018).



Obrázek 9: SF s deponitním materiálem – snímky zobrazující deponitní materiál na povrchu kompozitu z hedvábného fibroinu a polyakrylamidového hydrogelu. Kompozity byly inkubovány v nasimulované tělní tekutině (Purnomo P., Putu H.S., Ana M., 2018).

Dalším vhodným kompozitem je SF/HAP, přičemž dojde ke zlepšení osteogenního potenciálu. Přidáním HAP do SF se zlepšují jeho biologické a mechanické vlastnosti, jelikož se složením přibližuje přirozené struktuře kostí. Při výzkumu se ukázalo, že osteoblasty vykazují vyšší životaschopnost na scaffoldu SF/HAP (Farokhi M. et al., 2018).

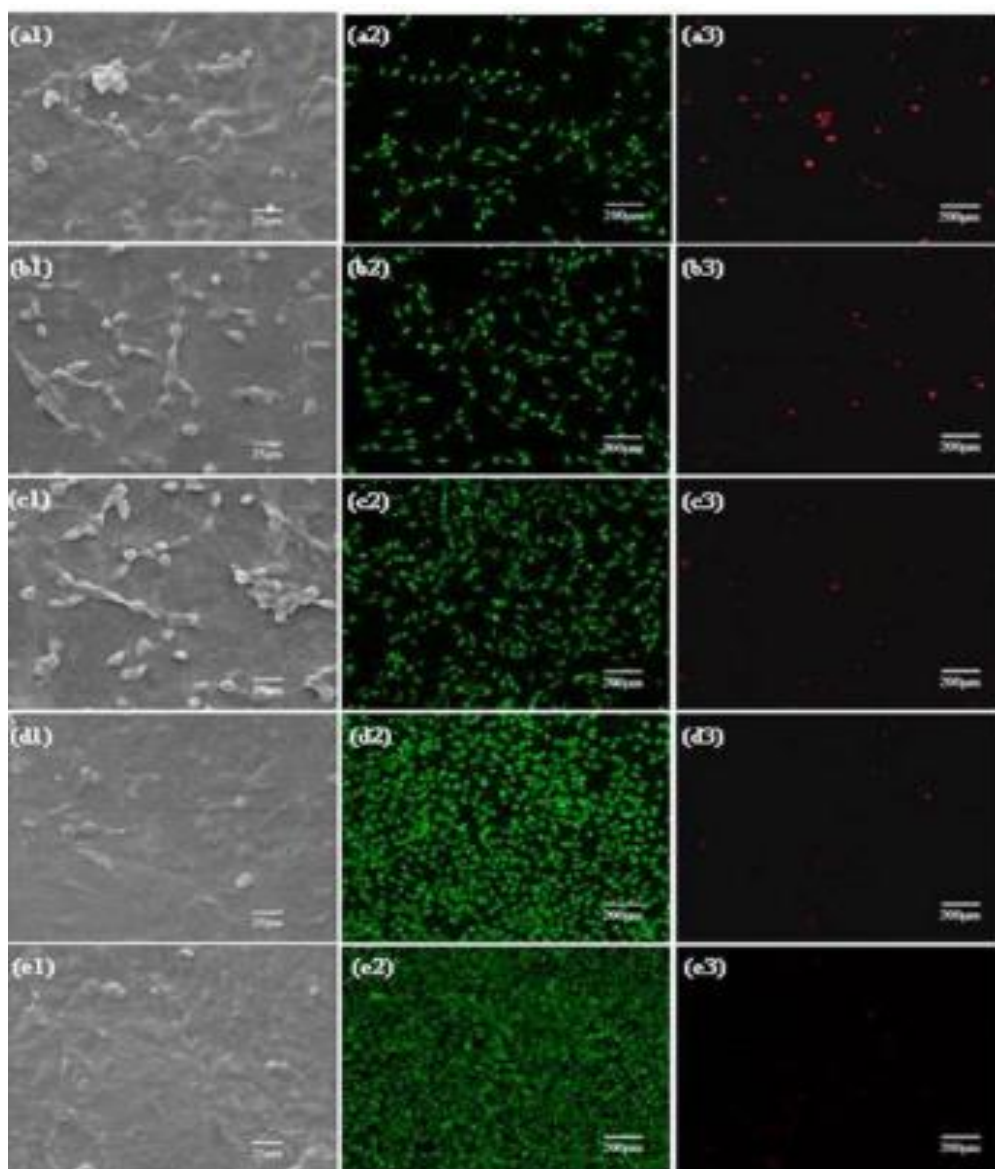
2.3.1.5 Kyselina polyglykolová

Kyselina polyglykolová je vysoce krystalický syntetický polymer kyseliny glykolové. Díky hydrofilní povaze dochází k rychlé degradaci, a to vede ke ztrátě mechanické pevnosti PGA, která obvykle klesá po 14 dnech od doby implantace o 50 % a po 28 dnech o 90 %. Produktem degradace PGA je kyselina hydroxyoctová a je metabolizována játry nebo ledvinami (Sheikh Z. et al., 2015). Hlavní nevýhodou PGA je možnost zvýšení acidity v okolní tkáni (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018).

2.3.1.6 Kyselina polymléčná

Kyselina polymléčná je polyester s lineárními polymerními řetězci, má vynikající mechanické a tepelné vlastnosti, je biokompatibilní a biologicky odbouratelný. Je cenově dostupnější díky svým obnovitelným zdrojům (Sheikh Z. et al., 2015). Jde o zdroje v podobě cukrové třtiny, kukuřice či brambor a jejich produkty biodegradace jsou pro tělo

neškodné, proto je schválen pro použití v biomedicínském oboru (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018). Existuje ve dvou formách, a to L-PLA a D-PLA. L-PLA je známá díky svým dobrým mechanickým vlastnostem. Z těla je vylučována přes játra nebo přes plíce (Sheikh Z. et al., 2015). PLA má ovšem některé nedostatky, mezi které patří nízká buněčná adheze, způsobená díky hydrofobním vlastnostem, zánětlivé reakce *in vivo*, a to kvůli produktu degradace, kyselině mléčné. Navíc má PLA nízkou degrační rychlost, a to mezi 10 měsíci až 4 roky. Vytvoření nanokompozitu pomocí bioaktivního materiálu může zlepšit rychlost degradace, mechanické vlastnosti a také zvýšit adhezi buněk (Tajbakhsh S., Hajiali F., 2017). Nanokompozitní scaffold, složený z PLLA/HAP, vykazuje dobré vazby na kostní strukturu (Sheikh Z. et al., 2015). Zvýšení mechanické pevnosti PLLA lze zajistit také mechanickými vlastnosti nanočástic nitridu bóru a ZnO whiskerů, neboli „vousů“ (ZnO_w). Tato kombinace složek je výhodná pro upevnění, proliferaci a životaschopnost buněk MG63. Nitrid bóru je biokompatibilní, vykazuje necytotoxickou cytocompatibilitu s osteoblasty a podporuje diferenciaci MSC na osteoblasty. ZnO je taktéž biokompatibilní a podporuje buněčnou adhezi a růst (Feng P. et al., 2016).



Obrázek 10: PLLA scaffold – životaschopnost MG63 (buňky linie lidských osteoblastů) buněk po 7denní kultivaci, (a1 – a3) scaffold PLLA, (b1 – b3) scaffold PLLA /BN, (c1 – c3) scaffold PLLA /ZnO, (d1 – d3) scaffold PLLA /BN/ZnO-0,75-5, (e1 – e3) scaffold PLLA / BN / ZnO-1-7, obrazy SEM (a1, b1, c1, d1, e1), živé buňky (a2, b2, c2, d2, e2) byly zbarveny zeleně; (a3, b3, c3, d3, e3) mrtvé buňky byly obarveny červeně (Feng P. et al., 2016).

2.3.1.7 Kyselina polymléčno-ko-glykolová

Kyselina polymléčno-ko-glykolová (PLGA) je tvořená kombinací kyseliny mléčné a glykolové (Sheikh Z. et al., 2015). Vykazuje velkou možnost buněčné adheze a proliferační vlastnosti, a díky tomu je výborným kandidátem pro použití v tkáňovém inženýrství (Prasadh S., Wong R.Ch.W., 2018). Scaffold vytvořený z PLGA zesílené pomocí HAP zlepšuje mechanické vlastnosti ve srovnání se scaffoldem vyrobeném pouze z PLGA. Přítomnost HAP dodává scaffoldu zvýšenou schopnost přilnutí osteoblastů

na jeho povrch. Na kulturách *in vitro* došlo také ke zvýšené mineralizaci (Sheikh Z. et al., 2015).

2.3.2 Keramika

Další hlavní třídou biomateriálů pro opravu kostí je keramika. Do této kategorie patří sloučeniny jako je HAP a trikalcium–fosfát, vykazují dobrou schopnost osteokonduktivity. Hlavním omezením keramiky je její křehkost a obtížnost zpracování (Wei G. et al., 2004). Keramický scaffold se typicky vyznačuje svou vysokou mechanickou tuhostí, jinak nazývanou Youngův modul. Má vynikající biokompatibilitu díky své chemické a strukturní podobnosti s minerálním složením kostí. Keramika zvyšuje diferenciaci a proliferaci osteoblastů (O'Brien F.J., 2011).

Kompozitní biomateriály kombinující většinou syntetické polymery, zejména s anorganickou keramikou, jsou zajímavé pro přípravu scaffoldu. Mají přiměřené biologické a mechanické vlastnosti. Tyto kompozity mohou také napodobovat vlastnosti a morfologii kompaktní a trabekulární kosti. Růstové faktory mohou být přidány k náhradám kostí, a tím regulovat aktivitu buněk a podporovat tvorbu kostí. Většina studií používala růstové faktory rodiny BMP, zejména BMP-2. Růstové faktory mají krátký biologický poločas *in vivo*, je proto důležité tyto proteiny chránit před degradací dodáním do systému. Takové systémy se mohou uvolnit v malých koncentracích a zabraňují toxickým a karcinogenní účinkům v suprafyziologických dávkách. Genová a buněčná terapie také umožňuje produkci růstových faktorů a jejich uvolnění. Je mnoho parametrů, které ovlivňují uvolnění růstových faktorů z distribučního systému, jako je povrchová chemie a náboj scaffoldu, jeho geometrie, objem, porozita, hydrofobicita, krystalinita, míra, s jakou jsou degradovány a snadnost výroby. Uvolnění růstových faktorů může být řízeno difuzí, externí stimulací, enzymatickými či chemickými reakcemi nebo jejich kombinací (Marquis M.E. et al., 2009). Potřeba druhé operace k odstranění neabsorbovatelných vláken vede k použití reabsorbovatelných, anebo biokeramických látek, které vedou k výztuži v kompozitních materiálech. Patří zde například HAP/PLA, TCP/PLGA či fosfátové skelné vlákno/PLA (Sheikh Z. et al., 2015). Polymerní-keramické kompozitní scaffold využívá kombinaci fosforečnanů vápenatých, díky jejich osteokonduktivitě a polyesterů, kvůli jejich dobré biologické degradaci. Toto polymerní-keramické kompozitní scaffold se tvoří buď přímým míšením, nebo biomimetickým způsobem. Ve srovnání s prostým polymerním scaffoldem, ve kterém se tkáňová matrice

vytvořila pouze v povrchové vrstvě (<240 μm), kompozitní scaffold podporuje růst buněk a tvorbu nové tkáně v celém objemu, včetně samostatného centra scaffoldu. Tyto kompozity napodobují do určité míry kost, ta je totiž složena z anorganické sloučeniny, zejména HAP a organické sloučeniny, zejména COL. Kompozitní scaffold také potlačuje apoptózu osteoblastů, a to zvýšenou adsorpcí sérových proteinů, jako je vitronektin a fibronektin, na scaffoldu (Wei G. et al., 2004).

2.3.2.1 Fosforečnan vápenatý

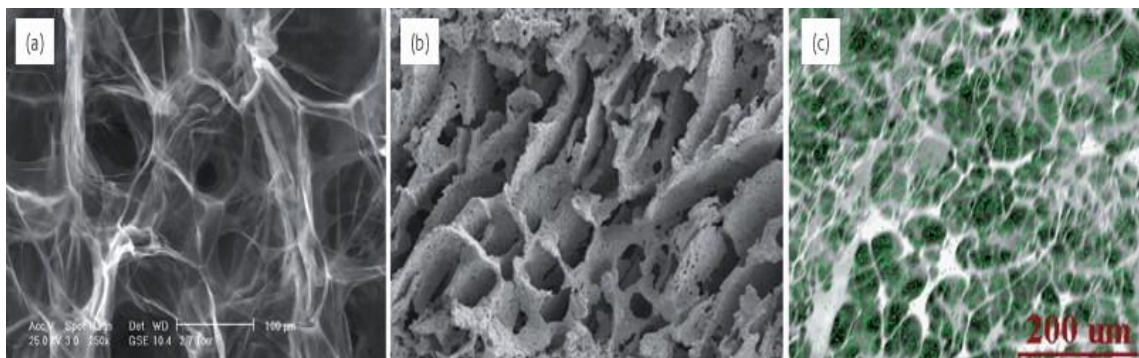
Tricalcium fosfát je resorbovatelný a bioaktivní keramický materiál. Má dvě krystalické formy: α -TCP a β -TCP (Sheikh Z. et al., 2015). α -TCP je reaktivnější ve vodných systémech oproti β -TCP (Tajbakhsh S., Hajiali F., 2017). TCP vykazuje vyšší rychlost biodegradace než HAP po implantaci *in vivo* (Sheikh Z. et al., 2015). Je vstřebatelný 10–25x rychleji než HAP (Marquis M.E. et al., 2009). Předklinické experimenty na tibiích potkanů prokázaly, že se TCP téměř po měsíci a půl po implantaci zcela resorbuje s novou tvorbou kosti. TCP kostní náhrady ukázaly, že jsou rychle infiltrovány pomocí kostí a dochází k pomalé resorpci osteoklastů, a to v době mezi 6-24 měsíci (Sheikh Z. et al., 2015). Materiály z této sloučeniny jsou vysoce žádané kvůli jejich vynikající biologické degradaci a kvůli podobnosti s anorganickými minerály v kosti (Cheng H. et al., 2017). Bifázický fosforečnan vápenatý, tvořený kombinací HAP a β -TCP, může být použit jako materiál pro náhradu kostí či výplň v kompozitní výrobě. Dále pak existuje amorfní fosforečnan vápenatý, který má velkou schopnost remineralizace a vysokou rozpustnost ve srovnání s jinými fosforečnatými materiály (Tajbakhsh S., Hajiali F., 2017). Kompozity TCP a polymeru byly vyrobeny z biopolymerů, jako je CTS, PLGA a PCL. Kompozity TCP/PCL po *in vivo* studiích ukazují, že napomáhají při podpoře dalšího hojení kostí (Prasadh S., Wong R.Ch.W., 2018).

2.3.2.2 Hydroxyapatit

Hydroxyapatit (HA/HAP) je bioaktivní a bioresorbovatelný fosforečnan vápenatý, který tvoří většinu anorganické složky kostní tkáně. Díky tomu, že je HAP primární složkou kostí, se může zdát být ideálním adeptem na kostní náhrady, avšak problémem je obtížná kontrola rychlosti degradace (O'Brien F.J., 2011). Byly

snahy o vyvinutí biokeramických materiálů na bázi HAP s přidavkem iontů. Stroncium-HAP, magnézium-HAP a křemík-HAP byly testovány pro zlepšení mechanických a biologických vlastností, avšak kvůli střední až nízké rozpustnosti HAP po implantaci se jako materiál pro scaffold neosvědčil. Ukázalo se, že HAP je vhodným nosičem pro osteogenní buněčné populace a osteokonditivní růstové faktory (Sheikh Z. et al., 2015). Tvar a velikost nanokompozitu HAP/PCL, potažený dvojfázovým TCP, hrají významnou roli při zlepšování mechanických vlastností. Nejvyšší dosaženou pevnost (2,1 MPA) vykazuje tvar jehly s nano velikostí (Prasadh S., Wong R.Ch.W., 2018).

Hydroxyapatit/uhličitan vápenatý (CHACC) je biologicky odbouratelný a osteokonditivní materiál, který podporuje *in vitro* proliferaci a osteogenní diferenciaci MSC lidské kostní dřeně a funguje jako funkční scaffold pro tvorbu kostí *in vivo*. Syntetické biomateriály se nepodobají přirozené kosti v architektuře, poréznosti, ani co se týče obsahu organických složek a nejsou optimální, pokud jde o biologickou degradaci a integraci hostitelské tkáně. Přirozený korálový exoskeleton má porézní architekturu, která je podobná trabekulární kosti. Vzhledem k tomu, že jeho hlavní složkou je uhličitan vápenatý, byla vyvinuta hydrotermální technika k úplné přeměně uhličitanu vápenatého na keramický korálový hydroxyapatit pro klinické použití. *In vitro* buněčné 3D struktury vytvořené z kmenových buněk připomínají živou tkáň a jsou známé jako organoidy. Byly vyvinuty jako modely pro transplantační medicínu a genovou terapii (Day A.G.E. et al., 2018).



Obrázek 11: Srovnání COL, HAP a kompozitního COL – HA scaffoldů – (A) COL scaffold s vysokou porozitou, ale špatnými mechanickými vlastnostmi (B) hydroxyapatitový scaffold s dobrými mechanickými vlastnostmi, ale špatnou buněčnou infiltrací (C) kompozitní COL – HA scaffold s vysokou pórovitostí a rovnoměrným rozložením částic (O'Brien F.J., 2011).

2.3.2.3 Bioaktivní sklo

Bioaktivní materiál je definován jako materiál, který podléhá specifickým povrchovým reakcím po implantaci do těla, což má za následek tvorbu vrstvy, která je podobná HAP, ta je dále zodpovědná za tvorbu pevného spojení mezi tkáněmi. Název bioaktivní mají proto, protože se vážou na kost a zlepšují tvorbu kostní tkáně (Tajbakhsh S., Hajiali F., 2017). Bioaktivní sklo je osteokonduktivní anorganický materiál, který je často používán v klinické praxi a je taktéž známo pod pojmem bioglass. Bioaktivní skla, zejména 45S5, jsou důležité keramické kompozity fosforečnanu vápenatého. Složení 45S5 v hmotnostních procentech je: 45 % SiO_2 , 24,5 % Na_2O , 24,5 % CaO a 6 % P_2O_5 . Přítomnost CaO a P_2O_5 v těchto sklech vysvětluje jejich bioaktivitu, definovanou jako schopnost materiálu vyvíjet povrchovou vrstvu obsahující karbonátový hydroxyapatit, podobný kostní minerální složce (Marquis M.E. et al., 2009). Tento tenký hydroxyapatitový povlak absorbuje proteiny a přitahuje osteoprogenitorové buňky (Wang W., Yeung K.W.K., 2017). Jejich iontové produkty a povrchová modifikace podporují proliferaci a diferenciaci osteoblastů, a také stimulují produkci fenotypových markerů. Nicméně 45S5 nemá vliv na tvorbu osteoklastů nebo na resorpci kostí (Marquis M.E. et al., 2009).

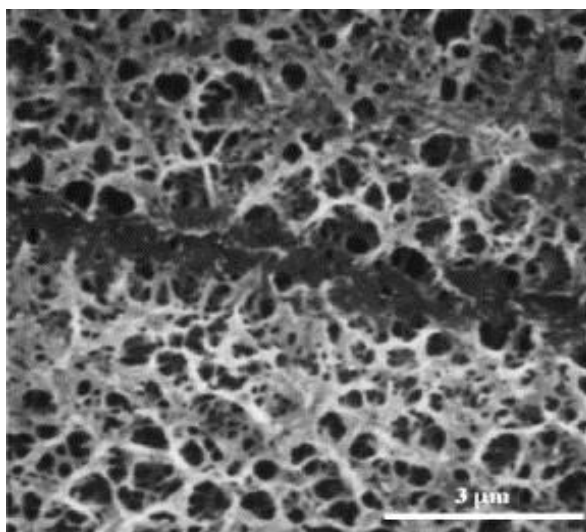
2.3.3 Kovy

Nejčastěji používaným materiálem z kovů, které obvykle tvoří základ kovových implantátů pro regeneraci kostí je titan a nerezová ocel. Jejich hlavní výhodou jsou vynikající mechanické vlastnosti, které z nich tvoří nejrozšířenější materiál pro implantaci, nicméně nevýhodou je nezanedbatelná degradace, která vede k druhému chirurgickému zákroku. Další nevýhodou může být míra toxicity v těle, způsobená akumulací kovových iontů v důsledku koroze materiálu (Karageorgiou V., Kaplan D., 2005).

2.3.3.1 Titan

Titan patří mezi běžné kovy, používané při výrobě kostních implantátů, na základě jeho pevnosti, odolnosti vůči korozi a biokompatibilitě (Cheng H. et al., 2017). Například MSC připojené na Ti vláknité síť se mohou diferencovat na osteoblasty *in vitro*. Nicméně některé experimenty *in vivo* mají zdůraznit zlepšení osteogenních vlastností optických vláken Ti s použitím proteinových nebo HAP povlaků (Marquis M.E. et al., 2009).

Pro zvýšení osteogenetické diferenciacie a osteointegrace byly vyvinuty různé způsoby úpravy povrchu, fyzikálních vlastností a topografie. Mezi tyto úpravy patří například pískování, elektrolytické štěpení, leptání pomocí kyseliny či mikroobrábění. Změnou povrchových parametrů pak dochází k lepšímu uchycení buněk na povrch materiálu (Lin L. et al., 2014). Těmito úpravami jsou kostní implantáty modifikovány tak, aby se zvýšila interakce s adherentními buňkami, a tak podpořila osteointegraci (Cheng H. et al., 2017). Například alkalické ošetření spolu s tepelným zpracováním zlepšuje biologickou aktivitu titanu (Liu X., Chu P.K., Ding Ch., 2004).

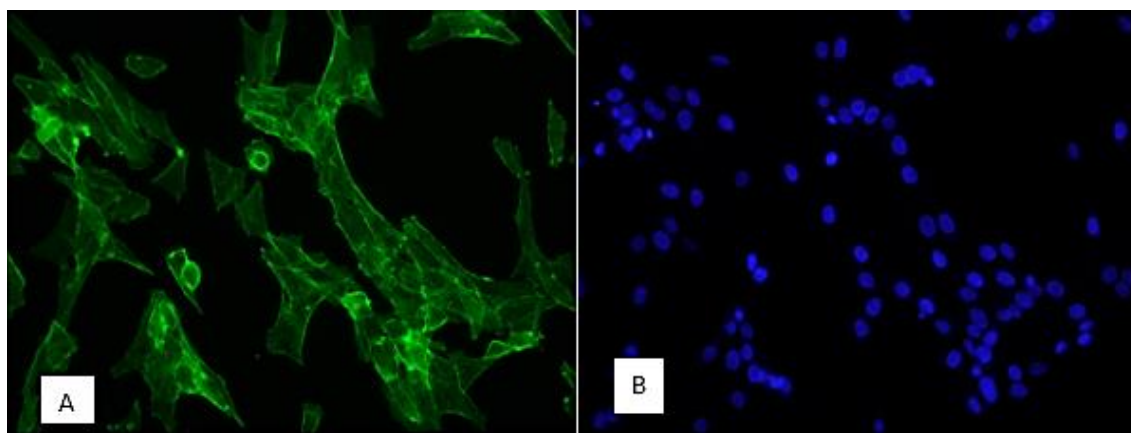


Obrázek 12: Povrch titanu po alkalickém a tepelném zpracování (Liu X., Chu P.K., Ding Ch., 2004).

Lin L. a kolektiv (Lin L. et al., 2014) testovali tři typy hierarchických struktur TiO_2 , a to TiO_2 nanotrubičky s použitím potenciostatické anodizace, TiO_2 houbovitě struktury, připravené pomocí eloxování a nano/mikro struktura podobná TiO_2 , která byla hydrotermálně ošetřena. Z výsledků testů se ukázalo, že alkalický hydrotermálně ošetřený Ti substrát byl nejlepším materiálem pro integraci kosti a implantátu z hlediska *in vivo* i *in vitro* testovaných parametrů. Tento povrch vykazoval větší drsnost, větší specifický povrch a hydrofilní smáčivost.

Oxid titaničitý (TiO_2) představuje tři krystalické struktury: anatas (tetragonální), rutil (tetragonální) a brookit (ortorombický), avšak brookitová forma je nestabilní a špatně syntetizovatelná, oproti tomu anatas a rutil jsou syntetizovány v laboratořích. Jsou polovodičové a vykazují katalytickou aktivitu. Jsou velmi používány v tkáňovém inženýrství díky jejich netoxickým a baktericidním vlastnostem, chemické stabilitě, vynikající biokompatibilitě a mají nízké pořizovací náklady (Mota R.C.A.G., Silva E.O.,

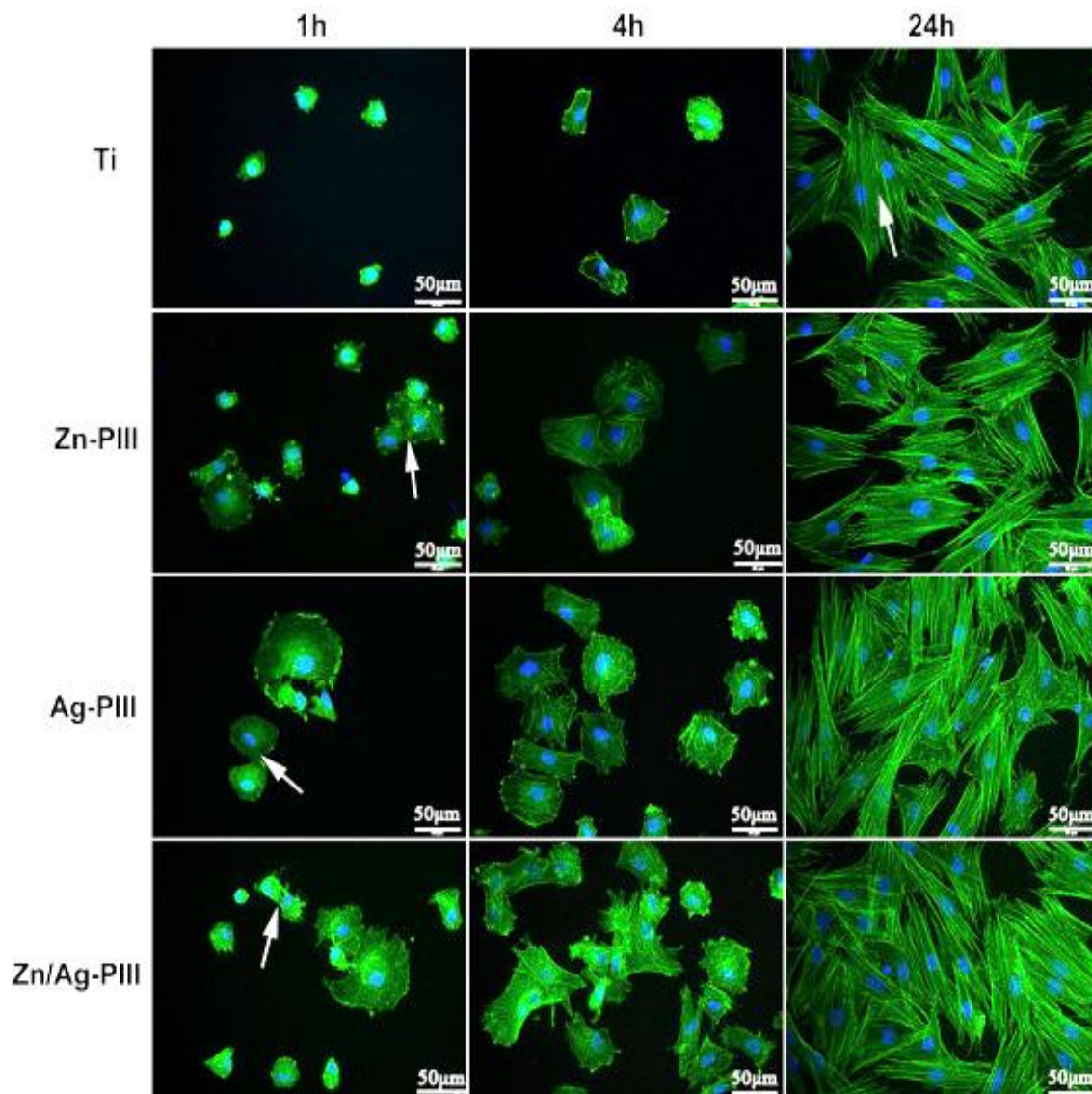
Menezes L.R., 2018). TiO₂ nanostruktury, zavedené do struktury hydrogelu (chitosan, COL), mají významný vliv na bobtnavé vlastnosti vzniklého kompozitu a jsou vhodným materiálem na výrobu bioaktivního scaffoldu (Zazakowny K. et al., 2016).



Obrázek 13: Osteoblasty na TiO₂ zvětšeno 200x – A) osteoblasty barveny faloidinem pro zviditelnění aktinových vláken, B) osteoblasty barvené pomocí hoescht barviva pro zvýraznění jader.

2.3.3.2 Zinek

Zinek je základním prvkem lidského těla, vyskytující se hlavně v kostech. Je důležitý při regulaci a katalýze ALP, která hraje důležitou roli při osteogenezi a mineralizaci. Tento kov má dobrou chemickou stabilitu, kompatibilitu, antibakteriální aktivitu a je netoxický jak *in vitro*, tak *in vivo* (Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R., 2018). U zinku je však velmi důležité kontrolovat koncentraci, protože vysoká koncentrace zinečnatých iontů může v těle způsobit cytotoxickou reakci. Díky antibakteriálnímu účinku se ve studiích zinek implantuje do titanu. Výsledky studie ukazují, že titan s implantovaným zinkem stimuluje počáteční adhezi, proliferaci a diferenciaci MSC, kdy zinek zvyšuje osteogenní vlastnosti, stimuluje tvorbu kostí a vykazuje částečný antibakteriální účinek na *E. coli*, a také na *S. aureus* (Jin G., Cao H. et al., 2014). Pro zlepšení antibakteriálních schopností implantátu se používá stříbro, které vykazuje dobrou kompatibilitu s osteoblasty a titanovým substrátem (Jin G., Qin H. et al., 2014).



Obrázek 14: Buněčná adheze MSC na čistém Ti, Zn, Ag a Zn/Ag – testováno barvením FITC (fluorescein isothiokyanát) pro vizualizaci aktinu a jader, buňky s mitózou jsou značeny bílou šipkou (Jin G., Qin H. et al., 2014).

3. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat typy a funkce kostních buněk, poté se zaměřit na nanomateriály vhodné pro kultivaci a regeneraci kostních buněk, a tyto materiály dále rozdělit na základě jejich vlastností.

Mezi kostní buňky patří tři typy buněk: osteoblasty, osteocyty a osteoklasty, z nichž každá má jiný tvar a funkci. Osteoblasty se vyvíjí z mesenchymálních buněk kostní dřene a mají za úkol tvořit novou kostní hmotu. Poté se obklopují kostní matricí a diferencují na osteocyty. Osteocyty oproti osteoblastům nevytvářejí mezibuněčnou kostní hmotu. Za to obsahují metabolicky aktivní složky a díky lysozómům mohou fungovat jako fagocytující buňky. Osteoklasty se tvoří z hematopoetické řady za pomoci cytokinů a jejich hlavní funkcí je odbourávání kostní hmoty.

V tkáňovém inženýrství je hlavní myšlenkou poskytnout pacientům takový materiál, který by plně nahradil kostní hmotu bez jakéhokoliv vedlejšího rizika, jako je infekce či sepse. Využívají se při tom nanomateriály, jelikož vykazují lepší vlastnosti než makrometrické materiály. Základní jednotkou je, spolu s kostními buňkami, scaffold, který představuje trojrozměrnou porézní strukturu daného materiálu, které mohou napodobovat kostní extracelulární matrix, podporovat proliferaci a diferenciaci buněk. Mezi důležité vlastnosti scaffoldu patří: rychlost degradace, pórovitost a pevnost. Nanomateriály se dělí na přírodní polymery, syntetické polymery keramiku a kovy. Přírodní polymery jsou biologicky rozložitelné, ale mají špatné mechanické vlastnosti. Proto se vyvinuly syntetické polymery s lepšími mechanickými vlastnostmi, ale produkty degradace mohou být pro člověka toxické. Mezi keramické materiály patří hydroxyapatit a fosforečnan vápenatý, což jsou hlavní složky kosti a vykazují tak nejlepší vlastnosti pro použití v tkáňovém inženýrství, ale nevýhodou je křehkost a špatná manipulace při zpracování. Kovy vykazují dobré mechanické vlastnosti, ale velkou nevýhodou je biologická nerozložitelnost, a proto je pacient nucen podstoupit operaci pro vyjmutí implantátu. Každý materiál vykazuje jiné vlastnosti, a proto se kombinují tyto materiály mezi sebou, kdy vznikají tzv. nanokompozity. Ty vykazují lepší vlastnosti než samostatný materiál. Nejvhodnější kombinací je například použití keramického materiálu se syntetickým polymerem. V současné době se také často používají kombinace s přírodními polymery, jako je například hedvábí, které vykazuje zvýšenou adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk.

4. Seznam použité literatury

1. Bonewald L.F.: The amazing osteocyt: *Journal of Bone Mineral Research*, 2011, 26(2), 229-38.
2. Bost K.L., Ramp W.K., Nicholson N.C., Bento J.L., Marriott I., Hudson M.C.: Staphylococcus aureus infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production: *The Journal of Infection Diseases*, 1999, 180(6), 1912-20.
3. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L.: Osteoclast differentiation and activation: *Nature*, 2003, 423(6937), 337-42.
4. Clarke B.: Normal bone anatomy and physiology: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2008, 131-39.
5. Clemens T.L., Karsenty G.: The osteoblast, an insulin target cell controlling glucose homeostasis: *Journal of Bone Mineral Research*, 2011, 26(4), 677-80.
6. Coutinho D., Costa P.F., Neves N., Gomes M., Reis R.L.: Micro-and Nanotechnology in Tissue Engineering: *Tissue Engineering*, 2011, 3-29.
7. Day A.G.E., Francis W.R., Fu K., Pieper I.L., Guy O., Xia Z.: Osteogenic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells on coralline hydroxyapatite/calcium carbonate microparticles: *Stem cells international*, 2018, 4258613, 1-9.
8. Dudley H.R., Spiro D.: The fine structure of bone cells: *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1961, 11(3), 627-49.
9. Farokhi M., Mottaghtalab F., Samani S., Shokrgozar M.A., Kundu S.C., Reis R.L., Fatahi Y., Kaplan D.L.: Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering: *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1), 68-91.
10. Favus M.J.: Bisphosphonates for osteoporosis: *New England Journal of Medicine*, 2010, 2027-35.
11. Gong T., Xie J., Liao J., Zhang T., Lin S., Lin Y.: Nanomaterials and bone regeneration: *Bone research*, 2015, 3, 15029.
12. Cheng H., Chawla A., Yang Y., Li Y., Zhang J., Jang H.L., Khademhosseini A.: Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery: *Drug Discovery Today*, 2017, 22(9), 1336-50.
13. Jang J., Park J.Y., Gao G., Cho D.W.: Biomaterials-based 3D cell printing for next-generation therapeutics and diagnostics: *Biomaterials*, 2018, 156, 88-106.

14. Jin G., Cao H., Qiao Y., Meng F., Zhu H., Liu X.: Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 117, 158-65.
15. Jin G., Qin H., Cao H., Qian S., Zhao Y., Peng X., Zhang X., Liu X., Chu P.K.: Synergistic effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium: *Biomaterials*, 2014, 35(27), 7699-713.
16. Kushwaha P., Wolfgang M.J., Riddle R.C.: Fatty acid metabolism by the osteoblast: *Bone*, 2018, 115, 8-14.
17. Karageorgiou V., Kaplan D.: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis: *Biomaterials*, 2005, 26(27), 5474-91.
18. Kenar H., Ozdogan C.Y., Dumlu C., Doger E., Kose G.T., Hasirci V.: Microfibrous scaffolds from poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) blended with xeno-free collagen/hyaluronic acid for improvement of vascularization in tissue engineering applications: *Materials Science and Engineering*, 2019, 97, 31-44.
19. Lin L., Wang H., Ni M., Rui Y., Cheng T.Y., Cheng Ch. K., Pan X., Li G., Lin Ch.: Enhanced osteointegration of medical titanium implant with surface modifications in micro/nanoscale structures: *Directory of Open Access Journals*, 2014, 2(1), 35-42.
20. Liu X., Chu P.K., Ding Ch.: Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications: *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2004, 47(3-4), 49-121.
21. Marquis M.E., Lord E., Bergeron E., Drevelle O., Park H., Cabana F., Sental H., Faucheux N.: Bone cells-biomaterials interactions: *Frontiers in Bioscience*, 2009, 14, 1023-67.
22. Mohamed A.M.: An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation: *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 2008, 15(1), 4-12.
23. Mota R.C.A.G., Silva E.O., Menezes L.R.: Polymer nanocomposites used as scaffold for bone tissue regeneration: *Materials Sciences and Applications*, 2018, 9(8), 679-97.
24. Navarro M., Michiardi A., Castano O., Planell J.A.: Biomaterials in orthopaedics: *Journal of Royal Society Interface*, 2008, 5(27), 1137-58.
25. O'Brien C.A., Nakashima T., Takayanagi H.: Osteocyte control of osteoclastogenesis: *Bone*, 2013, 54(2), 258-63.
26. O'Brien C.A.: Control of RANKL gene expression: *Bone*, 2010, 46(4), 911-9.

27. O'Brien F.J.: Biomaterials and scaffolds for tissue engineering: *Materials Today*, 2011, 14(3), 88-95.
28. Pitsillides, A.A., Rawlinson, S.C., Suswillo, R.F., Bourrin, S., Zaman, G., Lanyon, L.E.: Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling?: *Faseb Journal*, 1995, 9(15), 1614-22.
29. Prasad S., Wong R.Ch.W.: Unraveling the mechanical strength of biomaterials used as a bone scaffold in oral and maxillofacial defects: *Oral Science International*, 2018, 15(2), 48-55.
30. Purnomo P., Setyarini P.H., Mukaromah A.H.: The potential of silk fibroin as a polymer composite reinforcement for bone implant materials: *MATEC Web of Conferences*, 2018, 204.
31. Riddle R.C., Clemens T.L.: Bone cell bioenergetics and skeletal energy homeostasis: *American Physiological Society*, 2017, 97(2), 667-98.
32. Sheikh Z., Najeeb S., Khurshid Z., Verma V., Rashid H., Glogauer M.: Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications: *Materials*, 2015, 8(9), 5744-94.
33. Soundarya S.P., Menon A.H., Chandran S.V., Selvamurugan N.: Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different desing and fabrication techniques: *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 119, 1228-39.
34. Tajbakhsh S., Hajjali F.: A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering: *Materials Science and Engineering*, 2017, 70(1), 897-912.
35. Tautzenberger A., Kovtun A., Ignatius A.: Nanoparticles and their potential for application in bone: *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7, 4545-57.
36. Wang, L., Wang Y., Han Y., Henderson, S.C., Majeska R.J., Weinbaum S., Schaffler M.B.: In situ measurement of solute transport in the bone lacunar-canalicular system: *Proceedings of the Nationall Academy of Sciences og the United States of America*, 2005, 102(33), 11911-6.
37. Wang P., Hu J., Ma P.X.: The engineering of patient-specific, anatomically shaped, digits: *Biomaterials*, 2009, 30(14), 2735-40.
38. Wang Q., Yan J., Yang J., Li B.: Nanomaterials promise better bone repair: *Materials Today*, 2016, 19(8), 451-63.

39. Wang W., Yeung K.W.K.: Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: *Bioactive Materials*, 2017, 2(4), 224-47.
40. Wei G., Ma P.X.: Structure and prepertie of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering: *Biomaterials*, 2004, 25(19), 4749-57.
41. Williams D.F.: On the nature of biomaterials: *Biomaterials*, 2009, 30(30), 5897-909.
42. Xie J., Peng C., Zhao Q., Wang X., Yuan H., Yang L., Li K., Lou X., Zhang Y.: Osteogenic differentiation and bone regeneration of iPSC-MSCs supported by a biomimetic nanofibrous scaffold: *Acta Biomaterialia*, 2016, 29, 365-79.
43. Yang G.H., Kim M., Kim G.H.: Additive-manufactured polycaprolactone scaffold consisting of innovatively designed micro-sized spiral struts for hard tissue regeneration: *Biofabrication*, 2016, 9(1).
44. Yang X., Chen X., Wang H.: Acceleration of osteogenic differentiation of preosteoblastic cells by chitosan containing nanofibrous scaffolds: *Biomacromolecules*, 2009, 10(10), 2772-8.
45. Zazakowny K., Lewandowska-Łańcucka J., Mastalska-Popławska J., Kamiński K., Kusior A., Radecka M., Nowakowska M.: Biopolymeric hydrogels–nanostructured TiO₂ hybrid materials as potential injectable scaffolds for bone regeneration: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 148, 607-14.
46. Zhao Ch., Tan A., Pastorin G., Ho H.K.: Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering, 2013, 31(5), 654-68.