UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Kultivace buněk na nanomateriálech

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020 Štěpánka Jelínková

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Cell Cultivation on Nanomaterials

BACHELOR THESIS

2020 Štěpánka Jelínková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Štěpánka Jelínková**
Osobní číslo:	**C17167**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Téma práce:	**Kultivace buněk na nanomateriálech**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis kultivací buněk in vitro na nanomateriálech. V rámci tohoto tématu se nejprve zaměřte na popis rozdělení nanomateriálů používaných pro testování buněčné proliferace. Následně popište typy buněk, které se k těmto experimentům používají společně s uvedením buněčných markerů adheze. Nakonec se zaměřte na popis chování buněk na různých 3D nanomateriálech.

2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed*, apod.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

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: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 28. února 2020

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Štěpánka Jelínková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. a Mgr. Janě Báčové za poskytnutí cenných rad, věcných připomínek a vstřícnost při vypracování bakalářské práce. Děkuji také mé rodině a přátelům za podporu, kterou mi věnovali během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na chování buněk na různých nanomateriálech. Nejprve je v práci popsáno tkáňové inženýrství, jeho hlavní zájmy a využití v klinické praxi. Dále jsou popsány nanomateriály, které se používají pro testování buněčné proliferace, a jejich rozdělení. Poté se práce věnuje buněčné linii MG-63, která je nejčastěji používanou linií pro toto testovaní. Popis chování MG-63 je zaměřen především na titanové nanomateriály. Následně je popsána adheze a její markery, které pomáhají přilnout buňce na nanomateriál. Nakonec se práce zaobírá chováním buněčné linie MG-63 na scaffoldu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Tkáňové inženýrství, scaffold, nanomateriály, buněčná linie MG-63, proliferace, markery adheze.

TITLE

Cell Cultivation on Nanomaterials

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on the behaviour of cells on various nanomaterials. First, the thesis describes tissue engineering, its main interests and use in clinical practice. Next, nanomaterials that are used to test cell proliferation and their distribution are described. Then the thesis deals with the cell line MG-63, which is the most commonly used line for this testing. Description of behaviour MG-63 is focused mainly on titanium nanomaterials. Subsequently, adhesion and its markers are described, which help the cell to adhere to nanomaterial. Finally, the thesis deals with the behaviour of the MG-63 cell line on a scaffold.

KEYWORDS

Tissue engineering, scaffold, nanomaterials, cell line MG-63, proliferation, adhesions markers.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ 9
SEZNAM ZKRATEK 10
ÚVOD 11
1. TEORETICKÁ ČÁST 12
1.1. Tkáňové inženýrství 12
1.2. Nanomateriály 15
1.2.1. Titanové nanomateriály 16
1.2.2. Hedvábí 18
1.3. Buňky používané v tkáňovém inženýrství 19
1.3.1. Buňky MG-63 20
1.3.1.1. Markery adheze 27
1.3.1.2. Chování MG-63 na 3D scaffoldu 30
ZÁVĚR 41

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: **Postup v kostním tkáňovém inženýrství** 14
Obrázek 2: **3 druhy modulace nanomateriálů pro diferenciaci kmenových buněk**. 16
Obrázek 3: **Fluorescenční mikrograf zobrazující bakterie Escherichia coli** 17
Obrázek 4: **Struktura hedvábí bource morušového** 19
Obrázek 5: **Řez vrstvami svisle orientovaných nanotrubic TiO_2 s různými průměry**21
Obrázek 6: **Schéma interakce mezi kostí a implantovaným povrchem** 22
Obrázek 7: **Porovnání snímků hydroxyapatitu a sloučeniny hedvábného fibroinu a nano-hydroxyapatitu** 24
Obrázek 8: **Morfologický povrch slitiny Ti2448 po anodizaci** 26
Obrázek 9: **Chování biokompatibilních nanočástic** 27
Obrázek 10: **Morfologie buněk MG-63 ve fluorescenčním mikroskopu**..... 30
Obrázek 11: **Výroba porézního scaffoldu z kyseliny mléčné/nano-hydroxyapatitu** 32
Obrázek 12: **Distribuce průměrů vláken poly-L-laktidu se zvyšující se koncentrací diamantových nanočástic** 33
Obrázek 13: **Snímek kolagenových vláken na poly-(laktid-ko-glykolidu)**..... 35
Obrázek 14: **Snímek čistého hedvábného fibroinu a scaffoldu hedvábného fibroinu/chitosanu po lyofilizaci** 38
Obrázek 15: **Schematický diagram ternárního kompozitu** 39

SEZNAM ZKRATEK

ECM	extracelulární matrice (*Extracellular matrix*)
EPT	zamotaný porézní titan (*Entangled porous titanium*)
GDP	metoda plazmy žárového výboje (*Glow discharge plasma*)
HA	hydroxyapatit
MRSA	methicilin rezistentní kmeny Staphylococcus aureus (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)
n-HA	nano-hydroxyapatit
PLA	kyselina mléčná (*Polylactic acid*)
PLLA	kyselina poly-L-mléčná (*Poly-L-lactic acid*)
SF	hedvábný fibroin (*Silk fibroin*)
SF/n-HA	sloučenina hedvábného fibroinu a nano-hydroxyapatittu
SLA	pískování a leptání kyselinou (*Sandblasting acid etching*)
TE	tkáňové inženýrství (*Tissue engineering*)
Ti2448	slitina titanu Ti-24-Nb-4Zr-8Sn
TNT	anodizované nanotrubky z TiO_2 (*Anodized titanium dioxide nanotubes*)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (*Vascular endothelial growth factor*)

ÚVOD

Tkáňové inženýrství se zejména v poslední dekádě velice rychle rozvíjí. Spolu s buněčnou a genovou terapií se jedná o další oblast moderní terapie. Jeho cílem je příprava takových náhrad tkání a případně i orgánů, které jsou co nejvíce podobné původní tkáni. Důležitou součástí tohoto vědeckého oboru je použití nosiče, tzv. scaffoldu, ve kterém se uplatní zejména poznatky z nanotechnologie. Mezi materiály, které se běžně používají k vývoji scaffoldu patří sloučeniny titanu, biomateriály z hedvábí či kolagen. K osídlení této struktury požadovanou populací buněk se používají buňky kmenové. Mezi běžně používané buňky v tkáňovém inženýrství patří osteoblasty, fibroblasty nebo buněčná linie neuroblastomu.

Problematičnost scaffoldů tkví v jejich možné inkompatibilitě s pacientem, a proto musí být nově vyvinuté scaffoldy dále zkoumány, aby se předešlo komplikacím při aplikaci této struktury spolu s osídlenými buňkami do těla pacienta. Aplikace scaffoldu, který není biokompatibilní by mohla vést až k sepsi organismu.

Moderní terapie využívající nanomateriály a kmenové buňky by mohla v budoucnosti pomoci v léčbě Parkinsonovy choroby či nádorových onemocnění, dále by se poznatky z tohoto oboru mohly použít u náhrad kůže po rozsáhlých popáleninách a v náhradách kostí, chrupavek nebo cév.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství (TE) je multidisciplinární obor na pomezí medicíny, biologie a technických oborů *(Langer et al., 2016)*. TE poskytlo slibné perspektivy k překonání omezené účinnosti konvekčních technologií možností léčby nebo transplantace orgánů. Značný pokrok v terapiích kmenových buněk, vědeckých biomateriálech a vývoji doručovacích systémů schopných napodobit produkci růstových faktorů může nabídnout průlomy v léčbě různých onemocnění *(Hassanzadeh et al., 2018)*. Cílem TE je příprava biologicky ekvivalentních náhrad tkání a případně i orgánů. Téměř každá tkáň lidského těla byla studována z hlediska možnosti nahrazení živými tkáňovými strukturami *(Langer et al., 2016)*. Použití TE pro navrhování funkčních náhražek poškozených nebo chybějících tkání může poskytnout velké úspěchy v regeneračních terapiích *(Hassanzadeh et al., 2018)*.

Hlavními zájmy TE jsou především buňky (nejčastěji kmenové a progenitorové), biomateriály (dvourozměrné filmy, trojrozměrné struktury (3D) ve formě scaffoldů, nanovlákna, hydrogely, nanočástice, mikrokapsle, biogel pro 3D tisk, směsi přírodních látek a/nebo syntetických látek a další) a přidání bioaktivních molekul, jako jsou růstové hormony a léčiva, pro zlepšení a/nebo regeneraci tkání pro biomedicínské aplikace *(Aramwit et al., 2017)*.

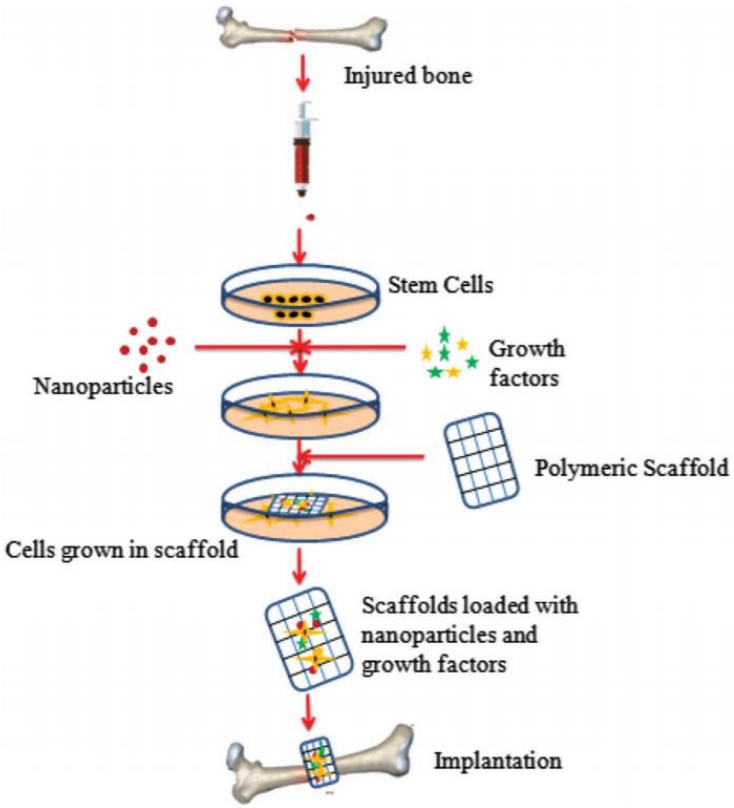
Široké používání dlouhodobých implantátů v různých oborech medicíny je spojeno se zvyšující se poptávkou po materiálech vhodných k nahrazení kostí pro rekonstrukci funkce kostních tkání a jejich rychlého a účinného hojení *(Ehlert et al., 2019)*. I když existuje několik materiálů, které jsou zjevně žádoucí pro biologické aplikace, jejich povrchové vlastnosti vyžadují modifikace k uspokojení poptávky ve velmi komplikovaném biosystému *(Wu et al., 2019)*. V oblasti biomimetických materiálů a technologie tkáňových implantátů je, kromě chemického povrchu, důležitost nanometrické topografie povrchu a drsnost biomateriálů stále více uznávaná jako rozhodující faktor pro přijetí tkáně a přežití buněk *(Park et al., 2007)*. Drsnost povrchu nanočástic je jednoznačně považována za faktor pozitivně ovlivňující adhezi, růst a fenotypovou maturaci buněk. To je vysvětleno skutečností, že nanostrukturovaný materiál připomíná nano-architekturu přírodní extracelulární matrice (ECM) *(Solař et al., 2015)*.

Povrchové úpravy jsou nutné například k úpravě kompatibility krve s umělou srdeční chlopní, k ovlivnění buněčné adheze a proliferace ortopedické nebo kostní osteointegrace, ke zlepšení odolnosti proti opotřebení, odolnosti proti korozi spoje nebo kyčelních implantátů a v neposlední řadě ke změně transportních vlastností dodávek léků a kontrole adsorpce proteinů. Metoda osteointegrace spočívá v upevňování protézy a implantátu přímo ke kosti. Tyto povrchové úpravy lze provádět pomocí různých metod prostřednictvím mechanických, chemických, elektrochemických nebo fyzikálních přístupů *(Wu et al., 2019)*.

Poptávka po technologiích schopných léčit kostní vady, které jsou obtížně opravitelné, je v posledních letech na vzestupu. Tento úkol, doprovázený příchodem funkčně přizpůsobených, biokompatibilních a biologicky rozložitelných materiálů, získal obrovský zájem o výzkum v kostním TE. Výsledkem je, že různé materiály a výrobní metody byly za tímto účelem zkoumány, což vedlo k hlubšímu pochopení geometrických, mechanických a biologických požadavků spojených s kostními scaffoldy *(Wubneh et al., 2018)*. V současné době je většina strategií kostního TE založena na porézních a biokompatibilních scaffoldech očkovaných tkáňově specifickými buňkami *(Chen et al., 2019)*.

Jedním z klíčových faktorů pro úspěch TE je rozvoj již zmíněného scaffoldu, který musí mít optimální vlastnosti *(Hassanzadeh et al., 2018)*. Využití scaffoldu jako nosiče nanočástic a růstových faktorů je nedílnou součástí postupů v TE (obrázek 1). Při výrobě scaffoldů se používají tři odlišné skupiny biomateriálů, a to přírodní, syntetické polymery a keramika. Polymery zahrnují přírodní a syntetické polymery *(Soundarya et al., 2018)*. Přírodní scaffoldy jsou přístupné, ale jejich složení závisí na původu zvířat a čištění. Pro výrobu syntetických scaffoldů by měla být zvážena celá řada parametrů. Kromě morfologických omezení, povrchové funkčnosti, mechanických vlastností a biologické aktivity, zůstávají při navrhování těchto 3D struktur otázky ohledně toxicity zbytkového rozpouštědla scaffoldu, reprodukovatelnosti a biokompatibility *(Hassanzadeh et al., 2018)*. Scaffold by tedy měl být biologicky kompatibilní, hydrofilní, porézní a biologicky rozložitelný *(Purohit et al., 2019)*. Ačkoli vztah mezi velikostí pórů a tvorbou kostí je neprůkazný, je zřejmé, že porézní struktury poskytují větší prostor a plochu povrchu pro adhezi kostních buněk a růst kostí *(Yang et al., 2019)*. Póry pojímají buňky tak, aby proliferovaly a šířily se tak po scaffoldu, kde vytvoří integrovaný konstrukt buněčného scaffoldu. Bez pórů buňky přilnou a proliferují pouze na povrchu 3D struktury, což není žádoucí pro účely TE. V závislosti

na metodě výroby scaffoldu mohou některé z nich vykazovat nízkou porozitu a s ohledem na materiál může u některých scaffoldů trvat déle, než se rozloží *(Purohit et al., 2019)*.



Obrázek 1: **Postup v kostním tkáňovém inženýrství:** Z poškozené kosti odběr kmenových buněk, přidání nanočástic a růstových faktorů, nasazení na scaffold, implantace na kost *(Shukla et al., 2017)*.

Kostní štěp nebo scaffold by měl napodobovat strukturu a vlastnosti přirozené kostní extracelulární matrice a poskytovat všechny potřebné environmentální podněty nalezené v kosti *(Soundarya et al., 2018)*. Jeho hlavním cílem je tedy poskytnout prostředí, ve kterém může probíhat proces remodelace kosti s minimálními komplikacemi *(Wubneh et al., 2018)*. Scaffoldy jsou vytvořeny z různých biomateriálů a byly vyrobeny za použití nepřeberného množství výrobních technik ve snaze regenerovat kosti v těle *(Soundarya et al., 2018)*.

Mezi různými strategiemi TE získalo v posledních letech přední postavení buněčné TE, kde je hlavní zapouzdření buněk do 3D struktury. Když měkká tkáň roste, mechanické vlastnosti scaffoldu se mohou měnit v důsledku sekrece matrice buňkami, a proto syntetické scaffoldy musí mít přirozené vlastnosti ECM, které se v průběhu času mění a stále musí mít za následek odpovídající mechanické vlastnosti potřebné pro

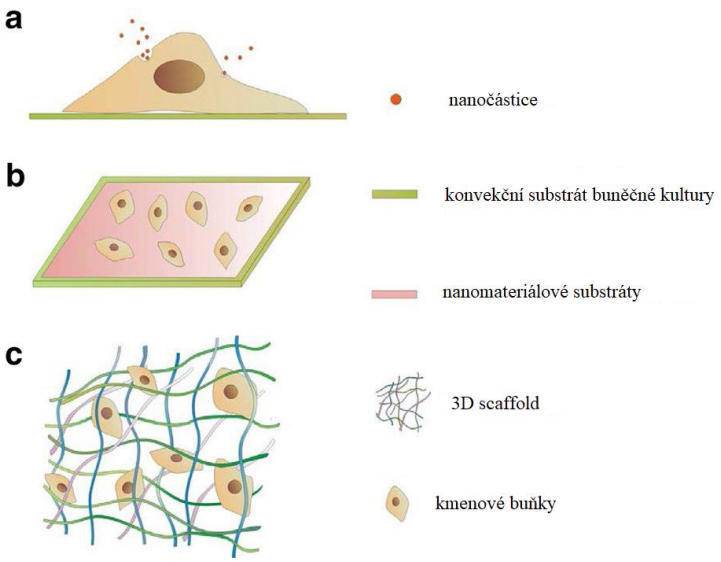
fungování tkáně. Jde vlastně o to, aby scaffold dozrál a stárnul na požadované mechanické vlastnosti v průběhu doby, kdy buňky v lešení rostou. Materiály, které se široce používají pro 3D výrobu měkkých tkání, jsou doposud polykaprolakton, polyvinylalkohol, chitosan, hedvábný fibroin a další. Nejčastěji se používají hydrogely kvůli snadnosti kontroly potiskovatelnosti, viskozity a schopnosti napodobovat tkáň *(Chawla et al., 2020)*.

V současné době se pro výrobu scaffoldu používají bioaktivní a biologicky resorbovatelné materiály kvůli jejich schopnosti stimulovat a podporovat regeneraci živé tkáně *(Purohit et al., 2019)*. Ze širokého spektra materiálů vhodných k výrobě scaffoldu používaných v TE vzbuzují nanovlákna a mikrovlákna velkou pozornost. S průměrem podobným sloučeninám extracelulární matrice vlákna napodobují přirozené prostředí buněk a zvyšují jejich adhezi a proliferaci *(Rampichová et al., 2017)*.

1.2. Nanomateriály

Díky svým jedinečným vlastnostem závislým na velikosti se nanomateriály uplatňují v nejrůznějších oborech. Jejich škála využití je od stavebnictví přes výrobky každodenního života až k aplikacím v medicíně a zdravotnictví. Do velké skupiny nanomateriálů patří titanové a uhlíkové nanomateriály, hedvábný fibroin, fullereny, nanocelulóza a další *(Laux et al., 2018)*.

Nanomateriály jsou materiály s mikrostrukturou charakteristické délky stupnice, která je v rozsahu nanometrů (nm). Nanomateriály mohou být použity v různých modulací (obrázek 2). Díky jejich malé velikosti, snadné syntéze a univerzálnosti v povrchové úpravě jsou široce používány k manipulaci chování buněk. Během posledního desetiletí různé materiály, včetně uhlíkových trubic, grafenu, nanočástic oxidu křemičitého, nanočástic oxidu titaničitého, stříbrných nanočástic a nanostruktury DNA byly intenzivně zkoumány v biologických a lékařských oborech. Ve skutečnosti existují různé typy nanomateriálů pro regulaci diferenciace kmenových buněk do různých typů buněk, včetně adipocytů, kardiomyocytů, osteoblastových buněk a nervových buněk prostřednictvím různých mechanismů. Pro propagaci diferenciace buněk je běžné přidávání specifických diferenciačních faktorů, jako jsou růstové faktory a bioaktivní molekuly do média *(Wei et al., 2017)*.

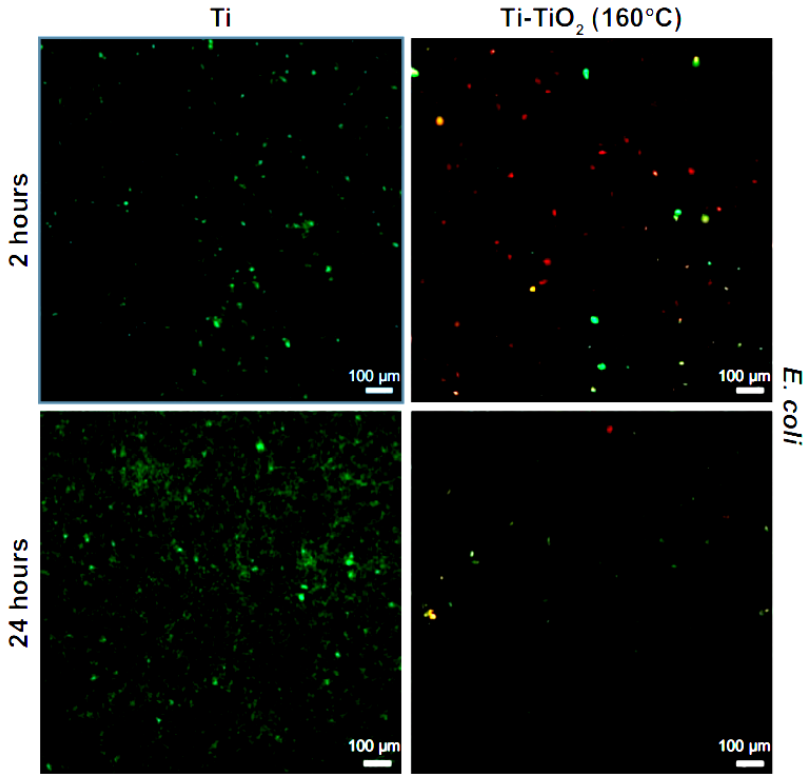


Obrázek 2: **3 druhy modulace nanomateriálů pro diferenciaci kmenových buněk**: a) nanomateriály jako nanočástice, b) dvourozměrný matrix, c) 3D scaffold *(Upraveno dle Wei et al., 2017).*

1.2.1. Titanové nanomateriály

Materiály založené na titanu jako zástupci kovových biomateriálů jsou uznávány jako nejslibnější materiály pro ortopedické implantáty. Titan je považován za bioinertní materiál s dobrou biokompatibilitou, vynikající odolností proti korozi a vhodnými mechanickými vlastnostmi. Stabilní vrstva oxidu titaničitého (TiO_2) o tloušťce 3-10 nm se samovolně tvoří, když je titan vystaven vzduchu nebo vodě a obdařuje tak povrch biokompatibilitou *(Liu et al., 2017).* S ohledem na již zmíněnou dobrou biokompatibilitu a vysoce uspořádanou strukturu nanotrubic, schopnost TiO_2 nanočástic podporovat diferenciaci kmenových buněk přitahuje velkou pozornost *(Wei et al., 2017).* U implantátů založených na titanu se předpokládá, že přirozeně vytvořená tenká vrstva TiO_2 působí jako bariéra mezi implantátem a tkání, aby se zabránilo uvolňování kovových iontů do těla a následné minimalizace šancí na imunitní odpověď. Nedávné studie však ukázaly, že tato několik nanometrů tenká vrstva neposkytuje dostatečnou dlouhodobou ochranu proti korozi. Na druhou stranu TiO_2 ve formě nátěrů byl také značně využíván pro antibakteriální aktivitu v důsledku fotokatalýzy, což dokazuje slibný potenciál v boji proti infekcím bez obětování osteointegrace *(Liu et al., 2017).* Kromě toho TiO_2 lze vyrobit jako 3D scaffold pro diferenciaci kmenových buněk. TiO_2 3D scaffoldy potažené alginátem obsahující simvastatin nebo derivát matrice skloviny mohou řídit osteogenní diferenciaci kmenových buněk *(Wei et al., 2017).*

Liu et al. ve své studii poprvé zavedli depozici atomové vrstvy s řízenou teplotou, která poskytuje jedinečný TiO_2 povlak na titanových substrátech. Tento povlak na implantátech na bázi titanu pomocí techniky depozice atomové vrstvy ukázal slibnou antimikrobiální účinnost vůči grampozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*), gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*) a bakteriím rezistentním vůči antibiotikům (MRSA – methicilin rezistetntní kmeny *S. aureus*). Nejen že povlak TiO_2 inhiboval bakteriální adhezi a růst, ale také do určité míry usmrtil bakterii. Na obrázku 3 je vidět, že na titanovém substrátu s TiO_2 vrstvou byly po 24 hodinách kultivace usmrceny bakterie *E. coli*. Díky této vlastnosti existuje silný potenciál v použití tohoto povlaku v oblasti ortopedických implantátů (*Liu et al., 2017*).



Obrázek 3: **Fluorescenční mikrograf zobrazující bakterie *Escherichia coli***: kultivovaný po 2 a 24 hodinách na titanovém (Ti) vzorku a titanovém vzorku s povlakem oxidu titaničitého (Ti-TiO_2) při teplotě 160 °C. Zeleně jsou zobrazeny živé a červeně mrtvé buňky *(Liu et al., 2017)*.

Další hojně využívanou sloučeninou je nitrid titanu (TiN). TiN je využíván jako nátěrový materiál pro různé aplikace. Povlak TiN se v biomedicínské aplikaci používá ke zvýšení tvrdosti a odolnosti proti korozi, v ortodoncii, ke snížení opotřebení chirurgické slitiny, ortopedických implantátů, kyčelních protéz a kardiovaskulárních biomateriálů. Povlak TiN je využíván nejen díky své biokompatibilitě, ale je také považován za žádoucí materiál pro styk s krví *(Wu et al., 2019)*.

Jelikož je titan biokompatibilní materiál, ale není bioaktivní, je zapotřebí zlepšit osteointegraci implantátů titanu/slitiny titanu. Jedním z takových způsobů zlepšení je modifikace jejich povrchu, architektury a fyzikálně-chemických vlastností. Na základě výsledků dřívějších výzkumů lze konstatovat, že buňky jsou vysoce citlivé na jakékoli změny v morfologii, struktuře, drsnosti a povrchové energii. Tyto faktory mohou přímo ovlivnit rychlost a stupeň buněčné adheze, proliferace, diferenciace a také mají vliv na morfologii buněk *(Ehlert et al., 2019)*. Za účelem zlepšení osteointegrace mezi povrchem titanového implantátu a kostní tkání, byly vyvinuty různé techniky povrchových úprav, jako je např. pískování a leptání kyselinou (SLA), laserová ablace a hydroxyapatitová vrstva *(Han et al., 2016)*. Jinou možnou modifikací pórovitého titanu za účelem překonání jeho bioinertních účinků je implantace tantalu, nebo vápníku *(Wang et al., 2016)*.

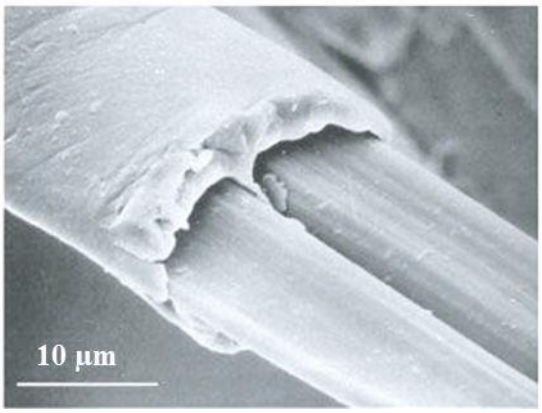
Titan a jeho sloučeniny jsou široce používány ve všech oborech klinické medicíny *(Tian et al., 2015)*. Používá se například jako součást biomateriálů pro léčení kostních defektů a pro výrobu kardiovaskulárních stentů *(Wu et al., 2015)*. Využívá se v ortopedii, například při artroplastice, a to zejména kloubu kyčelního či kolenního.

1.2.2. Hedvábí

Hedvábí je jedinečný vláknitý protein, který poskytuje univerzální polymerní šablonu. Fibroin, hlavní složka hedvábného proteinu, je dokonalý substrát pro proliferaci a adhezi široké škály buněk *(Liu et al., 2010)*.

Existuje více variant hedvábí, ale zájem byl věnován především hedvábí bource morušového (*Bombyx mori*) (obrázek 4), a to díky jeho dostupnosti a žádoucím vlastnostem, jako je snadnost s jakou může být chemicky modifikován, jeho biokompatibilita, jeho pomalá rychlost degradace *in vivo* a jeho schopnost být zpracován do několika materiálových formátů z vodného roztoku nebo organických rozpouštědel *(Huang et al., 2018)*.

Dříve se hedvábí používalo hlavně v textilním průmyslu, ale v poslední době našel různé využití v biomedicínské oblasti, zejména díky jeho vysoké pevnosti v tahu, kontrolovatelné biologické rozložitelnosti, hemostatické vlastnosti, nízké cytotoxicitě, nízké antigenicitě a nezánětlivým reakcím *(Huang et al., 2018; Liu et al., 2010)*.



Obrázek 4: **Struktura hedvábí bource morušového**: Snímek hedvábí bource morušového z elektronového mikroskopu *(Huang et al., 2018)*.

Hedvábné hydrogely jsou atraktivní biomateriály pro aplikace tkáňového inženýrství, protože jejich tuhost může být doladěna a mohou zahrnovat růstové faktory a další buněčné signalizační faktory pro optimalizaci buněčných funkcí. Mikro-strukturované a elastické hedvábné hydrogely podporují růst a proliferaci kmenových buněk po dobu delší než 3 týdny. Tyto hydrogely se také používají pro opouzdření kmenových buněk a pro *in vivo* implantáty *(Huang et al., 2018)*.

Struktura scaffoldu z hedvábí je považována za důležitý faktor ve studiích tkáňového inženýrství. *Sommer et al.* ve své studii zjistili, že rozsah velikosti pórů hedvábného scaffoldu zpočátku ovlivnil morfologii regenerované kosti, ale po 5 týdnech v kultuře tyto rozdíly zmizely *(Sommer et al., 2016)*.

Kromě toho produkty fibroinu vykazují vysokou biologickou kompatibilitu, nízkou imunogenitu, kontrolovatelnou biologickou degradaci a omezenou bakteriální adhezi *(Goncharenko et al., 2016)*.

1.3. Buňky používané v tkáňovém inženýrství

V kostním TE je používána celá řada somatických a kmenových buněk, například autologní osteoblasty, embryonální kmenové buňky, kmenové buňky kostní dřeně a další. Osteoblasty, jakožto plně diferencované buňky byly použity pro *in vitro* i *in vivo* studie týkající se rekonstrukce kostí. Cytokompatibilita různých materiálů v jakémkoli formátu (prášek, granule a scaffold) se obvykle hodnotí pomocí těchto buněk. Uplynulo dvacet let od první implantace porézního biomateriálu naočkovaného buňkami, implantace byla provedena u lidského pacienta s defektem segmentu kosti *(Kargozar et al., 2019)*.

Dalšími používanými buňkami jsou lidské diploidní fibroblasty (buněčný kmen WI-38), které jsou odvozené od ženského plodu plic a lidských endoteliálních buněk získaných z umbilikálních cév plodu *(Bettini et al., 2008)*. *In vitro* modelem široce používaným například ve výzkumu Parkinsonovy choroby je buněčná linie neuroblastomu SH-SY5Y. Tato linie je sublinií buněčné linie SK-N-SH, která byla založena v kultuře v roce 1970 z biopsie kostní dřeně metastatického neuroblastomu čtyřletého dítěte a prošla třemi koly klonální selekce *(Xicoy et al., 2017)*. Dalším příkladem buněčných linií jsou lidské plicní epiteliální buňky (L-132) a lidské monocyty (THP-1), které byly použity při porovnání cytotoxických účinků nanočástic oxidu zinečnatého a oxidu křemičitého s jejich velikostí mikronů a k porovnání odpovědí mezi těmito buňkami a částicemi *(Sahu et al., 2016)*.

Buňky osteosarkomu jsou odvozeny od maligních nádorů kostí a jsou běžně používány jako osteoblastové modely. Tři různé buněčné linie odvozené od osteosarkomu jsou MG-63, Saos-2 a U-2 OS *(Pautke et al., 2004)*.

Dále se budu věnovat nejčastěji používaným buňkám v kostním TE, buněčné linii MG-63.

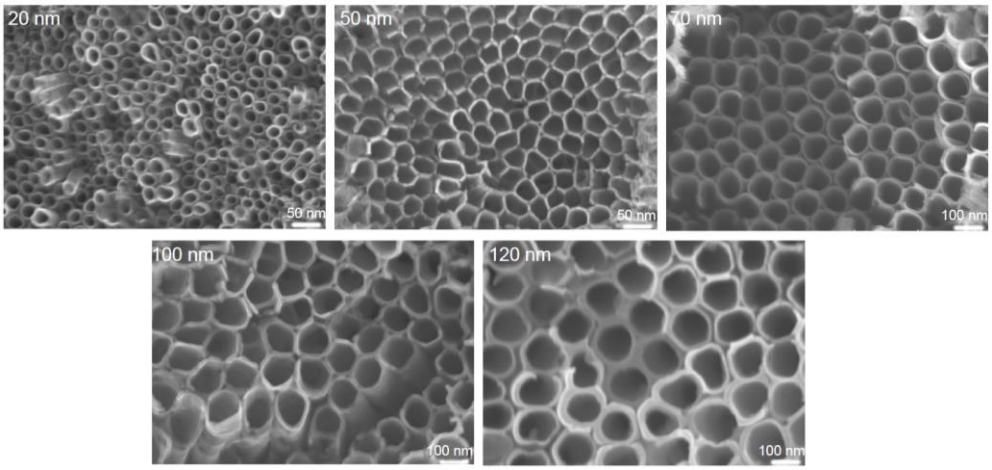
1.3.1. Buňky MG-63

Jedná se o osteoblastovou buněčnou linii osteosarkomu. MG-63 je běžně používaný model ke studiu životaschopnosti kostních buněk, proliferace a adheze na povrchy nosných materiálů, jako je například titan *(Wandiyanto et al., 2019)*. Bylo popsáno, že interakce mezi osteoblasty a filmy oxidu titaničitého zahrnují chemické reakce. Větší drsnost povrchu a povrchová energie, více povrchových hydroxylových skupin a přítomnost fibronektinu nebo vitronektinu jsou důležité prvky pro adhezi, šíření a proliferaci osteoblastů na titanových površích *(Hao et al., 2013)*.

Iwatta et al. ve své studii, k objasnění optimální stupnice mikrostruktury na mikro-/nano-titanových površích, použili povrchové mikrostruktury, které byly vyrobeny s vrstvou TiO_2, a to pomocí ošetření pískem a elektrochemickou anodizací. Buňky osteosarkomu MG-63 vykazovaly snížené šíření na menších mikrostrukturních površích při inkubaci po dobu 24 hodin *(Iwata et al., 2017)*.

Mikrotubuly jsou naprosto nezbytné pro životaschopnost buněk, pomáhají vytvářet struktury podílející se na buněčném dělení, buněčné polaritě a pohyblivosti, signalizaci z buňky do buňky a intracelulárním transportu *(Conduit, 2016)*. Bylo prokázáno, že mikrotubuly sestávající z heterodimerů α–tubulinu a β–tubulinu se podílejí

na pohybu buněk, intracelulární výměně a mitóze. Acetylovaný α–tubulin je součástí stabilních mikrotubulů, a deacetylace α–tubulinu zvyšuje pohyblivost buněk. Základní jednotkou spojovací struktury mezi buňkami a nanotrubicemi je komplex ECM-integrin-cytoskelet. *Tian et al.* porovnali expresi acetylovaného α–tubulinu v buňkách MG-63 kultivovaných na nanotrubicovitém povlaku o průměrech 20 a 120 nm (obrázek 5). Bylo dokázáno, že na nanotrubicovitém povlaku s průměrem 20 nm byla evidentně nižší exprese již zmíněného acetylovaného α–tubulinu, zatímco na nanotrubicovitém povlaku s průměrem 120 nm byla exprese v buňkách zvýšena. Kritický průměr pro adhezi, šíření a proliferaci buněk byl pro nanotrubice 20 nm. Větší průměry nanotrubic mají za následek sníženou migrační kapacitu a proliferaci a zvýšenou apoptózu buněk *(Tian et al., 2015)*.

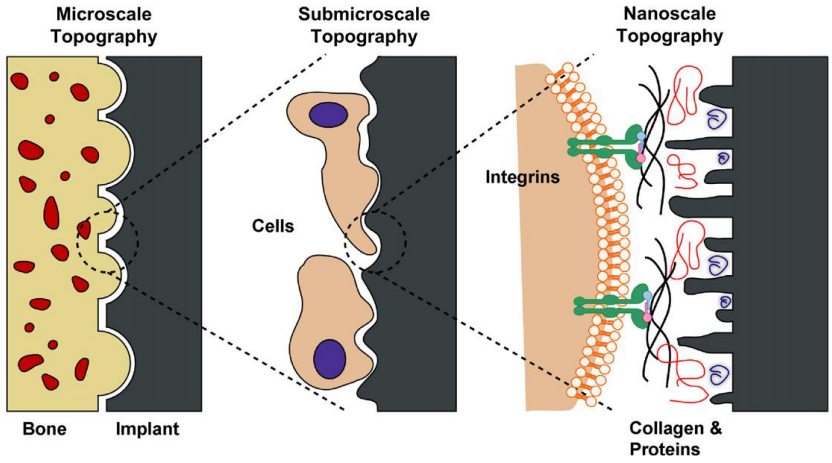


Obrázek 5: **Řez vrstvami svisle orientovaných nanotrubic TiO_2 s různými průměry**: od 20 nm až do 120 nm *(Tian et al., 2015)*.

Kombinace depozice nanočástic pomocí zdrojů plynové agregace a přetírání takových nanočástic je účinnou metodou pro výrobu nanostrukturovaných povrchů. Růst lidských buněk MG-63 může být pozitivně ovlivněn nanostrukturou a největší množství buněk přilnutých na povrch, bylo na struktuře o 30 nm *(Solař et al., 2015)*.

Role proteinů a kolagenu je důležitou součástí v interakci kosti s implantovaným povrchem (obrázek 6). *Gittens et al.* pozorovali vliv různě upravených titanových nanomateriálů na hladiny osteokalcinu, osteoprotegerinu a vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) *(Gittens et al., 2011)*. VEGF, někdy také označovaný jako VEGF-A, je homodimerický glykoprotein. VEGF-A reguluje většinu endoteliálních odpovědí, jako je proliferace a migrace endoteliálních buněk a cévní permeabilita. Tento glykoprotein je klíčovým regulátorem v tvorbě nových cév (angiogeneze), která má důležitou roli v embryonálním vývoji, orgánové homeostáze a ve vývoji nemocí

(Matsumoto et al., 2014). Buňky MG-63 byly nasazené na předem ošetřeném titanovém disku, nano-modifikovaném předem ošetřeném titanovém disku, pískovaném/leptaném kyselinou a nano-modifikovaném, pískovaném/leptaném titanovém disku. Zatímco hladiny osteokalcinu, osteoprotegerinu a VEGF, které byly měřené pro předem ošetřené a nano-modifikované vzorky, nebyly znatelně odlišné, statisticky významné zvýšení hladin těchto markerů bylo pozorováno u vzorků pískovaných/leptaných kyselinou, které paralelizovaly nárůst v mikroskopickém měřítku drsnosti vzorků pískovaných/leptaných kyselinou vzhledem ke vzorkům předem ošetřených titanových disků a nano-modifikovaných předem ošetřených titanových disků. Další statisticky významné zvýšení hladiny osteokalcinu, osteoprotegerinu a VEGF oproti vzorkům pískovaných/leptaných kyselinou bylo pozorováno u vzorků nano-modifikovaných titanových disků. Výsledky ukázaly, že zavedení takových struktur v kombinaci s mikro-/sub-mikro stupnicí drsnosti zlepšuje diferenciaci osteoblastů a produkci lokálních faktorů, což naznačuje potenciál pro zlepšenou osteointegraci implantátů *in vivo (Gittens et al., 2011)*.



Obrázek 6: **Schéma interakce mezi kostí a implantovaným povrchem**: na různých topografických stupnicích, kost vs. implantát, role proteinů a kolagenu *(Gittens et al., 2011)*.

Sjöström et al. využili techniku anodizace přes masku na velkém titanovém povrchu, kdy byli schopni vytvořit nano-vzorový model povrchu ke studiu buněčné interakce s nanotopografickými funkcemi s jemně vyladěnými rozměry. Tato technika využívá nanoporézní anodu oxidu hlinitého jako šablony, která poskytuje masku pro vzor titanu s homogenními poli a laditelnými titanovými strukturami *(Sjöström et al., 2011)*.

Ultrafialová (UV) fotokatalýza, jedinečná povrchová vlastnost polovodičů jako je například titan, byla použita jako metoda úpravy povrchu, která může zlepšit biologickou reakci na titan bez změny povrchových prvků. Tato jedinečná vlastnost

výrazně zvýšila bioaktivitu mikroměřítkového titanu jak *in vivo*, tak i *in vitro*. *Wu et al.* provedli studii za účelem posouzení účinku UV předúpravou nanostrukturového titanu *in vitro,* dále zkoumali chování osteoblastů na substrátech a prozkoumali fyzikálně-chemické mechanismy, které jsou základem UV světla na nanoměřítku titanu. V této studii byla porovnána biokompatibilita UV ošetřených a UV neošetřených titanových nanotrubek. UV ošetřené nanotrubky zvýšily řadu biologických činností, včetně adsorpce bílkovin, adheze buněk a proliferaci buněk. Bylo dokázáno, že na UV ošetřeném titanu se snižuje obsah kyselých hydroxylů a zvyšuje se kladný náboj. Výsledkem této studie je teorie, že ošetření UV zvyšuje biokompatibilitu snížením elektrostatického odpuzování mezi biomateriály a biomolekulami *(Wu et al., 2015)*.

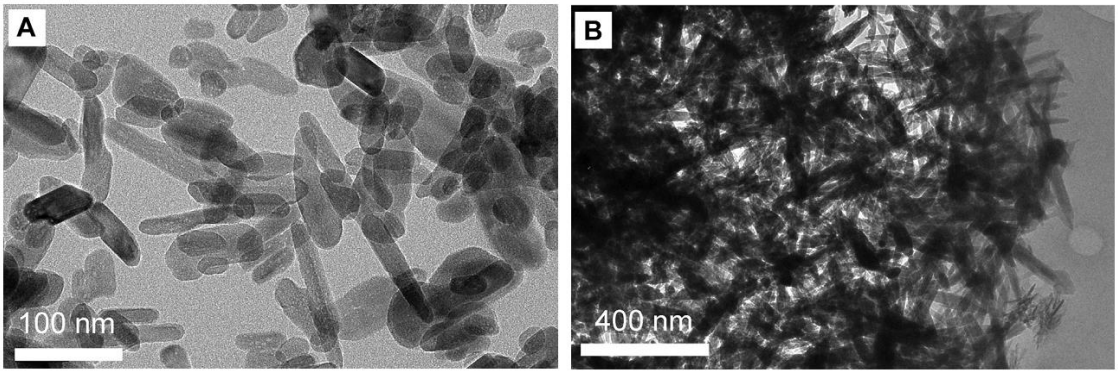
Ošetření UV na titanových površích se může kombinovat s ponořením do alendronátu, což je typ dusíkatých bisfosfonátů, který je v současné době jedním z nejúčinnějších činidel pro léčbu různých onemocnění kostí. Tato látka zvyšuje aktivitu alkalické fosfatázy (ALP) a podporuje expresi genů kódujících kostní morfogenní protein 2, kolagen I. typu a osteokalcin, což ukazuje na jeho schopnost indukovat proliferaci a zrání osteoblastů. Současná aplikace UV ošetření a ponoření do alendronátu měla za následek větší diferenciaci buněk MG-63 a bylo prokázáno, že tato metoda zlepšuje osteointegraci titanových implantátů *(Jeon et al., 2019)*.

Možnou modifikací titanu s tantalem je případ, kdy se vyrobil pomocí plazmatické implantace iontů a depozice zamotaný porézní titan (EPT) s implantovaným tantalem, který kombinoval výhody titanu a tantalu. Dvě kontrolní skupiny sestávaly z EPT implantovaných s vápníkem a EPT bez implantace vápníku. I když nebyl zjištěn žádný rozdíl v povrchové topografii a mechanické výkonnosti, experimenty *in vitro* potvrdily pozitivní účinky EPT implantovaných s tantalem při zlepšování životaschopnosti buněk MG-63, proliferace, diferenciace, mineralizace extracelulární matrice a exprese osteogenních markerů. Pokusy *in vivo* prokázaly příznivé vlastnosti implantovaných EPT s vápníkem a vynikající vlastnosti EPT implantovaných s tantalem při zlepšování osteogenní aktivity, povrchu osteointegrace a nového růstu kostí. Přestože EPT implantované s vápníkem mohou účinně propagovat povrchovou osteointegraci a nový růst kosti, EPT implantované s tantalem mají stabilnější a trvalejší účinky dlouhodobě. Proto mohou být EPT implantované s tantalem využity jako jeden z vysoce efektivních materiálů pro výrobu štěpu při rekonstrukci kosti *(Wang et al., 2016)*.

Hydroxyapatit (HA) je považován za bioaktivní materiál, který příznivě ovlivňuje adhezi, růst a osteogenní diferenciaci osteoblastů. Biologický HA extrahovaný

z organismu obsahuje řadu domén různě nabitých povrchů, nezávisle na topografii, které ukazují jejich potenciál vázat různé proteiny matrice. V složených materiálech je HA kombinován s řadou monomerních a polymerních materiálů, jako je oxid křemičitý, alginát nebo hedvábný protein. Tato kombinace polymerů a keramiky ve formě složených materiálů může překonat nevýhody kvůli jejich nevhodným mechanickým vlastnostem pro aplikace nesoucí zatížení *(Filova et al., 2014)*.

Anorganický HA, který byl ve formě nano-HA (n-HA), použili ve své studii *Lin et al.* spolu s organickým hedvábným fibroinem (SF). Materiály byly vyrobeny pomocí zjednodušených ko-precipitačních metod a byly uloženy na substráty ze slitiny titanu. Výsledky takto vzniklých sloučenin hedvábného fibroinu a nano-hydroxyapatitu (SF/n-HA) ukázaly, že materiály SF/n-HA měly lepší osteogenní diferenciaci buněk MG-63 než samotné n-HA materiály (obrázek 7). Proto je SF/n-HA vhodnější pro diferenciaci MG-63 na osteoblast. SF díky jeho buněčné biokompatibilitě tedy může být důvodem pro vyšší proliferaci a diferenciaci buněk a jeho přidáním do nano-hydroxyapatitu může vzrůst právě tato schopnost buněčné proliferace a diferenciace na materiálech *(Lin et al., 2015)*. V mnoha dalších studiích už jen samotné přidání HA k různým materiálům zlepšilo růst kostních buněk *(Filova et al., 2014)*.



Obrázek 7: **Porovnání snímků hydroxyapatitu a sloučeniny hedvábného fibroinu a nano-hydroxyapatitu**: snímky z transmisního elektronového mikroskopu; A) TEM snímek čistých nanokrystalů hydroxyapatitu, B) TEM snímek sloučeniny hedvábného fiborinu a nano-hydroxyapatitu (*Lin et al., 2015*).

Nano-povrch s homogenní nanovláknovou texturou byl připraven alkalicko-hydrotermální úpravou a jeho účinky na hojení tkáně a antimikrobiální vlastnosti byly vyhodnoceny *in vitro* a porovnány s hladkým povrchem vyrobeným leštěním a mikro-povrchem pomocí SLA. Výsledky ukázaly, že nano-povrch zvýšil osteogenní diferenciaci lidských osteoblastů MG-63 *(Miao et al., 2017)*. Bylo

opakovaně prokázáno, že nanostruktura substrátu pro růst buněk má stimulační účinek na adhezi buněk a následný růst *(Vandrovcová et al., 2014)*. Z klinického hlediska může nanostrukturovaný titanový povrch podporovat hojení periimplantační kosti a měkké tkáně a také omezit bakteriální infekce, což by bylo prospěšné pro včasné nakládaní a dlouhodobý úspěch a přežití dentálních implantátů *(Miao et al., 2017)*.

Ke studiu buněčné diferenciace můžou být využity binární sloučeniny titanu. Jako stabilizační prvky pro binární sloučeniny titanu byly zvoleny: železo, molybden, vanad a zirkon. Stabilizační účinek vybraných kovů se zvyšuje v pořadí zirkon, vanad molybden a železo. Ve stavu čistého kovu vanad a železo indukují vyšší cytotoxicitu, zatímco molybden a zirkon mají nízkou cytotoxicitu. Aby se zvýšila biologická aktivita, byly do vrstvy mikroporézního oxidu binární sloučeniny titanu začleněny ionty vápníku a fosforu. Mikroporézní a mikro/nanoporézní povrchy vedly ke zvýšené počáteční adhezi buněk. I když mikro/nanoporézní povrchy měly nižší celkový obsah proteinu než hladké povrchy a mikroporézní povrchy po inkubaci buněk MG-63 po dobu sedmi dnů, měly mikro/nanoporézní povrchy tendenci k vyšším aktivitám ALP. Mezitím se molybdenové a vanadové ionty uvolněné z mikroporézní nebo z mikro/nanoporézní vrstvy oxidu chovaly pozitivně k dosažení vyšší životaschopnosti a diferenciace buněk, ale uvolněné železo způsobilo pokles životaschopnosti a diferenciace buněk. Závěrem této studie se dospělo ke zjištění, že buněčná diferenciace závisí na mikrostruktuře a typu legujících prvků slitiny titanu *(Han et al., 2016)*.

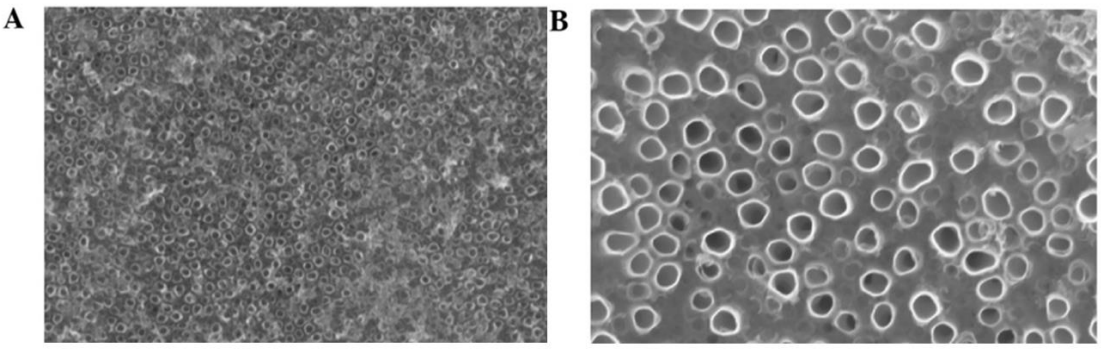
Ozařování femtosekundovým laserem je vzhledem k vysoké opakovatelnosti, flexibilitě a schopnosti generovat širokou škálu povrchových struktur vysoce atraktivní výrobní metodou pro změnu zvlhčovacích vlastností, nebo vzorců chování buněk. Laserové strukturování vzorků Ti6Al4V je zajímavé pro řadu biomedicínských aplikacích. Ti6Al4V je materiál používající se pro kostní implantáty, jako kyčelní a kolenní klouby a obecně v rekonstrukční chirurgii *(Schnell et al., 2019)*. Tato slitina je používána hlavně díky své vysoké pevnosti, odolnosti vůči korozi, vysoké lomové houževnatosti a nízké hmotnosti *(Agius et al., 2018)*. Elastický modul slitiny Ti6Al4V je však až desetkrát větší než u lidské kosti a jako příčina selhání implantátu se často uvádí nesoulad pružného modulu mezi kostí a materiálem implantátu. Kromě toho zde také panují určité obavy ohledně toxicity hliníku a vanadu přítomných v této slitině, které se mohou uvolňovat do těla pasivním rozpouštěním filmu a způsobovat tak například neurologické poruchy, alergické reakce, osteomalacii nebo Alzheimerovu

chorobu *(Hao et al., 2013; Afzali et al., 2019)*. Vzhledem k těmto toxickým účinkům se povrch slitiny upravuje.

V důsledku ozáření povrchů femtosekundovým laserem nebyl odhalen žádný cytotoxický účinek. Nano/mikro povrchy vytvořené laserovými procesy ovlivnily adhezi, morfologii a růst buněk MG-63. Výsledkem studie je zjištění, že femtosekundová laserová nano/mikro textura je dobrým nástrojem pro produkci topograficky funkcionalizovaných povrchů materiálu pro vedení adheze a růstu kostních buněk. Růst lidských osteoblastů MG-63 je závislý na nano/mikro texturách s femtosekundovým laserem strukturované slitiny titanu. Mikrostruktury se zřetelným pilířovým mikro-profilem vykazovaly jasné zhoršení adheze a šíření buněk. Laserové procesy se dobře hodí pro zdrsnění titanových povrchů, a tedy pro modifikování biomateriálů v regenerativní medicíně *(Schnell et al., 2019)*.

Použitím metody přímé oxidace povrchu slitiny Ti6Al4V lze na jejím povrchu vyrobit hydrofobní vláknitý TiO_2 scaffold. Úroveň životaschopnosti buněčné linie MG-63 se zvýšila po 72 hodinách kultivace na zcela amorfním TiO_2 povrchu nanovláken než na kontrolním vzorku (Ti6Al4V) *(Ehlert et al., 2019)*.

Kvůli toxicitě vanadu a hliníku ve slitině Ti6Al4V byly pro medicínské aplikace navrženy nové slitiny titanu obsahující netoxické a nealergické prvky, včetně niobu, tantalu, zirkonu, molybdenu a cínu. Nová slitina titanu Ti-24Nb-4Zr-8Sn, která se označuje zkratkou Ti2448, vede k významnému zlepšení své vysoké pevnosti, vysoké odolnosti proti únavě a nízkému modulu pružnosti. Na této slitině byly anodizací vytvořeny nanoporézní fólie TiO_2 se dvěma různými velikostmi pórů (30 a 90 nm) (obrázek 8). 30 nm nanoporézní filmy TiO_2 na této slitině mohou poskytovat optimální bioaktivní povrch implantátu pro počáteční adhezi osteoblastů *(Hao et al., 2013)*.

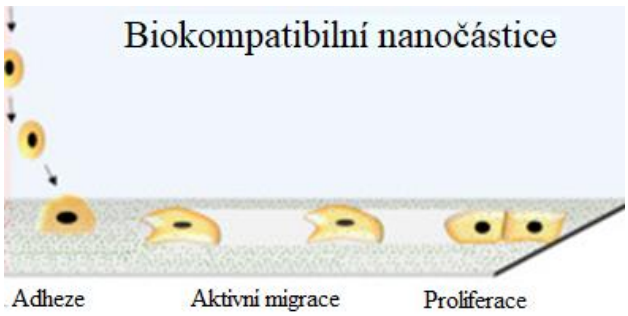


Obrázek 8: **Morfologický povrch slitiny Ti2448 po anodizaci**: A (30 nm), B (90 nm) *(Upraveno dle Hao et al., 2013).*

1.3.1.1. Markery adheze

Adheze buněk k titanovým materiálům je zprostředkována proteiny adsorbovanými na povrchu z kultivačního média nebo produkovaného buňkami. Proteiny ECM, jako je fibronektin, vitronektin, kolagen a laminin obsahují specifické aminokyselinové sekvence, které se vážou na receptory integrinu na buněčném povrchu a ovlivňují tak buněčnou adhezi *(Babuska et al., 2020)*. Vitronektin slouží jako biomarker pro adhezi a šíření buněk. Adheze buněk k ECM usnadňuje vazba integrinů na funkční proteiny, jako je vitronektin a fibronektin. Vitronektin se může vázat s integriny a má konkurenční výhody ve srovnání s jinými hlavními proteiny. Buněčná adheze k ECM většinou vede ke shlukování integrinů do fokálních adhezních komplexů a náboru funkčních proteinů, včetně fibronektinu, fokální adhezní kinázy, extracelulárně regulované kinázy a dalších *(Tian et al., 2015)*.

Je známo, že fibronektin hraje důležitou roli v buněčné vazbě, růstu, migraci a diferenciaci *(Chang et al., 2016)*. Adheze, migrace a následná proliferace je znázorněna na obrázku 9. Fibronektin je makromolekulární glykoprotein, který by mohl mít více vazebných míst pro usnadnění ukládání na povrchu vzorku. Kromě toho je izoelektrický bod fibronektinu v rozmezí 5,6-6,1, což je velmi blízko fyziologickému pH. Proteinové molekuly vykazují nejvyšší povrchovou aktivitu a obecně se nejsnadněji adsorbují na povrchy, když je jejich pH blízko k povrchovému izoelektrickému bodu *(Lu et al., 2018)*. Mimo jiné se také uvádí, že se fibronektin podílí na adhezi a agregaci krevních destiček prostřednictvím receptorů integrinu aIIbβ3 (glykoprotein IIb/IIIa) na membráně destiček *(Chang et al., 2016)*. Fibronektin společně s albuminem jsou prospěšné proteiny pro absorpci na biomateriály a zprostředkovávají různé buněčné interakce v ECM, a hrají důležitou roli v antibakteriálních vlastnostech a adhezi buněk *(Lu et al., 2018)*.



Obrázek 9: **Chování biokompatibilních nanočástic**: Substrát buněčné kultury potažen nanočásticemi; následná adheze, migrace a nakonec proliferace buněk potažených biokompatibilními nanočásticemi na buněčný povrch *(Upraveno dle Pitchaimani et al., 2017).*

Nedávno se zdálo, že mírně hydrofilní povrchy jsou optimální pro adhezi buněk. Oba extrémy, jak ve formě hydrofobních, tak ve vysoce hydrofilních povrchů, narušují adsorpci proteinů zprostředkujících adhezi *(Babuska et al., 2020)*.

Fokální adhezní kináza slouží jako zprostředkovatel pro spojení kadherinu s aktinem v cytoskeletu a pro ovlivňování buněčného chování, včetně šíření, migrace a adheze *(Tian et al., 2015)*. Regulace fosfor-fokální adhezní kinázy a vitronektinu v buňkách kultivovaných na nanotrubkách s většími průměry znamená, že nedostatek funkční produkce ECM může narušit adhezi buněk k ECM, a to vede k inhibici vazby integrinů na fokální adhezní komplex a aktivaci přenosu intracelulárního signálu do cytoskeletu *(Tian et al., 2015)*.

Slitiny titanu a niobu přitahují v posledních letech hodně pozornosti, a to především jako slibné materiály pro výrobu kostních implantátu. *Vandrovcova et al*. zkoumali adhezi, růst a diferenciaci buněk MG-63 na nosičích z titanu (Ti) a niobu (Nb) na slitině TiNb povrchů oxidovaných při 165 °C za hydrotermálních podmínek a při 600 °C v proudu vzduchu. Předpokládá se, že na nanostrukturovaných substrátech s nepravidelnostmi určitých charakteristických rozměrů jsou proteiny zprostředkovávající buněčnou adhezi, jako je vitronektin a fibronektin, přítomné v doplňku séra buněčných kultivačních médií, adsorbovány ve vhodné a více fyziologické geometrické konformaci, která je díky nim dobře dostupná pro receptory buněčné adheze. Kromě toho nanostrukturované povrchy adsorbují přednostně vitronektin, protože jeho molekuly jsou menší a méně složité (lineární), než jiné molekuly extracelulární matrice. Vitronektin je pak rozpoznáván adhezními receptory na osteoblastech prostřednictvím sekvence aminokyselin lysin-arginin-serin-arginin přítomné v molekule vitronektinu *(Vandrovcova et al., 2014)*.

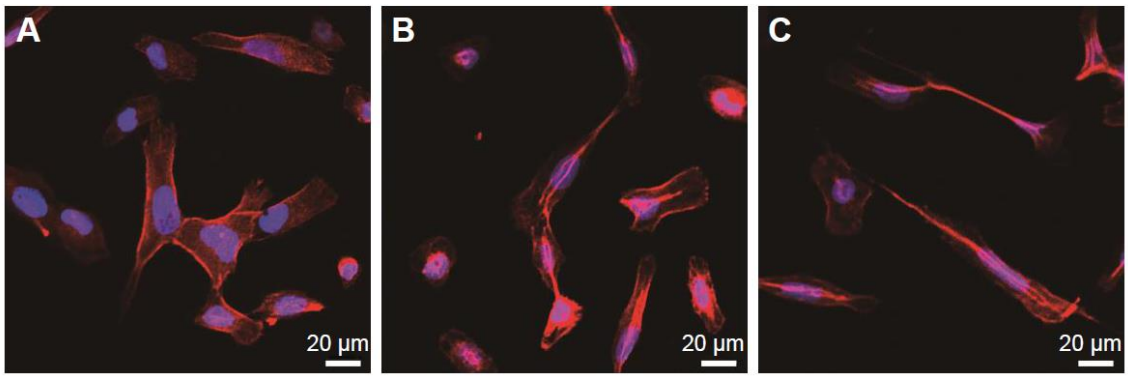
Buněčné reakce v blízkosti implantátů jsou silně ovlivněny hydrofilností povrchu, drsností, strukturou, chemickým složením, nábojem a morfologií. Vzhledem k této skutečnosti se několik studií pokusilo zvýšit adhezi a aktivitu osteoblastových buněk nanesením funkčních proteinů na titanový povrch. Metoda plazmy žárového výboje (GDP) byla použita ke zpracování disků titanu a další vzorky byly následně roubovány fibronektinem. Titanové vzorky roubované fibronektinem, které jsou ošetřeny metodou GDP by mohly zkrátit dobu osteointegrace a zlepšit osteointegraci v časných stádiích fixace zubního implantátu. Roubování pomocí metody GDP se může provádět i jinými funkčními proteiny, jako jsou proteiny ECM, kolagen typu I a albumin *(Chang et al., 2016)*.

Na sloučeninách s nano-HA vykazovaly buňky relativně vysoké koncentrace β-aktinu a také talinu, což je fokální adhezní protein spojený s aktinovým cytoskeletem. Příznivé účinky částic HA na adhezi a růst buněk byly vysvětleny zvýšenou smáčivostí kompozitního materiálu, změnami topografie povrchu materiálu, zlepšenou adsorpcí proteinů zprostředkujících buněčnou adhezi na povrch materiálu a také osteoindukčním účinkem HA. Sedmý den po naočkování kompozity s 5-15 hm.% HA (HA/matrix) významně zvýšily počet buněk ve srovnání s čistým materiálem bez HA. Tento účinek byl výraznější u kompozitů s mikro-HA než s nano-HA. Kompozity obsahující nano-HA podporovaly počáteční přichycení a proliferaci buněk MG-63 ve třetí den. Mikro-HA podporovalo přichycení buněk a až do koncentrace 15 hm.% významně zvýšilo hustotu buněk v sedmý den. Avšak vyšší koncentrace mikro-HA významně snížily růst a životaschopnost buněk MG-63, ačkoli podporovaly syntézu osteokalcinu v těchto buňkách *(Filova et al., 2014)*.

Předchozí studie ukázaly, že integrin β1 je důležitým můstkem pro adhezi osteoblastů na biomateriálech. Vyšší úrovně exprese integrinu β1 mohou přispívat k počáteční adhezi osteoblastových buněk k povrchu implantátu. Hladiny exprese integrinu β1 mRNA na 30 nm nanoporézním povrchu po 24 hodinách buněčné kultivace byly významně vyšší než hladiny na kontrolních neanodizovaných a 90 nm nanoporézních površích. Avšak 90 nm nanoporézní povrch vykazoval nižší expresní hladinu integrinu β1 mRNA ve srovnání s neanodizovaným kontrolním povrchem po 24 a 48 hodinách buněčné kultivace. Jak už bylo uvedeno výše, filmy nanoporézních oxidů na slitině Ti2448, zejména 30 nm nanoporézní film, mají významný vliv na adhezi buněk osteoblastů *(Hao et al., 2013)*.

Leštěné titanové destičky ošetřené anodickou oxidací a oxidací mikro obloukem byly použity jako modelové povrchy ke studiu adheze buněk MG-63. Anodická oxidace vytváří svisle zarovnané nanotrubice TiO_2 na titanovém substrátu a oxidace mikro obloukem může poskytnout titan s mikroporézním povlakem fosforečnanu vápenatého. Buňka obvykle používá integriny k přenosu informací z extracelulární matrice do vnitřku buňky, ale taková vnější signalizace také zprostředkovává reakci na povrchy a tato signalizace má významný vliv na adhezi a proliferaci buněk. Titanové destičky ošetřené anodickou oxidací a oxidací mikro obloukem významně podporovaly buněčnou adhezi a tvorbu ECM stimulací sekrece fibronektinu z buněk MG-63. Za stimulovaný růst buněk na modifikovaném titanu je zodpovědný konkrétně integrin α_5 *(Zhou et al., 2014)*.

Tepelná hydrogenace anodizovaných nanotrubek z TiO_2 (TNT) vytvořených elektrochemickou oxidací titanu může zlepšit hydrofilitu bez změny morfologie. Zvýšená smáčivost povrchu ve vzorku hydrogenovaných TNT významně zlepšila počáteční adsorpci proteinu, což je důležité pro podporu adheze a diferenciace osteogenních buněk. Kromě toho zvýšená míra uvolňování kyslíku a hydroxylových skupin podél celé délky nanotrubice v hydrogenovaných TNT snižují rychlost uvolňování proteinu. Tyto hydrogenované TNT vykazovaly vyšší kapacitu pro adsorpci hovězího sérového albuminu uvnitř nanotrubic. Díky super-hydrofilnímu povrchu indukovanému hydrogenací bylo zejména na hydrogenovaných TNT adsorbováno více proteinu než na kontrolních TNT. Hydrogenované TNT, které použily ve své studii *Lu et al.*, byly schopny zachytit relativně malá množství proteinu a usnadnit ukládání fibronektinu. Morfologie buněk pozorovaná pomocí fluorescenční mikroskopie (obrázek 10) prokázala, že ve srovnání s buňkami MG-63 na povrchu titanu a kontrolních TNT měly buňky MG-63 na povrchu hydrogenovaných TNT prodlouženou morfologii s rozšířenějšími filopodii a pravidelným uspořádáním aktinového cytoskeletu. Ukázalo se, že protáhlý tvar je prospěšný pro diferenciaci osteoblastů. Hydrogenace by mohla zlepšit smáčivost a adsorpci proteinů TNT, což je důležité pro časný osteointegrační účinek na kost *(Lu et al., 2018)*.



Obrázek 10: **Morfologie buněk MG-63 ve fluorescenčním mikroskopu**: A – titanové substráty, B – kontrolní TNT, C – hydrogenované TNT; Červeně je znázorněn aktin a modře jádro *(Lu et al., 2018)*.

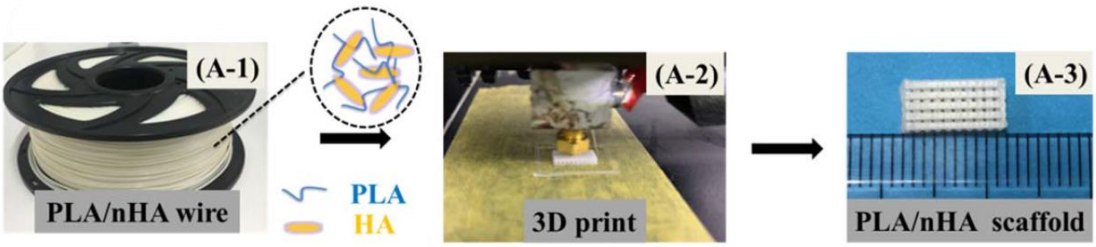
1.3.1.2. Chování MG-63 na 3D scaffoldu

3D tisk, také známý jako aditivní výroba, je proces spojování materiálů pro vytváření objektů z 3D modelových dat, obvykle vrstvu po vrstvě. Scaffold tkáňového inženýrství by měl pro vybrané buňky poskytovat vodivé prostředí a nedávným trendem je vytváření přizpůsobených scaffoldů s předem navrženými tvary, strukturou

a funkcemi pro zvýšenou regeneraci tkáně. Vhodnou povrchovou úpravou mohou být biologicky aktivní molekuly a buňky rozpoznatelné ligandy fyzikálně nebo chemicky spojené s povrchem scaffoldu *(Wang et al., 2020)*.

Buněčná adheze závisí jak na materiálu scaffoldu, tak i na jeho organizaci, včetně 3D struktury. Malé G proteiny z rodiny GTPáz (Ras, Rac, Rho a Cdc42) se podílejí na regulaci reorganizace aktinu. Zejména se ukázalo, že aktivita RhoA ve 3D podmínkách byla nižší než na plochých biopolymerních filmech. Osteogeneze a reorganizace cytoskeletu mohou být vyvolané nejen 3D podmínkami, ale také expozicí chemickým faktorům. Například dexametazon indukuje změny v dynamice reorganizace cytoskeletu aktinu, což úzce souvisí s rychlými změnami hladin cAMP v buňkách a spouštěním signálních drah, které vedou buňky k osteogenní diferenciaci. Kultivace buněk MG-63 na mineralizovaných fibroinových scaffoldech zvyšuje hladinu exprese ALP *(Goncharenko et al., 2016)*. Exprese ALP je časným příznakem zrání osteoblastů a naznačuje *in vitro* diferenciaci osteoblastů na zralé kostní buňky a mineralizaci matricí. Kalcifikované uzly se vytvářejí po určité době proliferace osteoblastů, představují zrání růstu a diferenciace osteoblastů a jsou tedy důležitým markerem pro identifikaci osteoblastů. Tvorba těchto uzlů přímo odráží schopnost osteoblastů indukovat mineralizaci matrice *(Zeng et al., 2015)*.

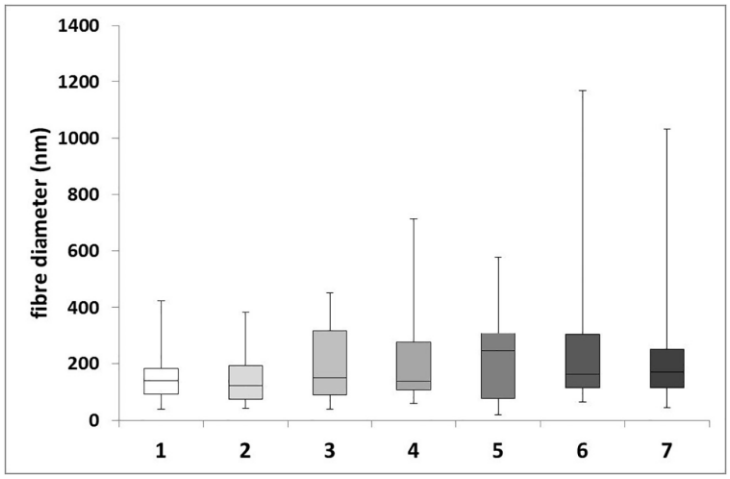
Pro výrobu biomateriálů vhodných pro regeneraci kostí byly vyvinuty přípravky na bázi biologicky rozložitelných polymerů kyseliny polymléčné (PLA). PLA je vyrobena z dextrózy extrahované z biologických materiálů, jako je kukuřice nebo celulóza. Bohužel biologicky rozložitelné syntetické materiály, jako je právě PLA, jsou spíše křehké a obvykle vykazují relativně malé deformace při přetržení, vysokou tuhost a nízkou plasticitu pro malé deformace. Tyto mechanické vlastnosti jsou často nekompatibilní s biologickými aplikacemi *(Belaid et al., 2020)*. Účinnou strategií k překonání těchto problémů je zavádění nanočástic nebo nanovláken. K potažení PLA nanomateriálů se využívá HA kvůli jeho velké podobnosti s přírodním apatitem a jeho dobře známými osteokonduktivními a osteoinduktivními vlastnostmi. Výroba scaffoldů vyrobených z PLA a potažených nano-HA spočívá v 3D tisku drátků do podoby scaffolu (obrázek 11). Scaffoldy vyrobené z PLA a potažené nano-HA podporovaly proliferaci buněk MG-63 *in vitro* a kromě toho měly schopnost zvýšit osteogenezi a osteokonduktivitu *in vivo (Chen et al., 2019)*.



Obrázek 11: **Výroba porézního scaffoldu z kyseliny mléčné/nano-hydroxyapatitu**: (A-1) - drát sloučeniny kyseliny mléčné/nano-hydroxyapatitu, následuje tisk vrstvením vláken do 3D struktury (A-2) a nakonec vznik porézního scaffoldu z kyseliny mléčné/nano-hydroxyapatitu (A-3) *(Chen et al., 2019)*.

Kyselina poly-L-mléčná (PLLA) je jedním z dobře definovaných substrátů, který se používá pro adhezi osteoblastů. Obecně je většina substrátů PLLA pro kultury osteoblastů z netoxických, biologicky rozložitelných materiálů, které jsou používány jako materiály scaffoldu v TE. Bylo zkoumáno chování a osteogenní aktivita MG-63 buněk naočkovaných na různých scaffoldech PLLA a HA založených na kolagenu. Buňky MG-63 přilnuly k povrchům materiálu, udržely si dobré přichycení a zároveň byly schopné proliferovat na povrch, což naznačuje že scaffoldy jsou netoxické *(Cecen et al., 2015)*.

Stankova et al. ve své studii využili nanovláknitý scaffold vyrobený z PLLA s diamantovými nanočásticemi, který měl spíše negativní účinky na adhezi, růst a osteogenní diferenciaci lidských buněk MG-63. Počet, šíření, životaschopnost a mitochondriální aktivita těchto buněk klesala se zvyšující se koncentrací diamantových částic ve scaffoldu (0,44-12,28 %). Rovněž rostoucí množství diamantových částic mělo za následek vyšší maximum průměru vlákna PLLA (obrázek 12). Exprese mRNA pro fokální adhezní proteiny vinkulin a zejména talin se významně snížila na scaffoldu s nejvyšší koncentrací diamantových nanočástic (12,28 %) ve srovnání s čistými scaffoldy PLLA a většinou scaffoldů naložených diamantovými nanočásticemi. Avšak na scaffoldech s nejnižší koncentrací diamantových nanočástic (0,44 %) byla exprese talinu dokonce vyšší než na čistých PLLA scaffoldech. To naznačuje určitý podpůrný účinek diamantových nanočástic na adhezi buněk zvýšením tuhosti scaffoldu. Lze tedy dojít k závěru, že diamantové nanočástice s rozměry 4-5 nm použité v této studii měly škodlivý účinek na buňky podobné lidským osteoblastům MG-63 *(Stankova et al., 2019)*.



Obrázek 12: **Distribuce průměrů vláken poly-L-laktidu se zvyšující se koncentrací diamantových nanočástic**: 0 % (1), 0,44 % (2), 0,87 % (3), 1,72 % (4), 3,38 % (5), 6,54 % (6), 12,28 % (7). Rostoucí množství diamantových částic má za následek vyšší maximum průměru vlákna *(Stankova et al., 2019)*.

Zvláštní pozornost byla věnována zejména antimikrobiálním nanočásticím. Tyto látky mají fyzikálně-chemické vlastnosti, díky nimž jsou jedinečné mezi všemi antimikrobiálními látkami. Jejich tvar, zvětšená plocha povrchu a velikost, v kombinaci s jejich toxickou povahou vůči prokaryotickým organismům, z nich činí mimořádně atraktivní multifunkční látky. Nanočástice oxidu zinečnatého mohou být použity jako potahový materiál k inhibici bakteriální adheze a podpoře růstu osteoblastů.

K nanesení směsí nanočástic oxidu zinečnatého a n-HA na povrch skleněných substrátů byla využita elektrohydrodynamická atomizace. Nano-potažené substráty byly vystaveny *S. aureus* suspendovaným v pufrovaném fyziologickém roztoku nebo hovězím séru, aby se stanovila antimikrobiální aktivita. Výsledky studie ukázaly, že 100% nanočástice oxidu zinečnatého a kompozitní potahované substráty (75 % nanočástice oxidu zinečnatého/25 % nano-hydroxyapatit) mají významnou antimikrobiální aktivitu. Buňky MG-63 kultivované na substrátech nanočástic oxidu zinečnatého nevykazovaly uvolňování cytokinů (tumor nekrotizující faktor-α a interleukin-6) a tudíž nebyla vyvolána žádná zánětlivá odpověď, když byly buňky ponechány k přilnutí na potažené povrchy *(Memarzadeh et al., 2015)*.

Na titanovém povrchu byla vyvinuta nano-strukturovaná vrstva obohacená ionty vápníku a stříbra. Stříbro je dobře známým antibakteriálním činidlem, které se obvykle nanáší na povrch materiálu, aby ho chránilo před bakteriálním napadením, avšak jeho přebytek na povrchu materiálu může způsobit toxicitu pro lidské buňky. Bylo možné optimalizovat poměr iontů vápníku a stříbra na povrchu titanu tak, aby měl minimální koncentraci stříbra, která může mít nejen antimikrobiální aktivitu ale také kompatibilitu

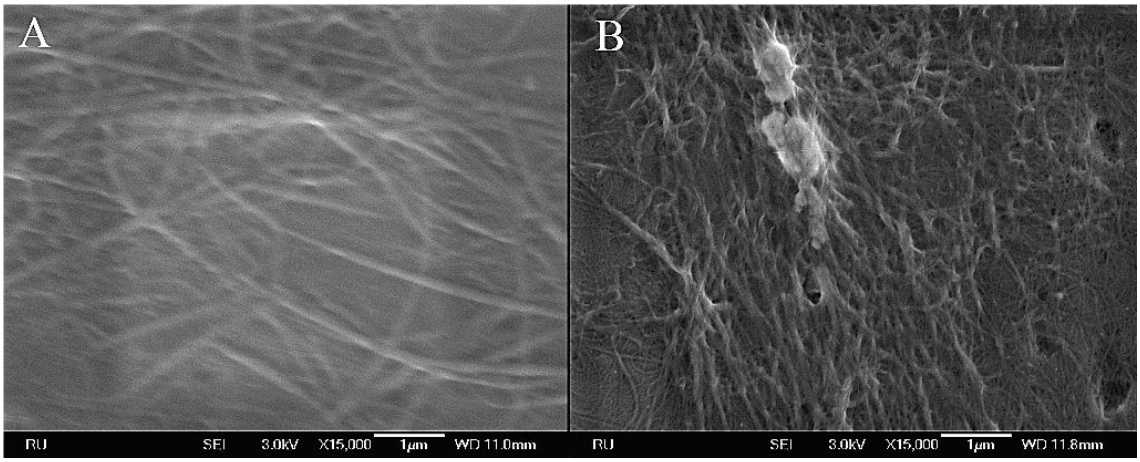
s buňkami MG-63. Takováto povrchová modifikace je užitečná v ortopedických implantátech, které vyžadují zvýšenou biologickou a antibakteriální aktivitu a kompatibilitu s buňkami *(Rajendran et al., 2019)*.

Mezoporézní bioaktivní skla mají velký potenciál v aplikacích kostního TE, která silně souvisejí s jejich schopností podporovat depozici HA a další tvorbou vysokopevnostního rozhraní mezi přírodní tkání a biomateriálem. Začlenění bioaktivních skel do polymerních matric vede k vytvoření hybridních systémů, které rozšiřují jejich oblast použití, což umožňuje navrhování biomimetických scaffoldů při zlepšování rozhraní mezi buňkami a materiálem. Mezoporézní bioaktivní skleněné nanočástice byly úspěšně a homogenně začleněny do kolagenové vláknité matrice typu I. Takto navržený scaffold byl schopen uvolňovat ionty stroncia až 7 dní s udržitelnější kinetikou ve srovnání se samotnými částicemi mezoporézního bioaktivního skla. Zesítění vzorků nemělo žádné podstatné zlepšení mechanické a tepelné stability materiálu, nicméně jak nezesíťované, tak i ty zesíťované vzorky vykazovaly vysokou biokompatibilitu podporující dobrou životaschopnost a přilnavost buněk MG-63 (*Montalbano et al., 2019)*.

Pro aplikace v kostním TE byl vytvořen 3D tiskem scaffold z PLA za použití techniky modelování tavené depozice a zesílen začleněním oxidu grafenu. Průměrná velikost pórů scaffoldu byla mezi 400 a 500 mikrometry. Začlenění oxidu grafenu mělo za následek drsnější povrch, přechod z hydrofobního povrchu na hydrofilní a vylepšení termomechanických vlastností. Ve srovnání s buňkami pěstovanými bez scaffoldu, buňky MG-63 vykazovaly vyšší životaschopnost v přítomnosti PLA a sloučenině PLA s oxidem grafenu nezávisle na procentuálním zastoupení oxidu grafenu ve sloučenině. Sloučenina PLA s oxidem grafenu podpořila adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk MG-63 na povrch scaffoldu *(Belaid et al., 2020)*.

Destičky jsou často používány v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně jako zdroj přírodních cytokinů a růstových faktorů. Destičky hrají důležitou roli při hojení a regeneraci ran a zánětlivé odpovědi. Jednou z hlavních výhod jejich použití jako zdroje růstového faktoru je možnost autologního použití, což snižuje imunitní reakci. Destičky byly kombinovány s 3D scaffoldem poly-ε-kaprolaktonu. Biologické hodnocení v modelu buněčné linie MG-63 ukázalo zlepšenou metabolickou aktivitu, proliferaci a aktivitu ALP ve srovnání s nefunkčním vláknitým scaffoldem. Kromě toho odpověď buněk byla závislá na dávce se zlepšenou biokompatibilitou se zvyšující se koncentrací destiček *(Rampichová et al., 2017)*.

Kolagen je jedním z nejpoužívanějších proteinů pro regeneraci tkání. Kolagen I. typu je hlavní organická složka kostní matrice, která má vynikající biologickou kompatibilitu, biologickou rozložitelnost, nízkou toxicitu a antigenicitu a umožňuje dobré připojení kostních buněk *(Ion et al., 2016)*. Filmy poly-(laktid-ko-glykolidu) byly potaženy kolagenem typu I nebo kolagenem typu I s chondroitin sulfátem, aby se prozkoumal účinek chondroitin sulfátu na chování osteoblastové buněčné linie MG-63. Buňky na kolagenu I s chondroitin sulfátem vytvořily četná filopodia a vykazovaly vyvinuté fokální adhezní plaky obsahující vinkulin. Navíc tyto buňky obsahovaly výrazně vyšší koncentraci osteokalcinu než buňky na čistém kolagenu. Tato vyšší koncentrace osteokalcinu je následkem přidání chondroitin sulfátu jako proteinu vázajícího vápník, který je vyžadován pro zrání osteogenních buněk (konkrétně pro mineralizaci kostní matrice). Povlaky kolagenu I s chondroitin sulfátem podporují proliferaci buněk MG-63, zlepšují adhezi buněk a zvyšují diferenciaci osteogenních buněk. Snímky z elektronového mikroskopu ukazují, že tyto povlaky kolagenu I s chondroitin sulfátem mají za následek kratší, tenčí vlákna (obrázek 13). Kolageny obsahují vazebná místa pro osteoprogenitorové buňky a kolagenové povlaky mají zlepšené připojení, šíření a proliferaci osteoblastů *(Vandrovcová et al., 2011)*.



Obrázek 13: **Snímek kolagenových vláken na poly-(laktid-ko-glykolidu)**: snímky z elektronového mikroskopu; (A) kolagen na discích z poly-(laktid-ko-glykolidu); (B) kolagen spolu s chondroitin sulfátem na discích z poly-(laktid-ko-glykolidu); potažení kolagenem spolu s chondroitin sulfátem mělo za následek kratší, tenčí vlákna *(Vandrovcová et al., 2011)*.

Alginát, nejčastěji používaný hydrogel, má požadované vlastnosti scaffoldu, především schopnost zesíťování prostřednictvím přirozeně přítomných kationtů, jako je vápník (Ca^{2+}), dobrou retenci vody a biokompatibilitu. I přesto má alginát i své nevýhody, jako je buněčná adheze, migrace a životaschopnost, a proto se pro zlepšení těchto vlastností zabudovávají bioaktivní proteiny a peptidy, jako je kolagen, želatina, fibrin nebo kyselina arginin-glycin-asparagová. Právě alginát ve spojení s želatinou byl zkoumán ve své studii *Chawla et al*. a k pozorování chování buněk na různých procentech výplně v rámci scaffoldu stejné koncentrace byly použity buňky osteoblastů MG-63. 3D scaffoldy alginát-želatina jsou hemokompatibilní, cytokompatibilní a je také podporovaná *in vitro* tvorba apatitu v simulované tělní tekutině, čímž se potvrzuje bioaktivní povaha scaffoldu. Mechanická vlastnost 3D scaffoldu byla dynamická a zapouzdření buněk v nich zlepšilo pevnost v tlaku o 40 % během pouhých 3 dnů inkubace a tudíž přirozený proces tvorby tkáně může být napodoben zapouzdřením buněk do 3D konstrukce. Jak 20, tak 25% výplň uvnitř alginát-želatinového scaffoldu vedla k vyšší životaschopnosti a proliferaci osteoblastových buněk *(Chawla et al., 2020)*.

S cílem zlepšit regeneraci kosti byl vyroben nano-kompozitní scaffold z oxidu grafenu, želatiny a alginátu. Oxid grafenu získal význam v biomateriálním výzkumu díky svým pozoruhodným chemickým a mechanickým vlastnostem. Obsahuje různé funkční skupiny kyslíku (epoxy, hydroxyl, keton, karboxy a dioly), které dělají jeho povrch otevřený pro kovalentní elektrostatickou a vodíkovou vazbu s biomolekulami, jako je polysacharid, proteiny, aptamery a nukleové kyseliny. Nano-kompozitní scaffold ze želatiny, alginátu a oxidu grafenu vykazoval dobrou pórovitost, biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost a mechanickou pevnost. Začlenění oxidu grafenu do alginátové a želatinové matrice může změnit jak fyzikální, tak chemické vlastnosti upravených nano-kompozitních scaffoldů a má za následek dobré připojení buněk a proliferaci buněk MG-63 *(Purohit et al., 2019)*.

V současné době se v oblasti TE používají různé keramické částice, protože mají pozoruhodné vlastnosti, které mohou zvýšit osteogenní kapacitu scaffoldu. Mezi nimi byl použit nano-oxid křemičitý související se schopností tvorby apatitu pro anorganickou depozici.

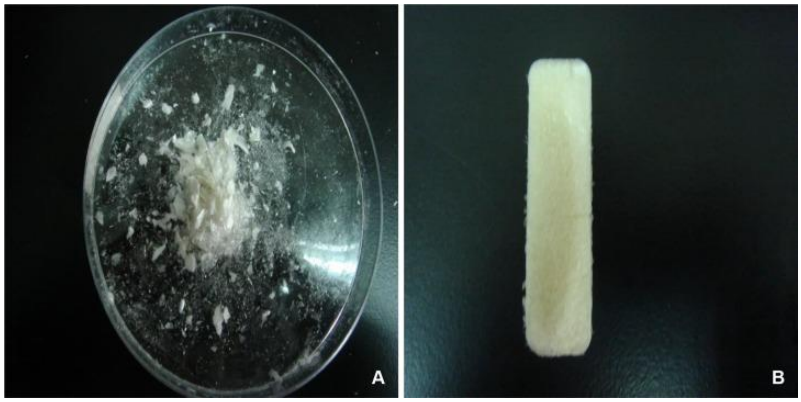
Khatami et al. zkoumali osteogenní vlastnosti alginát-nano-křemičitých hydrogelů obohacených kolagenem a želatinou na buněčné linii MG-63. Zavedení kolagenu a želatiny vedlo ke snížení velikostí póru alginát-nano-křemičitanových hydrogelů.

Kromě toho přítomnost kolagenu na rozdíl od želatiny podporovala mechanickou integritu a snížila rychlost degradace. Přežití buněk podporoval jak kolagen, tak i želatina. Mikrokapsle obsahující kolagen a želatinu podporovaly vyšší rychlost ukládání a mineralizaci vápníku než samotné mikrokapsle alginát-nano-křemičitanu. Detekce transkripční úrovně osteokalcinu a kostního morfogenetického proteinu ukázala, že kolagen měl potenciál indukovat morfogenezi kosti. Tyto výsledky ukazují, že mikrokapsle mohou urychlit diferenciaci osteoblastů a mineralizační proces. Začlenění kolagenu a želatiny tedy zlepšilo vlastnosti a buněčnou proliferaci a diferenciaci alginát-nano-křemičitanových hydrogelových mikrokapslí a ty mohou být dále použity jako vlivní kandidáti pro produkci kostních tkání *in vitro* a pro modulární aplikace inženýrství kostních tkání *(Khatami et al., 2019)*.

Pro aplikace TE byly vyvinuty scaffoldy na bázi bioaktivního skla pokryté nanočásticemi HA naplněnými ionty Mg^{2+}, Zn^{2+} a nebo oběma ionty najednou *(Dittler et al., 2019)*. Bioaktivní sklo je materiál, který dokáže opravit, nahradit a regenerovat tělesné tkáně, může vytvořit vazbu mezi tkáněmi a materiály a jeho degradační produkty mohou podporovat produkci růstových faktorů, proliferaci buněk, genovou expresi osteoblastů a růst kostní tkáně *(Yang et al., 2019)*. Povrchová modifikace bioaktivního skla pomocí HA, HA s Mg nebo HA s Zn nepřináší zvláštní výhody, když jsou tyto materiály použity jako scaffold pro účely TE s ohledem na nemodifikované scaffoldy bioaktivního skla. Scaffold bioaktivního skla s HA a dvojitým plněním ionty Mg a Zn byl ovšem schopen vytvořit hustou vrstvu fosforečnanu vápenatého již po jednom dni inkubace v biologicky relevantním médiu. Kromě toho bylo pozorováno významné zvýšení biologické kompatibility a proliferačních vlastností buněk MG-63 s ohledem na nepotažené scaffoldy bioaktivního skla a bioaktivního skla s HA. Scaffold bioaktivního skla s HA dvojitým plněním ionty Mg a Zn může být považován jako potenciálně antibakteriální scaffold *(Dittler et al., 2019)*.

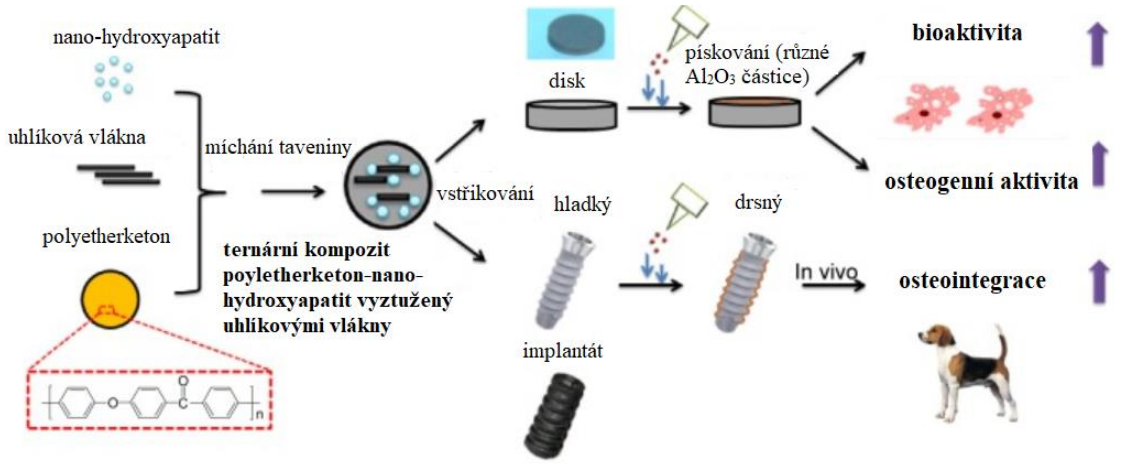
Použití dvou nebo více vzájemně modifikovaných materiálů pro konstrukci kompozitních scaffoldů se stalo důležitým trendem. Konkrétně SF a chitosan mají jedinečné výhody a získaly velkou pozornost. Čistý SF v práškové formě je obtížné uchopit a má špatné mechanické vlastnosti (obrázek 14). SF/chitosan je oblíbený materiál díky své dobré tkáňové kompatibilitě. Materiál vhodný pro osteoblasty musí mít také dobrou afinitu k buňkám, ale i schopnost udržovat ECM osteoblastů a usnadňovat opravu kostí. Materiál složený z 40% SF a 60% chitosanu, který byl vyroben lyofilizací, má dobrou kompatibilitu a buňky MG-63 na něm rostly dobře.

Rychlost adheze a proliferace byly významně zvýšeny ve srovnání se skupinou slepých kontrolních vzorků. 40% SF/60% chitosan podporoval sekreci ALP buňkami, shlukování buněk, vylučování matrice a konečnou mineralizaci podstatně dříve než skupina se 100% chitosanem *(Zeng et al., 2015)*.



Obrázek 14: **Snímek čistého hedvábného fibroinu a scaffoldu hedvábného fibroinu/chitosanu po lyofilizaci**: A) čistý hedvábný fibroin v práškové formě, B) vzorek hedvábného fibroinu/chitosanu je nažloutle bílý s drsným povrchem a porézní vnitřní strukturou *(Zeng et al., 2015)*.

Mírná drsnost povrchu může zlepšit biologické vlastnosti biokompozitního implantátu na bázi polyetherketonu vyztuženého uhlíkovými vlákny, který je kandidátem v nahrazení chirurgických kovových implantátů. Navzdory atraktivním výhodám a pokroku v přípravě nových kompozitů/implantátů právě na bázi již zmíněného polyetherketonu vyztuženého uhlíkovými vlákny, použití nano-HA v ternárních kompozitech tohoto materiálu mu uděluje vynikající bioaktivní výkon a osteointegraci pro nosné ortopedické/dentální aplikace (obrázek 15). Vyhodnocení vlivu drsnosti povrchu ternárního kompozitu polyetherketon-nano-HA vyztuženého uhlíkovými vlákny na *in vitro* odpovědi buněk bylo provedeno s buněčnou linií MG-63. Hydrofilnost a množství iontů vápníku na povrchu se významně zlepšují se zvyšující se drsností povrchu kompozitu. Kompozit se střední drsností povrchu významně zvyšuje přilnutí/proliferaci buněk a podporuje expresi ALP a tvorbu vápenatých uzlů ve srovnání s ostatními skupinami. Tento ternární kompozit s vhodnou drsností povrchu silně posiluje cytokompatibilitu a osteogenezi *in vitro*, stejně jako podporuje osteointegraci *in vivo* v experimentu na modelu bígla. Kompozit by mohl být slibným kandidátem při výrobě zubních implantátů a náhrad kostních štěpů *(Deng et al., 2015)*.



Obrázek 15: **Schematický diagram ternárního kompozitu**: příprava a biologické hodnocení ternárního kompozitu polyetherketon-nanohydroxyapatitu vyztuženého uhlíkovými vlákny *(Upraveno dle Deng et al., 2015).*

Jako potenciální antikorozní a biokompatibilní povlak pro ortopedické implantáty může být využit povlak, který využívá vrstvu syntetických zeolitových krystalů (silikalit-1) nanesený na silikonovém substrátu. Silikalit-1 je čistě křemičitá forma zeolitu, která ve své struktuře neobsahuje potenciálně škodlivý hliník na rozdíl od jiných hlinito-křemičitanových typů zeolitu. Vrstva silikalitu-1 podporovala adhezi, proliferaci a životaschopnost buněk MG-63 lépe nebo v podobné míře jako standardní kultivační materiál – mikroskopická skleněná krycí sklíčka. Použití tohoto biokompatibilního nano- a mikro-strukturovaného povlaku bez hliníku v kostních implantátech je slibné zejména proto, že povrchové vlastnosti povlaku silikalitu-1 lze během procesu syntézy dále vyladit, aby se dosáhlo optimální interakce mezi buňkou a materiálem *(Doubková et al., 2019).*

Kyselina polymléčná-glykolová je rozložitelná, funkční sloučenina s dobrou biokompatibilitou a mechanickými vlastnostmi a je široce používána ve farmaceutických a lékařských inženýrských materiálech. Jelikož ale tato kyselina postrádá schopnost podporovat diferenciaci osteoblastů, je nutné ji kombinovat s jinými materiály. Pokusy na zvířatech ukázaly, že kombinace bioaktivního skla a kyseliny polymléčné-glykolové může podporovat regeneraci kostních defektů. Bylo prokázáno, že bioaktivní sklo uvolňuje vápník, fosfor a křemík z materiálu do plazmy, což stimuluje expresi ALP. V pokusech na zvířatech prováděných ve studii *Yang et al.* objevili zánětlivou reakci v oblasti transplantovaného nanoporézního scaffoldu sestávajícího z kyseliny polymléčné-glykolové a bioaktivního skla v časném pooperačním období. Časná zánětlivá odpověď je zprostředkována neutrofily

uvolňujícími reaktivní druhy kyslíku a zánětlivými cytokiny, které jsou zodpovědné za odstranění odumřelých buněk z oblasti štěpu. Mimo jiné byla také pozorována neovaskularizace štěpu, která není jen klíčem k přežití vlastního štěpu, ale je také důležitá pro osteogenezi. Scaffold s nanovláknitou trojrozměrnou síťovou strukturou s průměrem vlákna 160-320 nm vykazoval dobrou biokompatibilitu, která byla zkoumána pomocí osteosarkomové buněčné linie MG-63, podporoval buněčnou adhezi, a poskytoval kalcifikovanou matrici, která podporovala tvorbu osteoblastů a může se tak jednat o vhodný biologický scaffold pro opravu kostních defektů *(Yang et al., 2019)*.

ZÁVĚR

Cílem této práce byl popis rozdělení nanomateriálů používaných pro testování buněčné proliferace, poté popis typů buněk, které se k tomuto testování využívají spolu s buněčnými markery adheze a následně popis chování buněk na 3D nanomateriálech.

Velice často používaným nanomateriálem v tkáňovém inženýrství je titan a jeho sloučeniny, dále to může být hedvábí, kyselina mléčná nebo uhlíkové nanomateriály. Výhody nanomateriálů z titanu spočívají v jeho bioinertnosti, dobré kompatibilitě a odolnosti proti korozi. Ke studiím zabývajícím se proliferací a adhezí buněk na nanomateriály se využívají nejčastěji buňky osteoblastové linie osteosarkomu MG-63. Další používanou buněčnou linií jsou lidské diploidní fibroblasty WI-38, nebo buněčná linie neuroblastomu SH-SY5Y. Jako marker adheze slouží proteiny extracelulární matrice, z nich nejdůležitější jsou fibronektin, vitronektin, kolagen nebo laminin.

S neustálým pokrokem v medicíně, biologických a technických oborech je samozřejmostí i pokrok právě v oboru tkáňového inženýrství. Výzkumů s tímto zaměřením neustále přibývá. I když aplikace kmenových buněk na scaffold je novým příslibem do budoucnosti, je nutné provést další studie k objasnění kompatibility scaffoldů s tkáněmi pacienta. Zároveň je žádoucí prozkoumat možné inkompatibility u materiálů použitých k výrobě scaffoldů a případně tyto materiály upravit tak, aby byly tělu pacienta neškodné.

Použitá literatura

1) Afzali, P.; Ghomashchi, R. and Oskouei, R. H.: On the corrosion behaviour of low modulus titanium alloys for medical implant applications: a review. *Metals*. 2019, 9(8), str. 878-894.
2) Agius, D.; Kourousis, K. I. and Wallbrink, Ch.: A review of the as-built SLM Ti-6Al-4V mechanical properties towards achieving fatique resistant designs. *Metals*. 2018, 8(1), str. 75-99.
3) Aramwit, P.; Motta, A. and Kundu, S. C.: Tissue engineering: from basic sciences to clinical perspectives. *BioMed Research International*. 2017, 2017, str. 1-2.
4) Babuska, V.; Dobra, J. K.; Dluhos, L. *et al.*: Repeated exposure of nanostructured titanium to osteoblasts with respect to peri-implantitis. *Materials*. 2020, 13(3), str. 697-707.
5) Belaid, H.; Nagarajan, S.; Teyssier, C. *et al.*: Development of new biocompatible 3D printed graphene oxide-based scaffolds. *Materials Science & Engineering C*. 2020, 110, str. 1-10.
6) Bettini, R.; Romani, A. A.; Morganti, M. M. *et al.*: Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, 68(1), str. 74-81.
7) Cecen, B.; Kozaci, D.; Yuksel, M. *et al.*: Biocompatibility of MG-63 cells on collagen, poly-L-lactic acid, hydroxyapatite scaffolds with different parameters. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. 2015, 13(1) str. 10-16.
8) Conduit, P. T: Microtubule organization: a complex solution. *The Journal of Cell Biology*. 2016, 213(6), str. 609-612.
9) Deng, Y.; Liu, X.; Xu, A. *et al*.: Effect of surface rougness on osteogenesis in vitro and osseointegration in vivo of carbon fiber-reinforced polyetherketone-nanohydroxyapatite composite. *International Journal of Nanomedicine*. 2015, 10, str. 1425-1447.
10) Dittler, M. L.; Unalan, I.; Grünewald, A. *et al.*: Bioactive glass (45S5)-based 3D scaffolds coated with magnesium and zinc-loaded hydroxyapatite nanoparticles for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Bionterfaces*. 2019, 182, article 110346.

11) Doubková, M.; Němčáková, I.; Jirka, I. *et al.*: Silicalite-1 layers as a biocompatible nano- and micro-structured coating: an *in vitro* study on MG-63 cells. *Materials*. 2019, 12(21), str. 3583-3595.
12) Ehlert, M.; Roszek, K.; Jędrzejewski, T. *et al.*: Titania nanofiber scaffolds with enhanced biointegration activity – preliminary *in vitro* studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. 20(22), str. 5642-5660.
13) Filova, E.; Suchy, T.; Sucharda, Z. *et al.*: Support for the initial attachment, growth and differentiation of MG-63 cells: a comparison between nano-size hydroxyapatite and micro-size hydroxyapatite in composites. *International Journal of Nanomedicine*. 2014, 9, str. 3687-3706.
14) Gittens, R. A; McLachlan, T.; Olivares-Navarrete, R. *et al.*: The effects of combined micron-/submicron-scale surface rougness and nanoscale features on cell proliferation and differentation. *Biomaterials*. 2011, 32(1), str. 3395-3403.
15) Goncharenko, A. V.; Malyuchenko, N. V.; Moisenovich, A. M. *et al.*: Changes in morphology of actin filaments and expression of alkaline phosphatase at 3D cultivation of MG-63 osteoblast-like cells on mineralized fibroin scaffolds. Biochemistry. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016, 470(6), str. 716-719.
16) Han, O.-S.; Hwang, M.-J.; Song, Y.-H. *et al.*: Effects of surface structure and chemical composition of binary ti alloys on cell differentiation. *Metals*. 2016, 6(7), str. 150-164.
17) Hao, Y.; Li, S.; Han, X. *et al.*: Effects of the surface charactetistics of nanoporous titanium oxide films on Ti-24Nb-4Zr-8Sn alloy on the initial adhesion of osteoblast-like MG-63 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013, 6(1), str. 241-247.
18) Hassanzadeh, P.; Atyabi, F. and Dinarvand, R.: Tissue engineering: still facing a long way ahead. *Journal of Controlled Release*. 2018, 279, str. 181-197.
19) Huang, W.; Ling, S.; Li, Ch. *et al.*: Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chemical Society Reviews*. 2018, 47(17), str. 6486-6504.
20) Chang, Y.-C.; Lee, W.-F.; Feng, S.-W. *et al.*: *In vitro* analysis of fibronectin-modified titanium surfaces. *PLoS One*. 2016, 11(1), str. 1-12.
21) Chawla, D.; Kaur, T.; Joshi, A. *et al.*: 3D bioprinted alginate-gelatin based scaffolds for soft tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 144, str. 560-567.

22) Chen, X.; Gao, Ch.; Jiang, J. *et al.*: 3D printed porous PLA/nHA composite scaffolds with enhanced osteogenesis and osteoconductivity *in vivo* for bone regeneration. *Biomedical Materials*. 2019, 14(6), str. 1-15.

23) Ion, A.; Andronescu, E.; Rădulescu, D. *et al.*: Biocompatible 3D matrix with antimicrobial properties. *Molecules*. 2016, 21(1), str. 115-127.

24) Iwata, N.; Nozaki, K.; Horiuchi, N. *et al.*: Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation. *Wiley Online Library* (online: www.wileyonlinelibrary.com). 2017.

25) Jeon, C.; Oh, K. C.; Park, K.-H. *et al.*: Effects of ultraviolet treatment and alendronat immersion on osteoblast-like cells and human gingival fibroblasts cultured on titanium surfaces. *Scientific Reports*. 2019, 9, str. 1-11.

26) Kargozar, S.; Mozafari, M.; Hamzehlou, S. *et al.*: Bone tissue engineering using human cells: a comprehensive review on recent trend, current prospects, and recommendations. *Applied Sciences*. 2019, 9(1), str. 174-222.

27) Khatami, N.; Khoshfetrat, A. B.; Khaksar, M. *et al.*: Collagen-alginate-nano-silica microspheres improved the osteogenic potential of human osteoblast-like MG-63 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019, 120(9), str. 15069-15082.

28) Langer, R. and Vacanti J.: Advances in tissue engineering. *Journal of pediatric surgery*. 2016, 51(1), str. 8-12.

29) Laux, P.; Tentschert, J.; Riebeling, Ch. *et al.*: Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Archives of Toxicology*. 2018, 92(1), str. 121-141.

30) Lin, L.; Hao, R.; Xiong, W. *et al.*: Quantitative analyses of the effect of silk fibroin/nano-hydroxyapatite composites on osteogenic differentiation of MG-63 human osteosarcoma cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015, 119(5), str. 591-595.

31) Liu, L.; Bhatia, R. and Webster, T. J.: Atomic layer deposition of nano-TiO_2 thin films with enhanced biocompatibility and antimicrobial activity for orthopedic implants. *International Journal od Nanomedicine*. 2017, 12, str. 8711-8723.

32) Liu, T.-l; Miao, J.-ch.; Sheng, W.-h. *et al.*: Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. *Biomedicine & Biotechnology*. 2010, 11(1), str. 10-16.

33) Lu, R.; Wang, C.; Wang, X. *et al.*: Effects of hydrogenated TiO_2 nanotube arrays on protein adsorption and compatibility with osteoblast-like cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2018, 13, str. 2037-2049.

34) Matsumoto, K. and Ema, M.: Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumors. *The Journal of Biochemistry*. 2014, 156(1), str. 1-10.

35) Memarzadeh, K.; Sharili, A. S.; Huang, J. *et al.*: Nanoparticulate zinc oxide as a coating material for orthopedic and dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015, 103(3), str. 981-989.

36) Miao, X.; Wang, D.; Xu, L. *et al.*: The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: a systematic study. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, str. 1415-1430.

37) Montalbano, G.; Borciani, G.; Pontremoli, C. *et al.*: Development and biocompatibility of collagen-based composites enriched with nanoparticles of strontium containing mesoporous glass. *Materials*. 2019, 12(22), str. 3719-3735.

38) Park, J.; Bauer, S.; von der Mark, K. *et al.*: Nanosize and vitality: TiO_2 nanotube diameter directs cell fate. *Nano Letters*. 2007, 7(6), str. 1686-1691.

39) Pautke, Ch.; Schieker, M.; Tischer, T. *et al.*: Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*. 2004, 24(6), str. 3743-3748.

40) Pitchaimani, A.; Nguyen, T. D. T.; Koirala, M. *et al.*: Impact of cell adhesion and migration on nanoparticle uptake and cellular toxicity. *Toxicology In Vitro*. 2017, 43, str. 29-39.

41) Purohit, S. D.; Bhaskar, R.; Singh, H. *et al.*: Development of a nanocomposite scaffold of gelatin-alginate-graphene oxide for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 133, str. 592-602.

42) Rajendran, A.; Vinoth, G.; Nivedhitha, J. *et al.*: Ca-Ag coexisting nano-structured titania layer on Ti metal surface with enhanced bioactivity, antibacterial and cell compatibility. *Materials Science and Engineering: C*. 2019, 99, str. 440-449.

43) Rampichová, M.; Buzgo, M.; Míčková, A. *et al.*: Platelet-functionalized three-dimensional poly-ε-caprolactone fibrous scaffold prepared using centrifugal spinning for delivery of growth factors. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, str. 347-361.

44) Sahu, D.; Kannan, G. M.; Tailang, M. *et al.*: In vitro cytotoxicity of nanoparticles: a comparison between particle size and cell type. *Journal of Nanoscience*. 2016, 2016, str. 1-10.

45) Shukla, A.; Ranjan, S.; Dasgupta, N. *et al.*: Nanotechnology towards prevention of anemia and osteoporosis: from concept to market. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2017, 31, str. 863-879.

46) Schnell, G.; Staehlke, S.; Duenow, U. *et al.*: Femtosecond laser nano/micro Ti6Al4V surfaces – effect on wetting and MG-63 cell adhesion. *Materials*. 2019, 12(13), str. 2210-2222.

47) Sjöström, T; Lalev, G.; Mansell, J. P. *et al.*: Initial attachment and spreading of MG63 cells on nanopatterned titanium surfaces via through-mask anodization. *Applied Surface Science*. 2011, 257(10), str. 4552-4558.

48) Solař, P.; Kylián, O.; Marek, A. *et al.*: Particles induced surface nanoroughness of titanium surface and its influence on adhesion of osteoblast-like MG-63 cells. *Applied Surface Science*. 2015, 324, str. 99-105.

49) Sommer, M.R.; Vetsch, J. R.; Leemann, J. *et al.*: Silk fibroin scaffolds with inverse opal structure for bone tissue engineering. *Wiley Online Library* (online: www.wileyonlinelibrary.com). 2016.

50) Soundarya, S. P.; Menon, A. H.; Chandran, S. V. *et al.*: Bone tissue engineering: scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 119, str. 1228-1239.

51) Stankova, L.; Musilkova, J.; Broz, A. *et al.*: Alternations to the adhesion, growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells on nanofibrous polyactide scaffolds with diamond nanoparticles. *Diamond & Related Materials*. 2019, 97, str. 1-12.

52) Tian, A.; Qin, X.; Zhang, H. *et al.*: Nanoscale TiO_2 nanotubes govern the biological behavior of human glioma and osteosarcoma cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2015, 10, str. 2423-2439.

53) Vandrovcová, M.; Douglas, T.; Hauk, D. *et al.*: Influence of collagen and chondroitin sulfate (CS) coatings on poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) on MG 63 osteoblast-like cells. *Physiological Research*. 2011, 60, str. 797-813.

54) Vandrovcova, M.; Jirka, I.; Novotna, K. *et al.*: Interaction of human osteoblast-like Saos-2 and MG-63 cells with thermally oxidized surfaces of a titanium-niobium alloy. *PLoS One.* 2014, 9(6), str. 1-15.

55) Wandiyanto, J. V.; Truong, V. K.; Kobaisi M. A. *et al.*: The fate of osteoblast-like MG-63 cell on pre-infected bactericidal nanostructured titanium surfaces. *Materials*. 2019, 12(10), str. 1575-1590.

56) Wang, Ch.; Huang, W.; Zhou, Y. *et al.*: 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials*. 2020, 5(1), str. 82-91.

57) Wang, Q.; Qiao, Y.; Cheng, M. *et al.*: Tantalum implanted entangled porous titanium promotes surface osseointegration and bone ingrowth. *Scientific Reports*. 2016, 6, str. 26248-26260.

58) Wei, M.; Li, S.; Le, W. *et al.*: Nanomaterials modulate stem cell differentiation: biological interaction and underlying mechanisms. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017, 15(1), str. 75-87.

59) Wu, J.; Zhou, L.; Ding, X. *et al.*: Biological effects of ultraviolet photocatalysis on nanoscale titanium with a focus on physiochemical mechanism. *Langmuir*. 2015, 31, str. 10037-10046.

60) Wu, W.-Y.; Chan, M.-Y.; Hsu, Y.-H. *et al.*: Bioapplication of TiN thin films deposited using high power impulse magnetron sputtering. *Surface & Coatings Technology*. 2019, 362, str. 167-175.

61) Wubneh, A; Tsekoura, E. K.; Ayranci, C. *et al.*: Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2018, 80, str. 1-30.

62) Xicoy, H.; Wieringa, B. and Martens, G. J. M.: The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*. 2017, 12(1), str. 1-11.

63) Yang, L.; Liu, S.; Fang, W. *et al.*: Poly(lactic-co-glycolic acid)-bioactive glass composites as nanoporous scaffolds for bone tissue engineering. *In vitro* and *in vivo* studies. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019, 18(6), str. 4874-4880.

64) Zeng, S.; Liu, L.; Shi, Y. *et al.*: Characterization of silk fibroin/chitosan 3D porous scaffold and *in vitro* cytology. *PLoS One*. 2015, 10(6), str. 1-23.

65) Zhou, Z.; Dai, Y.; Liu, B.-B. *et al.*: Surface modification of titanium plate enhanced fibronectin-mediated adhesion and proliferation of MG-63 cells. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 2014, 24(4), str. 1065-1071.