

UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
Ústav lékařské chemie a biochemie

Hydrogelové nosiče pro tkáňové inženýrství

Hydrogel scaffolds for tissue engineering



Disertační práce

Vypracovala: Ing. Petra Chocholatá

Školitel: doc. Ing. Václav Babuška, Ph.D.

Školitel konzultant: Ing. Lucie Wolfová, Ph.D.

Studijní program: Lékařská farmakologie

Plzeň 2023

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. Ing. Václavovi Babuškovi, Ph.D. za vedení v rámci studia.

Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Lucii Wolfové za provedená měření, za cenné rady a připomínky při přípravě disertační práce.

Velký dík patří Mgr. Janě Dvořákové, Ph.D., Mgr. Janě Kolaje Dobré, Ph.D., Ing. Lucii Wiesnerové a MUDr. Vlastimilovi Kuldovi Ph.D. za konzultace, připomínky a praktické rady. Poděkování také patří NTC Nové technologie – výzkumnému centru Západočeské univerzity v Plzni, konkrétně Ing. Jaroslavovi Kadlecovi a také Ing. Monice Šupové, Ph.D. z Ústavu struktury a mechaniky hornin AV ČR, v. v. i za provedená měření.

V neposlední řadě děkuji i své rodině za podporu a pomoc během mého studia a přípravě disertační práce.

Petra Chocholatá

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně a veškeré převzaté údaje řádně citovala. V textové části jsou použity části předchozích článků, kde jsem spoluautorem, a jejichž kompletní znění je k dispozici v přílohové části práce. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s uložením elektronické verze své práce v databázi UK LF Plzeň.

V Plzni dne

.....

Abstrakt

Kostní tkáňové inženýrství se snaží napodobit přirozené chování tvrdých pojivových tkání. V současné době dochází v této oblasti k aktivnímu rozvoji výzkumu a vývoje nových funkčních materiálů. Hlavním směrem v oblasti léčby defektu kostní tkáně je použití biologicky odbouratelných kompozitních materiálů na bázi biopolymerů obohacených o anorganickou složku, případně v kombinaci se složkou buněčnou. Obecně významnou roli zde hrají díky svým vlastnostem hydrogely, které mohou poměrně dobře reagovat na změny podmínek okolního prostředí a jsou používány jako vhodné pro buňky, které tam mohou růst a proliferovat. Strukturou hydrogelu mohou difundovat živiny a odpadní produkty a v neposlední řadě díky tomu mohou sloužit také jako nosiče léčiv. Jejich velkou výhodou, je možnost injekční aplikace s následným gelováním *in situ*.

V této práci byly porovnávány fyzikálně zesíťované hydrogely na bázi polyvinylalkoholu (PVA) a kyseliny hyaluronové (HA) v různých objemových poměrech obohacené o hydroxyapatit (HAp) - anorganickou složku vlastní pro kostní tkáň. Začlenění hydroxyapatitu do organické matrix bylo provedeno dvěma způsoby, syntézou přímo *in situ* a fyzikálním přimícháním předem připraveného hydroxyapatitu. Složení obou typů hydroxyapatitu bylo analyzováno pomocí infračervené spektroskopie a energiově disperzní spektroskopie.

Pro stanovení nejvhodnějšího typu hydrogelu pro léčbu kostního defektu bylo použito hodnocení mechanických i biologických vlastností a viability buněk podobných osteoblastům MG-63. Na vybraných typech hydrogelů byla dále ověřována viabilita a diferenciací lidských mezenchymálních buněk BM-hMSC. Použité diferenciací médium bylo oproti základnímu kultivačnímu mediu obohaceno o dexametazon, askorbát-2-fosfát, β -glycerolfosfát, vitamin K3 a vitamin D3. Míra buněčné diferenciací byla hodnocena na základě a exprese vybraných osteogenních genů pomocí polymerázové řetězové reakce, stanovení aktivity alkalické fosfatázy a vizuálně potvrzena barvením vápenatých solí.

Dosažené výsledky ukázaly, že nejvýhodnějšího složení hydrogelů PVA/HA/HAp bylo dosaženo objemovým poměrem 3:1:2 a 1:1:2. Z hlediska mechanických vlastností se jako výhodnější jevila příprava hydrogelů, kde byl HAp syntetizován *in situ*. Dle předpokladů se také ukázalo, že přítomnost HA významně zvýšila primární adhezi buněk a přítomnost HAp zlepšila proliferaci kultivovaných buněk. Hodnocení diferenciací ukázalo, že s výjimkou exprese genu Runx2, bylo signifikantně výhodnější složení hydrogelu o objemovém poměru jednotlivých složek 3:1:2.

Klíčová slova: kostní tkáňové inženýrství, hydrogel, PVA, kyselina hyaluronová, hydroxyapatit, MG-63, mezenchymální kmenové buňky, diferenciací, osteoblasty

Abstract

Bone tissue engineering attempts to mimic the natural behavior of hard connective tissues. Currently, there is an active research and development of new functional materials in this field. The main direction in the treatment of bone tissue defects is the use of biodegradable composite materials based on biopolymers enriched with an inorganic component, possibly in combination with a cellular component. In general, hydrogels play an important role in tissue engineering due to their properties, as they can respond relatively well to changes in environmental conditions and are used as a suitable medium for cells to grow and proliferate. Structure of hydrogels also allows nutrients and waste products to diffuse, and the last but not least, thanks to this they can also serve as drug carriers. A major advantage of hydrogels is that they can be injected with subsequent *in situ* gelation.

In this work, physically cross-linked hydrogels based on polyvinyl alcohol (PVA) and hyaluronic acid (HA) in different volume ratios enriched with hydroxyapatite (HAp), an inorganic component inherent to bone tissue, were compared. Incorporation of HAp into the organic matrix was performed in two different ways, by *in situ* synthesis directly in the PVA/HA matrix and by physical mixing of pre-prepared HAp. The composition of both types of HAp was analyzed using infrared spectroscopy and energy dispersive spectroscopy.

To determine the most suitable type of hydrogel for the treatment of a bone defect, the mechanical and biological properties and viability of MG-63 osteoblast-like cells was evaluated. Furthermore, the viability and differentiation of human mesenchymal stem cells BM-hMSC were verified on selected hydrogel types. The used differentiation medium was enriched with dexamethasone, ascorbate-2-phosphate, β -glycerol phosphate, vitamin K3 and vitamin D3. The degree of cell differentiation was assessed by expression of selected osteogenic genes using polymerase chain reaction, determination of alkaline phosphatase activity, and visual confirmation of calcium salt staining.

The achieved results showed that the preferred composition of PVA/HA/HAp hydrogels was in the volume ratios of 3:1:2 and 1:1:2, respectively. From the point of view of mechanical properties, the preparation of hydrogels, where HAp was synthesized *in situ*, appeared to be advantageous. As expected, the presence of HA also appeared to significantly enhance primary cell adhesion and the presence of HAp improved cell proliferation. The evaluation of differentiation showed that, with the exception of Runx2 gene expression, the hydrogel formulation with a 3:1:2 volume ratio of individual components was significantly preferable.

Key words: bone tissue engineering, hydrogel, PVA, hyaluronic acid, hydroxyapatite, MG- 63, mesenchymal stem cells, differentiation, osteoblasts

Obsah

1	Teoretická část.....	10
1.1	Kostní tkáňové inženýrství	10
1.1.1	Buněčné systémy používané v kostním tkáňovém inženýrství	11
1.1.2	Osteogenní diferenciaci a její testování	12
1.2	Stavba kosti, kostní tkáň	15
1.2.1	Kostní buňky	18
1.2.2	Stavba kosti	17
1.2.3	Růst a vývoj kosti	21
1.2.4	Mechanické vlastnosti kosti.....	22
1.3	Materiály používané v kostním tkáňovém inženýrství	24
1.3.1	Typy používaných materiálů	25
1.3.2	Kompozitní materiály	30
1.3.3	Skafoldy.....	30
1.3.4	Osteointegrace a její hodnocení.....	32
1.4	Hydrogely	35
1.4.1	Historie hydrogelů	36
1.4.2	Mechanické vlastnosti hydrogelů	37
1.4.3	Síťování hydrogelů	38
1.4.4	Hustota a pórovitost hydrogelů.....	40
1.5	Současnost a budoucnost kostního tkáňového inženýrství	41
2	Praktická část.....	43
2.1	Hlavní a dílčí cíle práce	43
2.2	Materiál a metodika	44
2.2.1	Chemikálie.....	44
2.2.2	Syntéza hydroxyapatitu	44
2.2.3	Příprava skafoldu s předem připraveným hydroxyapatitem.....	44
2.2.4	Příprava skafoldu se syntézou hydroxyapatitu <i>in situ</i>	45
2.2.5	Příprava hydrogelu	45
2.2.6	Stanovení optimální koncentrace PVA a počtu cyklů síťování.....	45
2.2.7	Stanovení pórovitost a hustoty hydrogelu	45
2.2.8	Analýza hydroxyapatitu.....	46
2.2.9	Biologické hodnocení hydrogelů <i>in vitro</i>	47
2.2.10	Stanovení mechanických vlastností hydrogelů	48
2.2.11	Testy buněčné viability.....	49
2.2.12	Osteogenní diferenciaci	50
2.2.13	Stanovení osteogenní diferenciaci BM-hMSC	51
2.2.14	Příprava histologických preparátů.....	53
2.2.15	Statistické vyhodnocení	54
3	Souhrn výsledků a jejich diskuze	55
3.1	Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 1	55
3.2	Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 2	56
3.3	Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 3	62
3.4	Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 4.....	75

3.5	Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 5	77
4	Závěry	87
4.1	Závěry vztahující se k cíli 1	87
4.2	Závěry vztahující se k cíli 2	88
4.3	Závěry vztahující se k cíli 3	89
4.4	Závěry vztahující se k cíli 4	90
4.5	Závěry vztahující se k cíli 5	91
4.6	Závěry pro praxi a výhled do budoucna	92
5	Seznam použité literatury	93
6	Seznam obrázků	110
7	Seznam tabulek	109
8	Seznam příloh	110

Seznam použitých zkratek

ADSC: kmenové buňky z tukové tkáně (z angl. adipose-derived stem cells).....	12
ALP: alkalická fosfatáza.....	12
BM-hMSC: lidské mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřene (z angl. bone marrow human mesenchymal stem cells).....	49
BMP: kostní morfogenní protein (z angl. bone morphogenic protein)	20
BSP: kostní sialoprotein (z angl. bone sialoprotein)	12
BTE: kostní tkáňové inženýrství (z angl. bone tissue engineering)	10
CCK-8: kit pro počítání buněk (z angl. cell counting kit).....	33
Col1: kolagen typu I.....	19
c_t : prahová hodnota cyklu PCR	13
CTN: kalcitonin.....	19
DMA: dynamická mechanická analýza.....	48
DMEM: Dulbecco's Modified Eagles's Medium	49
ECM: extracelulární matrix.....	11
EDS: energiově disperzní spektroskopie.....	46
FBS: fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)	49
FN: fibronektin	11
FTIR: Fourierova transformační infračervená spektroskopie	46
FWHM: plná šířka poloviny maxima.....	66
G' : elastický (dynamický) modul (storage modulus)	38
G'' : ztrátový modul (loss modulus)	38
GAPDH: glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza.....	13
HA: kyselina hyaluronová.....	26
HAp: hydroxyapatit	12
MSC: mezenchymální kmenové buňky (z angl. mesenchymal stem cells)	12
OCN: osteokalcin	12
OPN: osteopontin	21
PBS: fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline).....	47
PCL: poly- ϵ -kaprolakton	27
PGA: kyselina polyglykolová.....	27
PLA: kyselina polymléčná.....	27

PLGA: kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové	27
PVA: polyvinylalkohol.....	27
RANK: aktivátor receptoru jaderného faktoru $\kappa\beta$	19
RANKL: ligand aktivátoru receptoru jaderného faktoru $\kappa\beta$	19
RT-PCR: polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	13
SBF: simulovaná tělní tekutina (z angl. simulated body fluid)	47
SEM: skenovací elektronová mikroskopie	34
SSRH: chytré na podnět reagující hydrogely (z angl. smart stimuli-responsive hydrogels	42
tg δ : ztrátový úhel (ztrátový činitel)	38
WST-8: [2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium sodná sůl].....	33

1 Teoretická část

1.1 Kostní tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství obecně je relativně nový obor, který využívá živé buňky, biokompatibilní materiály a vhodné biochemické a fyzikální faktory. Propojuje několik vědních disciplín, jako jsou věda o materiálech, biologie, chemie, strojírenství, klinická medicína a genetika [Berthiaume et al., 2011]. Hlavním cílem tkáňového inženýrství je obnova a zlepšení funkce poškozených tkání. Využívá porézní trojrozměrné (3D) skafoldy osazené buňkami a aditivy v podobě biologicky aktivních látek, které vytvářejí struktury podobné tkáním [Chaudhari et al., 2016]. Tyto tři věci (skafold, buňky, růstové faktory) se nazývají „triáda tkáňového inženýrství“ a tento systém se jeví jako vhodné biologické prostředí pro efektivní růst a diferenciaci buněk [O'Brien, 2011; Dlaska et al., 2015].

Prvními terapiemi regenerativní medicíny byly transplantace kůže. Poté se objevily techniky uchovávací buňky a tkáně, které umožnily alogenní kožní bankovníctví poskytující kožní štěpy jako hotové výrobky. Syntetické kožní náhrady byly sice připraveny poprvé již v roce 1962, avšak úspěšné produkty pro tkáňové inženýrství byly vyvinuty až na přelomu 70. a 80. let 20. století. Lze říci, že právě tehdy skutečně začalo moderní tkáňové inženýrství, i když samotný pojem „tkáňové inženýrství“ byl představen až v roce 1988 na *National Workshop Science Foundation* jako „aplikace principů a metod inženýrství a přírodních věd k základnímu porozumění strukturně-funkčním vztahů v normální a patologické tkáni savců a vývoji biologických náhrad, k obnově, udržování nebo zlepšení funkce tkáně.“ Langer a Vacanti použili tento termín v článku publikovaném v časopisu *Science* v roce 1993 [Vacanti and Langer, 1999].

V 90. letech 20. století byla k náhradě kůže přidána první náhrada chrupavky a mnoho výzkumných laboratoří se pustilo do aplikace tkáňového inženýrství na téměř všechny tkáně lidského organismu. Ovšem na rozdíl od kůže a chrupavek, strategie kombinace buněk a matrix nefungovala dostatečně dobře, neboť některé tkáně vyžadují rozsáhlou vaskularizaci a další významné tkáňové procesy. Později došlo ke značnému poklesu podpory tkáňového inženýrství a pozornost se upnula na oblast kmenových buněk. Ačkoliv u náhrad některých tkání, např. močového měchýře, rohovky, průdušek, cév, srdce a jater, došlo k významnému pokroku, je stále daleko od klinicky přijatelného řešení. Je třeba překonat velice obtížnou překážku, zajistit funkční cévní zásobování, řídit složité uspořádání různých typů buněk v 3D tkáni a kvantitativně i kvalitativně identifikovat spolehlivé zdroje buněk pro tvorbu takovýchto tkání [Berthiaume et al., 2011]. Společným cílem všech oblastí je napodobit přirozené prostředí lidského těla, zachovat funkci buněk a nevyvolat odmítavou reakci imunitního systému [Yu et al., 2018].

Vzhledem ke stárnutí populace je v současné době transplantace kostí, po krevní transfúzi, druhým nejběžnějším typem transplantace a předpokládá se, že její potřeba bude stále narůstat [Kattimani et al., 2016]. Kostní tkáňové inženýrství (BTE, *bone tissue engineering*) umožňuje opravu kostních defektů, které vznikly z různých příčin. Kostní tkáň je, na rozdíl od jiných tkání, sice schopna přirozené samoopravy, přestavby a regenerace, ale bohužel ne vždy v dostačující míře, a proto je snaha vyvinout skafold dodávající buňkám růstové faktory sloužící jako signály k zahájení regenerace. Vědci se proto snaží vyvinout způsob přípravy skafoldů z biomateriálů podobných přírodním, s multifunkčními vlastnostmi, jako je buněčná adheze, proliferace a diferenciaci buněk [Dhandayuthapani et al., 2011].

Biomateriály jsou kombinovány s různými buňkami, ale nejčastěji používanými jsou buňky kmenové [Stevens, 2008].

1.1.1 Buněčné systémy používané v kostním tkáňovém inženýrství

Proces tvorby, remodelace a hojení kostí zahrnuje koordinovanou činnost různých typů buněk. Pokrok v poznání biologie osteoblastů během těchto procesů byl umožněn díky použití kultivačních modelů různého původu *in vitro*. Každý z těchto modelových systémů nabízí jedinečné výhody pro lepší pochopení vývoje kostí, diferenciaci, genové exprese a reakci na hormony a lokální faktory. Tyto modely jsou užitečným nástrojem při vývoji nových terapií nebo biomateriálů, avšak vznikají obavy ohledně fenotypových vlastností a rozdílů ve vztahu k primárním lidským osteoblastům [Czekanska et al., 2012]. Vzhledem k tomu, že materiály jsou primárně určeny pro humánní medicínu, jsou upřednostňovány buněčné kultury lidské. Každý z buněčných modelů má však své výhody i nevýhody, a proto není jednoduché najít univerzální model vhodný pro všechny fáze testování biokompatibility skafoldů nebo implantátů [Saydé et al., 2021].

Mezi běžně používané modelové systémy patří orgánové kultury, primární kultury osteoblastických buněk odvozených z fetálních lebečních nebo subperiostu dlouhých kostí plodu, klonální buněčné linie z buněk izolovaných z kostních nádorů (typicky osteosarkomu), netransformované buněčné linie, experimentálně immortalizované buněčné linie a kultury kostní dřevě [Salhotra et al., 2020].

Pro počáteční testy jsou upřednostňovány osteosarkomové buňky díky své snadné kultivaci a rychlé proliferaci. Již od konce 70. let 20. století se začaly používat buněčné linie osteosarkomu označované UMR 106 a ROS 17/2, jedná se však o buněčné kultury zvířecí [Lauvrak et al., 2013]. Modely osteoblastických buněk odvozených od lidských osteosarkomů zahrnují Saos-2, MG-63, OHS 4, TE-85, KPDXM a TPXM [Kartsogiannis and Kong wah Ng, 2004].

Často používaná buněčná linie **MG-63**, byla odvozena z osteosarkomu 14 letého chlapce. Buňky této linie jsou menší než běžné osteoblasty, mají fibroblastovou vřetenovitou morfolonii, jsou adherentní a vhodné pro transfekci. Buňky MG-63 sice mají fenotyp nezralých osteoblastů, ale jsou považovány za vhodný model pro studium buněčné adheze, protože exprimují podobné spektrum integrinů, podjednotek receptorů adheze, jako primární lidské osteoblasty (jmenovitě $\alpha 2$, $\alpha 5$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$), které váží kolagen, vitronektin a fibronektin (FN). Vzhledem k jejich relativně vysoké proliferační aktivitě jsou buňky MG-63 také vhodné pro hodnocení buněčné proliferace, což je jeden z důležitých parametrů chování buněk. Dále vykazují rychlý růst bez kontaktní inhibice, což má za následek tvorbu agregátů. V literatuře se objevují nesrovnalosti v mineralizaci buněk MG-63, ale obecně se ukazuje, že tyto buňky vykazují velice nízkou a nejednotnou mineralizaci, protože se zastavují v preosteoblastové fázi diferenciaci [Díaz-Rodríguez et al., 2009]. Zajímavé je, že tyto buňky jsou mechanosenzitivní, reagují na mikrotopografii povrchu materiálu změnami v uspořádání aktinových vláken, mikrotubulů a sítě vimentinu. Nicméně s ohledem na nízkou schopnost buněk MG-63 ukládat vápník, nedostatečnou osteoblastickou funkci, rozdílnou rychlost diferenciaci, aktivitu alkalické fosfatázy a tvorbu extracelulární matrix (ECM), nejsou vhodné pro testování diferenciaci na biomateriálech [Šupová et al., 2018].

Kvůli dobré diferenciační schopnosti, imunogenicitě a kryokonzervaci jsou pro následné testování diferenciace vhodnější **mezenchymální kmenové buňky** (MSC), popř. kmenové buňky z tukové tkáně (ADSC). Multipotentní MSC mohou být izolovány nejen z kostní dřene, ale také z mnoha dalších tkání, jako je tuková tkáň, kosterní sval, játra, mozek a slinivka břišní [Porada et al., 2006]. Tyto buňky jsou schopné diferencovat *in vitro* nejen na osteoblasty, ale i na chondroblasty a adipocyty [Skubis et al., 2016]. Na rozdíl od osteosarkomových modelů však probíhá proliferace MSC pomaleji a brzy podléhají senescenci [Lin et al., 2017].

1.1.2 Osteogenní diferenciace a její testování

Osteogenní diferenciace

MSC se diferencují na nezralé osteoblasty, které exprimují geny kostních matrixových proteinů (Runx2, osterix, β -katenin, vysoká hladina osteopontinu). Nezralé osteoblasty se potom diferencují ve zralé osteoblasty exprimující vysoké hladiny těchto genů a nakonec jsou zabudovány do kostní matrix, aby se přeměnily v osteocyty. Na základě *in vitro* a i *in vivo* zjištění se ukazuje, že Runx2 hraje důležitou roli při udržování zásob nezralých osteoblastů. Spouští totiž expresi hlavních genů proteinů kostní matrix v rané fázi diferenciace, což vede k tomu, že buňky získávají osteoblastický fenotyp, ale jsou stále udržovány v nezralém stádiu. Pro další zrání osteoblastů musí být snížena exprese Runx2, čímž dochází též ke snížení exprese alkalické fosfatázy (ALP), zatímco exprese osteokalcinu (OCN) narůstá. Tento protein je vysoce exprimován právě v aktivních osteoblastech, zatímco ve zralé kosti jeho exprese klesá [Komori, 2006]. Dalším proteinem, který hraje důležitou roli při mineralizaci je kostní sialoprotein (BSP), který přímo podporuje diferenciaci osteoblastů, což vede ke zvýšené produkci mineralizované matrix. Kromě toho BSP stimuluje *in vivo* kalcifikaci a osteogenezi [Xia et al., 2011].

Stanovení stupně mineralizace a hodnocení osteodiferenciace

Osteogenní buňky zapojené do procesu tvorby kosti jsou zodpovědné za produkci nerozpustných anorganických složek, které obsahují především vápník a fosfáty ve formě hydroxyapatitu (HAp) ukládaného do ECM. Pro stanovení těchto anorganických látek lze použít různé metody.

Jednou z tradičních metod je poměrně levné a přístrojově nenáročné histologické barvení pojmenované po maďarském farmakologovi a toxikologovi *Juliovi von Kossovi*. Metoda von Kossa umožňuje detekovat minerální usazeniny v živočišných tkáních *in vitro* i *in vivo*. Jedná se o reakci probíhající ve dvou krocích, kdy nejprve dochází ke srážecí reakci kationtů stříbra se složkami vápenatých usazenin za vzniku žlutého zbarvení, což ukazuje na přítomnost fosforečnanu vápenatého. V druhém kroku dochází k redukci vázaného stříbra organickým materiálem na černé metalické stříbro pomocí světla. Von Kossova technika se stala v kombinaci s různými kontrastními barvivy standardní metodou pro barvení kostí a dalších mineralizovaných tkání. Může být také používána pro hodnocení mineralizace v kultivovaných buňkách a k nepřímému posouzení kostní resorpce (kostní resorpční jamky vytvořené osteoklasty se objeví jako bílé skvrny na homogenním černém pozadí). Omezení této metody je v její špatné specifičnosti, protože pozitivní zbarvení v kulturách osteoblastů nemusí představovat pouze HAp, ale i dystrofické mineralizace neznámého původu.

Navzdory tomu se přesto stala von Kossova metoda jednou z nejoblíbenějších pro detekci mineralizovaných tkání [Schneider, 2021].

Barvení alizarinovou červení se také po desetiletí používá k hodnocení vápenatých solí v buněčných kulturách. Tato metoda je univerzální a barvivo lze z obarvené monovrstvy extrahovat a provést jeho semikvantifikaci. Alizarin se extrahuje buď cetylpyridinium chloridem, nebo kyselinou octovou a neutralizuje hydroxidem amonným s následnou kolorimetrickou detekcí při 405 nm. Použití kyseliny octové se ukazuje jako mnohem citlivější a spolehlivější zejména u slabě obarvených monovrstev, i když je pracnější [Gregory et al., 2004].

Další možností pro kvantifikaci vápníku v buněčné kultuře je použití komerčně dostupných kitů, např. kolorimetrický test vápníku (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), který je založen na spektrofotometrickém měření produktu reakce mezi vápenatými ionty a o-kresolftaleinem [Steinerova et al., 2021].

Jedním z časných markerů osteogenní diferenciaci je membránově vázaný enzym ALP. Během diferenciaci její aktivita stoupá. Aktivitu ALP v buňkách lze detekovat pomocí testu SIGMAFAST BCIP/NBT (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), který vytváří modrý až fialový roztok NBT diformazanový produkt. Po lýze buněk lze ALP kvantifikovat měřením absorbance při 420 nm. Toto stanovení lze vztáhnout na celkový obsah bílkovin. Výhodou této metody je, že barva po vystavení světlu nebledne [Shanbhag et al., 2020].

Genová exprese

Polymerázová řetězová reakce

Se zavedením polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR, *real-time PCR*), RT-PCR s reverzní transkripcí a dalších molekulárně biologických metod, jako je např. sekvenování nové generace (NGS), došlo k dramatickým změnám v oblasti měření genové exprese.

V současné době je RT-PCR běžnou metodou. Ke sběru dat dochází během procesu PCR a amplifikace s detekcí probíhají současně v jediném kroku. Toho lze dosáhnout použitím různých fluorescenčních látek, které korelují koncentraci PCR produktu s intenzitou fluorescence. Reakce je charakterizována bodem v čase (nebo cyklem) PCR označovaným jako prahová hodnota cyklu (c_t), kdy je poprvé detekována cílová amplifikace. Jedná se o intenzitu fluorescence větší než fluorescence pozadí. Z toho vyplývá, že čím větší je množství cílové oblasti v DNA výchozího materiálu, tím výraznější je nárůst fluorescenčního signálu, což vede k nižší hodnotě c_t [Yin et al., 2001]. Ke kvantifikaci RT-PCR se tradičně používají tzv. housekeepingové geny, jako je např. glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) [Wong and Medrano, 2005].

Kvantifikace genové exprese pomocí RT-PCR je velmi citlivá a výkonná, nevyžaduje post amplifikační manipulaci. K jejímu provedení postačuje malé množství templátu a je možné detekovat dokonce i jedinou kopii specifického transkriptu. Bohužel její hlavní nevýhodou je nákladnost zařízení a činidel nezbytných pro její uskutečnění [Zhang et al., 2015].

Seznam vhodných genů pro hodnocení osteodiferenciaci, včetně příkladů vybraných primerů, je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 – Vhodné geny a primery pro sledování osteodiferenciace

[Salasznyk et al., 2007; Sisti et al., 2016; Willette et al., 1999; Huang et al., 2000; Kim, 2002; Suzuki et al., 2014; Winkler et al., 2003]

Protein	Gen	Sekvence primerů
Glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza (housekeeping)	<i>GAPDH</i>	F: 5'-ATGGAAATCCCATCACCATCT-3' R: 5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTTATT-3'
Alkalická fosfatáza	<i>ALP</i>	F:5'-GGAACTCCTGACCCTTGACC-3' R:5'-TCCTGTTTCAGCTCGTACTGC-3'
Kolagen typ 1	<i>Col1</i>	F:5'-GAGTGCTGTCCCGTCTGC-3' R:5'-TTTCTTGTTTCGGTGGGTG-3'
RUNT 2 dependentní faktor	<i>RUNX2</i>	F:[5'-GTAGATGGACCTCGGGAACC-3' R: 5'-GAGCTGGTCAGAACAAAC-3'
Osteopontin	<i>OPN</i>	F: 5'-AAGCGAGGAGTTGAATGGTGCAT-3' R: 5'-TGTGGGTTTCAGCACTCTGCTTCAT-3'
Osteokalcin	<i>OCN</i>	F:5'-GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG-3' R:5'-CTCACACACCTCCCTCCTG-3'
Osterix	<i>Osx, Sp7</i>	F: 5'-AACCCCCAGCTGCCCCACCTACC-3' R: 5'-GACGCTCCAGCTCATCCGAACG-3'
Kostní sialoprotein	<i>BSP</i>	F: 5'-ACAACACTGGGCTATGGAGAGGAC-3' R: 5'-ACTTGTGGTGGGGTTGTAGGTTCA-3'
Osteonektin	<i>OSN, SPARC, BM-40</i>	F: 5'-TGCCTGATGAGACAGAGGTGGT-3' R: 5'-CTTCGGTTTCCTCTGCACCATC-3'
Kostní morfogenní protein 2	<i>BMP-2</i>	F: 5'-CGAGGTCCTGAGCGAGTTCGAG-3' R: 5'-TGGCAGTAAAAGGCGTGATACC-3'
Osteoprotegerin	<i>OPG</i>	F: 5'-GCTAACCTCACCTTCGAG-3' R: 5'-TGATTGGACCTGGTTACC-3'
Receptorový aktivátor jaderného faktoru κ B ligand	<i>RANKL</i>	F: 5'-TTAAGCCAGTGCTTCACGGG-3' R: 5' ACGTAGACCACGATGATGTTCGC-3'
Sklerostin	<i>SOST</i>	F: 5'-CCGGAGCTGGAGAACAACAAG-3' R: 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3'
Transformující růstový faktor β	<i>TGF β</i>	F: 5'-GAAACCCACAACGAAATC-3' R: 5'-GCTCTGATGTGTTGAAGA-3'

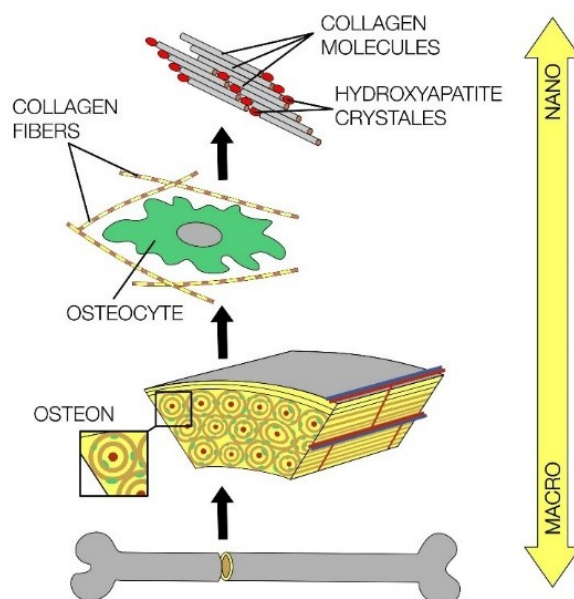
1.2 Stavba kosti, kostní tkáň

Kost je tvrdá pojivová tkáň, která obecně slouží jako strukturální opora, na kterou se upínají svaly, podílí se na jejich kontrakci a chrání životně důležité vnitřní orgány včetně mozku a míchy. Dále je kost hlavním zdrojem vápníku a fosfátů, poskytuje vhodné prostředí pro diferenciaci krvetvorných buněk a má i endokrinní funkce ovlivňující další orgány. Jedná se o živou tkáň s bohatým krevním zásobením a specifickou schopností regenerace. Navzdory prvním dojmům je kost živá, aktivní tkáň, která je neustále remodelována [Stephanie et al., 2017].

Kost je vícesložková, hierarchicky uspořádaná, mineralizovaná nanokompozitní konstrukce s jedinečnými mechanickými vlastnostmi s pestrým uspořádáním materiálových struktur v mnoha délkových měřítkách [Šupová, 2020]. Ty jsou ve vzájemné souhře a plní důležité mechanické, biologické a chemické funkce jako je strukturální podpora, ochrana a ukládání hojivých buněk a homeostáza minerálních iontů. Pro pochopení mechanických vlastností kostního materiálu je důležité porozumět mechanickým vlastnostem jednotlivých složek fází a strukturálním vztahům mezi těmito fázemi. Rozlišujeme tyto úrovně a struktury [Stevens, 2008]:

- makrostruktura: spongiózní a kortikální kost,
- mikrostruktura (asi 10–500 μm): Haversovy systémy, osteony a jednotlivé trabekuly,
- submikrostruktura (1–10 μm): lamely,
- nanostruktura (několik stovek nanometrů až 1 μm): fibrilární kolagen a vnořené minerály,
- subnanostruktura (pod několika stovkami nanometrů): molekulární struktura složek jako jsou minerály, kolagen a nekolagenní organické proteiny.

Uspořádání a orientace jednotlivých struktur kosti jsou sice nepravidelné, ale optimalizované, což činí materiál kosti heterogenní a anizotropní. To je možné vidět v rámci jednotlivých hierarchických úrovní kosti (obrázek 1) [Wang et al., 2016]. Díky své vnitřní struktuře, která se podobá včelí plástvi, je kost tuhá, ale relativně lehká [Rho et al., 1998].



Obrázek 1 - Hierarchické uspořádání kosti
[Chocholata et al., 2019]

Z histologického hlediska se rozlišují dva typy kostní tkáně [Balko et al., 2017]:

- *vláknitá* (primární, nezralá)
- *lamelární* (sekundární, zralá), ta se dále dělí na dva strukturální podtypy podle umístění a zatížení, na kost:
 - kompaktní (kortikální), pórovitost menší než 10 obj. %,
 - spongiózní (trabekulární), pórovitost 50–90 obj. %.

Lamelární kostní tkáň se v těle vyskytuje mnohem častěji než kost vláknitá. Je tvořena kolagenními vlákny paralelně uspořádanými v mineralizované amorfní matrix. Ty se shlukují koncentricky kolem centrálního kanálu, nebo tvoří systém paralelních plášťových lamel na povrchu kosti [Bose et al., 2013].

Základní stavební jednotkou kompakty je osteon tvořený trubicovitými lamelami, v jejichž stěnách jsou mělké jamky (lakuny), kde se nachází rozvětvené osteocyty (osteoblasty). Středem osteonu prochází Haversův kanálek, kde se nachází krevní kapiláry spolu s nervovými vlákny inervujícími jejich stěnu. Dále je kanálek vyplněn vazivem a různými typy pojivových buněk. Jednotlivé lamely tvořící osteon se skládají ze svazků vzájemně se křížících kolagenních vláken, mezibuněčné hmoty a osteocytů. Kompakta tvoří až 80 % lidské kostry a zajišťuje především mechanickou oporu [Kenkre and Bassett, 2018].

Kostní spongióza je tvořena trabekulami (trámci) a lamelami, které vytvářejí kostní architekturu, kterou má každá kost specifickou a je velmi podobná stavbě trubicovitých lamel osteocytů. Prostor mezi trabekulami je vyplněn tukovými buňkami, které k nim velmi dobře adherují a vytváří hydraulický elastický systém, který trabekuly chrání jako jakýsi

„tlumič“ před zatížením zvýšeným hydraulickým tlakem. Spongióza, tvořící asi 20 % kostry, se podílí především na látkové výměně a remodelaci kosti. Při zlomenině kosti, nebo při jakémkoliv porušení jejího tvaru, dochází k přestavbě trabekul podle nového tlakového zatížení. Pro modelaci i remodelaci kosti platí tzv. Wolfův zákon, který říká: „Zevní tvar, vnitřní struktura i funkční zatížení kosti jsou ve vzájemné harmonii. Při jakémkoliv změně dochází k přestavbě kosti, jejímž cílem je dosažení původní harmonie,“ [Dylevský, 2009].

1.2.1 Stavba kosti

Kost je základním stavebním článkem celé kostry. Kosti lze na základě tvaru, jejich stavby a vlastností rozdělit na kosti dlouhé, krátké a ploché. Povrch kostí kryje poměrně silná a tuhá vazivová blána zvaná **okostice** (*periosteum*), která se skládá ze tří vzájemně spojených vrstev:

- povrchová vrstva (*adventicie*): síťově orientovaná vlákna vazivových buněk (fibrocyty, tukové buňky);
- střední vrstva: podélně probíhající snopce kolagenních a elastických vláken;
- vnitřní vrstva: velké množství osteocytů, fibroblastů a cév umožňující růst kosti do šířky.

Kostní dřev (*medulla ossium*), která je velice měkká a rosolovitá, má různou stavbu podle toho, o jaký typ dřev se jedná. Červená kostní dřev je krvetvorným orgánem. Prochází zde síť krevních vlásečnic, ve kterých jsou uloženy buňky pro tvorbu všech základních typů bílých i červených krvinek a krevních destiček. Po narození je to jediné místo, kde vznikají všechny typy krvinek. Věkem je červená kostní dřev postupně nahrazována žlutou infiltrací tukových buněk, která vyplňuje takřka celou dutinu všech kostí, a proto slouží i jako zdroj energie. Krvetvorba pak probíhá převážně v kosti hrudní. Ve velmi vysokém věku dochází ke ztrátě tukových buněk a kostní dřev se přeměňuje na šedou, která je převážně vazivová [Dylevský, 2009].

Kostní ECM se skládá ze složky organické (22 hm. %), anorganické minerální (69 hm. %) a vody (9 hm. %). Organické složky zajišťují flexibilitu a jsou převážně tvořeny kolagenem (typ I, III a V). Zbytek tvoří lipidy a více než 200 druhů nekolagenních matrixových proteinů, glykoproteiny a specifické proteoglykany, jako osteokalcin, osteopontin, kostní sialoprotein, fibronectin nebo kostní morfogenní protein (BMP, *bone morphogenetic protein*) podílející se na regulaci mineralizace kostní matrix, její organizaci a další činnosti kostních buněk [Lin et al., 2020; Šupová, 2020]. Anorganické složky, tvořené hydroxyapatitem a fosforečnanem vápenatým, se podílejí na pevnosti a houževnatosti kosti [Wang et al., 2016].

Kolagen typ I (Col1) představuje 90 % celkového množství kolagenu v kostní tkáni. Tvoří trojitou šroubovici polypeptidů o průměru asi 1,5 nm a délce přibližně 300 nm vytvářející fibrily [Lin et al., 2020].

Osteokalcin (OCN), protein kyseliny γ -karboxyglutamové je tvořený 46-50 aminokyselinami a je vylučován především osteoblasty. Vzniká jako pre-protein, který prochází dalšími modifikacemi, včetně přeměny glutamátových zbytků na γ -karboxyglutamát. Konečný OCN je potom zabalen do intracelulárních vezikul, aby mohl být vyloučen do kostní matrix. Původně se předpokládalo, že OCN iniciuje tvorbu hydroxyapatitu vazbou na vápenaté ionty. Studie ale ukazují, že jeho funkcí je inhibovat

mineralizaci kosti [Wang et al., 2021]. OCN není pouze protein vázaný v ECM, ale jedná se o běžný kostní faktor, který ovlivňuje metabolismus glukózy, reprodukci a kognici mezi kostí a mozkem, slinivkou břišní a varlaty prostřednictvím endokrinních smyček [Shan et al., 2021].

Osteopontin (OPN, kyselý fosfoglykoprotein) je vysoce fosforylovaný glykoprotein bohatý na kyselinu asparagovou. V kostní tkáni je uvolňován osteoblasty, osteocyty, ale i odontoblasty (buňky lemující dřevnou dutinu zubu). Má velký význam jako součást mineralizované ECM kostí a zubů. OPN hraje roli při destrukci kostní tkáně. Jeho vazba na integriny je klíčová pro signální reakce regulující aktivitu osteoklastů, expresi a aktivitu osteoprotegerinu, a dále pro ukončení aktivity osteoklastů a ovlivnění jejich resorpce. Jedná se o faktor, který zastává důležitou úlohu při remodelaci kostí v souvislosti se zvýšeným mechanickým namáháním, kdy dochází k nárůstu jeho exprese [Icer and Gezmen-Karadag, 2018].

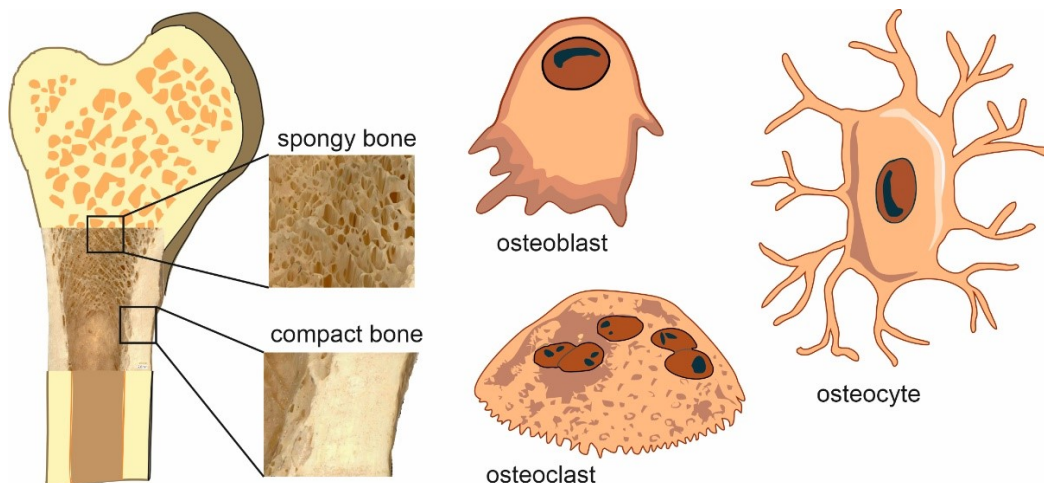
Hydroxyapatit (HAp) je hlavní anorganickou složkou kosti, tvoří asi 60 % kostní hmoty [Feng, 2009]. Hexagonální krystaly apatitu, ve tvaru destiček o velikosti asi 50 x 25 nm a tloušťce 1,5 až 4 nm, jsou orientovány v periodickém uspořádání v tzv. fibrilách, přednostně rovnoběžně s kolagenními fibrilami [Wang et al., 2016].

Voda je převážně vázána v matrix, zbytek je potom v podobě volných molekul. Ty jsou při zatížení kosti redistribuovány a procházejí kostními mikrokanálky, čímž přenášejí informace o aktuálním zatížení dané kosti, a tím napomáhají procesu mineralizace. Se snižujícím se množstvím vody dochází ke snižování mineralizace, kost křehne a stává se náchylnou k lámání [Gaidash et al., 2011].

1.2.2 Kostní buňky

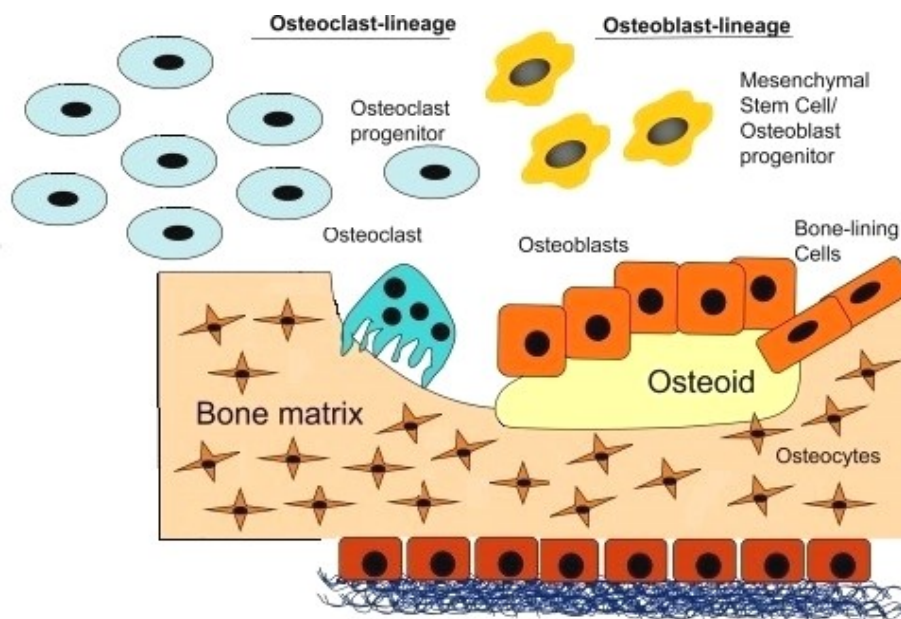
Základními složkami kosti, stejně jako všech pojivových tkání, jsou buňky a matrix. Přestože kostní buňky tvoří jen malou část objemu kosti, mají zásadní vliv na její funkci. Každá z těchto buněk má svoji jedinečnou funkci, podílí se na růstu, opravách, regulaci a všech dalších funkcích kostní tkáně. Rozlišujeme čtyři typy kostních buněk (obrázek 2 a obrázek 3):

- osteoprogenitorové buňky,
- osteocyty,
- osteoblasty,
- osteoklasty.



Obrázek 2 - Mikroskopická struktura kosti a jednotlivé typy kostních buněk
[Babuska et al., 2022]

Legenda: makroskopická struktura kosti – kost houbovitá a kompaktní a kostní buňky (vyobrazení je jen ilustrační, buňky nejsou v odpovídající velikosti).



Obrázek 3 - Jednotlivé složky extracelulární matrix kosti
[Chocholata et al., 2019]

Funkce a umístění jednotlivých kostních buněk je shrnuto v tabulce 2 [Setiawati and Rahardjo, 2019].

Tabulka 2 - Kostní buňky, jejich funkce a umístění v kosti

Typ buněk	Funkce	Umístění
osteoprogenitorové buňky	přeměna v osteoblasty	hluboké vrstvy periostu a kostní dřene
osteocyty	udržování koncentrace minerálů v matrix	kostní matrix
osteoblasty	tvorba kosti	rostoucí části kostí, včetně periostu a endostu
osteoklasty	resorpce kosti	povrch kostí a v místech starých, poraněných nebo nepotřebných kostech

Osteoprogenitorové buňky, známé také jako osteogenní buňky, jsou kmenové buňky nacházející se v kostní dřeni. Tyto buňky hrají důležitou roli při obnově a růstu kostí. Během fetálního vývoje nebo v období největších změn v osteogenezi dospělých dávají vzniknout osteoblastům. V této fázi jsou tyto struktury s kulatým jádrem obaleny velkým množstvím vřetenovité cytoplazmy. S věkem tělo ztrácí schopnost syntetizovat nebo využívat osteoprogenitorové buňky [Ren et al., 2019] a ve zralých kostech, které již nevykazují aktivní přestavbu nebo tvorbu kosti, existují jako zploštělé vřetenovité struktury, které se připojují k povrchu kosti a označují se jako "neaktivní osteoblasty" [Xu et al., 2019].

Osteocyty (osteocytární perilakunární matrix) tvoří 90 – 95 % všech kostních buněk a s životností až 25 let se jedná o nejdéle žijící kostní buňky. Osteocyty se nacházejí v lakunách obklopených mineralizovanou kostní matrix. Vykazují dendritickou morfologii, která se liší podle typu kosti. Jedná se vlastně o neaktivní osteoblasty, jejichž diferenciací vznikly [Setiawati and Rahardjo, 2019]. V procesu diferenciaci je možné odlišit čtyři stádia osteocytu [Florencio-Silva et al., 2015]:

- osteoidní osteocyt,
- preosteocyt,
- nezralý osteocyt,
- zralý osteocyt.

Jakmile je zralý osteocyt zachycen v mineralizované kostní matrix, dochází k poklesu exprese osteoblastických markerů (jako je OCN, Col1 a ALP) a k nárůstu exprese markerů preosteocytů (sklerostin, dentinový matrixový protein 1). Osteocyty se podílejí na produkci proteinů ECM, které jsou důležité pro metabolismus fosfátů a mineralizaci. Díky své poloze a morfologii jsou osteocyty zvláště vhodné pro přenos informací mezi buňkami v kosti. V případě mechanického tlaku působí jako mechanosenzory a napomáhají k adaptaci kosti při mechanickém zatížení. Tyto změny vyvolávají specifické chemické signály, které vedou k buňkám na povrchu kosti a ty potom zajišťují následnou tvorbu nebo resorpci kosti. Vzhledem k umístění osteocytů uvnitř kosti jsou velmi nepřístupné pro případnou izolaci a *in vitro* kultivaci [Boabaid et al., 2001].

Osteoblasty jsou kubické buňky obsahující velké jádro. Nacházejí se na povrchu trámčů kostní tkáně. Jedná se o buňky odvozené z MSC, které syntetizují kostní matrix. Termín

„osteoblast“ byl poprvé použit na počátku 20. století jako buňka, z níž doslova „klíčí kost“ a pochází z řečtiny jako kombinace slov *ὀστέο-* (kost) a *βλαστάνω* (klíčit). V kosti jsou přítomny po celý život, ale jejich aktivita je největší během embryonálního vývoje a růstu kosti. V dospělosti je potom jejich zdrojem endosteum a jsou aktivovány během regenerace poškozené kosti nebo při tvorbě kostní matrix. Pokud se množství osteoblastů sníží, ať už v důsledku přirozené přeměny, nebo během nadměrného regeneračního procesu, dochází k diferenciaci nových buněk z mezenchymálních progenitorových buněk. Ty jsou schopny tvořit osteoidy, což je matrix bohatá na kolagen typu I (Col1), a následně být kalcifikovány [Blair et al., 2017]. Osteoblasty produkují proteiny kostní matrix, jako je Col1, OCN, nebo ALP. Tyto buňky nejsou definitivně diferencované, postupně obklopují kostní matrix a mohou se diferencovat ve vzájemně propojené hvězdicovité buňky, osteocyty [Dylevský, 2009].

Osteoklasty jsou funkční po celý život. Jsou to velké, vícejaderné (až padesátijaderné) buňky odvozené z hematopoetických kmenových buněk, konkrétně z makrofágové linie. Osteoklasty produkují enzymy degradující kost během osifikace a tak je uvolňován prostor pro nově vznikající kostní tkáň. Svoji činností rozkládají kostní matrix a vytvářejí optimální prostředí pro enzymy podílející se na degradaci demineralizované extracelulární kostní matrix. Jako antagonisté osteoblastů tak udržují homeostázu mezi tvorbou a resorpcí kosti. Tato komplexní aktivita je řízena především aktivátorem receptoru jaderného faktoru $\kappa\beta$ (RANK) a jeho ligandem (RANKL). Při anabolických procesech nebo pod vlivem osteoresorpčních faktorů, jako jsou glukokortikoidy, kalcitriol nebo parathormon, uvolňují osteoblasty RANKL, který se váže na receptor RANK na preosteoklastech a mění je ve zralé osteoklasty, které jsou funkčně polarizované a svým apikálním pólem přiléhají k mineralizované části kostní matrix. Toto spojení je tvořeno specifickou interakcí mezi adhezí molekulou integrovanou v buněčné membráně (*integrinem*) a specifickými proteiny kostní matrix [Mulari et al., 2003]. Apikální část osteoklastu je invaginovaná, čímž vzniká mezi jeho hrubě zvrásněnou membránou a přilehlou kostí volný prostor, do kterého jsou aktivně nasávány látky potřebné k resorpci, neboť jedním z hlavních úkolů osteoklastu je okyselořit vzniklý resorpční prostor. Buňka je totiž bohatě vybavena enzymem karboanhydrázou, který katalyzuje reakci vody a oxidu uhličitého za vzniku bikarbonátového aniontu (HCO_3^-) a vodíkového protonu (H^+) čerpaného protonovou pumpou do resorpčního prostoru. Regulaci tohoto transportu, který úzce souvisí s regulací intracelulárního pH a membránového potenciálu, udržují iontové pumpy a kanály na bazolaterální straně buňky. Aktivita zralého osteoblastu je negativně regulována kalcitoninem (CTN), pro který je exprimováno velké množství receptorů [McDonald et al., 2021].

1.2.3 Růst a vývoj kosti

Kost je nejtvrdší ze všech pojivových tkání v těle a obsahuje velké množství cév, které zásobují kostní tkáň hormony důležitými pro regulaci jejího růstu. Proces tvorby kosti, tzv. *osteogeneze* nebo též *osifikace*, je komplexní proces, při kterém se vazivová či chrupavčitá tkáň přeměňuje v tkáň kostní. Všechny procesy osteogeneze jsou řízeny osteoblasty v úzké spolupráci s osteoklasty. Jednak dochází k resorpci kosti osteoklasty a potom k tvorbě kosti pomocí osteoblastů. Oba tyto procesy probíhají společně s přestavbou kosti s optimální mechanickou integritou. Rovnováha tohoto systému je však velmi křehká a může být

posunuta ve prospěch resorpce, jako např. při osteoporóze, která postihuje nejen ženy po menopauze, ale i starší muže, a vede k častějším zlomeninám [Alford et al., 2015]. Velmi jemná a dokonalá kontrola tohoto systému je naprosto nezbytná pro vývoj kosti, hojení zlomenin a správný vývoj kostry během života [Mezuk, 2008].

Vývoj chrupavčité kosti nastává již během třetího měsíce nitroděložního života. Během čtvrtého měsíce v děloze se v chondrokraniu vyvíjí cévní elementy. Ty se stávají osifikačními centry, okolo nichž se začíná tvořit kostní tkáň. Nakonec se množství staré chrupavčité tkáně snižuje na úkor velké části kosti. Rychlost růstu kosti není ve všech částech vždy stejná, např. u pažní kosti dochází k rychlejšímu růstu na proximálním konci oproti distálnímu [Ağirdil, 2020]. Růst kostí je řízen hormony a je velmi ovlivněn správným příjmem bílkovin, minerálů a vitamínů. Nedostatek vitamínu D brání vstřebávání vápníku z gastrointestinálního traktu, což u dětí může vést ke křivici, nebo u dospělých k osteomalacii, kdy osteoid je sice produkován, ale vápenaté soli se neukládají, takže kosti měknou a slábnou. Růst kostí se u mužů zastavuje asi okolo 21 let, u žen okolo 18 let, kdy dojde k uzavření epifyzární ploténky. Remodelace však probíhá po celý život, kdy je zachována mechanická integrita kostry [Kartsogiannis and Kong wah Ng, 2004].

1.2.4 Mechanické vlastnosti kosti

Nejen s věkem se výrazně mění mechanické vlastnosti kostí, ale také záleží na anatomické poloze a jejich vlastní kvalitě. Mezi různými biomechanickými vlastnostmi kostí, jako je např. tvrdost, pevnost, tečení a únava, má pružnost zásadní význam pro charakterizaci různých kostních patologií a pro konstruování kostních implantátů.

Modul pružnosti a pevnost kosti jsou anizotropními vlastnostmi. Kompaktní kost je při zatížení pevnější a tužší podél diafyzární osy než ve směru radiálně příčném a je též pevnější v tlaku než v tahu. Trabekulární kost je anizotropní a porézní kompozit a vykazuje chování závislé na čase stejně jako náchylnost k poškození při cyklickém zatěžování. Mechanické vlastnosti trabekulární kosti závisí nejen na její pórovitosti, ale také na strukturním uspořádání jednotlivých trabekul. Mechanické vlastnosti obou typů kostí uvádí tabulka 3 (uvedené hodnoty jsou průměry z obvykle uváděných údajů) [Wang et al., 2016].

**Tabulka 3 - Mechanické vlastnosti lidských kostí, průměrné hodnoty z obvykle
uváděných údajů v literatuře**
[Wang et al., 2016]

Typ kosti	Porosita	Youngův modul pružnosti [GPa]		Pevnost [MPa]	
Kompaktní kost	3 – 5 %	axiální	17,9 ± 3,9	v tahu	135 ± 15,6
				v tlaku	205 ± 17,3
		příčný	10,1 ± 2,4	v tahu	53 ± 10,7
				v tlaku	131 ± 20,7
		smykový	3,3 ± 0,4	ve smyku	65 ± 4,0
Trabekulární kost	až 90 %	obratle	0,067 ± 0,045		2,4 ± 1,6
		tibia	0,445 ± 0,257		5,3 ± 2,9
		femur	0,441 ± 0,271		6,8 ± 4,8

1.3 Materiály používané v kostním tkáňovém inženýrství

Kostní tkáň je dynamická a vysoce vaskularizovaná. Díky vysoké regenerační kapacitě většina zlomenin nevyžaduje žádný chirurgický zákrok, na rozdíl od závažných kostních defektů a komplikovaných zlomenin [Bose et al., 2013]. Kostní štěpy dostupné pro obnovu kostní tkáně mohou být přírodní, jako autografty, alografty nebo štěpy syntetické. Vzhledem ke své vynikající osteoindukční a osteogenní potenci mají autotransplantáty přednost před ostatními typy [O'Brien, 2011].

Autologní kostní štěp, považovaný za zlatý standard v léčbě kostních defektů, je metoda, při níž se štěp odebere z jednoho anatomického místa a následně je implantován do místa jiného. Vzhledem k tomu, že takový kostní štěp pochází od stejného jedince, je integrován rychleji a kompletněji. Na druhou stranu zde existují některé omezující faktory pro jejich využití. Patří mezi ně operační komplikace při získávání kostního materiálu, omezené dosažitelné množství, a delší čas chirurgického zákroku [Wang and Yeung, 2017]. Nejčastěji používané autotransplantáty jsou kostní štěpy anulární, kortikální, aspirát kostní dřevě a vaskularizovaný kostní štěp [Roberts and Rosenbaum, 2012; Khan et al., 2005].

Při použití **alogenních kostních štěpů** je štěp odebrán z jednoho jedince a transplantován jedinci jinému, do geneticky odlišné tkáně. Hlavní nevýhodou je tedy antigenicita a přenos infekce. Proto je nutná sterilizace a mražení, které imunogenitu minimalizují, ale dochází i ke snížení osteogenní kapacity a osteoinduktivity aloštěpů. Alogenní kostní štěp může být upraven do vhodné podoby, a proto je k dispozici v různých formách, včetně anulárních, kortikálních a vysoce zpracovaných kostních derivátů (tj. demineralizované kostní matrix) [Wang and Yeung, 2017].

Vzhledem k předchozím omezením jsou umělé kostní transplantáty vhodnou náhradou k dosažení úspěchu v kostním tkáňovém inženýrství [El-Husseiny et al., 2022].

Všechny typy kostních štěpů by měly splňovat následující požadavky [Albrektsson and Johansson, 2001]:

- osteokonduktivita,
- osteoinduktivita,
- osteointegrace (osseointegrace).

Osteokonduktivita znamená, že kost může růst na povrchu štěpu nebo dolů do pórů, kanálků nebo trubic, což vede k tvorbě kostní tkáně. V takovém případě mohou mezenchymální kmenové buňky růst pasivně.

Osteoinduktivita je schopnost vytvořit z pluripotentních buněk buněčnou linii tvořící kost. Je indukována růstovými faktory, které podporují mezenchymální kmenové buňky v diferenciaci na osteoblasty a chondroblasty [Roberts and Rosenbaum, 2012].

Osteointegrace (osseointegrace) souvisí s přímým kontaktem mezi kostí a implantátem. Příznivá inkorporace štěpu je ovlivněna mnoha faktory, jako je například typ kostního štěpu nebo místo, kde se implantace nachází atd. (tabulka 4) [Khan et al., 2005].

Tabulka 4 - Aktivita kostních štěpů podle jejich typu
 [Khan et al., 2005; Chocholata et al., 2019]

Štěp	Osteogeneze	Osteokondukce	Osteoindukce	Mechanické vlastnosti	Vascularita
AUTOLOGNÍ					
Kostní dřev	++	+/-	+	-	-
Kanceloidní	++	++	+	+	-
Kortikální	+	+	+/-	++	-
Vaskularizovaný	++	++	+	++	++
ALOGENNÍ					
Spongiózní	-	++	+	+	-
Kortikální	-	+/-	+/-	++	-
Demineralizovaný	-	++	+++	-	-

Legenda: +, ++, +++ = rozsah aktivity; - = žádná aktivita, +++ = maximální aktivita

V současné době je snaha vyrábět „bioaktivní“ materiály, které lze integrovat s biologickými molekulami, na rozdíl od minulosti, kdy byly navrhovány „biologicky inertní“ materiály [Todros et al., 2021]. Materiály, které mohou nahradit autologní nebo alogenní štěpy, jsou z bioaktivní keramiky, bioaktivního skla, přírodních či syntetických polymerů anebo z kompozitů. S těmito materiály je snazší se vyhnout problémům spojeným s transplantací a implantací, jako je infekce nebo nedostatečné přizpůsobení se vlivům prostředí. Ideální předpoklad je, že materiál by měl být současně nahrazen nově regenerovanou biologickou tkání [Stevens, 2008].

1.3.1 Typy používaných materiálů

Z historického hlediska byla jedinou důležitou vlastností biomateriálů první generace pouze jejich biokompatibilita, zatímco cílem biomateriálů druhé generace byla zase jejich biointeraktivita. První generace byla pouze pasivní, druhá generace mohla více podporovat regeneraci tkání. Biomateriály třetí generace, označované jako skafoldy, již reagují biologicky. Mohou například aktivovat geny a ovlivňovat tak všechny aspekty proliferace a diferenciací buněk [Rahman et al., 2018; Hench, 2002].

Materiály v současné době používané pro výrobu kostních skafoldů jsou na bázi anorganických, přírodních a syntetických polymerů. Pro zlepšení mechanických vlastností skafoldů, využití vynikajících vlastností jednotlivých materiálů a zvýšení tkáňové interakce, byly vyvinuty kompozity schopné dodávat specifická léčiva, jako jsou např. růstové faktory nebo antibiotika, a tím zlepšit růst a hojení kostí [Rezwan et al., 2006].

Anorganické materiály

Za nejstarší anorganické materiály používané jako implantáty lze považovat kovy [Gotman, 1997]. První zaznamenané použití kovových implantátů bylo ve starověkém Egyptě a jednalo se o implantáty z hliníku, olova, zlata a stříbra [Babuska et al., 2016]. V současné době se pro přípravu ortopedických a zubních implantátů, vzhledem ke biokompatibilitě, netoxičnosti a korozní odolnosti, nejčastěji používá titan a jeho slitiny. Bohužel kovy nejsou biologicky odbouratelné, takže obvykle je potřeba kovové implantáty odstranit [Turnbull et al., 2018].

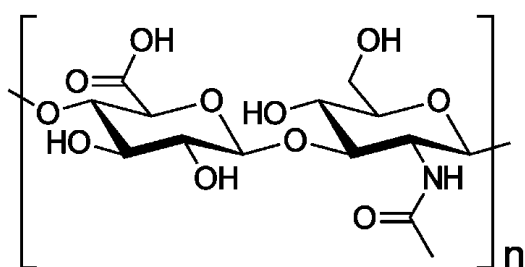
Mechanicky pevné anorganické biomateriály zahrnují biokeramiku, jako např. keramické kompozity, amorfni a bioaktivní skla, krystalickou keramiku, a bioaktivní sklokeramiku. Tyto materiály nacházejí uplatnění nejen v kostním tkáňovém inženýrství, ale také v ortopedii a stomatologii [Miguez-Pacheco et al., 2015]. Nejčastěji používanou biokeramikou je hydroxyapatit, trikalciumfosfát a jejich kompozity [Turnbull et al., 2018]. Díky své chemické podobnosti s nativní kostí vykazují vynikající biokompatibilitu a umožňují dobrou diferenciaci a proliferaci osteoblastů. Na druhou stranu jejich křehkost může způsobovat problémy při mechanickém zatěžování a při řízení rychlosti degradace [Berthiaume et al., 2011].

Hlavní přírodní anorganická složka kosti **hydroxyapatit** (HAp) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) vykazuje vynikající bioaktivitu, biokompatibilitu, osteokonduktivitu, netoxičnost a nezánetlivost. Syntetický HAp je bílý, zatímco přírodní HAp může mít různé barvy (hnědá, žlutá, zelená) [Kattimani et al., 2016]. Jeho mechanické vlastnosti jsou v zásadě ovlivněny velikostí částic [Hu et al., 2016], pórovitostí a hustotou [Kattimani et al., 2016]. HAp je velmi tvrdý, ale křehký, s velmi nízkou rychlostí degradace *in vivo*, a proto je často kombinován s přírodními nebo syntetickými polymery pro vytvoření skafoldů. Pro stavbu kostí je HAp velmi užitečný, protože stimuluje růstové faktory (např. BMP) a podporuje expresi ALP v mezenchymálních buňkách [Turnbull et al., 2018].

Přírodní polymery

Mezi tyto polymery patří např. polysacharidy (škrob, alginát, chitin/chitosan, kyselina hyaluronová a její deriváty) nebo proteiny (sója, kolagen, fibrinové gely, hedvábí). Poskytují vhodné prostředí pro růst buněk, napomáhají adhezi a metabolismu buněk. Na druhou stranu se mohou vyskytovat problémy s imunitní odpovědí kvůli patogenním nečistotám, a hůře u nich lze nastavit mechanické vlastnosti a biologickou odbouratelnost [Dorati et al., 2017].

Kyselina hyaluronová (HA) se hojně vyskytuje v lidském těle. Je složena z opakujících se disacharidových jednotek lineárního glukosaminoglykanu, který je složen z N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny D-glukuronové (obrázek 4) [Deng et al., 2017]. Nejen její biokompatibilita a biologická rozložitelnost, ale také její viskoelastická jsou vhodné vlastnosti zvyšující adhezi buněk, a proto se používá pro přípravu skafoldů. Velkou výhodou HA je její enzymatická odbouratelnost hyaluronidázou, enzymem produkovaným savčími buňkami. Vzhledem k velmi rychlé degradaci a rozpustnosti HA ve vodě, je nutné ji pro přípravu skafoldů zesíťovat [Chocholata et al., 2021].

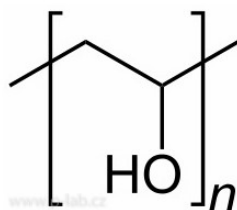


Obrázek 4 - Struktura kyseliny hyaluronové

Syntetické polymery

Do této skupiny řadíme např. polyvinylalkohol, polyestery polykyselin, jako je kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), dále poly- ϵ -kaprolakton (PCL) nebo kopolymery kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA), které jsou často používány jako skafoldy v tkáňové inženýrství a při transplantaci buněk. Mají vynikající mechanické vlastnosti [Asti and Gioglio, 2014] a lze je připravovat s přesně upravenou strukturou, což poměrně snadno umožňuje řídit rychlost jejich degradace. Častěji se ovšem u syntetických polymerů vyskytuje snížená bioaktivita [O'Brien, 2011].

Polyvinylalkohol (PVA, obrázek 5) je velmi často testovaným syntetickým polymerem v mnoha různých biomedicínských aplikacích díky své dobré biokompatibilitě, hydrofilním vlastnostem a určité míře biologické odbouratelnosti. Jeho příprava probíhá ve dvou krocích, kdy nejprve proběhne volná radikálová polymerace vinylacetátu následována částečnou hydrolýzou polyvinylacetátu. Řízením kroku hydrolýzy lze připravit různé typy PVA, a tím ovlivnit jeho rozpustnost, krystalinitu a chemické vlastnosti.



Obrázek 5 - Struktura polyvinylalkoholu

Velkou výhodou PVA je, že jej lze snadno přeměnit na hydrogel, a to ve dvou krocích: síťováním a dalším zpracováním. Fyzikálního síťování, které je založeno na reakci hydroxylových skupin, lze dosáhnout např. opakovaním cyklů zmrazování a rozmrazování. Není potřeba používat žádná chemická síťovací činidla, a proto tzv. kryogely neobsahují žádné toxické zbytky. Příklady způsobů přípravy hydrogelů na bázi PVA uvádí tabulka 5 [Kumar and Han, 2017].

Tabulka 5 - Způsoby přípravy hydrogelů na bázi PVA
 [Kumar and Han, 2017]

Hydrogely na bázi PVA	
Techniky síťování	Techniky zpracování
Funkcionalizované nanočástice	Odlévání/sušení z roztoku
Vodíková vazba	Vymrazování templátu napěněného CO ₂
Ozáření	Koagulační ošetření
Cyklus zmrazení - rozmrazení	Vyfukování roztoku
Chemická činidla	Elektrostatické zvlákňování
Iontové interakce	3D printing
Polymerace	Lyofilizace

Hlavní výhody a nevýhody jednotlivých typů materiálů používaných v kostním tkáňovém inženýrství jsou shrnuty v tabulce 6 [Chocholata et al., 2019].

Tabulka 6 - Výhody a nevýhody materiálů používaných v tkáňovém inženýrství
 [Chocholata et al., 2019]

Typ materiálu	Výhody	Nevýhody
Kovy	Biokompatibilita, netoxičnost a korozní odolnost	Není biologická odbouratelnost
BIOKERAMIKA		
Bioaktivní skla	Zlepšení diferenciací a osteogeneze	Malá pevnost a křehkost
Hydroxyapatit	Bioaktivita, biokompatibilita, osteoinduktivita, netoxičnost a nezářlivost	Křehkost, velmi pomalá degradace
Trikalcium fosfát	Podpora osteogenní diferenciací <i>in vivo</i>	Pomalá degradace, nestlačitelnost
PŘÍRODNÍ POLYMERY		
Kolagen	Enzymatická rozložitelnost	Složitá struktura
Želatina	Biokompatibilita, biologická odbouratelnost	Špatné mechanické vlastnosti
Chitosan	Zvýšení adheze buněk, jejich diferenciací a migrace, netoxičnost, nealergenní, mukoadhezivita, biokompatibilita, biodegradabilita a osteokonduktivita	Nízká mechanická pevnost
Kyselina hyaluronová	Biokompatibilita, biologická rozložitelnost, viskoelasticita, enzymatická rozložitelnost	Velmi rychlá degradace, rozpustnost ve vodě
Alginát	Biokompatibilita, snadné gelování, snadno chemicky modifikovatelný	Nerazložitelnost u savců, sterilizace způsobuje rozklad
Agaróza	Široký rozsah teploty tání a teploty gelování, není potřeba síťovacích činidel, velmi malá zánětlivá reakce <i>in vivo</i>	Špatná adheze buněk
SYNTECKÉ POLYMERY		
Polyvinylalkohol	Biokompatibilita, není potřeba síťovacích činidel (fyzikální síťování)	Příliš vysoká hydrofilita, slabá podpora pro růst buněk
Poly-α-hydroxylové kyseliny	Produkty degradace mohou být vyloučeny z těla	Degradace mechanickým narušením, špatné mechanické vlastnosti
Poly-ϵ-kaprolakton	Biodegradabilita, netoxičnost, nízký bod tání	Hydrofobicita, pomalý rozklad
Polyuretany	Výborné mechanické vlastnosti, dobrá biokompatibilita	Toxicita produktů rozkladu (aromatické diisokyanáty)

1.3.2 Kompozitní materiály

Jak již bylo uvedeno výše (tabulka 6), existuje mnoho problémů se skafoldy vyrobenými z jediného biomateriálu. Jako nejlepším řešením se v současné době ukazují kompozitní skafoldy, tj. kombinace keramiky a polymeru, nebo kombinace syntetických polymerů s přírodními [Berthiaume et al., 2011]. Kompozitní materiály zahrnují jak polymerní fázi, která je houževnatá a má určitou pevnost v tlaku, tak fázi anorganickou s bioaktivitou, která zlepšuje mechanické vlastnosti a rychlost degradace. Každá fáze má jiné vlastnosti a skafoldy tak propojují jejich nejlepší vlastnosti, jak je pro tkáňové inženýrství žádoucí. Proto jsou tyto materiály velmi podobné přirozené struktuře skutečné kosti [Vacanti and Langer, 1999].

1.3.3 Skafoldy

Termín skafold se používá pro trojrozměrný (3D) biomateriál, který poskytuje vhodné prostředí pro buňky k regeneraci tkání a orgánů. Cílem je vyrobit skafoldy, které jsou schopny buňkám poskytnout regenerační signály a napodobit přirozené prostředí. Vědci se snaží vyvinout způsoby výroby skafoldů složených z biomateriálů, které jsou velmi podobné biologickému prostředí, s multifunkčními vlastnostmi [Dhandayuthapani et al., 2011], a které jsou efektivní z hlediska nákladů a klinického použití [Yu et al., 2018].

Nejdůležitějším aspektem je struktura skafoldu. Propojené póry a vysoká pórovitost umožňuje uchycení buněk a usnadňuje jejich růst, proliferaci a diferenciaci, difuzi odpadních látek, produktů rozkladu skafoldů a vůbec 3D regeneraci tkáně. Velikost pórů musí být dostatečně velká, aby umožňovala migraci buněk, ale zároveň dostatečně malá, aby umožňovala vazbu buněk na skafold [Yu et al., 2018]. V ideálním případě musí degradace skafoldu trvat stejně dlouho jako samotná regenerace tkáně [Ge et al., 2008].

Ideální skafold pro kostní tkáň by tedy měl být osteokonduktivní, biologicky odbouratelný a s vhodnými mechanickými vlastnostmi. Je nutné, aby do nich bylo možné dodávat buňky, vyrábět je v nepravidelných tvarech a samozřejmě, aby byly komerčně životaschopné [Chen et al., 2006]. Cílem je vyrábět 3D konstrukce obsahující vhodné typy buněk, implantovatelné přímo *in vivo*, aby stimulovaly přímou tvorbu nových tkání. Lidské tělo je citlivý systém a materiály pro 3D skafoldy musí být biokompatibilní a snadno sterilizovatelné. Mnoho typů skafoldů se vyrábí ve formě hydrogelů [Yu et al., 2018].

Metody výroby skafoldů

Existuje několik technologií zpracování, které umožňují výrobu porézních 3D polymerních skafoldů pro kostní tkáňové inženýrství. Zejména se používá lití do rozpouštědel a loužení částic, pění plynem, emulzní lyofilizace, elektrostatické zvlákňování (*electrospinning*), rychlé prototypování a tepelně indukovaná fázová separace [Liu and Ma, 2004]. Výhody a nevýhody jednotlivých výrobních technologií skafoldů jsou dále shrnuty v tabulce 7 [Yuan et al., 2017; Leong et al., 2003; Lee et al., 2010; Stevens et al., 2008].

Tabulka 7 - Výhody a nevýhody jednotlivých výrobních technologií skafoldů
 [Yuan et al., 2017; Leong et al., 2003; Lee et al., 2010; Stevens et al., 2008]

Typ technologie	Výhody	Nevýhody
Lití do rozpouštědla a loužení částic	Jednoduchá metoda, snadná regulace velikosti pórů a pórovitosti	Nebezpečí denaturace inkorporovaných molekul díky zbytkům toxického rozpouštědla, snížení aktivity bioindukčních látek, nemožnost přidávání farmakologických látek
Proces napěňování plynem	Jednoduchá a finančně výhodná metoda, jakákoliv organická rozpouštědla, málo toxický, nehořlavý CO ₂ jako plynný porogen	Nevhodné pro hydrofilní a sklovité polymery (nízká rozpustnost v CO ₂)
Tepelně indukovaná separace fází (TIPS)	Získání porézní polymerní membrány s anizotropní strukturou a trubcových 3D skafoldů, nízká pravděpodobnost defektů	Produkty nevhodné pro osteoblasty nebo kostní tkáň (velikost pórů 10 -100 μm), použití organických rozpouštědel
Rychlé prototypování (SFFT)	Komplexní, velmi přesný 3D produkt	Toxická rozpouštědla, použití porogenů, omezení tvaru produktu
Mikrosférické slinování	Vynikající mechanické vlastnosti skafoldů	Vyšší teplota, delší doba procesu, menší velikost pórů s nižší pórovitostí
Emulzní lyofilizační metoda	Vysoce porézní skafoldy	Uzavřená struktura pórů
Technika elektrostatického zvlákňování	Velká plocha, vynikající mechanické vlastnosti, velkoobjemová výroba, velmi tenká vlákna	Nedostatečná regulace stavby skafoldu, sítě pórů a jejich velikosti
3D biotisk (bioprinting)	Dostatečná velikost dobře propojených pórů	Nedostatečná mechanická pevnost a integrita

Trojrozměrný biotisk (bioprinting)

Výše uvedené techniky pro přípravu 3D skafoldů nejsou ve svých procesech dostatečně univerzální a mají společné nevýhody: nedostatečná regulace struktury skafoldu, sítě pórů a jejich velikosti [An et al., 2015]. Je totiž potřeba, aby 3D porézní skafoldy obsahovaly konzistentní póry o přiměřené velikosti, které jsou dobře propojené pro migraci a proliferaci buněk. Tyto nevýhody by mohly v tkáňovém inženýrství pomoci vyřešit procesy 3D tisku prostřednictvím rychlého prototypování, biofabrikace, biotisku a aditivní výroby [Gungor-Ozkerim et al., 2018].

Objekty připravené 3D tiskem se zpracovávají vrstvu po vrstvě z práškových, kapalných nebo pevných substrátů. Struktura 3D tištěného objektu je dána počítačově vytvořeným modelem (CAD, *computer aided design*) a je načtena do 3D tiskárny. Pro pacienty lze

specifické 3D modely defektů vytvořit konverzí z počítačové tomografie (CT) nebo magnetické rezonance (MRI) [Turnbull et al., 2018]. Základem biotisku je vytvoření definované struktury, do které jsou pomocí technologie 3D biotisku umístěny buňky [Hospodiuk et al., 2017]. Obrovská výhoda je to, že tato metoda nevyžaduje žádné formy a může přenášet mikrorozměry do 3D struktury relativně levně, flexibilně a s vysokou účinností. Všechny modely jsou „šité na míru“ a velmi specifické [Shaunak et al., 2017].

Buňky lze tisknout i bez jakéhokoliv skafoldu, a to napodobením embryonálního vývoje. Nejprve se z buněk vytvoří novotkáň, která se ukládá do specifických vzorů pro splnutí a zrání, a poté se získá funkční tkáň většího rozsahu. Na rozdíl od konvenčních 3D tisků, biotisk vyžaduje odlišné techniky podporující živé buňky a zajišťující jejich kontrolovanou distribuci a ukládání [Mandrycky et al., 2016].

3D biotisk lze považovat za nový a velmi slibný přístup k produkci 3D tkáňových struktur, ale je nutné vyhodnotit různé materiály pro biologické inkousty, aby byla splněna požadovaná kritéria pro vlastnosti skafoldů [Gungor-Ozkerim et al., 2018]. Dalšími cíli jsou minimalizace ztráty buněk, zintenzivnění interakce mezi nimi a vytvoření sítě cév v tkáňové struktuře [Hospodiuk et al., 2017]. Navzdory tomu je již možné pomocí 3D biotisku vytvořit perfuzní buněčné vrstvy cévních konstrukcí, které se uplatní v inženýrských prevaskularizovaných tkáňových konstruktech [Jia et al., 2016]. Hlavním problémem kostního tkáňového inženýrství nebo obecně tkáňového inženýrství je totiž vaskularizace tkáně. Zhu a kol. se pokusili studovat architekturu cévní sítě a vyvinuli novou metodu založenou na rychlém 3D tisku, tzv. mikroskopický kontinuální optický biotisk (μ COB) pro vaskularizovanou tkáň [Zhu et al., 2016].

3D biotisk je sice součástí tkáňového inženýrství, ale bude trvat dlouho, než se z akademických produktů stanou produkty vhodné pro klinické použití. V současné době je záměrem standardizovat a certifikovat zdravotnické prostředky vyrobené pomocí 3D tisku a vyřešit právní problémy [An et al., 2015].

1.3.4 Osteointegrace a její hodnocení

Osteointegrace implantátu může být považována za úspěšnou, pokud splňuje určitá kritéria z hlediska funkce, fyziologie tkání a i spokojenosti uživatele [Babuska et al., 2015]. Za objevitele moderní osteointegrace je považován švédský ortopedický chirurg *Per Ingvar Brånemark (1929 – 2014)*, který se svými spolupracovníky umístil titanový implantát se závitěm do nohy králíka. Pozoroval, jak kost rostla v blízkosti implantátu, až k němu velmi efektivně přilnula. Na základě těchto poznatků Brånemark definoval pojem osteointegrace jako „přímé strukturální a funkční spojení mezi živou kostí a povrchem nosného implantátu“ [Pasqualini and Pasqualini, 2009]. Osteointegrace je také histologicky definována v Dorlandově ilustrovaném lékařském slovníku jako přímé ukotvení implantátu vytvořením kostní tkáně kolem implantátu bez růstu fibrózní tkáně na rozhraní kosti a implantátu. Vzhledem k tomu, že histologické definice mají některé nedostatky, především to, že mají omezené klinické použití, byla navržena jiná, více biomechanicky orientovaná definice osteointegrace jako "proces, při kterém je dosaženo klinicky asymptomatické pevné fixace aloplastických materiálů v kosti a tato fixace se udržuje v průběhu funkční zátěže" [Albrektsson and Johansson, 2001].

Dobrou osteointegraci materiálů pro kostní tkáňové inženýrství zajišťuje jejich dostatečná bioaktivita, tzn. osteoinduktivita a osteokonduktivita. Fyzikálně chemické vlastnosti a modifikace povrchů materiálů pro výrobu kostních implantátů mohou ovlivnit adhezi buněk, jejich proliferaci a také jejich morfologii [Liu et al., 2021].

Sledování viability a proliferace buněk

Je nutné, aby materiály používané pro přípravu skafoldů nahrazující a podporující tvorbu tkáně fungovaly jako substrát podporující adhezi buněk, jejich následnou proliferaci a biosyntézu. Adheze buněk hraje zásadní roli v buněčné komunikaci a má velký význam při vývoji a udržování tkání. Je to schopnost jedné buňky přilnout k jiné nebo k ECM. *In vitro* je většina savčích buněk závislá na ukotvení a pevném přichycení k podkladu. Podle tzv. modelu buněčné adheze, čím více buňka přilne, tím větší je počet jejich chemických vazeb k povrchu. Buněčná adheze se podílí na stimulaci signálů, které regulují diferenciaci buněk, buněčný cyklus, jejich migraci a přežívání. Pro různé aplikace jsou zapotřebí různé požadavky na jejich adhezi. Například biomateriály interagující s krví, jako např. umělé srdeční chlopně nebo cévy, vyžadují nulovou adhezi k buňkám nebo plazmatickým proteinům, aby se zabránilo vzniku trombózy a embolie. Na druhou stranu je nutné, aby materiály používané pro přípravu skafoldů nahrazující a podporující tvorbu tkáně fungovaly jako substrát podporující adhezi buněk, jejich následnou proliferaci a biosyntézu. Pro analýzu adheze buněk v oblasti studia biomateriálů, účinků jejich biochemického ošetření a podnětů prostředí na buněčnou kulturu je používána celá řada různých technik [Khalili and Ahmad, 2015].

Viabilitu a proliferaci buněk lze měřit pomocí komerčně dostupných kitů, které jsou jednoduché, rychlé a citlivé. Např. kit pro počítání buněk, *Cell Counting Kit – 8* (CCK-8, Bimake, Mnichov, Německo) je roztok obsahující ve vodě dobře rozpustnou tetrazoliovou sůl WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium sodná sůl], která se po redukci buněčnými dehydrogenázami přeměňuje na formazanové barvivo a jeho množství je přímo úměrné počtu živých buněk. Na obdobném principu funguje i kit s označením *MTT Cell Viability Assay* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), který je ale pomalejší a méně citlivý v porovnání s CCK-8 [Cai et al., 2019].

Sledování morfologie buněk

Pro základní analýzu přibližného tvaru buněk po uchycení na biomateriál lze použít jejich obarvení krystalovou violetí. Před samotným barvením je nutná fixace buněk. Pokud se k obarveným vzorkům přidá roztok dodecylsulfátu sodného, dojde k uvolnění krystalové violeti a pomocí optické hustoty v mikrodestičkovém readeru lze stanovit proliferaci kvantitativně [Forsprecher et al., 2009].

Podrobnější informace o morfologii buněk může poskytnout fluorescenční barvení specifických buněčných struktur. Aktinový cytoskelet tvořený souborem aktinových filament je struktura umožňující migraci buněk, ale také změnu tvaru buňky. Mechanické vlastnosti povrchu řídí intracelulární motilitu a morfogenezi membránových organel, které umožňují buňkám vytvářet adheze. Další cytoskeletální protein vinkulin slouží k ukotvení aktinových filament k membráně a hraje též důležitou roli při migraci buněk a také v řízení

jejich tvaru. Pro vizualizaci lokálních adhezí se používá monoklonální protilátka antivinkulin [Svitkina, 2018]. Barvení buněčného jádra se provádí pomocí látky, která se po navázání na DNA uvolňuje a vyzařuje fluorescenci [Rabel et al., 2020].

Nejpokročilejší metodou sledování morfologie buněk je skenovací elektronová mikroskopie (SEM), která dokáže odhalit morfologické charakteristiky buněk, ECM a minerálů, které jsou hlavními složkami zralé kostní tkáně. Před samotným pozorováním buněk je nutné je nejprve dehydratovat vzestupnou alkoholovou řadou a vysušit hexamethyldisilazanem s následným sušením v exsikátoru [Bozhokin et al., 2021].

Samotné sledování morfologie buněk pro jejich identifikaci však není zcela spolehlivé, protože většina buněk během růstu mění svůj vzhled a navíc mnoho různých typů buněk vypadá velmi podobně [Steinerova et al., 2021].

1.4 Hydrogely

Hydrogely jsou trojrozměrné, zesíťované, hydrofilní biopolymerní struktury. Díky schopnosti botnat mohou absorbovat a pevně zadržovat velké množství vody nebo biologické tekutiny ve svém zbotnalém stavu, aniž by docházelo k jejich rozpuštění. Toto je způsobeno především díky přítomnosti hydrofilních skupin, jako např. $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONH}-$, nebo $-\text{SO}_3\text{H}$ [Chocholata et al., 2020; Huynh et al., 2011]. Hydrogely ze své podstaty také poměrně dobře reagují na změny podmínek okolního prostředí, jako jsou např. pH, teplota nebo mechanické namáhání, čímž se po zabudování buněk velice podobají živým tkáním. Díky pórovité struktuře hydrogelů je také dobře zabezpečena difuze živin a odpadních látek a tak vytvářejí vhodné prostředí pro správnou proliferaci buněk. S výhodou jsou proto používány v tkáňovém inženýrství pro svoji schopnost uvolňování léčiv. Celkové prostupování živin dovnitř a buněčných produktů ven z gelu určuje charakter vody v nich obsažené [Caliari and Burdick, 2016]. Velkou výhodou určitých typů hydrogelů je také možnost jejich síťování *in situ* přímo v místě defektu, což umožňuje injekční aplikace těchto materiálů a díky tomu méně invazivní zákroky oproti, např. aplikacím již hotových skafoldů. Zesíťování materiálů přímo v místě defektu má také velkou výhodu z hlediska augmentace defektu, kdy v tomto místě dochází k vyplnění celého objemu bez nutnosti jeho začišťování nebo tvarování skafoldů s pevným tvarem [Ullah et al., 2015]. Nevýhodou hydrogelů mohou být v rámci některých aplikací (měkké tkáně) jejich horší mechanické vlastnosti, zejména z hlediska pevnosti, kdy již při menším namáhání může docházet k nevratným deformacím těchto materiálů. Dalším problémem je jejich sterilizace [Hoffman, 2012]. Výhody a nevýhody hydrogelů jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8 - Některé výhody a nevýhody hydrogelů
[Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2019]

Výhody hydrogelů	Ochrana buněk a nestabilních biochemických faktorů (peptidy proteiny, oligonukleotidy DNA) ve vodném prostředí
	Velmi dobrý transport živiny do buněk a odpadních produktů z buněk
	Snadná modifikace pomocí ligandů buněčné adheze
	Možnost injekční aplikace
	Obvykle biokompatibilní
Nevýhody hydrogelů	Obtížnější manipulace
	Horší mechanické vlastnosti
	Možné komplikace se zavedením buněk a různých faktorů pro injekční aplikaci
	Problematická sterilizace

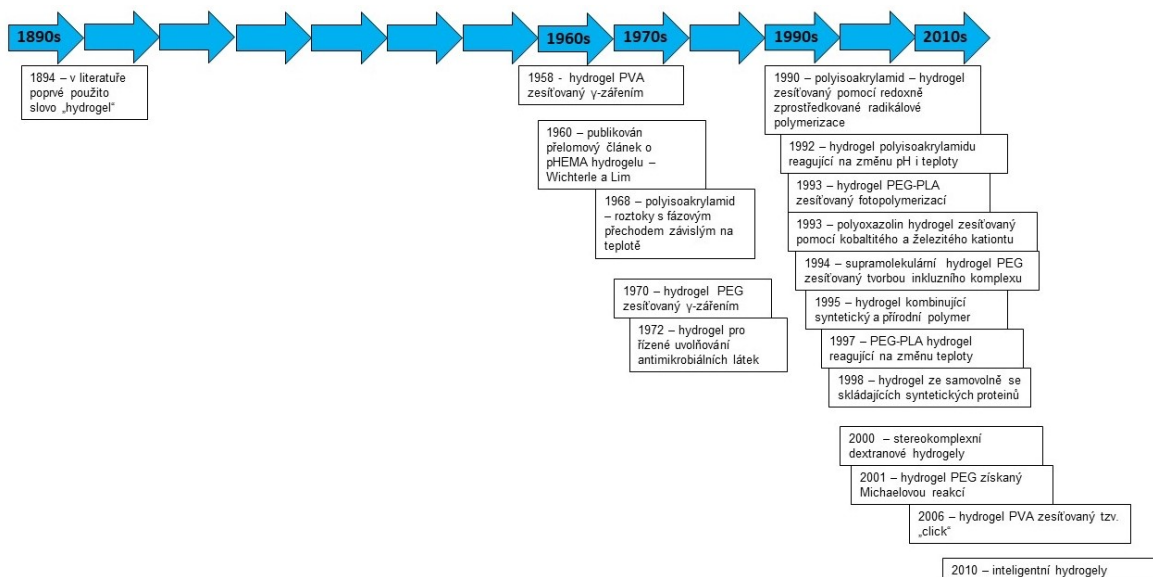
Velký potenciál hydrogelů se ukazuje v neinvazivních, dálkově ovládaných terapiích, včetně cíleného podávání léků, dále v regenerativní medicíně, tkáňovém inženýrství a implantaci umělých orgánů. V oblasti léčby kostních defektů, vzniklých např. po nádorech, dochází

pomocí přítomných buněk a biologicky aktivních látek k podpoře regenerace kostní tkáně. Zde není totiž cílem nahrazovat části kostí a to vzhledem k jejich nosným a opěrným funkcím. Hydrogely nacházejí také velké využití v oftalmologii pro účinné podávání léků. Dále jsou využívány pro zvýšení účinků protirakovinové léčby, kdy je lze enkapsulovat do hydrogelu a injekčně aplikovat přímo do místa nádoru a tím snížit zátěž organismu [Mantha et al., 2019; Chocholata et al., 2021].

1.4.1 Historie hydrogelů

Poprvé bylo slovo „hydrogel“ použito v článku publikovaném roku 1894 [Yahia et al., 2015]. Ovšem tehdy popsáný materiál nebyl hydrogel, jak jej známe dnes, ale jednalo se o koloidní gel vyrobený z anorganických solí. Od té doby byl název „hydrogel“ používán pro 3D strukturu z přírodního hydrofilního polymeru, ve kterém byla síť vytvořena buď chemicky, nebo fyzikálně [Lee et al., 2013]. Hydrogel, ve smyslu, jak jej známe dnes, se objevil v literatuře až mnohem později, v roce 1960. Byl popsán jednou ze svých typických vlastností, vysokou afinitou k vodě. Jednalo se o hydrogel polyhydroxyethylmethakrylátu, který tehdy *Otto Wichterle* a jeho spolupracovník *Drahošlav Lím* vyvinuli s ambiciózním cílem pro aplikace s lidskými tkáněmi a začal se používat pro výrobu kontaktních čoček [Buwalda et al., 2014]. Od té doby počtu studií hydrogelů pro biomedicínské aplikace začalo přibývat, zejména v 70. letech minulého století. Ke skutečnému rozvoji hydrogelů pro použití v medicíně došlo potom v 90. letech. V současné době jsou „inteligentní hydrogely“ zcela přizpůsobeny příslušným aplikacím v širokém spektru oborů od zdravotnických prostředků až po strojírenství [Lee et al., 2013].

Tak, jak se postupně hydrogely vyvíjely, lze jejich historii rozdělit do třech hlavních bloků (obrázek 6) a můžeme v podstatě rozlišit tři generace hydrogelů. U první generace bylo cílem vyvinout materiál s vysokou botnavostí a dobrými mechanickými vlastnostmi na relativně jednoduchém principu s využitím široké škály síťovacích procesů [Buwalda et al., 2017]. Od sedmdesátých let se objevilo jiné pojetí hydrogelu a tzv. druhá generace. Tato generace byla schopna reagovat na specifické podněty, jako jsou změny teploty, pH nebo koncentrace specifických molekul v roztoku, a tak spouštět specifické reakce, např. polymerace materiálu, řízené uvolňování léčiv, nebo tvorba pórů *in situ*. Konečně třetí generace hydrogelů je zaměřena na vývoj stereokomplexních materiálů (např. interakce polyethylenglykolu a kyseliny polymléčné), zesíťování hydrogelů za pomoci kovových ligandů a fyzikálních interakcí [Buwalda et al., 2014].



Obrázek 6 - Časová osa vystihující nejdůležitější okamžiky ve vývoji hydrogelů

1.4.2 Mechanické vlastnosti hydrogelů

Hydrogely jsou ze své podstaty zesíťované hydrofilní polymery. Mechanické vlastnosti hydrogelů jsou ovlivněny volbou samotného polymeru, jeho chemickým složením, strukturou, molekulovou hmotností, koncentrací, pH, nábojem a v neposlední řadě typem a hustotou síťování. Volbou vhodného polymeru a síťovací reakce tak můžeme ovlivnit finální vlastnosti těchto materiálů, a to jak z hlediska jejich mechanických, tak i biologických vlastností a jejich stability. Toto pak umožňuje variabilitu jejich použití pro různé aplikace [Vedadghavami et al., 2017].

Mechanické chování hydrogelů lze nejlépe pochopit pomocí teorie pružnosti pryže a teorie viskoelasticity. Obě tyto teorie jsou založeny na časově nezávislém a časově závislém obnovení orientace a struktury polymerního řetězce při jeho namáhání a deformaci. Pomocí těchto teorií je možné analyzovat strukturu polymeru a získat informace o počtu elasticky aktivních řetězců. Viskoelastické vlastnosti hydrogelů vyplývají z jejich struktury. Ve své struktuře obsahují jak kapalně disperzní prostředí, což souvisí s jejich viskozitou, tak polymerní síť, která jim dává vlastnosti typické pro tuhá tělesa. Míra jejich namáhání potom určuje, zda se budou chovat jako elastická tělesa nebo dojde k překročení určité meze a dochází u nich k trvalé deformaci a tečení [Caliari and Burdick, 2016].

Mechanické vlastnosti hydrogelů lze stanovit pomocí různých metod, kdy se sleduje vliv napětí na deformaci vzorků za různých podmínek. Nejčastěji se však využívá dynamické namáhání a sleduje se vliv napětí a deformace materiálu v čase, což je principem oscilačních testů, které existují dva. Buď se jedná o test amplitudový, kdy je nastavena konstantní frekvence oscilace a mění se amplituda deformace. Hlavním úkolem tohoto testu je zjistit, při jaké amplitudě deformace dochází k nevratnému poškození sledovaných vzorků a trvalé deformaci. Druhý typ je test frekvenční, kdy je nastavena konstantní amplituda deformace a

mění se frekvence tohoto namáhání (postupně od nejmenší hodnoty k nejvyšší) [Sadykov et al., 2022]. Vzniká fázový posun mezi deformací a napětím, což je typické právě pro viskoelastické materiály a je měřítkem jejich pružnosti. Tento fázový posun se používá pro stanovení elastického (dynamického) modulu materiálu G' (*storage modulus*), který je definován jako poměr pružného (fázového) napětí a deformace. Tento modul se vztahuje ke schopnosti materiálu uchovávat energii. Podobně, ztrátový modul materiálu G'' (*loss modulus*) je poměrem viskózní (mezifázové) složky a napětí. Souvisí se schopností materiálu udržet se v rovnováze a odvádět napětí prostřednictvím tepla. Poměr těchto dvou modulů je definován jako ztrátový úhel (ztrátový činitel; $\tan \delta$) a určuje ztrátu mechanické práce materiálu při dynamickém namáhání. U materiálů s větším modulem pružnosti, které jsou houževnatější, dochází při jejich namáhání k menší deformaci. Pokud je výsledný ztrátový úhel větší než 1, převažují vlastnosti viskózní a pokud je jeho hodnota menší než 1, převažují elastické vlastnosti [Zhang et al., 2010].

1.4.3 Síťování hydrogelů

Jak již bylo uvedeno, trojrozměrná struktura hydrogelu vzniká vytvořením vazeb mezi polymerními řetězci. Počet a typ těchto příčných vazeb ovlivňuje fyzikální vlastnosti hydrogelu. Tyto vazby mají potom vliv na elasticitu (mohou se napínat a zase se vracet do původního stavu), viskozitu (odolnost k tečení), nerozpustnost, nárůst pevnosti a houževnatosti. S rostoucím počtem příčných vazeb se hydrogely stávají tužšími a nemohou být již tolik napínány, jsou méně viskózní, tím i méně pružné, až se mohou dokonce stát křehkými. Síťování má dále za následek nerozpustnost polymeru vlivem silných kovalentních vazeb, kterými jsou řetězce k sobě vázány. Takový polymer potom může rozpouštědlo absorbovat a vytvořit gel [Hong et al., 2020].

Způsob síťování do značné míry ovlivňuje mechanické a biochemické vlastnosti. Hydrogely na bázi stejných polymerů, ale s různou strukturou síťování, mohou vykazovat různé vlastnosti. Řízením stupně zesíťování je možné vyladit vlastnosti materiálu a vhodně je optimalizovat pro různé aplikace, čímž je možné širokospektré využití polymeru stejného původu. Přehled způsobů síťování hydrogelů uvádí tabulka 9. Pro síťování hydrogelů se používají dvě základní metody, popřípadě i jejich kombinace [Hu et al., 2019]:

- **fyzikální síťování** (nekovalentní vazby), ke kterému dochází například díky hydrofobním interakcím mezi řetězci, iontovým interakcím mezi polyaniontem a polykationtem nebo vícevalentními kationty,
- **chemické síťování** (kovalentní vazby), které zahrnuje fotopolymeraci (např. ultrafialové záření), enzymem indukované síťování nebo síťování pomocí síťovacího činidla.

Fyzikální síťování

Vazby ve fyzikálně zesíťovaném hydrogelu jsou obvykle vytvářeny mezimolekulovými reverzibilními interakcemi (tabulka 9). Významným přínosem tohoto způsobu síťování je biomedicínská bezpečnost díky absenci chemických síťovacích činidel. Tím je zamezeno potenciální cytotoxicitě vlivem nezreagovaných chemických látek. Důležitější je ovšem to, že takto zesíťované hydrogely reagují na podněty samoregenerací a lze je injekčně aplikovat při pokojové teplotě. Proto jsou fyzikálně zesíťované hydrogely využívány pro enkapsulaci živých buněk a podávání terapeutických molekul. Na druhou stranu takto zesíťované hydrogely vykazují nižší mechanické vlastnosti a jsou méně stabilní [Parhi, 2017].

Chemické síťování

U chemicky zesíťovaných polymerů se vytváří mezi řetězci kovalentní vazby, které jsou ve srovnání s fyzikálním zesíťováním pevné a trvalé (tabulka 9). Takto zesíťované hydrogely jsou za fyziologických podmínek stabilnější, s vynikajícími mechanickými vlastnostmi a laditelným chováním během degradace [Rouillard et al., 2011].

Tabulka 9 - Přehled způsobů síťování hydrogelů

Fyzikální síťování hydrogelů	Iontové/elektrostatické interakce [Hu et al., 2019]
	Hydrofobní interakce [Sadykov et al., 2022]
	Krystalizace [Hatakeyema et al., 2005]
	Vodíková vazba [Yi et al., 2015]
	Pomocí koordinace kovů [Hu et al., 2019]
	Vazba mezi hostitelem a hostem [Mukhopadhyay et al., 2018]
Chemické síťování hydrogelů	Fotopolymerizace [Han et al., 2022]
	Enzymově katalyzovaná reakce [Moreira Teixeira et al., 2012]
	Pomocí "click chemistry": <ul style="list-style-type: none">• Diels-Alderova reakce [Cramer and Truhlar, 1994],• tvorba Schiffovy báze [Hu et al., 2019],• oximové síťové vazby,• adice Michaelova typu [Samui, 2022]
	Dynamická kovalentní vazba [Marco-Dufort and Tibbitt, 2019]

1.4.4 Hustota a pórovitost hydrogelů

Porosita a architektura pórů ve smyslu pórovitosti a vzájemné propojenosti pórů hrají významnou funkci pro viabilitu, proliferaci a migraci buněk. Vzájemné propojení pórů umožňuje buňkám prorůstání, vaskularizaci a difuzi živin pro jejich existenci v hydrogelu. Stupeň pórovitosti dále podstatně ovlivňuje mechanické vlastnosti, přičemž tuhost klesá s rostoucí pórovitostí. Póry ve vzorku mohou mít různou morfologii, mohou být [Annabi et al., 2010]:

- uzavřené,
- otevřené (slepý konec nebo vzájemně propojené),
- rozdělené na dutiny a hrdla.

Experimentálně bylo prokázáno, že optimální velikost pórů implantátu pro regeneraci tkání je 5 μm pro neovaskularizaci, 5–15 μm pro vrůstání fibroblastů, 20 – 125 μm pro regeneraci kůže, 100–350 μm pro regeneraci kostní tkáně, 40 – 100 μm pro vrůstání osteoidu a 20 μm pro růst hepatocytů. Fibrovaskulární tkáň vyžaduje póry o velikosti větší než 500 μm , aby mohlo dojít k rychlé vaskularizaci a přežití transplantovaných buněk. Bylo zjištěno, že hydrogely s menší velikostí pórů spíše podporují růst buněk než diferenciaci, což vede k přerůstání buněk během jejich střední a pozdní fáze diferenciaci [Anovitz and Cole, 2015]. Řízení pórovitosti a mikroarchitektury hraje tedy klíčovou roli při regulaci vlastností uměle vytvořené tkáně. Kombinací metod pro přípravu hydrogelů lze připravit systémy s vhodnou pórovitostí pro danou aplikaci v tkáňovém inženýrství a je možné i zlepšit jejich integraci v rámci hostitelské tkáně [Lien et al., 2009].

Morfologii hydrogelů lze posoudit mikroskopickými technikami. Podle rostoucí síly zvětšení se jedná o [Bertoldi et al., 2011]:

- optickou mikroskopii (OM),
- stereomikroskopii (SM),
- tunelovou mikroskopii (SEM a TEM) a
- mikroskopii atomárních sil (AFM).

Kromě toho je další důležitou metodou mikro-CT, která se také nazývá rentgenová mikrotomografie. Jedná se o zobrazovací techniku, jednoduše popsanou jako nedestruktivní radiografii s vysokým rozlišením. Touto metodou je možné provádět kvalitativní a kvantitativní testy vzorků a vyhodnocovat vzájemné propojení pórů. Mikro-CT může poskytnout informace o průměrné velikosti pórů, distribuci velikosti a jejich propojení, tloušťce pórů/stěn a anizotropii/izotropii vzorku (ve smyslu přítomnosti/nepřítomnosti preferenční orientace pórů) [Chen, 2020].

1.5 Současnost a budoucnost kostního tkáňového inženýrství

Kost vykazuje skutečný regenerační potenciál. Hojení zlomenin je příkladem, kdy regenerace probíhá prostřednictvím přísně regulovaných sekvencí molekulárních a buněčných dějů, které kopírují tvorbu kostní tkáně pozorovanou během embryogeneze. Přesto v některých případech regenerace kosti neprobíhá správně a je nutný terapeutický zásah. Regenerace kosti totiž vyžaduje vzájemnou komunikaci mezi faktory mikroprostředí a buňkami. Kostní tkáňové inženýrství se pokouší napodobit toto přirozené prostředí dodáváním buněk schopných osteodiferenciace v biomateriálech podporujících jejich adhezi a proliferaci, ideálně také jejich degradaci s uvolňováním růstových faktorů za vzniku kostní matrix [Quarto and Giannoni, 2016].

Vzhledem k tomu, že kost je dynamickým systémem, měla by i kultivace vaskularizované kostní tkáně probíhat za dynamických podmínek pro zajištění maximální perfuze živin a kyslíku [Tang et al., 2016]. Bylo totiž prokázáno, že zlepšení přísunu živin a zvýšení vnitřního smykového napětí pomocí středního proudění média významně ovlivňuje expresi osteogenních genů v osteoblastech [Grayson et al., 2008]. Existuje několik kultivačních systémů zajišťujících tyto nezbytné transportní podmínky pro buněčný růst ve 3D rozměrech, jako např. perfuzní bioreaktory, bioreaktory s rotujícími stěnami a bioreaktory s rotujícími buňkami. Bioreaktor tedy usnadňuje přímou perfuzi kultivačního média [Grayson et al., 2008], čímž jsou napodobeny fyziologické podmínky i během kultivace [Egger et al., 2017]. Zjednodušeně řečeno, bioreaktor je systém, ve kterém je možné řídit a monitorovat kultivační podmínky [Martin et al., 2004], a tak jej lze použít jako *in vitro* nástroje k napodobení přirozených podmínek v lidském těle (pH, teplota, parciální tlak kyslíku, perfuze buněk, mechanické síly), které lze upravit podle potřeby. Pomocí bioreaktorů byly vytvořeny nové struktury materiálů s dříve nevídanými vlastnostmi, což ukazuje na jejich klíčovou roli v tkáňovém inženýrství [Lavik and Langer, 2004].

I když je velice obtížné napodobit přirozenou strukturu kosti, je snahou BTE se tomu alespoň co nejvíce přiblížit. *In vitro* se ukázalo mnoho slibných výsledků, ale bohužel jen málo z nich bylo úspěšných také *in vivo*. Přestože bylo zkoumáno již mnoho polymerů, je třeba vybrat takové, které mají laditelné vlastnosti a mohou poskytnout platformu pro více aplikací [Holzwarth and Ma, 2011]. Zavedením 3D tisku došlo ke značnému zlepšení struktur skafoldů. Jeho aplikace na buněčné struktury [Stevens, 2008] se ukazuje jako velmi slibná pro velmi širokou škálu použití v regenerační a transplantační medicíně [Ozbolat et al., 2016].

Komplikovaný je vztah mezi imunitní odpovědí a obnovou tkání. Proto se koncepce „ideálního“ biomateriálu posouvá od imunitně invazivního k imunitně interaktivnímu, který vyvolává odpovídající imunologické reakce a umožňuje tak vlastní asimilaci a následnou obnovu tkáně. Makrofágy, které řídí interakci mezi imunitním systémem a biomateriály úpravou vnějších chemických podmínek nebo topografických aspektů, jsou nyní cílem mnoha výzkumů, kdy vzájemné působení biomateriálů a makrofágů je klíčovou složkou při regulaci regenerace tkáně. Význam imunitních buněk v regulaci dynamiky kosti byl nedávno zdůrazněn rozvojem osteoimunologie, která zkoumá osteoimunomodulační vlastnosti materiálů pro úspěšnou regeneraci kosti [El-Husseiny et al., 2022].

Do popředí mezi bio-skafoldy používanými pro různé účely biomedicíny a tkáňového inženýrství se dostávají hydrogely. Dokáží překlenout velké kostní defekty, posílit růst nové

kosti a její rekonstrukci, a to díky zvláštním schopnostem inkorporace a biodegradace. V současné době jsou navrhovány nové hydrogely s inteligentními schopnostmi reagovat na fyzikální, biologické a chemické signály nativních tkání. To vede ke konstrukci inteligentních hydrogelových platforem, které mohou podle potřeby reagovat na různé podněty. Tyto chytré na podnět reagující hydrogely (SSRH, *smart stimuli-responsive hydrogels*) mohou reagovat na jemné výkyvy prostředí (teplota, pH, iontové síly, chemické látky atd.) [Zhu et al., 2018]. Právě hydrogely jsou významnou třídou biomateriálů, které mohou být vstříkovány jako kapalina gelující *in situ*. Takto vytvořené injektovatelné hydrogely mohou být vloženy přímo do místa defektu s komplexním tvarem minimálně invazivním procesem. Vhodná a homogenní distribuce buněk, biologických faktorů a molekulárních signálů je jejich další výhodou oproti hydrogelům konvenčním [Olov et al., 2022].

Jednou z největších výzev tkáňového inženýrství je získat funkční vaskularizovanou náhradu pro složité tkáně a orgány. Vaskularizace je kritická, ať už jde o tkáň jater, kosti nebo kůže a zatím není jasné, který přístup bude pro jednotlivé aplikace nejvhodnější. Konečnou motivací pro tkáňové inženýrství je vývoj celé uměle připravené tkáně pro transplantaci, jako jsme již dnes svědky při použití umělých cévních štěpů u dětských pacientů [Zilla et al., 2020].

2 Praktická část

2.1 Hlavní a dílčí cíle práce

Tato práce si klade za cíl vybrat nejvhodnější složení skafoldu ve formě hydrogelu na bázi polyvinylalkoholu (PVA) a kyseliny hyaluronové (HA) obohaceného hydroxyapatitem (HAp), který by bylo možné použít v kostním tkáňovém inženýrství pro regeneraci a reparaci kostní tkáně.

Dílčí cíle práce

1. Stanovení optimálních podmínek přípravy hydrogelu na bázi PVA/HA obohaceného HAp.
2. Stanovení nejvhodnějšího složení hydrogelu na bázi PVA/HA obohaceného HAp na základě stanovení *in vitro* biologických vlastností (botnavost, degradace, hemokompatibilita), adheze a proliferace buněk MG-63.
3. Vliv rozdílných způsobů přípravy HAp (*in situ* a předem připravený) na vlastnosti hydrogelu s nejvhodnějším složením, porovnání chemických, mechanických a *in vitro* biologických vlastností (botnavost, degradace, hemokompatibilita), adheze a proliferace buněk MG-63.
4. Ověření adheze a proliferace BM–hMSC na hydrogelu s výhodnějším způsobem přípravy HAp.
5. Ověření osteogenní diferenciaci BM–hMSC na hydrogelu s výhodnějším způsobem přípravy HAp.

2.2 Materiál a metodika

2.2.1 Chemikálie

Polyvinylalkohol (PVA, Mw 145 000, plně hydrolyzovaný), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaCl, NaHCO_3 , KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NH_3 (vše Merck, Praha, Česká republika), kyselina hyaluronová (HA, Mw 1 800 000, ZVC Dr. L. Hoffmann, Cítov pod Řípem, Česká republika), ethanol (96 %), CaCl_2 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (vše Penta, Praha, Česká republika), KH_2PO_4 (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika). $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HCl, Na_2SO_4 , Tris (vše Lachema, Brno, Česká republika), dexametazon, askorbát-2-fosfát, β -glycerolfosfát, vitamin K3 (menadion) a vitamin D3 (cholecalciferol) (vše Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), Triton-X100, glutaraldehyd (oba Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Německo), cetylpyridinium chlorid, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , hydrochinon, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (vše P-LAB, Praha, Česká republika).

2.2.2 Syntéza hydroxyapatitu

Hydroxyapatit (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, Ca/P = 1,67) byl syntetizován sol-gelovou metodou [Kumar et al., 2009]. Za stálého míchání a při pokojové teplotě bylo v deionizované vodě rozpuštěno odpovídající množství KH_2PO_4 tak, aby vznikl 0,6M roztok. Následně bylo přidáno odpovídající množství $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, aby byl zajištěn poměr Ca/P = 1,67. Pro zachování pH = 10 byl přidán zředěný roztok NH_3 (roztok $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = 1:2$) a směs byla za stálého míchání homogenizována při pokojové teplotě až vznikla dokonale homogenní suspenze. Poté směs zrála 24 h při pokojové teplotě. Použitý NH_3 byl odstraněn vymýváním pomocí deionizované vody do neutrálního pH. Suspenze HAp byla vysušena při teplotě 70 °C po dobu 1 hodiny v sušárně. K získání výsledného prášku HAp byla použita třecí miska s tloučkem. Analýza připraveného produktu byla provedena pomocí infračervené spektrofotometrie (FTIR Nicolet iS5, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2.3 Příprava skafoldu s předem připraveným hydroxyapatitem

Vodný roztok PVA (5 %) byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství prášku v deionizované vodě za stálého míchání při teplotě 90 °C, dokud nevznikl homogenní roztok. Navážené množství HA pro přípravu 1 % vodného roztoku bylo rozpuštěno v deionizované vodě za stálého míchání při teplotě 50 °C, dokud nevznikl homogenní roztok. Roztoky PVA a HA byly smíchány v objemovém poměru 3:1 (označeno jako A) a 1:1 (označeno jako B) a míchány 24 hod za mírného ohřevu (40 °C). Vodná suspenze HAp (5 %) připravená z odpovídajícího množství předem připraveného prášku byla k těmto dvěma typům směsí přidána za použití sonikátoru UP100H (Hielscher, Teltow, Německo) v objemovém poměru HA/HAp 1:1 (ozn. HA1, HB1), 1:2 (ozn. HA2, HB2) a 1:3 (ozn. HA3, HB3). Homogenní směsi byly nality do 24-jamkových destiček (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Švýcarsko).

2.2.4 Příprava skafoldu se syntézou hydroxyapatitu *in situ*

Syntéza částic HAp *in situ* probíhala za přítomnosti směsi PVA a HA v objemovém poměru PVA/HA 3:1 a 1:1, jak bylo popsáno výše. Pro zachování pH okolo 9 byl použit roztok NH₃. Vodný roztok CaCl₂ (0,5M) byl pomalu přidáván za stálého míchání a při mírném ohřevu (45 °C) do směsi PVA/HA a celá směs byla homogenizována po dobu 24 hod za mírného ohřevu (45 °C). Poté byl po kapkách přidáván vodný roztok NaH₂PO₄ (0,3M) za vzniku mléčného zabarvení, což potvrdilo vznik HAp. Byly připraveny dva typy směsí v objemovém poměru HA/HAp 1:2 (ozn. IHA2, IHB2). Homogenní směs byla nalita do 24-jamkové destičky a ponechána při pokojové teplotě po dobu 72 hod, aby došlo ke zrání *in situ* vytvořeného HAp [Mollazadeh et al., 2007].

2.2.5 Příprava hydrogelu

Konečný porézní fyzikálně zesíťovaný hydrogel byl získán zmrazením homogenních směsí ve 24-jamkových destičkách na teplotu - 20 °C po dobu 12 hod a poté rozmrazením při pokojové teplotě (+ 25 °C) též po dobu 12 hod (1 cyklus). Tento postup byl opakován ještě šestkrát, tzn., celkem proběhlo 7 cyklů fyzikálního síťování. Takto byly připraveny hydrogelové vzorky skafoldů o průměru 1,5 cm a tloušťce asi 0,5 cm.

2.2.6 Stanovení optimální koncentrace PVA a počtu cyklů síťování

Optimální koncentrace roztoku PVA a počet cyklů fyzikálního síťování byly určeny na základě stanovení hustoty a pórovitosti u vzorků připravených z vodného roztoku PVA o koncentraci 15 % (ozn. 1), 10 % (ozn. 2) a 5 % (ozn. 3). Vzorky byly vystaveny třem (ozn. A), pěti (ozn. B) a deseti (ozn. C) cyklům zmrazení na teplotu - 20 °C po dobu 12 hod a rozmrazení při pokojové teplotě (+ 25 °C) po dobu 12 hod (1 cyklus). Pro hodnocení byly vždy použity tři vzorky od každého typu.

2.2.7 Stanovení pórovitosti a hustoty hydrogelu

Otevřená pórovitost a hustota hydrogelu byly stanoveny metodou vytěsnění kapaliny ze vzorku na základě Archimedova zákona [Su et al., 2019]. K měření byly použity skafoldy předem mrazem vysušené 72 h, 0,5 mbar v lyofilizátoru (LyoQuest, Telstar Group, Barcelona, Španělsko). Lyofilizovaný a předem zvážený vzorek (m) byl ponořen do odměrného válce se známým objemem 70 % ethanolu (V₁), který není rozpouštědlem pro tento hydrogel. Bylo provedeno několik krátkých cyklů evakuace a represe po dobu asi 5 min, aby ethanol lépe pronikl do pórů skafoldu. Poté byl stanoven objem kapaliny a kapalinou impregnovaného skafoldu (V₂). Po vyjmutí skafoldu z odměrného válce, byl změřen objem zbývající kapaliny (V₃) a otevřená pórovitost (P) byla stanovena jako:

$$P = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100 \text{ [\%]} \quad (1)$$

- V_1 ... počáteční objem ethanolu
 V_2 ... objem ethanolu a ethanolem impregnovaného skafoldu
 V_3 ... objem zbývající kapaliny po vyjmutí skafoldu

Hustota hydrogelu (ρ) byla potom vypočítána pomocí předem stanovené hmotnosti (m) jako:

$$\rho = \frac{m}{V_2 - V_3} \quad [g / cm^3] \quad (2)$$

- m ... počáteční hmotnost lyofilizovaného skafoldu
 V_2 ... objem ethanolu a ethanolem impregnovaného skafoldu
 V_3 ... objem zbývající kapaliny po vyjmutí skafoldu

Výsledná hodnota pórovitosti a hustoty hydrogelu byla vypočtena jako průměrná hodnota ze tří měřených vzorků.

2.2.8 Analýza hydroxyapatitu

Fázová analýza HAp byla provedena pomocí infračervené spektrofotometrie (FTIR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*). Infračervená spektra byla změřena spektrofotometrem iS50 (Thermo Nicolet Instruments Co., Madison, USA) ve spektrální oblasti $4\,000 - 400\text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 4 cm^{-1} průměrováním 64 scanů metodou zeslabené totální reflexe (ATR, *Attenuated Total Reflexion*), kdy se měří spektrum odrazem od povrchu měřené látky. Naměřená spektra byla vyhodnocena pomocí programu OMNIC Software 2019. Pro analýzu HAp ve skafoldech pomocí FTIR byly materiály upraveny kalcinací při teplotě $500\text{ }^\circ\text{C}$ na vzduchu. Tato teplota byla stanovena záměrně, aby se organické látky zcela odstranily a anorganická část nebyla ovlivněna.

Pro energiově disperzní spektroskopii (EDS) byly vzorky ve formě prášku pomocí spektrálního uhlíkového terče adjustovány na hliníkový stab a pokryty vrstvou uhlíku na naprašovače Leica EM ACE600 (Specion s.r.o., Most, ČR) o tloušťce pokryvu $11,19\text{ nm}$. EDS analýzy byly měřeny v režimu vysokého vakua na skenovacím elektronovém mikroskopu STEM Apreo S LoVac (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) v systému APEX EDAX s EDS detektorem Octane Elite SDD (EDAX, Ametek, Berwyn, Pensylvánie, USA). Bylo proměřeno pět náhodně zvolených polí ve zvětšení 1 000krát (plocha $97\,767\text{ }\mu\text{m}^2$), celková proměřená plocha na jednom vzorku byla $488\,835\text{ }\mu\text{m}^2$. Při analýze bylo použito urychlovací napětí 15 keV a nastavena korekce na pokryv uhlíkem $11,2\text{ nm}$.

2.2.9 Biologické hodnocení hydrogelů *in vitro*

Botnání

Stupeň zbotnání hydrogelů byl stanoven ponořením předem zvážených (m_i) lyofilizovaných vzorků do 10 ml fosfátového pufru (PBS, *phosphate buffered saline*). Vzorky byly uloženy do inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ a postupně váženy až bylo dosaženo neměnné hmotnosti (m_f). Pro stanovení byly použity 3 vzorky od každého typu a rovnovážný stupeň zbotnání (S_w) byl stanoven podle vztahu:

$$S_w[\%] = \left[\frac{m_f - m_i}{m_i} \right] \times 100 \quad (3)$$

m_i ... počáteční hmotnost lyofilizovaného vzorku

m_f ... konečná neměnná hmotnost vzorku

Výsledná hodnota byla stanovena jako průměrná hodnota ze tří měřených vzorků.

Studium degradace

Hodnocení biodegradability bylo provedeno ponořením skafoldů do roztoku simulované tělní tekutiny (SBF, *simulated body fluid*) při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ po dobu 25 dnů. Roztok SBF byl připraven podle Kukubo et al. (tabulka 10) [Kokubo and Takadama, 2006].

Tabulka 10 – Složky roztoku SBF a jejich množství pro přípravu 500 ml

Pořadí	Chemická látka	Množství
1	NaCl	4,018 g
2	NaHCO ₃	0,178 g
3	KCl	0,114 g
4	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,116 g
5	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,159 g
6	1M HCl	19,5 ml
7	CaCl ₂	0,146 g
8	Na ₂ SO ₄	0,036 g
9	Tris	3,059 g
10	1M HCl	1,84 ml

Každý lyofilizovaný vzorek byl zvážen (m_a) a ponořen do zkumavky obsahující 10 ml SBF. Zkumavky byly uzavřeny víčkem, utěsněny parafilmem a ponechány v inkubátoru při

teplotě 37 °C, 5 % CO₂ po dobu 25 dnů. Poté byly skafoldy sušeny v laboratorní sušárně při teplotě 50 °C po dobu 4 dnů a zváženy (m_b). Úbytek hmotnosti byl stanoven podle vztahu:

$$\text{ubyték hmotnosti [\%]} = \left[\frac{(m_a - m_b)}{m_a} \right] \times 100 \quad (4)$$

m_a ... počáteční hmotnost lyofilizovaného vzorku

m_b ... konečná hmotnost vzorku po inkubaci a vysušení

Od každého typu skafoldu byly degradaci podrobeny vždy tři vzorky a výsledný úbytek hmotnosti byl stanoven jako jejich průměrná hodnota.

Hemolytický test

Hemolytický test [Pal and Pal, 2006] se provádí pro ověření hemokompatibility vzorků. Čerstvá lidská krev (8 ml ve zkumavce s citrátem sodným) byla zředěna 10 ml fyziologického roztoku (0,9 % NaCl). Do každé zkumavky s 10 ml fyziologického roztoku předehřátého na 37 °C po dobu 30 minut byl přidán jeden vzorek (A_S), 0,2 ml zředěné krve a vše bylo zahříváno v inkubátoru na 37 °C s 5 % CO₂ po dobu 60 minut. Jako negativní kontrola (A_{NC}) byl použit roztok 0,2 ml zředěné krve v 10 ml fyziologického roztoku a jako pozitivní kontrola (A_{PC}) roztok 0,2 ml zředěné krve v 10 ml destilované vody. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 5 minut při 3 000 ot/min. Hemokompatibilita byla stanovena fotometricky (UV/VIS spektrofotometr Optizen POP Nano Bio, Mecasys Co., Soul, Jižní Korea) při vlnové délce 545 nm jako procento hemolýzy:

$$\text{hemolýza [\%]} = \left[\frac{(A_S - A_{NC})}{(A_{PC} - A_{NC})} \right] \times 100 \quad (5)$$

A_S ... absorbance vzorku

A_{NC} ... absorbance negativní kontroly

A_{PC} ... absorbance pozitivní kontroly

Od každého typu skafoldu byly hemolytickému testu podrobeny vždy tři vzorky a výsledné procento hemolýzy bylo stanoveno jako jejich průměrná hodnota.

2.2.10 Stanovení mechanických vlastností hydrogelů

Pomocí dynamické mechanické analýzy (DMA, DMTA) lze měřit fyzikálně-mechanické vlastnosti materiálů za dynamických podmínek a sledovat tak jejich mechanické vlastnosti v závislosti na době namáhání, frekvenci, amplitudě napětí a míře deformace. Přístroj aplikuje na materiál cyklické napětí a měří deformační odezvu materiálu nebo naopak. Z amplitud a fázového posunu oscilujícího napětí a deformace jsou stanoveny základní charakteristiky materiálu jako modul komplexní (G^*), dynamický (G'), ztrátový (G'') a ztrátový činitel (ztrátový úhel; $\text{tg } \delta$) [Macosko, 1994].

Kompresní vlastnosti

Kompresní vlastnosti hydrogelů byly měřeny dynamickým mechanickým analyzátozem DMA Q800 (TA Instruments, New Castle, USA). Vzorky byly kruhového průřezu o průměru 15 mm a tloušťce cca 5 mm. Test byl proveden při konstantní teplotě 37 °C. Před vlastním testováním byly vzorky temperovány na teplotu 37 °C po dobu 15 min. Následné testování bylo provedeno ve dvou režimech zatěžování, při konstantní rychlosti 6 mm min⁻¹ a 0,6 mm min⁻¹, respektive 100 μm s⁻¹ a 10 μm s⁻¹. Následně byla u všech vzorků zaznamenána závislost napětí na deformaci.

Viskoelastické vlastnosti

Charakterizace viskoelastických vlastností hydrogelů byla provedena na modulárním kompaktním reometru MCR 92 Anton Paar (Anton Paar GmbH, Graz, Rakousko), geometrie deska–deska s křížovým šrafováním. Elastický (G') a ztrátový modul (G'') testovaných vzorků byly měřeny při teplotě 37 °C v režimu dynamického oscilačního namáhání a deformace s frekvencí 1 Hz.

2.2.11 Testy buněčné viability

Použité buněčné kultury

MG-63

Buněčná linie podobná lidských osteoblastům MG-63 (ECACC 86051601, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) byla kultivována v souladu s protokolem poskytnutým dodavatelem v Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Biosera Europe, Nuaille, Francie) doplněném 10 % (v/v) fetálním hovězím sérem (FBS, *fetal bovine serum*), (Biosera Europe, Nuaille, Francie), 100 U/ml penicilinu, 100 mg/ml streptomycinu (oba PAA Laboratories GmbH, Rakousko) a 2,5mM stabilním glutaminem (Diagnovum GmbH, Ebsdorfergrund, Německo), při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ ve zvlhčeném inkubátoru. Kultivační médium bylo vyměňováno podle potřeby.

BM-hMSC

Lidské mezenchymální kmenové buňky získané z kostní dřeně (BM-hMSC; *bone marrow human mesenchymal stem cells*) (SCC034) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) byly kultivovány v souladu s protokolem poskytnutým dodavatelem v DMEM doplněném 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml penicilinu a 100 mg/ml streptomycinu, 2,5mM stabilním glutaminem při 37 °C a 5 % CO₂ ve zvlhčené atmosféře. Kultivační médium bylo vyměňováno podle potřeby.

Testy buněčné adheze a proliferace

Před vlastním použitím byly hydrogely sterilizovány ponořením do 70 % ethanolu po dobu 3 hodin. Po sterilizaci byly promyty PBS a ponechány v kultivačním médiu ve zvlhčené atmosféře při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ (přibližně 12 h) pro podpoření adsorpce proteinů [Vrana et al., 2008]. Vzorky ve 24-jamkových destičkách byly osázeny jednak buňkami MG-63 a jednak buňkami BM-hMSC. Suspenze buněk MG-63 o objemu 1 ml obsahovala 4 x 10⁵ buněk, které byly na skafold nasazeny pomocí injekční stříkačky s jehlou o průměru 0,6 mm.

Buňky BM-hMSC byly nasazovány v množství 5×10^4 buněk ve 100 μl bazálního média z důvodu pomalejšího růstu a větší velikosti.

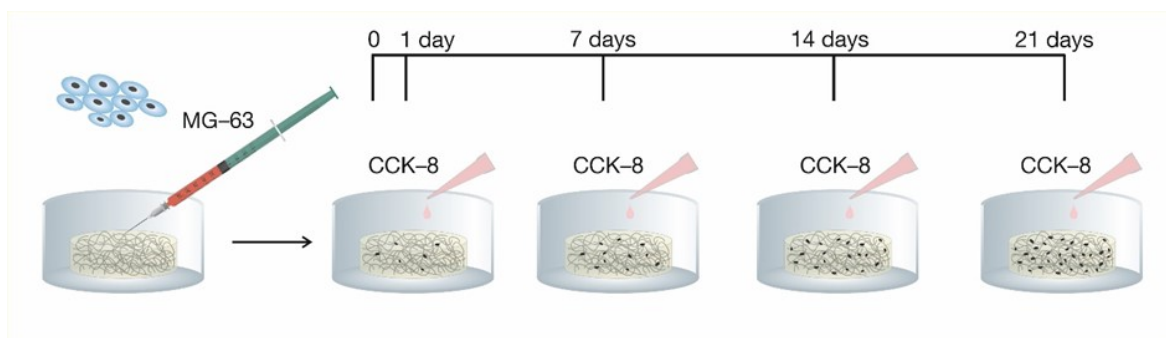
Počáteční adheze byla stanovena 24 hodin po výsevu pomocí kitu CCK-8 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo) v souladu s metodikou pro počítání buněk podle pokynů výrobce. Test CCK-8 je založen na přeměně světla fialové barvy vysoce vodorozpustné tetrazoliové soli WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl) na oranžovou vodorozpustnou sůl formazanového barviva, které lze kvantifikovat spektrofotometricky. Množství formazanového barviva vzniklého aktivitou dehydrogenáz v buňkách je přímo úměrné počtu živých buněk.

Vzorky hydrogelů byly přeneseny do nové 24-jamkové destičky a ke každému vzorku bylo přidáno 550 μl premixu (10 % roztok CCK-8 v DMEM). Po inkubaci (60 minut, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2) byly vzorky vyjmuty a množství vzniklého formazanu bylo stanoveno fotometricky v 96-jamkové destičce při 450 nm v mikrodestičkovém readeru SYNERGY H1 (BioTek, Winooski, VT, USA). Každý vzorek byl měřen čtyřikrát (4 x 100 μl) a byly použity vždy tři vzorky od každého typu hydrogelu. Počet životaschopných buněk byl stanoven na základě předem vytvořené kalibrační křivky. Primární adheze byla vypočtena podle vzorce:

$$\text{adheze} [\%] = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100 \quad (8)$$

N ... počet životaschopných buněk po 24 hodinách po nasazení
 N_0 ... počet nasazovaných buněk

Buněčná proliferace byla kvantifikována jako počet životaschopných buněk pomocí CCK-8 na základě kalibrační křivky v časových intervalech 7, 14 a 21 dní po vysazení (viz obrázek 7).



Obrázek 7 - Schéma experimentu hodnocení viability buněk na skafoldech

2.2.12 Osteogenní diferenciaci

Pro diferenciaci byly buňky BM-hMSC vysazeny na hydrogel ve 24-jamkové destičce sterilizovaný v 70 % ethanolu, v množství 5×10^4 buněk ve 100 μl kultivačního média DMEM doplněného 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml penicilinu, 100 mg/ml streptomycinu, a 2,5mM stabilním glutaminem při 37 $^{\circ}\text{C}$ a 5 % CO_2 ve zvlhčené atmosféře. Po 24 hodinách

kultivace bylo kultivační médium vyměněno za médium diferenciační, které bylo připraveno ze základního kultivačního média obohacením o dexametazon, askorbát-2-fosfát, β -glycerolfosfát, vitamin K3 (menadion) a vitamin D3 (cholecalciferol). Podrobné složení uvádí tabulka 11.

Tabulka 11 - Složení diferenciačního média

Složka v DMEM	Koncentrace
FBS	10 % (v/v)
penicilin	100 U/ml
streptomycin	100 mg/ml
stabilní glutamin	2,5 mM
dexametazon	100 nM
askorbát-2-fosfát	50 μ g/ml
β -glycerolfosfát	10 mM
vitamin K3	10 nM
vitamin D3	10 nM

Buňky byly kultivovány v diferenciačním médiu při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ ve zvlhčené atmosféře. Diferenciační médium bylo vyměňováno dvakrát týdně a připravováno vždy čerstvé. Celková doba diferenciace trvala 28 dní.

2.2.13 Stanovení osteogenní diferenciace BM-hMSC

Stanovení nerozpustných anorganických složek v ECM, které obsahují vápník a fosfáty ve formě HAp vytvořených osteogenní kulturou, bylo provedeno na základě aktivity ALP, barvení a exprese vybraných diferenciačních genů.

Stanovení aktivity ALP metodou konstantního času

Aktivita ALP v buňkách pomocí tohoto testu byla měřena v den 0, 7, 14, 21 a 28 od zahájení diferenciace. Podle pokynů dodavatele (ACAM, Cambridge, Velká Británie) byly buňky lyzovány v 0,1 % pufru Triton-X100 (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Německo) smíchaný s pracovním roztokem obsahujícím fosfatázový substrát v alkalickém pufovaném roztoku. Vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 15 min a intenzita vzniklého barevného produktu byla změřena jako absorbance při 420 nm proti vodě v mikrodestičkovém readeru SYNERGY H1. Před vlastním měřením byl zařazen míchací krok. Jako negativní kontrola byla použita směs replikátů příslušného vzorku (A_{negC}), která byla přidána až po napipetování inhibitoru a substrátu. Všechny inkubace byly prováděny přímo v destičkovém readeru a vzorky byly měřeny v tripletu a výsledná hodnota byla určena jako průměr. Aktivita ALP byla stanovena podle vzorce:

$$ALP \left[\frac{\mu\text{kat}}{l} \right] = 10,263 \times \Delta A \quad (9)$$

$$\Delta A = A_{vz} - A_{negC} \quad (10)$$

A_{vz} ... absorpce příslušného vzorku

A_{negC} ... absorpance příslušné negativní kontroly

Barvení pomocí alizarinu

Průběh diferenciacce byl hodnocen barvením vápenatých ložisek pomocí alizarinu (Alizarin Red S, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) v 0., 7., 14., 21. a 28. dni diferenciacce. Buňky na hydrogelu kultivované v diferenciacčním médiu byly promyty PBS a fixovány 2,5 % glutaraldehydem v PBS po dobu 30 min při 37 °C, 5 % CO₂. Po fixaci buněk byly hydrogely opět promyty PBS a obarveny 1 % roztokem alizarinu tak, že 50 μl bylo kápnuto přímo na skafold a ponecháno po dobu 2,5 min při pokojové teplotě. Poté byl barvicí roztok odstraněn a vzorky byly několikrát opláchnuty deionizovanou vodou a foceny makroskopicky.

Kvantifikace vápníku v osteogenní kultuře pomocí alizarinu

Ke kvantifikaci vápníku v osteogenní kultuře byly použity skafoldy obarvené alizarinem po 0., 7., 14., 21. a 28. dni diferenciacce. Do každé jamky se skafoldem bylo napipetováno 0,5 ml 10 % cetylpyridinium chloridu v 10mM Na₃PO₄ · 12 H₂O. Extrakce probíhala při pokojové teplotě po dobu 120 minut. Absorbance extrahovaného barviva byla měřena v 96-jamkové destičce při pokojové teplotě a vlnové délce 562 nm pomocí mikrodestičkového readeru SYNERGY H1. Každý vzorek byl měřen v tripletu (3 x 100 μl), jako negativní kontrola byl použit 10 % cetylpyridinium chloridu v 10mM Na₃PO₄ · 12 H₂O a výsledná hodnota byla stanovena jako průměr třech naměřených hodnot.

Barvení von Kossa

Tradiční metoda k detekci minerální usazeniny v živočišných tkáních se provádí dvoukrokovou barvicí metodou. Buňky diferencované na hydrogelu 0, 7, 14, 21 a 28 dní po promytí PBS byly fixovány 2,5 % glutaraldehydem v PBS po dobu 30 min při 37 °C, 5 % CO₂. Poté byly hydrogely opět promyty PBS a inkubovány s 2,5 % roztokem AgNO₃ po dobu 1 min při teplotě 37 °C, 5 % CO₂. Po opláchnutí deionizovanou vodou byly vzorky inkubovány po dobu 1 minuty při pokojové teplotě ve tmě s 0,5 % roztokem hydrochinonu. Po odstranění roztoku hydrochinonu byl k buňkám na 1 minutu při pokojové teplotě přidán 5 % roztok Na₂S₂O₃ a nakonec byly hydrogely ještě několikrát promyty deionizovanou vodou. Skafoldy byly foceny makroskopicky.

Stanovení exprese vybraných diferenačních genů pomocí RT-PCR

Pro kvantitativní odhad exprese vybraných diferenačních genů byla použita metoda RT-PCR se sondami UPL (Universal Probe Library, Roche, Praha, Česká republika). Celková RNA z buněk obsažených ve skafoldech byla extrahována pomocí soupravy FastRNAPro Green Kit (QBIogene, Irvine, CA, USA). Reverzní transkripce (byla provedena z 500 ng celkové RNA pomocí soupravy Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a náhodných hexamerů (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pro vlastní RT-PCR byla použita souprava KiCqStart® Probe qPCR ReadyMix™ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sekvence primerů a odpovídající sondy UPL byly vygenerovány pomocí softwaru ProbeFinder (Roche Applied Science, Mannheim, Německo) a syntetizovány společností GeneriBiotech (Hradec Králové, Česká republika). V tabulce 12 jsou uvedeny sekvence primerů a sondy UPL použité v koncentraci doporučené výrobcem. Pro stanovení byly použity vždy 3 vzorky, z nichž každý byl měřen v dubletu. Hladiny transkriptů byly normalizovány vůči housekeepingovému genu GAPDH.

Tabulka 12 - Sekvence primerů a odpovídající sondy UPL pro stanovení genové exprese osteodiferenciace

Označení genu	Forward a reverse primer, sekvence (5' - 3') (10 μM)	Sondy UPL (10 μM)
GAPDH	5'-GAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3' 5'-GTTCACACCCATGACGAACA-3'	probe #45
ALP	5'-TCACTCTCCGAGATGGTGGT-3' 5'-GTGCCCGTGGTCAATTCT-3'	probe #12
RUNX2	5'-TCACTGTCCTTTGGGAGTAGG-3' 5'-TGTCCTCTCAGCTCAGCTACC-3'	probe #74
BMP-2	5'-CAGACCACCGTTGGAGA-3' 5'-CCACTCGTTTCTGGTAGTTCTTC-3'	probe #31
OCN	5'-GGCGCTACCTGTATCAATGG-3' 5'-TCAGCCAACCTCGTCACAGTC-3'	probe #1
OPN	5'-TTTCGCAGACCTGACATCC-3' 5'-GGCTGTCCCAATCAGAAGG-3'	probe #61

2.2.14 Příprava histologických preparátů

Příprava histologických preparátů byla provedena na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Plzni (Univerzita Karlova). Po 21 dnech kultivace buněk ve skafoldech byly vzorky fixovány a uloženy v 10 % neutrálním pufrovaném formaldehydu. Byla provedena standardní dehydratace v ethanolu, následně ponořením do xylenu a nakonec zality do roztaveného parafínu. Tkáňové bloky byly nařezány na tloušťku 5 μm (Microtom Leica RM2255, Leica Biosystem, Wetzlar, Německo) a obarveny roztoky hematoxylinu a eosinu (H&E) (Biognost d.o.o., Záhřeb, Chorvatsko) pro vizualizaci buněk [Zhao et al., 2002]. Obarvené řezy byly pozorovány pomocí inverzního optického mikroskopu s digitálním fotoaparátem (Olympus CKX41, Olympus, Tokio, Japonsko).

2.2.15 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly vypočteny jako průměrná hodnota tří vzorků a každý vzorek byl měřen čtyřikrát. Pro testování normality distribuce bylo porovnání dat provedeno pomocí Studentova t-testu a výsledky s $p \leq 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Podle konkrétní situace byl využit jak neparametrický dvoustranný párový test, tak neparametrický Friedmanův test.

Statistické hodnocení analýzy HAp bylo provedeno v programu JASP (JASP 0.14.1, JASP Team, Amsterdam, Nizozemsko). Pro vyhodnocení bylo předpokládáno normální rozdělení dat (Q–Q graf), shoda rozptylů byla ověřena pomocí Levenova testu. Nulové hypotézy o shodě středních hodnot byly testovány metodou ANOVA a post–hoc testy (Studentův t-test) a byly provedeny pomocí Tukeyho, Bonferroniho nebo Šidákovy korekce s původní pravděpodobností výskytu chyby typu I 0,05. Pro určení věcného vlivu rozdílů v průměrných hodnotách byl vypočten Cohenův koeficient d se standardním omezením pro jeho velikost a na jeho základě byla stanovena směrodatná odchylka jako vážená směrodatná odchylka obou vzorků.

3 Souhrn výsledků a jejich diskuze

3.1 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 1

Stanovení optimálních podmínek přípravy hydrogelu na bázi PVA/HA obohaceného HA_p

Pro přípravu hydrogelu byl zvolen fyzikální typ síťování za pomoci cyklů zmrazování a rozmrazování. Hodnoty pórovitosti a hustoty pro zvolené počty cyklů síťování byly určujícím parametrem pro stanovení optimálního počtu cyklů síťování (tabulka 13).

Tabulka 13 - Stanovení hustoty a pórovitosti hydrogelu s různou koncentrací PVA v závislosti na počtu cyklů fyzikálního síťování

Počet cyklů síťování	15 % PVA			10 % PVA			5 % PVA		
	3	5	10	3	5	10	3	5	10
Pórovitost [%]	29,17	33,95	35,55	30,15	33,33	40,00	40,00	40,95	45,00
Hustota [g·cm ⁻³]	1,289	0,926	0,899	0,648	0,577	0,734	0,299	0,278	0,285

Nejnižší pórovitost a zároveň nejvyšší hustota byla zjištěna u 15 % roztoku PVA s nejnižším počtem cyklů fyzikálního síťování. Nejvyšší pórovitosti bylo dosaženo u 5 % roztoku PVA podrobeného 10 cyklům fyzikálního síťování. Zároveň u této koncentrace bylo dosaženo nejnižší hustoty bez rozdílu počtu síťovacích cyklů.

Diskuze

Fyzikální způsob síťování, opakované mrazení a rozmrazování, pro přípravu hydrogelu se jevil jako velice výhodný vzhledem k tomu, že se nepoužívají žádná síťovací činidla a tím byla zajištěna biomedicínská bezpečnost připraveného hydrogelu. Pro přípravu skafoldů byl vybrán 5 % roztok PVA, který dosáhl nejvyššího stupně pórovitosti a nejnižší hustoty. Jednotlivé póry by pravděpodobně měly být v těsné blízkosti a tak by materiál měl umožnit dostatečný vzájemný kontakt mezi buňkami, což je nezbytné pro jejich proliferaci. Dále je potřeba, aby materiál měl určité mechanické vlastnosti pro bezpečnou manipulaci. S rostoucím počtem příčných vazeb se totiž hydrogel stává tužším [Hong et al., 2020]. V porovnání počtu cyklů síťování nedochází u 5 % roztoku PVA k významné změně hustoty v závislosti na počtu cyklů síťování. Pro přípravu hydrogelu byl použit 5 % roztok PVA a bylo stanoveno použití 7 cyklů síťování i s ohledem na mechanické vlastnosti hydrogelu.

3.2 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 2

Stanovení nejvhodnějšího složení hydrogelu na bázi PVA/HA obohaceného HAp

Pro přípravu hydrogelu bylo na základě stanovení hustoty a pórovitosti použit 5 % roztok PVA. Ten byl kombinován v různých objemových poměrech s 1 % roztokem HA a 5 % suspenzí HAp. Celkem bylo připraveno 8 typů hydrogelů o různém složení a byly podrobeny sedmi cyklům fyzikálního síťování. Hydrogely byly porovnávány na základě *in vitro* biologických vlastností (botnavost, degradace, hemokompatibilita) (tabulka 14), adheze a proliferace buněk MG-63 (obrázek 8).

Tabulka 14 - Výsledky stupně zbotnění, hodnocení bioaktivity a hemokompatibility u jednotlivých typů skafoldů

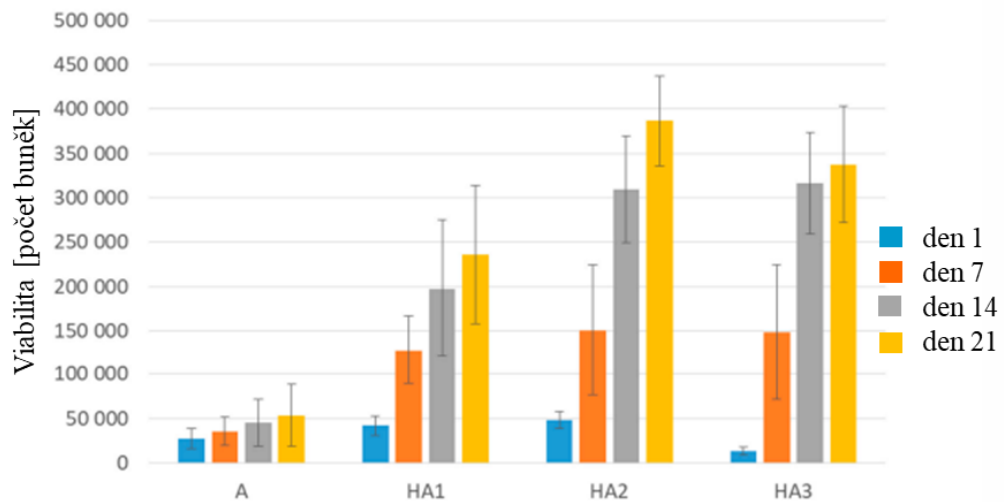
Vzorek	Poměr jednotlivých složek [PVA/HA/HAp]	Stupeň zbotnění [%]	Hodnocení bioaktivity [%]	Hemolýza [%] ¹
A	3:1:0	902,06	110,55	0,97 (+++)
HA1	3:1:1	917,23	102,50	0,39 (+++)
HA2	3:1:2	804,27	97,25	1,46 (+++)
HA3	3:1:3	770,82	113,30	1,55 (+++)
B	1:1:0	999,61	118,70	0,68 (+++)
HB1	1:1:1	1020,45	124,80	0,10 (+++)
HB2	1:1:2	797,92	122,70	0,58 (+++)
HB3	1:1:3	404,79	102,70	1,46 (+++)

Legenda: ¹ Hodnoty hemolýzy < 5 % znamenají vysokou hemokompatibilitu materiálu [+++] [Pal and Pal, 2006]

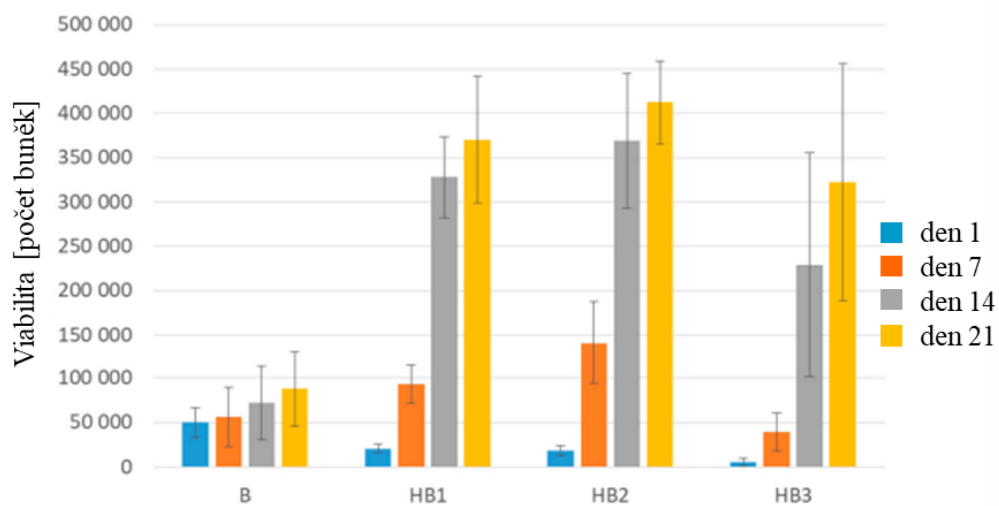
Z hodnocení botnění jednotlivých typů hydrogelů vyplývá, že jak HAp, tak i HA ovlivňovaly stupeň zbotnění. Stejně typy skafoldů (stejný poměr PVA/HA), ale s rozdílným množstvím HAp, vykazovaly pokles absorpce vody s rostoucím množstvím HAp. Vzorky obsahující nižší podíl HAp a stejné množství HA vykazovaly vyšší stupeň zbotnění, jak je patrné u vzorků HB1 a HB2 ($p = 0,0306$), HB1 a HB3 ($p < 0,001$), HB2 a HB3 ($p = 0,0107$). U hydrogelů řady A se vliv množství HAp na stupeň zbotnění neprojevil signifikantně jako u vzorků řady B, neboť podíl hydrofilních složek je výrazně vyšší než podíl HAp.

Na základě naměřených výsledků lze konstatovat nárůst hmotnosti u všech typů skafoldů po 25 dnech v roztoku SBF. U vzorků obsahujících vyšší množství HA vzhledem k PVA byl pozorován vyšší nárůst hmotnosti, vzorky A a B ($p = 0,0289$). Vliv množství HAp ve skafoldech se významným způsobem neprojevil na změně hmotnosti jednotlivých vzorků.

Všechny hodnoty hemolýzy skafoldů se pohybovaly mezi 0,1 % a 1,55 %. U vzorků s rozdílným množstvím HAp byla pozorována zvyšující se hemolýza s jeho zvyšujícím se množstvím. Vzorky obsahující poměr PVA/HA 1:1 (0,10%, 1,46 %) ve srovnání se vzorky neobsahující žádný HAp (0,97 %, 0,68 %) a u nichž bylo nižší množství HAp vzhledem k PVA, tzn. PVA/HAp (3:1, 3:2). (0,39 %, 1,46) vykazovaly nižší hemokompatibilitu.



(a)



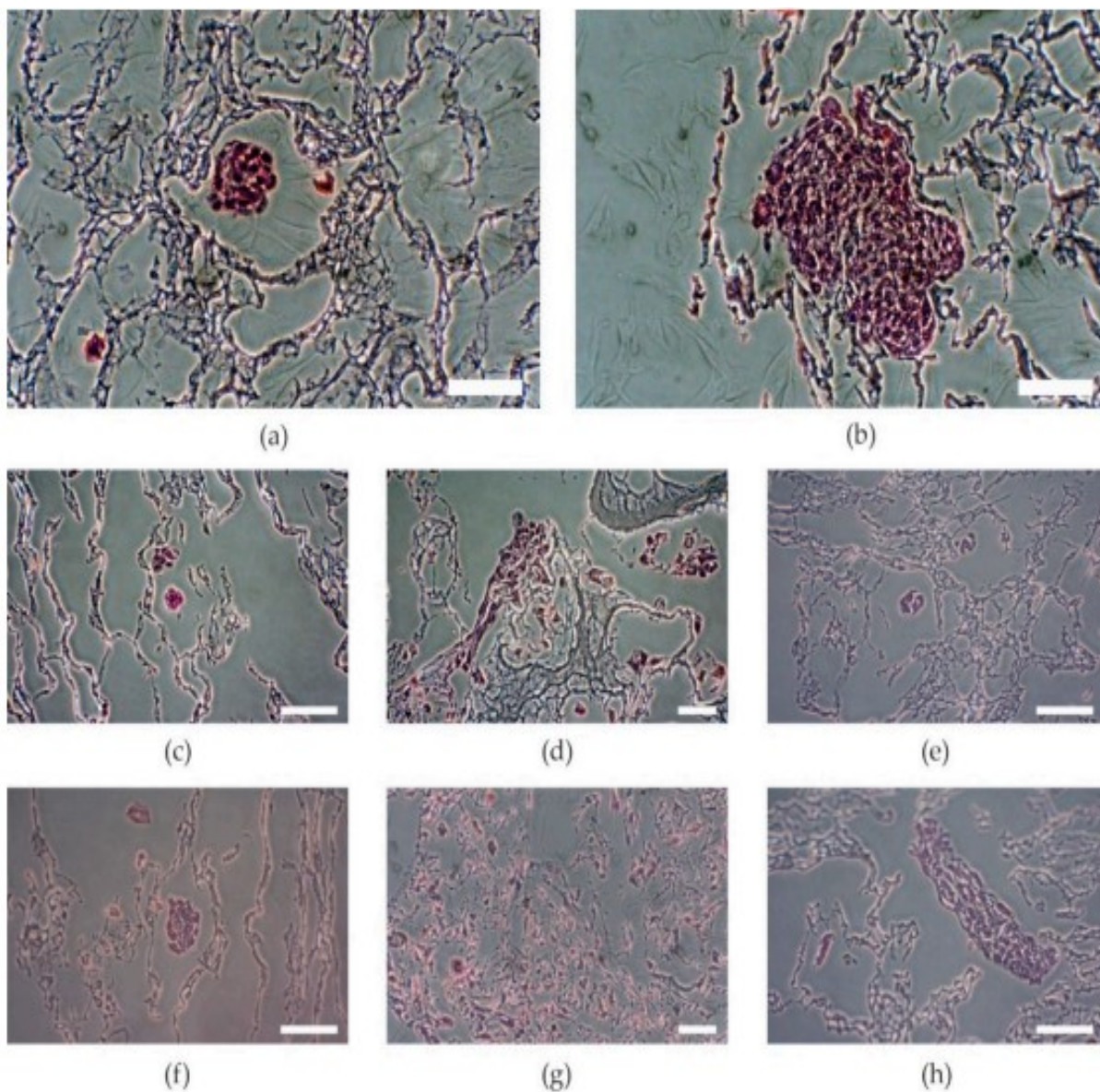
(b)

Obrázek 8 - Grafické znázornění viability buněk MG-63 na různých typech hydrogelů

Legenda: (adheze - den 1, proliferace - den 7, 14 a 21), (a) vzorky A, HA1, HA2, HA3, (b) vzorky B, HB1, HB2, HB3, Cchybové úsečky představují \pm SD,
 A: PVA/HA/HAp = 3:1:0; HA1: PVA/HA/HAp = 3:1:1; HA2: PVA/HA/HAp = 3:1:2;
 HA3 =PVA/HA/HA = 3:1:3;
 B: PVA/HA/HAp = 1:1:0; HB1: PVA/HA/HAp = 1:1:1; HB2: PVA/HA/HAp = 1:1:2;
 HB3 =PVA/HA/HAp = 1:1:3.

Během kultivace buněk se hodnota absorbance formazanu zvyšovala (obrázek 8 a, b), což naznačovalo, že buňky na skafoldech proliferovaly. Primární adheze měřená 24 hodin po nasazení buněk (den 1) na PVA/HA/HAp hydrogelech se zvýšila ve srovnání s primární adhezí na hydrogelu připraveného pouze z PVA v naší předběžné studii. U vzorků s vyšším množstvím HA vzhledem k PVA byla pozorována vyšší primární adheze a proliferace, zejména po delší době kultivace (vzorky s poměrem PVA/HA = 1:1). Přidání HAp zlepšilo šíření buněk a jejich hustotu na povrchu skafoldu ve srovnání se vzorky, které žádný HAp neobsahovaly; vzorky A a HA1 ($p = 0,0326$), A a HA2 ($p < 0,001$), A a HA3 ($p < 0,001$) (obrázek 8 a), B a HB1 ($p < 0,001$), B a HB2 ($p < 0,001$), B a HB3 ($p < 0,001$) (obrázek 8 b). Čím vyšší byla koncentrace HAp vůči organické matrix, tím nižší byla primární adheze buněk (vzorky HA1 a HB3).

Vizuální srovnání proliferace u jednotlivých vzorků bylo hodnoceno prostřednictvím histologicky obarvených řezů, které vykazují různé množství a uchycení buněk (obrázek 9).



Obrázek 9 - Vizuální srovnání kolonií buněk MG-63 obarvených hematoxylinem a eosinem na různých typech hydrogelů

Legenda: (a) vzorek A, (b) vzorek B, (c) vzorek HA1, (d) vzorek HA2, (e) vzorek HA3, (f) vzorek HB1, (g) vzorek HB2, (h) vzorek HB3,
 A: PVA/HA/HAp = 3:1:0; HA1: PVA/HA/HAp = 3:1:1; HA2: PVA/HA/HAp = 3:1:2;
 HA3 = PVA/HA/HAp = 3:1:3;
 B: PVA/HA/HAp = 1:1:0; HB1: PVA/HA/HAp = 1:1:1; HB2: PVA/HA/HAp = 1:1:2;
 HB3 = PVA/HA/HAp = 1:1:3.

Diskuze

Stupeň zbobtnání je jedním ze základních parametrů pro použití skafoldů v tkáňovém inženýrství. Je ovlivněn složením a hydrofilní povahou skafoldu. Absorpce vody souvisí s velikostí pórů a jejich vzájemným propojením [Haroun et al., 2009]. Výsledky potvrdily, že jak přítomnost HAp, tak i HA ovlivnila chování skafoldů při bobtnání. Stejně typy skafoldů, které se lišily v množství HAp vykazovaly pokles množství absorbované vody s rostoucím množstvím HAp. Čím vyšší byla koncentrace HAp ve vzorku, tím byl pozorován nižší stupeň zbobtnání v důsledku nižší hydrofility. Toto zjištění odpovídá výsledkům, které uvádí Kaur et al, kde byla hodnocena bobtnavost skafoldů obsahujících pouze dvě složky, PVA a HAp, bez přítomnosti HA [Kaur et al., 2015]. Na druhou stranu HA hydrofilitu hydrogelů zvyšovala, což vedlo ke zvýšení absorpce vody. Námi naměřený celkový stupeň zbobtnání hydrogelů v důsledku přidání hydrofilní složky (HA) dosáhl mnohem vyšších hodnot.

Tvorbu krystalů podobných apatitu na povrchu skafoldu bylo možné reprodukovat *in vivo* v roztoku SBF. Materiál lze považovat za bioaktivní *in vivo*, pokud se na jeho povrchu v SBF tvoří krystaly apatitu [Kokubo and Takadama, 2006]. V poslední době, byla standardizována metoda pro testování skafoldů *in vitro* ponořením do SBF, ačkoli někteří autoři s touto metodou nesouhlasí. Důvodem je skutečnost, že existují některé bioaktivní materiály, které v SBF netvoří na svém povrchu krystaly apatitu a přesto je možné je považovat za bioaktivní [Zadpoor, 2014]. Tvorba těchto krystalů v SBF by měla být podpořena právě přítomností HA [Nikbakht et al., 2020]. Přítomnost HA v důsledku zvýšení hydrofility měla přímou souvislost s nárůstem hmotnosti a lze konstatovat, že hydrofilnější povrch je bioaktivnější. Výsledky ukazovaly přímou závislost růstu krystalů na rostoucí koncentraci HA.

Je důležité studovat interakce materiálů používaných pro přípravu skafoldů a krevních složek pro posouzení rizika srážení krve. Test byl založen na stanovení množství hemoglobinu uvolněného z červených krvinek při kontaktu se skafoldem [Pal and Pal, 2006]. Je třeba zdůraznit, že se jednalo pouze o tzv. předběžný a orientační test a je nutné provést podrobnější zkoumání biokompatibility. Jednotlivé složky skafoldů jsou považovány za biokompatibilní, stejně jako celý skafold. Při porovnání vzorků s rozdílným množstvím HAp, bylo pozorováno mírné zvýšení hemolýzy u vzorků s vyšším množstvím přidaného HAp vzhledem k obsahu PVA. Mírné zvýšení hemolýzy u těchto vzorků lze považovat za zanedbatelné vzhledem ke krevní snášenlivosti. To může být způsobeno větší interakcí mezi iontovými skupinami HAp a krví. Naše výsledky byly v souladu s výsledky hemokompatibility, které uvádí Kaur et al. a Pal [Kaur et al., 2015; Pal and Pal, 2006].

Adheze a proliferace buněk je důležitým faktorem pro integraci skafoldu do biologického prostředí. Hodnocení *in vitro* bylo provedeno pomocí lidských buněk MG-63, které jsou podobné osteoblastům. Skafoldy připravené pouze z PVA vykazovaly nedostatečnou adhezi buněk, což se projevilo hlavně během proliferace. Důvodem je, že hydrofilní inertní polymer PVA působí proti adhezi buněk [Su et al., 2019]. Bylo zjištěno, že přítomnost HAp zvyšuje primární adhezi buněk a vyšší obsah HA zase jejich proliferaci [Oh et al., 2016]. Výsledky ukázaly, že došlo ke zvýšení primární adheze a proliferace buněk, zejména po delší době kultivaci. Tento výsledek potvrdil, že HAp umožňovala buňkám silnější přilnutí ke skafoldu pravděpodobně díky svým přirozeným biologickým funkcím [Oh et al., 2016]. Přítomnost HAp zlepšila šíření buněk a jejich hustotu na povrchu skafoldu ve srovnání se vzorky, které neobsahovaly žádný HAp. To může být pravděpodobně způsobeno větším povrchem. Čím vyšší byla koncentrace HAp, tím lepší proliferace byla pozorována, ale dalším zvyšováním

množství HAp došlo ke snížení proliferace buněk. Vzorke s nejnižším množstvím HAp vykazovaly nejnižší nárůst proliferace, s rostoucím množstvím HAp došlo k jejímu zvýšení, ale vzorky s nejvyšším množstvím HAp vykazovaly pokles proliferace buněk. To odpovídá výsledkům adheze a proliferace buněk na skafoldech připravených z PVA a HAp, které uvedli Kaur et al. ve svých výsledcích [Kaur et al., 2015]. Tyto výsledky ukazují, že je zapotřebí zvolit optimální množství HAp. Ze tří testovaných poměrů se jako nejvhodnější jevila směs s objemovým poměrem HA/HAp 1:2.

3.3 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 3

Vliv rozdílných způsobů přípravy HAp na vlastnosti hydrogelu s nejvhodnějším složením

Na základě výše uvedených výsledků, byly pro další zkoumání vybrány hydrogely, které obsahovaly HA/HAp v poměru 1:2, tzn. hydrogely složené ze tří složek PVA/HA/HAp v objemovém poměru 3:1:2 a 1:1:2. Tyto hydrogely byly porovnávány na základě různé syntézy HAp. Vzorky označené UHA2, respektive UHB2, byly získány fyzikálním přimícháním předem připraveného HAp do organické matrix pomocí ultrasonikace. Vzorky obsahující HAp do organické matrix zabudovaného pomocí *in situ* syntézy byly označeny IHA2, respektive IHB2. Pro potvrzení struktury, poměru Ca/P a krystalinity obou typů HAp v jednotlivých vzorcích byla použita analýza EDX a FTIR. U všech vzorků byly dále hodnoceny mechanické vlastnosti, *in vitro* biologické vlastnosti a stanovena viabilita buněk MG-63.

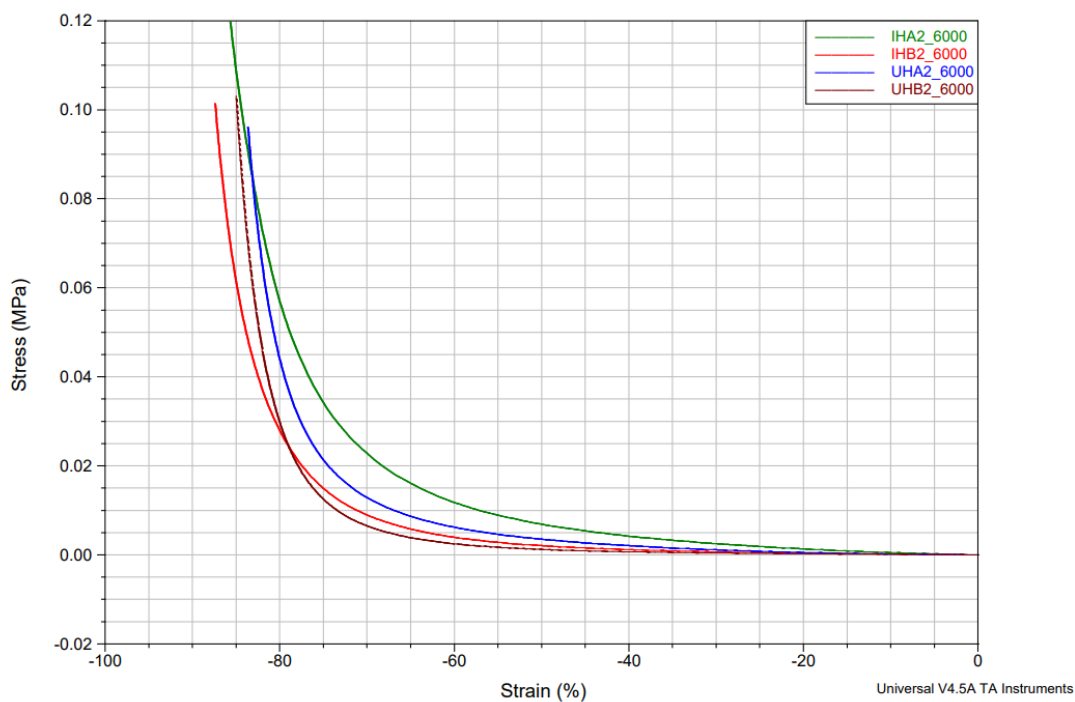
Vliv přípravy HAp na mechanické vlastnosti hydrogelu

Stanovení Youngova modulu pružnosti (E) z lineární části průběhu napětí vs. deformace do 10 % prodloužení bylo provedeno při konstantní teplotě 37 °C, výsledky jsou uvedeny v tabulce 15.

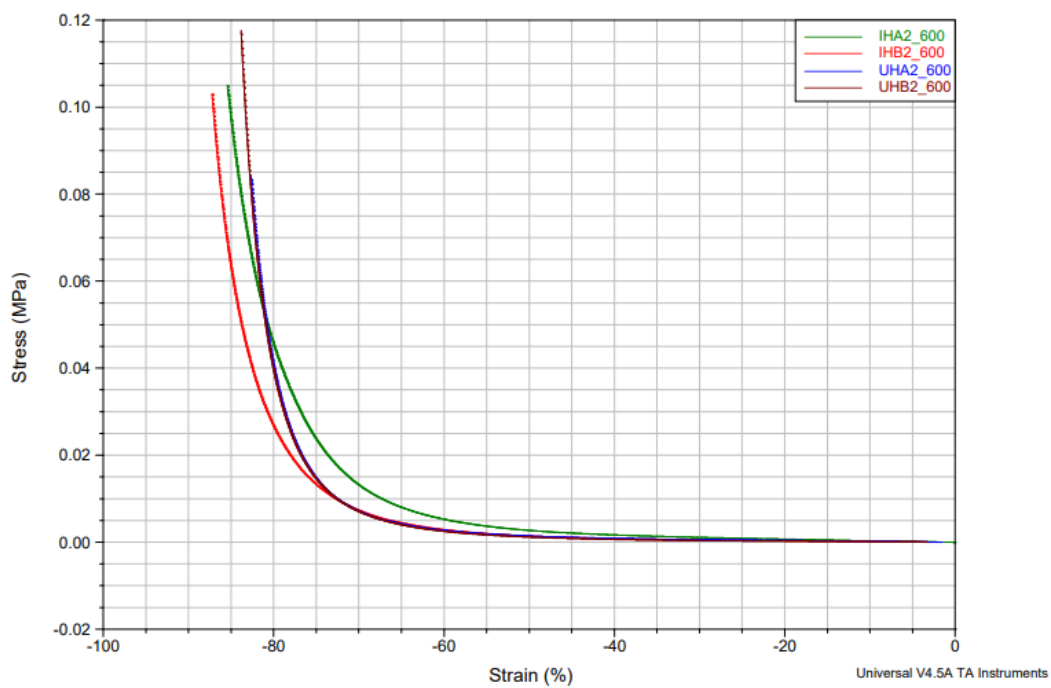
Tabulka 15 - Stanovení Youngova modulu pružnosti hydrogelů s různě připraveným HAp

Vzorek	Objemový poměr jednotlivých složek vzorku [PVA/HA/HAp]	Youngův modul pružnosti E [MPa]
UHA2	3:1:2	$1,64 \cdot 10^{-3}$
IHA2	3:1:2	$2,93 \cdot 10^{-3}$
UHB2	1:1:2	$1,29 \cdot 10^{-3}$
IHB2	1:1:2	$1,54 \cdot 10^{-3}$

Testování kompresních vlastností bylo provedeno ve dvou režimech, a to při konstantní rychlosti zatěžování $6\,000\ \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a $600\ \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, respektive $100\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a $10\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Následně byla u všech vzorků zaznamenána závislost napětí na deformaci (obrázek 10 a obrázek 11). Stanovený Youngův modul pružnosti u vzorku hydrogelu s vyšším obsahem organické matrix a s HAp připraveným *in situ* (IHA2) vykazoval dvojnásobnou hodnotu oproti ostatním vzorkům (UHA2, IHB2, UHB2).

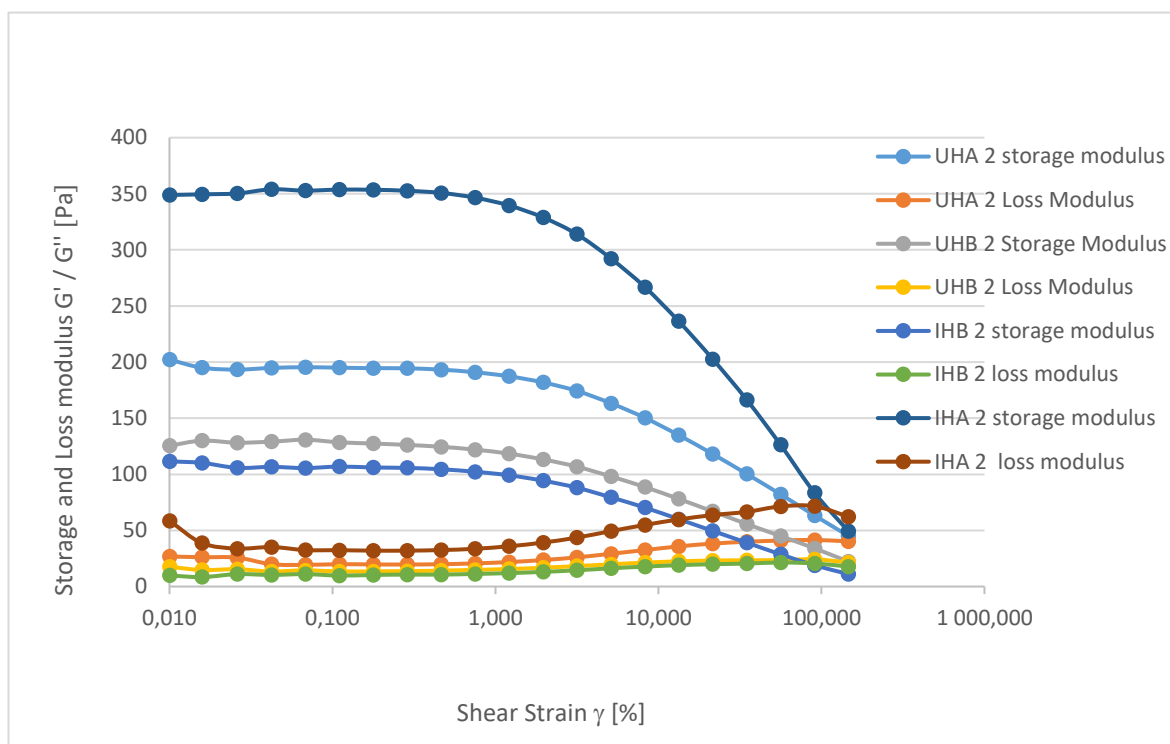


Obrázek 10 - Vliv způsobu přípravy HAp na kompresní vlastnosti hydrogelů při konstantní rychlosti zatěžování 6 000 μm·min⁻¹, respektive 100 μm·s⁻¹



Obrázek 11 – Vliv způsobu přípravy HAp na kompresní vlastnosti hydrogelů při konstantní rychlosti zatěžování 600 μm·min⁻¹, respektive 10 μm·s⁻¹

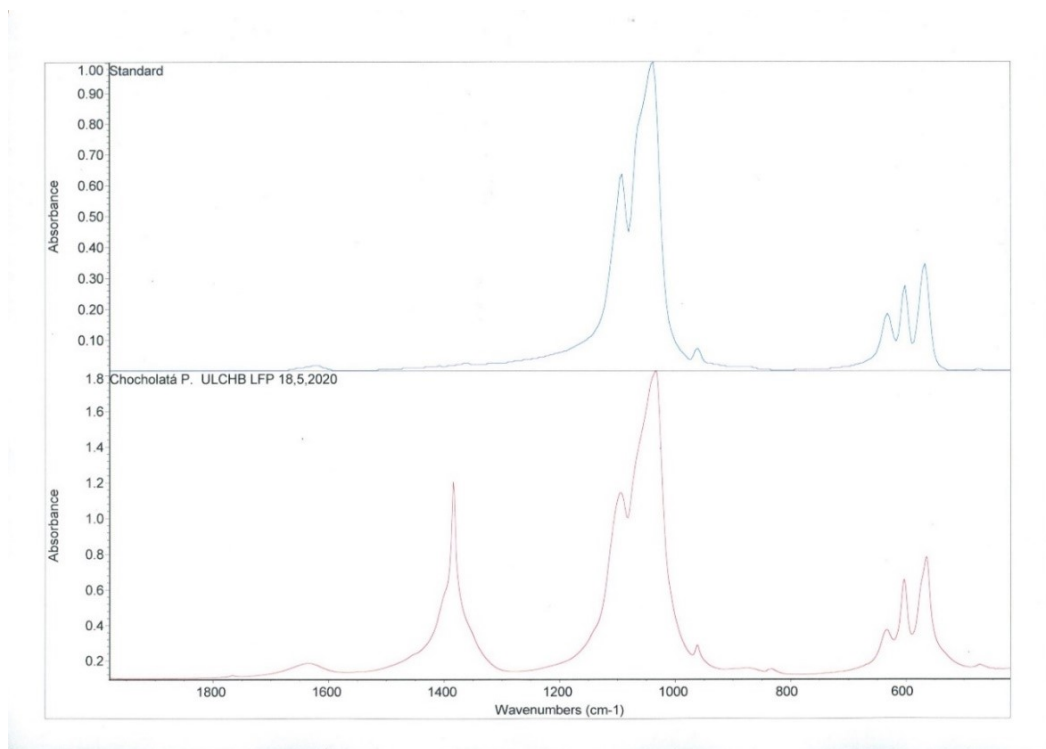
Viskoelastické vlastnosti hydrogelů s různě připraveným HAp byly stanoveny na základě dynamického (G') a ztrátového modulu (G'') s použitím dynamického oscilačního režimu deformace s frekvencí 1 Hz (obrázek 12). Výsledky ukázaly, že hydrogel s vyšším obsahem organické matrix a s HAp připraveným *in situ* (IHA2) dosáhl trojnásobných hodnot dynamického modulu oproti ostatním hydrogelům (UHA2, IHB2, UHB2).



Obrázek 12 – Stanovení viskoelastických vlastností jednotlivých hydrogelů s různě připraveným HAp

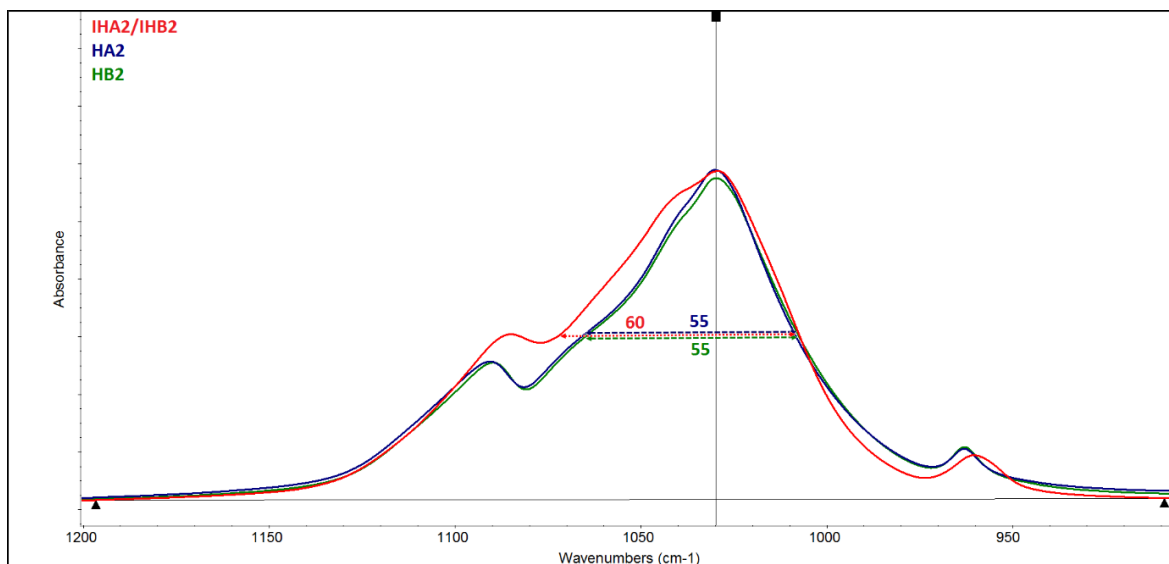
Analýza HAp

Ověření předem připraveného HAp bylo provedeno pomocí FTIR). Píky charakteristické pro HAp jsou při $1\,000\text{--}1\,050\text{ cm}^{-1}$ a $560\text{--}600\text{ cm}^{-1}$. Pík při $1\,420\text{ cm}^{-1}$ značí přítomnost dusičnanů (obrázek 13 a obrázek 14).



Obrázek 13 - FTIR předem připraveného HAp

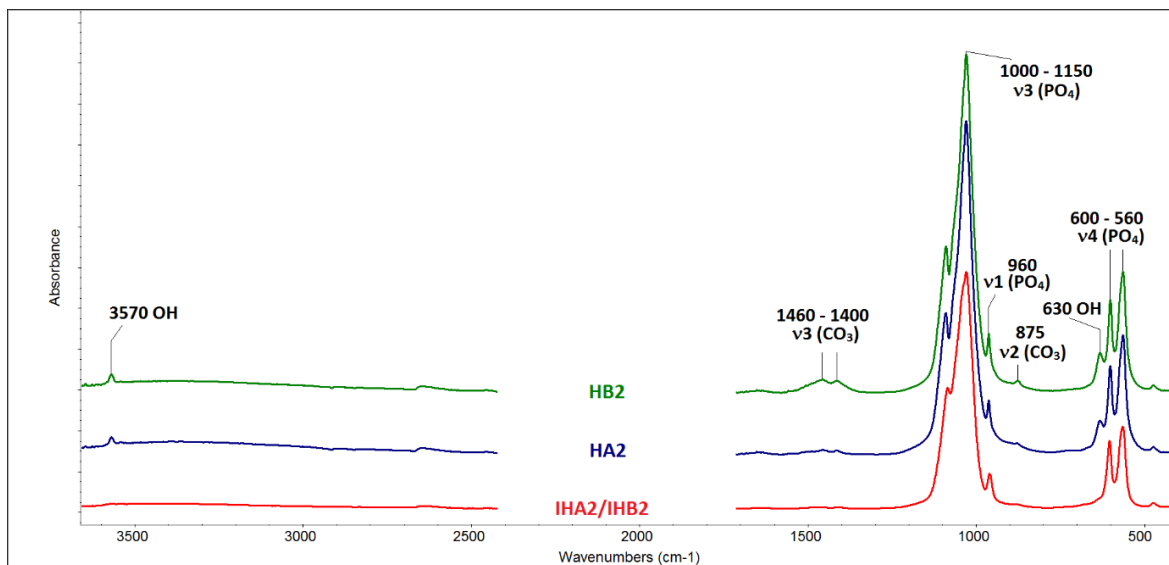
Legenda. modrá barva – standardní HAp, červená barva – HAp použitý pro přípravu skafoldů.



Obrázek 14 - FTIR spektra HAp v hydrogelech s různě připraveným HAp

Legenda: modrá barva – vzorek UHA2, červená barva – vzorky IHA2 a IHB2, zelená barva – vzorek UHB2.

Krystalinita byla měřena v oblasti $1\ 030\ \text{cm}^{-1}$ s využitím plné šířky poloviny maxima (FWHM, *full width in half of maximum*), kde byly vidět rozdíly v pološířkách všech studovaných HAp (obrázek 15). Čím vyšší je krystalinita materiálu, tím nižší je hodnota FWHM. U vzorků s předem připraveným HAp (vzorky UHA2, UHB2) byla naměřena hodnota $55\ \text{cm}^{-1}$, zatímco hodnoty pro apatit připravený *in situ* (vzorky IHA2, IHB2) byla naměřena hodnota $60\ \text{cm}^{-1}$.



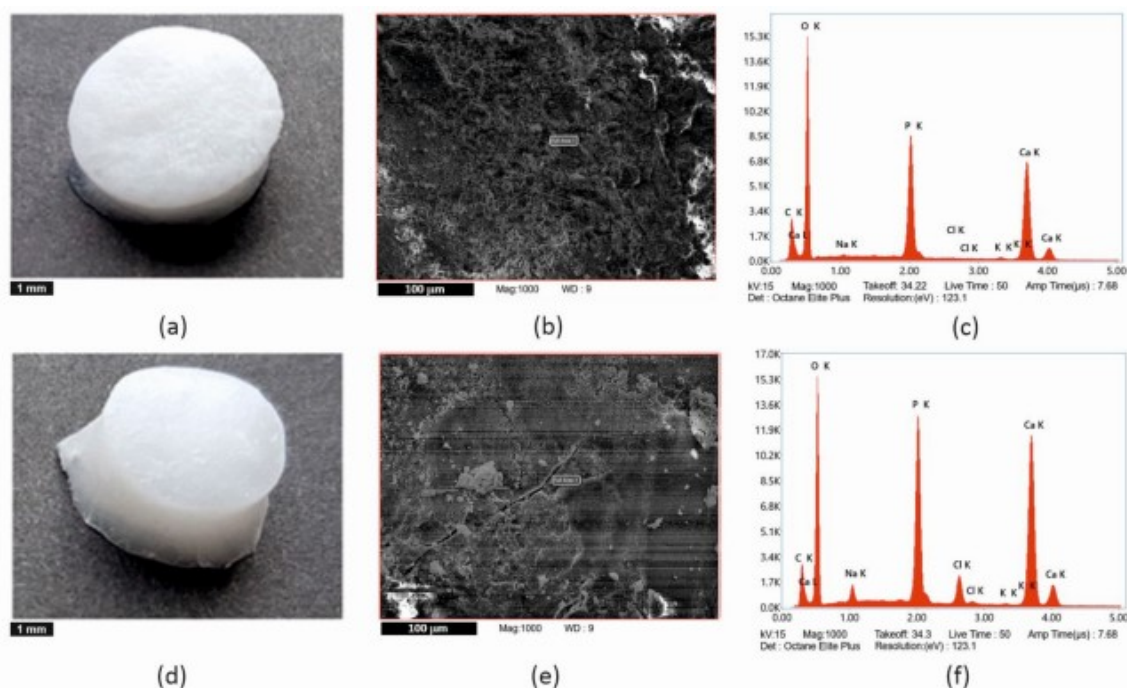
Obrázek 15 - FWHM spektra HAp v hydrogelech s různě připraveným HAp

Legenda: modrá barva – vzorek UHA2, červená barva – vzorky IHA2 a IHB2, zelená barva – vzorek UHB2.

Prvkové složení izolovaných apatitů bylo stanoveno pomocí EDS a výsledky uvádí tabulka 16 a obrázek 16.

Tabulka 16 - Prvkové složení izolovaných apatitů v hydrogelech na základě EDS analýzy

Prvek [hm %]	IHA2/HB2		UHA2		UHB2	
	Průměr	Průměrná odchylka	Průměr	Průměrná odchylka	Průměr	Průměrná odchylka
C	5,40	0,70	6,05	7,66	6,15	5,81
O	39,80	1,24	39,74	43,53	39,40	36,59
Na	1,83	0,22	0,03	0,01	0,01	0,01
P	17,87	0,15	16,87	16,80	17,26	17,57
Cl	2,03	0,54	0,01	0,09	0,03	0,01
K	0,02	0,02	0,45	0,41	0,75	0,76
Ca	33,06	1,59	36,85	31,12	36,40	38,36



Obrázek 16 - Srovnání hydrogelů s předem připraveným HAp (a-c) a hydrogelů s HAp připraveným *in situ* (d-f)

Legenda: makroskopický obrázek skafoldů – stupnice 1 mm (a, d), snímky z ESM kalcinovaných skafoldů – měřítko 100 μm (b, e), spektrum prvků – analýza EDS (c, f).

Hmotnostní poměr Ca/P ve stechiometrickém hydroxyapatitu je roven 2,15, což odpovídá molárnímu poměru 1,67. Provedená EDS analýza ukázala, že poměr těchto dvou prvků v našem předem připraveném HAp se blíží hodnotě pro stechiometrický HAp (2,15). O něco nižší hodnotu vykazoval poměr Ca/P (1,85) v HAp připraveném *in situ* (tabulka 17). Se

spolehlivostí vyšší než 95 % můžeme potvrdit, že mezi středními hodnotami poměru Ca/P apatitů UHB2 a IHA2/IHB2, obdobně IHA2/IH2B a UHA2 je nejspíš rozdíl. Tento rozdíl je věcně významný (na základě Cohena koeficientu d , tabulka 18).

Tabulka 17 - Hmotnostní poměr Ca/P v hydrogelech s různě připraveným HAp

Hmotnostní poměr	IHA2/IHB2		UHA2		UHB2	
	Průměr	Průměrná odchylka	Průměr	Průměrná odchylka	Průměr	Průměrná odchylka
Ca/P	1,85	0,14	2,18	0,11	2,11	0,12

Tabulka 18 - Cohenův koeficient d pro poměr Ca/P v hydrogelech s různě připraveným HAp

Porovnání	Cohenův koeficient d	Cohenův koeficient d (pár)
UHB2 vs. IHA2/IHB2	1,955	2,060
UHB2 vs. UHA2	0,638	0,439
IHA2/IHB2 vs. UHA2	2,628	2,650

***In vitro* biologické hodnocení hydrogelů**

Pro biologické hodnocení hydrogelů s předem připraveným HAp (vzorky UHA2, UHB2) a s HAp připraveným *in situ* (vzorky IHA2, IHB2) byly použity testy botnání, biodegradability, a hemolytický test (tabulka 19).

Tabulka 19 - Biologické hodnocení hydrogelů s různě připraveným HAp

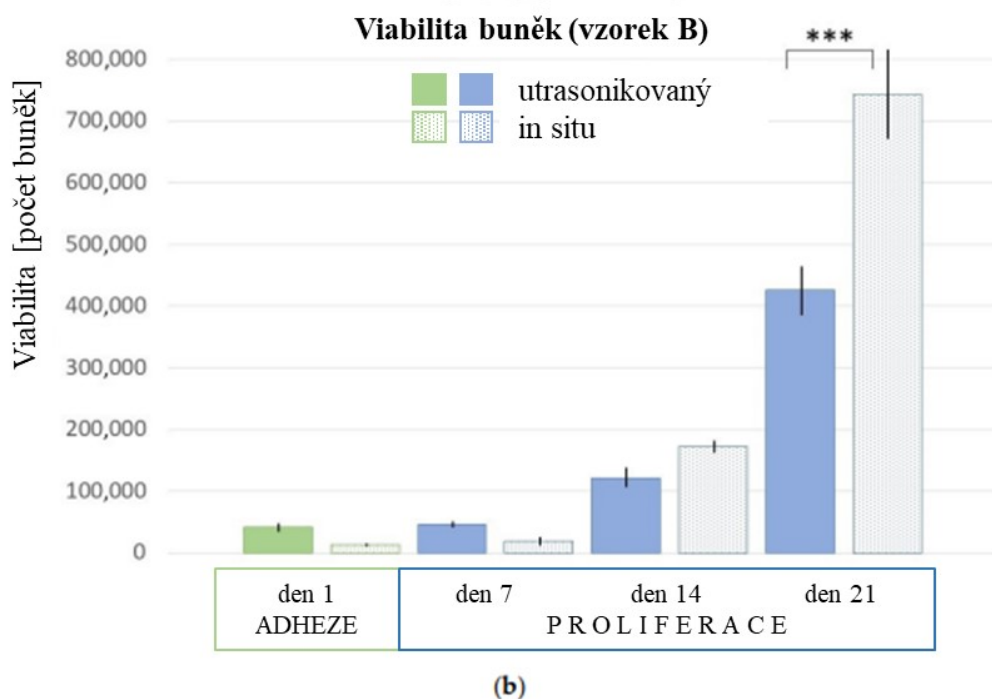
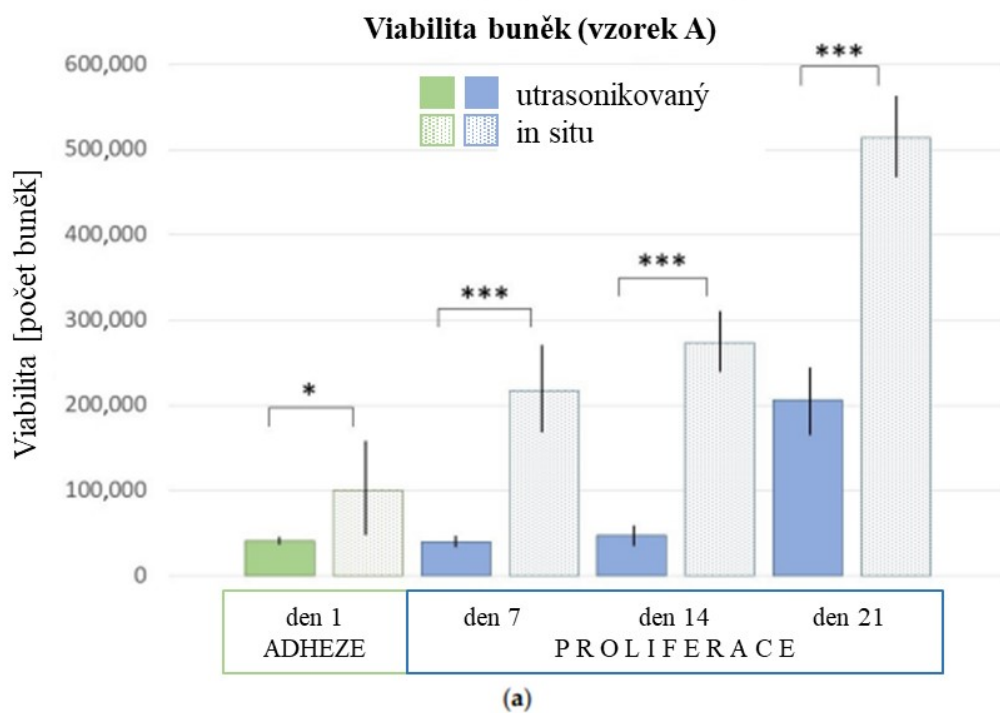
Vzorek	Objemový poměr jednotlivých složek vzorku [PVA/HA/HAp]	Stupeň zbotnění [%]	Hodnocení bioaktivity [%]	Hemolýza [%] ¹
UHA2	3:1:2	384 ± 54	8,4 ± 0,8	18,1 ± 1,2 (++)
IHA2	3:1:2	392 ± 49	16,0 ± 0,5	21,1 ± 1,0 (+)
UHB2	1:1:2	211 ± 7	15,0 ± 2,7	14,7 ± 2,0 (++)
IHB2	1:1:2	170 ± 24	17,2 ± 2,8	3,8 ± 0,4 (+++)

Legenda: ¹ vysoce hemokompatibilní (< 5 % hemolýza, +++), hemokompatibilní (do 10 % hemolýzy, ++), nehemokompatibilní (hemolýza >20 %, +) [Pal and Pal, 2006].

Vzorky s objemovým poměrem jednotlivých složek PVA/HA/HAp 3:1:2 (vzorky UHA2, IHA2) dosáhly významně vyššího stupně zbotnění ($p < 0,001$) než vzorky o složení PVA/HA/HAp 1:1:2 (vzorky UHB2, IHB2). Způsob přípravy HAp stupeň zbotnění neovlivnil. Hodnocení bioaktivity ukázalo u vzorků s poměrem složek PVA/HA/HAp 3:1:2, že vzorek připravený fyzikálním vmícháním HAp (vzorek UHA2) vykazoval výrazně nižší pokles hmotnosti ($p < 0,001$) než vzorek s HAp připraveným *in situ* (vzorek IHA2). Hodnoty hemolýzy u všech vzorků ukázaly hodnoty do 10 %, respektive do 20 %, což znamenalo, že všechny vzorky byly hemokompatibilní. Významně rozdílná hemolýza byla zaznamenána u vzorků s poměrem PVA/HA 1:1 ($p = 0,0081$) a také u vzorků obsahující *in situ* připravený HAp ($p = 0,0336$).

Stanovení buněčné viability

Pro hodnocení viability hydrogelů byly použity buňky MG-63. Stanovení zahrnovalo jednak počáteční adhezi (den 1, 24 h po vysazení buněk) a jednak proliferaci (den 7, 14 a 21) na základě měření rostoucí absorbance formazanu (obrázek 17).

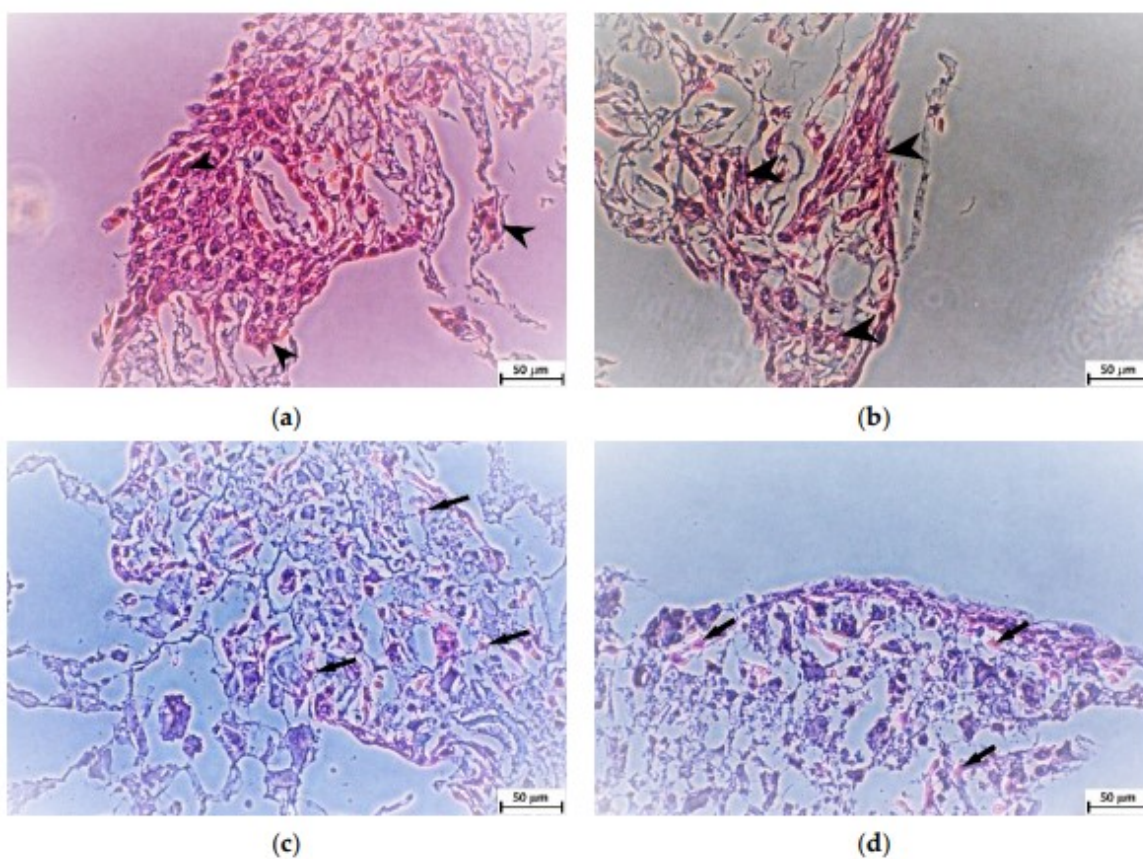


Obrázek 17 - Grafické znázornění adheze a proliferace buněk MG-63 na hydrogelech s různě připraveným HAp

Legenda: (a) vzorky UHA2, IHA2, (b) vzorky UHB2, IHB2, chybová úsečka představuje \pm SD, vzorky A: PVA/HA/HAp = 3:1:2, vzorky B: PVA/HA/HAp = 1:1:2, U = ultrasonikovaný, I = *in situ* připravený HAp, hvězdičky (*, ***) označují statisticky významné rozdíly $p < 0,05$, respektive $p < 0,001$.

Při porovnání buněčné viability vzorků A (PVA/HA/HAp = 3:1:2) byla u hydrogelu s *in situ* připraveným HAp zaznamenána významně vyšší počáteční adheze ($p = 0,0440$), stejně jako proliferace v následujících dnech ($p < 0,001$). U vzorků B (PVA/HA/HAp = 1:1:2) byl též pozorován signifikantní rozdíl v proliferaci, který se však projevil ve prospěch skafoldu IHB2 až po delší době kultivace, 21. den ($p < 0,001$).

Po 21 dnech buněčné proliferace byly z jednotlivých testovaných hydrogelů připraveny histologické řezy. Bylo zřejmé, že více buněk bylo ve skafoldech s HAp syntetizovaným *in situ* (vzorky IHA2, IHB2), zatímco skafoldy s fyzikálně přimíchaným HAp pomocí ultrasonikátoru (vzorky UHA2, UHB2) obsahovaly pouze solitérní buňky (obrázek 18).



Obrázek 18 - Reprezentativní mikroskopické snímky histologických řezů, na kterých jsou vidět buňky MG-63 rostoucí 21 dní po nasazení buněk na hydrogelech s různě připraveným HAp

Legenda: (a) vzorek IHA2, (b) vzorek IHB2, (c) vzorek UHA2, (d) vzorek UHB2, šipky označují shluky buněk u vzorků IHA2, IHB2, zatímco šipky u vzorků UHA2 a UHB2 ukazují na solitérní buňky, měřítko je 50 µm.

Diskuze

Ke stanovení mechanických vlastností hydrogelů byly použity vzorky o průměru 12 mm a výšce 6 mm. Z důvodu stejnoměrného rozložení teploty byly vzorky před vlastním testováním vystaveny teplotě 37 °C po dobu 15 min. Porovnáním výsledků mechanických vlastností lze říci, že hydrogel s vyšším obsahem organické matrix a s HAp připraveným *in situ* dosáhl dvojnásobných hodnot a v rámci dynamického modulu dokonce trojnásobných hodnot, oproti ostatním typům hydrogelů. Lze tedy říci, že hydrogel IHA2, který obsahoval poměr PVA/HA/HAp 3:1:2, dosáhl třikrát vyšší houževnatosti. V rámci složení studovaných hydrogelů dosažené výsledky ukázaly, že na jejich mechanické vlastnosti má největší vliv množství PVA a forma HAp. Hydrogel s vyšším množstvím PVA a s HAp připraveným *in situ* dosáhl lepších mechanických vlastností oproti hydrogelům obsahující nižší množství PVA a fyzikálně přimíchaný HAp. Tento výsledek odpovídá předpokladům, že větší množství viskózní složky a lepší distribuce částic HAp zvyšuje mechanické vlastnosti hydrogelů. Tento systém obsahuje i větší podíl hydrofilní složky, která zvyšuje absorpci vody a tím se také zvyšuje pružnost sítě [Rial et al., 2018]. Nicméně vzhledem k tomu, že se jedná o hydrogely, jsou obecně tyto hodnoty nižší v porovnání s jinými typy skafoldů (např. keramika, pěny atd.) [Oliveira et al., 2019] a ze statistického hlediska je tento rozdíl nevýznamný.

Pro analýzu HAp ve skafoldech pomocí FTIR byly materiály upraveny kalcinací při teplotě 500 °C na vzduchu. Tato teplota byla stanovena záměrně, aby se organické látky zcela odstranily a anorganická část nebyla ovlivněna [Šupová, 2020]. Ukázalo se, že námi vyrobený HAp odpovídal standardu vzhledem k maximální dosažené absorpenci mezi 1 200 a 1 000 cm^{-1} . Přídavný pík při 1 420 cm^{-1} charakterizoval přítomnost dusičnanů, protože nebyla při přípravě HAp provedena jeho kalcinace. Spektra hydrogelů UHA2 a UHB2 vykazují pásy při 3 570 a 630 cm^{-1} , které jsou důkazem hydroxylace apatitu v aniontovém kanálu. Pásy ve FTIR spektru typické pro valenční a deformační módy aniontu PO_4^{3-} jsou viditelné ve všech spektrech. Pásy v rozmezí 1 000–1 150 cm^{-1} patří asymetrickému valenčnímu módu. Pás v oblasti 960 cm^{-1} patří symetrickým valenčním vibracím a pásy v oblasti 560–600 cm^{-1} jsou odrazem asymetrických deformačních vibrací. Na základě porovnání FWHM spekter lze konstatovat, že krystalinita obou připravených apatitů se neliší. Jak je patrné z výsledků, apatity obsahují vápník, fosfor a kyslík jako hlavní prvky a také uhlík, který je součástí uhličitanů. Sodík a chlór jsou přítomny v HAp skeletech hydrogelů IHA2 a IHB2 v koncentraci přibližně 2 hm % a draslík ve stopovém množství. Tyto prvky pocházely z přípravy HAp.

Jedním z důležitých parametrů u HAp je hmotnostní poměr vápníku a fosforu. Hmotnostní poměr Ca/P ve stechiometrickém hydroxyapatitu je roven 2,15, což odpovídá molárnímu poměru 1,67. Ze statistické analýzy vyplývá, že apatity ve vzorcích UHA2 a UHB2 jsou, se spolehlivostí 95 %, ve svých poměrech Ca/P shodné a jejich hodnoty (2,18 a 2,11) se blíží hodnotě pro stechiometrický hydroxyapatit (2,15). Provedená EDS analýza tedy ukázala, že poměr těchto dvou prvků v našem předem připraveném HAp se blíží hodnotě pro stechiometrický HAp (2,15). O něco nižší hodnotu vykazoval poměr Ca/P (1,85) v HAp připraveném *in situ*, což odpovídá formě HAp s nedostatkem vápníku [Šupová et al., 2018]. Pro stanovení věcného účinku rozdílů středních hodnot poměru Ca/P byl vypočten Cohenův koeficient pro párové porovnání se standardními hranicemi pro jeho velikost (< 0,2 zanedbatelný; 0,2-0,5 malý; 0,5-0,8 střední; > 0,8 velký efekt). Cohenův koeficient je míra věcné významnosti a jedná se o důležitější údaj nežli spolehlivost zamítnutí nulové hypotézy

o rovnosti středních hodnot. Se spolehlivostí vyšší než 95 % můžeme potvrdit, že mezi středními hodnotami poměru Ca/P apatitů hydrogelů UHB2 a IHA2/IHB2, obdobně IHA2/IB2 a UHA2, je nejspíš rozdíl. Tento rozdíl je věcně významný (velký efekt na základě Cohena koeficientu).

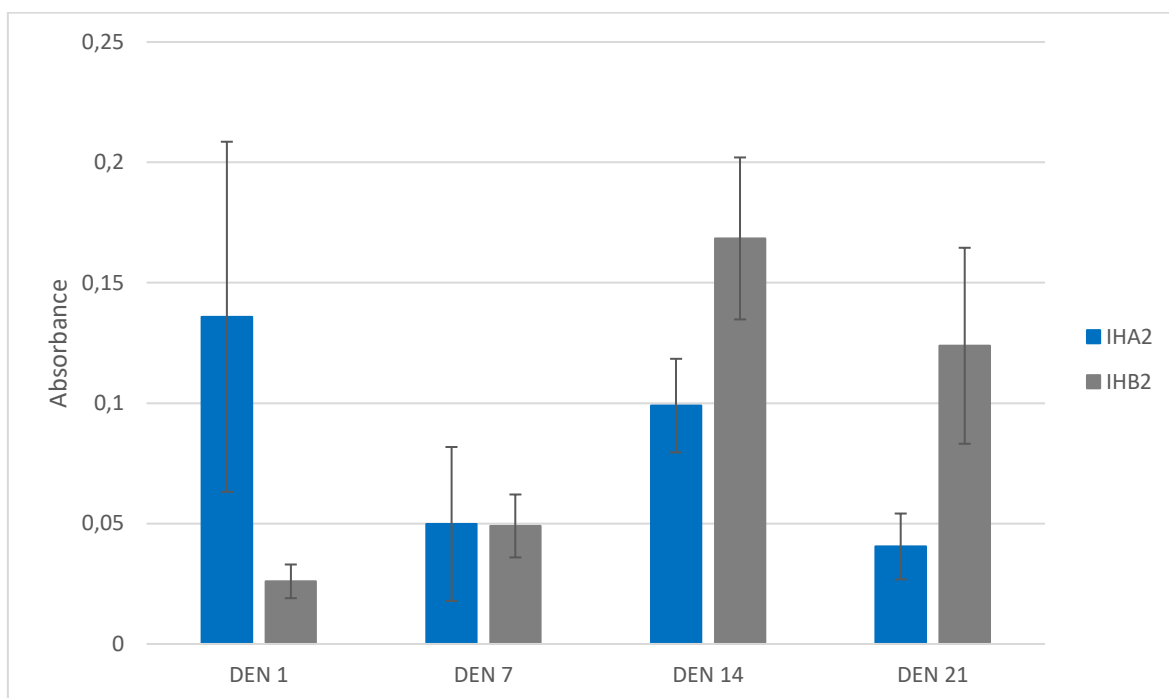
Ve stupni zbotnění byly mezi jednotlivými hydrogely zjištěny významné rozdíly. Vzorky, které obsahovaly větší podíl organické matrix vůči anorganické složce (vzorky IHA2 a UHA2), vykazovaly vyšší absorpenci vody a to díky vyššímu podílu hydrofilních složek. Způsob přípravy stupeň zbotnění neovlivnil. Bioaktivita byla hodnocena na základě změny hmotnosti vzorků ponořených do roztoku SBF. Biologická rozložitelnost se u jednotlivých vzorků významně nelišila s výjimkou vzorků, kde byl objemový poměr PVA/HA 3:1 (vzorky IHA2 a UHA2). Z výsledků hemolýzy vyplynulo, že všechny vzorky lze považovat za hemokompatibilní s výjimkou skafoldu s poměrem PVA/HA 3:1 s HAp připraveným *in situ* (vzorek IHA2). Je třeba však zdůraznit, že tento test je pouze předběžný a bylo by potřeba provést podrobnější a širší testování hemokompatibility.

Klíčovým faktorem pro integraci skafoldu do biologického prostředí je vyhodnocení viability buněk. Je známo, že různé způsoby inkorporace HAp do organické matrix ovlivňují vlastnosti skafoldů. Použitý polymer může nabízet ionizovatelné postranní skupiny pro krystalizaci HAp a tím napodobit proces mechanismus vzniku biologických kompozitů [Kato et al., 1997]. Příprava HAp *in situ* probíhala při pH okolo 9, což je o něco nižší hodnota, než je optimální pH pro syntézu samotného HAp před přidáním do skafoldu (pH 11). Při vyšším pH se sice na postranních -OH skupinách tvoří náboje snadněji, ale přesto dochází k pomalejší absorpci Ca^{2+} iontů, které po navázání tvoří centra pro tvorbu krystalů HAp. Lokální zvýšení koncentrace iontů Ca^{2+} uvolněním méně stabilní struktury může způsobovat apoptózu buněk [Chang et al., 2003]. V souladu s tímto tvrzením se ukázalo, že vzorky s *in situ* připraveným HAp (vzorky IHA2 a IHB2) vykazovaly mnohem lepší viabilitu buněk MG-63 oproti skafoldům s předem připraveným HAp (vzorky UHA2 a UHB2).

3.4 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 4

Ověření adheze a proliferace BM–hMSC na hydrogelu s výhodnějším způsobem přípravy HAp

Na základě předešlých výsledků se ukázala jako výhodnější příprava HA *in situ*, přímo v organické matrix. Na hydrogelech obsahujících jednotlivé složky PVA/HA/HAp v objemovém poměru 3:1:2 (vzorek IHA2) a 1:1:2 (vzorek IHB2) byla měřena adheze (den 1, 24 hodin po nasazení buněk) a proliferace (den 7, 14 a 21) buněk BM–hMSC pomocí CCK-8. Výsledky ukazuje obrázek 19.



Obrázek 19 - Stanovení adheze a proliferace BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp pomocí CCK-8

Primární adheze stanovená 24 hodin po nasazení buněk se ukázala signifikantně lepší u hydrogelu IHA2 ($p < 0,0368$). Avšak proliferace buněk byla výrazně lepší po delší době kultivace na hydrogelu IHB2, den 14 ($p < 0,0165$), resp. den 21 ($p < 0,0055$).

Diskuze

V aplikacích BTE je stále častěji používána HA, která podporuje migraci i proliferaci buněk, i když je její použití *in vivo* omezeno endogenní degradací hyaluronidázou, reaktivním kyslíkem a aktivním dusíkem [Li et al., 2019]. V souladu s tímto zjištěním se ukázalo, že bylo dosaženo vyšší proliferace buněk BM-hMSC na hydrogelu s vyšším množstvím HA vzhledem k PVA po 14, respektive 21 dnech kultivace (vzorek IHB2). Na druhou stranu, tak jak popisuje Kaur et al., vyšší množství HAp snižovalo primární adhezi buněk (vzorek IHB2) v důsledku zvyšující se krystalinity a kontaktního úhlu [Kaur et al., 2015].

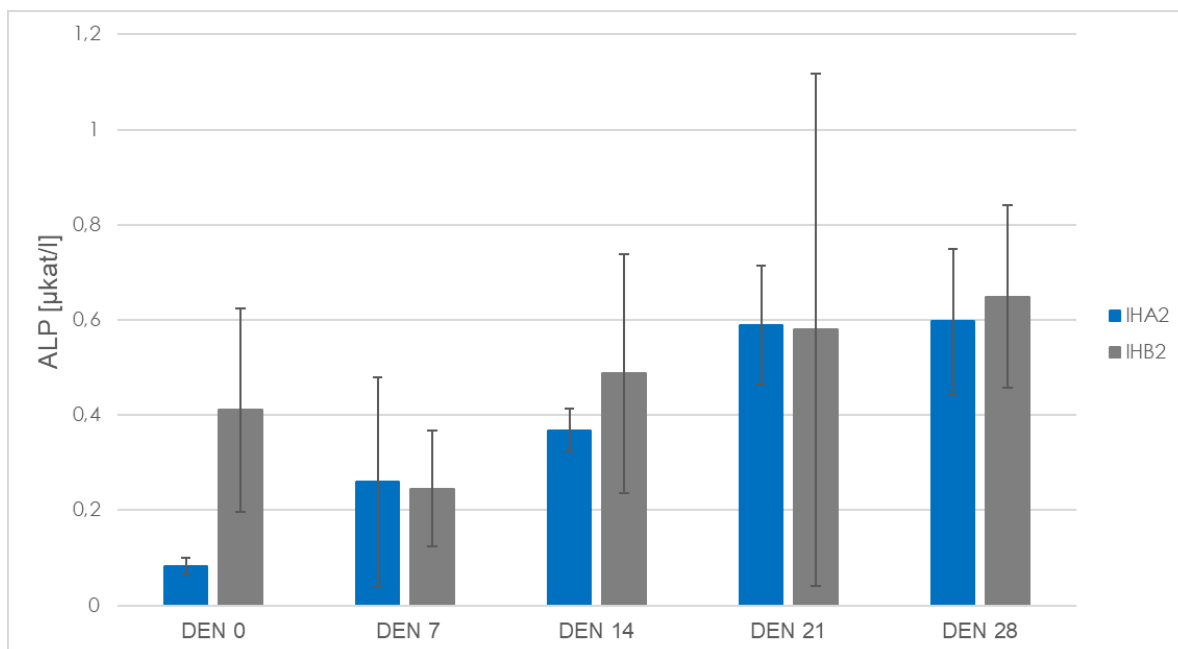
3.5 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 5

Ověření osteogenní diferenciaci BM-hMSC na hydrogelu s výhodnějším způsobem přípravy HAp

Pro ověření osteodiferenciaci byly použity hydrogely s *in situ* připraveným HAp, kde byly jednotlivé složky PVA/HA/HAp v objemovém poměru 3:1:2 (vzorek IHA2) a 1:1:2 (vzorek IHB2).

Stanovení aktivity ALP metodou konstantního času

Hodnoty aktivity ALP u obou typů hydrogelů se v průběhu diferenciaci buněk zvyšovaly až do 14. dne procesu (obrázek 20). Srovnáním s diferenciací v den 0, resp. 7, se hodnoty signifikantně zvyšovaly ($p < 0,001$, respektive $p < 0,01$), ale od 14. dne diferenciaci se aktivita ALP buněk na hydrogelových skafoldech výrazně nelišila.

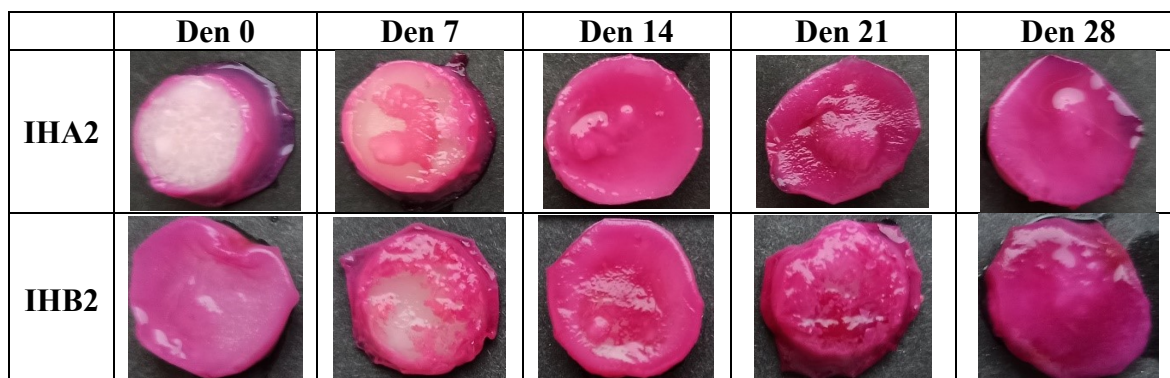


Obrázek 20 - Stanovení aktivity ALP metodou konstantního času při osteodiferenciaci BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp

Barvení pomocí alizarinu

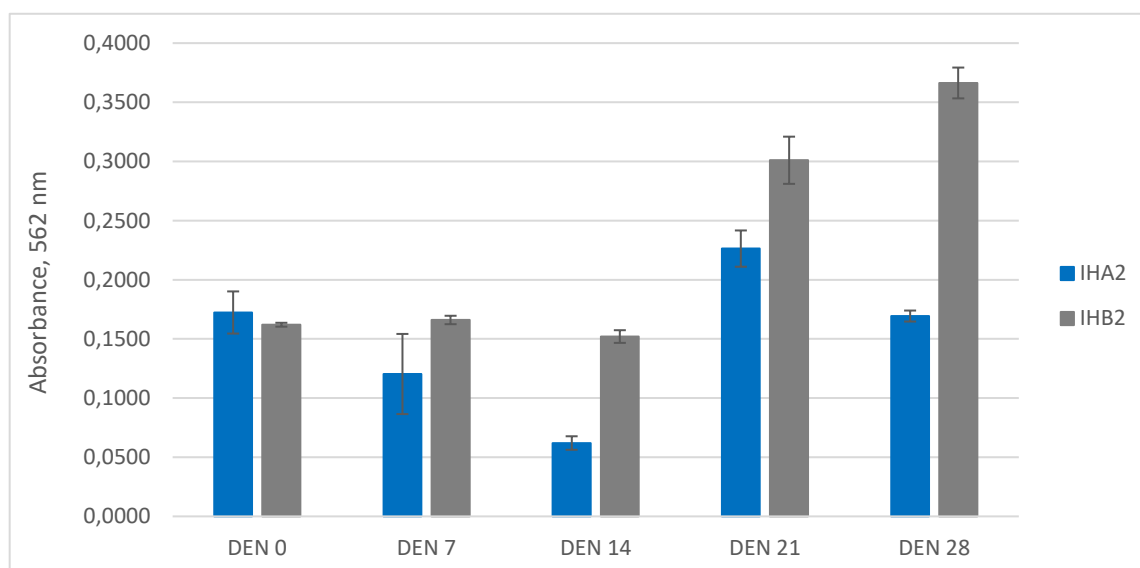
Z makroskopické vizualizace (tabulka 20) je vidět, že během 28 dnů diferenciacce docházelo ke zvyšování intenzity zbarvení na obou typech hydrogelů.

Tabulka 20 – Výsledky barvení pomocí alizarinu v průběhu osteodiferenciacce BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp



Kvantifikace vápníku pomocí alizarinu

Vzorky obarvené alizarinem, byly použity pro kvantifikaci vápníku. Množství vápníku v jednotlivých hydrogelech bylo stanoveno fotometricky na základě absorbance vyextrahovaného barviva v den 0, 7, 14, 21 a 28 osteogenní diferenciacce (obrázek 21).






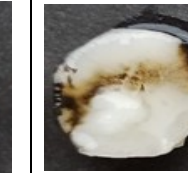
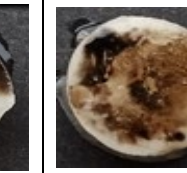


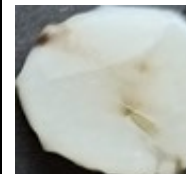
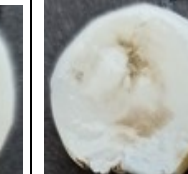
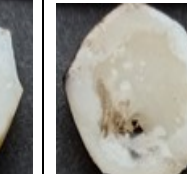
Obrázek 21 - Kvantifikace vápníku v osteogenní kultuře na základě absorbance vyextrahovaného alizarinu z hydrogelů s *in situ* připraveným HAp

Porovnáním naměřených hodnot se ukázalo, že množství vápníku v buňkách na hydrogelu IHB2 se začalo oproti hydrogelu IHA2 signifikantně zvyšovat až od 14. dne procesu, den 14 a den 21 ($p < 0,0162$), den 14 a den 28 ($p < 0,0012$).

Barvení von Kossa

Vizuální hodnocení mineralizace buněk během osteodiferenciace na hydrogelech pomocí dvoukrokového barvení ukázala mírně se zvyšující množství vápenatých látek, u vzorku IHA2 od začátku procesu, u vzorku IHB2 až od 14. dne procesu diferenciace (tabulka 21).

Tabulka 21 – Výsledky barvení von Kossa v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp

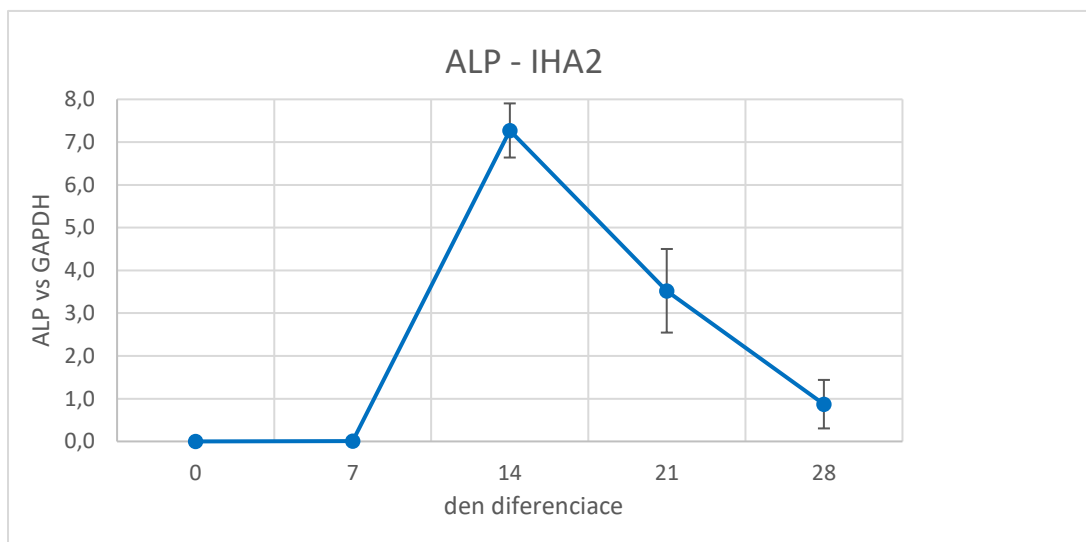
	Den 0	Den 7	Den 14	Den 21	Den 28
IHA2					
IHB2					

Stanovení osteogenní diferenciace pomocí RT-PCR

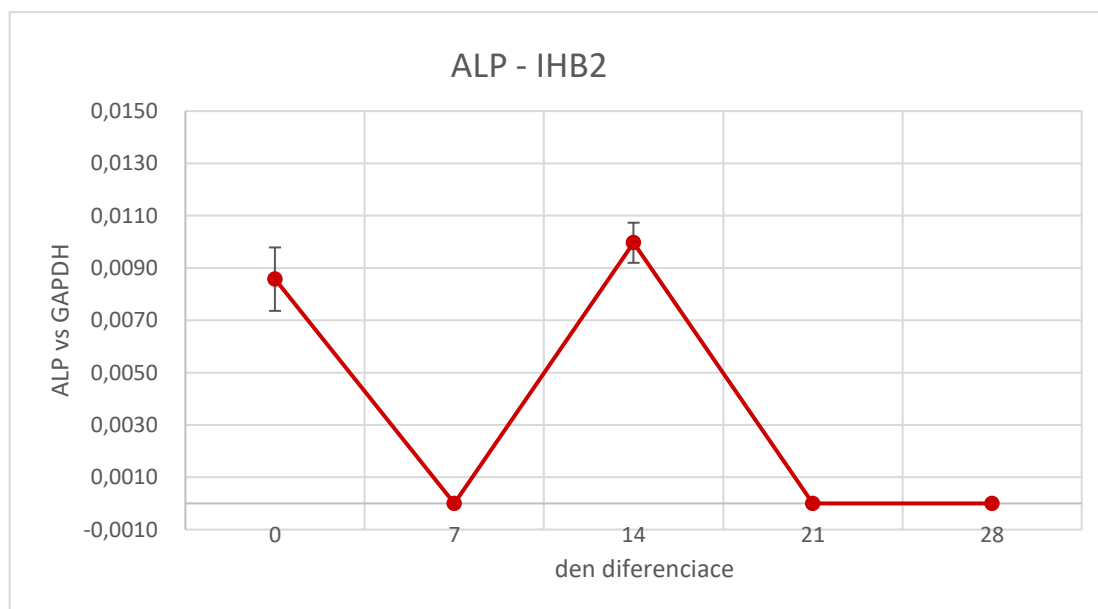
Osteodiferenciace BM-hMSC byla provedena na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp (vzorky IHA2 a IHB2) a monitorována po dobu 28 dnů. Kvantitativní stanovení pěti vybraných genů exprimovaných v průběhu diferenciace bylo provedeno pomocí RT-PCR a normalizováno na úroveň exprese kontrolního housekeepingového genu GAPDH. Tento gen je nejčastěji používán při porovnávání genové exprese [Barber et al., 2005]. Diferenciace byla hodnocena na základě exprese genů ALP, Runx2, BMP-2, OCN a OPN.

Stanovení exprese genu ALP

Výsledky osteogenní diferenciacce BM-hMSC na hydrogelech potvrdily nejvyšší expresi ALP v den 14 od začátku diferenciacce u obou typů a po zbytek procesu exprese tohoto genu klesala (obrázek 22 a, b). U buněk na hydrogelu s menším podílem HAp vzhledem k organické matrix (vzorek IHA2) lze říci, že hodnota maxima exprese tohoto genu byla signifikantně vyšší ($p < 0,001$) než u buněk na vzorku obsahujícího vyšší podíl HAp vůči organické matrix (vzorek IHB2).



(a)



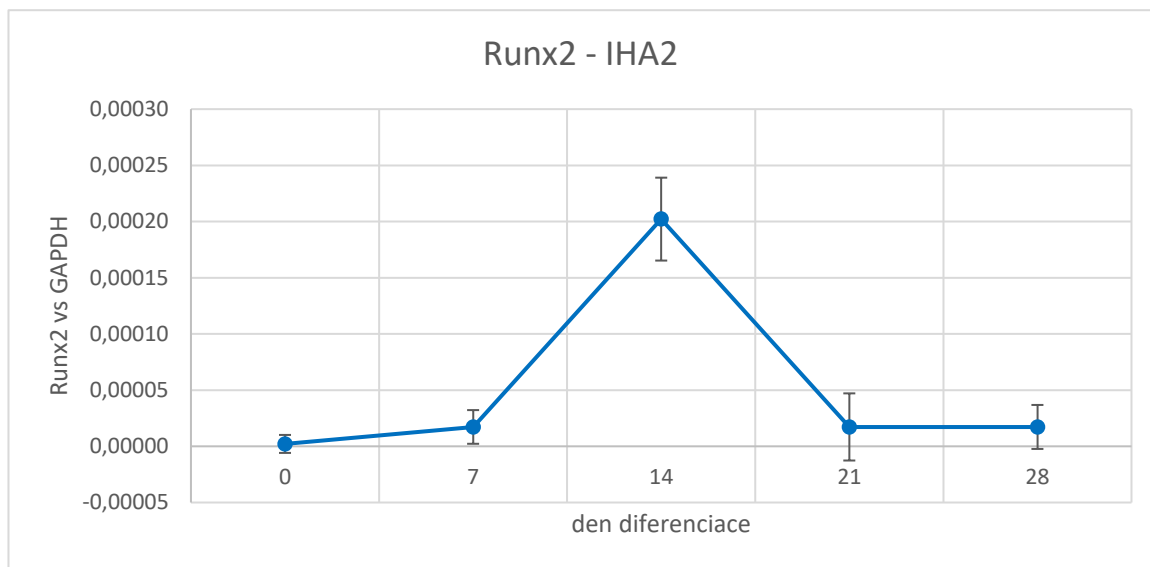
(b)

Obrázek 22 - Stanovení exprese genu ALP pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciacce BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp

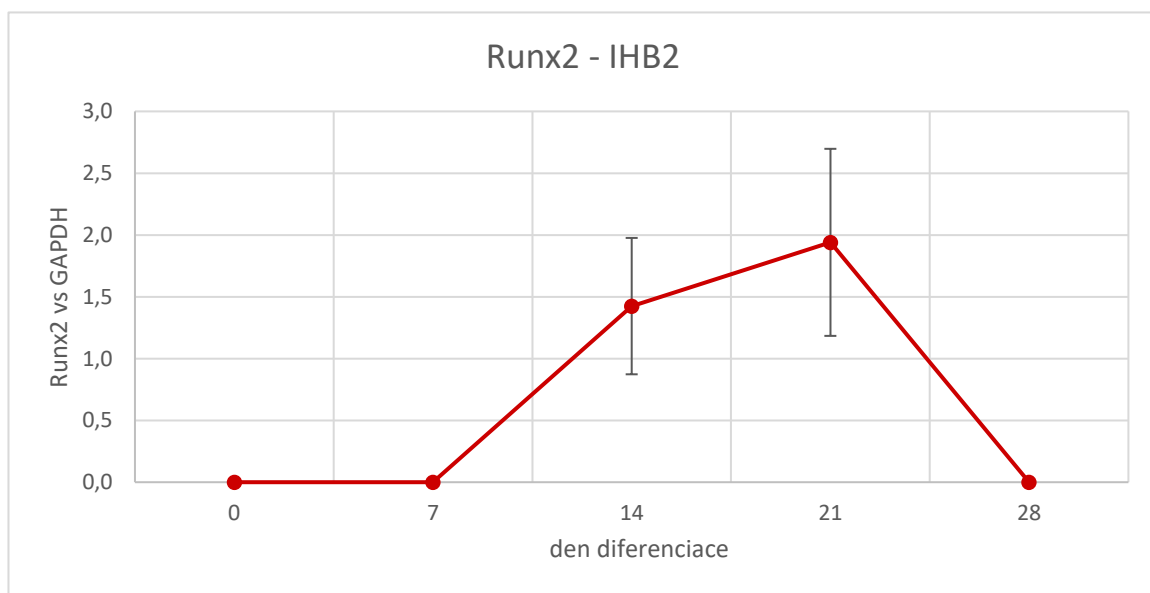
Legenda: (a) modrá barva - vzorek IHA2, (b) červená barva - vzorek IHB2.

Stanovení exprese genu Runx2

Výsledky stanovení exprese genu Runx2 ukázaly maximální hodnotu u buněk na hydrogelu IHA2 v den 14 osteogenní diferenciace a pak exprese tohoto genu klesala (obrázek 23 a). U buněk na hydrogelu IHB2 se 14. den diferenciace hodnota exprese zvýšila a maxima bylo dosaženo až 21. den procesu (obrázek 23 b). Porovnáním maxim exprese genu Runx2 se hodnota u buněk na hydrogelu IHB2 ukázala signifikantně vyšší než u buněk na hydrogelu IHA2 ($p < 0,001$).



(a)



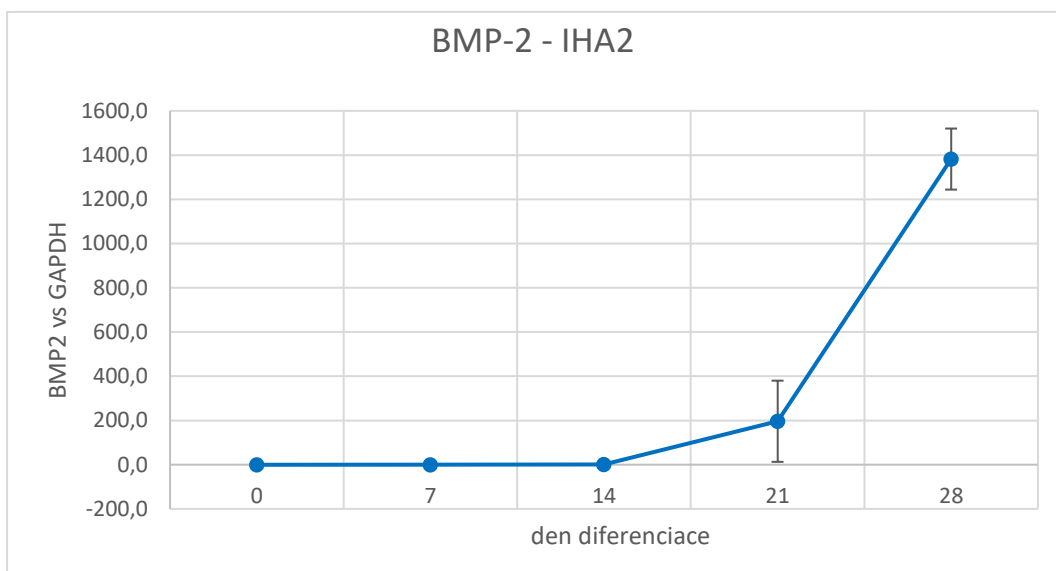
(b)

Obrázek 23 - Stanovení exprese genu Runx2 pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp

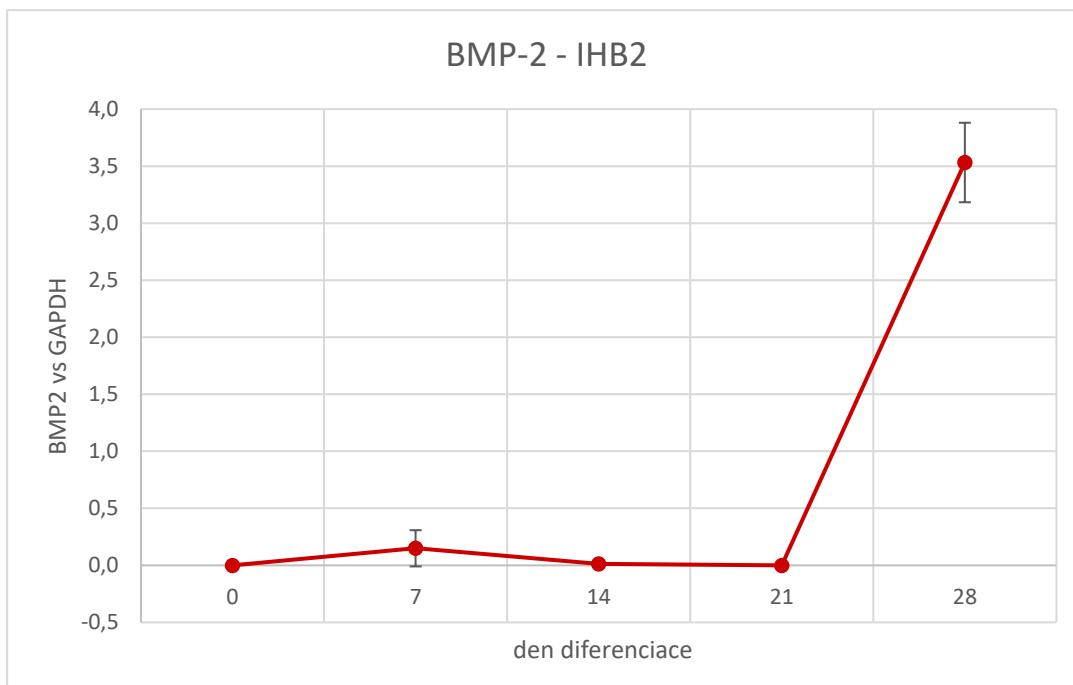
Legenda: (a) modrá barva - vzorek IHA2, (b) červená barva - vzorek IHB2.

Stanovení exprese genu *BMP-2*

U buněk na hydrogelu IHA2 bylo zaznamenáno zvyšování exprese genu *BMP-2* od 21. dne, zatímco u buněk na hydrogelu označeném IHB2 až od 28. dne osteogenní diferenciace (obrázek 24 a, b). U posledně jmenovaného skafoldu byla 28. den hodnota exprese genu u buněk signifikantně nižší než u buněk na hydrogelu IHA2 ($p < 0,001$).



(a)



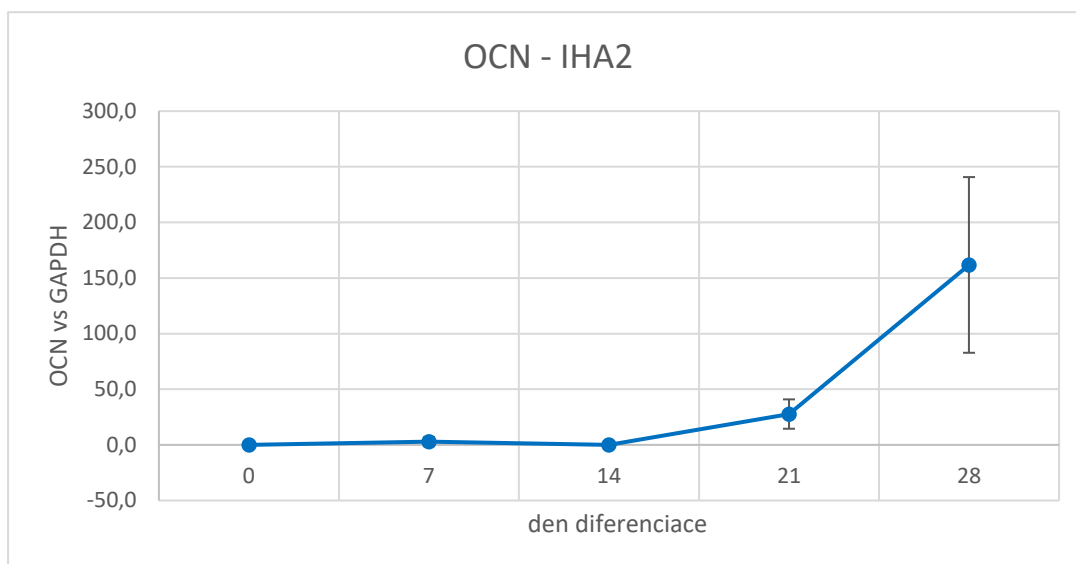
(b)

Obrázek 24 - Stanovení exprese genu *BMP-2* pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp

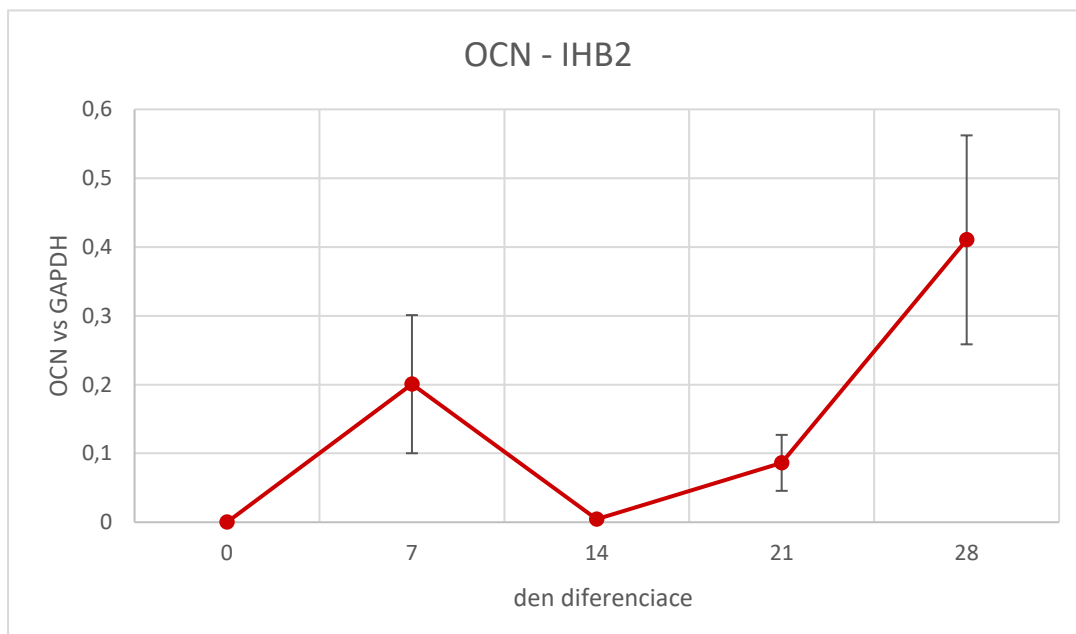
Legenda: (a) modrá barva - vzorek IHA2, (b) červená barva - vzorek IHB2.

Stanovení exprese genu OCN

U buněk na obou typech hydrogelů se exprese genu OCN začala zvyšovat po 14. dnu osteodiferenciace a v den 28 bylo dosaženo maximální hodnoty (obrázek 25 a, b). U buněk na hydrogelu IHA2 byla hodnota maxima exprese tohoto genu signifikantně vyšší oproti hodnotě u buněk na hydrogelu IHB2 ($p < 0,001$).



(a)



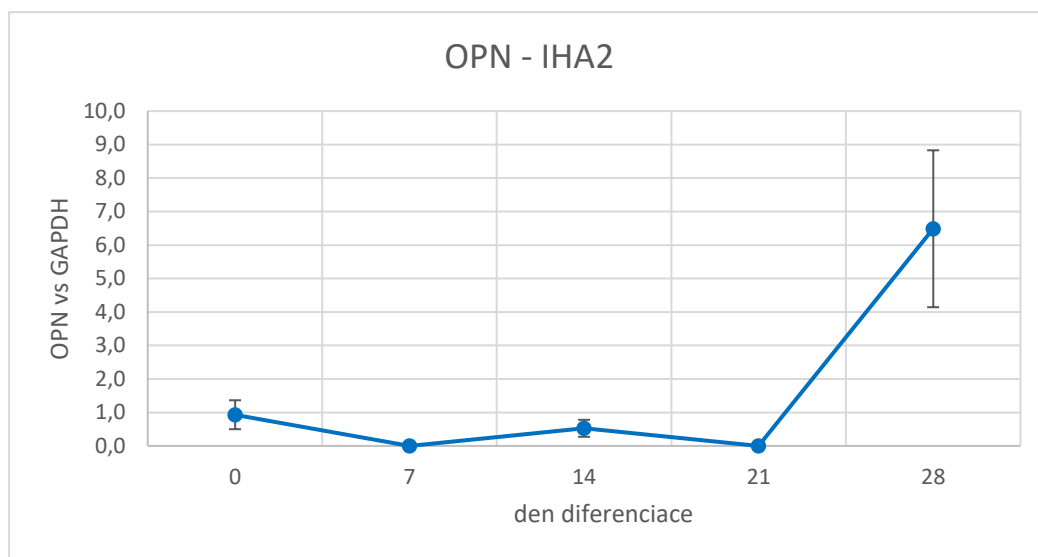
(b)

Obrázek 25 - Stanovení exprese genu OCN pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp

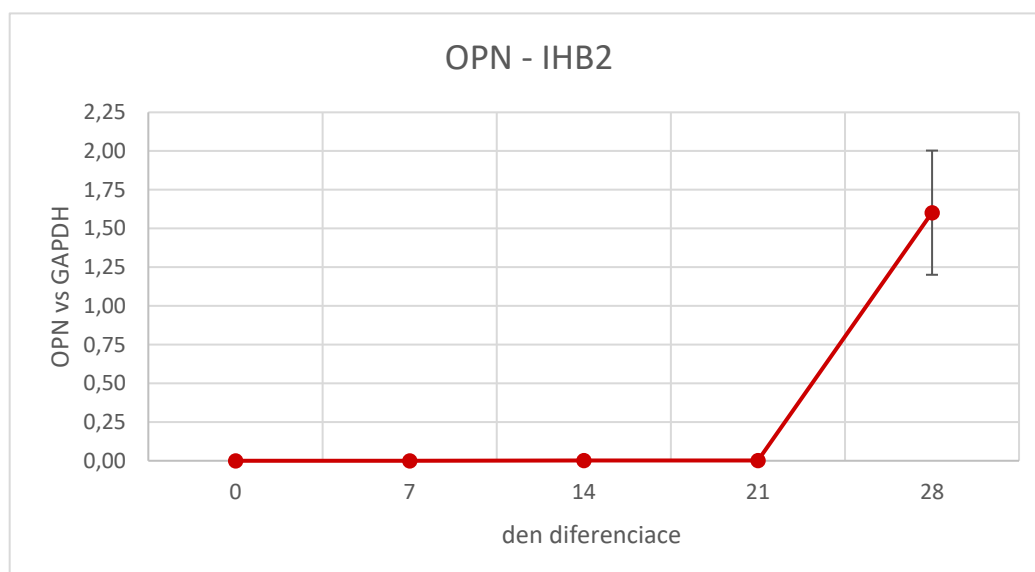
Legenda: (a) modrá barva - vzorek IHA2, (b) červená barva - vzorek IHB2.

Stanovení exprese genu *OPN*

U buněk na obou typech hydrogelů shodně došlo ke zvýšení exprese genu *OPN* až v den 28 diferenciačního procesu (obrázek 26 a, b), ale u buněk na vzorku IHA2 bylo dosaženo signifikantně vyšší hodnoty než u buněk na vzorku IHB2 ($p < 0,001$).



(a)



(b)

Obrázek 26 - Stanovení exprese genu *OPN* pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciacie BM-hMSC na hydrogelech s *in situ* připraveným HAp

Legenda: (a) modrá barva - vzorek IHA2, (b) červená barva - vzorek IHB2.

Diskuze

Osteogenní diferenciaci buněk probíhala v diferenciacním médiu, které oproti běžně používanému kultivačnímu médiu bylo suplementováno některými dalšími faktory a vitaminy (dexametazon, askorbát-2-fosfát, β -glycerolfosfát, vitamin K3 a vitamin D3) na základě poznatků z literatury [Umrath et al., 2022; Gabbay et al., 2010; Chaves Neto et al., 2011; Brauer et al., 2016].

Dexametazon se běžně používá ke stimulaci osteogenní diferenciaci MSC *in vitro*. Je však paradoxní, že glukokortikoidy, jako je právě dexametazon, vedou u pacientů podstupujících léčbu glukokortikoidy k úbytku kostní hmoty a ke zvýšenému riziku zlomenin, což může vést ke glukokortikoidy indukované osteoporóze. Bylo prokázáno, že osteogenní diferenciaci progenitorových buněk izolovaných z periostální tkáně čelisti není závislá na dexametazonu, pokud je médium doplněno lidským destičkovým lyzátem namísto FBS. To umožňuje, aby se podmínky *in vitro* mnohem více přiblížily přirozené situaci *in vivo*. Dále byla provedena studie ukazující, že nepřítomnost dexametazonu při diferenciaci buněk periostu čelisti nesnížila schopnost mineralizace, ale naopak mírně zlepšila osteogenní diferenciaci buněk. Na druhou stranu se ukázalo, že suplementace dexametazonem silně mění genovou expresi, ECM a buněčnou komunikaci buněk čelistního periostu. Ke zkoumání změn v parakrinní sekreci způsobených dexametazonem byl použit sekretom periostálních buněk, které byly dříve ošetřeny osteogenním médiem s dexametazonem a bez něj. V přítomnosti dexametazonu došlo ke změně sekrece několika cytokinů buňkami a byla silně indukována diferenciaci osteoklastů mononukleárních buněk periferní krve [Umrath et al., 2022].

Asorbát-2-fosfát hraje několik rolí ve vývoji kostí. Jako faktor se účastní několika transkripčních a enzymatických reakcí, které regulují časnou diferenciaci osteoblastů, stejně jako navazující biosyntézu matrixových molekul, zejména kolagenu. V provedené studii se dále ukázala další důležitá role askorbátu a to při potlačování aktivity osteoklastů [Gabbay et al., 2010].

Přítomnost β -glycerolfosfátu podporuje mineralizaci kostní tkáně tím, že zvyšuje dostupnost fosfátových iontů. Vlivem β -glycerolfosfátu dochází ke stimulaci prokolagenhydroxylace, zpracování a sestavování fibril, po nichž následuje dramatická indukce specifických genů spojených s osteoblastofenotypem, včetně ALP, OPN a OCN [Chaves Neto et al., 2011].

Pro zvýšení exprese OCN je vhodné diferenciacní médium rozšířit o vitamin D3 a vitamin K3. Tyto vitamíny se však nepodílejí na ukládání fosforečnanu vápenatého ani na regulaci aktivity ALP [Brauer et al., 2016].

Vizuální porovnání vzorků obarvených alizarinem stejně jako kvantifikace vyextrahovaného barviva potvrdila lepší diferenciaci BM-hMSC na hydrogelu s vyšším obsahem HA vzhledem k PVA (vzorek IHB2). Toto zjištění bylo v souladu s výsledky, které publikovali Cui et al. [Cui et al., 2021].

Vizuální hodnocení vzorků barvených metodou von Kossa ukázalo lepší osteodiferenciaci BM-hMSC na hydrogelu s nižším obsahem HAP vzhledem k organické matrix (vzorek IHA2), oproti výsledkům, které uvádí Jahan et al. [Jahan et al., 2020]. Je třeba ovšem vzít

v potaz špatnou specifičností této metody, neboť pozitivní zbarvení může představovat např. i dystrofickou mineralizaci neznámého původu [Schneider, 2021].

Časný marker osteodiferenciace ALP obecně dosahuje svého maxima okolo 14. dne diferenciace a dále u zralých osteoblastů klesá [Shao et al., 2017]. To bylo potvrzeno pomocí PCR a i stanovením aktivity tohoto enzymu při diferenciaci buněk na obou typech hydrogelů. Z výsledků, které uvádí Hu et al., je zřejmé, že přítomnost HAp i HA současně zvyšují diferenciaci osteoblastů, což ukazuje pozitivní vliv na tvorbu nové kosti [Hu et al., 2017].

Expresí genu Runx2 se během procesu diferenciace v osteoblasty mění, ale obecně se jedná o marker raného stádia diferenciace, který svého maxima dosahuje okolo 14. dne procesu [Shao et al., 2017]. To se potvrdilo u buněk na hydrogelu IHA2, zatímco u buněk na hydrogelu IHB2 došlo pravděpodobně ke zpoždění diferenciace a maxima exprese bylo dosaženo až 21. den procesu. Maximální hodnota exprese Runx2 byla vyšší u buněk na hydrogelu s vyšším obsahem HA (vzorek IHB2), stejně jak uvedli ve své studii diferenciace Cui et al. [Cui et al., 2021].

BMP-2, člen skupiny TGF- β , je jedním z důležitých růstových faktorů nejen osteogenní, ale také chondrogenní diferenciaci. Tento marker indukuje osteogenesi prostřednictvím exprese Runx2 a Sox9 [Zhou et al., 2016]. BMP-2 je také spojován s osteoporózou, osteoartrózou a patologickými kalcifikacemi cév a srdečních chlopní [Rogers et al., 2015]. Gen pro tento faktor vykazuje rostoucí úroveň exprese v průběhu procesu diferenciace [Edgar et al., 2007]. U buněk na hydrogelu označeném IHA2 došlo k nárůstu exprese BMP-2 dříve oproti buňkám na hydrogelu označeném IHB2 a maximální dosažená hodnota byla signifikantně vyšší. Ovšem je možné, že z důvodu zpoždění diferenciace buněk na hydrogelu IHB2 nebylo ani po 28 dnech ještě dosaženo maximální hodnoty. Neboť, jak ve svých výsledcích uvedli Bernardo et al., vyšší obsah HAp zvýšil u buněk expresi BMP-2 [Bernardo et al., 2022].

Jeden z markerů pozdní fáze diferenciace, OCN, hraje roli v syntéze a mineralizaci extracelulární matrix. Během procesu by se hodnota exprese OCN měla zvyšovat a maxima by měla dosáhnout mezi 14. a 28. dnem osteodiferenciace [Schmitz et al., 2020]. Tento výsledek se potvrdil u buněk na obou typech hydrogelů. Hodnota exprese genu OCN se začala zvyšovat 21. den osteodiferenciace a maxima bylo dosaženo 28. den procesu. U buněk na hydrogelu s vyšším obsahem organické matrix (vzorek IHA2) bylo v tento den dosaženo signifikantně vyšší hodnoty exprese.

Protein OPN, stejně jako OCN, je markrem pokročilého stádia diferenciace. Ke zvýšení jeho exprese dochází taktéž mezi 14. a 28. dnem osteodiferenciace [Schmitz et al., 2020]. U buněk na obou typech hydrogelů došlo shodně ke zvýšení exprese genu OPN mezi 21. a 28. dnem diferenciace. Stejně jako u exprese genu OCN, i zde bylo u buněk na hydrogelu s vyšším množstvím organické matrix (vzorek IHA2) dosaženo signifikantně vyšší hodnoty exprese 28. den procesu.

V kostní medicíně jsou HAp nebo jiné fosforečnany vápníku široce používány, neboť jsou známé tím, že podporují biomineralizaci a zvýšenou tvorbu kosti. Při implantaci podporují nárůst apatitové vrstvy, což vede k vazbě na kost a tím je zajištěna lepší fixace skafoldu k hostitelské tkáni [Nooeaid et al., 2012].

4 Závěry

4.1 Závěry vztahující se k cíli 1

Stanovení optimálních podmínek přípravy hydrogelu na bázi PVA/HA obohaceného HA_p

Porosita, pórovitost a vzájemná propojenost pórů hrají významnou roli při viabilitě, proliferaci a migraci buněk. Vzájemné propojení pórů je důležité pro existenci buněk ve skafoldu, protože umožňuje buňkám jejich vzájemný kontakt, prorůstání a difuzi živin. Na druhou stranu s rostoucí pórovitostí klesá tuhost skafoldu, která je důležitá pro adhezi buněk. Jak pórovitost, tak mechanické vlastnosti jsou ovlivněny stupněm zesíťování. Řízením stupně zesíťování je možné vyladit vlastnosti materiálu a vhodně je optimalizovat. U připravených hydrogelů bylo provedeno fyzikální zesíťování bez použití chemických síťovacích činidel. Vzorky byly podrobeny opakovaně zmrazování a rozmrazování, čímž došlo ke krystalizaci řetězce PVA. Na základě stanovení hustoty a pórovitosti byly porovnány hydrogely s koncentrací roztoku PVA 5, 10 a 15 %, které podstoupily 3, 5, respektive 10 cyklů zmrazování a rozmrazování. Největší hodnoty pórovitosti bylo dosaženo u hydrogelu s 5 % koncentrací roztoku PVA. V porovnání počtu cyklů síťování u všech tří koncentrací nedocházelo mezi cykly 5 a 10 k významné změně hustoty, proto bylo pro přípravu hydrogelů stanoveno použití 7 cyklů síťování.

4.2 Závěry vztahující se k cíli 2

Stanovení nejvhodnějšího složení hydrogelu na bázi PVA/HA obohaceného HAp

Vzorky obsahující vyšší podíl HA a stejné množství HAp vykazovaly vyšší stupeň zbotnání. Na druhou stranu, čím vyšší byla koncentrace HAp ve vzorku, tím nižší byl stupeň zbotnání v důsledku snížení hydrofility. Přítomnost HA v důsledku zvýšení hydrofility měla přímou souvislost s nárůstem hmotnosti hydrogelů po 25 dnech v roztoku SBF a lze konstatovat, že hydrofilnější povrch je bioaktivnější. Ovlivnění bioaktivity vlivem množství HAp ve skafoldech nebylo pozorováno. Předběžný a orientační test hemolýzy vykazoval vysokou hemokompatibilitu u všech typů hydrogelů, neboť i jejich jednotlivé složky jsou vysoce biokompatibilní. Vzorky připravené pouze z PVA vykazovaly nedostatečnou primární adhezi buněk a i jejich samotnou proliferaci. U hydrogelů s vyšším množstvím HA byla pozorována vyšší primární adheze a proliferace buněk, zejména po delší době kultivace. Tento výsledek ukazuje, že HA umožňovala buňkám silnější přilnutí, pravděpodobně díky svým přirozeným biologickým funkcím. Přítomnost HAp ukázala vliv na proliferaci buněk a jejich hustotu na povrchu hydrogelu ve srovnání se vzorky, které žádný HAp neobsahovaly. Zvyšující se koncentrace HAp snižovala primární adhezi buněk jako důsledek zvyšující se krystalinity a kontaktního úhlu. S rostoucím množstvím HAp se sice proliferace zvyšovala, ale jen do určité míry. Tyto výsledky ukazují, že je zapotřebí zvolit optimální množství anorganické složky. Ze tří testovaných poměrů HA a HAp se jako optimální ukázalo použití objemového poměru 1:2.

4.3 Závěry vztahující se k cíli 3

Vliv rozdílných způsobů přípravy HAp na vlastnosti hydrogelu s nevhodnějším složením

Na základě porovnání stupně botnání se u hydrogelů neukázal vliv způsobu přípravy HAp, ale pouze vliv vyššího množství hydrofilní složky, která stupeň zbotnání zvýšila. Biodegradabilita se mezi jednotlivými typy skafoldů významně nelišila. Pouze hydrogely s předem připraveným HAp a jeho vyšším množstvím vykazovaly výraznější úbytek hmotnosti. Všechny typy skafoldů bez rozdílu poměru složek a způsobu přípravy vykazovaly dobrou hemokompatibilitu.

Příprava hydrogelů pouhým přimícháním předem připraveného HAp do organické matrix znemožnila nejen kontrolu morfologie skafoldů, ale i chemické interakce HAp a organické fáze. Ukázalo se, že je výhodné syntetizovat HAp přímo v organické matrix, protože dochází nejen k lepší distribuci částic HAp, ale i ke zlepšení mechanických vlastností a biokompatibility hydrogelů s *in situ* připraveným HAp. U *in situ* připraveného HAp byla zjištěna snížená hodnota Ca/P (1,85) oproti poměru těchto prvků odpovídající stechiometrii. Statistická analýza poměru Ca/P v připravených apatitech ukázala, že předem připravený HAp se blíží hodnotě pro stechiometrický HAp (2,15), zatímco HAp připravený *in situ* odpovídá kalcium – deficitní formě (1,85).

Vzorky s *in situ* připraveným HAp vykazovaly mnohem lepší podmínky pro viabilitu buněk. Významně vyšší se ukázala, jak počáteční adheze, tak i proliferace v následujících dnech. Příprava HAp *in situ* probíhala při pH okolo 9, což je o něco nižší hodnota, než je pH optimální pro syntézu samotného HAp před přidáním do skafoldu. Při vyšším pH se sice na postranních -OH skupinách tvoří náboje radikálně, ale přesto dochází k pomalejší absorpci Ca^{2+} iontů, které po navázání tvoří centra pro tvorbu krystalů HAp. Lokální zvýšení koncentrace iontů Ca^{2+} uvolněných v důsledku rozpuštění méně stabilní struktury může způsobovat apoptózu buněk.

4.4 Závěry vztahující se k cíli 4

Ověření adheze a proliferace BM–hMSC na hydrogelu s výhodnějším způsobem přípravy HAp

Klíčovým faktorem pro integraci skafoldu do biologického systému je vyhodnocení počáteční adheze a proliferace buněk. Výrazně vyšší počáteční adheze BM-hMSC (den 1 po nasazení buněk) bylo dosaženo u vzorku obsahujícího vyšší podíl organické matrix vzhledem k obsahu HAp (vzorek IHA2). Výsledky proliferace buněk (den 7, 14 a 21 po nasazení buněk) potvrdily vhodnější podmínky na hydrogelu s vyšším obsahem HAp vůči organické matrix (vzorek IHB2). Vyšší množství HAp vůči PVA umožňuje lepší a silnější přichycení buněk a jejich následnou proliferaci. Na druhou stranu se potvrdilo, že s vyšším obsahem organické matrix viabilita buněk klesá. Kultivační médium DMEM, pravděpodobně, pronikalo do struktury organické matrix a ta se stala viskóznější, což negativně ovlivnilo proliferaci buněk.

4.5 Závěry vztahující se k cíli 5

Ověření osteogenní diferenciaci BM–hMSC na hydrogelu s výhodnějším způsobem přípravy HAp

Diferenciace buněk BM–hMSC na hydrogelových skafoldech na bázi PVA/HA obohacených o HAp připravený *in situ* byla hodnocena na základě barvení, stanovení aktivity ALP a exprese 5 genů (ALP, Runx2, BMP-2, OCN, OPN). S výjimkou exprese genu Runx2 se ukázalo, že během diferenciaci buněk na hydrogelu IHA2 bylo dosaženo signifikantně vyšších hodnot exprese všech ostatních stanovovaných genů. Expese genu Runx2 byla výrazně vyšší u buněk na hydrogelu IHB2, u kterého se na základě stanovení ostatních genů jevil proces diferenciaci opožděný oproti vzorku IHA2. Obecně lze říci, že na jednotlivých skafoldech bylo množství buněk spíše nižší.

4.6 Závěry pro praxi a výhled do budoucna

V současné době hrají významnou roli v tkáňovém inženýrství hydrogely. Je velice žádoucí hydrogely aplikovat injekčně přímo do místa defektu, aby co nejcitlivěji reagovaly na vnější podmínky prostředí. Budoucí výzkum bude zaměřen na přípravu injektovatelného hydrogelu na bázi PVA a HA obohaceného o *in situ* připravený HAp s možností gelovatění při teplotě lidského organismu. Bude se třeba zaměřit, aby síťování probíhalo spontánně během mísení složek.

Při inkorporaci hydrogelu do organismu hraje významnou roli imunitní systém, respektive makrofágy. Ty jsou jednou z mnoha buněk podílejících se na časně fázi zánětlivé reakce organismu, která je dále určující pro regenerační reakci. Celý tento kaskádovitý proces vede k osteogenezi mezenchymálních buněk, které jsou pak základem nové kosti. Kromě toho, makrofágy podle stavu své polarizace uvolňují faktory (např. osteopontin nebo onkostatín M), které řídí regeneraci kosti. Použití biomateriálů mění roli makrofágů, a proto je cílem, aby materiály regulovaly imunitní odpověď tak, aby byla stimulována regenerace kosti. Proto je dalším cílem se zaměřit na vzájemné působení připraveného hydrogelu, monocytů a osteodiferenciace mezenchymálních buněk.

5 Seznam použité literatury

AĞIRDIL, Yücel, (2020). The growth plate: a physiologic overview. *EFORT Open Reviews* [online]. 8., vol. 5, no. 8, pp. 498–507. ISSN 2396-7544, 2058-5241. Retrieved z: doi:10.1302/2058-5241.5.190088

ALBREKTSSON, T. and C. JOHANSSON, (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* [online]. 1.10., vol. 10, no. 0, pp. S96–S101. ISSN 0940-6719, 1432-0932. Retrieved z: doi:10.1007/s005860100282

ALFORD, Andrea I., Kenneth M. KOZLOFF and Kurt D. HANKENSON, (2015). Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 8., vol. 65, pp. 20–31. ISSN 13572725. Retrieved z: doi:10.1016/j.biocel.2015.05.008

AN, Jia, Joanne Ee Mei TEOH, Ratima SUNTORNNOND and Chee Kai CHUA, (2015). Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering* [online]. 6., vol. 1, no. 2, pp. 261–268. ISSN 20958099. Retrieved z: doi:10.15302/J-ENG-2015061

ANNABI, Nasim, Jason W. NICHOL, Xia ZHONG, et al., (2010). Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 8., vol. 16, no. 4, pp. 371–383. ISSN 1937-3368, 1937-3376. Retrieved z: doi:10.1089/ten.teb.2009.0639

ANOVITZ, Lawrence M. and David R. COLE, (2015). Characterization and Analysis of Porosity and Pore Structures. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* [online]. vol. 80, no. 1, pp. 61–164. ISSN 1529-6466. Retrieved z: doi:10.2138/rmg.2015.80.04

ASTI, Annalia and Luciana GIOGLIO, (2014). Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *The International Journal of Artificial Organs* [online]. 3., vol. 37, no. 3, pp. 187–205. ISSN 1724-6040. Retrieved z: doi:10.530/ijao.5000307

BABUSKA, Vaclav, Jana DOBRA, Vlastimil KULDA, et al., (2015). Comparison of Fibroblast and Osteoblast Response to Cultivation on Titanium Implants with Different Grain Sizes. *Journal of Nanomaterials* [online]. vol. 2015, pp. 1–9. ISSN 1687-4110, 1687-4129. Retrieved z: doi:10.1155/2015/920893

BABUSKA, Vaclav, Phanindra Babu KASI, Petra CHOCHOLATA, et al., (2022). Nanomaterials in Bone Regeneration. *Applied Sciences* [online]. 5.7., vol. 12, no. 13, p. 6793. ISSN 2076-3417. Retrieved z: doi:10.3390/app12136793

BABUSKA, Vaclav, Omid MOZTARZADEH, Tereza KUBIKOVA, et al., (2016). Evaluating the osseointegration of nanostructured titanium implants in animal models: Current experimental methods and perspectives (Review). *Biointerphases* [online]. 9., vol. 11, no. 3, p. 030801. ISSN 1934-8630, 1559-4106. Retrieved z: doi:10.1116/1.4958793

BALKO, Jan, Zbynek TONAR and Ivan VARGA, (2017). *memorix histologie*. 2.vydání. Praha: Triton. ISBN 978-80-7553-249-7.

BARBER, Robert D., Dan W. HARMER, Robert A. COLEMAN and Brian J. CLARK, (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics* [online]. 11.5., vol. 21, no. 3, pp. 389–395. ISSN 1094-8341, 1531-2267. Retrieved z: doi:10.1152/physiolgenomics.00025.2005

BERNARDO, Marcela P., Bruna C. R. DA SILVA, Ahmed E. I. HAMOUDA, et al., (2022). PLA/Hydroxyapatite scaffolds exhibit in vitro immunological inertness and promote robust osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells without osteogenic stimuli. *Scientific Reports* [online]. 11.2., vol. 12, no. 1, p. 2333. ISSN 2045-2322. Retrieved z: doi:10.1038/s41598-022-05207-w

BERTHIAUME, François, Timothy J. MAGUIRE and Martin L. YARMUSH, (2011). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* [online]. 15.7., vol. 2, no. 1, pp. 403–430. ISSN 1947-5438, 1947-5446. Retrieved z: doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257

BERTOLDI, Serena, Silvia FARE` and Maria Cristina TANZI, (2011). Assessment of scaffold porosity: the new route of micro-CT. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* [online]. vol. 9, no. 3, pp. 165–175. ISSN 1722-6899. Retrieved z: doi:10.5301/JABB.2011.8863

BLAIR, Harry C., Quitterie C. LARROUTURE, Yanan LI, et al., (2017). Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation *In Vivo* and *In Vitro*. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 6., vol. 23, no. 3, pp. 268–280. ISSN 1937-3368, 1937-3376. Retrieved z: doi:10.1089/ten.teb.2016.0454

BOABAID, F., P.S. CERRI and E. KATCHBURIAN, (2001). Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue and Cell* [online]. 8., vol. 33, no. 4, pp. 318–325. ISSN 00408166. Retrieved z: doi:10.1054/tice.2001.0179

BOSE, Susmita, Sahar VAHABZADEH and Amit BANDYOPADHYAY, (2013). Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today* [online]. 12., vol. 16, no. 12, pp. 496–504. ISSN 13697021. Retrieved z: doi:10.1016/j.mattod.2013.11.017

BOZHOKIN, Mikhail S., Svetlana A. BOZHKOVA, Aleksandr A. RUBEL, et al., (2021). Specificities of Scanning Electron Microscopy and Histological Methods in Assessing Cell-Engineered Construct Effectiveness for the Recovery of Hyaline Cartilage. *Methods and Protocols* [online]. 27.10., vol. 4, no. 4, p. 77. ISSN 2409-9279. Retrieved z: doi:10.3390/mps4040077

BRAUER, A, T POHLEMANN and W METZGER, (2016). Osteogenic differentiation of immature osteoblasts: Interplay of cell culture media and supplements. *Biotechnic & Histochemistry* [online]. 2.4., vol. 91, no. 3, pp. 161–169. ISSN 1052-0295, 1473-7760. Retrieved z: doi:10.3109/10520295.2015.1110254

BUWALDA, Sytze J., Kristel W.M. BOERE, Pieter J. DIJKSTRA, et al., (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of*

Controlled Release [online]. 9., vol. 190, pp. 254–273. ISSN 01683659. Retrieved z: doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.052

BUWALDA, Sytze J., Tina VERMONDEN and Wim E. HENNINK, (2017). Hydrogels for Therapeutic Delivery: Current Developments and Future Directions. *Biomacromolecules* [online]. 13.2., vol. 18, no. 2, pp. 316–330. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Retrieved z: doi:10.1021/acs.biomac.6b01604

CAI, Ling, Xijiang QIN, Zhihui XU, et al., (2019). Comparison of Cytotoxicity Evaluation of Anticancer Drugs between Real-Time Cell Analysis and CCK-8 Method. *ACS Omega* [online]. 31.7., vol. 4, no. 7, pp. 12036–12042. ISSN 2470-1343, 2470-1343. Retrieved z: doi:10.1021/acsomega.9b01142

CALIARI, Steven R and Jason A BURDICK, (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods* [online]. 5., vol. 13, no. 5, pp. 405–414. ISSN 1548-7091, 1548-7105. Retrieved z: doi:10.1038/nmeth.3839

CHANG, Myung Chul, Ching-Chang KO and William H. DOUGLAS, (2003). Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials* [online]. 8., vol. 24, no. 17, pp. 2853–2862. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00115-7

CHAUDHARI, Atul, Komal VIG, Dieudonné BAGANIZI, et al., (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 25.11., vol. 17, no. 12, p. 1974. ISSN 1422-0067. Retrieved z: doi:10.3390/ijms17121974

CHAVES NETO, Antonio Hernandez, Karla Cristiana QUEIROZ, Renato MILANI, et al., (2011). Profiling the changes in signaling pathways in ascorbic acid/ β -glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 1., vol. 112, no. 1, pp. 71–77. ISSN 07302312. Retrieved z: doi:10.1002/jcb.22763

CHEN, Qizhi Z., Ian D. THOMPSON and Aldo R. BOCCACCINI, (2006). 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 4., vol. 27, no. 11, pp. 2414–2425. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.11.025

CHEN, Yu, ed., (2020). *Hydrogels based on natural polymers*. Amsterdam, Netherlands ; Cambridge, MA: Elsevier. ISBN 978-0-12-816421-1.

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA and Vaclav BABUSKA, (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials* [online]. 14.2., vol. 12, no. 4, p. 568. ISSN 1996-1944. Retrieved z: doi:10.3390/ma12040568

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA, Jana DVORAKOVA, et al., (2020). Biological Evaluation of Polyvinyl Alcohol Hydrogels Enriched by Hyaluronic Acid and Hydroxyapatite. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 10.8., vol. 21, no. 16, p. 5719. ISSN 1422-0067. Retrieved z: doi:10.3390/ijms21165719

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA, Jana DVORAKOVA, et al., (2021). In Situ Hydroxyapatite Synthesis Enhances Biocompatibility of PVA/HA Hydrogels.

International Journal of Molecular Sciences [online]. 28.8., vol. 22, no. 17, p. 9335. ISSN 1422-0067. Retrieved z: doi:10.3390/ijms22179335

CUI, Xu, Chengcheng HUANG, Zhizhen CHEN, et al., (2021). Hyaluronic acid facilitates bone repair effects of calcium phosphate cement by accelerating osteogenic expression. *Bioactive Materials* [online]. 11., vol. 6, no. 11, pp. 3801–3811. ISSN 2452199X. Retrieved z: doi:10.1016/j.bioactmat.2021.03.028

CZEKANSKA, Em, Mj STODDART, Rg RICHARDS and Js HAYES, (2012). In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells and Materials* [online]. 9.7., vol. 24, pp. 1–17. Retrieved z: doi:10.22203/eCM.v024a01

DENG, Youming, Jianan REN, Guopu CHEN, et al., (2017). Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration. *Scientific Reports* [online]. 12., vol. 7, no. 1, p. 2699. ISSN 2045-2322. Retrieved z: doi:10.1038/s41598-017-02962-z

DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran, Yasuhiko YOSHIDA, Toru MAEKAWA and D. Sakthi KUMAR, (2011). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* [online]. vol. 2011, pp. 1–19. ISSN 1687-9422, 1687-9430. Retrieved z: doi:10.1155/2011/290602

DÍAZ-RODRÍGUEZ, L., O. GARCÍA-MARTÍNEZ, M. ARROYO-MORALES, et al., (2009). Antigenic Phenotype and Phagocytic Capacity of MG-63 Osteosarcoma Line. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 9., vol. 1173, pp. E46–E54. ISSN 00778923. Retrieved z: doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04950.x

DLASKA, Constantin E., Gunnar ANDERSSON, Mats BRITTBERG, et al., (2015). Clinical Translation in Tissue Engineering—The Surgeon’s View. *Current Molecular Biology Reports* [online]. 6., vol. 1, no. 2, pp. 61–70. ISSN 2198-6428. Retrieved z: doi:10.1007/s40610-015-0013-3

DORATI, Rossella, Antonella DETRIZIO, Tiziana MODENA, et al., (2017). Biodegradable Scaffolds for Bone Regeneration Combined with Drug-Delivery Systems in Osteomyelitis Therapy. *Pharmaceuticals* [online]. 12.12., vol. 10, no. 4, p. 96. ISSN 1424-8247. Retrieved z: doi:10.3390/ph10040096

DYLEVSKÝ, Ivan, (2009). *Funkční anatomie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3240-4.

EDGAR, Cory M., Vinay CHAKRAVARTHY, George BARNES, et al., (2007). Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. *Bone* [online]. 5., vol. 40, no. 5, pp. 1389–1398. ISSN 87563282. Retrieved z: doi:10.1016/j.bone.2007.01.001

EGGER, Dominik, Sarah SPITZ, Monica FISCHER, et al., (2017). Application of a Parallelizable Perfusion Bioreactor for Physiologic 3D Cell Culture. *Cells Tissues Organs* [online]. vol. 203, no. 5, pp. 316–326. ISSN 1422-6405, 1422-6421. Retrieved z: doi:10.1159/000457792

EL-HUSSEINY, Hussein M., Eman A. MADY, Walaa A. EL-DAKROURY, et al., (2022). Smart/stimuli-responsive hydrogels: State-of-the-art platforms for bone tissue engineering.

Applied Materials Today [online]. 12., vol. 29, p. 101560. ISSN 23529407. Retrieved z: doi:10.1016/j.apmt.2022.101560

FENG, Xu, (2009). Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Current Chemical Biology* [online]. 1.5., vol. 3, no. 2, pp. 189–196. ISSN 18723136. Retrieved z: doi:10.2174/187231309788166398

FLORENCIO-SILVA, Rinaldo, Gisela Rodrigues da Silva SASSO, Estela SASSO-CERRI, et al., (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* [online]. vol. 2015, pp. 1–17. ISSN 2314-6133, 2314-6141. Retrieved z: doi:10.1155/2015/421746

FORSPRECHER, J., Z. WANG, V. NELEA and M. T. KAARTINEN, (2009). Enhanced osteoblast adhesion on transglutaminase 2-crosslinked fibronectin. *Amino Acids* [online]. 4., vol. 36, no. 4, pp. 747–753. ISSN 0939-4451, 1438-2199. Retrieved z: doi:10.1007/s00726-008-0125-7

GABBAY, Kenneth H., Kurt M. BOHREN, Roy MORELLO, et al., (2010). Ascorbate Synthesis Pathway. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 6., vol. 285, no. 25, pp. 19510–19520. ISSN 00219258. Retrieved z: doi:10.1074/jbc.M110.110247

GAIDASH, A. A., L. N. SINITSA, O. A. BABENKO and A. A. LUGOVSKOY, (2011). Nanoporous Structure of Bone Matrix at Osteoporosis from Data of Atomic Force Microscopy and IR Spectroscopy. *Journal of Osteoporosis* [online]. vol. 2011, pp. 1–7. ISSN 2042-0064. Retrieved z: doi:10.4061/2011/162041

GE, Zigang, Zhaoxia JIN and Tong CAO, (2008). Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. *Biomedical Materials* [online]. 6., vol. 3, no. 2, p. 022001. ISSN 1748-6041, 1748-605X. Retrieved z: doi:10.1088/1748-6041/3/2/022001

GHASEMIYEH, Parisa and Soliman MOHAMMADI-SAMANI, (2019). Hydrogels as Drug Delivery Systems; Pros and Cons. *Trends in Pharmaceutical Sciences* [online]. 3., vol. 5, no. 1 [accessed. 2. February 2023]. Retrieved z: doi:10.30476/tips.2019.81604.1002

GOTMAN, Irena, (1997). Characteristics of Metals Used in Implants. *Journal of Endourology* [online]. 12., vol. 11, no. 6, pp. 383–389. ISSN 0892-7790, 1557-900X. Retrieved z: doi:10.1089/end.1997.11.383

GRAYSON, Warren L., Sarindr BHUMIRATANA, Christopher CANNIZZARO, et al., (2008). Effects of Initial Seeding Density and Fluid Perfusion Rate on Formation of Tissue-Engineered Bone. *Tissue Engineering Part A* [online]. 11., vol. 14, no. 11, pp. 1809–1820. ISSN 1937-3341, 1937-335X. Retrieved z: doi:10.1089/ten.tea.2007.0255

GREGORY, Carl A, W GRADY GUNN, Alexandra PEISTER and Darwin J PROCKOP, (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* [online]. 6., vol. 329, no. 1, pp. 77–84. ISSN 00032697. Retrieved z: doi:10.1016/j.ab.2004.02.002

GUNGOR-OZKERIM, P. Selcan, Ilyas INCI, Yu Shrike ZHANG, et al., (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science* [online]. vol. 6, no. 5, pp. 915–946. ISSN 2047-4830, 2047-4849. Retrieved z: doi:10.1039/C7BM00765E

- HAROUN, Ahmed A., Amira GAMAL-ELDEEN and David R. K. HARDING, (2009). Preparation, characterization and in vitro biological study of biomimetic three-dimensional gelatin–montmorillonite/cellulose scaffold for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 12., vol. 20, no. 12, pp. 2527–2540. ISSN 0957-4530, 1573-4838. Retrieved z: doi:10.1007/s10856-009-3818-x
- HENCH, L. L., (2002). Third-Generation Biomedical Materials. *Science* [online]. 8.2., vol. 295, no. 5557, pp. 1014–1017. ISSN 00368075, 10959203. Retrieved z: doi:10.1126/science.1067404
- HOFFMAN, Allan S., (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 12., vol. 64, pp. 18–23. ISSN 0169409X. Retrieved z: doi:10.1016/j.addr.2012.09.010
- HOLZWARTH, Jeremy M. and Peter X. MA, (2011). Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 12., vol. 32, no. 36, pp. 9622–9629. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.009
- HONG, Taekuk, Sang-Mi JEONG, Yong Kyu CHOI, et al., (2020). Superhydrophobic, Elastic, and Conducting Polyurethane–Carbon Nanotube–Silane–Aerogel Composite Microfiber. *Polymers* [online]. 7.8., vol. 12, no. 8, p. 1772. ISSN 2073-4360. Retrieved z: doi:10.3390/polym12081772
- HOSPODIUK, Monika, Madhuri DEY, Donna SOSNOSKI and Ibrahim T. OZBOLAT, (2017). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances* [online]. 3., vol. 35, no. 2, pp. 217–239. ISSN 07349750. Retrieved z: doi:10.1016/j.biotechadv.2016.12.006
- HU, Jingxiao, Youjia ZHU, Hua TONG, et al., (2016). A detailed study of homogeneous agarose/hydroxyapatite nanocomposites for load-bearing bone tissue. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1., vol. 82, pp. 134–143. ISSN 01418130. Retrieved z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.09.077
- HU, Weikang, Zijian WANG, Yu XIAO, et al., (2019). Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomaterials Science* [online]. vol. 7, no. 3, pp. 843–855. ISSN 2047-4830, 2047-4849. Retrieved z: doi:10.1039/C8BM01246F
- HU, Yimin, Jingdi CHEN, Tiantang FAN, et al., (2017). Biomimetic mineralized hierarchical hybrid scaffolds based on in situ synthesis of nano-hydroxyapatite/chitosan/chondroitin sulfate/hyaluronic acid for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 9., vol. 157, pp. 93–100. ISSN 09277765. Retrieved z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.059
- HUANG, Lin, JiaKe XU, David J. WOOD and Ming H. ZHENG, (2000). Gene Expression of Osteoprotegerin Ligand, Osteoprotegerin, and Receptor Activator of NF-κB in Giant Cell Tumor of Bone. *The American Journal of Pathology* [online]. 3., vol. 156, no. 3, pp. 761–767. ISSN 00029440. Retrieved z: doi:10.1016/S0002-9440(10)64942-5
- HUYNH, Cong Truc, Minh Khanh NGUYEN and Doo Sung LEE, (2011). Injectable Block Copolymer Hydrogels: Achievements and Future Challenges for Biomedical

Applications. *Macromolecules* [online]. 13.9., vol. 44, no. 17, pp. 6629–6636. ISSN 0024-9297, 1520-5835. Retrieved z: doi:10.1021/ma201261m

ICER, Mehmet Arif and Makbule GEZMEN-KARADAG, (2018). The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical Biochemistry* [online]. 9., vol. 59, pp. 17–24. ISSN 00099120. Retrieved z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003

JAHAN, Kaushar, Garthiga MANICKAM, Maryam TABRIZIAN and Monzur MURSHED, (2020). In vitro and in vivo investigation of osteogenic properties of self-contained phosphate-releasing injectable purine-crosslinked chitosan-hydroxyapatite constructs. *Scientific Reports* [online]. 14.7., vol. 10, no. 1, p. 11603. ISSN 2045-2322. Retrieved z: doi:10.1038/s41598-020-67886-7

JIA, Weitao, P. Selcan GUNGOR-OZKERIM, Yu Shrike ZHANG, et al., (2016). Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials* [online]. 11., vol. 106, pp. 58–68. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.07.038

KARTSOGIANNIS, Vicky and KONG WAH NG, (2004). Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 12., vol. 228, nos. 1–2, pp. 79–102. ISSN 03037207. Retrieved z: doi:10.1016/j.mce.2003.06.002

KATO, Koichi, Yoshihiro EIKA and Yoshito IKADA, (1997). In situ hydroxyapatite crystallization for the formation of hydroxyapatite/polymer composites. *Journal of Materials Science* [online]. vol. 32, no. 20, pp. 5533–5543. ISSN 00222461. Retrieved z: doi:10.1023/A:1018616306104

KATTIMANI, Vivekanand Sabanna, Sudheer KONDAKA and Krishna Prasad LINGAMANENI, (2016). Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights* [online]. 1., vol. 7, p. BTRI.S36138. ISSN 1179-061X, 1179-061X. Retrieved z: doi:10.4137/BTRI.S36138

KAUR, Tejinder, Arunachalam THIRUGNANAM and Krishna PRAMANIK, (2015). Tailoring the in vitro characteristics of poly(vinyl alcohol)-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering [online]. 4.6., vols. 36(8): 771–784, pp. 771–784. Retrieved z: doi:DOI 10.1515/polyeng-2015-0252

KENKRE, Js and Jhd BASSETT, (2018). The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* [online]. 5., vol. 55, no. 3, pp. 308–327. ISSN 0004-5632, 1758-1001. Retrieved z: doi:10.1177/0004563218759371

KHALILI, Amelia and Mohd AHMAD, (2015). A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 5.8., vol. 16, no. 8, pp. 18149–18184. ISSN 1422-0067. Retrieved z: doi:10.3390/ijms160818149

KHAN, Safdar N, Frank P CAMMISA, Harvinder S SANDHU, et al., (2005). The Biology of Bone Grafting. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. vol. 13, no. 1, p. 10.

- KIM, Jae-Hoon, (2002). Osteopontin as a Potential Diagnostic Biomarker for Ovarian Cancer. *JAMA* [online]. 3.4., vol. 287, no. 13, p. 1671. ISSN 0098-7484. Retrieved z: doi:10.1001/jama.287.13.1671
- KOKUBO, Tadashi and Hiroaki TAKADAMA, (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* [online]. 5., vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017
- KOMORI, Toshihisa, (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 1.12., vol. 99, no. 5, pp. 1233–1239. ISSN 07302312, 10974644. Retrieved z: doi:10.1002/jcb.20958
- KUMAR, Anuj and Sung Soo HAN, (2017). PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 4.3., vol. 66, no. 4, pp. 159–182. ISSN 0091-4037, 1563-535X. Retrieved z: doi:10.1080/00914037.2016.1190930
- LAUVRAK, S U, E MUNTHE, S H KRESSE, et al., (2013). Functional characterisation of osteosarcoma cell lines and identification of mRNAs and miRNAs associated with aggressive cancer phenotypes. *British Journal of Cancer* [online]. 10., vol. 109, no. 8, pp. 2228–2236. ISSN 0007-0920, 1532-1827. Retrieved z: doi:10.1038/bjc.2013.549
- LAVIK, E. and R. LANGER, (2004). Tissue engineering: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 7., vol. 65, no. 1 [accessed. 30. September 2022]. ISSN 0175-7598, 1432-0614. Retrieved z: doi:10.1007/s00253-004-1580-z
- LEE, Jin Woo, Jong Young KIM and Dong-Woo CHO, (2010). Solid Free-form Fabrication Technology and Its Application to Bone Tissue Engineering. *International Journal of Stem Cells* [online]. 31.5., vol. 3, no. 2, pp. 85–95. ISSN 2005-3606, 2005-5447. Retrieved z: doi:10.15283/ijsc.2010.3.2.85
- LEE, Sang Cheon, Il Keun KWON and Kinam PARK, (2013). Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1., vol. 65, no. 1, pp. 17–20. ISSN 0169409X. Retrieved z: doi:10.1016/j.addr.2012.07.015
- LEONG, K.F., C.M. CHEAH and C.K. CHUA, (2003). Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* [online]. 6., vol. 24, no. 13, pp. 2363–2378. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00030-9
- LI, Hongru, Zhiping QI, Shuang ZHENG, et al., (2019). The Application of Hyaluronic Acid-Based Hydrogels in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Advances in Materials Science and Engineering* [online]. 20.12., vol. 2019, pp. 1–12. ISSN 1687-8434, 1687-8442. Retrieved z: doi:10.1155/2019/3027303
- LIEN, Sio-Mei, Liang-Yu KO and Ta-Jen HUANG, (2009). Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. 2., vol. 5, no. 2, pp. 670–679. ISSN 17427061. Retrieved z: doi:10.1016/j.actbio.2008.09.020

- LIN, Xiao, Suryaji PATIL, Yong-Guang GAO and Airong QIAN, (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 26.5., vol. 11, p. 757. ISSN 1663-9812. Retrieved z: doi:10.3389/fphar.2020.00757
- LIN, Yu-Hsuan, Brittany E. JEWELL, Julian GINGOLD, et al., (2017). Osteosarcoma: Molecular Pathogenesis and iPSC Modeling. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 8., vol. 23, no. 8, pp. 737–755. ISSN 14714914. Retrieved z: doi:10.1016/j.molmed.2017.06.004
- LIU, Xiaohua and Peter X MA, (2004). Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. p. 10.
- LIU, Ziqian, Xiaoling LIU and Seeram RAMAKRISHNA, (2021). Surface engineering of biomaterials in orthopedic and dental implants: Strategies to improve osteointegration, bacteriostatic and bactericidal activities. *Biotechnology Journal* [online]. 7., vol. 16, no. 7, p. 2000116. ISSN 1860-6768, 1860-7314. Retrieved z: doi:10.1002/biot.202000116
- MACOSKO, Christopher W., (1994). *Rheology: principles, measurements, and applications*. New York: VCH. Advances in interfacial engineering series. ISBN 978-1-56081-579-2.
- MANDRYCKY, Christian, Zongjie WANG, Keekyoung KIM and Deok-Ho KIM, (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances* [online]. 7., vol. 34, no. 4, pp. 422–434. ISSN 07349750. Retrieved z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.12.011
- MANTHA, Somasundar, Sangeeth PILLAI, Parisa KHAYAMBASHI, et al., (2019). Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials* [online]. 12.10., vol. 12, no. 20, p. 3323. ISSN 1996-1944. Retrieved z: doi:10.3390/ma12203323
- MARCO-DUFORT, B. and M.W. TIBBITT, (2019). Design of moldable hydrogels for biomedical applications using dynamic covalent boronic esters. *Materials Today Chemistry* [online]. 6., vol. 12, pp. 16–33. ISSN 24685194. Retrieved z: doi:10.1016/j.mtchem.2018.12.001
- MARTIN, Ivan, David WENDT and Michael HEBERER, (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology* [online]. 2., vol. 22, no. 2, pp. 80–86. ISSN 01677799. Retrieved z: doi:10.1016/j.tibtech.2003.12.001
- MCDONALD, Michelle M., Weng Hua KHOO, Pei Ying NG, et al., (2021). Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell* [online]. 3., vol. 184, no. 5, pp. 1330-1347.e13. ISSN 00928674. Retrieved z: doi:10.1016/j.cell.2021.02.002
- MEZUK, Briana, (2008). Affective Disorders, Bone Metabolism, and Osteoporosis. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* [online]. 12., vol. 6, nos. 3–4, pp. 101–113. ISSN 1534-8644, 1559-0119. Retrieved z: doi:10.1007/s12018-009-9025-y
- MIGUEZ-PACHECO, Valentina, Larry L. HENCH and Aldo R. BOCCACCINI, (2015). Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft

tissues. *Acta Biomaterialia* [online]. 2., vol. 13, pp. 1–15. ISSN 17427061. Retrieved z: doi:10.1016/j.actbio.2014.11.004

MOLLAZADEH, S., J. JAVADPOUR and A. KHAVANDI, (2007). In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly(vinyl alcohol) matrix. *Ceramics International* [online]. 12., vol. 33, no. 8, pp. 1579–1583. ISSN 02728842. Retrieved z: doi:10.1016/j.ceramint.2006.06.006

MULARI, Mika T. K., Haibo ZHAO, Päivi T. LAKKAKORPI and H. Kalervo VÄÄNÄNEN, (2003). Osteoclast Ruffled Border Has Distinct Subdomains for Secretion and Degraded Matrix Uptake: **Membrane Turnover at Osteoclast Ruffled Border**. *Traffic* [online]. 2., vol. 4, no. 2, pp. 113–125. ISSN 13989219. Retrieved z: doi:10.1034/j.1600-0854.2003.40206.x

NIKBAKHT, Mohammad, Saeed KARBASI and Seyed Mahdi REZAYAT, (2020). Biological evaluation of the effects of Hyaluronic acid on Poly (3-hydroxybutyrate) based Electrospun Nanocomposite scaffolds for cartilage tissue engineering application. *Materials Technology* [online]. 23.2., vol. 35, no. 3, pp. 141–151. ISSN 1066-7857, 1753-5557. Retrieved z: doi:10.1080/10667857.2019.1659535

NOOEAI, Patcharakamon, Vehid SALIH, Justus P. BEIER and Aldo R. BOCCACCINI, (2012). Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 10., vol. 16, no. 10, pp. 2247–2270. ISSN 15821838. Retrieved z: doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01571.x

O'BRIEN, Fergal J., (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 3., vol. 14, no. 3, pp. 88–95. ISSN 13697021. Retrieved z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X

OH, Se Heang, Dan Bi AN, Tae Ho KIM and Jin Ho LEE, (2016). Wide-range stiffness gradient PVA/HA hydrogel to investigate stem cell differentiation behavior. *Acta Biomaterialia* [online]. 4., vol. 35, pp. 23–31. ISSN 17427061. Retrieved z: doi:10.1016/j.actbio.2016.02.016

OLIVEIRA, Andreia Sofia, Oumar SEIDI, Nuno RIBEIRO, et al., (2019). Tribomechanical Comparison between PVA Hydrogels Obtained Using Different Processing Conditions and Human Cartilage. *Materials* [online]. 18.10., vol. 12, no. 20, p. 3413. ISSN 1996-1944. Retrieved z: doi:10.3390/ma12203413

OLOV, Nafiseh, Shadab BAGHERI-KHOULENJANI and Hamid MIRZADEH, (2022). Injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering: a review. *Progress in Biomaterials* [online]. 6., vol. 11, no. 2, pp. 113–135. ISSN 2194-0509, 2194-0517. Retrieved z: doi:10.1007/s40204-022-00185-8

OZBOLAT, Ibrahim T., Weijie PENG and Veli OZBOLAT, (2016). Application areas of 3D bioprinting. *Drug Discovery Today* [online]. 8., vol. 21, no. 8, pp. 1257–1271. ISSN 13596446. Retrieved z: doi:10.1016/j.drudis.2016.04.006

PAL, Kunal and S. PAL, (2006). Development of Porous Hydroxyapatite Scaffolds. *Materials and Manufacturing Processes* [online]. 5., vol. 21, no. 3, pp. 325–328. ISSN 1042-6914, 1532-2475. Retrieved z: doi:10.1080/10426910500464826

PARHI, Rabinarayan, (2017). Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 31.12., vol. 7, no. 4, pp. 515–530. ISSN 2228-5881, 2251-7308. Retrieved z: doi:10.15171/apb.2017.064

PORADA, Christopher, Esmail ZANJANI and Graca ALMEIDA-PORADA, (2006). Adult Mesenchymal Stem Cells: A Pluripotent Population with Multiple Applications. *Current Stem Cell Research & Therapy* [online]. 1.9., vol. 1, no. 3, pp. 365–369. ISSN 1574888X. Retrieved z: doi:10.2174/157488806778226821

QUARTO, Rodolfo and Paolo GIANNONI, (2016). Bone Tissue Engineering: Past–Present–Future. In: Massimiliano GNECCHI, ed. *Mesenchymal Stem Cells* [online]. New York, NY: Springer New York, p. 21–33 [accessed. 5. December 2022]. ISBN 978-1-4939-3582-6. Retrieved z: doi:10.1007/978-1-4939-3584-0_2

RABEL, Kerstin, Ralf-Joachim KOHAL, Thorsten STEINBERG, et al., (2020). Controlling osteoblast morphology and proliferation via surface micro-topographies of implant biomaterials. *Scientific Reports* [online]. 12., vol. 10, no. 1, p. 12810. ISSN 2045-2322. Retrieved z: doi:10.1038/s41598-020-69685-6

RAHMAN, Saeed, Malvika NAGRATH, Sasikumar PONNUSAMY and Praveen ARANY, (2018). Nanoscale and Macroscale Scaffolds with Controlled-Release Polymeric Systems for Dental Craniomaxillofacial Tissue Engineering. *Materials* [online]. 20.8., vol. 11, no. 8, p. 1478. ISSN 1996-1944. Retrieved z: doi:10.3390/ma11081478

REN, Xiaoyan, Qi ZHOU, David FOULAD, et al., (2019). Osteoprotegerin reduces osteoclast resorption activity without affecting osteogenesis on nanoparticulate mineralized collagen scaffolds. *Science Advances* [online]. 7.6., vol. 5, no. 6, p. eaaw4991. ISSN 2375-2548. Retrieved z: doi:10.1126/sciadv.aaw4991

REZWAN, K., Q.Z. CHEN, J.J. BLAKER and Aldo Roberto BOCCACCINI, (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 6., vol. 27, no. 18, pp. 3413–3431. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039

RHO, Jae-Young, Liisa KUHN-SPEARING and Peter ZIOUPOS, (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* [online]. 3., vol. 20, no. 2, pp. 92–102. ISSN 13504533. Retrieved z: doi:10.1016/S1350-4533(98)00007-1

RIAL, Ramon, J.F. Armando SOLTERO, Pedro V. VERDES, et al., (2018). Mechanical Properties of Composite Hydrogels for Tissue Engineering. *Current Topics in Medicinal Chemistry* [online]. 10.10., vol. 18, no. 14, pp. 1214–1223. ISSN 15680266. Retrieved z: doi:10.2174/1568026618666180810151539

ROBERTS, Timothy T. and Andrew J. ROSENBAUM, (2012). Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis* [online]. 10., vol. 8, no. 4, pp. 114–124. ISSN 1547-6278, 1555-8592. Retrieved z: doi:10.4161/org.23306

ROGERS, Melissa B., Tapan A. SHAH and Nadia N. SHAIKH, (2015). Turning Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) on and off in Mesenchymal Cells: REGULATION of

Bmp2 GENE EXPRESSION. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 10., vol. 116, no. 10, pp. 2127–2138. ISSN 07302312. Retrieved z: doi:10.1002/jcb.25164

ROUILLARD, Andrew D., Caroline M. BERGLUND, Jae Youn LEE, et al., (2011). Methods for Photocrosslinking Alginate Hydrogel Scaffolds with High Cell Viability. *Tissue Engineering Part C: Methods* [online]. 2., vol. 17, no. 2, pp. 173–179. ISSN 1937-3384, 1937-3392. Retrieved z: doi:10.1089/ten.tec.2009.0582

SADYKOV, Rustam, Daria LYTKINA, Ksenia STEPANOVA and Irina KURZINA, (2022). Synthesis of Biocompatible Composite Material Based on Cryogels of Polyvinyl Alcohol and Calcium Phosphates. *Polymers* [online]. 21.8., vol. 14, no. 16, p. 3420. ISSN 2073-4360. Retrieved z: doi:10.3390/polym14163420

SALASZNYK, Roman M., Robert F. KLEES, William A. WILLIAMS, et al., (2007). Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* [online]. 1., vol. 313, no. 1, pp. 22–37. ISSN 00144827. Retrieved z: doi:10.1016/j.yexcr.2006.09.013

SALHOTRA, Ankit, Harsh N. SHAH, Benjamin LEVI and Michael T. LONGAKER, (2020). Mechanisms of bone development and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 11., vol. 21, no. 11, pp. 696–711. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Retrieved z: doi:10.1038/s41580-020-00279-w

SAYDÉ, Tarek, Omar EL HAMOUI, Bruno ALIES, et al., (2021). Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials* [online]. 13.2., vol. 11, no. 2, p. 481. ISSN 2079-4991. Retrieved z: doi:10.3390/nano11020481

SCHMITZ, S.I., B. WIDHOLZ, C. ESSERS, et al., (2020). Superior biocompatibility and comparable osteoinductive properties: Sodium-reduced fluoride-containing bioactive glass belonging to the CaO–MgO–SiO₂ system as a promising alternative to 45S5 bioactive glass. *Bioactive Materials* [online]. 3., vol. 5, no. 1, pp. 55–65. ISSN 2452199X. Retrieved z: doi:10.1016/j.bioactmat.2019.12.005

SCHNEIDER, Marlon R., (2021). Von Kossa and his staining technique. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 20.11. [accessed. 1. November 2022]. ISSN 0948-6143, 1432-119X. Retrieved z: doi:10.1007/s00418-021-02051-3

SETIAWATI, Rosy and Paulus RAHARDJO, (2019). Bone Development and Growth. In: Haisheng YANG, ed. *Osteogenesis and Bone Regeneration* [online]. B.m.: IntechOpen [accessed. 1. July 2022]. ISBN 978-1-78985-767-2. Retrieved z: doi:10.5772/intechopen.82452

SHAN, Chang, Jiang YUE and Wei LIU, (2021). Broadening the role of osteocalcin in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of Endocrinology* [online]. 1.5., vol. 249, no. 2, pp. R43–R51. ISSN 0022-0795, 1479-6805. Retrieved z: doi:10.1530/JOE-20-0203

SHANBHAG, Siddharth, Samih MOHAMED-AHMED, Turid Helen Felli LUNDE, et al., (2020). Influence of platelet storage time on human platelet lysates and platelet lysate-expanded mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cell Research &*

Therapy [online]. 12., vol. 11, no. 1, p. 351. ISSN 1757-6512. Retrieved z: doi:10.1186/s13287-020-01863-9

SHAO, Dan, Mengmeng LU, Duo XU, et al., (2017). Carbon dots for tracking and promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomaterials Science* [online]. vol. 5, no. 9, pp. 1820–1827. ISSN 2047-4830, 2047-4849. Retrieved z: doi:10.1039/C7BM00358G

SHAUNAK, Shalin, Baljinder DHINSA and Wasim KHAN, (2017). The Role of 3D Modelling and Printing in Orthopaedic Tissue Engineering: A Review of the Current Literature. *Current Stem Cell Research & Therapy* [online]. 15.2., vol. 12, no. 3, pp. 225–232. ISSN 1574888X. Retrieved z: doi:10.2174/1574888X11666160429122238

SISTI, Karin E., María C. DE ANDRÉS, David JOHNSTON, et al., (2016). Skeletal stem cell and bone implant interactions are enhanced by LASER titanium modification. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 5., vol. 473, no. 3, pp. 719–725. ISSN 0006291X. Retrieved z: doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.013

SKUBIS, Aleksandra, Bartosz SIKORA, Nikola ZMARZŁY, et al., (2016). Adipose-derived stem cells: a review of osteogenesis differentiation. *Folia Biologica et Oecologica* [online]. 7.12., vol. 12, pp. 38–47. ISSN 2083-8484, 1730-2366. Retrieved z: doi:10.1515/fobio-2016-0004

STEINEROVA, Marie, Roman MATEJKA, Jana STEPANOVSKA, et al., (2021). Human osteoblast-like SAOS-2 cells on submicron-scale fibers coated with nanocrystalline diamond films. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2., vol. 121, p. 111792. ISSN 09284931. Retrieved z: doi:10.1016/j.msec.2020.111792

STEPHANIE, N, H KATARINA, L R AMIR and H A GUNAWAN, (2017). ALP gene expression in cDNA samples from bone tissue engineering using a HA/TCP/Chitosan scaffold. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 8., vol. 884, p. 012112. ISSN 1742-6588, 1742-6596. Retrieved z: doi:10.1088/1742-6596/884/1/012112

STEVENS, Brian, Yanzhe YANG, Arunesh MOHANDAS, et al., (2008). A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 5., vol. 85B, no. 2, pp. 573–582. ISSN 15524973, 15524981. Retrieved z: doi:10.1002/jbm.b.30962

STEVENS, Molly M., (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* [online]. 5., vol. 11, no. 5, pp. 18–25. ISSN 13697021. Retrieved z: doi:10.1016/S1369-7021(08)70086-5

SU, Weiping, Yihe HU, Min ZENG, et al., (2019). Design and evaluation of nano-hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) hydrogels coated with poly(lactic-co-glycolic acid)/nano-hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) scaffolds for cartilage repair. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* [online]. 12., vol. 14, no. 1, p. 446. ISSN 1749-799X. Retrieved z: doi:10.1186/s13018-019-1450-0

ŠUPOVÁ, Monika, (2020). The Significance and Utilisation of Biomimetic and Bioinspired Strategies in the Field of Biomedical Material Engineering: The Case of

Calcium Phosphat—Protein Template Constructs. *Materials* [online]. 10.1., vol. 13, no. 2, p. 327. ISSN 1996-1944. Retrieved z: doi:10.3390/ma13020327

ŠUPOVÁ, Monika, Tomáš SUCHÝ, Zbyněk SUCHARDA, et al., (2018). The comprehensive in vitro evaluation of eight different calcium phosphates: Significant parameters for cell behavior. *Journal of the American Ceramic Society* [online]. 8.10., p. jace.16110. ISSN 0002-7820, 1551-2916. Retrieved z: doi:10.1111/jace.16110

SUZUKI, Eiichi, Hiromi OCHIAI-SHINO, Hideto AOKI, et al., (2014). Akt Activation is Required for TGF- β 1-Induced Osteoblast Differentiation of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts. *PLoS ONE* [online]. 3.12., vol. 9, no. 12, p. e112566. ISSN 1932-6203. Retrieved z: doi:10.1371/journal.pone.0112566

SVITKINA, Tatyana, (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 1., vol. 10, no. 1, p. a018267. ISSN 1943-0264. Retrieved z: doi:10.1101/cshperspect.a018267

TANG, Daniel, Rahul S. TARE, Liang-Yo YANG, et al., (2016). Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials* [online]. 3., vol. 83, pp. 363–382. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.01.024

TODROS, Silvia, Martina TODESCO and Andrea BAGNO, (2021). Biomaterials and Their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration. *Processes* [online]. 29.10., vol. 9, no. 11, p. 1949. ISSN 2227-9717. Retrieved z: doi:10.3390/pr9111949

TURNBULL, Gareth, Jon CLARKE, Frédéric PICARD, et al., (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* [online]. 9., vol. 3, no. 3, pp. 278–314. ISSN 2452199X. Retrieved z: doi:10.1016/j.bioactmat.2017.10.001

ULLAH, Faheem, Muhammad Bisyrul Hafi OTHMAN, Fatima JAVED, et al., (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 12., vol. 57, pp. 414–433. ISSN 09284931. Retrieved z: doi:10.1016/j.msec.2015.07.053

UMRATH, Felix, Achim PFEIFER, Wanjing CEN, et al., (2022). How osteogenic is dexamethasone?—effect of the corticosteroid on the osteogenesis, extracellular matrix, and secretion of osteoclastogenic factors of jaw periosteum-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 31.10., vol. 10, p. 953516. ISSN 2296-634X. Retrieved z: doi:10.3389/fcell.2022.953516

VACANTI, Joseph P and Robert LANGER, (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet* [online]. 7., vol. 354, pp. S32–S34. ISSN 01406736. Retrieved z: doi:10.1016/S0140-6736(99)90247-7

VEDADGHAVAMI, Armin, Farnaz MINOOEI, Mohammad Hossein MOHAMMADI, et al., (2017). Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* [online]. 10., vol. 62, pp. 42–63. ISSN 17427061. Retrieved z: doi:10.1016/j.actbio.2017.07.028

- VRANA, Nihal Engin, Yurong LIU, Garret Brian MCGUINNESS and Paul Aidan CAHILL, (2008). Characterization of Poly(vinyl alcohol)/Chitosan Hydrogels as Vascular Tissue Engineering Scaffolds. *Macromolecular Symposia* [online]. 8., vol. 269, no. 1, pp. 106–110. ISSN 10221360, 15213900. Retrieved z: doi:10.1002/masy.200850913
- WANG, Hailong, Jinqiao LI, Zihan XU, et al., (2021). Undercarboxylated osteocalcin inhibits the early differentiation of osteoclast mediated by Gprc6a. *PeerJ* [online]. 2.3., vol. 9, p. e10898. ISSN 2167-8359. Retrieved z: doi:10.7717/peerj.10898
- WANG, Wenhao and Kelvin W.K. YEUNG, (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials* [online]. 12., vol. 2, no. 4, pp. 224–247. ISSN 2452199X. Retrieved z: doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007
- WANG, Xiaojian, Shanqing XU, Shiwei ZHOU, et al., (2016). Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials* [online]. 3., vol. 83, pp. 127–141. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.01.012
- WILLETTE, Robert N., Juan L. GU, Paul G. LYSKO, et al., (1999). BMP-2 Gene Expression and Effects on Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Vascular Research* [online]. vol. 36, no. 2, pp. 120–125. ISSN 1018-1172, 1423-0135. Retrieved z: doi:10.1159/000025634
- WINKLER, D. G., DAVID G.WINKLER¹, , MAY KUNG SUTHERLAND¹, et al., (2003). Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO Journal* [online]. 1.12., vol. 22, no. 23, pp. 6267–6276. ISSN 1460-2075. Retrieved z: doi:10.1093/emboj/cdg599
- WONG, Marisa L. and Juan F. MEDRANO, (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* [online]. 7., vol. 39, no. 1, pp. 75–85. ISSN 0736-6205, 1940-9818. Retrieved z: doi:10.2144/05391RV01
- XIA, Bing, Jie WANG, Lida GUO and Zujun JIANG, (2011). Effect of bone sialoprotein on proliferation and osteodifferentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Biologicals* [online]. 7., vol. 39, no. 4, pp. 217–223. ISSN 10451056. Retrieved z: doi:10.1016/j.biologicals.2011.04.004
- XU, Jiajia, Yiyun WANG, Ching-Yun HSU, et al., (2019). Human perivascular stem cell-derived extracellular vesicles mediate bone repair. *eLife* [online]. 4.9., vol. 8, p. e48191. ISSN 2050-084X. Retrieved z: doi:10.7554/eLife.48191
- YAHIA, LHocine, LUKAS GRITSCH^{1,2}, FEDERICO LEONARDO MOTTA^{1,2}, et al., (2015). History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* [online]. vol. 04, no. 02 [accessed. 13. July 2021]. ISSN 2254609X. Retrieved z: doi:10.4172/2254-609X.100013
- YIN, Jian Lin, Nicholas A SHACKEL, Amany ZEKRY, et al., (2001). Real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunology & Cell Biology* [online]. 6., vol. 79, no. 3, pp. 213–221. ISSN 0818-9641, 1440-1711. Retrieved z: doi:10.1046/j.1440-1711.2001.01002.x

YU, Juhong, Hong XIA and Qing-Qing NI, (2018). A three-dimensional porous hydroxyapatite nanocomposite scaffold with shape memory effect for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science* [online]. 4., vol. 53, no. 7, pp. 4734–4744. ISSN 0022-2461, 1573-4803. Retrieved z: doi:10.1007/s10853-017-1807-x

YUAN, Bo, Sheng-yuan ZHOU and Xiong-sheng CHEN, (2017). Rapid prototyping technology and its application in bone tissue engineering. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* [online]. 4., vol. 18, no. 4, pp. 303–315. ISSN 1673-1581, 1862-1783. Retrieved z: doi:10.1631/jzus.B1600118

ZADPOOR, Amir Abbas, (2014). Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2., vol. 35, pp. 134–143. ISSN 09284931. Retrieved z: doi:10.1016/j.msec.2013.10.026

ZHANG, Dekun, Junjie DUAN, Dagang WANG and Shirong GE, (2010). Effect of preparation methods on mechanical properties of PVA/HA composite hydrogel. *Journal of Bionic Engineering* [online]. 9., vol. 7, no. 3, pp. 235–243. ISSN 1672-6529, 2543-2141. Retrieved z: doi:10.1016/S1672-6529(10)60246-6

ZHANG, Qian, Jing WANG, Fang DENG, et al., (2015). TqPCR: A Touchdown qPCR Assay with Significantly Improved Detection Sensitivity and Amplification Efficiency of SYBR Green qPCR. *PLOS ONE* [online]. 14.7., vol. 10, no. 7, p. e0132666. ISSN 1932-6203. Retrieved z: doi:10.1371/journal.pone.0132666

ZHAO, Feng, Yuji YIN, William W. LU, et al., (2002). Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials* [online]. 8., vol. 23, no. 15, pp. 3227–3234. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/S0142-9612(02)00077-7

ZHOU, Nian, Qi LI, Xin LIN, et al., (2016). BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. *Cell and Tissue Research* [online]. 10., vol. 366, no. 1, pp. 101–111. ISSN 0302-766X, 1432-0878. Retrieved z: doi:10.1007/s00441-016-2403-0

ZHU, Wei, Xuanyi MA, Maling GOU, et al., (2016). 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 8., vol. 40, pp. 103–112. ISSN 09581669. Retrieved z: doi:10.1016/j.copbio.2016.03.014

ZHU, Yang, Yasumoto MATSUMURA, Murugesan VELAYUTHAM, et al., (2018). Reactive oxygen species scavenging with a biodegradable, thermally responsive hydrogel compatible with soft tissue injection. *Biomaterials* [online]. 9., vol. 177, pp. 98–112. ISSN 01429612. Retrieved z: doi:10.1016/j.biomaterials.2018.05.044

ZILLA, Peter, Manfred DEUTSCH, Deon BEZUIDENHOUT, et al., (2020). Progressive Reinvention or Destination Lost? Half a Century of Cardiovascular Tissue Engineering. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* [online]. 9.9., vol. 7, p. 159. ISSN 2297-055X. Retrieved z: doi:10.3389/fcvm.2020.00159

6 Seznam tabulek

Tabulka 1 – Vhodné geny a primery pro sledování osteodiferenciace.....	14
Tabulka 2 - Kostní buňky, jejich funkce a umístění v kosti.....	20
Tabulka 3 - Mechanické vlastnosti lidských kostí, průměrné hodnoty z obvykle uváděných údajů v literatuře.....	23
Tabulka 4 - Aktivita kostních štěpů podle jejich typu.....	25
Tabulka 5 - Způsoby přípravy hydrogelů na bázi PVA.....	28
Tabulka 6 - Výhody a nevýhody materiálů používaných v tkáňovém inženýrství	29
Tabulka 7 - Výhody a nevýhody jednotlivých výrobních technologií skafoldů	31
Tabulka 8 - Některé výhody a nevýhody hydrogelů	35
Tabulka 9 - Přehled způsobů síťování hydrogelů.....	39
Tabulka 10 – Složky roztoku SBF a jejich množství pro přípravu 500 ml	47
Tabulka 11 - Složení diferenciačního média	51
Tabulka 12 - Sekvence primerů a odpovídající sondy UPL pro stanovení genové exprese osteodiferenciace	53
Tabulka 13 - Stanovení hustoty a pórovitosti hydrogelu s různou koncentrací PVA v závislosti na počtu cyklů fyzikálního síťování	55
Tabulka 14 - Výsledky stupně zbotnění, hodnocení bioaktivity a hemokompatibility u jednotlivých typů skafoldů	56
Tabulka 15 - Stanovení Youngova modulu pružnosti hydrogelů s různě připraveným HAp	62
Tabulka 16 - Prvkové složení izolovaných apatitů v hydrogelech na základě EDS analýzy	67
Tabulka 17 - Hmotnostní poměr Ca/P v hydrogelech s různě připraveným HAp	68
Tabulka 18 - Cohenův koeficient d pro poměr Ca/P v hydrogelech s různě připraveným HAp	68
Tabulka 19 - Biologické hodnocení hydrogelů s různě připraveným HAp.....	68
Tabulka 20 – Výsledky barvení pomocí alizarinu v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp.....	78
Tabulka 21 – Výsledky barvení von Kossa v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp.....	79

7 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Hierarchické uspořádání kosti	16
Obrázek 2 - Mikroskopická struktura kosti a jednotlivé typy kostních buněk [Babuska et al., 2022].....	19
Obrázek 3 - Jednotlivé složky extracelulární matrix kosti	19
Obrázek 4 - Struktura kyseliny hyaluronové.....	27
Obrázek 5 - Struktura polyvinylalkoholu	27
Obrázek 6 - Časová osa vystihující nejdůležitější okamžiky ve vývoji hydrogelů	37
Obrázek 7 - Schéma experimentu hodnocení viability buněk na skafoldech.....	50
Obrázek 8 - Grafické znázornění viability buněk MG-63 na různých typech hydrogelů ...	57
Obrázek 9 - Vizuální srovnání kolonií buněk MG-63 obarvených hematoxylinem a eosinem na různých typech hydrogelů	59
Obrázek 10 - Vliv způsobu přípravy HAp na kompresní vlastnosti hydrogelů při konstantní rychlosti zatěžování $6\ 000\ \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, respektive $100\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	63
Obrázek 11 – Vliv způsobu přípravy HAp na kompresní vlastnosti hydrogelů při konstantní rychlosti zatěžování $600\ \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, respektive $10\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	63
Obrázek 12 – Stanovení viskoelastických vlastností jednotlivých hydrogelů s různě připraveným HAp.....	64
Obrázek 13 - FTIR předem připraveného HAp.....	65
Obrázek 14 - FTIR spektra HAp v hydrogelech s různě připraveným HAp.....	65
Obrázek 15 - FWHM spektra HAp v hydrogelech s různě připraveným HAp	66
Obrázek 16 - Srovnání hydrogelů s předem připraveným HAp (a-c) a hydrogelů s HAp připraveným <i>in situ</i> (d-f).....	67
Obrázek 17 - Grafické znázornění adheze a proliferace buněk MG-63 na hydrogelech s různě připraveným HAp.....	71
Obrázek 18 - Reprezentativní mikroskopické snímky histologických řezů, na kterých jsou vidět buňky MG-63 rostoucí 21 dní po nasazení buněk na hydrogelech s různě připraveným HAp	72
Obrázek 19 - Stanovení adheze a proliferace BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp pomocí CCK-8	75
Obrázek 20 - Stanovení aktivity ALP metodou konstantního času při osteodiferenciaci BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp	77

Obrázek 21 - Kvantifikace vápníku v osteogenní kultuře na základě absorbance vyextrahovaného alizarinu z hydrogelů s <i>in situ</i> připraveným HAp	78
Obrázek 22 - Stanovení exprese genu ALP pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp	80
Obrázek 23 - Stanovení exprese genu Runx2 pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp	81
Obrázek 24 - Stanovení exprese genu BMP-2 pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp	82
Obrázek 25 - Stanovení exprese genu OCN pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp	83
Obrázek 26 - Stanovení exprese genu OPN pomocí RT-PCR v průběhu osteodiferenciace BM-hMSC na hydrogelech s <i>in situ</i> připraveným HAp	84

8 Seznam příloh

Příloha I

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA and Vaclav BABUSKA, (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials* [online]. 14.2., vol. 12, no. 4, p. 568. ISSN 1996-1944. Retrieved z: doi:10.3390/ma12040568 [IF 2023: 3,748]

Příloha II

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA, Jana DVORAKOVA, et al., (2020). Biological Evaluation of Polyvinyl Alcohol Hydrogels Enriched by Hyaluronic Acid and Hydroxyapatite. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 10.8., vol. 21, no. 16, p. 5719. ISSN 1422-0067. Retrieved z: doi:10.3390/ijms21165719 [IF 2023: 6,208]

Příloha III

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA, Jana DVORAKOVA, et al., (2021). In Situ Hydroxyapatite Synthesis Enhances Biocompatibility of PVA/HA Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 28.8., vol. 22, no. 17, p. 9335. ISSN 1422-0067. Retrieved z: doi:10.3390/ijms22179335 [IF 2023: 6,208]

Příloha IV

BABUSKA, Vaclav, Phanindra Babu KASI, **Petra CHOCHOLATA**, et al., (2022). Nanomaterials in Bone Regeneration. *Applied Sciences* [online]. 5.7., vol. 12, no. 13, p. 6793. ISSN 2076-3417. Retrieved z: doi:10.3390/app12136793 [IF 2023: 2,838]

Příloha I

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA and Vaclav BABUSKA, (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials* [online]. 14.2., vol. 12, no. 4, p. 568. ISSN 1996-1944. Retrieved z: doi:10.3390/ma12040568 [IF 2023: 3,748]

Příloha II

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA, Jana DVORAKOVA, et al., (2020). Biological Evaluation of Polyvinyl Alcohol Hydrogels Enriched by Hyaluronic Acid and Hydroxyapatite. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 10.8., vol. 21, no. 16, p. 5719. ISSN 1422-0067. Retrieved z: doi:10.3390/ijms21165719
[IF 2023: 6,208]

Příloha III

CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA, Jana DVORAKOVA, et al., (2021). In Situ Hydroxyapatite Synthesis Enhances Biocompatibility of PVA/HA Hydrogels. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 28.8., vol. 22, no. 17, p. 9335. ISSN 1422-0067. Retrieved z: doi:10.3390/ijms22179335
[IF 2023: 6,208]

Příloha IV

BABUSKA, Vaclav, Phanindra Babu KASI, **Petra CHOCHOLATA**, et al., (2022). Nanomaterials in Bone Regeneration. *Applied Sciences* [online]. 5.7., vol. 12, no. 13, p. 6793. ISSN 2076-3417. Retrieved z: doi:10.3390/app1213679 [IF 2023: 2,838]