

**WPLYW PODŁOŻY I RUSZTOWAŃ ZAWIERAJĄCYCH
KRZEM LUB JEGO ZWIĄZKI NA OSTEOGENEZĘ *IN
VITRO* MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK
MACIERZYSTYCH I KOMÓREK
OSTEOPROGENITOROWYCH**

EFFECTS OF GROWTH SURFACES OR SCAFFOLDS CONTAINING SILICA
OR SILICA COMPOUNDS ON *IN VITRO* OSTEOGENESIS OF
MESENCHYMAL STEM CELLS AND OSTEOPROGENITOR CELLS

Natalia DERUS*, Joanna FILIPOWSKA*, Anna M. OSYCZKA

Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii UJ

Streszczenie: Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC), szczególnie te obecne w szpiku kostnym, są naturalnym źródłem komórek kościotwórczych – osteoblastów. Dlatego też wiele innowacyjnych eksperymentalnych terapii tkanki kostnej zakłada wykorzystanie komórek MSC w regeneracji tkanki kostnej. Dostarczenie MSC do organizmu wymaga niejednokrotnie odpowiednich podłoży i rusztowań umożliwiających osiadanie oraz wnikanie komórek kościotwórczych oraz komórek wspomagających procesy kościotworzenia. Zapewniają to m.in. podłoża i rusztowania wzbogacone w krzem lub jego związki. Rola krzemu w procesach osteogenezy nie jest do końca poznana. Krzem, dostarczany do organizmu ludzkiego z pokarmem, wpływa pozytywnie na tkankę łączną, w tym m.in. na produkcję kolagenu w tkance kostnej i skórze, oraz stymuluje produkcję składników międzykomórkowej macierzy chrząstki. W pracy omówiono najnowsze doniesienia dotyczące wykorzystania krzemu oraz jego pochodnych w podłożach i rusztowaniach do hodowli komórek kościotwórczych, począwszy od bioaktywnej ceramiki oraz polimerów, kończąc na metalach i biomateriałach naturalnych. Przedstawiono najnowsze przykłady wykorzystania materiałów krzemowych pozytywnie wpływających na procesy osteogenezy *in vitro*.

Słowa kluczowe: mezenchymalne komórki macierzyste, osteoblasty, osteogeneza, krzem, podłoża i rusztowania do hodowli komórek

Summary: Mesenchymal Stem Cells (MSCs), especially those from bone marrow, are natural source of osteoblasts (bone forming cells). Therefore, many innovative experimental bone regeneration therapies are based on MSCs. Delivery of those cells into animal organisms often requires the use of appropriate growth surfaces or scaffolds that enable MSCs' infiltration and support osteogenesis by

* Natalia Derus oraz Joanna Filipowska są odpowiednio studentkami studiów magisterskich i doktoranckich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ oraz UJ Collegium Medicum. Niniejsza praca została przygotowana i złożona w Zakładzie Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ

those cells. This is possible thanks to surfaces and scaffolds enriched in silicon or silicon derivatives. The role of silica in osteogenesis is not fully understood yet. Silicon that is delivered to animal organisms mainly with food has a positive effect on the connective tissue, including e.g. the production of collagen in bone tissue and skin, and stimulation of cartilage extracellular matrix production. This review summarizes the latest reports regarding the application of silicon and its derivatives in surfaces and scaffolds, which are designated for osteogenic cells cultures, starting with bioactive ceramics and polymers and ending with metals and natural biomaterials. We present the most recent examples of silica-based materials influencing osteogenesis *in vitro*.

Key words: mesenchymal stem cells, osteoblasts, osteogenesis, silicon, surfaces and scaffolds for cell culture

WSTĘP

Auto- lub allogenne przeszczepy tkanki kostnej nie są w stanie spełnić wszystkich potrzeb współczesnych terapii tkanki kostnej, dlatego coraz więcej uwagi poświęca się tzw. inżynierii tkanki kostnej z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) szpiku kostnego oraz osteoblastów. O ile jednak pozyskiwanie odpowiednich komórek od pacjentów lub zwierząt doświadczalnych jest na ogół możliwe, to odtworzenie tkanki kostnej *in vitro* i *in vivo* z udziałem MSC nastęrcza więcej trudności. Podłoża i rusztowania do hodowli oraz dostarczania komórek mezenchymalnych do organizmu zwierzęcego mają za zadanie naśladować naturalną macierz tkanki kostnej oraz stanowić przestrzenny szkielet dla nowopowstającej tkanki kostnej *in vitro* czy *in vivo*. Stosowane podłoża i rusztowania muszą być nietoksyczne, posiadać odpowiedni skład chemiczny, topografię powierzchni, strukturę przestrzenną oraz wytrzymałość mechaniczną [17]. Przykładowo, w przypadku inżynierii tkanki kostnej kości długich, na ogół konieczne są rusztowania o wysokiej porowatości, umożliwiające migrację do ich wnętrza osteoblastów czy mniej zróżnicowanych prekursorów kostnych i unaczynienie powstającej tkanki kostnej. Ponadto, nie może dojść do odrzucenia podłoża czy rusztowania wskutek ostrej odpowiedzi immunologicznej organizmu zwierzęcego na przeszczep, czy też tworzenia tkanki włóknistej wokół przeszczepu wskutek m.in. chronicznej reakcji immunologicznej, prowadzącej do rozluźnienia wiązania przeszczep-kość i wysięku zapalnego. Inżynieria tkanki kostnej stanowi więc poważne wyzwanie dla inżynierów biomateriałów, biologów i lekarzy, którzy muszą poznać szereg podstawowych procesów towarzyszących tzw. „żywym przeszczepom”, niosącym komórki kościotwórcze na odpowiednio skonstruowanych podłożach czy rusztowaniach. Co więcej, inżynieria tkankowa zakłada, że takie przeszczepy będą w organizmie biorcy wykazywać właściwości mechaniczne naturalnej kości a ponadto, że podłoża i rusztowania tkankowe będą w organizmie biorcy ulegały stopniowej degradacji i zostaną w efekcie zastąpione przez naturalną kość.

Z biomateriałami wykorzystywanymi w inżynierii tkanki kostnej związane są pojęcia osteokondukcji i osteoindukcji. Osteokonduktywne biomateriały pozwalają

na wnikanie osteoblastów lub ich prekursorów i tworzenie macierzy kostnej biorcy. Nie muszą być biologicznie aktywne. Wystarczy, że stanowią odpowiednie środowisko dla komórek kościotwórczych, jak np. tytan. Osteoinduktywne materiały są aktywne biologicznie i stymulują mezenchymalne komórki macierzyste, osteoblasty i ich prekursory do różnicowania i/lub odkładania zmineralizowanej macierzy kostnej.

Liczne przesłanki literaturowe z lat 90-tych ubiegłego wieku i późniejszych sugerują pozytywną rolę krzemu oraz jego związków na tkankę łączną. Dlatego prowadzi się intensywne badania nad zastosowaniem podłoży i rusztowań zawierających krzem i jego związki w hodowlach komórek kościotwórczych oraz ich wykorzystania do dostarczania komórek kościotwórczych do organizmu biorcy. Poniżej omówiono najnowsze doniesienia dotyczące wspomnianych podłoży i rusztowań oraz ich wykorzystania w inżynierii tkanki kostnej.

KRZEM W ORGANIZMIE

Krzem oraz kwas krzemowy dostarczane są do organizmu człowieka głównie poprzez przewód pokarmowy, a wydalane są z moczem. Jugdaohsingh [18] podaje, że krzem pochodzący z pokarmu ma pozytywny wpływ na tkankę łączną, a zatem i na tkankę kostną. Ponadto istnieje pozytywna zależność pomiędzy spożywaniem pokarmów zawierających krzem, a mineralizacją kości [42]. Krzem w postaci krzemionki (SiO_2) jest również składnikiem wielu preparatów odbudowujących i wzmacniających skórę, włosy i paznokcie [41]. Dokładny mechanizm działania krzemu w procesach kościotworzenia nie jest jednak poznany, ale postuluje się jego rolę m.in. w mineralizacji macierzy kostnej oraz syntezie i stabilizacji włókien kolagenowych [18]. Prawdopodobnie odgrywa także rolę we wczesnych etapach zwapniania kości podczas rozwoju zarodkowego oraz w tworzeniu glikozaminoglikanów chrząstki [42]. Krzem może więc inicjować kościotworzenie poprzez wpływ m.in. na migrację i różnicowanie osteoblastów oraz mineralizację macierzy kostnej.

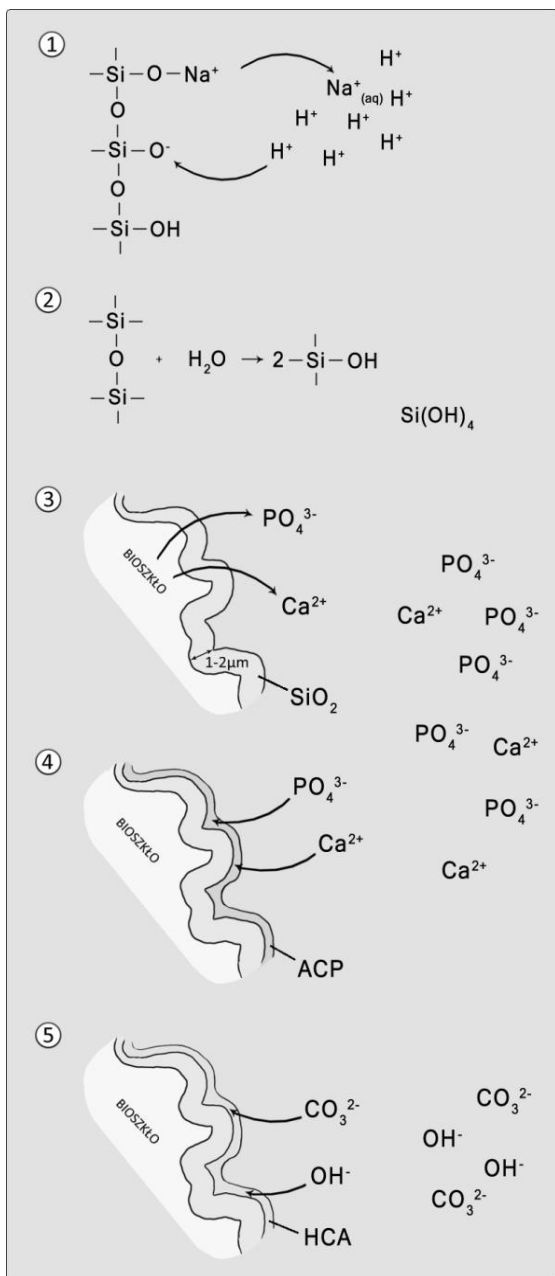
BIOAKTYWNE SZKŁA I CERAMIKA KRZEMOWA

Bioglass[®] należy do grupy bioaktywnych materiałów ceramicznych, w skład których wchodzi: tlenek krzemu, tlenek wapnia, tlenek fosforu oraz zazwyczaj tlenek sodu. Ponad 40 lat temu Hench i wsp. [14] wykazali, że tego typu materiały dobrze integrują z kością. Kilkanaście lat później, Cho i wsp. [8] oraz Hench [12] zaproponowali mechanizm tego procesu (ryc. 1). Oddziaływanie bioszkle z płynami ustrojowymi prowadzi do wytworzenia powierzchniowej warstwy bogatej w tlenek krzemu, co inicjuje formowanie warstwy amorficznego fosforanu wapnia (ACP), który następnie ulega przekształceniu w krystaliczny

hydroksyapatyt węglanowy (HCA).

Cho i wsp. [8] wykazali, że grupy krzemianowe, które powstają na drodze rozpuszczania żeli krzemionkowych, są ekspozowane na powierzchniach różnych podłoży i rusztowań i inicjują formowanie HCA niezależnie od mikrostruktury żelu krzemionkowego, z którego pochodzą. Xynos i wsp. [48] wykazali, że produkty biodegradacji bioszklą wzmagają proliferację ludzkich osteoblastów oraz wpływają na ekspresję mRNA insulinopodobnego czynnika wzrostu II (IGFII), stymulującego m.in. wzrost i proliferację komórek kostnych. W badaniach z wykorzystaniem mikromacierzy cDNA [47] określono wpływ związków pochodzących z biodegradacji bioszklą na hodowlę ludzkich osteoblastów i ekspresję ponad tysiąca genów. Około dwieście genów wykazało podwyższoną ekspresję genetyczną w porównaniu z kontrolą, jaką były komórki hodowane w podstawowej pożywce hodowlanej. Wśród genów o zmienionej względem kontroli ekspresji znalazły się m.in. geny kodujące receptory powierzchniowe, czynniki wzrostu oraz cząsteczki przekazujące sygnały wewnątrzkomórkowe, takie jak: receptor powierzchniowy CD44 pośredniczący w procesach przylegania komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej, G1/S-specyficzna cyklina D odpowiedzialna za regulację cyklu komórkowego, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej typu 2 (MMP2) odpowiedzialne za rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach fizjologicznych, kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym typu I (ERK1), przekazująca wewnątrz komórek sygnały do proliferacji i różnicowania, kościopochodny czynnik wzrostu BPGF1, a także wspomniany wcześniej IGFII. Bielby i wsp. [4] porównali wpływ substancji, pochodzących z biodegradacji bioaktywnych szkieł zawierających 45% lub 58% SiO₂, na proliferację oraz różnicowanie mysich i ludzkich osteoblastów. Zaobserwowali oni zwiększone i przyspieszone formowanie tkanki kostnej pod wpływem substancji pochodzących z biodegradacji bioaktywnych szkieł o większej zawartości krzemionki.

Jednym z głównych składników bioaktywnych szkieł jest tlenek krzemu, stąd od lat modyfikuje się metody wytwarzania bioaktywnych szkieł z udziałem tlenu krzemu i bada potencjał osteoinduktywny oraz mechanizmy osteogenezy indukowane przez produkty biodegradacji materiałów zawierających ten tlenek. Wykorzystując mysie [38] i ludzkie [49] osteoblasty ustalono, że 45 mol% krzemu w bioszkle 45S5 jest najkorzystniejsze dla procesów kościotworzenia. Bioszkoło 45S5 o składzie SiO₂: 45mol%, P₂O₅: 6mol%, CaO: 24,5mol%, Na₂O: 24,5 mol%, zostało opatentowane pod nazwą Bioglass[®] 45S5. Badane są również bioaktywne szkla o innych proporcjach SiO₂:CaO:P₂O₅ oraz innym składzie tlenków podstawowych, w celu określenia ich wpływu na procesy kościotworzenia. Właściwości i zastosowanie w inżynierii tkankowej wspomnianych powyżej bioaktywnych szkieł opisuje najnowsza praca przeglądowa Rahaman i wsp. [33]



RYCINA 1: Mechanizm powstawania warstwy krystalicznego hydroksyapatytu węglanowego na powierzchni bioszkl

- 1) Wymiana Na^+ i Ca^{2+} , jonów-modyfikatorów sieci szkła, z $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ z roztworu. Następuje hydroliza grup ortokrzemianowych SiO_4^{4-} i powstają grupy silanolowe. Wzrasta pH roztworu
- 2) Wzrost pH prowadzi do rozpuszczenia SiO_2 w formie Si(OH)_4 , formują się połączenia Si-OH na powierzchni szkła
- 3) Kondensacja i polimeryzacja amorficznej warstwy bogatej w SiO_2
- 4) Dalsze rozpuszczanie szkła. Uwalnianie jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} ze szkła do roztworu – powstanie warstwy ACP na powierzchni bogatej w SiO_2
- 5) Warstwa ACP przyłącza jonowo OH^- i CO_3^{2-} z roztworu i krystalizuje w warstwę HCA

FIGURE 1. The mechanism of crystalline hydroxycarbonate apatite formation on the bioactive glass surface

- 1) The exchange of Na^+ and Ca^{2+} ions of bioactive glass with $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ from the solution. This is followed by the hydrolysis of orthosilanol groups SiO_4^{4-} leading to the formation of silanol groups. The pH of the solution increases.
- 2) Increased pH results in SiO_2 dissolution in the form of Si(OH)_4 , the Si-OH groups form on the surface of bioactive glass
- 3) Condensation and polymerization of the amorphous layer enriched in SiO_2
- 4) Further dissolution of bioactive glass. The release of Ca^{2+} i PO_4^{3-} ions from bioactive glass to the solution; the formation of ACP layer on the surface enriched in SiO_2
- 5) The ACP layer traps OH^- and CO_3^{2-} ions from the solution and crystallizes into HCA layer

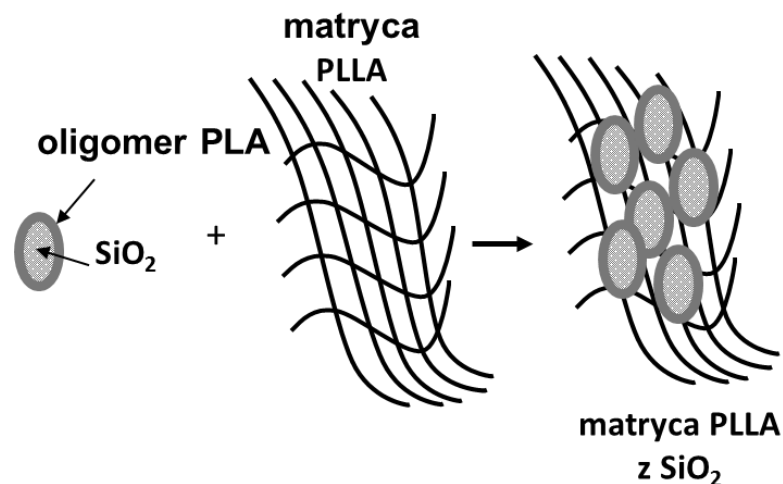
Okazuje się, że w zależności od proporcji $\text{SiO}_2:\text{CaO}$ w bioaktywnych szklach można modulować różnicowanie ludzkich MSC szpiku kostnego w kierunku osteoblastów i osteoklastów. Karpov i wsp. [19] porównywali różnicowanie ww. komórek hodowanych na podłożach z bioaktywnych szkieł o proporcjach

SiO₂:CaO: 40:54 mol% oraz 80:16 mol%. Badano m.in. poziom ekspresji genu fosfatazy zasadowej (*ALP*) i aktywność samego enzymu (*ALP*) oraz poziom ekspresji genów osteopontyny (*OP*) i ligandu RANK (*RANKL*). Podwyższona we wczesnych etapach hodowli komórek ekspresja genu i aktywność *ALP* oraz ekspresja *OP*, wskazują na procesy różnicowania osteoblastów, ale *OP* może być produkowana także przez osteoklasty [19]. *RANKL* jest produkowany przez osteoblasty i oddziałuje z receptorem RANK na osteoklastach, co skutkuje ich aktywacją i dojrzewaniem. W oparciu o ww. wskaźniki powstawania osteoblastów i osteoklastów w hodowli komórek mezenchymalnych wykazano, że podłoża z bioaktywnych szkieł zawierających 40mol% SiO₂ promowały tworzenie się zarówno osteoblastów, jak i osteoklastów, natomiast podłoża zawierające 80mol% dwutlenku krzemu promowały głównie różnicowanie komórek w osteoblasty. Pamuła i wsp. [30] użyli ostatnio wymienionych powyżej bioaktywnych szkieł do produkcji podłoży i rusztowań kompozytowych na bazie kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA). PLGA wykazuje wysoką biogodność, ale pozostaje bierny biologicznie, dlatego wprowadzenie do PLGA biologicznie aktywnych materiałów lub związków chemicznych pozwala na wytworzenie biomateriałów o lepszych właściwościach biologicznych i fizykochemicznych. Wykazano, że w zależności od rodzaju bioaktywnego szkła wprowadzonego do PLGA, otrzymane kompozyty promowały tworzenie się głównie osteoblastów lub osteoklastów i osteoblastów, podobnie jak podłoża złożone wyłącznie z bioaktywnych szkieł wspomnianych powyżej, ale otrzymane materiały kompozytowe wykazywały lepsze parametry fizykochemiczne i mechaniczne. Pamuła i wsp. podsumowali ostatnio właściwości oraz aktywność biologiczną kompozytów zawierających bioaktywne szkła [31].

POLIMERY WZBOGAĆCONE KRZEMEM

Polimery są wykorzystywane w inżynierii tkankowej ze względu na ich dużą plastyczność chemiczną, co umożliwia otrzymywanie z nich różnych form przestrzennych, w tym rusztowań do hodowli komórek. Do polimerów można dołączać również różnorodne grupy funkcyjne, a zatem można modyfikować ich właściwości podczas procesu ich wytwarzania oraz obróbki, wpływać na ich wytrzymałość mechaniczną, biodegradowalność, a także ich aktywność biologiczną. Polimery modyfikowano również krzemem i jego pochodnymi [25, 34]. Wpływ zawartości krzemu w polimerach na ich aktywność biologiczną badali ostatnio Calandrelli i wsp. [5]. Użyli oni poli-ε-kaprolaktanu (PCL) modyfikowanego grupami metakrylanu glicydylu (GMA) lub butylu (BMA). Do tych materiałów wprowadzano różne ilości nanocząsteczek tlenku krzemu oznaczonych A90, bądź nanocząsteczek tlenku krzemu zawierających grupy winylowe, oznaczonych AR72. Porównano wpływ otrzymanych materiałów na różnicowanie ludzkich MSC pochodzących ze szpiku kostnego w hodowlach *in*

vitro. Zbadano m.in. poziom białka osteokalcyny (OC), który wzrasta w końcowych etapach różnicowania komórek mezenchymalnych w osteoblasty. Wprowadzenie nanocząsteczek tlenku krzemu poprawiło właściwości mechaniczne otrzymanych materiałów i nie wpłynęło na biogodność materiałów w hodowlach.



RYCINA 2. Przykład wprowadzania krzemionki (SiO_2) do polimerów. Krzemionka (SiO_2) jest pokrywana oligomerem kwasu mlekowego (PLA) i wprowadzana następnie do matrycy przygotowanej z kwasu poli-L laktydowego (PLLA). Powstaje kompozyt PLLA z wbudowaną krzemionką SiO_2 . Na podstawie Yan S. i wsp. *Materials Science and Engineering B* 2006 133: 49–54; zmienione

FIGURE 2. The example of silica (SiO_2) incorporation into polymers. Silica (SiO_2) is covered with lactic acid oligomer (PLA) and then introduced into poly-L-lactic acid-based matrix. The composite of PLLA and silica is formed. Modified from Yan S. et al. *Materials Science and Engineering B* 2006 133: 49–54

Ponadto, podłoża oznaczone w omawianej pracy symbolami: PCL-g-(BMA-AR72) oraz PCL-g-(GMA-AR72), zawierające SiO_2 w formie nanocząsteczkowej z grupami winylowymi i oznaczone AR72, indukowały w ludzkich komórkach MSC syntezę osteokalcyny. Autorzy ww. pracy wnioskowali, że dodanie nanocząsteczek tlenku krzemu z grupami winylowymi (tj AR72) do materiałów polimerowych lepiej stymuluje różnicowanie komórek mezenchymalnych w osteoblasty, w porównaniu do materiałów polimerowych nie zawierających nanocząsteczek tlenku krzemu, ale jednocześnie obniża proliferację ludzkich MSC. Wu i wsp. [45] otrzymali ostatnio PLGA zawierający amorficzny lub krystaliczny CaSiO_3 . Ludzkie mezenchymalne komórki szpikowe hodowane na ww. materiałach wykazywały zwiększoną żywotność w porównaniu do samego polimeru oraz formowały kości po wszczepieniu ich do kości czaszki myszy, przy czym lepsze wyniki *in vivo* uzyskano dla rusztowań zawierających krystaliczny CaSiO_3 . W 2010 roku grupa Costache i in. opracowała błony polimerowo-

-kserożelowe, do których dwutlenek krzemu wprowadzany był w postaci koloidalnej [9]. Składały się one m.in. z poli-L-laktydu kwasu mlekowego (PLLA) oraz żelowej formy krzemionki. Ta ostatnia, w porównaniu z samym polimerem, wpływała korzystnie na właściwości mechaniczne otrzymanych materiałów, ich biogodność oraz poprawiała ich wytrzymałość [16]. Wspomniane materiały mogą więc znaleźć zastosowanie w tzw. sterowanej regeneracji kości.

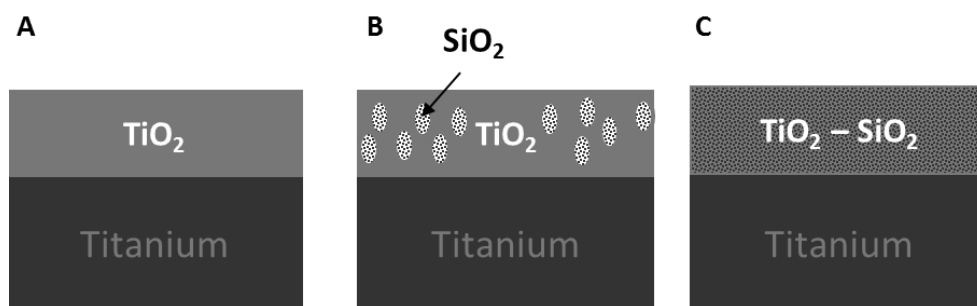
METALE I STOPY METALI MODYFIKOWANE KRZEMEM

Implanty tytanowe są używane od lat ze względu na odpowiednią wytrzymałość i biogodność, ale tytan jest biologicznie obojętny. Ostatnia z wymienionych cech sprawia, że jego zastosowanie w stymulacji regeneracji tkanki kostnej jest ograniczone [27]. Dlatego nowe metody otrzymywania przestrzennych siatek oraz porowatych rusztowań tytanowych [7] zakładają stosowanie odpowiednich warstw na tytanie lub modyfikacji chemicznych samego tytanu, dzięki czemu rusztowania te mogą stać się biologicznie aktywne.

Meretoja i wsp. [27 A i B] założyli, że produkty rozpuszczania bioszklą zawierającego krzem promują kościotworzenie w środowisku biologicznym [15] i wykorzystali bioaktywne szkła jako powłoki rusztowań tytanowych. W warunkach *in vivo* ulegały one jednak zbyt szybkiej resorpcji, co skutkowało odsłonięciem warstwy tytanowej i rozluźnieniem wiązania z tkanką kostną. Porównywano też procesy kościotworzenia *in vitro* na rusztowaniach z niemodyfikowanej siatki tytanowej, siatki tytanowej pokrytej tlenkiem tytanu lub mieszaniną tlenku tytanu z tlenkiem krzemu (tj 30:70 mol% $\text{TiO}_2:\text{SiO}_2$), w hodowlach komórek osteoblastycznych pochodzących ze szpiku kostnego szczura [27 A,B]. Komórki proliferowały porównywalnie na wszystkich badanych materiałach, ale najwyższy potencjał stymulacji różnicowania osteoblastów wykazywały rusztowania tytanowe pokryte TiO_2 . Co ciekawe, rusztowania pokryte $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ wykazywały najsłabszy potencjał mineralizacji macierzy kostnej. Zatem tlenek krzemu nie sprawdził się jako czynnik osteoinduktywny w badanych rusztowaniach tytanowych. Powodem tego mogły być zbyt niskie stężenia grup krzemowych oraz związków krzemu uwalnianych z powłok do pożywki hodowlanej lub eksponowanych do komórek. Podobne badania porównawcze regeneracji tkanki kostnej przeprowadzono także *in vivo* [27 B]. Przed wszczęciem rusztowań podskórnie u szczurów, zasiedlano je szczurzymi komórkami MSC szpiku kostnego. W porównaniu z samym tytanem, na rusztowaniach powlekanych TiO_2 oraz SiO_2 i TiO_2 zaobserwowano zwiększone odkładanie wapnia w pierwszych czterech tygodniach eksperymentu *in vivo*. W dalszym przebiegu badania, macierz kostna odkładała się na samym tytanie głównie w środku, a na materiałach pokrytych TiO_2 lub równocześnie SiO_2 i TiO_2 w wielu rozproszonych miejscach rusztowań. Pod koniec eksperymentu zaobserwowano powstawanie tkanki przypominającej szpik kostny wewnątrz

rusztowań z czystego tytanu i rusztowań powlekanych TiO_2 . Tylko na materiałach pokrytych zarówno SiO_2 i TiO_2 następował dalszy przyrost macierzy kostnej zawierającej wapń zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz rusztowań. Na wszystkich rusztowaniach zaobserwowano znaczący przyrost zmineralizowanej macierzy kostnej zawierającej osteocyty. Cytowane prace sugerują m.in., że wyniki badań *in vivo* mogą różnić się od wyników badań *in vitro*. W badaniach *in vitro*, powłoki zawierające TiO_2 i SiO_2 najslabiej stymulowały procesy odkładania zmineralizowanej macierzy kostnej, z kolei w badaniach *in vivo* sprawdzały się najlepiej w regeneracji tkanki kostnej.

W materiałach tytanowo-krzemowych wiele zależy od formy chemicznej zastosowanego krzemu oraz jego stężenia. Obecność krzemu oraz jego związków w podłożach i rusztowaniach do hodowli komórek może mieć działanie niekorzystne. Dla przykładu, Sabetrasekh i wsp. [35] zbadali wpływ pierwiastków śladowych, zawartych w sproszkowanym lub litym TiO_2 pochodzącym od różnych producentów, na różnicowanie *in vitro* preosteoblastycznych mysich komórek linii MC3T3-E1. Analizowano cytotoksyczność materiałów poprzez pomiar intensywności uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) do pożywki hodowlanej, oraz poziom interleukiny szóstej (IL-6) i czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF). Poziom IL-6 oraz VEGF wzrastał wraz ze skażeniem TiO_2 przez glin i krzem, pomimo że zawartość glinu i krzemu nie przekraczała 0,6% wagowych. Zwiększone uwalnianie LDH do pożywki było związane z obecnością śladowych ilości krzemu, glinu i magnezu.



RYCINA 3. Przykład wprowadzania krzemionki (SiO_2) do powierzchni metali np. tytanu. A. Tytan pokryty warstwą tlenku tytanu (TiO_2); B. Kompozyt tlenku tytanu (TiO_2) z krzemionką (SiO_2); C. Jednorodna warstwa $\text{TiO}_2 - \text{SiO}_2$ uzyskana w wyniku utworzenia wiązań chemicznych między TiO_2 i SiO_2 . Na podstawie Nur H Materials Science and Engineering B 2006 133: 49–54; zmienione
 FIGURE 3. The example of silica (SiO_2) incorporation into the titanium surface. A. Titanium covered with titanium dioxide layer (TiO_2); B. The composite made of titanium dioxide (TiO_2) and silica(SiO_2); C. Uniform layer of TiO_2 and SiO_2 resulted from the chemical bonding between TiO_2 and SiO_2 . Modified from Nur H Materials Science and Engineering B 2006 133: 49–54

Chaudari i wsp. [7] porównywali regenerację kości *in vivo* na rusztowaniach tytanowych pokrytych TiO_2 , mikroporowatą amorficzną krzemionką (AMS) lub bioaktywnym szkłem. Pokrycie rusztowań TiO_2 nie wpływało istotnie na tempo odbudowy tkanki kostnej, ale pozwalało na wrastanie kości w pory rusztowania. Powłoka AMS przyspieszała regenerację tkanki kostnej w bezpośrednim otoczeniu rusztowania, natomiast powłoka z bioaktywnego szkła stymulowała przyrost tkanki kostnej również w miejscach odległych od implantu.

W inżynierii tkanki kostnej poza tytanem używa się też m.in. stali nierdzewnej, którą również się łączy z SiO_2 . Ballarre i wsp. [3] przeprowadzili doświadczenia *in vivo* na szczurach, mające na celu porównanie osteointegracji materiałów wykonanych ze stali nierdzewnej pokrytej czteroetyloortokrzemiano-metylotrietoksykrzemianowodorem zawierającym koloidalne cząstki SiO_2 w ilościach 10mol% lub 30mol%. Dodanie związku krzemu, niezależnie od jego stężenia, poprawiło mechaniczne właściwości powierzchni rusztowań, a ponadto poprawiło integrację obydwu rusztowań z kością. Autorzy wnioskowali, że właściwości mechaniczne rusztowań zawierających 10mol% SiO_2 były zbliżone do właściwości mechanicznych tkanki kostnej zbitej.

INNE MATERIAŁY I KOMPOZYTY

Bioaktywne szkła, polimery i tytan to nie jedyne materiały, które modyfikowano krzemem i jego pochodnymi. Krzemem modyfikowano również m.in. chitynę [26], jedwab [28], hydroksyapatyt [32] oraz fosforan wapnia [11] i testowano potencjał kościotwórczy takich modyfikowanych materiałów. Dla przykładu, białka pozyskane z jedwabiu [28] wykorzystano jako podłoże do hodowli ludzkich MSC szpiku kostnego. Podłoże modyfikowano mikrokulkami SiO_2 o różnych średnicach. Podłoża zawierające mikrokulki SiO_2 stymulowały proliferację komórek oraz ekspresję genów dla kolagenu typu I oraz sialoproteiny kości (BSP). Kolagen typu I oraz BSP są odpowiednio wskaźnikami wczesnej i późnej osteogenezy. Wspomniane powyżej efekty stymulacji komórek były bardziej widoczne, gdy komórki były dodatkowo stymulowane do różnicowania w osteoblasty askorbinianem i deksametazonem. Na podłożach z chitozanu, pochodnej chityny [21], mysie osteoblasty linii MC3T3-E1 lepiej przylegały, jeśli podłoża te wzbogacono w kserożel zawierający SiO_2 , a ponadto podłoża wzbogacone w SiO_2 lepiej stymulowały ekspresję genu i aktywność ALP badanych osteoblastów. W badaniach *in vivo*, porównujących szybkość regeneracji kości czaszki u szczura, wykazano szybszą regenerację kości na rusztowaniach chitozanowych zawierających SiO_2 w porównaniu z niemodyfikowanymi podłożami chitozanowymi. Ten sam zespół [20] wszczepiał do kości czaszkowej szczura podłoża kolagenowe modyfikowane kserożelem SiO_2 . W porównaniu do niemodyfikowanych podłoży kolagenowych, podłoża kolagenowe zawierające krzem stymulowały proliferację i różnicowanie prekursorów osteoblastów

w dojrzałe osteoblasty. Zbadano również wpływ podłoża krzemowych wzbogaconych węglem na komórki osteoblastyczne [6]. Powłoki krzemowe (Si) modyfikowane diamentopodobnym węglem stymulowały adhezję, żywotność i proliferację komórek linii MC3T3-E1 w porównaniu z niemodyfikowanymi powłokami krzemowymi. Wreszcie, Natalio i wsp. [29] podjęli próbę opracowania podłoża zawierających silikateinę alfa. Jest to enzym, który m.in. katalizuje formowanie nanostrukturalnej biokrzemionki stymulującej mineralizację nowopowstającej tkanki kostnej. W omawianym badaniu silikateina wiązała się do hydroksyapatytu, a na powierzchni tak utworzonego połączenia, w obecności metakrzemianu sodu, tworzyła się powierzchniowa warstwa biokrzemionki. Autorzy sugerowali, że podłoża hydroksyapatytowe z silikateiną mogą znaleźć zastosowanie m.in. w regeneracji tkanki kostnej w stomatologii, ponieważ mogą wpływać na ekspresję białek uczestniczących w tworzeniu szkliwa zębów oraz mogą promować mineralizację macierzy międzykomórkowej przez komórki osteoblastyczne, ale nie wykonali oni żadnych weryfikacji biologicznych.

PODSUMOWANIE

Pomimo kilkudziesięciu lat badań biologicznych rozmaitych podłoży i rusztowań zawierających krzem oraz jego pochodne, nadal brak ujednoczonego biologicznego modelu badawczego i systematycznych porównań wpływu krzemu oraz jego pochodnych na komórki tkanki kostnej oraz wzrost i mineralizację macierzy kostnej. W wielu przypadkach badania ograniczają się do analizy wpływu domieszek krzemu i jego pochodnych w podłożach i rusztowaniach na formowanie powierzchniowej warstwy hydroksyapatytu węglanowego (HCA), który ze względu na podobieństwo chemiczne i strukturalne z substancją mineralną kości, uważany jest powszechnie za parametr biogodności materiału. Nie można jednak zapominać, że oddziaływanie podłoża czy rusztowania na zasiedlające je komórki jest niezmiernie istotne w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej. Cytowane w tym opracowaniu badania sugerują, że krzem w postaci tlenku krzemu wpływa korzystnie na ekspresję wielu genów kodujących białka odpowiedzialne za procesy kościotworzenia osteoblastów. Mechanizm, w jaki ten pierwiastek i jego pochodne wpływają na osteoblasty oraz mezenchymalne komórki macierzyste jest jednak wciąż słabo poznany.

Regeneracja kości poprzez stosowanie różnego składu chemicznego podłoża do hodowli komórek nie jest jedynym zastosowaniem materiałów zawierających krzem. Obecnie stosuje się materiały uwalniające różne substancje z powierzchni. Dla przykładu, Shi i wsp. [36] stworzyli rusztowania z kompozytu hydroksyapatytu, krzemionki oraz PLGA, do których wiązano antybiotyki – siarczan gentamycyny. Takie rusztowania uwalniały antybiotyk przez około miesiąc hodowli świńskich MSC w symulowanym osoczu, miały niską cytotoksyczność i stymulowały wzrost komórek lepiej niż rusztowania z samego

PLGA. Shi i wsp. [37] otrzymali także materiał kompozytowy złożony z nanocząstek hydroksyapatytu, krzemionki oraz mikrokulek PLGA, do którego wiązali alendronian. Alendronian to bisfosfonian z domieszką azotu N₂, który jest stosowany klinicznie np. w leczeniu osteoporozy. Stwierdzono, że hodowane na tym materiale chrzęstnotwórcze komórki macierzyste błony maziowej wykazywały potencjał kościotwórczy. Balas i wsp. [2] związali L-tryptofan z dostępną w handlu porowatą krzemionką celem kontrolowanego uwalniania z powierzchni krzemionki potencjalnych leków przyspieszających regenerację kości. Wykazano, że w zależności od sposobu modyfikacji powierzchni krzemionki można wpływać na adsorpcję oraz kinetykę uwalniania L-tryptofanu.

Przytoczone przykłady wskazują na szerokie możliwości stosowania krzemu oraz jego związków w biologii i medycynie. Poznanie mechanizmów odpowiedzi komórek na krzem i jego pochodne, a także usystematyzowanie oraz dalszy rozwój wiedzy dotyczącej potencjału biologicznego krzemowych podłoży i rusztowań do hodowli komórek, są konieczne z punktu widzenia nauk podstawowych i aplikacyjnych dotyczących roli oraz możliwości zastosowania krzemu w organizmach zwierzęcych, w tym u ludzi.

PODZIĘKOWANIA

Pracę wykonano w ramach projektu badawczego dr Anny M. Osyczka finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (nr projektu NCN B/NZ4/00664). Autorki składają szczególne podziękowania prof. dr hab. Wincentemu Kilarskiemu za cenne uwagi podczas redagowania pracy.

LITERATURA

- [1] ADLER AJ, BERLYNE GM. Silicon metabolism II. Renal handling in chronic renal failure patients. *Nephron* 1986; **44**:36–39.
- [2] BALAS F, MANZANO M, COLILLA M, VALLET-REGÍ M. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomater* 2008; **4**(3):514–522.
- [3] BALLARRE J, MANJUBALA I, SCHREINER WH, ORELLANO JC, FRATZL P, CERÉ S. Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants. *Acta Biomater* 2010; **6**(4):1601–1609.
- [4] BIELBY RC, CHRISTODOULOU IS, PRYCE RS, RADFORD WJ, HENCH LL, POLAK JM. Si Time- and concentration-dependent effects of dissolution products of 58S sol-gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue Eng* 2004; **10**(7-8):1018–1026.
- [5] CALANDRELLI L, ANNUNZIATA M, RANIONE F D, LAURIENZO P, MALINCONICO M, OLIVA A. Development and performance analysis of PCL/silica nanocomposites for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2010; **21**(11):2923–2936.
- [6] CHAI F, MATHIS N, BLANCHEMAIN N, MEUNIER C, HILDEBRAND HF. Osteoblast interaction with DLC-coated Si substrates. *Acta Biomater* 2008; **4**(5):1369–1381.
- [7] CHAUDHARI A, BRAEM A, VLEUGELS J, MARTENS JA, NAERT I, CARDOSO MV, DUYCK J. Bone tissue response to porous and functionalized titanium and silica based coatings. *PLoS One* 2011; **6**(9):e24186. Epub 2011 Sep 15.

- [8] CHO SB, MIYAJI F, KOKUBO T, NAKANISHI K, SOGA N, NAKAMURA T. Apatite-forming ability of silicate ion dissolved from silica gels; *J Biomed Mater Res* 1996; **32**(3):375-381.
- [9] COSTACHE MC, Qu H, DUCHEYNE P, DEVORE DI., Polymer-xerogel composites for controlled release wound dressings. 2010 Aug; **31**(24):6336-43. Epub 2010 May 26. *Biomaterials*.
- [10] DODDS RA, CONNOR JR, JAMES IE, RYKACZEWSKI EL, APPELBAUM ER, DUL E, GOWEN M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: An in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res* 1995; **10**(11):1666-1680.
- [11] GILLESPIE P, WU G, SAYER M, STOTT MJ. Si complexes in calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 2010; **21**(1):99-108.
- [12] GOMES-FILHO JE, DE MORAES COSTA MM, CINTRA LT, DUARTE PC, TAKAMIYA AS, LODI CS, BERNABÉ PF. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. *J Endod* 2011; **37**(2):250-254.
- [13] HENCH LL. *Bioceramics*. *J Am Ceram Soc* 1998; **81**:1705-1728.
- [14] HENCH LL, Splinter R.J., Allen W.C., Greenlee T.K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* 1971; **5**: 117-141.
- [15] HENCH, LL. Stimulation of bone repair by gene activating glasses. *Key Eng Mater* 2004; **3**: 254-252.
- [16] JANG TS, LEE EJ, JO JH, JEON JM, KIM MY, KIM HE, KOH YH. Fibrous membrane of nano-hybrid poly-L-lactic acid/silica xerogel for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; **21**. doi: 10.1002/jbm.b.31952. [Epub ahead of print]
- [17] JONES JR, LIN S, YUE S, LEE PD, HANNA JV, SMITH ME, NEWPORT RJ. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation. *Proc Inst Mech Eng H* 2010; **224**(12):1373-1387.
- [18] JUGDAOHSINGH R. Silicon and bone health. *J Nutr Health Aging* 2007; **11**:99-110.
- [19] KARPOV M, LACZKA M, LEBOY PS, OSYCZKA AM. Sol-gel bioactive glasses support both osteoblast and osteoclast formation from human bone marrow cells. *J Biomed Mater Res A* 2008; **84**(3):718-726.
- [20] LEE EJ, JUN SH, KIM HE, KOH YH. Collagen-silica xerogel nanohybrid membrane for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2012; **100**(4):841-847.
- [21] LEE EJ, SHIN DS, KIM HE, KIM HW, KOH YH, JANG JH. Membrane of hybrid chitosan-silica xerogel for guided bone regeneration. *Biomaterials* 2009; **30**(5):743-750.
- [22] LEE EJ, TENG SH, JANG TS, WANG P, YOON SW, KIM HE, KOH YH. Nanostructure poly(epsilon-caprolactone)-silica xerogel fibrous membrane for guided bone regeneration. *Acta Biomater* 2010; **6**(9):3557-3565.
- [23] LI S, SHAH A, HSIEH AJ, HAGHIGHAT R, PRAVEEN SS, MUKHERJEE I, WEI E, ZHANG Z, WEI Y. Characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-silica) hybrid materials with different silica contents. *Polymer* 2007; **48**(14):3982-3989.
- [24] LU X, MA PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2004; **32**(3):477-486.
- [25] LÜ JM, WANG X, MARIN-MULLER C, WANG H, LIN PH, YAO Q, CHEN C. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; **9**:325-341.
- [26] MADHUMATHI K, SUDHEESH KUMAR PT, KAVYA KC, FURUIKE T, TAMURA H, NAIR SV, JAYAKUMAR R. Novel chitin/nanosilica composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol* 2009; **45**(3):289-292.
- [27A] MERETOJA VV, DE RUIJTER AE, PELTOLA TO, JANSEN JA, NÄRHI TO. Osteoblast differentiation with titania and titania-silica-coated titanium fiber meshes. *Tissue Eng* 2005; **11**(9-10):1489-1497.
- [27B] MERETOJA VV, TIRRI T, AÄRITALO V, WALBOOMERS XF, JANSEN JA, NÄRHI TO; Titania and titania-silica coatings for titanium: comparison of ectopic bone formation within cell-seeded scaffolds; *Tissue Eng*. 2007 Apr; **13**(4):855-63.
- [28] MIESZAWSKA AJ, FOURLIGAS N, GEORGAKOUDI I, Ouhib NM, Belton DJ, Perry CC, Kaplan DL. Osteoinductive silk-silica composite biomaterials for bone regeneration. *Biomaterials* 2010; **31**(34):8902-8910.
- [29] NATALIO F, LINK T, MÜLLER WE, SCHRÖDER HC, CUI FZ, WANG X, WIENS M. Bioengineering of the silica-polymerizing enzyme silicatein-alpha for a targeted application to

- hydroxyapatite. *Acta Biomater* 2010; **6**(9):3720-3728.
- [30] PAMULA E, KOKOSZKA J, CHOLEWA-KOWALSKA K, LACZKA M, KANTOR L, NIEDŹWIEDZKI L, REILLY GC, FILIPOWSKA J, MADEJ W, KOŁODZIEJCZYK M, TYLKO G, OSYCZKA AM. Degradation, bioactivity, and osteogenic potential of composites made of PLGA and two different sol-gel bioactive glasses. *Ann Biomed Eng* 2011; **39**(8):2114-2129.
- [31] PAMULA E., CHOLEWA-KOWALSKA K., SZUTA M., OSYCZKA A. M.; Bioactive glasses as composite components: technological advantages and bone tissue engineering, in: *Biomaterials and Stem Cells in Regenerative Medicine*, M. Ramalingman, S. Ramakrishna, S. Best, EDS; CRC PRESS 2012
- [32] PATEL N, BEST SM, BONFIELD W, GIBSON IR, HING KA, DAMIEN E, REVELL PA. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Sci Mater Med* 2002; **13**(12):1199-1206.
- [33] MOHAMED N. RAHAMAN, DELBERT E. DAY, B. SONNY BAL, QIANG FU, STEVEN B. JUNG, LYNDA F. BONEWALD, ANTONU P. TOMSIA, Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 7 (2011): 2355–2373
- [34] RHEE SH. Effect of calcium salt content in the poly-ε-caprolactone/silica nanocomposite on the nucleation and growth behavior of apatite layer. *J Biomed Mater Res A* 2003; **67**:1131-1138.
- [35] SABETRASEKH R, TIAINEN H, RESELAND JE, WILL J, ELLINGSEN JE, LYNGSTAADAS SP, Haugen H J. Impact of trace elements on biocompatibility of titanium scaffolds. *Biomed Mater* 2010; **5**(1):15003. Epub 2010 Jan 7.
- [36] SHI (2) X, WANG Y, REN L, ZHAO N, GONG Y, WANG DA. Novel mesoporous silica-based antibiotic releasing scaffold for bone repair. *Acta Biomater* 2009; **5**(5):1697-1707.
- [37] SHI X, WANG Y, VARSHNEY RR, REN L, ZHANG F, WANG DA. In-vitro osteogenesis of synovium stem cells induced by controlled release of bisphosphate additives from microspherical mesoporous silica composite. *Biomaterials* 2009; **30**(23-24):3996-4005.
- [38] SILVER IA, DEAS J, ERECINSKA M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 2001; **22**(2):175-185.
- [39] SINGH R, LEE PD, JONES JR, POOLOGASUNDARAMPILLAI G, POST T, LINDLEY TC, DASHWOOD RJ. Hierarchically structured titanium foams for tissue scaffold applications. *Acta Biomater* 2010; **6**(12):4596–4604.
- [40] VALERIO P, PEREIRA MM, GOES AM, LEITE MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004; **25**(15):2941-2948.
- [41] WICKETT RR, KOSSMANN E, BAREL A, DEMEESTER N, CLARYS P, VENDEN BERGHE D, CALOMME M. Effect of oral intake of choline-stabilized orthosilicic acid on hair tensile strength and morphology in woman with fine hair. *Arch Dermatol Res* 2007; **299**(10):499-505.
- [42] WIENS M, WANG X, SCHLOBMACHER U, LIEBERWIRTH I, GLASSER G, USHIJIMA H, SCHRÖDER HC, MÜLLER WEG. Osteogenic potential of biosilica on human osteoblast-like (SaOS-2) cells. *Calcif Tissue Int* 2010; **87**(6):513–524.
- [43] WILLIAMS DF, WILLIAMS RL. Degradative effects of the biological environment on metals and ceramics. [w] Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE [red.] *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego, CA: Academic Press 1996: 260–266.
- [44] WU C, RAMASWAMY Y, ZHU YF, ZHENG R, APPELYARD R, HOWARD A, ZREIGAT H. The effect of mesoporous bioactive glass on the physiochemical, biological and drug release properties of poly(dl-lactide-co-glycolide) films. *Biomaterials* 2009; **30**(12):2199-2208.
- [45] WU C, ZHANG Y, FAN W, KE X, HU X, ZHOU Y, XIAO Y. CaSiO₃ microstructure modulating the in vitro and in vivo bioactivity of poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Biomed Mater Res A* 2011; **98**(1):122-131.
- [46] XUE W, BANDYOPADHYAY A, BOSE S. Mesoporous calcium silicate for controlled release of bovine serum albumin protein. *Acta Biomater* 2008; **5**(5):1686-1696.
- [47] XYNOS ID, EDGAR AJ, BUTTERY LD, HENCH LL, POLAK JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2000; **55**(2):151-157.
- [48] XYNOS ID, EDGAR AJ, BUTTERY LD, HENCH LL, POLAK JM. Ionic products of bioactive glass

- dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **276**(2):461-465.
- [49] XYNOS ID, HUKKANEN MVJ, BATTEN JJ, BUTTERY LD, HENCH LL, POLAK JM. Bioglass® 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* 2000; **67**(4):321-329.
- [50] YAN S, YIN J, CUI L, YANG Y, CHEN X. Apatite-forming ability of bioactive poly(l-lactic acid)/grafted silica nanocomposites in simulated body fluid. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; **86**(1):218-224

Redaktor prowadzący – J. Kubrakiewicz

Otrzymano: 27.06.2012

Przyjęto: 30.07.2012

Anna Maria Osyczka

Zakład Biologii i Obrazowania Komórki

Instytut Zoologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ

ul. Gronostajowa, 30-387 Kraków

e.mail: a.m.osyczka@uj.edu.pl

