

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA STROJNÍ

ÚSTAV MECHANIKY, BIOMECHANIKY A MECHATRONIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových scaffoldů
v podmínkách *in vitro* a *ex vivo***

AUTOR: Bc. Marko Meded

STUDIJNÍ PROGRAM: Aplikované vědy ve strojním inženýrství

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

PRAHA 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Meded** Jméno: **Marko** Osobní číslo: **467334**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Aplikované vědy ve strojním inženýrství**
Specializace: **Biomechanika**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových scaffoldů v podmínkách in vitro a ex vivo

Název diplomové práce anglicky:

Mechanical and structural properties of collagen scaffolds under in vitro and ex vivo conditions

Pokyny pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na téma aplikací kolagenových materiálů pro náhrady kostní tkáně se zaměřením na ověření jejich vlastností v in vitro podmínkách.
2. Navrhněte a realizujte experimentální analýzu mechanických a strukturních vlastností kolagenových scaffoldů po expozici v prostředí in vitro a ex vivo.
3. Analyzujte vliv použitých prostředí na mechanické a strukturní vlastnosti scaffoldů.
4. Interpretujte výsledky s ohledem na porovnání vlivu použitých podmínek.

Seznam doporučené literatury:

1. Suchý T, et al. 2018 J. Mater. Sci. Mater. Med. 29:20. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-6024-2>
2. Suchý T, et al. 2021 Materials 14:4388. <https://doi.org/10.3390/ma14164388>
3. Yilmaz B, et al. 2020 Microchem. J. 155:104713. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104713>
4. Przekora A, et al. 2021 Mater. Sci. Eng. C. 119:111612. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111612>

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:


Ing. Tomáš Suchý, Ph.D. odbor biomechaniky FS


Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:


Ing. Radek Sedláček, Ph.D. odbor biomechaniky FS

Datum zadání diplomové práce: **12.04.2022** Termín odevzdání diplomové práce: **14.08.2022**

Platnost zadání diplomové práce:


Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce

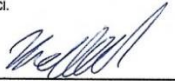

doc. Ing. Miroslav Španiel, CSc.
podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry


doc. Ing. Miroslav Španiel, CSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomant bere na vědomí, že je povinen vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

28.4.2022
Datum převzetí zadání


Podpis studenta

Anotační list

Jméno autora: Marko Meded

Název DP: Mechanické a strukturní vlastnosti kolagenových scaffoldů v podmínkách *in vitro* a *ex vivo*

Anglický název: Mechanical and structural properties of collagen scaffolds under *in vitro* and *ex vivo* conditions

Akademický rok: 2021/2022

Ústav/Odbor: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

Vedoucí DP: doc. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

Konzultant: Ing. Radek Sedláček, Ph.D.

Klíčová slova: kolagen, scaffold, degradace, simulované tělní prostředí, *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*

Keywords: collagen, scaffold, degradation, simulated body conditions, *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*

Abstrakt

Tato práce zkoumá možnosti využití simulovaných tělních tekutin k co nejpřesnějšímu napodobení prostředí lidského těla. Principem je sledování degradace zesíťovaných kolagenových scaffoldů, které představují jeden z nejčastěji využívaných materiálů v implantologii. Měřicí metody použité k tomuto účelu jsou založeny na hodnocení mechanických vlastností (elastický gradient, stabilní hladina napětí, absorbovaná energie, účinnost absorbování energie), úbytku hmotnosti a obrazových a mikro-CT analýzách pro pozorování strukturních změn, ke kterým dochází v důsledku degradace. Sledovanými prostředími byly minimální esenciální médium, *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo*. Cílem bylo porovnání prvních třech jmenovaných se skupinou *in vivo* se snahou zjistit, která z nich nejlépe a do jaké míry simuluje tělní prostředí.

Abstract

This work explores the possibilities of using simulated body fluids to represent the human body environment as accurately as possible. The principle is to track the degradation of cross-linked collagen scaffolds comprising one of the most common material in implantology. The measurement methods used for this purpose are based on the evaluation of mechanical properties (elastic gradient, sigma plateau, absorbed energy, energy absorption efficiency), weight loss and image and micro-CT analyses to observe the structural changes that occur due to degradation. The environments studied were minimal essential medium, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. The aim was to compare the first three named with the *in vivo* group in an attempt to determine which one best simulates the body environment and to what extent.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, a to výhradně s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citovaných zdrojů.

V Praze dne:

.....

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval svému vedoucímu své práce, panu doc. Ing. Tomášovi Suchému, Ph.D. za ochotu, věnovaný čas, trpělivost a veškerou pomoc, díky které jsem mohl tuto diplomovou práci dokončit. Dále bych chtěl také poděkovat Ing. Radku Sedláčkovi, Ph.D. a Ing. Lucii Vištejnové, Ph.D. za veškerou pomoc v laboratořích.

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Cíle práce.....	13
3. Teoretická část	14
3.1. Tkáňové inženýrství.....	14
3.1.1. Scaffoldy a jejich důležité vlastnosti	15
3.2. Biomateriály využitelné v TE	16
3.2.1. Polymery (syntetické a přírodní)	17
3.2.2. Keramické materiály	18
3.3. Kompozitní materiály a kostní cementy	19
3.4. Kolagen v tkáňovém inženýrství	20
3.4.1. Struktura.....	21
3.4.2. Zpracování	22
3.4.3. Síťování.....	23
3.5. Degradace - simulace tělního prostředí	23
3.5.1. Vlastnosti, které v něm pozorujeme – degradace a její vyhodnocování... 24	
3.5.2. Acelulární média.....	25
3.5.3. Buněčná média a kultury - <i>in vitro</i>	26
3.5.4. Prostředí <i>in vivo</i>	27
3.5.5. <i>Ex vivo</i>	28
4. Experimentální část	29
4.1. Příprava kolagenových scaffoldů.....	29
4.2. Metodika <i>in vitro</i>	30
4.3. Metodika <i>in vivo</i>	32
4.4. Metodika <i>ex vivo</i>	33
4.5. Mechanické zkoušky.....	33
4.6. Hmotnostní úbytky	37

4.7.	Obrazová a mikro-CT analýza.....	38
4.8.	FTIR.....	39
4.9.	Statistická analýza.....	39
5.	Výsledky	41
5.1.	Mechanické vlastnosti.....	41
5.2.	Hmotnostní úbytky <i>D</i>	48
5.3.	Obrazová a mikro-CT analýza.....	49
5.4.	FTIR.....	53
6.	Diskuse.....	55
7.	Závěr.....	59
8.	Zdroje	61
9.	Seznam obrázků.....	67
10.	Seznam tabulek	70

Seznam symbolů a zkratk

σ [kPa]	tlakové smluvní napětí
σ_{pl} [kPa]	stabilní hladina napětí
ε [1]	stlačení
h [mm]	výška
h_o [mm]	počáteční výška
D [%]	hmotnostní úbytky
E [kPa]	elastický gradient
F [N]	síla
S_o [mm ²]	počáteční plocha
r_B [1]	koeficient pořadové biseriální korelace
W [kJ/m ³]	absorbovaná energie
W_e [%]	účinnost absorbování energie
AMK	aminokyselinové zbytky
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie
CPC	kalcium fosfátová keramika
CPBC	kalcium fosfátové kostní cementy
ČSN	Česká technická norma
ECM	extracelulární matrix
EDC	N-(3-dimethylamino propyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochlorid
EMEM	Eaglovo minimální esenciální médium
DF	dermální fibroblasty
DMEM	Dulbeccovo modifikované minimální esenciální médium
FBS	fetální bovinní sérum
HAP	hydroxyapatit
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
NHS	N-hydroxysukcinimid
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PCL	polykaprolakton
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
RT	pokožová teplota

TE	tkáňové inženýrství
SBF	simulated body fluid
SEM	skenovací elektronová mikroskopie

1. Úvod

Kost je dobrým příkladem dynamické tkáně. Ve většině případů poškození dochází k její přirozené regeneraci, ale v případech rozsáhlejších traumatických nebo netraumatických poškození, se kosti nemusí zahojit samostatně. V těchto případech může být k navození kostní regenerace nutný chirurgický zákrok s aplikací kostního štěpu [1].

Kostní štěpy však není možné použít za všech podmínek a místo nich se využívají umělé materiály nebo tzv. tkáňové nosiče. Ty musí splňovat určité mechanické a strukturní vlastnosti. Dalšími podmínkami jsou pak jejich biokompatibilita a biodegradabilita. Funkce scaffoldu je v tomto případě podporovat svými vlastnostmi produkci nové tkáně, zároveň se však musí sám odbourávat (degradovat), aby mohlo dojít k jeho postupnému nahrazení kostní tkání. Porozumění degradačnímu mechanismu je tedy klíčovým faktorem pro výběr ideálního materiálu a velikou výzvou tkáňového inženýrství [2].

Ideálním způsobem pozorování těchto procesů je jejich pozorování v živém prostředí, tedy *in vivo*. To kvůli etickým či finančním důvodům není ale vždy možné. V takových situacích se pak provádí experiment *in vitro* v simulovaných tělních podmínkách.

Další, méně probádanou metodou pozorování, je metoda *ex vivo* - "mimo živý organismus". V ní pozorujeme chování implantátů v explantované tkáni udržované v simulovaném tělním prostředí.

Při navrhování takovýchto simulací je vždy důležité stanovit jaké podmínky použít a jaké prostředí či pozorované vlastnosti jsou středem zájmu.

Tato práce se zabývá vlivem vybraných simulovaných tělních prostředí na degradaci kolagenových scaffoldů a na jejich mechanické a strukturní vlastnosti v různých časových intervalech. Vlivy jednotlivých prostředí byly ověřovány na modelových vzorcích (kolagenové scaffoldy), které byly vybrány jako zástupce jednoho z nejčastěji používaných biomateriálů v implantologii. Cílem bylo porovnat simulovaná tělní prostředí s reálným živým prostředím a tím zjistit, zda lze tyto simulace považovat za věrohodné.

Tato diplomová práce je součástí studie, která byla finančně podpořena grantovým projektem Technologické agentury ČR v rámci projektu č. TP01010055 (program

GAMA2), dílčí projekt „Ověření technologie zpracování kolagenové disperze pro impregnaci porézních povrchů kotvicích částí implantátů“.

2. Cíle práce

Hlavním cílem práce je vyhodnocení vlivu simulovaných tělních prostředí na degradaci kolagenových scaffoldů, a tedy na jejich mechanické a strukturní vlastnosti. Kolagenové scaffoldy byly použity z důvodu, že se díky svým vlastnostem jedná o jedny z nejhojněji používaných materiálů v tkáňovém inženýrství. Pozorovanými prostředími jsou: minimální esenciální médium (MEM), *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo*. U mechanických vlastností sledujeme:

- Elastický gradient
- Stabilní hladina napětí
- Absorbovaná energie
- Účinnost absorbování energie

Z pohledu strukturních vlastností je pozornost zaměřena na:

- Hmotnostní úbytky
- Vnitřní strukturu sledovanou pomocí obrazové a mikro-CT analýzy
- Změny na sekundární úrovni kolagenu (infračervená spektrometrie)

Náplní práce je pak potvrzení či zamítnutí nulových hypotéz na úrovni statistické a věcné významnosti. Hlavními hypotézami jsou:

- 1) Podmínky *in vitro*, *ex vivo* a MEM simulují *in vivo* prostředí
- 2) MEM simuluje prostředí *in vitro*

Vedlejšími hypotézami jsou:

- 1) expozice ve všech prostředích vede ke stejným změnám v mechanických vlastnostech
- 2) expozice ve všech prostředích vede ke stejným změnám ve struktuře

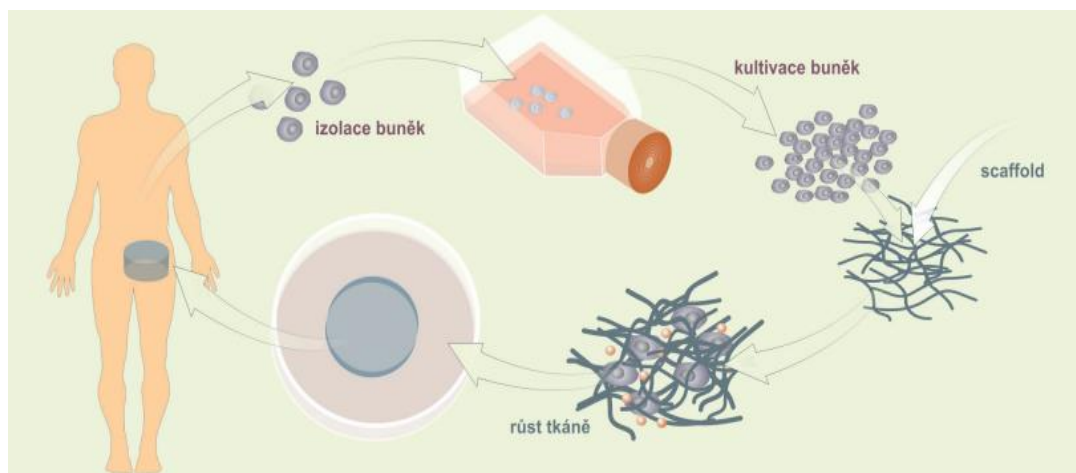
3. Teoretická část

3.1. Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství (TE) je definováno jako interdisciplinární obor, který využívá principy inženýrství a věd o živé přírodě k vývoji biologických náhrad, které obnovují, udržují nebo zlepšují funkci tkání. V současné době je TE prosperující oblastí v rámci regenerující medicíny [3].

Hlavními principy TE jsou:

- Izolace buněk z tkáně
- Navýšení jejich počtu
- *In vitro* implementace do scaffoldu
- Buněčná kultivace
- Aplikace do poškozené části



Obr. 1 Schéma tkáňového inženýrství[4]

TE se zaměřuje na vývoj scaffoldů, které umožňují dosažení úspěšné regenerace poškozených tkání. Toho je dosaženo pomocí kombinace buněk a biomateriálů, které slouží k vytvoření přirozeného prostředí pro buňky a jejich kultivaci, proliferaci a diferenciaci. Princip TE je znázorněn na Obr. 1 [4].

Lze tedy říci, že pro TE jsou základem tři klíčové komponenty, označované jako triáda tkáňového inženýrství: vhodný výběr buněk, biomateriálový scaffold pro 3D kultivaci a přítomnost vhodných biologicky aktivních látek, kterými jsou např. růstové faktory [4,5].

Jednou z nejlepších metod získávání buněk je odběr autologních buněk přímo od pacienta. Jejich množství je ale ne vždy dostačující a jejich alternativou jsou pak buňky dárce [4,6].

Časté je také využití kmenových buněk, které se nacházejí v mnoha, ne-li ve všech tkáních. Ty se nejen obnovují (tj. vytvářejí další kmenové buňky), ale mohou se také diferencovat do potenciálně všech buněk pojivových tkání [6].

3.1.1. Scaffoldy a jejich důležité vlastnosti

TE se ve velké míře opírá o použití porézních 3D scaffoldů, které poskytují vhodné prostředí pro regeneraci tkání a orgánů. Tyto scaffoldy fungují jako šablona pro tvorbu tkáně a jsou obvykle osazeny buňkami či kombinovány s bioaktivními látkami. Scaffoldy osázené buňkami jsou buď kultivovány *in vitro* za účelem syntézy tkání, které lze poté implantovat do poraněného místa nebo jsou implantovány přímo do rány v těle, kde je vyvolána regenerace tkání nebo orgánů *in vivo*. Scaffoldy se podle jejich původu dělí na biologické, tedy získané z lidských nebo zvířecích tkání, nebo scaffoldy syntetické, vytvořené na bázi polymerů [7].

Bez ohledu na typ tkáně je při navrhování nebo určování vhodnosti scaffoldu pro použití v tkáňovém inženýrství důležitá řada klíčových aspektů:

Biokompatibilita

První důležitou vlastností scaffoldu je jeho kompatibilita s prostředím. Materiál tudíž nesmí být toxický a jeho přítomnost nesmí negativně ovlivňovat buňky. Po implantaci nesmí scaffold vyvolat protizánětlivou imunitní reakci, která by mohla negativně ovlivnit proces hojení či odmítnout implantovaný materiál. Buňky musí mít schopnost adheze na povrchu, případně jím projít a začít se množit. Takový materiál pak nazýváme cytokompatibilní [4,7].

Biodegradabilita

Cílem TE je umožnit tělu, aby jeho vlastní buňky časem nahradily scaffoldy, které nejsou určeny jako trvalé implantáty. Scaffold musí být biologicky odbouratelný, aby buňky mohly produkovat vlastní extracelulární matrix (ECM). Degradované části scaffoldů by rovněž neměly být toxické a měly by být schopny opustit tělo pomocí metabolických procesů bez zásahu do jiných orgánů. K odbourání scaffoldu by nemělo

dojít dřív, než bude tato tkáň vytvořena, ale také ani příliš pozdě, aby scaffold nebránil v růstu nové tkáně [4,7].

Mechanické vlastnosti

V ideálním případě by měl mít scaffold mechanické vlastnosti odpovídající místu, do kterého má být implantován, a z praktického hlediska musí být dostatečně pevný na to, aby umožnil chirurgickou manipulaci během implantace [7].

3.2. Biomateriály využitelné v TE

Na první konsensuální konferenci Evropské společnosti pro biomateriály v roce 1976 byl biomateriál definován jako "neživý materiál použitý ve zdravotnickém prostředku, který je určen k interakci s biologickými systémy". Současná definice však zní "materiál určený k interakci s biologickými systémy za účelem léčby, rozšíření nebo náhrady jakékoli tkáně, orgánu či funkce těla". Tato nepatrná změna definice ukazuje, jak se oblast biomateriálů vyvíjela [7]. Zatímco v minulosti byly materiály určené k implantaci navrhovány jako "bioinertní", nyní se materiálův vědci zaměřili na navrhování záměrně "bioaktivních" materiálů, které se integrují s biologickými molekulami nebo buňkami a regenerují tkáň [8].

Tabulka 1: Biomateriály v TE, přeloženo z [9]

Materiály	Výhody	Nevýhody	Příklady využití
Polymery (nylon, silikon, polyester atd.)	Odolné Snadná výroba	Malá pevnost Deformuje se	Měkké tkáně, stehy, uši, nos
Kovy (Ti a jeho slitiny, Co-Cr slitiny, Au atd.)	Tvrdé, tvárné	Může dojít ke korozi Složitá výroba	Kloubní náhrady, zubní implantáty
Keramika (kalcium fosfáty včetně hydroxyapatitu)	Velice biokompatibilní	Křehké	Zubní a ortopedické implantáty
Kompozity (degradabilní polymery a kalcium fosfáty, kostní cement)	Pevné, dělané na míru	Složitá výroba	Kostní cementy

3.2.1. Polymery (syntetické a přírodní)

Polymerní biomateriály hrají důležitou roli v celé řadě zdravotnických prostředků, diagnostických systémů a farmaceutických přípravků. V posledních několika desetiletích bylo v souvislosti se vznikem a rychlým rozvojem oboru TE a regenerativní medicíny vyvinuto obrovské množství nových polymerních biomateriálů. Tyto polymerní scaffoldy, nejčastěji vyrobené z biodegradabilních syntetických polymerů a přírodních makromolekul, hrají klíčovou roli v tkáňovém inženýrství a používají se při regeneraci v podstatě všech typů tkání [9].

Syntetické polymery

Syntetické polymery jsou biologicky odbouratelné polymery, které lze syntetizovat za kontrolovaných podmínek a které poskytují předvídatelné fyzikálně-chemické a mechanické vlastnosti, jako je rychlost degradace, pevnost v tahu a pružnost. Dále je požadováno, aby byly netoxické, jednoduše sterilizovatelné a formovatelné do různých tvarů s vhodnou morfologií pórů. V TE se pravidelně používají polymery polykaprolakton (PCL), kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) [10].

PCL je biologicky rozložitelný polymer, který se hydrolýzou vylučuje citrátovým cyklem. Jedná se o zcela rozložitelný polymer bez toxických rozkladných produktů.

PLA je biokompatibilní, biologicky odbouratelný polymer, který má tepelnou stabilitu a vhodné mechanické vlastnosti. Při použití *in vivo* bylo zjištěno, že se přímo rozkládá hydrolýzou bez použití katalyzátorů nebo enzymů [11].

PGA je nejjednodušší lineární alifatický polyester. Kvůli vysoké hladině krystalinity je nerozpustný ve vodě. Jeho použití je omezeno určitými mechanickými vlastnostmi a nedostatečnou integrací s přilehlými tkáněmi [12].

PLGA kopolymer kombinuje vlastnosti PGA a PLA. Jeho poměr složek ale není v lineární závislosti s mechanickými vlastnostmi. Platí, že čím více glykolových jednotek PLGA obsahuje, tím kratší je doba degradace. Jeho hlavní výhodou oproti ostatním syntetickým materiálům je lepší buněčná adheze a proliferace [4].

Jejich vlastnosti a využití porovnává Tabulka 2.

Tabulka 2: Syntetické polymery a jejich vlastnosti [4]

Polymer	Krystalinita	Rychlost degradace	Typické aplikace
PGA	Vysoce krystalinický	2-3 měsíce	Stehy, fixace zlomenin
L-PLA	Semikrystalinický	>2 roky	Fixace zlomenin
D,L-PLA	Amorfní	12-16 měsíců	Doprava léčiv
PLGA	Amorfní	1-6 měsíců	Stehy, ústní implantáty

Přírodní polymery

Hlavní úlohou biomateriálu je napodobit ECM, ke které se buňky ukotvují, aby vytvořily tkáň, která se sama o sobě skládá především z elastických vláken, kolagenů a integrovaných glykosaminoglykanů [5].

Nejjednodušší metodou napodobení ECM je izolace a použití přírodních polymerů, které ji tvoří. Kolagen, jakožto nejhojněji zastoupený protein v lidském těle, je jedním z nejoblíbenějších biomateriálů v oblasti TE [5].

Jiné přírodní polymery mohou v biomateriálech nabízet jiné mechanické nebo funkční vlastnosti než kolagen, což může být užitečné pro konkrétní aplikace v regenerativní medicíně nebo pro modely onemocnění TE *in vitro*. Například zatímco kolagen dodává ECM stabilitu a pevnost v tahu, jiné složky, jako je elastin, dodávají tkáni lepší elastické vlastnosti[5].

3.2.2. Keramické materiály

Díky vynikající biokompatibilitě, osteokonduktivitě a osteoinduktivitě se řada biokeramiky široce uplatňuje při opravách kostních defektů a regeneraci kostní tkáně [13]. Jedná se o polykrystalické anorganické sloučeniny, které zahrnují kovové oxidy, křemičitany, karbidy, hydridy a sulfidy [14].

Kalcium fosfátová keramika (CPC) je třída bioaktivních materiálů, které se hojně využívají pro obnovu a augmentaci kostní tkáně. Její povrchové vlastnosti podporují adhezi/proliferaci osteoblastů (tj. osteokondukci) a stimulují tvorbu nové kosti (tj.

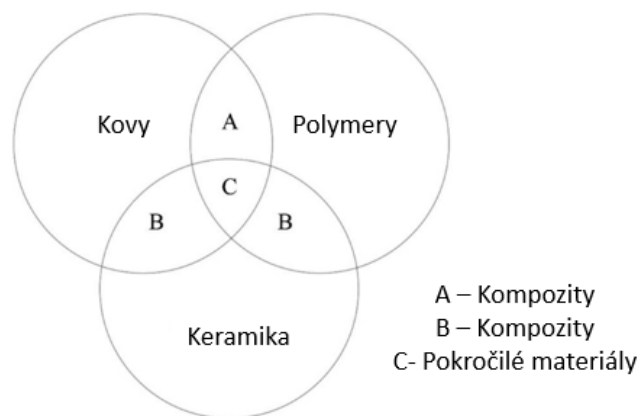
osteoindukci). Bylo prokázáno, že CPC podporuje růst kostí *in vivo* a rekrutuje stromální buňky kostní dřeně do ektopických míst, kde indukují tvorbu kostí [15].

Nejčastěji používanými CPC materiály jsou hydroxyapatit (HAP), trikalciumpfosfát, amorfni fosforečnan vápenatý a bifázický fosforečnan vápenatý. HAP, jakožto nejznámější ze skupiny CPC, se hojně využívá při regeneraci kostí, protože se svým složením nejvíce blíží kostnímu minerálu [15].

Celokeramické materiály jsou křehké a nehodí se k přenášení zatížení, a tudíž je vhodné je kombinovat se syntetickými či přírodními polymery.

3.3. Kompozitní materiály a kostní cementy

Kompozitní materiály se skládají ze dvou nebo více materiálů, jejichž fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti se značně liší viz Obr. 2. Charakteristické vlastnosti těchto kompozitů jsou výsledkem jednotlivých vlastností jejich složek a jejich příslušných objemových podílů a uspořádání v materiálovém systému [16].

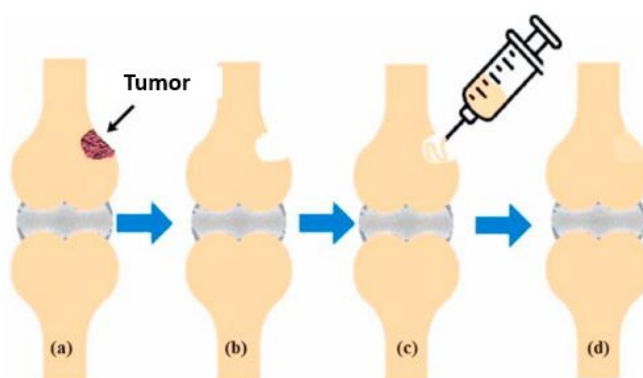


Obr. 2: Kombinace jednotlivých biomateriálů, přeloženo z [16]

Kompozitní biomateriály patří mezi nejpoužívanější biomateriály, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, díky svým vynikajícím vlastnostem. Tyto materiály lze snadno vyrobit tak, aby měly požadované funkční vlastnosti. Specifické vlastnosti kompozitů lze s vysokou přesností optimalizovat pomocí volby různých parametrů, jako jsou objemové poměry složek, velikost částic či vláken, geometrie, orientace a distribuce, typ matrice atd. V důsledku toho mají kompozitní materiály konstrukční flexibilitu a lze je snadno přizpůsobit tak, aby měly téměř jakoukoli požadovanou kombinaci vlastností, na rozdíl od kovových, polymerních a keramických biomateriálů [16].

Kostní cementy

Kostní cementy vznikají spojením dvou materiálů. Přesněji je lze definovat jako směs určitého druhu prášku a tekuté fáze, které po smíchání nejen ztvrdnou, ale po vpravení do těla se v něm pevně uloží. Tento materiál má určitou pružnost, kterou lze použít k fixaci materiálu v živém těle v místě zlomeniny dle potřeby. Dalším důležitým aspektem těchto biomateriálů je poskytování mechanické podpory tělu. Pokud jde o mechanickou podporu, je velmi důležité si uvědomit, že tyto cementové materiály mají různé úrovně mechanické pevnosti. Celý výzkum v této oblasti se snaží vytvořit kostní cementy s lepšími vlastnostmi, nejen kvůli delší životnosti, ale zároveň i větší mechanické pevnosti. Dalšími požadavky jsou pak i nutnost nulového zánětlivého účinku po implantaci do těla, krátkou dobu tuhnutí *in-situ* a co nejmenší pooperační virovou nebo bakteriální infekci. Průběh implantace je zobrazen v schématu na Obr. 3 [17].



Obr. 3: Idealizovaný průběh léčby tumoru kosti pomocí kostního cementu [17]

Příkladem jsou kalcium fosfátové kostní cementy (CPBC). Vzhledem k vlastnostem CPBC, jako je vstříkovatelnost a schopnost ustálení v podmínkách *in vivo*, nabízejí tyto biomateriály možnost minimálně invazivních zákroků, čímž se eliminuje nutnost otevřené operace. Jejich nevýhodami jsou např. špatná degradabilita, nedostatečná makroporozita či horší mechanické vlastnosti [18].

3.4. Kolagen v tkáňovém inženýrství

Kolagen typu I, zastupující 90 % kolagenů v těle, je nejrozšířenější bílkovinou u savců. Dodává mechanickou stabilitu, pevnost a houževnatost celé řadě tkání od šlach a vazů až po kůži, rohovku, kost a dentin. Tyto tkáně mají zcela odlišné mechanické požadavky. Některé vyžadují vyšší pružnost či schopnost uchovávat mechanickou

energii, jiné zas tuhost a pevnost. To vše ukazuje všestrannost kolagenu jako stavebního materiálu [19].

3.4.1. Struktura

Kolagen je charakteristický svojí trojřetězcovou helikální strukturou. Skládá se ze tří kolagenových polypeptidových makromolekul, nazývaných α -řetězce, které se stáčíjí do pravotočivé superšroubovice. Každý z těchto řetězců obsahuje přibližně 1000 aminokyselinových zbytků (AMK) a jeho rozměr odpovídá délce 280 nm. Příkladem zastoupení molekul v kolagenu uvádí Tabulka 3 [20]. Tabulka 3: Průměrné zastoupení aminokyselin v kolagenu z hovězí kůže [21]

Aminokyselina	Hodnota	Aminokyselina	Hodnota
Hydroxyprolin	116	Methionin	6
Kyselina asparagová	44	Isoleucin	10
Threonin	15	Leucin	24
Serin	36	Tyrosin	2
Kyselina glutanová	70	Fenylalanin	12
Prolin	122	Hydroxylysin	6
Glycin	321	Lysin	30
Alanin	105	Histidin	4
Valin	20	Arginin	47

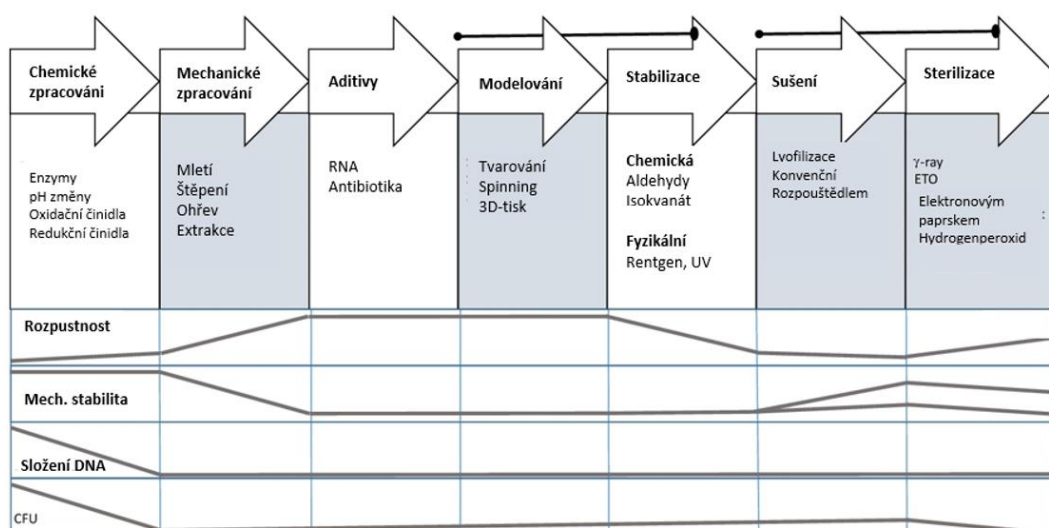
Voda plní elementární funkci při zachování fyzikálních vlastností kolagenu. Její podíl na celkové hmotnosti tvoří přibližně 10-20 %. V málo hydratovaném či dehydratovaném stavu jsou polypeptidové řetězce omezeny ve svém pohybu. S rostoucí hydratací se tyto řetězce naopak postupně uvolňují [21].

Glycinové zbytky se díky svým menším rozměrům nachází uvnitř spirály. Tím umožňují semknutí tří α -řetězců do konečného kolagenového superhelixu. Prolin svou kruhovou strukturou vytváří levotočivou konformaci všech α -řetězců s třemi AMK zbytky na otáčku. Polypeptidový řetězec je tvořen jednotkami tripeptidů ve tvaru (Gly-X-Y)_n, kde X a Y jsou další AMK, nejčastěji prolin a hydroxyprolin. Část kolagenové molekuly tvořená z AMK s nízkou molární hmotností je považována za krystalickou, vysoce orientovanou. Naopak je tomu u oblastí s vyšší koncentrací molárních polárních AMK, které nemají přísně uspořádanou stavbu, tudíž je považujeme jako méně orientované až amorfní [20].

3.4.2. Zpracování

Kolagen se používá k výrobě kolagenových roztoků, porézních houbiček, nití pro chirurgické a stomatologické účely nebo matric pro buněčné kultury. Tkáně bohaté na kolagen, jako jsou kůže a šlachy savců, se intenzivně zpracovávají fyzikálními a chemickými prostředky [22].

Technologie zpracování tkání jsou podle potřeby uspořádány v daném pořadí, kterým lze docílit výroby materiálu s požadovanými vlastnostmi. Těmi jsou např. pevnost, rozpustnost, stabilita vůči teplotě a enzymatické degradaci či buněčná odezva viz Obr. 4 [22].



Obr. 4: Fáze zpracovávání kolagenu a jejich vliv na vlastnosti, přeloženo z [22]

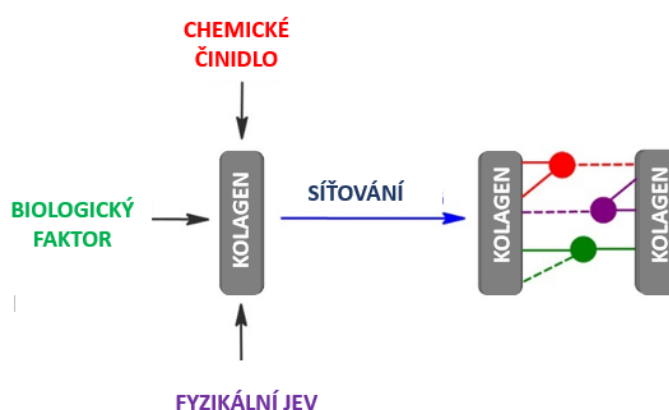
Hlavním zdrojem kolagenu jsou kosti a kůže hovězího dobytka, jako je kráva, vůl, buvol a skot. Hydrolyzovaný hovězí kolagen získaný z různých tkání vykazuje antioxidační a antihypertenzní aktivitu [23].

Dalším zdrojem kolagenu jsou také vepřové kosti a kůže, ale také různé tkáně ryb, medúz a dalších živočichů, zejména savců. Kolagen získaný z těchto zdrojů je podobný kolagenu lidskému. Neměl by vyvolat žádnou alergickou reakci, a tudíž je považován za bezpečný [23].

Přirozený kolagen má obvykle nízkou a někdy i nulovou rozpustnost ve vodném prostředí. Její stupeň závisí na zralosti tkáně. U starších tkání lze kolagen izolovat až po fyzikálním ošetření. Odolnost vůči rozpouštění je dána jeho strukturou, stabilizovanými mezimolekulárními interakcemi a síťováním [21].

3.4.3. Síťování

Vzhledem k nízké odolnosti vůči vnějším faktorům, jako je vysoká teplota nebo přítomnost enzymů, vyžaduje struktura kolagenu po izolaci síťování. Existují fyzikální a chemické metody zlepšení jeho struktury. Je všeobecně známo, že tento proces vyžaduje chemické činidlo nebo fyzikální jev, který vyvolá vznik stabilních vnitromolekulárních nebo mezimolekulárních chemických vazeb (Obr. 5). Chemická činidla, která lze v tomto procesu použít, by měla interagovat s kolagenem prostřednictvím funkční skupiny (amidické nebo karboxylové), což vede k tvorbě příčných vazeb mezi jednotlivými molekulami kolagenu [24].



Obr. 5: Síťování kolagenu, přeloženo z [24]

Většina intra/intermolekulárních příčných vazeb v kolagenu se nachází v telopeptidové oblasti. Jednotlivé α -řetězce kolagenu lze polymerizovat buď fyziologickým síťováním nebo nefyziologickými (umělými) síťovacími činidly (aldehydy). Síťování navíc umožňuje snížit antigenicitu kolagenu a u některých forem snižuje jeho kalcifikaci [21].

3.5. Degradace - simulace tělního prostředí

Důvodem simulace tělního prostředí je snaha pozorovat chování materiálu v prostředí, které ideálně odpovídá skutečným podmínkám, a to jak už z pohledu biokompatibility a biodegradability, tak i sledování změn jeho mechanických a strukturních vlastností.

Sledovat chování materiálu lze v prostředí *in vivo*, *in vitro* a *ex vivo*. Ideální možností je *in vivo*. To je ale kvůli etickým či finančním důvodům občas neproveditelné, a v tu chvíli se studie přiklání k simulování tělních podmínek.

Při navrhování takového experimentu je třeba určit jaká média k simulaci použít, jakým podmínkám je vystavit, a které vlastnosti pozorovat. Snahou je pak zjistit, zda je možné výsledky přenést na *in vivo* model [25].

Důležitou vlastností scaffoldů je možnost řídit jejich degradaci *in vivo* a *in vitro*. V *in vivo* prostředí by měla být rychlost degradace ideálně přizpůsobena tak, aby byla přímo úměrná rychlosti vzniku nové regenerované tkáně. Rychlost degradace by měla odpovídat rychlosti buněčného růstu při zachování jejich životaschopnosti [26].

3.5.1. Vlastnosti, které v něm pozorujeme – degradace a její vyhodnocování

Po implantaci mohou biodegradabilní polymery v důsledku degradace podléhat různým změnám svých fyzikálně-chemických vlastností. Tyto změny mohou ohrozit jejich požadovanou funkci a vyvolat nežádoucí reakci tkáně. Proto je důležité charakterizovat a kvantifikovat změny, k nimž dochází v biomateriálech v různých fázích degradace [2].

Způsoby, jakými degradaci měřit je několik. Mezi ně patří:

- Absorpce vody a hmotnostní úbytek
- Molekulární hmotnost
- Krystalinita
- Morfologie
- Chemické reakce na povrchu
- Mechanické vlastnosti

3.5.2. Acelulární média

K nejčastěji používaným acelulárním, tedy nebuněčným, médiím patří následující roztoky.

SBF

Simulovaná tělní tekutina (SBF) je acelulární, přesycený roztok fosforečnanu vápenatého s iontovým složením téměř stejným jako anorganická složka lidské krevní plazmy a obecně pufovaný za fyziologických podmínek (pH 7,4 a 36,5 °C). Různé přípravky SBF se používají již desítky let k testování korozního a kostního chování, bioaktivity, uvolňování iontů, rychlosti bobtnání a biodegradace biomateriálů a ukládání fosforečnanů vápníku, zejména hydroxyapatitu, na různé druhy substrátů biomimetickými a elektrochemickými metodami. Prvním, kdo použil SBF ve svých experimentech byl japonský vědec Tadashi Kokubo v roce 1991 při sledování změn povrchu bioaktivní sklokeramiky. I když se dnes SBF používá ke sledování degradace, byl původně vyvinutý jako způsob nahrazení *in vivo* testů [27,28].

PBS

Fosfátový pufovaný roztok (PBS) je netoxický roztok používaný v mnoha biologických laboratořích. Na rozdíl od vody zabraňuje poškození buněk v důsledku osmózy. Funkce pufru spočívá v udržování konstantního pH. Koncentrace iontů a osmolarita odpovídá tělnímu prostředí [29,30].

Fyziologický roztok

Fyziologický roztok je 0,9% vodný roztok chloridu sodného se stejnou osmolaritou jako krevní plasma. Existuje několik různých druhů tohoto roztoku.

Ringerův roztok

Jedním z fyziologických roztoků je například Ringerův laktátový roztok, což je typ izotonické krystaloidní tekutiny, která se dále klasifikuje jako vyvážený nebo pufovaný roztok používaný k náhradě tekutin. Obsah Ringerova laktátu zahrnuje sodík, chlorid, draslík, vápník a laktát ve formě mléčnanu sodného, smíchaného do roztoku [31].

Hankův roztok

Hankův roztok je další ze skupiny látek simulující tělní prostředí, který se používá hlavně k vyrovnávání podmínek v buněčném kultivačním médiu a pro udržení hladiny fyziologického pH roztoku (7-7,4). Kvůli své slabé reaktivitě s okolím a malou koncentrací solí se Hankův roztok používá zejména v atmosférických podmínkách, ne při 5% obsahu CO₂, jak tomu bývá u jiných roztoků [32].

3.5.3. Buněčná média a kultury - *in vitro*

Buněčná média, jak už název napovídá, jsou média, která jsou určena pro kultivaci buněk. Tato média jsou komplexnější než roztoky solí z kapitoly 3.5.2. Jejich funkcí ale není jen kultivace buněk. Využití také najdou v simulování tělního prostředí, ve kterém lze sledovat degradaci zkoušených materiálů. Kultivační média se využívají především pro kultivaci různých typů buněk a jsou využívána zejména při testech biokompatibility nebo cytotoxicity, při kterých jsou buňky kultivovány na testovaných materiálech a je hodnocena jejich reakce (např. v porovnání s pozitivní nebo negativní kontrolou). Základní požadavky na prostředí pro buňky pro optimální růst jsou: řízená teplota, substrát pro uchycení buněk, vhodné růstové médium, správné pH a osmolalita [4,33].

Buňky lze dělit podle jejich původu, a to na liniové buňky a primokultury. Další kategorií, kterou lze buňky rozdělit je typ kultivace: adherované a v suspenzi [4,33].

Pro kultivaci buněk při klinických studiích jsou důležité kmenové buňky, a to konkrétně mezenchymální kmenové buňky. Produkují buňky mezodermového původu. Do rozsahu produkce spadají buňky podpůrných tkání, svalovina, cévy, krevní buňky, ledviny, pohlavní orgány aj. Také jsou schopny produkovat široké spektrum buněčných typů, jako jsou chondrocyty, osteocyty, adipocyty, vazivové elementy atd [4].

EMEM

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) patří mezi první široce používaná média vynalezena Harrym Eaglem. Obsahem jsou vyvážený roztok soli, neesenciální aminokyseliny a pyruvát sodíku. Dalším prvkem je hydrogenuhličitan sodný (1500 mg/l) se sníženou koncentrací pro použití v atmosféře s 5 % koncentrací CO₂, jehož funkcí je udržení vhodného pH. EMEM je obvykle obohaceno o další chemické sloučeniny nebo séra, takže je vhodné pro širokou škálu savčích buněk [33].

DMEM

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) má téměř dvakrát vyšší koncentraci aminokyselin a čtyřikrát vyšší množství vitaminů, dusičnanu železitého, pyruvátu sodného a doplňkových aminokyselin než EMEM. Původní DMEM obsahoval 1 000 mg/l glukózy a byl poprvé uveden pro kultivaci embryonálních myších buněk. Další varianta s 4500 mg/l glukózy se ukázala jako optimální pro kultivaci různých druhů buněk. DMEM je základní médium a neobsahuje žádné proteiny ani látky podporující růst [33].

3.5.4. Prostředí *in vivo*

Termín *in vivo* označuje lékařský test, experiment nebo postup, který se provádí na živém organismu, například na laboratorním zvířeti či na člověku. Důvodem, proč je sledování materiálu nejvhodnější v tomto prostředí je to, že právě na toto prostředí je výroba materiálů zaměřena. Jedná se většinou o poslední fázi testování, kdy materiál už v předchozích experimentech *in vitro* vykazoval kvalitní výsledky, a to nejen z pohledu mechanických nebo strukturních vlastností, ale i z pohledu biologického hodnocení.

Příkladem vhodných strukturních vlastností jsou nutná vaskularizace systému, nebo vlastnosti umožňující případnou infiltraci buněk z okolí. Kvůli těmto parametrům mnoho typů scaffoldů s dobrými mechanickými výsledky *in vitro* po implantaci selhalo. Je tedy nutné najít vhodnou rovnováhu mezi mechanickými vlastnostmi a vlastnostmi podporujícími inkorporaci materiálu *in vivo* [4].

Při testování na zvířatech je důležité na modelech pozorovat následující parametry:

- Akutní, subakutní a chronická toxicita
- Účinky na reprodukční funkce včetně teratogenity
- Kancerogenita
- Mutagenita
- Speciální toxikologické testy

3.5.5. *Ex vivo*

Ex vivo v překladu znamená "mimo živý organismus". Ve vědě se *ex vivo* vztahuje k experimentům nebo měřením prováděným ve tkáni nebo na tkáni organismu ve vnějším prostředí s minimální změnou přirozených podmínek. Existuje mnoho pádných důvodů pro obnovení lidských tkání *ex vivo*. Úspěšné modely tkání *ex vivo* umožňují studium dynamiky a mechaniky buněčné diferenciaci a vývoje orgánů. Funkční *ex vivo* orgány mohou být užitečné v klinickém prostředí jako mimotělní orgány pro transplantační a genovou terapii. Dále je lze využívat k farmakologickým studiím.[35]

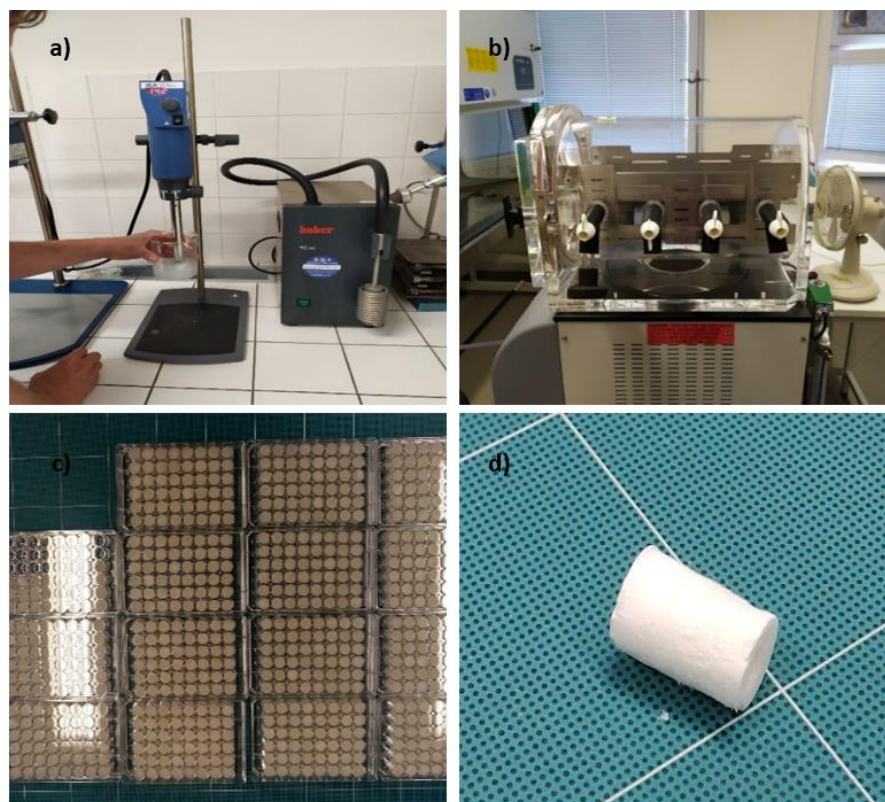
Účelem *ex vivo* studií je snížení počtu pokusů na zvířatech a zároveň se přiblížit co nejvíce *in vivo* modelu. *Ex vivo* modely musí být stabilní, bez ztráty fyziologických vlastností, životaschopnosti a metabolické aktivity po příslušnou dobu kultivace. Kromě toho by měl především sledovat mechanické a strukturní vlastnosti[36].

Příkladem takového experimentu je studie Przekora a kol., která se zabývala implantací chitosinu, kurdlanu a HAP do trabekulární lidské kosti *ex vivo*, při které pozorovali oseointegraci materiálu s kostí. V rámci této studie bylo prokázáno, že testovaný biomateriál umožňuje tvorbu vazby s kostními implantáty díky osteoblastům, které mají schopnost produkovat kostní ECM. Důležitým zjištěním bylo, že pomocí pozorování metodou CLSM bylo prokázáno, že lidské kostní implantáty mohou zůstat živé po dlouhé časové období (minimálně 50 dní). Lze tedy tvrdit, že *ex vivo* model je vhodnou metodou pro testování oseointegrace biomateriálů [37].

4. Experimentální část

4.1. Příprava kolagenových scaffoldů

Pro přípravu scaffoldů byl použit kolagen typu I (VUP Medical, Brno, Česká republika). Kolagen se nechal 1 h bobtnat v deionizované vodě při pokojové teplotě (RT, cca 20 °C), dále byl homogenizován pomocí dezintegrátoru (10 000 ot/min, 10 min) a poté byl ponechán 60 min při RT. Po této prodlevě byla disperze dále homogenizována (10 000 ot/min, 1 min) a umístěna do válcových nádob o průměru 12 mm (48-jamkový kultivační plast, CELLSTAR, Cat.-No. 677 180, Greiner Bio-One GmbH, Rakousko). Konečná koncentrace vodní disperze kolagenu byla 4 % hm. Nádoby s kolagenovou disperzí byly zmrazeny při teplotě -80 °C (suchý led) po dobu 3 hodin a poté lyofilizovány (BenchTop 4KZL, VirTis, Los Angeles, CA, USA). Zesíťování kolagenových scaffoldů bylo provedeno pomocí N-(3-dimethylamino propyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) v poměru EDC/NHS 4/1 (hmotnost/hmotnost). EDC a NHS byly rozpuštěny v 95 % hm. ethanolu. EDC a NHS byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA. Scaffoldy byly vystaveny síťovacímu roztoku po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Poté byl použit 0,1 M Na₂HPO₄ (45 min) pro dvojí promytí scaffoldů. Poslední fáze přípravy zahrnovala oplachování v deionizované vodě (30 min), zmrazení (-30 °C) a lyofilizaci. Vzorčky byly sterilizovány gama zářením při standardní dávce 25 kGy (Bioster, ČR). Přístroje použité k přípravě a finální produkt lze vidět na Obr. 6.



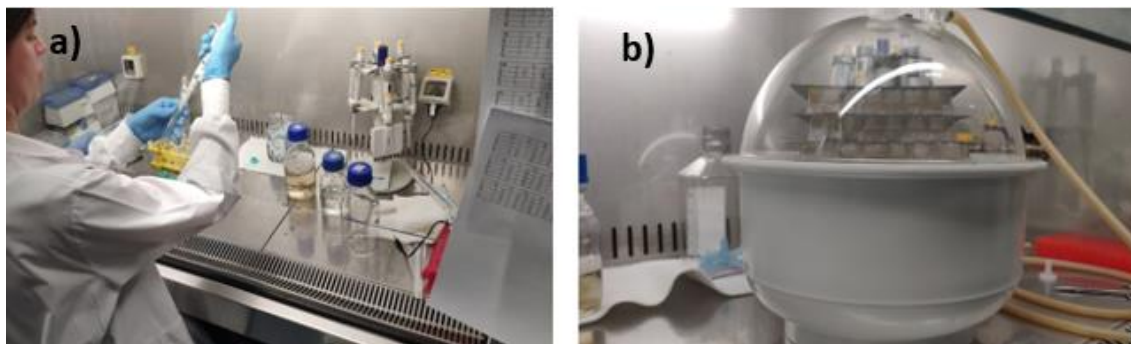
Obr. 6: a) homogenizace nabobtnaného kolagenu b) lyofilizátor c) scaffoldy v kultivačním platu, -d) výsledný scaffold

4.2. Metodika *in vitro*

Jako *in vitro* buněčný model reálného tělního prostředí byly zvoleny lidské dermální fibroblasty (DF). Ty jsou odpovědné jak za produkci mezibuněčné hmoty pojiva, tak za syntézu široké palety degradačních enzymů, které mohou ovlivňovat degradace biomateriálů implantovaných do tělního prostředí.

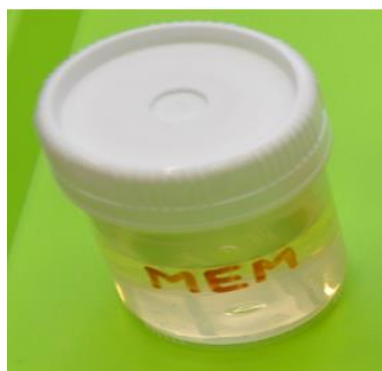
DF byly izolovány, kultivovány a pasážovány dle standardních postupů a celý níže popsaný experiment probíhal ve sterilních podmínkách laminárního boxu. V den experimentu byly vzorky kolagenových válečků (dále jen vzorky) hydratovány v kultivačním médiu a pod vakuem po dobu 2 hodin. Mezitím byla připravena nasazovací suspenze DF. Po hydrataci byly vzorky vloženy do nového 24-jamkového kultivačního panelu (Techno Plastic Products AG) a DF do nich byly nasazeny v hustotě 370 000 buněk / vzorek v objemu 200 μL (Obr. 7). Těchto 200 μL bylo na vzorek vždy nanášeno po částech tak, aby bylo zajištěno úplné vsáknutí buněčné suspenze do vzorku, a tím zajištěna distribuce buněk v celém objemu vzorku. Následně byly vzorky s nasazenými buňkami vloženy na 2 h do kultivačního inkubátoru s 37 °C a 5% CO_2 za účelem adheze buněk k vnitřním strukturám vzorků. Po 2 hodinách bylo ke vzorkům přidáno 1 mL

kultivačního média a takto byly vzorky kultivovány v podmínkách 37 °C a 5% CO₂ po dobu 7, 14 a 21 dní. V den ukončení kultivace byly vzorky převezeny do biomechanické laboratoře a podrobeny mechanickým zkouškám. Složení kultivačního média DMEM (Thermo Fisher Scientific), 10% fetální bovinní sérum (FBS) (Thermo Fisher Scientific), penicilin (100 U/ml)/streptomycin (0,1 mg/ml) (Biochrom), 0,5% L-glutamin (Biosera) a 1% ne-esenciální aminokyseliny (Biosera). Pro každý časový úsek bylo použito 10-11 vzorků ($n=10-11$).



Obr. 7: a) nasazování DF do vzorků b) vakuování

Cílem této práce je i zjištění vlivu buněk na degradaci vzorků, a tak byla zkoumáno ještě jedno prostředí (MEM), které bylo připraveno stejným způsobem, jako prostředí předchozí. Rozdílem pak bylo nenasazení DF a také ponoření do jiného typu nádob, viz Obr. 8. Vzorky byly kultivovány v podmínkách 37 °C a 5% CO₂ po dobu 1, 7, 14 a 21 dní a také 1h (*hydratovaný stav*). Médium bylo kompletně měněno každý třetí den a po celou dobu experimentu byla rutinně monitorována stabilní hladina pH. Pro každý časový úsek v této skupině bylo použito 7-10 vzorků ($n=7-10$). Část experimentu s použitím DF byla provedena na pracovišti Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy za asistence Ing. Lucie Vištejnové, Ph.D. Část experimentu se samotným MEM na pracovišti Ústavu struktury a mechaniky hornin AV ČR.

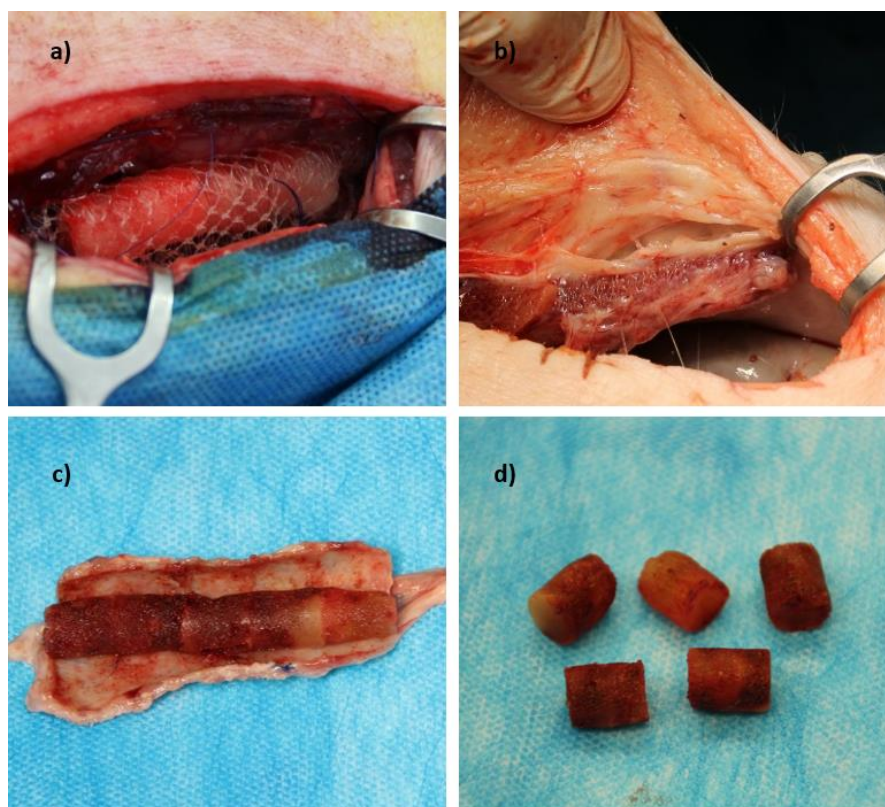


Obr. 8: Kolagenové vzorky ponořené v simulovaném tělním prostředí, skupina MEM

4.3. Metodika *in vivo*

Pro pozorování chování kolagenních scaffoldů v *in vivo* prostředí byly vzorky po pěti či šesti kusech svázaný sterilní chirurgickou nití a sešity dohromady do kýlní sítky. Pro rozpoznání jednotlivých vzorků určených k zjišťování hmotnostních úbytků bylo pořadí určeno pomocí dvojitého uzlu, který značil začátek řady daných pěti/šesti vzorků. Ty byly za suchého stavu předem zváženy a každému z nich bylo přiřazeno číslo k identifikaci.

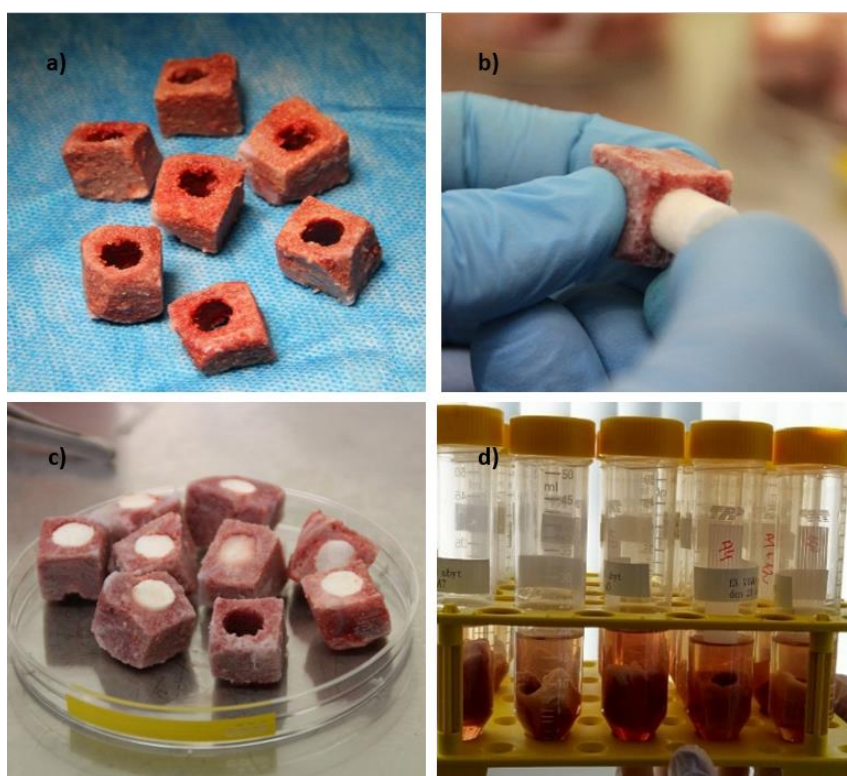
Skupiny vzorků byly následně implantovány do peritonea šesti experimentálních zvířat (prase, *Sus scrofa domesticus*, 25 kg, povolení etické komise ID MSMT-33799/2021-4). Do každého z nich byly implantovány dvě skupiny vzorků. Jedna pro hmotnostní úbytky, druhá pro mechanické vlastnosti. Vzorky byly vystaveny tomuto prostředí po dobu 7, 14 a 21 dní, načež byly explantovány z již mrtvého zvířete. Během času stráveného v *in vivo* prostředí došlo ke srůstu scaffoldů s tkání, kterou bylo zapotřebí od vzorků pečlivě odstranit. V den explantace byly vzorky převezeny do biomechanické laboratoře a podrobeny mechanickým zkouškám. Pro každý časový úsek bylo použito 7-10 vzorků ($n=7-10$).



Obr. 9: a) čerstvě implantované vzorky b) vzorek připravený k explantaci c-d) explantované vzorky

4.4. Metodika *ex vivo*

Po dokončení *in vivo* části experimentu byly z experimentálních zvířat vyjmuty obě stehenní kosti (femury). Kosti byly důkladně očištěny od zbylého svalstva i chrupavek. Následně byly nařezány sterilní chirurgickou pilou na kostičky o rozměrech podobných výšce scaffoldů a poté do nich byly vyvrtány díry o průměru odpovídajícím průměrům scaffoldů. Ty pak byly vloženy do připravených kostiček a vystaveny kultivačnímu médiu v plastových nádobách a inkubovány za teploty 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 7, 14 a 21 dní. Médium bylo kompletně měněno každý třetí den. Počet zkoumaných vzorků pro každý časový úsek byl 9-10 ($n=9-10$). Tato část experimentu společně s částí *in vivo* byla provedena na pracovišti Biomedicínského centra, Lékařské fakulty v Plzni UK za asistence Ing. Lucie Vištejnové, Ph.D.

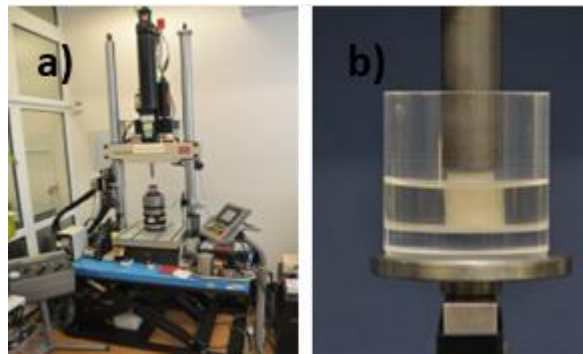


Obr. 10: a) nařezané a navrtané části femuru b) nasazení scaffoldů do kostiček c) scaffoldy v kostičkách d) vzorky vystavené kultivačnímu médiu

4.5. Mechanické zkoušky

Zkouška mechanických vlastností probíhala v laboratoři mechanických zkoušek za asistence Ing. Radka Sedláčka, Ph.D. podle normy ČSN ISO 13314 (Mechanické zkoušení kovů – Zkoušení tváritelnosti – Zkouška poréznych a pěnových kovů tlakem).

Zkouška tlakem se prováděla za použití zkušebního stroje (MTS Mini Bionix, MTS, Minnesota, USA) s konstantní rychlostí posuvu zatěžovacího prvku. Tlakové smluvní napětí σ a stlačení ε se určuje z aplikované zatěžující síly F a změny výšky zkušební vzorku pro zkoušku tlakem.



Obr. 11: a) zkušební stroj MTS Mini Bionix b) zatěžování vzorek vystavený médiu

Rozměry vzorku byly změřeny pomocí mikrometru vždy po třech hodnotách pro průměr a třech pro výšku. Výsledný rozměr byl pak roven aritmetickému průměru tří změřených hodnot. Veškeré výsledky byly zaznamenány do Excelu a ke každému poškozenému vzorku byl zaznamenán přesnější popis jeho nedostatků (prohloubení, trubkovitý tvar a další).

Po naměření celé skupiny vzorků ($n=9$) byly vzorky hromadně fotograficky zdokumentovány a jednotlivě podrobeny mechanické zkoušce. Vzorek byl vložen do menší plastové válcové nádoby naplněné médiem, kterému byl vzorek vystaven po celou předchozí dobu viz Obr. 11. Hladina média dosahovala výšky těsně pod horní okraj testovaného vzorku. Osa vzorku musí být shodná s osou horní a spodní tlakové desky. Rychlost posuvu zatěžovacího prvku při tlakové zkoušce byla konstantní a odpovídala 3,9 mm/min.

Ze zkoušky prvního vzorku, pokud možno toho co nejvíce poškozeného, byl stanoven počátek hystereze při 70 % stabilní hladiny napětí a bod zvratu při 20 % stabilní hladiny. Zatěžování bylo ukončeno při dosažení 50 % stlačení ε .

Ze záznamu testovacího systému tlakové zkoušky byla získána data pro zatěžující sílu F , axiální posuv l a čas t .

Data byla zpracována pomocí programu Matlab (R2021a, The MathWorks, Inc., MA, USA). Cílem bylo získat graf závislosti tlakového napětí na stlačení a vyhodnotit z něj

elastický gradient E , stabilní hladinu napětí σ_{pl} , absorbovanou energii W a účinnost absorbování energie We .

Napětí v tlaku σ je určeno podle vzorce:

$$\sigma = \frac{F}{S_0} \quad [MPa] \quad 1)$$

kde S_0 je počáteční průřez vzorku spočítaná pomocí průměru vzorku získaného z měření, jak je uvedeno dříve v této kapitole.

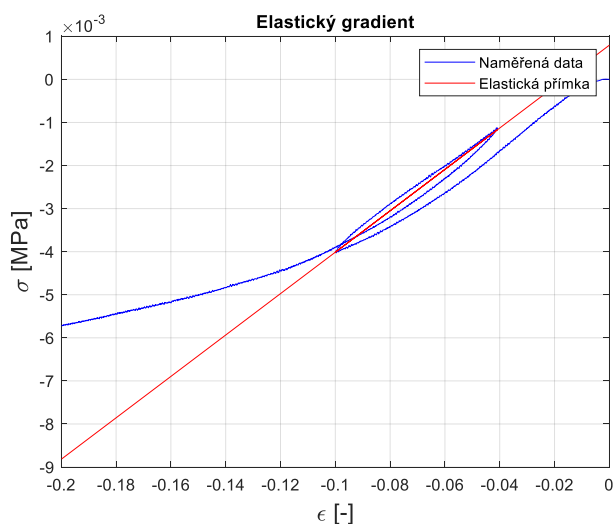
Stlačení ε je definováno podle vztahu:

$$\varepsilon = \frac{h - h_0}{h_0} \quad [-] \quad 2)$$

kde h_0 je počáteční výška vzorku a zároveň tedy počáteční místo zkoušky v její vynulované hodnotě. Hodnota h je pak průběžná výška vzorku během zkoušky.

Elastický gradient E

Elastický gradient vyjadřuje schopnost materiálu se pružně deformovat. Tato pružnost je závislá na poréznosti materiálu a v průběhu zatěžování se mění.



Obr. 12: Graf vyhodnocující elastický gradient, směrnice červené křivky odpovídá elastickému gradientu

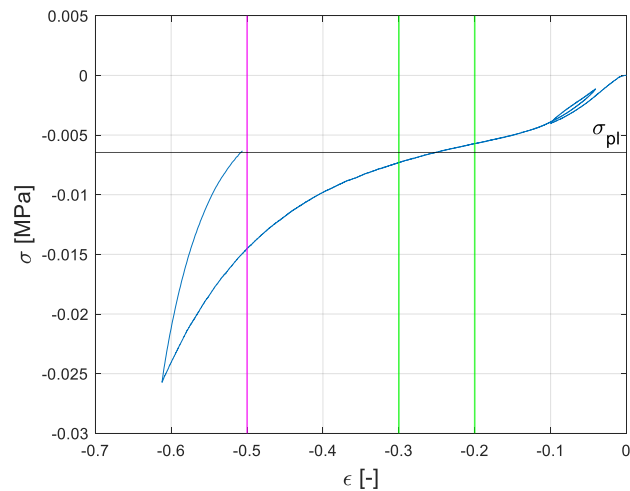
Její hodnota se získává pomocí hysterezní křivky, která vzniká při odlehčení v 70 % stabilního napětí a opakovaném zatížení v bodu zvratu 20 %. Právě těmito body pak proložíme směrnici sečny ve tvaru lineární přímky:

$$y = a \cdot x + b \quad 3)$$

kde parametr a reprezentuje elastický gradient.

Stabilní hladina napětí σ_{pl}

Jedná se o aritmetický průměr odečtených napětí v 0,1 % intervalech deformace nebo menších mezi 20 % a 30 % stlačení.

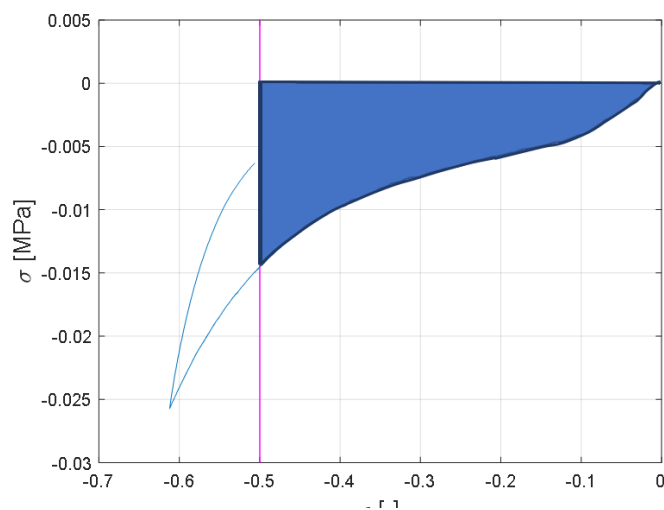


Obr. 13: Graf závislosti napětí na deformaci, černá čára vyznačuje stabilní hladinu napětí σ_{pl} , růžová konec stabilní hladiny na 50 % stlačení

Absorbovaná energie W

Plocha pod křivkou napětí-deformace až do 50 % deformace vyjádřenou vztahem:

$$W = \frac{1}{100} \int_0^{\epsilon_{50}} \sigma \cdot d\epsilon \quad \left[\frac{MJ}{m^3} \right] \quad 4)$$



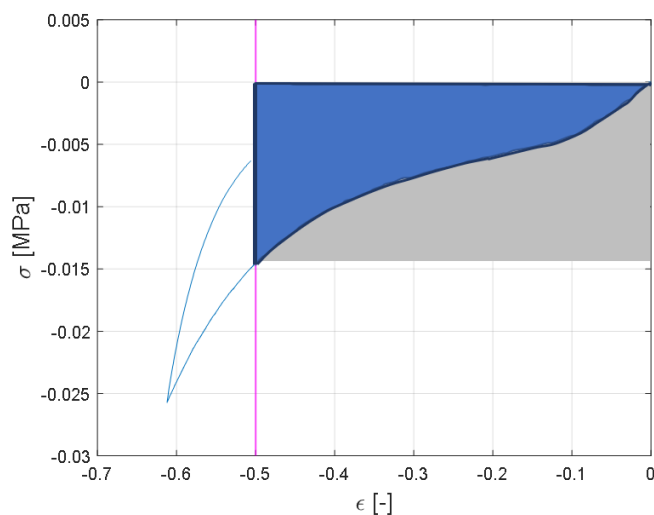
Obr. 14: Graf závislosti napětí na deformaci pro určení W , modrá plocha znázorňuje její hodnotu

Je tím vyjádřena energie vztažená na objem tělesa, kterou materiál absorbuje při zatěžování do 50 % deformace.

Účinnost absorbování energie We

Absorbovaná energie dělená součinem maximálního napětí v tlaku uvnitř rozsahu deformace a velikosti odpovídající deformace definována vztahem:

$$We = \frac{W}{\sigma_{max} \cdot \epsilon_{50}} \cdot 100 \quad [\%] \quad 5)$$



Obr. 15: Graf závislosti napětí na deformaci pro určení We , poměr modré plochy ku obdélníku (šedá + modrá) znázorňuje její velikost

Jedná se o podíl modré a šedé plochy, kde modrá reprezentuje absorbovanou energii W a šedá plochu oblasti do maximálního napětí. Fyzikálně lze We definovat jako potenciál materiálu absorbovat energii z celkového objemu.

4.6. Hmotnostní úbytky

Dalším způsobem pozorování vlivu simulovaných tělních prostředí na vzorky a jejich degradaci je zjišťování hmotnostních úbytků, a to podle vztahu:

$$D = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \cdot 100 \quad [\%] \quad 6)$$

kde m_0 reprezentuje hmotnost vzorku v suchém stavu před degradací a m_t hmotnost v suchém stavu po degradaci.

Vzorky byly váženy na pětimístné analytické váze XSE 105 DualRange (METTLER TOLEDO, USA). Každá skupina obsahovala 10 vzorků ($n=10$).

4.7. Obrazová a mikro-CT analýza

V této části je zkoumána vnitřní struktura scaffoldů, a to pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a micro-CT analýzy. Vzorky pro SEM byly před samotnou analýzou vysušeny pomocí lyofilizace. Pro SEM snímkování byly vzorky řezu jednotlivými scaffoldy pomocí uhlíkového terče adjustovány na hliníkový stab a pokryty v atmosféře Ar vrstvou Pt na naprašovače Leica EM ACE600 (Specion s.r.o., ČR). Vzhledem k větší topografii některých řezů byla zvolena shodná tloušťka pokryvu Pt 15nm. SEM snímky byly pořízeny v režimu vysokého vakua na skenovacím elektronovém mikroskopu STEM Apreo S LoVac (ThermoFisher Scientific, USA), zobrazení na ETD detektoru (Everhalt-Thorney detektor) v sekundárních elektronech za použití standard use case, ve zvětšeních 100x – 10 000x. Náhledy celých řezů byly nasnímány a sesazeny s použitím programu Maps 3.13. (ThermoFisher Scientific, USA).

Zkoumány byly vzorky před degradací, tedy scaffoldy v suchém stavu, a vzorky po 21 dnech degradace. Pro každé zkoumané médium bylo pořízeno několik snímků, každý při jiném měřítku (10 μm - 1 mm). Porovnávány pak byly mezi sebou všechny snímky různých médií ve stejném měřítku. Cílem bylo pozorovat rozdíly mezi porozitou, velikostí pórů, ale také i příčiny změn, které nastaly během degradace jako např. usazování látek na vnitřní povrchy, díky kterému mohlo dojít k nárůstu hmotnosti. Toto porovnání je však omezeno na interpretaci pozorovatele, a tudíž lze zpochybnit jeho směřodatnost.

Mikro-CT hodnocení struktury vzorků tkáňových nosičů bylo provedeno pomocí přístroje SkyScan 1272 (Bruker micro-CT, Belgie). Vzorek byl v suchém stavu umístěn do plastové zkumavky, která byla uložena na nosič vzorku a umístěna do skenovací komory. Po pilotních skenech a rekonstrukcích byly zvoleny skenovací parametry, které byly pro následné skenování využity (pixel size 7 μm , source voltage 60 kV, source current 166 μA , no filter, rotation step = 0.2°, frame averaging (2), rotation 180°, scanning time = 1h). Dataset projekčních snímků byl rekonstruován pomocí programu NRecon (Bruker micro-CT) do datasetu průřezových snímků (cross section images), které byly základem pro vizualizaci a analýzu. Vizualizace (2D i 3D) byly připraveny pomocí programů DataViewer and CTVOX (Bruker micro-CT). Analýza struktury byla provedena s využitím programu CTAn (Bruker micro-CT), přičemž byly hodnoceny následující parametry: Total Volume (celkový objem nosiče včetně jeho porozity), Scaffold Volume

(objem matrice nosiče), Pore size (průměrná velikost póru získaná metodou sphere-fitting), Porosity (podíl objemu porozity k Total Volume), Closed Porosity (podíl uzavřené porozity, tedy pórů bez spojení s okolním prostorem). Stanovení Volume of Interest, tedy objemu, ve kterém je analýza provedena a který obecně slouží jako základní referenční objem (v tomto případě „Total Volume“), bylo provedeno pomocí Shrink-wrap 3D algoritmu. Tímto postupem byl detekován vnější povrch nosiče (při nastavení „překračování“ pórů, aby nevstoupil dovnitř vzorku), který vymezil Volume of Interest. Postup si lze představit jako fólii ve tvaru krychle či kvádrů, která by se z okrajů celkového rekonstruovaného objemu začala postupně smršťovat, až by nakonec obalila daný vzorek a tím definovala Volume of Interest.

4.8.FTIR

Infračervená spektra byla měřena pomocí spektrometru iS50 (Thermo Nicolet Instruments Co., Madison, USA) v rozsahu 4000 až 400 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} , při zprůměrování 16 skenů technikou ATR. Spektrální dekonvoluce amidového pásu I byla provedena pomocí programu OMNIC 7. Výchozí parametry pro proces fitování křivky, tj. počet pásů a jejich polohy, byly předem stanoveny použitím kombinovaných postupů metody sekundární derivace a Fourierovy autodekonvoluce. Všechny materiály byly měřeny na 10 až 20 různých místech náhodně vybraných na 10 vzorcích. Integrované absorpce vybraných spektrálních složek a poměry pásů byly statisticky vyhodnoceny.

4.9.Statistická analýza

Statistická významnost rozdílů získaných dat byla vyšetřena za pomoci programu JASP 0.16.2.0 (JAPS Team (2020), Version 0.14.1). Pro každou sadu vzorků byla ověřena normalita dat (Shapiro-Wilkův test) a shoda rozptylů (Levennův test). Pokud pro daný zkoumaný časový úsek byly u všech skupin tyto dvě podmínky splněny, byl použit parametrický Studentův t-test. Pokud ne, byl použit neparametrický Mann-Whitney test pro každou porovnávanou skupinu. Výsledná hodnota $p \leq 0.05$ znamená statisticky významný rozdíl. Statisticky významné rozdíly na hladině spolehlivosti 95 % jsou v grafech označovány stříškou s hvězdičkou, a to jednou, jedná-li se o oboustranný t-test a dvěma pro oboustranný Mann-Whitney test. Díky výsledkům pak lze hypotézy zamítnout či nezamítnout. Statistická rozdílnost je ale pro kvalitnější hodnocení doplněna a míru věcné významnosti.

Míra věcné významnosti je mírou síly vztahu mezi dvěma proměnnými. V našem případě se jedná konkrétně o Cohenovo d získané pro data pocházející z normálního rozdělení. Pro data, která z normálního rozdělení nepocházejí, nabízí JASP pro velikost věcného účinku využít koeficient pořadové biseriální korelace r_B , který lze interpretovat podobně jako Pearsonův korelační koeficient. Tabulka 4 zobrazuje intervaly pro míru věcné významnosti a jím odpovídající barevné značení. Výsledky byly zapsány do tabulek pod každý graf a vyznačeny barevně. Jelikož v některých případech dochází v jednom grafu k porovnání jak podle t-testu, tak Mann-Whitneyho testu, je lepší věcnou významnost sledovat podle barevného značení než podle číselných hodnot. V tabulkách budou značeny skupiny podle způsobu vyhodnocování stejným způsobem, jako při vyhodnocování statistických rozdílů, tedy jedna hvězdička pro t-test a dvě pro Mann-Whitney test.

Tabulka 4: Klasifikační stupnice pro míru věcné významnosti

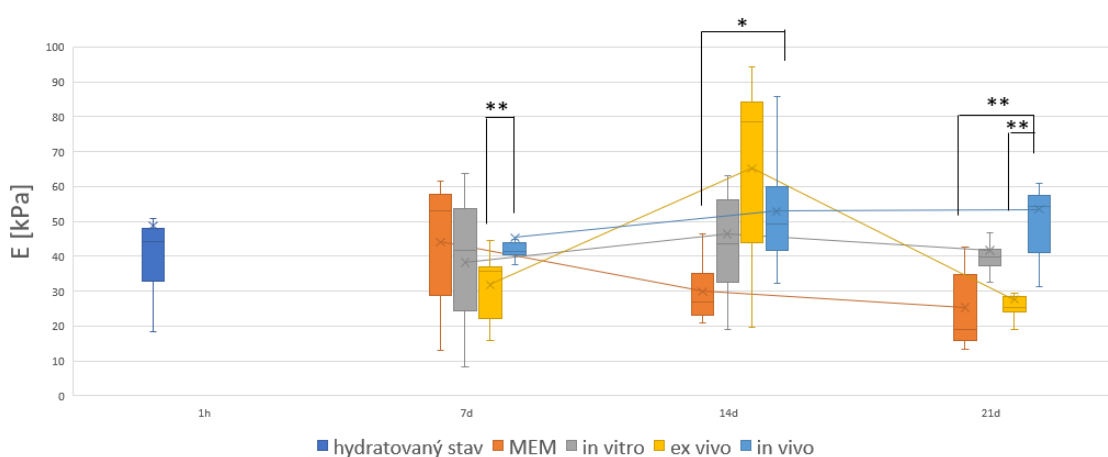
Cohenovo d	Koeficient pořadové biseriální korelace r_B	Míra věcné významnosti
>0,8	0,5-1	velká
0,5-0,8	0,3-0,5	střední
0,2-0,5	0,1-0,3	malá
0-0,2	0-0,1	zanedbatelná

5. Výsledky

5.1. Mechanické vlastnosti

Výsledky mechanických vlastností jsou zaznamenány ve dvou krabicových grafech. První porovnává všechna média simulující tělní prostředí s prostředím *in vivo*. Druhý pak porovnává skupiny MEM a *in vitro*. V každém grafu se nachází skupina *hydratovaný stav*, která reprezentuje vzorky vystavené médiu po dobu jedné hodiny. Zde předpokládáme, že jde o výchozí stav pro všechny sledované skupiny (při krátkodobé hydrataci není mezi různými prostředími nebo médii rozdíl).

Elastický gradient E



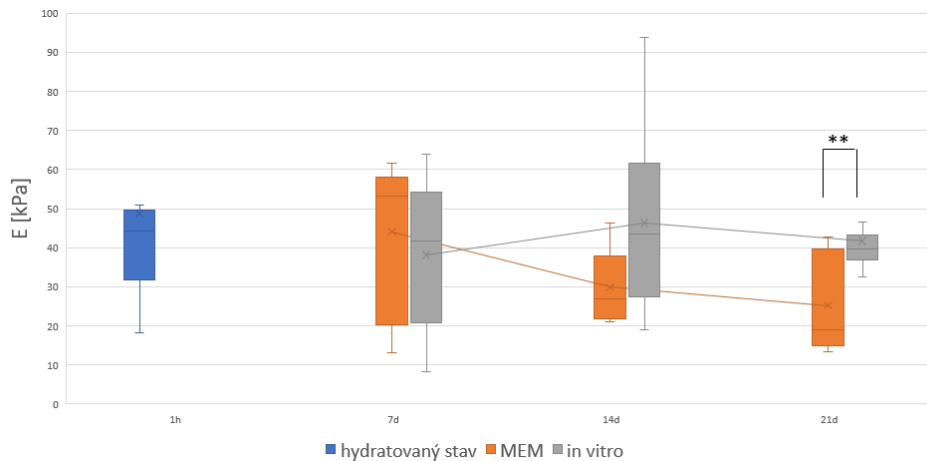
Obr. 16: Elastický gradient kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou *in vivo* v jednotlivých časech (oboustranný *t*-test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)

Tabulka 5: Míra věcné významnosti pro porovnávání elastického gradientu v jednotlivých prostředí s prostředím *in vivo* (pro Obr. 16), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d , skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá - střední, červená - velká

E	MEM	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>
7d**	0,200	0,086	0,683
14d*	1,574	0,336	0,340
21d**	0,873	0,489	0,911

Na Obr. 16 jsou porovnávány hodnoty elastických gradientů pro různá média v různý čas. Ke statisticky významným rozdílům od skupiny *in vivo* dochází u médií MEM a *ex vivo*. Skupinou, která nejlépe simuluje tělní prostředí je v tomto případě

skupina *in vitro*. Střední hodnoty těchto dvou skupin nabývají v průběhu času hodnot kolem 35-55 kPa. Míra věcné významnosti odpovídá předpokladům vyvozených z výsledků statistických významností. Z tabulky výše lze vyčíst vysokou míru věcné významnosti vždy ve dvou časech pro skupinu MEM a *ex vivo*. Menších hodnot pak nabývá právě skupina *in vitro*, kde je v prvních sedmi dnech míra věcné významnosti dokonce zanedbatelná. Právě u této skupiny tedy nelze na zvolené hladině spolehlivosti zamítnout hypotézu o shodě se skupinou *in vivo*.



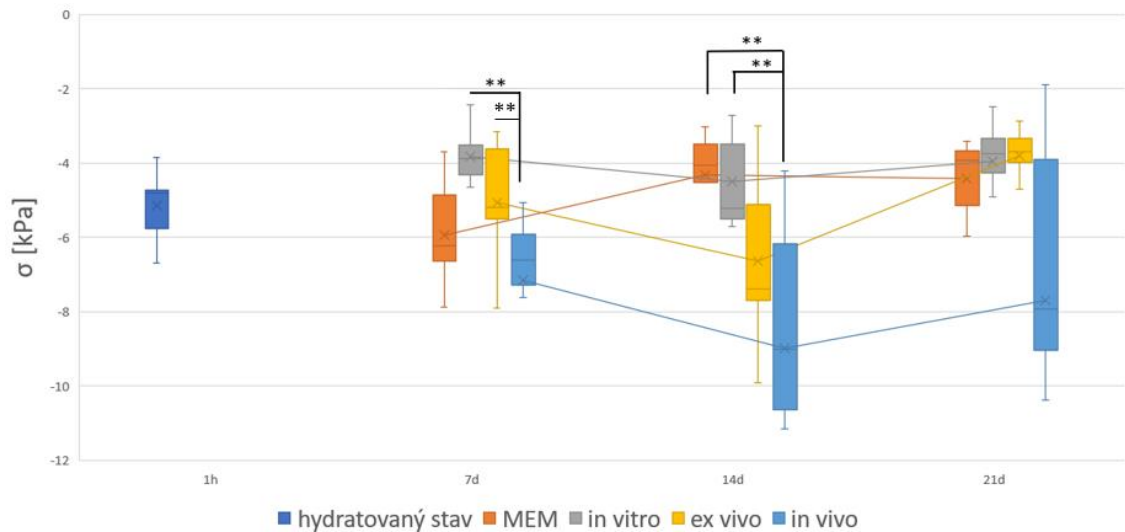
Obr. 17: Elastický gradient kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích *in vitro* a MEM během různých časových úseků., Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)

Tabulka 6: Míra věcné významnosti pro porovnávání elastického gradientu (pro Obr. 17), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d , skupina označená ** koeficient pořadově biseriální korelace r_B , zelená – malá, žlutá – střední, červená – velká

E	7d**	14d*	21d**
MEM – <i>in vitro</i>	0,240	0,962	0,629

Na Obr. 17 jsou porovnávány hodnoty elastických gradientů pro skupiny *in vitro* a MEM. Jak lze vidět, ke statisticky významným rozdílům dochází až 21. den. Z tabulky výše lze ale vyčíst, že míra věcné významnosti je 14. den dokonce vyšší než 21. den. Vliv činnosti buněk je tedy zřejmý už 14. den po nasazení.

Stabilní hladina napětí σ_{pl}

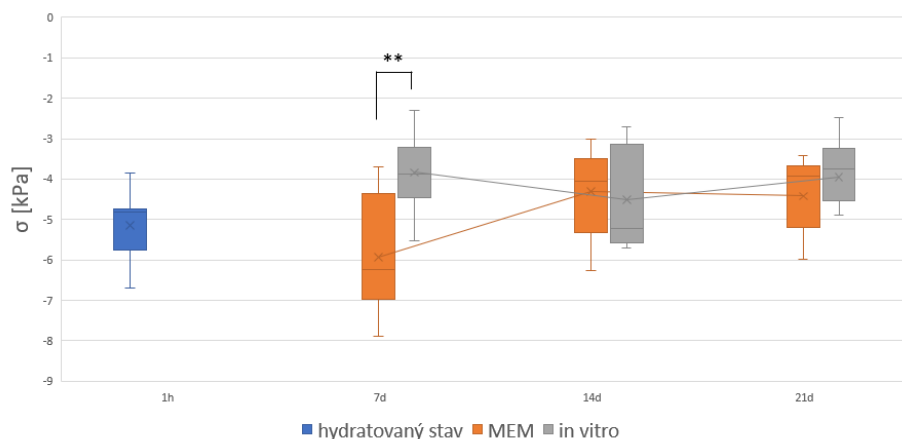


Obr. 18: Stabilní hladina napětí kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou *in vivo* v jednotlivých časech (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)

Tabulka 7: Míra věcné významnosti pro porovnávání stabilní hladiny napětí v jednotlivých prostředí s prostředím *in vivo* (pro Obr. 18), skupina označená ** obsahuje hodnoty koeficientu pořadové biseriální korelace r_B , zelená – malá, žlutá – střední, červená – velká

σ_{pl}	MEM	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>
7d**	0,257	0,971	0,587
14d**	0,822	0,891	0,360
21d**	0,429	0,533	0,533

Na Obr. 18 je porovnávána stabilní hladina napětí vzorků. Ke statisticky významným rozdílům se skupinou *in vivo* dochází alespoň v jeden čas ve všech ostatních skupinách. Podle tabulky výše je zřejmé, že nejhůře si v porovnání se skupinou *in vivo* vede skupina *in vitro*, u které vychází velká míra věcné významnosti ve všech časových úsecích. Střední hodnota skupiny *in vivo* se pohybuje kolem 7-9 kPa, zatímco u ostatních skupin se jedná o rozmezí cca 4-6 kPa.



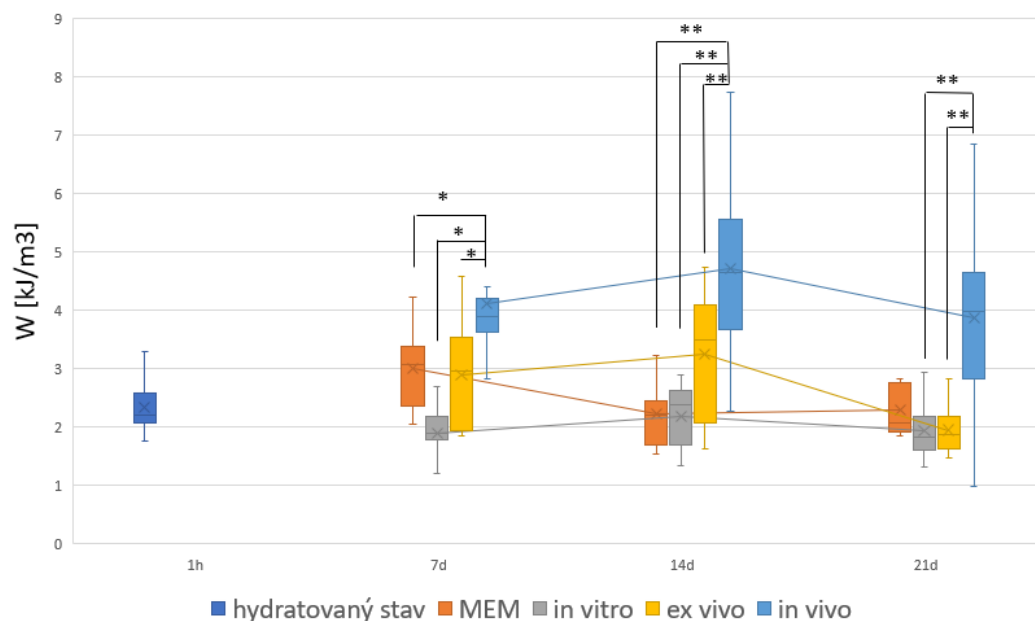
Obr. 19: Stabilní hladina napětí kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích *in vitro* a MEM během různých časových úseků. Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)

Tabulka 8: Míra věcné významnosti pro porovnávání stabilní hladiny napětí (pro Obr. 19), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d , zelená - malá, žlutá - střední, červená - velká

σ_{pl}	7d*	14d*	21d*
MEM – <i>in vitro</i>	1,665	0,051	0,445

Obr. 19 porovnává pouze stabilní hladinu napětí skupin MEM a *in vitro*. Po prvním týdnu dochází k výraznému snížení míry věcné významnosti a lze tedy konstatovat, že se nepodařilo na zvolené hladině spolehlivosti zamítnout hypotézu o shodě obou prostředí.

Absorbovaná energie W

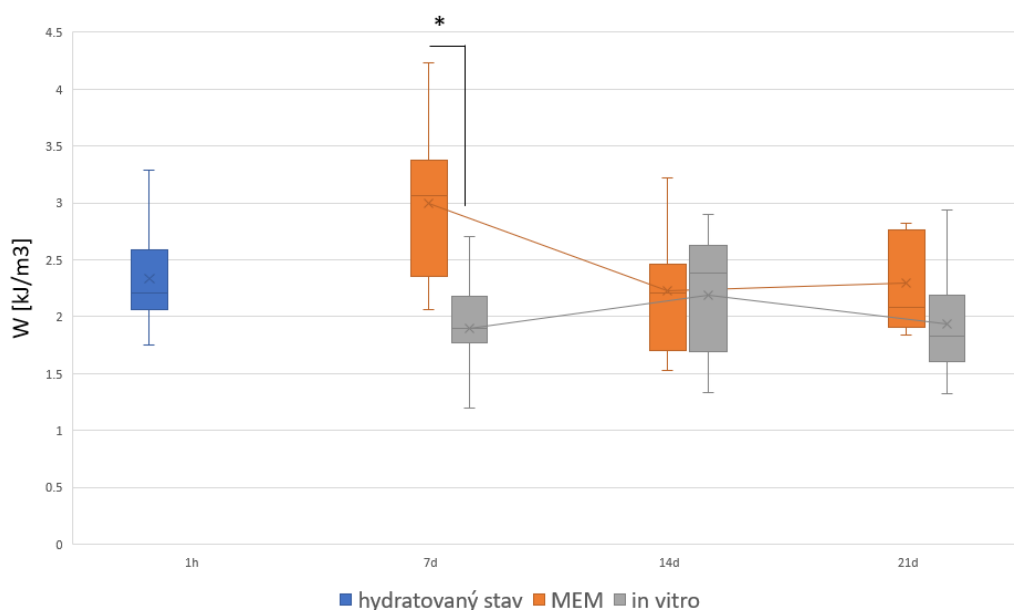


Obr. 20: Absorbovaná energie kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou *in vivo* v jednotlivých časech (oboustranný t -test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)

Tabulka 9: Míra věcné významnosti pro porovnávání absorbované energie v jednotlivých prostředí s prostředím *in vivo* (pro Obr. 20), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká

W	MEM	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>
7d*	1,207	2,762	1,192
14d**	0,889	0,891	0,540
21d**	0,540	0,622	0,611

Z Obr. 20 je zřejmé, že při porovnávání absorbované energie jsou všechny skupiny statisticky významně rozdílné od skupiny *in vivo*. Tabulka 10 potvrzuje, že je třeba na zvolené hladině spolehlivosti zamítnout hypotézu o shodě skupin *in vitro*, *ex vivo* a MEM se skupinou *in vivo*. Střední hodnoty pro *in vivo* skupiny se pohybují kolem 4-5 kJ/m³, ostatní pak v rozmezí 2-3 kJ/m³.



Obr. 21: Absorbovaná energie kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích *in vitro* a MEM během různých časových úseků. Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný t -test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *)

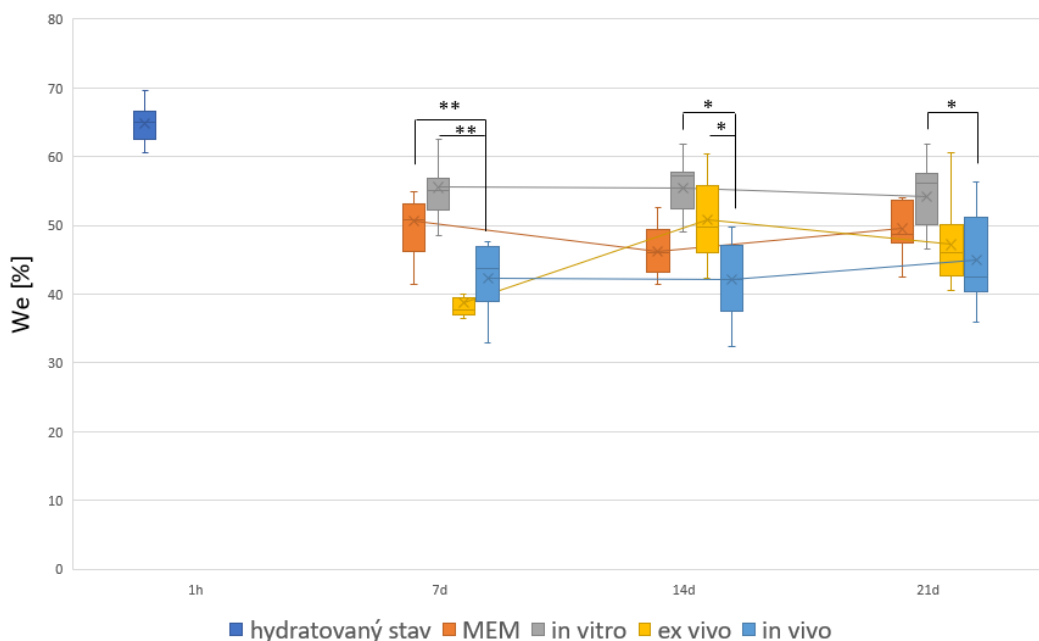
Tabulka 10: Míra věcné významnosti pro porovnávání absorbované energie (pro Obr. 21), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká

W	7d*	14d*	21d**
MEM – <i>in vitro</i>	1,748	0,062	0,457

Hodnoty absorbované energie pro skupiny MEM a *in vitro* v Obr. 21 jsou statisticky významně rozdílné první týden. Poté už dochází z pohledu statistické významnosti ke shodě. K podobnému závěru lze dojít i podle sledování míry věcné významnosti z tabulky

výše, kde nejvyšších hodnot nabývá skupina 7. dne. 14 dní po nasazení je naopak vliv buněk z tohoto pohledu zanedbatelný.

Účinnost absorbování energie We

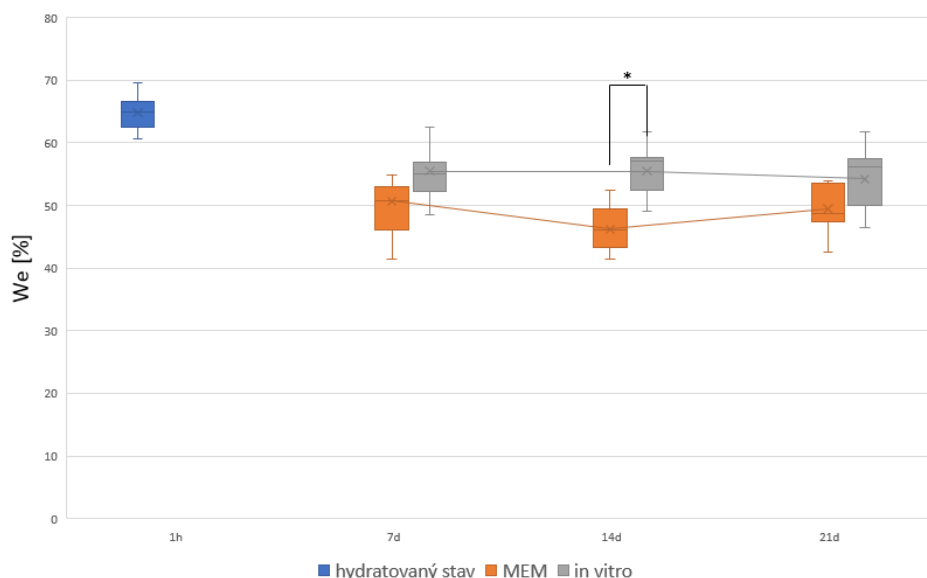


Obr. 22: Účinnost absorbování energie kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou *in vivo* v jednotlivých časech (oboustranný *t*-test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)

Tabulka 11: Míra věcné významnosti pro porovnávání účinnosti absorbování energie v jednotlivých prostředích *in vivo* (pro Obr. 22), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohenova d , skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá - střední, červená - velká

We	MEM	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>
7d**	0,743	2,686	0,556
14d*	0,852	2,776	1,500
21d*	0,781	1,561	0,347

Obr. 22 zobrazuje porovnání hodnot účinnosti absorbování energie kolagenových scaffoldů. Co se týče statisticky významných rozdílů, nejhorších výsledků dosahuje skupina *in vitro*, která se liší od *in vivo* skupiny ve všech časových úsecích. Ostatní dvě skupiny jsou statisticky významně shodné se skupinou *in vivo* ve dvou případech ze tří. Tabulka 11 však díky vysokým hodnotám téměř ve všech fázích jasně vypovídá o tom, že je nutno na zvolené hladině spolehlivosti zamítnout hypotézu o shodě skupin *in vitro*, *ex vivo* a MEM se skupinou *in vivo*. Střední hodnoty pro skupinu *in vivo* jsou 42-45 %. Pro ostatní skupiny se tyto hodnoty pohybují od 38 %, až po 55 %.



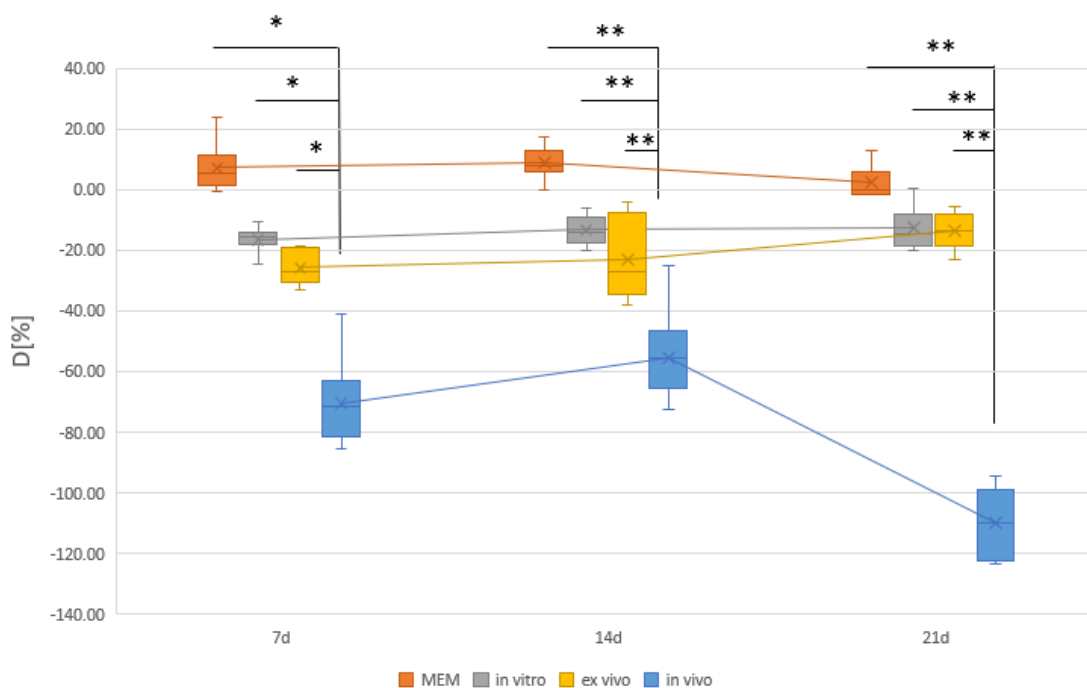
Obr. 23: Účinnost absorbované energie kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích *in vitro* a MEM během různých časových úseků. Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný t -test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *)

Tabulka 12: Míra věcné významnosti pro porovnávání účinnosti absorbování energie (pro Obr. 23), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohenova d , zelená – malá, žlutá – střední, červená - velká

We	7d*	14d*	21d*
MEM – <i>in vitro</i>	0,873	2,362	1,022

Na Obr. 23 je porovnávána účinnost absorbované energie skupin MEM a *in vitro*. Kromě druhého týdnu nejsou hodnoty statisticky významně rozdílné. Z tabulky výše je ale zřejmé, že i v tomto případě je nutno na zvolené hladině spolehlivosti zamítnout hypotézu o shodě těchto dvou skupin. Lze tedy konstatovat, že buňky mají veliký vliv na účinnost absorbování energie.

5.2. Hmotnostní úbytky D



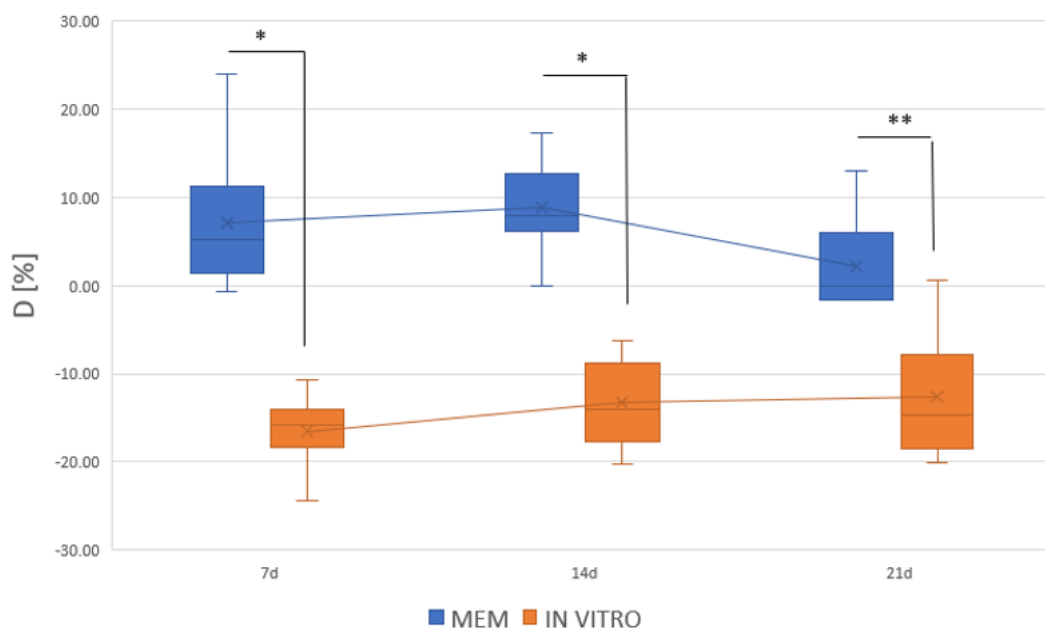
Obr. 24: Hmotnostní úbytky kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou *in vivo* v jednotlivých časech (oboustranný t-test $p \leq 0,05$, $n=6-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=6-11$, **)

Tabulka 13: Míra věcné významnosti pro porovnávání hmotnostních úbytků v jednotlivých prostředích s prostředím *in vivo* (pro Obr. 24), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d , skupina označená koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá - střední, červená - velká

D	MEM	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>
7d*	6,800	5,703	4,139
14d**	1,000	0,873	1,000
21d**	1,000	1,000	1,000

Z Obr. 24 je zcela zřejmé, že jsou při porovnávání hmotnostních úbytků všechny skupiny statisticky významně rozdílné od skupiny *in vivo*, pro níž se hodnoty pohybují v intervalu od cca -50 do -120 %, zatímco pro skupiny *in vitro* a *ex vivo* se jedná o interval mezi -10 až -35 %. Záporné hodnoty značí nárůst hmotnosti vzorků. Jediná skupina, u které došlo ke hmotnostnímu úbytku, je skupina MEM, a to konkrétně v rozmezí 0-10 %.

Dalším ukazatelem, díky kterému lze na zvolené hladině spolehlivosti zamítnout hypotézu o shodě skupin *in vitro*, *ex vivo* a MEM se skupinou *in vivo*, je Tabulka 13, ve které každá hodnota míry věcné významnosti je v intervalu *velká*.



Obr. 25: Hmotnostní úbytky kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích *in vitro* a MEM během různých časových úseků. Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný *t*-test $p \leq 0,05$, $n=6-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=6-11$, **)

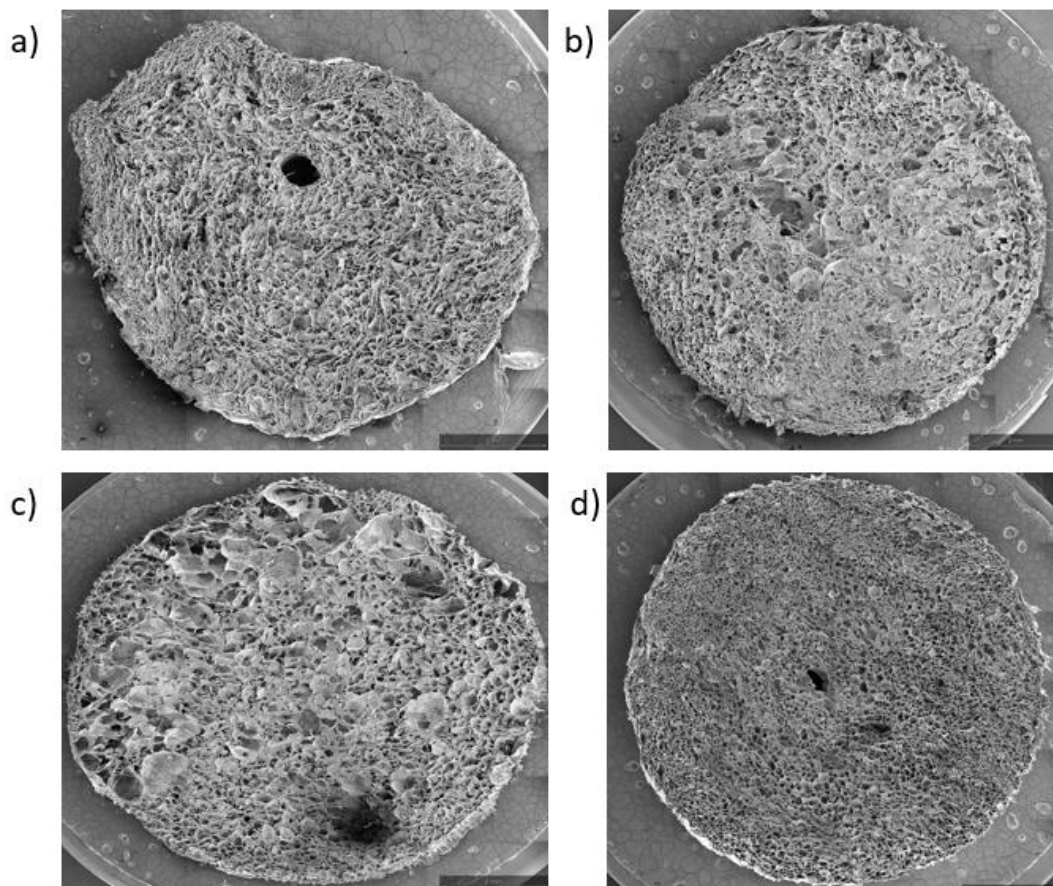
Tabulka 14: Míra věcné významnosti pro porovnávání hmotnostních úbytků (pro Obr. 25), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohenova *d*, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá - střední, červená - velká

D	7d*	14d*	21d**
MEM – <i>in vitro</i>	3,930	9,090	1,000

Jak už bylo zmíněno při porovnávání hmotnostního úbytku všech skupin se skupinou *in vivo*, u skupiny MEM dochází k úbytku materiálů, zatímco u skupiny *in vitro* je tomu naopak. Hodnoty jsou statisticky významně rozdílné. Z tabulky výše lze vyčíst, že i v tomto případě se jedná o velkou míru věcné významnosti ve všech případech, a i zde je tedy třeba na zvolené hladině spolehlivosti zamítnout hypotézu o shodě skupin *in vitro* a MEM.

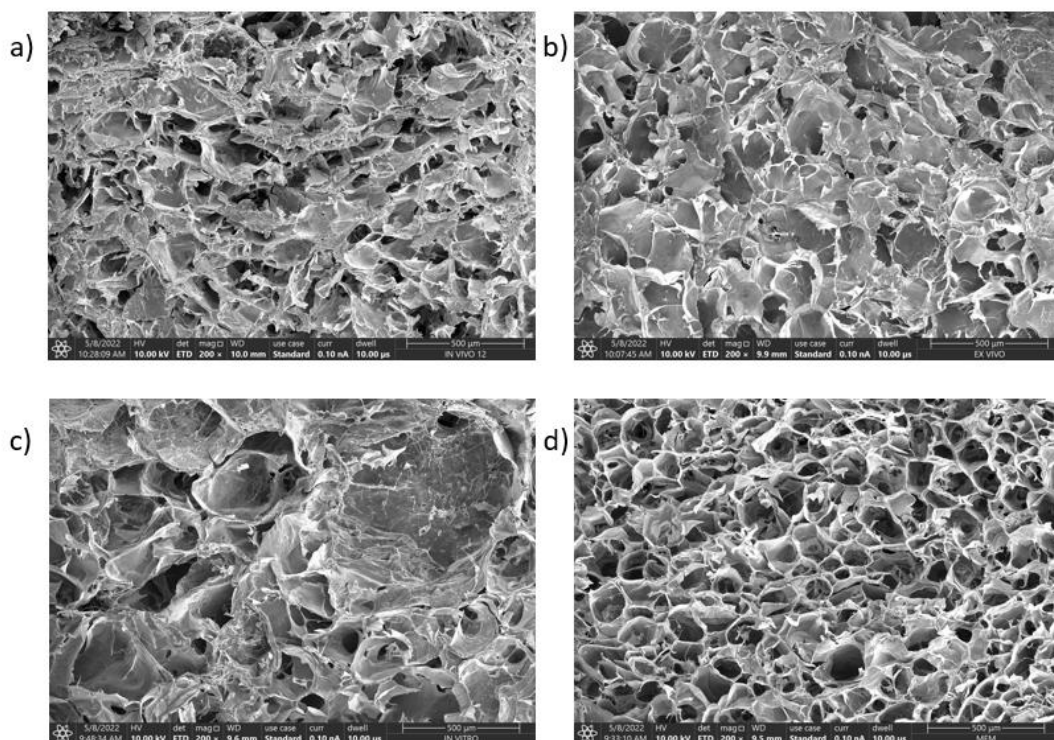
5.3.Obrazová a mikro-CT analýza

Tato část se zaměřuje na sledování změn ve vnitřní struktuře kolagenových vzorků pomocí SEM snímků a mikro-CT analýzy, které zkoumají jejich porozitu a velikost pórů.



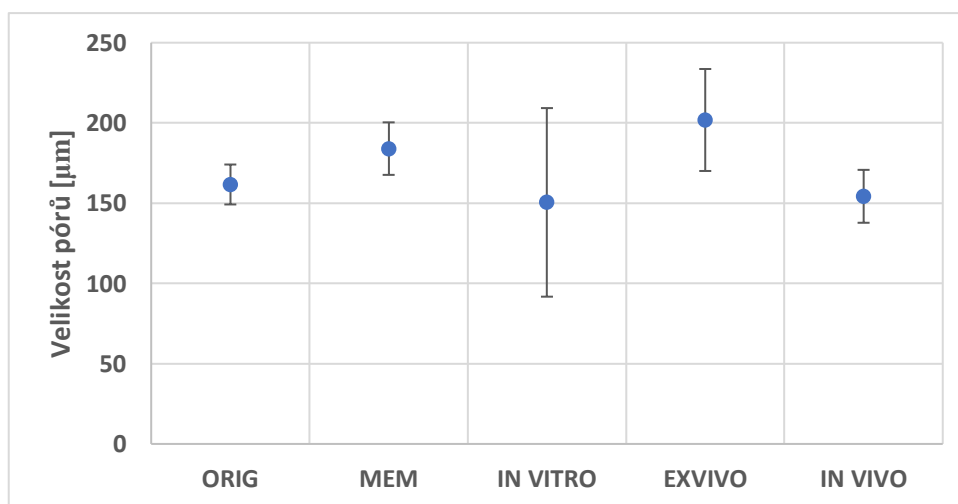
Obr. 26: SEM snímky (náhledy) scaffoldů po expozici (21 dnů) v prostředích: a) *in vivo* b) *ex vivo* c) *in vitro*
 d) MEM, měřítko 2mm

Obr. 26 zobrazuje náhledy na vnější povrch kolagenových scaffoldů po 21 dnech degradace. U vzorků skupiny *in vivo*, *in vitro* a MEM lze vidět, že došlo ke vzniku trhlin, které by mohly mít za následek narušení celkové struktury, a tudíž i vliv na mechanické vlastnosti.



Obr. 27: SEM snímky scaffoldů po expozici (21 dnů) v prostředích: a) *in vivo* b) *ex vivo* c) *in vitro* d) MEM; zvětšení 200x, měřítko 500 μ m

Na Obr. 27 pozorujeme rozdíly v porositě a velikosti pórů. Lze z něj kvalitativně usoudit, že nejmenší velikost pórů je u skupiny *in vivo*. Opakem je pak skupina *in vitro*. Problémem je, že porovnáváme vždy jeden vzorek z každé skupiny a je tak nemožné vyloučit jakékoliv abnormality, které mohly nastat. Nelze tak z pozorování vyvodit jednoznačný závěr. Pro lepší pochopení vnitřní struktury tedy využíváme mikro-CT analýzu uvedenou níže.

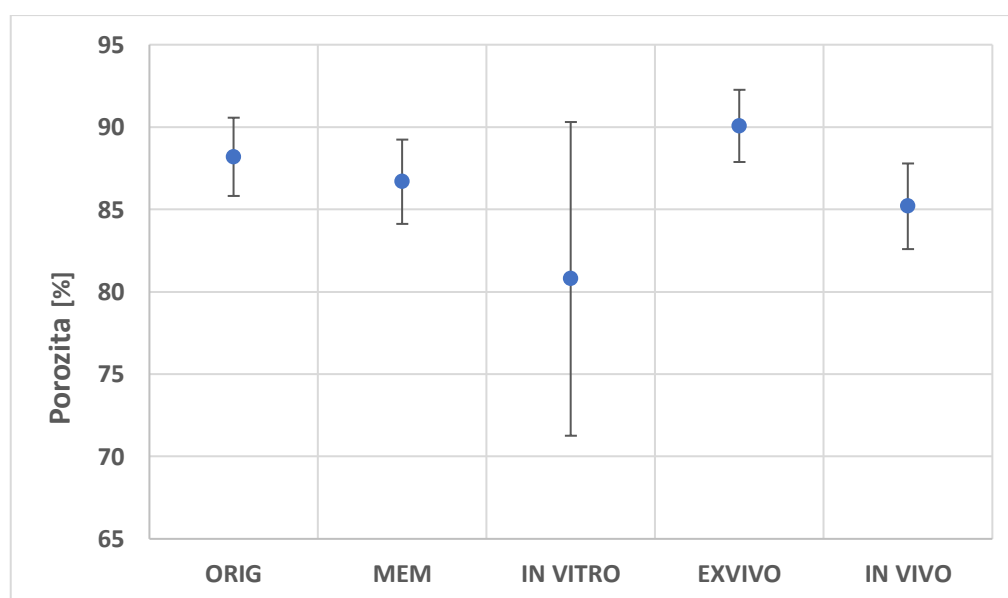


Obr. 28: Velikost pórů po 21 dnech degradace, ORIG - suché nedegradované vzorky Párové porovnání jednotlivých skupin po 21 dnech degradace se skupinou *in vivo* (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=3$, **)

Tabulka 15: Míra věcné významnosti pro porovnávání velikosti pórů (pro Obr. 28), skupina označená ** obsahuje hodnoty koeficientu pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká

Velikost pórů	MEM	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>
21d**	1,000	0,111	0,788

Graf na Obr. 28 porovnává velikosti pórů kolagenových scaffoldů včetně těch před degradací. Je třeba zdůraznit, že pro toto vyhodnocení bylo použito malý počet vzorků ($n=3$), a je tak v některých případech s větší odchylkou (*in vitro*, *ex vivo*) složité vyhodnotit směrodatnější hodnotu výsledku. Nicméně výsledné hodnoty představují údaje z objemu tří kompletně naskenovaných scaffoldů a lze je považovat za relevantní. Lze vidět, že scaffoldy vystavené *in vivo* prostředí nezměnily výrazně velikost pórů od svého původního stavu (ORIG). Jejich střední hodnoty se pohybují v intervalu od cca 155 do 160 μm . Z pohledu statistického vyhodnocení nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly se skupinou *in vivo*. Z pohledu míry věcné významnosti je ale zřejmé, že skupiny MEM a *ex vivo* se výrazně liší a lze tedy na zvolené hladině spolehlivosti zamítnout hypotézu o jejich shodě se skupinou *in vivo*.



Obr. 29: Porozita po 21 dnech degradace, ORIG - suché nedegradované vzorky. Párové porovnání jednotlivých skupin po 21 dnech degradace se skupinou *in vivo* (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=3$, **)

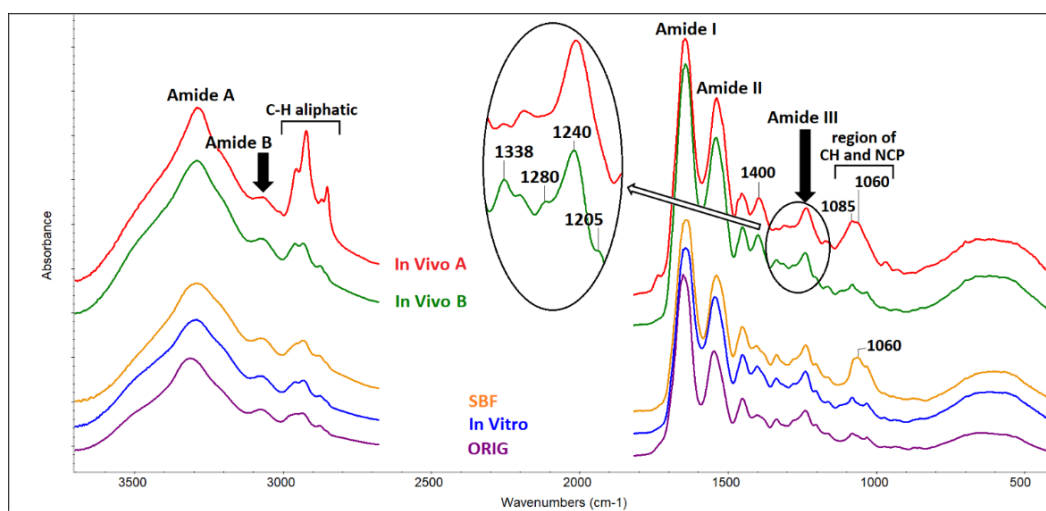
Tabulka 16: Míra věcné významnosti pro porovnávání porozity (pro Obr. 29), skupina označená ** obsahuje hodnoty koeficientu pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká

Porozita	MEM	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>
21d**	0,111	0,333	0,788

Z Obr. 29 vyplývá, že v *in vivo* prostředí dochází k mírnému poklesu porozity. Největší shody s touto skupinou dosahuje skupina MEM. K největšímu poklesu porozity dochází u skupiny *in vitro*. Celkově se porozita u vzorků pohybuje v rozmezí přibližně 80–90 %. Stejně jako u velikosti pórů zde nenastávají žádné statisticky významné rozdíly. Věcná významnost je nejvyšší u skupiny *ex vivo*.

5.4.FTIR

FTIR metoda byla použita pro hodnocení sekundární struktury kolagenu před degradací a 21 dní po ní. FTIR spektra kolagenu obsahují 5 amidických pásů označovaných A, B, I, II a III (Obr. 30).



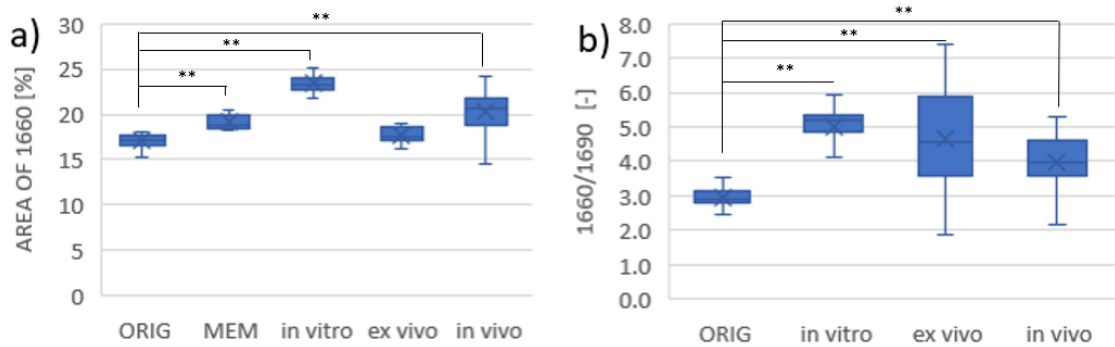
Obr. 30: Srovnání FTIR spekter vybraných materiálů ve střední infračervené oblasti spektra (4000 - 400 cm^{-1}).

Pás Amid I všech zkoumaných materiálů byl dekonvolován a plocha pásu při 1660 cm^{-1} , představující trojitou šroubovici byla statisticky vyhodnocena a porovnána se vzorky před expozicí (Obr. 31a). Kromě prostředí *ex vivo* jsou všechna prostředí oproti skupině ORIG statisticky významně rozdílná a to tak, že u všech dojde ke zvýšení obsahu vyztřelého kolagenu.

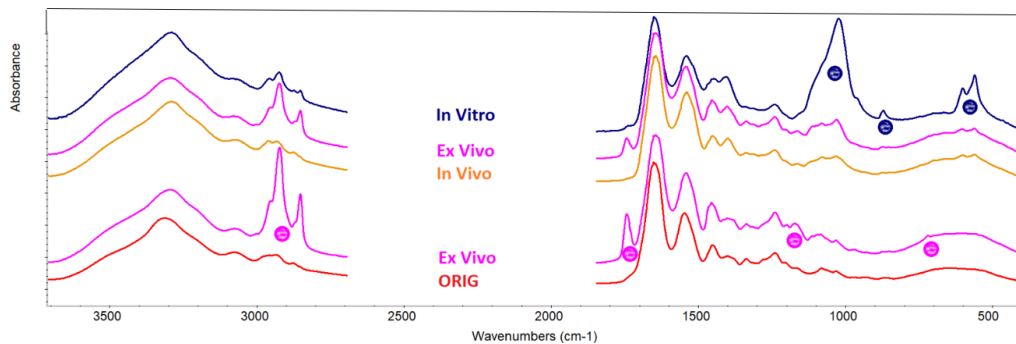
Poměr ploch dílčích pásem 1660/1690 cm^{-1} odráží obsah vyztřelého a nevyztřelého kolagenu v analyzovaných scaffoldech. Statisticky významné zvýšení poměru ploch 1660/1690 bylo zjištěno v případech expozice scaffoldů do média: *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo* vs. ORIG (Obr. 31b).

Vezmeme-li v potaz oba grafy z Obr. 31 dohromady, závěr je takový, že dochází k přestavbě kolagenu ve vzorku ve všech pozorovaných médiích. Za hlavní z příčin lze považovat působení buněk na kolagen. Nelze však tvrdit, že jde o jedinou příčinu, a to

z toho důvodu, že ke zvýšení obsahu vyzrálé části dochází i u skupiny MEM, která buňky neobsahuje. U skupiny *ex vivo* dochází ke zvýšení podílu vyzrálého a nevyzrálého kolagenu i přesto, že nedochází k nárustu obsahu vyzrálého kolagenu. Jedním z vysvětlení může být enzymatická degradace kolagenu.



Obr. 31: a) plocha pásu 1660 představující neporušenou trojšroubovicovou strukturu kolagenu (1660) (n=10) a b) poměr ploch 1660/1690 (n=20). Párové porovnání jednotlivých skupin po 21 dnech degradace se skupinou ORIG (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, **)



Obr. 32: Mapování anorganických a/nebo organických nečistot a přídavných látek ve vybraných materiálech. (modré tečky – pásy fosforečnanu vápníku, růžové tečky – pásy lipidů)

V Obr. 32 je vidět, že několik spekter kolagenových scaffoldů vystavených prostředí *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo* obsahuje pásy fosforečnanů vápníku (modré tečky), což je způsobeno biomimetickou nehomogenní precipitací. Všechna spektra scaffoldů vystavených prostředí *ex vivo* obsahují pásy patřící lipidům (růžové tečky) nehomogenně adsorbovaným z prostředí. Usazování látek během expozice má vliv na hmotnostní bilanci. Nelze ale s přesností určit do jaké míry, jelikož zároveň s usazováním probíhá i proces degradace, který má na hmotnost opačný vliv.

6. Diskuse

Tato práce se zabývá pozorováním kolagenových vzorků vystavených podmínkám simulujících tělní prostředí a jejich porovnáním se skutečným tělním prostředím. Cílem je posoudit vliv vybraných simulovaných podmínek na mechanické a strukturní vlastnosti a zhodnotit, do jaké míry jejich efekt odpovídá vlivu prostředí *in vivo*. Lze předpokládat, že dosažení shody je velmi komplexní úloha, závislá na mnoha proměnných, jako jsou použité materiály a prostředí, jejich příprava a modifikace, podmínky a mnoho dalšího. Cílem této kapitoly je diskutovat získané výsledky a jejich vzájemné spojitosti.

Strukturní vlastnosti byly reprezentovány velikostí pórů a porozitou. Velikost pórů se napříč všemi zkoumanými skupinami pohybovala v intervalu 150-200 μm . Průměrná hodnota pro úspěšný scaffold je 40-400 μm [38]. Z toho vyplývá, že námi zkoumané scaffoldy jsou ve shodě s tímto předpokladem a že během tří týdenní kultivace nedochází k její výrazné změně po expozici v prostředí *in vivo* a *in vitro*. Oproti tomu expozice v samotném kultivačním médiu a v prostředí *ex vivo* vede ke zvýšení velikosti pórů. Tento efekt se sice na zvolené hladině významnosti (0,05) nepodařilo prokázat jako statisticky významný, ale jeho věcná velikost je velká ($> 0,788$).

Hodnoty porozity vzorků před i po degradaci ve všech médiích se pohybují v intervalu 80-90 %. Běžně se ve studiích vyskytují hodnoty porozity od 65-96% [25,38–41]. Vysoká porozita je důležitou vlastností kolagenových scaffoldů, jakožto nosičů látek podporující růst tkáně. Ta ale s přibývajícím hodnotou může negativně ovlivnit mechanické vlastnosti, a proto je důležité volit kompromis mezi těmito dvěma vlastnostmi. Vzorky všech skupin kromě *ex vivo* ztrácí s postupem času porozitu. Vlivem může být usazování látek na vnitřním povrchu scaffoldů. Není to ale jediným důvodem, jak je patrné z Obr. 32, kde lze vyčíst, že k usazování látek dochází právě i ve skupině *ex vivo*, u které došlo ke zvýšení porozity. Ač ani v této skupině nárůst nebyl na zvolené hladině významnosti prokázán jako statisticky významný, i zde, stejně jako u velikosti pórů, je věcná velikost velká ($>0,788$). Naopak největší shoda byla zaznamenána u skupiny MEM, a ta jak u statistické, tak i věcné významnosti ($>0,111$). Zřejmý je i vliv buněk na porozitu, a to v případě pozorování rozdílů mezi skupinou *in vitro* a MEM, kde u první zmíněné je průměrná hodnota menší o více než 5 %.

Usazování látek lze uvažovat jako příčinu také u hmotnostních úbytků, lépe řečeno hmotnostních nárůstů u skupin *in vivo*, *ex vivo* a *in vivo*. Podobný průběh degradace nastal

např. ve studii Heimburg a kol., kde byly kolagenové scaffoldy osazeny lidskými preadipocyty a hmotnostní úbytky byly sledovány po dobu osmi týdnů v prostředí DMEM. I tam se ukázalo, že dochází k prudkému nárůstu hmotnosti, stejně jako je tomu v tomto experimentu [42].

K odlišným výsledkům hmotnostní bilance došla studie Kumar a kol., kde byly zkoumány kolagenové scaffoldy v kombinaci s chitosanem v PBS médiu obsahující lysozomy [43]. Jejich působení mělo za důsledek enzymatickou degradaci, která vysvětluje hmotnostní úbytek materiálu, který v kolagenovém scaffoldu bez chitosanu dosáhl hodnoty přes 50 %. Opačný trend ve změně hmotnosti v obou studiích lze vysvětlit rozdílným složením použitých médií, tedy jednoduchým solným roztokem a komplexnějším kultivačním médiem, které obsahuje různé organické molekuly (zejména bílkoviny) a anorganické ionty, které se mohou v porézní struktuře exponovaných materiálů usazovat ve vyšší míře a zásadněji tak ovlivňovat jejich hmotnost [25].

Hmotnostní bilance závisí jak na množství usazovaných látek, tak i na rychlosti a způsobu degradace. Tyto parametry pak rozhodují, zda dojde k hmotnostní úbytku či nárůstu. Jelikož je mnoho způsobů přípravy i podmínek, za jakých experimenty provádět, je složité určit, jak přesně jednotlivé parametry působí na vzorky. Z Obr. 24 lze usoudit, že čím komplexnější prostředí, tím větší změny v hmotnostní bilanci, a to konkrétně tak, že u skupiny *in vivo* dochází k nárůstu hmotnosti přibližně 70 % hned po prvním týdnu, zatímco u skupin *in vitro* a *ex vivo* v celém průběhu nepřesáhne hodnota 40 %.

Dalším důkazem o vlivu látek usazovaných ve scaffoldech na hmotnost je Obr. 25. Ten porovnává skupiny MEM a *in vitro*, které se liší přítomností buněk (DF), viz kapitola 4.2. Tyto dvě skupiny nezaznamenávají mnoho statisticky významných rozdílů při vyhodnocování mechanických vlastností, zato u hmotnostních úbytku jsou statisticky významně rozdílné v každém časovém úseku. Skupina MEM je jediná skupina, u které nedochází k hmotnostnímu nárůstu. Absence buněk má za důsledek menší obsah usazených látek produkovaných buňkami, jako kolagen nebo metabolické produkty, a tudíž hlavním faktorem ovlivňující hmotnost je degradace. Z FTIR analýzy (Obr. 32) byla zjištěna přítomnost precipitátů kalcium fosfátů (*in vitro*) a lipidů (*ex vivo*), které také přispívají ke změnám v hmotnostní bilanci.

Pružnost materiálu je reprezentována elastickým gradientem. Střední hodnoty pro skupinu *in vivo* se pohybují v rozmezí 40-50 kPa. S nimi jsou statisticky shodné hodnoty

in vitro. Naměřené hodnoty jsou ve stejných řádech jako ve studii Zhang a kol., kde byly zjišťovány mechanické rozdíly mezi obyčejnými kolagenovými scaffoldy a scaffoldy tvořených kombinací kolagenu a wollastonitových nanovláken v *in vitro* prostředí za použití DMEM. Druhá jmenovaná skupina dosahovala třikrát větších hodnot elastického gradientu ($E=45$ kPa) než kontrolní skupina z kolagenu [44].

Stabilní hodnota napětí pro skupinu *in vivo* se pohybuje v rozsahu 7-9 kPa. Ani jedna další skupina s ní není statisticky shodná. Ve 14. dni dojde k mírnému poklesu, o 7 dní později se však hodnota přiblíží zpátky k hodnotě v 7. dni. Při porovnávání skupin MEM a *in vitro* vychází hodnoty statisticky významně rozdílné pouze první týden, poté se hodnoty statisticky shodují. Suchý a kol. pozorovali chování kolagenových scaffoldů v prostředí SBF, PBS a krevní plazma [25]. Ač se jednalo o jiná prostředí, příprava kolagenu byla téměř identická a porovnání výsledků je v tomto případě velmi přínosné. Hodnoty stabilní hladiny napětí krevní plazmy, která by z těchto prostředí měla nejvíce simulovat tělní prostředí, dosahuje téměř identických výsledků (8-10 kPa). Její shoda s prostředím *in vivo* v této práci byla mimochodem i v hmotnostní bilanci, kde se i její hodnota pohybovala v prvních 14 dnech kolem 80 % nárůstu hmotnosti.

Absorbovaná energie skupiny *in vivo* dosahuje vyšších hodnot než ostatní skupiny a je statisticky výrazně rozdílná ve všech časových úsecích. Její střední hodnoty se pohybují v rozmezí 4-5 kJ/m³. U ostatních se tyto hodnoty objevují v intervalu 2-3 kJ/m³.

Účinnost absorbování energie je statisticky rozdílná pro skupiny *in vivo* a *in vitro* ve všech časech. Při porovnávání se skupinou MEM a *ex vivo* najdeme statisticky významný rozdíl v obou případech jen pro jeden časový úsek. U všech skupin došlo ke snížení hodnot od hydratovaného stavu, který činil přibližně 65 %, na hodnoty v rozmezí 40-60 %.

Při porovnávání skupin *in vitro* a MEM pozorujeme vliv buněk podporujících tvorbu nové tkáně na mechanické vlastnosti kolagenových scaffoldů. U každé porovnávané vlastnosti byly hodnoty statisticky rozdílné jen v jednom čase. Při zohlednění i věcného významu je ale patrné, že rozdíly jsou ještě větší. Nelze ale usoudit, zda je vliv buněk na mechanické vlastnosti negativní či pozitivní. V případě elastického gradientu a absorbované energie dosahuje větší shody se skupinou *in vivo* skupina *in vitro*. V případech stabilní hladiny napětí a účinnosti absorbování energie je tomu ale naopak. S jistotou ale lze naopak tvrdit, že buňky mají pozitivní vliv na hmotnostní bilanci.

Ačkoliv ani skupina *in vitro* nesimuluje tělní prostředí, dochází v ní alespoň k nárůstu hmotnosti, což je stejný proces jako u skupiny *in vivo*.

Překvapivých výsledků v této práci dosáhla skupina *ex vivo*, která dosáhla nejméně statistických shod se skupinou *in vivo*. V porovnání s ní se dařilo lépe v některých případech i skupině MEM. Je to také jediná skupina, u které nedošlo k nárůstu obsahu vyzrálého kolagenu.

Neprokázání statistické významnosti na zvolené hladině spolehlivosti a současně prokázané velké věcné efekty mohou také poukazovat na malé množství změřených vzorků. Na tyto vlivy by bylo vhodné se v zaměřit v dalším experimentu, ve kterém bychom navýšili množství testovaných vzorků a zvýšili tak sílu testu, což by podpořilo závěry mé práce.

7. Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyhodnocení vlivu simulovaných tělních prostředí na degradaci kolagenových scaffoldů, a tedy na jejich mechanické a strukturní vlastnosti. Snahou bylo zjistit, zda tato prostředí mohou simulovat prostředí *in vivo*.

Po stanovení cílů a hypotéz byla provedena rešerše na téma biomateriálů tkáňového inženýrství a médií simulujících tělní prostředí. Následovaly návrh a provedení experimentu, zpracování a statistické vyhodnocení výsledků.

První hlavní hypotéza založená na statistické shodě skupin *in vitro*, *ex vivo* a MEM se skupinou *in vivo* byla zamítnuta na zvolené hladině spolehlivosti.

Zamítnuta byla i druhá hlavní hypotéza o statistické shodě skupin MEM a *in vitro*. Jelikož se tyto skupiny lišily pouze přítomností buněk, byl prokázán vliv jejich činnosti na mechanické vlastnosti a hmotnostní bilanci.

Vedlejší hypotéza, která předpokládá stejné změny mechanických vlastností ve všech prostředích, je též zamítnuta. Výsledky mechanických zkoušek nenaznačují podobné chování ve všech médiích.

Ač statistické vyhodnocení hodnot porozity a velikosti pórů nezaznamenává statisticky významné rozdíly, s přihlédnutím na míru věcné významnosti a také výsledky FTIR analýzy je třeba zamítnout i vedlejší hypotézu, která předpokládá stejné změny ve struktuře vzorků.

Výsledky této práce potvrzují, že simulace tělního prostředí je velice komplexní úloha. Paradoxem pak je, že komplexnost médií nezaručuje větší úspěch při simulaci (skupina *ex vivo*). Náročnost této problematiky tkví ve vysokém počtu proměnných, a tudíž je vyžadováno dalších experimentů, jejichž přínos by byl významný.

Ze zkoumaných prostředí největší shody s tělním prostředím dosahuje skupina *in vitro*. Je třeba ale zdůraznit, že se jedná jen o nejlepší výsledek ze všech zkoumaných skupin, ne o tvrzení, že by tato skupina tělní prostředí ideálně simulovala. Výsledky je tudíž třeba hodnotit s určitou rezervou.

Je důležité také zmínit, že výsledky nelze prezentovat jako obecné, ale že se vztahují pouze na kolagenové scaffoldy. Další důležitým poznatkem je vhodnost analýzy vzorků různými metodami. Kombinace pozorování mechanických a strukturních vlastností

poskytuje lepší přehled o materiálech a jejich chování. Díky komplexnějšímu pohledu lze pak lépe posoudit, jak by se materiály chovaly v těle.

8. Publikované výsledky

MEDED, Marko, et al. Mechanical and structural characteristics of collagen scaffolds exposed to various simulating body environments and their comparison to in vivo conditions. In: *23rd International Scientific Conference APPLIED MECHANICS 2022 - Book of Abstracts*. Prague: Czech Technical University in Prague, 2022, p. 77-80. ISBN 978-80-01-06974-5.

9. Zdroje

1. Gillman, C.E., and Jayasuriya, A.C. (2021). FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C 130*, 112466. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493121006068>.
2. Azevedo, H., and Reis, R. (2004). Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate. *Biodegrad. Syst. Tissue Eng. Regen. Med.*, Available at: <https://core.ac.uk/download/pdf/55614175.pdf>
3. Langer, R., and Vacanti, J. (2016). Advances in tissue engineering. *J. Pediatr. Surg. 51*, 8–12. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022346815006314>.
4. Wolfová, L., Vojtová, L., Jurečková, L., and Kohutová, L. *Úvod do tkáňového inženýrství*. Česká republika: MediaBros, 2015. ISBN 978-80-260-9720-4
5. Almouemen, N., Kelly, H.M., and O’Leary, C. (2019). Tissue Engineering: Understanding the Role of Biomaterials and Biophysical Forces on Cell Functionality Through Computational and Structural Biotechnology Analytical Methods. *Comput. Struct. Biotechnol. J. 17*, 591–598. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31080565>.
6. Heath, C.A. (2000). Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol. 18*, 17–19. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779999013967>.
7. O’Brien, F.J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today 14*, 88–95. Available at:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136970211170058X>.
8. Stevens, M.M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater. Today* *11*, 18–25. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702108700865>.
 9. Kannan, R., Wei, G., and Ma, P.X. (2022). Chapter 2 - Synthetic polymeric biomaterials for tissue engineering. In *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, A. R. Boccaccini, P. X. Ma, and L. B. T.-T. E. U. C. and P. (Third E. Liverani, eds. (Woodhead Publishing), pp. 41–74. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128205082000234>.
 10. Adithya, S.P., Sidharthan, D.S., Abhinandan, R., Balangadharan, K., and Selvamurugan, N. (2020). Nanosheets-incorporated bio-composites containing natural and synthetic polymers/ceramics for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* *164*, 1960–1972. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020341416>.
 11. Rao, S.H., Harini, B., Shadamarshan, R.P.K., Balangadharan, K., and Selvamurugan, N. (2018). Natural and synthetic polymers/bioceramics/bioactive compounds-mediated cell signalling in bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* *110*, 88–96. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017321281>.
 12. Griffon, D.J., Sedighi, M.R., Schaeffer, D. V, Eurell, J.A., and Johnson, A.L. (2006). Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater.* *2*, 313–320. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174270610600002X>.
 13. Zhao, C., Liu, W., Zhu, M., Wu, C., and Zhu, Y. (2022). Bioceramic-based scaffolds with antibacterial function for bone tissue engineering: A review. *Bioact. Mater.* Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X22000767>.
 14. Thomas, S., Balakrishnan, P., and Sadasivan, S.M. (2018). *Fundamental biomaterials: ceramics* (Woodhead Publishing). ISBN 9780081022047
 15. Samavedi, S., Whittington, A.R., and Goldstein, A.S. (2013). Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence

- on cell behavior. *Acta Biomater.* 9, 8037–8045. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706113002985>.
16. Egbo, M.K. (2021). A fundamental review on composite materials and some of their applications in biomedical engineering. *J. King Saud Univ. - Eng. Sci.* 33, 557–568. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018363920302713>.
 17. Motameni, A., Alshemary, A.Z., and Evis, Z. (2021). A review of synthesis methods, properties and use of monetite cements as filler for bone defects. *Ceram. Int.* 47, 13245–13256. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884221002777>.
 18. Demir-Oğuz, Ö., Boccaccini, A.R., and Loca, D. (2023). Injectable bone cements: What benefits the combination of calcium phosphates and bioactive glasses could bring? *Bioact. Mater.* 19, 217–236. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X22001761>.
 19. Fratzl, P. (2008). Collagen: structure and mechanics, an introduction. In *Collagen* (Springer), pp. 1–13. Available at:
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-73906-9_1
 20. Peterkova, P., and Lapcik, L. (2000). Collagen - Properties, Modifications and Applications. *Chem. List.* 94, 371. Available at:
https://www.researchgate.net/publication/259573775_Collagen_-_Properties_Modifications_and_Applications
 21. Rýgllová, Š., Braun, M., and Suchý, T. (2017). Collagen and Its Modifications—Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis. *Macromol. Mater. Eng.* 302, 1600460. Available at: <https://doi.org/10.1002/mame.201600460>.
 22. Meyer, M. (2019). Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed. Eng. Online* 18, 24. Available at:
<https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>.
 23. Ahmed, M., Verma, A.K., and Patel, R. (2020). Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. *Sustain. Chem. Pharm.* 18, 100315. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352554120305544>.

24. Adamiak, K., and Sionkowska, A. (2020). Current methods of collagen cross-linking: Review. *Int. J. Biol. Macromol.* *161*, 550–560. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020335169>.
25. Suchý, T., Bartoš, M., Sedláček, R., Šupová, M., Žaloudková, M., Martynková, G.S., and Foltán, R. (2021). Various simulated body fluids lead to significant differences in collagen tissue engineering scaffolds. *Materials (Basel)*. *14*, 1–17. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8399520/>
26. Di Lisa, D., Dellacasa, E., and Pastorino, L. (2022). Enzymatic degradation of chitosan scaffold supporting 3D neuronal networks. *Mater. Lett.* *308*, 131196. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X21018942>.
27. Yilmaz, B., Pazarcıviren, A.E., Tezcaner, A., and Evis, Z. (2020). Historical development of simulated body fluids used in biomedical applications: A review. *Microchem. J.* *155*, 104713. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X19330693>.
28. Kokubo, T. (1991). Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* *12*, 155–163. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014296129190194F>.
29. Martin, N.C., Pirie, A.A., Ford, L. V, Callaghan, C.L., McTurk, K., Lucy, D., and Scrimger, D.G. (2006). The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. *Sci. Justice* *46*, 179–184. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135503060671591X>
30. Schille, C., Braun, M., Wendel, H.P., Scheideler, L., Hort, N., Reichel, H.-P., Schweizer, E., and Geis-Gerstorfer, J. (2011). Corrosion of experimental magnesium alloys in blood and PBS: A gravimetric and microscopic evaluation. *Mater. Sci. Eng. B* *176*, 1797–1801. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921510711001723>.
31. Martini, W.Z., Cortez, D.S., and Dubick, M.A. (2013). Comparisons of normal saline and lactated Ringer’s resuscitation on hemodynamics, metabolic responses, and coagulation in pigs after severe hemorrhagic shock. *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.* *21*, 1–12. Available at:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029282/>

32. Liu, S., and Wang, B. (2020). Electrochemical corrosion behavior of a magnesium calcium alloy in simulated body fluids with different glucose concentrations. *J. Mater. Res. Technol.* 9, 6612–6619. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S223878542031214X>.
33. Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Mater. Methods* 3, 1–29. Available at: <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>
34. McCullen, S.D., Chow, A.G.Y., and Stevens, M.M. (2011). In vivo tissue engineering of musculoskeletal tissues. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 715–720. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911000887>.
35. Koller, M.R., and Palsson, B. (1993). Tissue Engineering : Reconstitution of Human. *Biotechnology* 42, 909–930. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260420802>
36. Schwab, A., Meeuwssen, A., Ehlicke, F., Hansmann, J., Mulder, L., Smits, A., Walles, H., and Kock, L. (2017). Ex vivo culture platform for assessment of cartilage repair treatment strategies. *ALTEX* 34, 267–277. Available at: https://www.researchgate.net/publication/309367468_Ex_vivo_culture_platform_for_assessment_of_cartilage_repair_treatment_strategies
37. Przekora, A., Kazimierczak, P., and Wojcik, M. (2021). Ex vivo determination of chitosan/curdlan/hydroxyapatite biomaterial osseointegration with the use of human trabecular bone explant: New method for biocompatibility testing of bone implants reducing animal tests. *Mater. Sci. Eng. C* 119, 111612. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111612>.
38. Wu, Y.J., Chen, T., Chen, I.-F., Kuo, S.M., and Chuang, C.W. (2018). Developing highly porous collagen scaffolds by using alginate microsphere porogens for stem cell cultures. *Mater. Lett.* 223, 120–123. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X1830627X>.
39. Liao, S.S., and Cui, F.Z. (2004). In Vitro and in Vivo Degradation of Mineralized Collagen-Based Composite Scaffold: Nanohydroxyapatite/Collagen/Poly(L-

- lactide). *Tissue Eng.* *10*, 73–80. Available at:
<http://doi.org/10.1089/107632704322791718>
40. Safari, B., Aghazadeh, M., Roshangar, L., Aghanejad, A., and Davaran, S. (2022). A bioactive porous scaffold containing collagen/ phosphorous-modified polycaprolactone for osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Eur. Polym. J.* *171*, 111220. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305722002245>.
41. Ibara, A., Miyaji, H., Fugetsu, B., Nishida, E., Takita, H., Tanaka, S., Sugaya, T., and Kawanami, M. (2013). Osteoconductivity and biodegradability of collagen scaffold coated with nano- β -TCP and fibroblast growth factor 2. *J. Nanomater.* *2013*. Available at:
https://www.researchgate.net/publication/258396556_Osteoconductivity_and_Biodegradability_of_Collagen_Scaffold_Coated_with_Nano-beta-TCP_and_Fibroblast_Growth_Factor_2
42. Von Heimburg, D., Zachariah, S., Kühling, H., Heschel, I., Schoof, H., Hafemann, B., and Pallua, N. (2001). Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials* *22*, 429–438. Available at:
https://www.researchgate.net/publication/225871348_Human_Adipose_Precursor_Cells_Seeded_on_Hyaluronic_Scaffolds_a_Pilot_Clinical_Trial
43. Satish Kumar, T., Vijaya Ramu, D., and Sampath Kumar, N.S. (2019). Preparation and characterization of biodegradable collagen-Chitosan scaffolds. *Mater. Today Proc.* *19*, 2587–2590. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.10.091>.
44. Zhang, Q., Nakamoto, T., Chen, S., Kawazoe, N., Lin, K., Chang, J., and Chen, G. (2014). Collagen/wollastonite nanowire hybrid scaffolds promoting osteogenic differentiation and angiogenic factor expression of mesenchymal stem Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* *14*, 3221–3227. Available at:
https://www.researchgate.net/publication/261739732_CollagenWollastonite_Nanowire_Hybrid_Scaffolds_Promoting_Osteogenic_Differentiation_and_Angiogenic_Factor_Expression_of_Mesenchymal_Stem_Cells

10. Seznam obrázků

Obr. 1 Schéma tkáňového inženýrství[4]	14
Obr. 2: Kombinace jednotlivých biomateriálů, přeloženo z [16]	19
Obr. 3: Idealizovaný průběh léčby tumoru kosti pomocí kostního cementu [17] ...	20
Obr. 4: Fáze zpracovávání kolagenu a jejich vliv na vlastnosti, přeloženo z [22] ...	22
Obr. 5: Síťování kolagenu, přeloženo z [24]	23
Obr. 6: a) homogenizace nabobtnaného kolagenu b) lyofilizátor c-d) hotové scaffoldy	30
Obr. 7: a) nasazování DF do vzorků b) vakuování	31
Obr. 8: Kolagenové vzorky ponořené v simulovaném tělním prostředí, skupina MEM	31
Obr. 9: a) čerstvě implantovaný vzorek b) vzorek připravený k explantaci c-d) explantované vzorky	32
Obr. 10: a) nařezané a navrtané části femuru b) nasazení scaffoldů do kostiček c) scaffoldy v kostičkách d) vzorky vystavené kultivačnímu médiu	33
Obr. 11: a) zkušební stroj MTS Mini Bionix b) zatěžování vzorek vystavený médiu	34
Obr. 12: Graf vyhodnocující elastický gradient, směrnice červené křivky odpovídá elastickému gradientu	35
Obr. 13: Graf závislosti napětí na deformaci, černá čára vyznačuje stabilní hladinu napětí σ_{pl} , růžová konec stabilní hladiny na 50 % stlačení	36
Obr. 14: Graf závislosti napětí na deformaci pro určení W, modrá plocha znázorňuje její hodnotu	36
Obr. 15: Graf závislosti napětí na deformaci pro určení W_e , poměr modré plochy ku obdélníku (šedá + modrá) znázorňuje její velikost	37
Obr. 16: Elastický gradient kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou in vivo v jednotlivých časech (oboustranný t-test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)	41
Obr. 17: Elastický gradient kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích in vitro a MEM během různých časových úseků., Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **).....	42
Obr. 18: Stabilní hladina napětí kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se	

skupinou in vivo v jednotlivých časech (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)	43
Obr. 19: Stabilní hladina napětí kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích in vitro a MEM během různých časových úseků. Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)	44
Obr. 20: Absorbovaná energie kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou in vivo v jednotlivých časech (oboustranný t-test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)	44
Obr. 21: Absorbovaná energie kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích in vitro a MEM během různých časových úseků. Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný t-test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *)	45
Obr. 22: Účinnost absorbování energie kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků. Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou in vivo v jednotlivých časech (oboustranný t-test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, **)	46
Obr. 23: Účinnost absorbované energie kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích in vitro a MEM během různých časových úseků. Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný t-test $p \leq 0,05$, $n=7-11$, *)	47
Obr. 24: Hmotnostní úbytky kolagenových scaffoldů degradovaných v různých prostředích během různých časových úseků Párové porovnání jednotlivých skupin se skupinou in vivo v jednotlivých časech (oboustranný t-test $p \leq 0,05$, $n=6-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=6-11$, **)	48
Obr. 25: Hmotnostní úbytky kolagenových scaffoldů degradovaných v prostředích in vitro a MEM během různých časových úseků. Párové porovnání obou skupin v jednotlivých časech (oboustranný t-test $p \leq 0,05$, $n=6-11$, *), (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=6-11$, **)	49
Obr. 26: SEM snímky – náhledy: a) in vivo b) ex vivo c) in vitro d) MEM	50
Obr. 27: SEM snímky: a) in vivo b) ex vivo c) in vitro d) MEM; měřítko 500 μm .	51
Obr. 28: Velikost pórů po 21 dnech degradace, ORIG - suché nedegradované vzorky Párové porovnání jednotlivých skupin po 21 dnech degradace se skupinou in vivo (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05$, $n=3$, **)	51

Obr. 29: Porozita po 21 dnech degradace, ORIG - suché nedegradované vzorky. Párové porovnání jednotlivých skupin po 21 dnech degradace se skupinou in vivo (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05, n=3, **$).....	52
Obr. 30: Srovnání FTIR spekter vybraných materiálů ve střední infračervené oblasti spektra ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$).....	53
Obr. 31: a) plocha šroubovicové struktury kolagenu (1660) ($n=10$) a b) poměr ploch 1660/1690 ($n=20$). Párové porovnání jednotlivých skupin po 21 dnech degradace se skupinou ORIG (oboustranný Mann-Whitney test $p \leq 0,05, **$)	54
Obr. 32: Mapování anorganických a/nebo organických nečistot a přídatných látek ve vybraných materiálech. (modré tečky – pásy fosforečnanu vápníku, růžové tečky – pásy lipidů).....	54

11. Seznam tabulek

Tabulka 1: Biomateriály v TE, přeloženo z [9]	16
Tabulka 2: Syntetické polymery a jejich vlastnosti [4]	18
Tabulka 3: Průměrné zastoupení aminokyselin v kolagenu z hovězí kůže [21].....	21
Tabulka 4: Klasifikační stupnice pro míru věcné významnosti.....	40
Tabulka 5: Míra věcné významnosti pro porovnávání elastického gradientu v jednotlivých prostředí s prostředím in vivo (pro Obr. 16), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká	41
Tabulka 6: Míra věcné významnosti pro porovnávání elastického gradientu (pro Obr. 17), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená – malá, žlutá – střední, červená – velká	42
Tabulka 7: Míra věcné významnosti pro porovnávání stabilní hladiny napětí v jednotlivých prostředí s prostředím in vivo (pro Obr. 18), skupina označená ** obsahuje hodnoty koeficientu pořadové biseriální korelace r_B , zelená – malá, žlutá – střední, červená – velká	43
Tabulka 8: Míra věcné významnosti pro porovnávání stabilní hladiny napětí (pro Obr. 19), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, zelená - malá, žlutá - střední, červená - velká	44
Tabulka 9: Míra věcné významnosti pro porovnávání absorbované energie v jednotlivých prostředí s prostředím in vivo (pro Obr. 20), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká	45
Tabulka 10: Míra věcné významnosti pro porovnávání absorbované energie (pro Obr. 21), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká.....	45
Tabulka 11: Míra věcné významnosti pro porovnávání účinnosti absorbované energie v jednotlivých prostředí s prostředím in vivo (pro Obr. 22), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká	46
Tabulka 12: Míra věcné významnosti pro porovnávání účinnosti absorbované energie (pro Obr. 23), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, zelená – malá, žlutá – střední, červená - velká	47

Tabulka 13: Míra věcné významnosti pro porovnávání hmotnostních úbytků v jednotlivých prostředí s prostředím in vivo (pro Obr. 24), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká 48

Tabulka 14: Míra věcné významnosti pro porovnávání hmotnostních úbytků (pro Obr. 25), skupina označená * obsahuje hodnoty Cohena d, skupina označená ** koeficient pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká..... 49

Tabulka 15: Míra věcné významnosti pro porovnávání velikosti pórů (pro Obr. 28), skupina označená ** obsahuje hodnoty koeficientu pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká 52

Tabulka 16: Míra věcné významnosti pro porovnávání porozity (pro Obr. 29), skupina označená ** obsahuje hodnoty koeficientu pořadové biseriální korelace r_B , zelená - malá, žlutá – střední, červená - velká 52