



**FAKULTA
STROJNÍ
ČVUT V PRAZE**

Diplomová práce

Vliv různých simulovaných tělních prostředí na mechanické
a strukturní vlastnosti kolagen/PLCL kompozitů

Vendula Karbánová

Praha

2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Karbánová** Jméno: **Vendula** Osobní číslo: **473563**
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:

Vliv různých simulovaných tělních prostředí na mechanické a strukturní vlastnosti kolagen/PLCL kompozitů

Název diplomové práce anglicky:

The effect of various simulated body environments on mechanical and structural properties of collagen/PLCL composites

Pokyny pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na téma způsobů testování vlivu tělního prostředí v podmínkách in vitro a in vivo na materiály určené pro náhrady a léčbu měkkých tkání, kriticky zhodnoťte jejich přínosy a omezení
2. Navrhněte a realizujte experimentální analýzu mechanických a strukturních vlastností kolagen/PLCL kompozitů za podmínek simulujících tělní prostředí a v prostředí in vivo
3. Analyzujte vliv použitých prostředí na mechanické a strukturní vlastnosti kompozitů
4. Interpretujte výsledky s ohledem na typ použitých simulovaných prostředí a prostředí in vivo, kriticky zhodnoťte možnosti jejich vzájemné extrapolace

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. Helling AL, et al. 2017 ACS Biomater. Sci. Eng. 3:1922–1932. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00563>
4. In Jeong S, et al. 2004 Biomacromolecules 5:1303–1309. <https://doi.org/10.1021/bm049921i>

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:

doc. Ing. Lukáš Horný, Ph.D. odbor biomechaniky FS

Datum zadání diplomové práce: **07.04.2022**

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

Diplomantka bere na vědomí, že je povinna 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.

7. 4. 2022

Datum převzetí zadání

Karbánová

Podpis studentky

Anotační list

Jméno autora:	Vendula Karbánová
Název DP:	Vliv různých simulovaných tělních prostředí na mechanické a strukturní vlastnosti kolagen/PLCL kompozitů
Anglický název:	The effect of various simulated body environments on mechanical and structural properties of collagen/PLCL composites
Rok:	2022
Ústav:	Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
Vedoucí práce:	doc. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.
Druhý vedoucí práce:	doc. Ing. Lukáš Horný, Ph.D.
Bibliografické údaje:	Počet stran: 76 Počet obrázků: 30 Počet tabulek: 17

Klíčová slova:

Kolagen, poly(laktid-ko-kaprolakton), kopolymer, nanovlákná, kompozity, biodegradace

Keywords:

Collagen, poly(lactide-co-caprolactone), copolymer, nanofibers, composites, biodegradation

Abstrakt

Nanovlákná tvoří vysoce porézní struktury, které jsou schopny pojmout větší objem tekutin než běžné mikro či makrostruktury. Hydratace může významně ovlivnit jejich mechanické vlastnosti, proto je nutné zkoumat nanovláknenné materiály určené pro vlhké prostředí minimálně v hydratovaném stavu. Materiály určené pro náhradu měkkých tkání jsou však vystaveny daleko náročnějším podmínkám. Lidské tělo působí na náhrady mnoha faktory, musíme brát v úvahu pH, mechanické zatížení, enzymy, buňky atd. Existuje několik způsobů, jak simulovat tělní prostředí. Volba závisí především na finálním účelu daných materiálů a finančních možnostech. Tato práce je zaměřena na popis rozdílů mezi degradací ve vybraných simulovaných tělních podmínkách a degradací *in vivo*. Experimenty byly provedeny na kompozitech na bázi nanovláknenného kopolymeru ϵ -kaprolaktonu a L-laktidu s kolagenovou maticí (typ I). Takový kompozit je teoreticky vhodným kandidátem pro použití při výrobě bandáží plicních tepen pro kardiovaskulární chirurgii. Účinky vybraných médií byly stanoveny pomocí aplikace tahových zkoušek, úbytků hmotnosti a rastrovací elektronové mikroskopie.

Abstract

Nanofibers represent highly porous structures that exert a significantly higher swelling ratio than micro or macrostructured forms. Hydration can significantly affect their mechanical properties, so it is necessary to examine the behavior of nanofibrous materials intended for applications in wet environments at least in a hydrated state. However, materials intended for soft tissue replacements are exposed to far more demanding conditions. The physiological environment leads to the gradual degradation of these materials. The human body affects the material through many factors including pH, mechanical stress, enzymes, cells, etc. There are several ways to simulate body conditions. The choice depends on the final purpose of the prepared material and financial possibilities. This study focuses on the description of the differences between degradation in selected simulated body conditions and degradation *in vivo*. The experiments were performed on nanofibrous composites based on ϵ -caprolactone/L-lactide copolymer nanofibers and a collagen matrix (type I). Such composite is theoretically a suitable candidate to be used in the production of pulmonary artery bandings for cardiovascular surgery. The mechanical and structural effects of the enzyme-free or enzymatic media were determined via the application of tensile mechanical tests, the determination of mass loss, and scanning electron microscopy.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v příloženém seznamu.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Praze dne

Vendula Karbánová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala doc. Ing. Tomáši Suchému, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a čas, který mi v průběhu zpracování této diplomové práce věnoval. Děkuji doc. Ing. Lukáši Hornému, Ph.D. za pomoc s vyhodnocením mechanických zkoušek. Mé poděkování dále patří Ing. Lucii Vištejnové, Ph.D., Ing. Hynku Chlupovi, Ph.D., Ing. Jakubu Kronkovi, Ph.D., Ing. Monice Šupové, Ph.D., Ing. Margit Žaloudkové, Ph.D., Lence Borecké a Martině Křížkové za všechny hodiny strávené v laboratoři. Bez Vás by tato práce nebyla úplná.

Seznam symbolů použitých v textu

značka	jednotka	název
E	[MPa]	modul pružnosti v tahu
F	[N]	síla
F_m	[N]	maximální síla před přetržením
L_0	[mm]	počáteční délka
ΔL	[mm]	prodloužení
M_n	[1]	číselný průměr relativní molekulové hmotnosti
M_w	[1]	hmotnostní průměr relativní molekulové hmotnosti
m	[mg]	konečná hmotnost
m_0	[mg]	počáteční hmotnost
Δm	[%]	hmotnostní úbytek
n (N)	[1]	počet
R_m	[MPa]	smluvní mez pevnosti v tahu
S_0	[mm^2]	počáteční plocha příčného průřezu
γ_{LG}	[Nm^{-1}]	napětí na rozhraní kapalina – plyn
γ_{SG}	[Nm^{-1}]	napětí na rozhraní pevná látka – plyn
γ_{SL}	[Nm^{-1}]	napětí na rozhraní pevná látka – kapalina
ϵ	[1]	poměrné prodloužení
θ	[$^\circ$]	kontaktní úhel
σ	[MPa]	napětí

Seznam zkratek

zkratka	název
CA	kontaktní úhel (contact angle)
CL	ϵ -kaprolakton
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eagle médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMEMf	kultivační médium (DMEM) s fibroblasty
EDC	N-(3 dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochlorid
EDS	energiově disperzní spektroskopie (energy dispersive spectroscopy)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared spectroscopy)
IR	infračervené (infrared)
LA	L-laktid
MEM	minimální esenciální médium (Minimum Essential Medium)
NHS	N-hydroxysukcinimid
PAB	bandáž plicní tepny (pulmonary artery banding)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCL	polykaprolakton
PLA	polylaktid
PLCL	poly(laktid-ko-kaprolakton)
PLLA	poly(L-laktid)
SEM	skenovací elektronový mikroskop (scanning electron microscope)
SBF	simulovaná tělní tekutina (simulated body fluid)
TEM	transmisní elektronový mikroskop (transmission electron microscope)

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Teoretická část	3
3.1	Bandáž plicní arterie	3
3.2	Použitý materiál	4
3.2.1	Kolagen	5
3.2.2	Poly(laktid-ko-kaprolakton)	6
3.3	Simulace tělního prostředí	7
3.3.1	Jednoduchá média	8
3.3.2	Enzymatická a chemická degradace	9
3.3.3	Média na bázi bílkovin	10
3.3.4	Testy <i>in vivo</i>	10
3.4	Popis degradace	11
3.4.1	FTIR	11
3.4.2	Elektronová mikroskopie	12
3.4.3	EDS analýza	12
3.4.4	Měření kontaktního úhlu	13
3.4.5	Měření molekulové hmotnosti	14
3.4.6	Popis mechanických vlastností	14
4	Experimentální část	15
4.1	Příprava materiálu	15
4.2	Degradace	16

4.3	Testování	20
4.3.1	Tahová zkouška	20
4.3.2	Hmotnostní úbytky	21
4.3.3	Obrazová analýza	21
4.3.4	EDS analýza	22
4.3.5	Biologické hodnocení	22
4.3.6	Statistické vyhodnocení	23
5	Výsledky	24
5.1	Tahová zkouška	24
5.1.1	Statistické vyhodnocení tahových zkoušek	25
5.2	Hmotnostní úbytky	29
5.2.1	Statistické vyhodnocení hmotnostních úbytků	30
5.3	Obrazová analýza	32
5.4	EDS analýza	34
5.5	Biologické hodnocení	34
6	Diskuse	36
7	Závěr	38
	Publikované výsledky	39
	Literatura	40
A	Q-Q grafy	49
B	Statistické vyhodnocení: párové porovnání	59
C	Výsledky EDS analýzy	63

1 Úvod

Dnešní kardiovaskulární chirurgii bychom si nedovedli představit bez umělých náhrad a bandáží nativních tkání. Umožňují léčit pacienty s kardiovaskulárním onemocněním nebo alespoň snižují rizika s ním spojená. Příkladem může být bandáž aneurysmatu. Umístíme-li bandáž v oblasti rozšíření cévy můžeme předejít patologické deformaci a ruptuře. Umělé náhrady však s sebou nesou komplikace. Například ne vždy potřebuje pacient permanentní oporu tkáně. Použití neodbouratelného materiálu při výrobě náhrady tedy potom nutně vede k reoperaci a vyjmutí. Biodegradabilní materiál by pacienta ušetřil druhého chirurgického zákroku. Vhodnou kombinací přírodních a syntetických materiálů bychom mohli náhradu „ušít na míru“ danému účelu. Výběrem materiálů a způsobem zpracování jsme do jisté míry schopni ovlivnit mechanické vlastnosti a degradační profil výsledné náhrady.

Tato práce se zabývá chováním teoreticky vhodného materiálu k výrobě bandáží plicních tepen za různých degradačních podmínek. Materiál se skládá z nanovláken kopolymeru poly(laktid-ko-kaprolaktonu) a kolagenové matrice. Poměr jednotlivých materiálů ve směsné vrstvě byl zvolen na základě předchozích studií.

Protože stále nebyly prozkoumány a popsány odlišnosti v působení různých degradačních prostředí na nanovláčenné materiály, klade si tato práce za cíl alespoň částečně popsat rozdíly mezi degradací v simulovaných tělních podmínkách a degradací *in vivo*.

Práce byla součástí projektu NU20-02-00368 „Biomechanicky definované vstřebatelné materiály pro kardiovaskulární chirurgii“ podpořeného Agenturou pro zdravotnický výzkum MZ ČR, jehož cílem je vývoj resorbovatelné arteriální bandáže pro účely redukce průtoku krve arteriálním řečištěm a na ochranu arteriální stěny před patologickou deformací a rupturou.

2 Cíle práce

Tato práce si klade za cíl alespoň částečně popsat rozdíly mezi degradací v simulovaných tělních podmínkách a degradací *in vivo*. Rozsah degradace bude popsán na základě analýzy a statistického vyhodnocení:

1. počátečních modulů pružnosti,
2. smluvních mezí pevnosti v tahu a
3. hmotnostních úbytků.

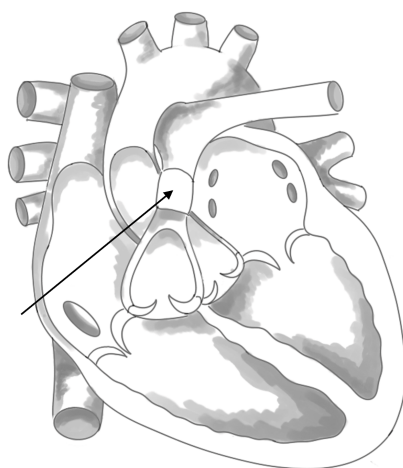
Strukturní vlastnosti budou popsány na základě snímků pořízených metodou skenovací elektronové mikroskopie.

Nulovou hypotézou této práce je předpoklad, že expozice ve vybraných simulovaných prostředích vede ke stejným změnám v mechanických a strukturních vlastnostech jako expozice v tělním prostředí.

3 Teoretická část

3.1 Bandáž plicní arterie

Hlavním důvodem, jenž vedl k výběru kolagen/PLCL kompozitu k testování vlivu různých simulovaných tělních prostředí bylo jeho teoretické využití - materiál je vhodným kandidátem pro výrobu bandáží plicních tepen (PAB) (viz Obr. 3.1). Protože je pouze teoreticky vhodný je nutné jej řádně otestovat. Tento experiment umožnil souběžně sledovat změny v mechanických vlastnostech a degradační chování zmiňovaného kompozitu, přičemž mohl být splněn hlavní cíl práce - porovnat rozdíly v simulovaných tělních prostředích.



Obrázek 3.1: Bandáž plicní arterie

PAB byla zavedena v roce 1952 jako paliativní procedura pro pacienty s vrozenými srdečními vadami charakterizovanými zvýšeným průtokem krve a zvýšeným tlakem v plicích. Princip zákroku spočívá v implantaci proužku materiálu kolem plicní tepny, který sníží průtok krve [1]. Tímto způsobem je pacientovi poskytnuta

ochrana před nevratnou plicní hypertenzí. V závažných případech vede tato hemodynamická abnormalita ke zvýšené námaze pravé srdeční komory. Při dlouhém trvání dochází působením vysokého tlaku ke zvětšení pravé komory a postupné ztrátě funkce [2, 3].

Bandáž s fixním rozměrem (průměrem) však nespĺňuje kontinuálně se měnící požadavky na rozměr. V případě, kdy je proužek implantován dětskému pacientovi, je nutné bandáž vzhledem k růstu dítěte povolit. Proto bylo učiněno několik pokusů vyvinout nastavitelné bandáže, umožňující vnější regulaci během hodin nebo dnů po chirurgickém zákroku [1]. Problém nastává i v situaci, kdy pacient bandáž již nadále nepotřebuje. Při zákroku se využívá gázy či např. teflonu [4]. Použití neodbouratelného materiálu vede nutně k reoperaci a vyjmutí. Biodegradabilní materiál by pacienta ušetřil druhého zákroku.

3.2 Použitý materiál

Tvorba cévních náhrad i podpor vyžaduje porozumění cévní stavbě. Při návrhu je nutné vzít v úvahu pulzující krevní tlak. Náročné prostředí vyžaduje materiály, které nejenže vydrží mechanické zatížení, ale také podpoří rychlou endotelizaci.

Přírodní polymery jako je hedvábí, želatina či kolagen podporují adhezi a proliferaci buněk. Ze syntetických polymerů je vhodným příkladem polykaprolakton (PCL).

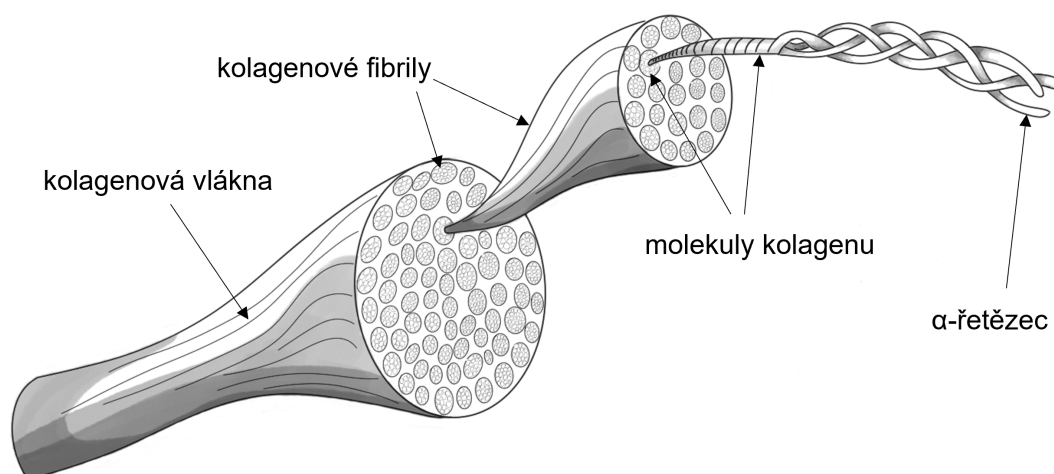
Materiály bandáží lze použít v různých formách, jakými jsou například síťky, fólie, textilie nebo nanovláknenné vrstvy. Dostupnou metodou výroby nanovláken je elektrostatické zvlákňování. Tato metoda umožňuje nastavit parametry výroby tak, abychom docílili žádoucích strukturních vlastností výsledného materiálu. Například průměry vláken lze řídit změnou koncentrace a složením roztoku polymeru. Vlákna mohou být náhodně orientována nebo zarovnána v závislosti na rychlosti otáčení kolektoru.

Dostupné metody umožňují vytvořit materiál na míru danému účelu. Studie naznačují, že více vrstev nanovláken v různých orientacích může zlepšit životaschopnost buněk [5]. S touto myšlenkou byl vyroben kompozit z nanovláknenných vrstev

kopolymeru poly(laktid-ko-kaprolaktonu) (PLCL), které byly impregnovány kolagenovou disperzí.

3.2.1 Kolagen

Kolageny tvoří až 30 % všech bílkovin v lidském těle. Dosud bylo identifikováno asi 30 různých typů kolagenu. Nejhojněji se vyskytující typy kolagenu jsou tzv. fibrilotvorné. Mezi ně patří kolagen typu I, který se vyskytuje především v kostech, šlachách, kůži, dentinu atd., typ II vyskytující se většinou v chrupavce a typ III v kůži. Tyto typy vykazují charakteristickou pevnost s třířetězcovou helikální strukturou (schéma na Obr. 3.2) o délce kolem 300 nm a středním průměru 1,5 nm. Ostatní typy kolagenu jsou spíše orgánově specifické [6].



Obrázek 3.2: Struktura kolagenu

Mnoho onemocnění a defektů pojivové tkáně je spojeno se špatnou syntézou nebo nadměrnou degradací kolagenu. Moderní přístup tkáňového inženýrství spočívá v nahrazení poškozené tkáně pomocí biokompatibilního scaffoldu, který slouží jako nosič buněk podporující růst a proliferaci. Kolagen je široce používán v oblasti klinické medicíny v souvislosti s tvrdými i měkkými tkáněmi. Nicméně určité vlastnosti kolagenu, jako je špatná prostorová stabilita, nízká pevnost *in vivo*, proměnlivá po-

vaha ve smyslu enzymatické degradace, hustota síťování, velikost vláken, stopové nečistoty a vedlejší účinky často omezují jak jeho analýzu, tak aplikaci.

Zatímco nativní kolagenová tkáň má významnou pevnost, tato pevnost se ztrácí, když jsou kolagenové produkty vyrobeny z rozpustného kolagenu, např. po elektrostatickém zvláknění, kdy je materiál rozpustný dokonce v čisté vodě. Po degradaci se na sekundární úrovni vytváří vazebná místa pro vodu, a tím je kolagen rozpustnější.

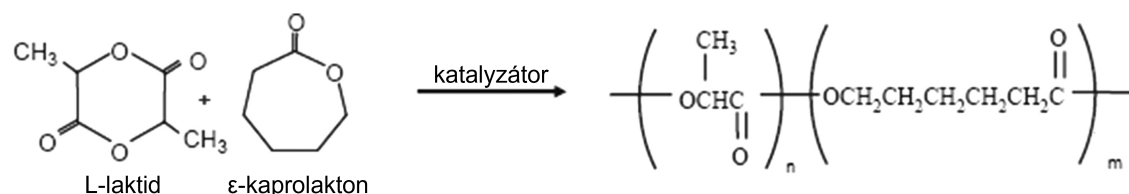
Laboratorně vyrobená kolagenová vlákna vykazují nízkou pevnost v tahu a jsou citlivá na vlhkost. Kolagen je velice závislý na hydrataci. Voda plní elementární funkci ve smyslu zachování jeho fyzikálních vlastností. Pro jejich udržení je nutné, aby až 20 % z celkové hmotnosti kolagenu zaujímala voda. V nízko hydratovaném nebo dehydratovaném kolagenu jsou polypeptidové řetězce omezeny ve svém pohybu. S rostoucí hydratací se však tyto řetězce uvolňují. Vlákna jsou dále citlivá na zvýšenou teplotu a nekontrolovatelně degradují působením enzymů. Vše zmiňované může omezovat jejich použití, proto je nutné takto připravený kolagen chemicky zesíťovat.

Protože samotný kolagen se vyznačuje relativně špatnými mechanickými vlastnostmi ve srovnání s nativními tkáněmi, používá se v kombinaci s dalšími přírodními či syntetickými polymery ve formě kompozitů [6].

3.2.2 Poly(laktid-ko-kaprolakton)

Nejčastěji používanými polymery jsou alifatické polyestery na bázi L-laktidu (LA), glykolidu, ϵ -kaprolaktonu (CL) a polyethylenglykolu. Většina dnes studovaných absorbovatelných polymerů, např. poly(L-laktid) (PLLA), vykazují velmi podobné mechanické chování s vysokým modulem pružnosti a spíše nízkými hodnotami prodloužení při přetržení kvůli jejich vysoké teplotě skelného přechodu a krystalinitě. Tyto materiály jsou zjevně nevhodné pro četná klinická použití, kde jsou vyžadovány vysoce flexibilní biologicky odbouratelné materiály. Nedostatky, kterými disponují polylaktidy (PLA), mohou být překonány smícháním nebo kopolymerizací s polymery s nižší teplotou skelného přechodu jako je PCL s $T_g = -60$ °C. Stupeň mísitelnosti PLA a PCL je bohužel nízký.

Vhodnou metodou výroby poly(laktid-ko-kaprolaktonu) může být kopolymerace LA s CL (viz Obr. 3.3). Parametry výroby lze řídit mechanické vlastnosti, chování tvarové paměti, rychlost degradace a případné uvolňování léčiva výsledného kopolymeru [7].



Obrázek 3.3: Schéma syntézy PLCL, upraveno z [7]

3.3 Simulace tělního prostředí

Nanovláknina tvoří vysoce porézní struktury, jež jsou schopny pojmout velký objem tekutin. Hydratace může významně ovlivnit jejich mechanické vlastnosti, proto je nutné zkoumat nanovláknenné materiály určené pro vlhké prostředí minimálně v hydratovaném stavu [8]. Materiály určené pro náhrady měkkých tkání jsou však vystaveny daleko náročnějším podmínkám. Fyziologické prostředí vede k postupné degradaci těchto materiálů. Lidské tělo působí na náhrady mnoha faktory, musíme brát v úvahu pH, mechanické zatížení, enzymy, buňky atd. V průběhu vývoje biomateriálů ale není vždy možné provádět *in vivo* experimenty na zvířatech. Zejména v raných fázích, kdy dochází k jejich optimalizaci. Aplikace experimentálních zvířecích modelů je přísně kontrolována etickými pravidly a nejčastěji je využívána až v závěrečné části procesu vývoje biomateriálu. Simulace tělního prostředí tedy představuje užitečný přístup v celkovém experimentálním procesu [9]. Existuje více způsobů, jakými simulujeme tělní podmínky. Výběr závisí na finálním účelu připraveného materiálu a finančních možnostech.

3.3.1 Jednoduchá média

Mezi běžné způsoby patří simulace pomocí jednoduchého média. Nejčastěji používaným médiem pro *in vitro* testování je fosfátový pufr (PBS) (sloučenina Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4). Roztok PBS je formulován tak, aby zabránil osmotickému šoku a udržel vodní rovnováhu v živých buňkách. Dále se používá fyziologický roztok (0,9% vodný roztok $NaCl$). V případech, kdy je zkoumán krátkodobý účinek hydratace na materiál nebo je předmětem zájmu obsah tekutin, který je materiál schopný pojmout, je možné použít jen destilovanou vodu. Největší výhodou těchto způsobů simulace je finanční nenáročnost. Při pravidelné výměně média jsme schopni pozorovat degradaci testovaného materiálu v řádu dnů, ale i let [10]. Takové médium však nezastane všechny funkce těla, neobsahuje enzymy ani buňky, které degradaci ve většině případů urychlují.

Simulovaná tělní tekutina

Komplexnějším médiem je simulovaná tělní tekutina (SBF), která se používá především při testech materiálů používaných k náhradám kostní tkáně. Umělé materiály implantované do kostních defektů bývají velmi často zapouzdřeny vazivovou tkání, což vede k jejich izolaci od okolní kosti. Už dříve však bylo ukázáno, že některá bioskla se spontánně navazují na živou kost, stejně tak několik typů keramiky. Tyto materiály však nejsou mechanicky kompatibilní s okolní kostí, proto se inženýři stále snaží o vývoj nových materiálů. S otázkou, jaký typ materiálu se váže k živé kosti přišla i další, a to jak *in vivo* bioaktivitu šetrně otestovat. Bylo zjištěno, že zkoumání tvorby apatitu na materiálu v SBF je užitečné pro predikci *in vivo* kostní bioaktivity materiálu. Počet zvířat použitých při následných experimentech a trvání pokusů lze použitím této metody výrazně snížit. SBF a její modifikované verze simulují koncentraci iontů v anorganické části lidské krevní plazmy (viz Tab. 3.1) a jsou v literatuře běžně doporučovány jako médium používané pro stanovení degradačních profilů různých (nejen keramických) materiálů [9, 11].

Tabulka 3.1: Nominální iontové koncentrace v SBF ve srovnání s koncentracemi v lidské krevní plazmě [11]

iont	iontová koncentrace (mM)	
	krevní plazma	SBF
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	103,0	147,8
HCO_3^-	27,0	4,2
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5
pH	7,2-7,4	7,4

3.3.2 Enzymatická a chemická degradace

Enzymy jsou biologické katalyzátory. To znamená, že urychlují reakce v živých organismech, aniž by samy podstoupily jakoukoli trvalou změnu. Hydrolytické reakce mohou být katalyzovány enzymy známými jako hydrolázy, které zahrnují mimo jiné proteázy, esterázy, glykosidázy a fosfatázy. Tyto enzymy jsou přítomny například v plazmě, v membráně kartáčového lemu a lumen gastrointestinálního traktu a v tubulárním epitelu ledvin, kde zajišťují účinnou hydrolýzu různých substrátů, aby usnadnily absorpci živin a rozpuštěných látek. Po implantaci je tělo navíc schopné v reakci na cizí předmět reagovat zvýšenou tvorbou enzymů, materiály jsou tak vystaveny agresivnějšímu prostředí [12].

Polymerní látky se mohou v těle rozkládat i díky chemické degradaci. Je dobře známo, že buňky, zejména leukocyty a makrofágy, jsou schopny během zánětlivé reakce produkovat vysoce reaktivní formy kyslíku jako je super oxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2), oxid dusnatý (NO) a kyselina chlorná ($HClO$). Oxidační účinek těchto látek může způsobit štěpení polymerního řetězce a přispět tak k degradaci materiálu [12].

Vzhledem ke schopnosti těla zvýšit tvorbu enzymů a reaktivních forem kyslíku je při simulaci tělního prostředí nutno zvážit jakou hladinu daného enzymu zvolit.

3.3.3 Média na bázi bílkovin

Přesnější simulace tělního prostředí však vyžaduje více složek biologického původu jako aminokyseliny, proteiny, glukózu, vitamíny a enzymy, (případně i buňky). Pro tento účel jsou využívána kultivační média, tedy speciální média určená především pro kultivaci různých typů buněk. Základ minimálního esenciálního média (MEM) tvoří šest solí a glukóza doplněné 13 esenciálními aminokyselinami a osmi vitamíny. Další varianty MEM jako je Dulbeccovo modifikované Eagle médium (DMEM) nebo α -MEM byly vyvinuty většinou přidáním dalších vitamínů, aminokyselin a/nebo jiných živin. Navíc pro účely buněčné kultivace jsou taková média dále doplněna fetálním bovinním sérem a antibiotiky [9].

Všechna zmiňovaná média lze využít při různých testech. Mohou se jednoduše nalít do zkumavky k testovanému materiálu, uzavřít do inkubátoru a následně můžeme pozorovat, co se s materiálem děje. Tělo ale není statické prostředí, proto se vyvíjí i jiné metody a přichází se s novými přístupy testování. Materiály jsou uzavírány do třepaček, jsou prováděny tribologické testy, cévní náhrady se vkládají do okruhů s čerpadly, které se snaží napodobit krevní oběh a testy s buňkami se také posunuly dál. Ke zvýšení proliferace se mohou buňky vystavit dynamickému zatížení, jež se více podobá reálnému tělnímu prostředí.

3.3.4 Testy *in vivo*

Využívání zvířat pro vědecké účely je dlouhodobou praxí v biologickém výzkumu i medicíně. Pozoruhodné anatomické a fyziologické podobnosti mezi lidmi a zvířaty, zejména savci, přiměly výzkumníky k prozkoumání široké škály mechanismů a posouzení nových terapií na zvířecích modelech před aplikací jejich objevů na lidi. Ne všechny výsledky lze však přímo převést na lidský organismus [13]. Už při prvním pohledu pozorujeme zjevné rozdíly ve stavbě těla. Nemůžeme očekávat stejné mechanické zatížení tkání u zvířat jako u lidí. Testy na zvířatech tak lze zařadit mezi další

způsoby simulace lidského tělního prostředí. Jak řekl Norbert Wiener: „*Nejlepším materiálovým modelem kočky je jiná, nebo nejlépe stejná kočka.*“

3.4 Popis degradace

V důsledku degradace mohou biodegradovatelné polymery podléhat po implantaci řadě změn ve svých vlastnostech. Tyto změny mohou ohrozit jejich funkci a vyvolat nežádoucí reakci organismu. Proto je důležité monitorovat změny, ke kterým dochází v různých fázích degradace.

V raných fázích degradace je nejvýznamnější událostí postupná difúze vodného roztoku do polymerní matrice, přičemž dochází k malým změnám v hmotnosti vzorku, v molekulové hmotnosti a následně v pevnosti polymeru v tahu. Hlavní změny souvisejí se změnami probíhajícími na povrchu. Postupem času dochází k významnějším ztrátám, kdy se štěpí dlouhé polymerní řetězce.

Hlavní techniky používané k hodnocení degradace biomateriálů lze rozdělit na povrchovou analýzu (infračervená spektroskopie, skenovací elektronová mikroskopie, EDS analýza, měření kontaktního úhlu), která je vhodnější pro sledování změn vyskytujících se v prvních fázích degradace, a na objemovou analýzu (stanovení změn molekulové hmotnosti, úbytků hmotnosti, změn v mechanických vlastnostech) pro charakterizaci pozdějších fází degradace [12].

Následující text pojednává o metodách běžně používaných k popisu degradace materiálů určených pro náhrady a léčbu měkkých tkání. Protože se jedná o velice rozsáhlou problematiku, není v možnostech této práce ji celou pokrýt.

3.4.1 FTIR

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je jednou z důležitých analytických technik, kterou lze použít pro charakterizaci vzorků v různých formách (tj. ve formě kapaliny, pasty, prášku, filmu, vlákna či plynu). Během FTIR analýzy jsou vzorky vystaveny infračervenému (IR) záření. IR záření má vliv na atomové vibrace v molekule vzorku. Každý materiál má svou specifickou odezvu – absorpci a/nebo přenos energie. Výsledkem je funkční závislost v procentech transmi-

tance nebo jednotkách absorpance na vlnové délce dopadajícího záření [14, 15]. Nevýhodou bývá náročnější interpretace výsledků.

3.4.2 Elektronová mikroskopie

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) je jedním z nejuniverzálnějších dostupných nástrojů pro zkoumání a analýzu morfologie mikrostruktury. Během čtených experimentů v 90. letech 19. století bylo zjištěno, že elektrony mohou být vychylovány magnetickým polem. Tento objev dal vzniknout elektronové mikroskopii, kdy byl zdroj světla nahrazen vysokoenergetickým elektronovým paprskem. Tímto způsobem byl ve 30. letech 20. století zkonstruován první transmisní elektronový mikroskop (TEM), ve kterém byl elektronový paprsek zaostřován elektromagnetickou kondenzátorovou čočkou na povrch preparátu [16]. SEM (někdy také nazývaný rastrovací elektronový mikroskop) byl vynalezen brzo po TEM, ale trvalo déle, než se vyvinul do praktického nástroje pro vědecký výzkum. Rastrovací elektronové mikroskopy v současnosti převyšují transmisní a používají se v mnoha oblastech, včetně lékařského a materiálového výzkumu, polovodičového průmyslu a ve forezních laboratořích. Zatímco konvenční TEM používá stacionární paprsek, SEM skenuje vzorek horizontálně ve dvou na sebe kolmých směrech. Celý postup je známý jako rastrové skenování, kdy paprsek postupně pokryje obdélníkovou oblast vzorku [17].

3.4.3 EDS analýza

Energiově disperzní spektroskopie (EDS, někdy nazývaná EDX nebo energiově disperzní rentgenová analýza) je jednou z nejčastěji používaných chemických analýz. Používá se jako doplněk k SEM. Analýza povrchu je provedena v řádu minut a výsledná spektra jsou snadno interpretovatelná. Má však svá omezení: jedná se o povrchovou metodu a poskytuje informace pouze o složení ve formě atomů nikoliv molekul.

Charakteristický proces generování rentgenového záření je zahájen vypuzením elektronu z vnitřní slupky. Atom se dostává do excitovaného stavu. Aby se atom dostal do stavu původního, musí se elektron z vyšší energetické hladiny přesunout

do prázdného místa vnitřní vrstvy. Generované rentgenové záření je rovno rozdílu energetických hladin [18].

3.4.4 Měření kontaktního úhlu

Smáčivost je ovlivněna jak chemickým složením, tak strukturou povrchu materiálu. Hlavní index používaný k jejímu hodnocení je kontaktní úhel (CA). Obvykle popisuje chování kapky kapaliny na pevném povrchu ve vzduchu a je definován jako úhel mezi pevným povrchem a tečnou ke kapce vedoucí bodem styku všech tří rozhraní (pevný povrch, kapalina, vzduch), viz Obrázek 3.4. Nedávné studie zkoumající chemické a strukturní stavy určily, že hranice mezi hydrofilním a hydrofobním povrchem je při $CA = 65^\circ$.

Vztah mezi CA a napětím na rozhraní lze popsat Youngovou rovnicí:

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG} \cdot \cos \theta = 0, \quad (3.1)$$

kde θ představuje CA a γ_{SG} , γ_{SL} a γ_{LG} představují napětí na rozhraní pevná látka – plyn, pevná látka – kapalina a kapalina – plyn. Youngova rovnice je však sestavena pro ideálně hladký povrch a jedinečný úhel θ . Kapka umístěná na skutečném povrchu má jisté spektrum CA. Dnes se k určení CA používají programy, které pracují s videozáznamem kapky. S jejich pomocí lze získat i popis hystereze kontaktního úhlu [19].



Obrázek 3.4: Schéma přisedlé kapky (Youngův model)

3.4.5 Měření molekulové hmotnosti

Jednou z nejdůležitějších analýz sloužících k popisu degradace polymerních materiálů je stanovení molekulové hmotnosti. Změnami v molekulové hmotnosti je ovlivněno mnoho dalších vlastností včetně mechanických vlastností a krystalinity. Jejich vlivem dále dochází ke změnám v úbytcích hmotnosti a v morfologii. Molekulová hmotnost může být stanovena např. gelovou permeační chromatografií či viskozimetrickými technikami. Hlavní užitečné parametry jsou číselný (M_n) a hmotnostní průměr molekulové hmotnosti (M_w). Poměr M_w k M_n je znám jako koeficient polydisperzity, který slouží k vyjádření šířky distribuce molekulové hmotnosti [12].

3.4.6 Popis mechanických vlastností

Pro náhrady a bandáže tkání jsou vyžadovány materiály s mechanickými vlastnostmi, které jsou obvykle řádově stejné jako u tkáně, kterou nahrazují. V případě, že se jedná o odbouratelný materiál, by měla být brána v úvahu i minimální mechanická pevnost, kterou by si měl implantát i při degradaci zachovat. V takových situacích je zásadní vyhodnotit mechanické vlastnosti materiálů v průběhu jejich degradace [12]. Materiály je možné testovat v tahu, ohybu a tlaku. Tubulární implantáty je navíc možné vystavit inflačně-extenzním zkouškám.

4 Experimentální část

4.1 Příprava materiálu

Nanovláknenné vrstvy z kopolymeru L-laktidu/ ϵ -kaprolaktonu 70/30 mol/mol (Purasorb PLC 7015, Corbion, Nizozemí) byly připraveny na Technické univerzitě v Liberci metodou elektrostatického zvláknění ze struny. Kopolymer byl zvlákněn (bezjehlově) z 10%hmotn. roztoku chloroformu (Penta, ČR) na zařízení Nanospider NS 1S500U s kontrolovaným prostředím NSAC150 (Elmarco, ČR). Plošná hustota vrstev byla 30 g/m². Vrstvy byly po sterilizaci ethylenoxidem dále zpracovány do kompozitů, kdy mezi tři nanovláknenné vrstvy byla rozprostřena 5%hmotn. kolagenová vodná disperze (kolagen typ I (VUP Medical, ČR)). Materiály byly na noc uloženy v inkubátoru při teplotě 37 °C. Následně byly materiály umístěny do laminárního boxu k sušení (odpaření vodné složky) do konstantní hmotnosti. Kvůli obsahu kolagenu v kompozitech bylo dalším krokem síťování (Obr. 4.1).

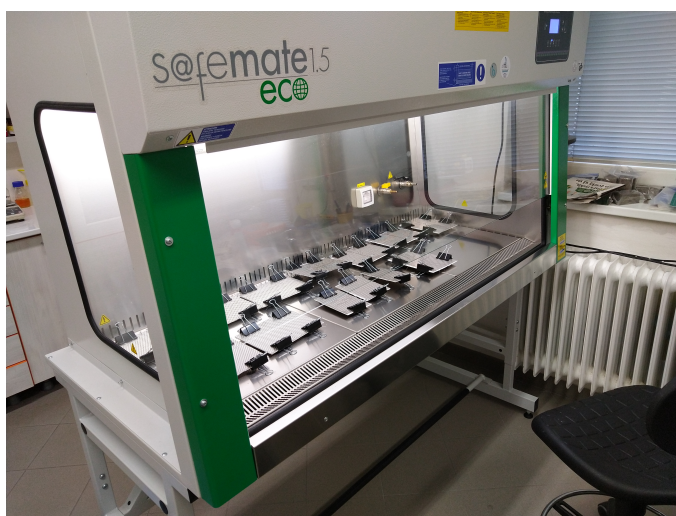
Síťování kolagenu probíhalo v roztoku ethanolu (PENTA, ČR) a destilované vody s EDC (N-(3 dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid, (Sigma-Aldrich, USA)) a NHS (N-hydroxysukcinimid, (Sigma-Aldrich, USA)) po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Na 1 g kolagenu bylo odváženo 0,625 g EDC a 0,156 g NHS, které se smísily se 142 ml 95%hmotn. roztoku ethanolu s vodou.

Po zesíťování byly kompozity dvakrát po dobu 20 minut promývány 0,1 M hydrogenufosforečnanem disodným (Penta, ČR) a dále dvakrát 20 minut v destilované vodě. Před dalším sušením byly materiály vloženy mezi textilie, které zabránily přilnutí k filtračnímu papíru. Kompozity mezi vrstvami filtračního papíru byly následně uloženy v děrovaných nerezových deskách a sepnuty svorkami. Toto uložení zamezilo zkroucení materiálu při sušení, které probíhalo opět v laminárním boxu, viz Obr. 4.2.

Poslední krok zahrnoval řezání materiálu na proužky o rozměrech 8 mm x 50 mm a sterilizaci gama zářením (25 kGy, BIOSTER, a. s., Česká republika).



Obrázek 4.1: Sítování



Obrázek 4.2: Sušení kompozitů

4.2 Degradace

Připravené vzorky byly vystaveny 8 degradačním prostředím (viz Tab. 4.1). Jako první byl použit fosfátový pufr (Sigma-Aldrich, Germany), který patří mezi nejčastěji používaná jednoduchá média. Simulovaná tělní tekutina byla vybrána

kvůli podobné iontové koncentraci jako anorganická část krevní plazmy. SBF byla připravena dle Kokuba [11]. Použita byla také lidská krevní plazma doplněna antibiotiky (penicilinem (20 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA) a streptomycinem (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)).

Tabulka 4.1: Porovnávaná degradační prostředí

porovnávaná prostředí	doplňující informace	Výrobce
PBS		Sigma-Aldrich, Německo
SBF	připravena dle Kokuba [11]	
PBS s kolagenázou	25 mU/ml	Sigma-Aldrich, USA
PBS s proteinázou K	20 mU/ml	Sigma-Aldrich, USA
lidská krevní plazma	suplementována	
DMEM	suplementováno	Thermo Fisher Scientific
DMEM s lidskými fibroblasty	80 000 buněk/vzorek; suplementováno	Thermo Fisher Scientific
peritoneum potkana	samci potkanů Wistar	

Fyziologické prostředí bylo dále simulováno PBS s kolagenázou (25 mU/ml, Sigma-Aldrich, USA) a PBS s proteinázou K (20 mU/ml, Sigma-Aldrich, USA). Při degradačních testech pomocí enzymů v prostředí *in vitro*, se často používají koncentrace přibližně 5-300 U/ml (např. 1 aktivní jednotka (U) kolagenázy teoreticky rozštěpí 1 μ g kolagenu za minutu). Jde o koncentrace pro testy, při kterých během krátké doby dochází ke kompletní degradaci kolagenových vzorků [20] – tyto podmínky jsou vhodné pro porovnání materiálů mezi sebou nebo s kontrolou, ale nerespektují koncentrace produkované buňkami. V práci šlo o napodobení koncentrace kolagenázy, jakou produkují v organismu fibroblasty, jež jsou v naší studii použity při *in vitro* simulaci. Fibroblasty mohou svou činností degradovat kolagenové vzorky i během implantace do peritonea použitého *in vivo* modelu. Jedná se o koncentrace přibližně v rozmezí 0,1-5 ng/ml [21, 22], což teoreticky odpovídá zvoleným hodnotám 25 mU/ml. Aktivita použité kolagenázy ovšem klesá s časem, proto bylo médium

měněno každý třetí den. Používané koncentrace proteinázy K se při krátkodobých experimentech (0 až 5 dní) pohybují v rozmezí 2-5 U/ml [23]. Jelikož jsme chtěli pozorovat degradaci v delším časovém horizontu, bylo nutné koncentraci snížit.

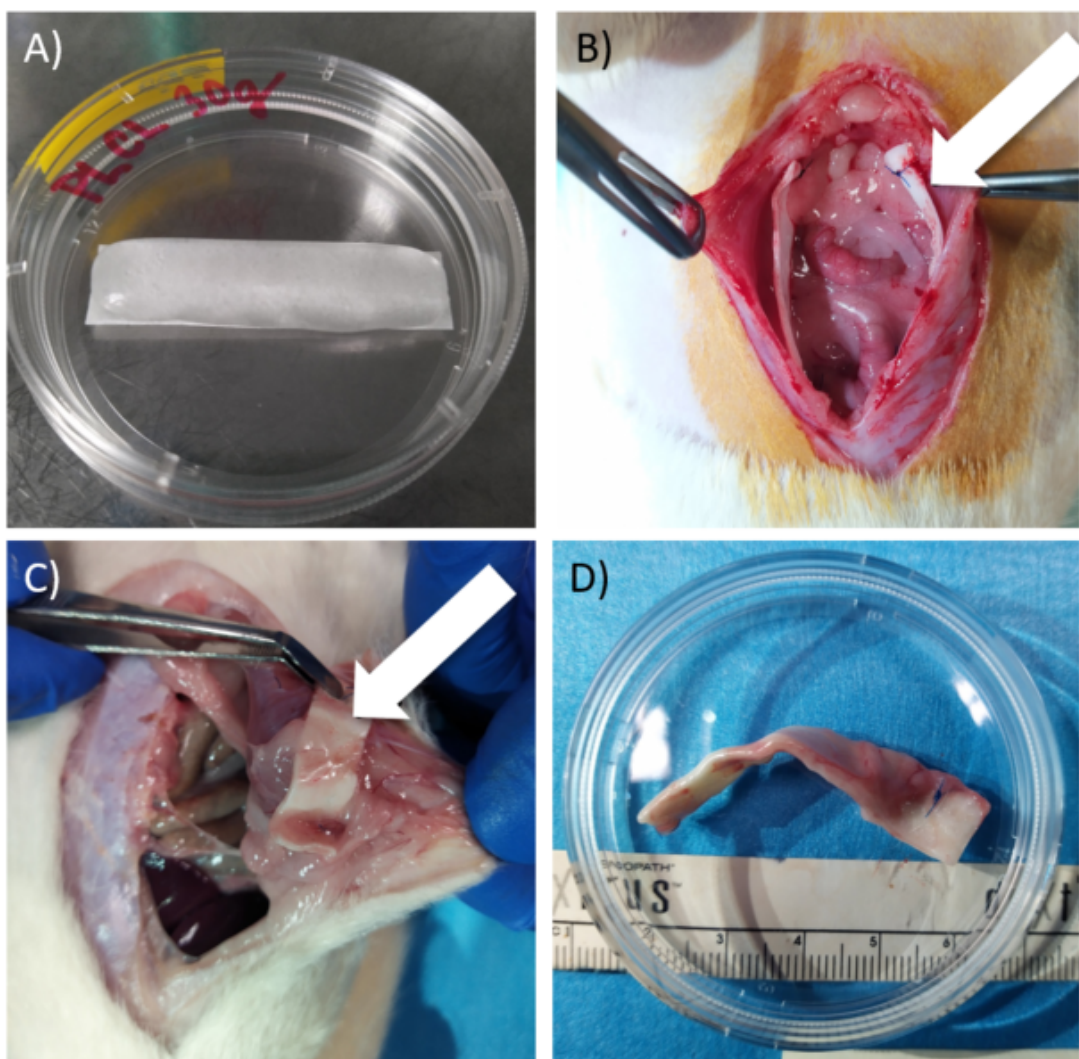
Poslední dvě média byla média pro buněčnou kultivaci s buňkami a pro srovnání i bez buněk. Kultivační médium bez buněk se skládalo z DMEM (Thermo Fisher Scientific) a z 10 % fetálního bovinního séra (Thermo Fisher Scientific), doplněno bylo o penicilin (100 U/ml) / streptomycin (0.1 mg/ml) (Biochrom), 0.5 % L-glutaminu (Biosera) a 1 % neesenciálních aminokyselin (Biosera). Médium s buňkami obsahovalo lidské dermální fibroblasty (80 000 buněk/vzorek).

Všechna média byla udržována při teplotě 37 °C, média pro buněčnou kultivaci navíc v 5% atmosféře CO_2 . Kompletně byla měněna každý třetí den a po celou dobu experimentu byla rutinně monitorována stabilní hladina pH. V předem určených časových intervalech (po 2 hodinách, 7, 14 a 28 dnech) bylo odebráno z každého média 9 vzorků.

In vitro a *in vivo* experimenty proběhly v Biomedicínském centru Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy.

Cílem bylo porovnání degradace v médiích s výsledky degradace v tělních podmínkách pomocí zvířecího modelu. Studie na zvířatech byla provedena na samcích potkanů Wistar starších šesti měsíců (schválení ID MSMT-19760-2020-3). Operační výkon byl proveden v celkové anestezii. Během výkonu byly do peritonea všity dva proužky kompozitů. Proužky byly fixovány k břišní stěně nevstřebatelnými stehy (pohled na incizi na Obr. 4.3). Pro každý časový bod bylo implantováno celkem 10 proužků. Zvířata byla usmrcena po 7, 14 a 28 dnech po implantaci.

Účinky degradačních prostředí na mechanické a strukturní vlastnosti materiálů byly stanoveny pomocí aplikace tahových zkoušek, úbytků hmotnosti a skenovací elektronové mikroskopie spolu s EDS analýzou.



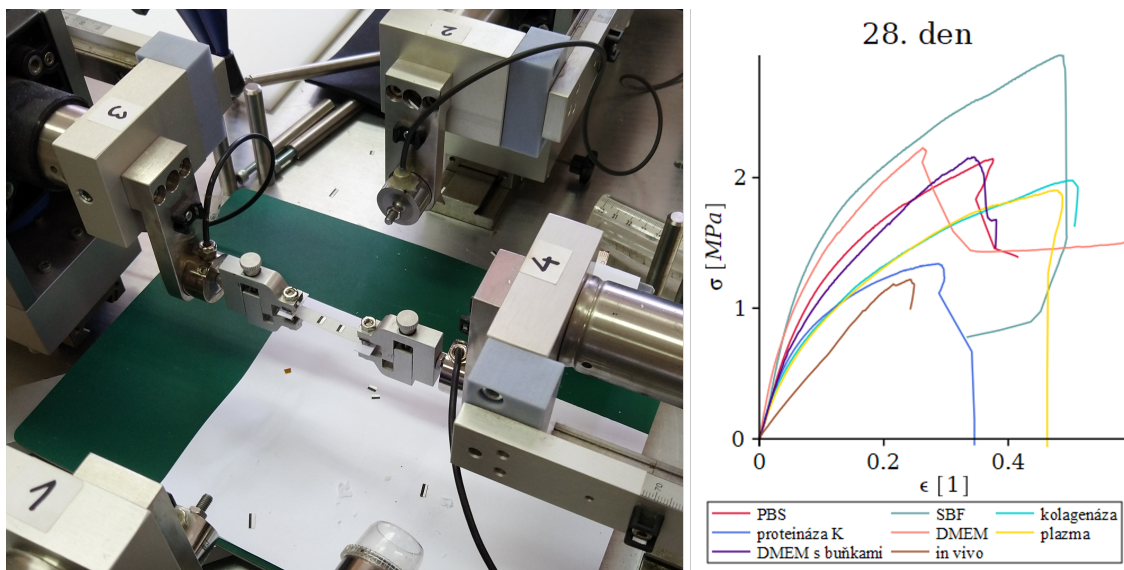
Obrázek 4.3: A) hydratovaný vzorek, B) pohled na incizi při implantaci, C) explantaci, D) explantovaný vzorek

4.3 Testování

4.3.1 Tahová zkouška

Vlivy degradačních prostředí na mechanické vlastnosti materiálů byly hodnoceny pomocí jednoosé tahové zkoušky. Vzorky bylo nejdříve zapotřebí vlepít vteřinovým lepidlem mezi proužky kartonu, za které byly následně upnuty do jehlových čelistí. Mechanické testy byly provedeny na víceúčelovém elektromechanickém tahovém zkušebním stroji Zwick/Roell (divize Messphysik, Graz, Rakousko) s vestavěným videoextenzometrem a silovými snímači U9C HBM (± 25 N) (Darmstadt, Německo). Na upnuté vzorky byly umístěny markery, které byly v průběhu zatěžování snímány. Na základě jejich vzdálenosti mohla být následně vyhodnocena deformace. Kompozity byly zatěžovány rychlostí 0,5 mm/s. Naměřená data (síla, čas, poloha příčníků, vzdálenost mezi markery) byla ukládána s frekvencí 20 Hz.

Tloušťky vzorků byly měřeny vždy ve třech bodech mikrometrem, výslednou hodnotu jsme získali jako aritmetický průměr. Šířky byly určeny z fotografií upnutých vzorků. K tomuto účelu jsme použili program ImageJ [24]. Porovnáním měřítka a naměřených hodnot v pixelech jsme získali pro každý vzorek 3 hodnoty, jejichž aritmetickým průměrem získaná výsledná šířka byla využita pro další vyhodnocení.



Obrázek 4.4: Ukázky tahových zkoušek

Ze záznamů tahových zkoušek (ukázka na Obr. 4.4) jsme vyhodnotili počáteční modul pružnosti E a smluvní mez pevnosti v tahu R_m , která je definována jako poměr maximální síly před přetržením vzorku F_m a referenční plochy průřezu S_0 . E byl určen jako směrnice tečny v počátku křivky $\sigma = f(\epsilon)$ s ohledem na deformaci $\epsilon \in [0; 0,025]$.

$$\sigma = \frac{F}{S_0} \quad [MPa] \quad (4.1)$$

$$\sigma = E \cdot \epsilon \quad [MPa] \quad (4.2)$$

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad [1] \quad (4.3)$$

$$R_m = \frac{F_m}{S_0} \quad [MPa] \quad (4.4)$$

4.3.2 Hmotnostní úbytky

Hmotnostní úbytky vzorků byly stanoveny pomocí vzorce:

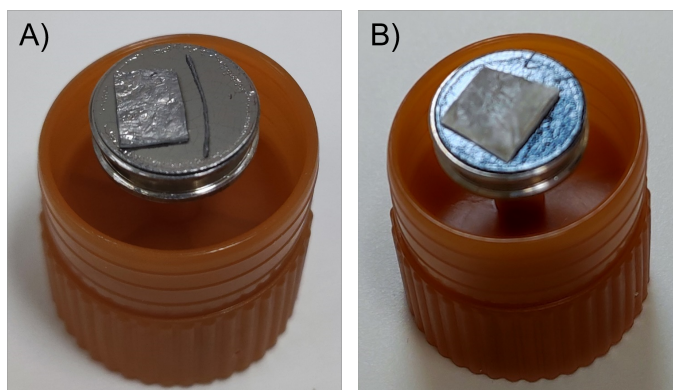
$$\Delta m = \frac{m_0 - m}{m_0} \cdot 100 \quad [\%], \quad (4.5)$$

kde m_0 je počáteční hmotnost a m je konečná hmotnost vzorku. Vzorky byly váženy na pětimístné analytické váze XSE 105 DualRange (METTLER TOLEDO, USA). Pro každý časový interval bylo zváženo 10 vzorků.

4.3.3 Obrazová analýza

Obrazová analýza byla provedena pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Z každého média byly vybrány 3 vzorky, které byly následně snímány. Analýza byla provedena na vzorcích uložených ve vybraných prostředích po dobu 28 dnů.

Pro SEM snímkování byly vzorky pomocí uhlíkového terče umístěny na hliníkový stab (viz Obr. 4.5 snímek A) a pokryty v atmosféře argonu vrstvou platiny na naprašovače Leica EM ACE600 (Specion s.r.o., ČR). Tloušťka pokryvu Pt činila 10,5 nm. SEM snímky byly pořízeny v režimu vysokého vakua na skenovacím elektronovém mikroskopu STEM Apreo S LoVac (ThermoFisher Scientific, USA), zobrazení na ETD detektoru v sekundárních elektronech (Everhalt-Thorney detektor), ve zvětšení 200x – 10 000x.



Obrázek 4.5: A) vzorek připravený k SEM snímkování, B) vzorek připravený k EDS analýze

4.3.4 EDS analýza

Energiově disperzní spektroskopie byla provedena ke zjištění změn v povrchovém složení materiálu. Pro EDS analýzu byly vzorky pomocí spektrálního uhlíkového terče umístěny na hliníkový stab (viz Obr. 4.5 snímek B)) a pokryty vrstvou uhlíku (tloušťka pokryvu 22,45 nm) na naprašovače Leica EM ACE600 (Specion s.r.o, ČR).

EDS analýza byla provedena v režimu vysokého vakua na skenovacím elektronovém mikroskopu STEM Apreo S LoVac (ThermoFisher Scientific, USA) v systému APEX EDAX s EDS detektorem Octane Elite SDDs (Ametek, USA). Z každého prostředí byly vybrány tři vzorky, na nichž bylo proměřeno 10 náhodně zvolených polí ve zvětšení 1 000x o ploše $97,767 \mu\text{m}^2$. Při analýze bylo použito urychlovací napětí 12,5 keV a nastavena korekce na pokryv uhlíkem.

4.3.5 Biologické hodnocení

Biologické hodnocení bylo provedeno jako ověření, že buňky skutečně po celou dobu experimentu na materiálech přežívaly a že změny v chování kompozitu po expozici v tomto prostředí mohou být činností buněk ovlivněné.

Testovaný materiál (kolagen/PLCL kompozit) byl vystaven biologickému prostředí, které bylo zastoupeno lidskými dermálními fibroblasty. Tento buněčný typ byl vybrán, protože reprezentuje hlavní buněčný typ ve vazivu. Fibroblasty byly

nasazeny na materiál dle standardních postupů laboratoře (Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, UK) a byly kultivovány za fyziologických podmínek simulujících tělní prostředí (živiny, 37 °C, 5% atmosféra CO_2 udržující fyziologické pH $\sim 7,4$) po dobu 28 dní. V časových bodech 1, 3, 7, 14 a 28 dnů byly buňky analyzovány pro jejich životaschopnost a tedy možnost zpracovávat a ovlivňovat materiál, na kterém byly kultivovány.

Byly zvoleny následující metody analýzy: sledování metabolické aktivity buněk a fluorescenční mikroskopie živých buněk na materiálu. Metabolická aktivita odráží životaschopnost buněk a fluorescenční mikroskopie ukazuje živé buňky rostoucí přímo na materiálu.

Pro měření metabolické aktivity byla použita metoda AlamarBlue (ThermoFisher Scientific) detekující aktivní enzymy dehydrogenázy v mitochondriích buněk. Každý vzorek byl inkubován 2 hodiny s roztokem AlamarBlue. Poté bylo 100 μ l roztoku přeneseno do černého 96 jamkového panelu a byla změřena fluorescence pomocí Synergy HT (Biotek) destičkového readeru. Experiment byl proveden na 8 nezávislých vzorcích.

Pro fluorescenční mikroskopii byl každý vzorek barven látkou calcein AM po dobu 30 min. Calcein AM je v případě živých buněk transformován na fluorescenční variantu molekuly umožňující zobrazení buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus X83.

4.3.6 Statistické vyhodnocení

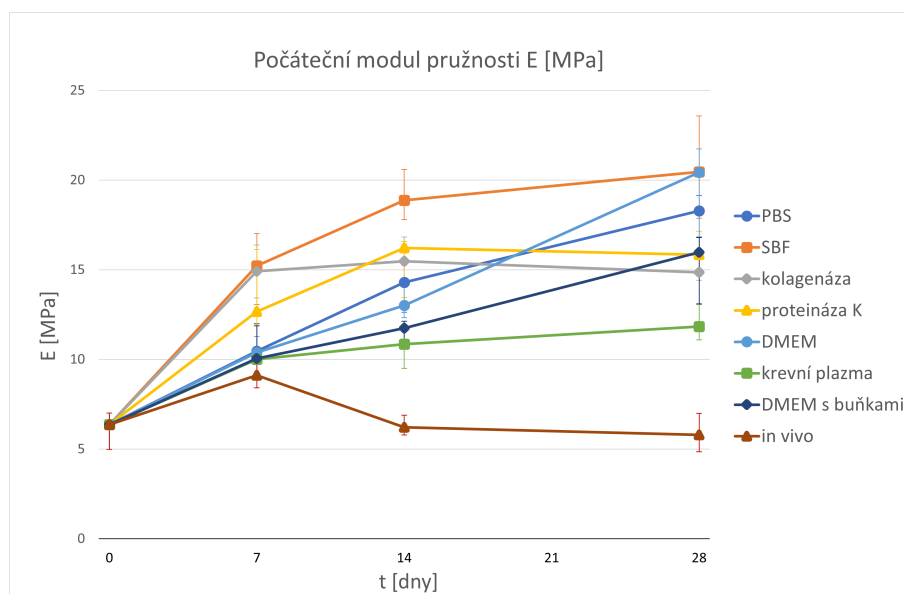
Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu JASP [25]. Nejdříve bylo ověřeno normální rozdělení získaných dat. K tomuto účelu byly použity výsledky Shapiro-Wilkova testu a Q-Q grafy naměřených hodnot (viz příloha A). Vzhledem k nepotvrzené normalitě dat byl použit při mnohonásobném porovnání Kruskal-Wallisův test. Při vyloučení nulové hypotézy byl proveden post hoc test podle Dunnové. Akceptována byla hladina významnosti $\leq 0,05$.

Protože síla testu mnohonásobného porovnání bývá nižší než testu párového, bylo provedeno i párové porovnání výsledků tahových zkoušek i hmotnostních úbytků vzorků vyňatých z médií s explantovanými vzorky (výsledky v příloze B).

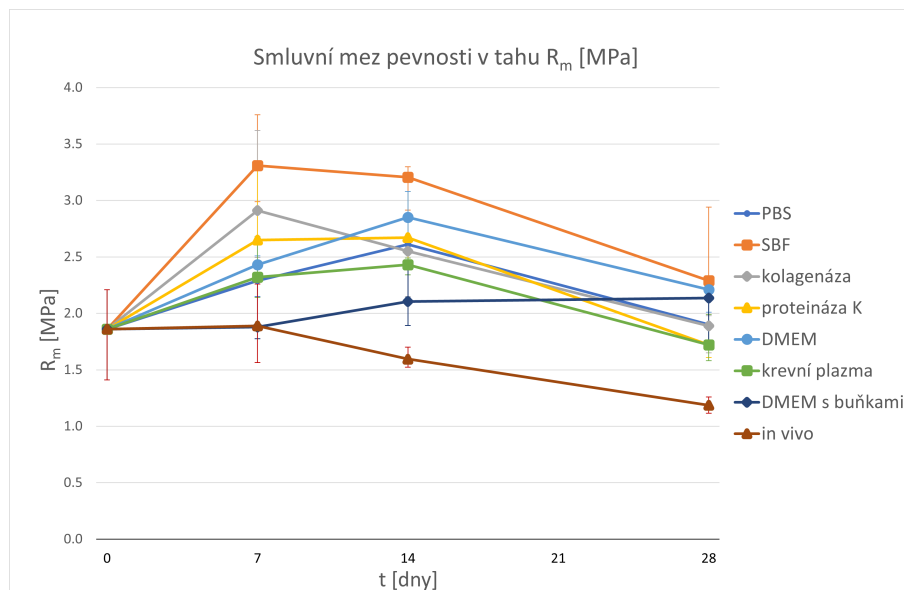
5 Výsledky

5.1 Tahová zkouška

Výsledky tahových zkoušek (viz Obr. 5.1, 5.2) ukazují, že modul pružnosti delším časem stráveným v médiích roste. Smluvní mez pevnosti časem naopak klesá. Nejvýznamnější změny v mechanických vlastnostech můžeme pozorovat u vzorků uložených v SBF.



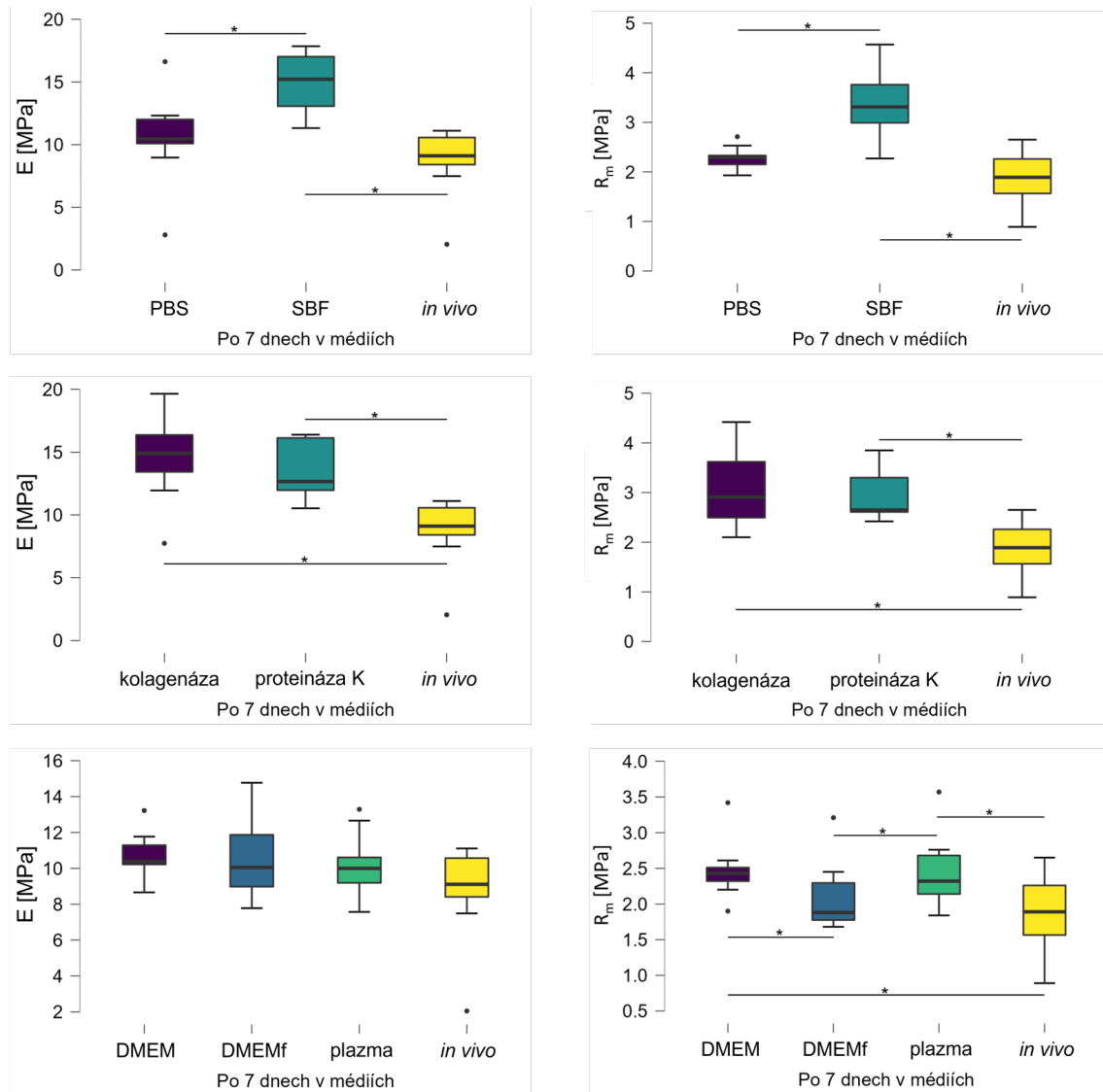
Obrázek 5.1: Počáteční modul pružnosti kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 2 hodin, 7, 14 a 28 dnů (medián s mezikvartilovým rozpětím, n=9)



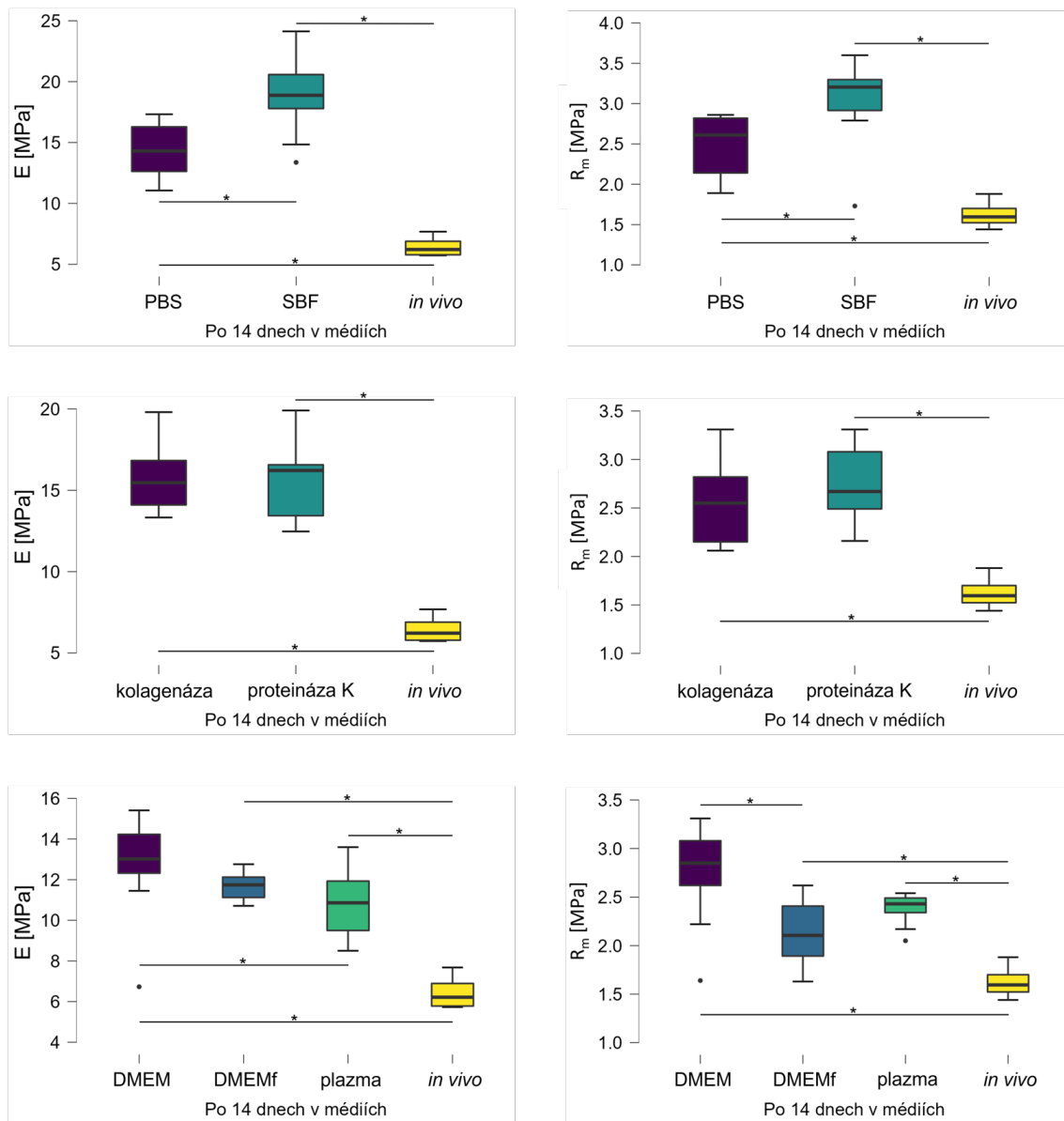
Obrázek 5.2: Smluvní mez pevnosti kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 2 hodin, 7, 14 a 28 dnů (medián s mezikvartilovým rozpětím, $n=9$)

5.1.1 Statistické vyhodnocení tahových zkoušek

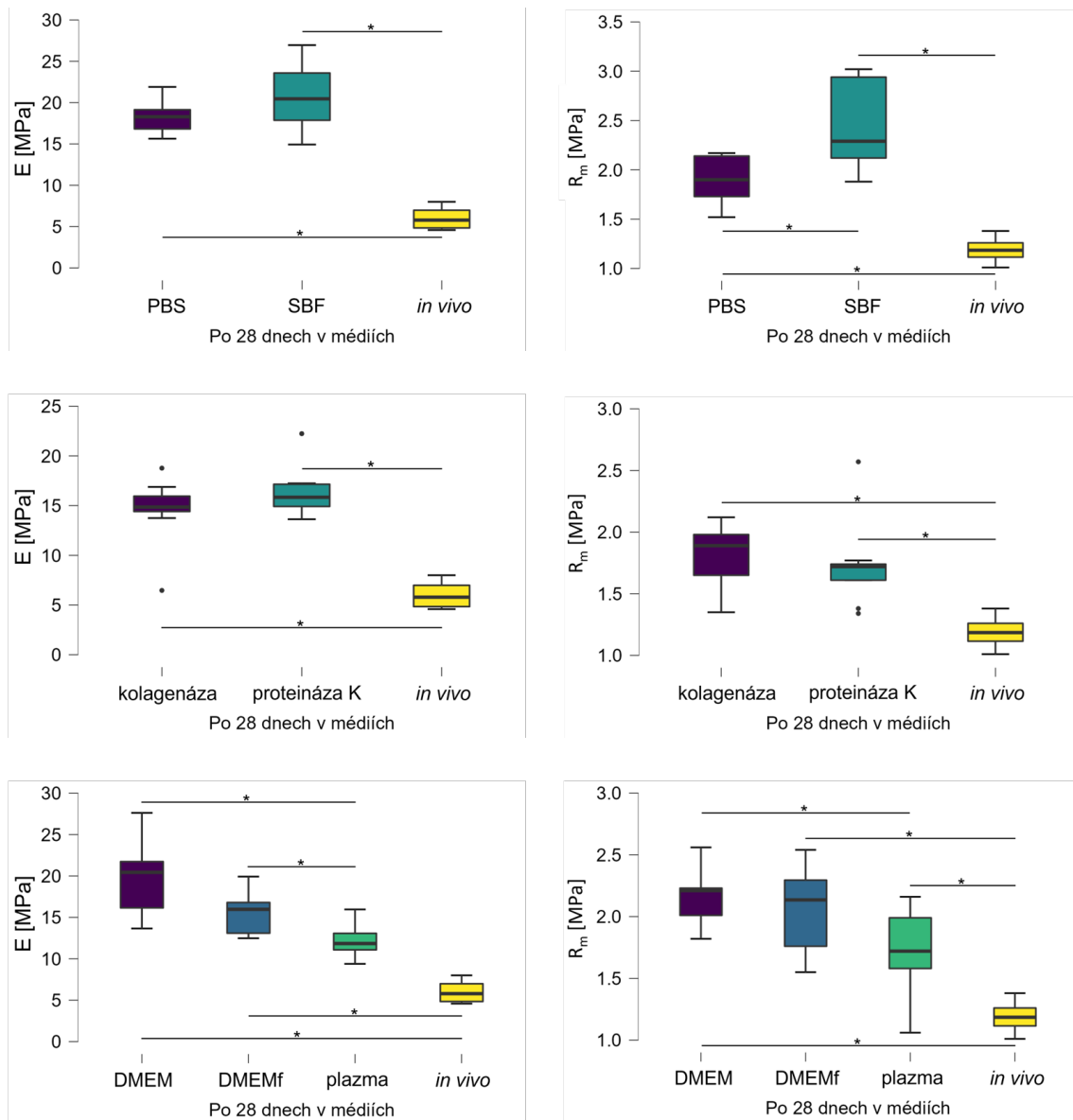
Statistické vyhodnocení proběhlo metodou mnohonásobného porovnání vždy po skupinách. Média byla rozdělena na média na bázi solí (PBS, SBF), enzymatická (PBS s kolagenázou, PBS s proteinázou K) a na bázi bílkovin (krevní plazma, DMEM, DMEM s fibroblasty (DMEMf)). Výsledky byly porovnány v dané skupině spolu s výsledky explantovaných vzorků (*in vivo*) (Obr. 5.3 až 5.5). U většiny naměřených dat se nepotvrdilo normální rozdělení, proto byly použity neparametrické metody. Statisticky významné rozdíly mezi soubory dat jsou vyznačeny *.



Obrázek 5.3: Porovnání mechanických vlastností kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, $n=9$)



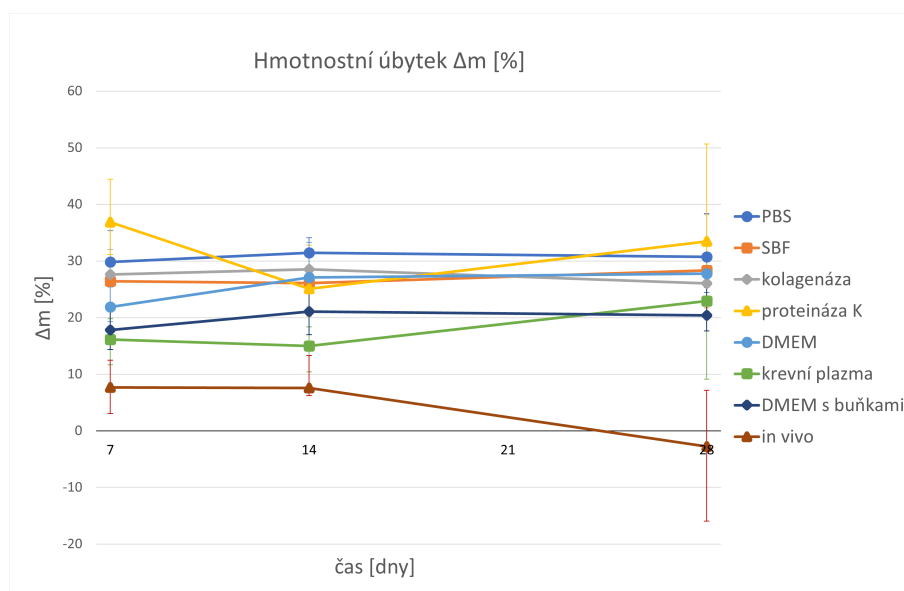
Obrázek 5.4: Porovnání mechanických vlastností kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, $n=9$)



Obrázek 5.5: Porovnání mechanických vlastností kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, $n=9$)

5.2 Hmotnostní úbytky

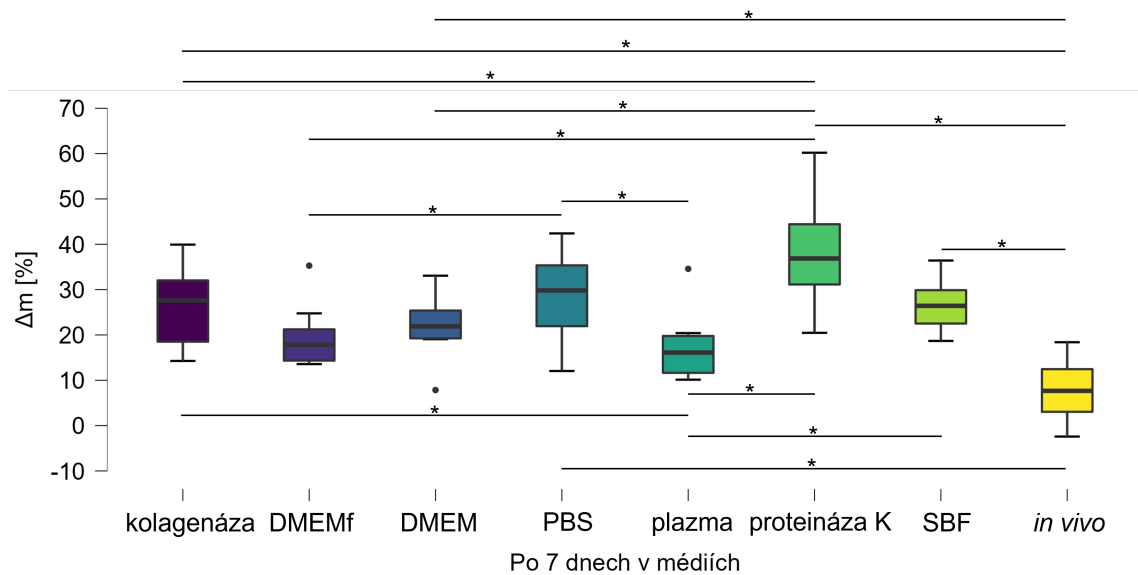
Nejvýznamnější hmotnostní úbytky je možné pozorovat již po 7 dnech ve vybraných prostředích (viz Obr. 5.6). Podíl na tom nese pravděpodobně rychlé „vyplavení“ kolagenu ze vzorků. Jediná proteináza K mohla mít v rámci tak krátkého časového úseku vliv i na polylaktid. Během vymezeného času experimentu nedocházelo jen k úbytkům hmotnosti. Jednalo se o bilanci mezi ztrátou materiálu a usazováním solí a v některých případech i bílkovin na povrch vzorků. V případě *in vivo* experimentu mohlo dojít k nárůstu hmotnosti i vlivem usazování složek tělních tekutin a obrůstání vzorků fibrózní tkání.



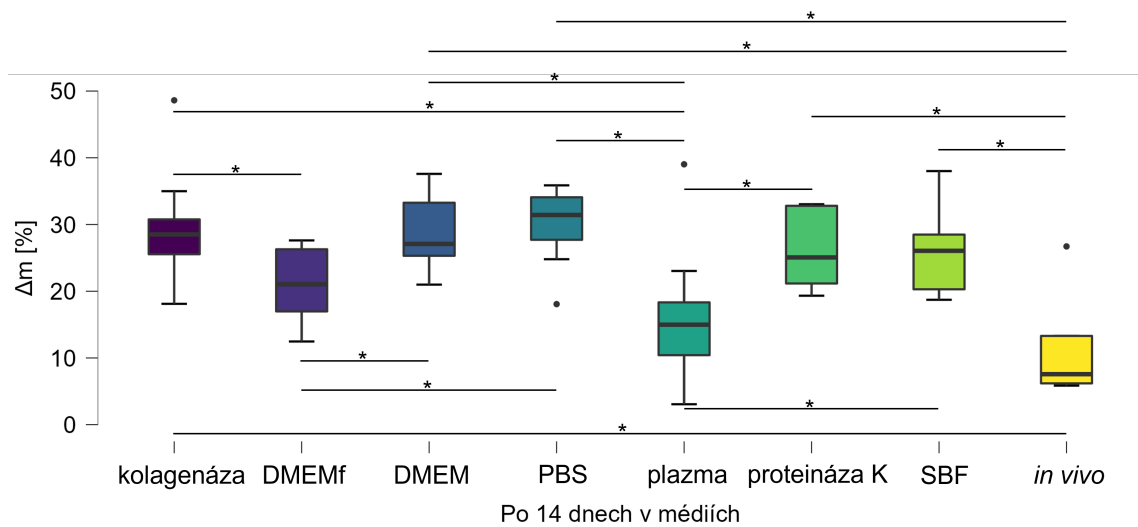
Obrázek 5.6: Hmotnostní úbytky kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7, 14 a 28 dnů (medián s mezikvartilovým rozpětím, $n=8$)

5.2.1 Statistické vyhodnocení hmotnostních úbytků

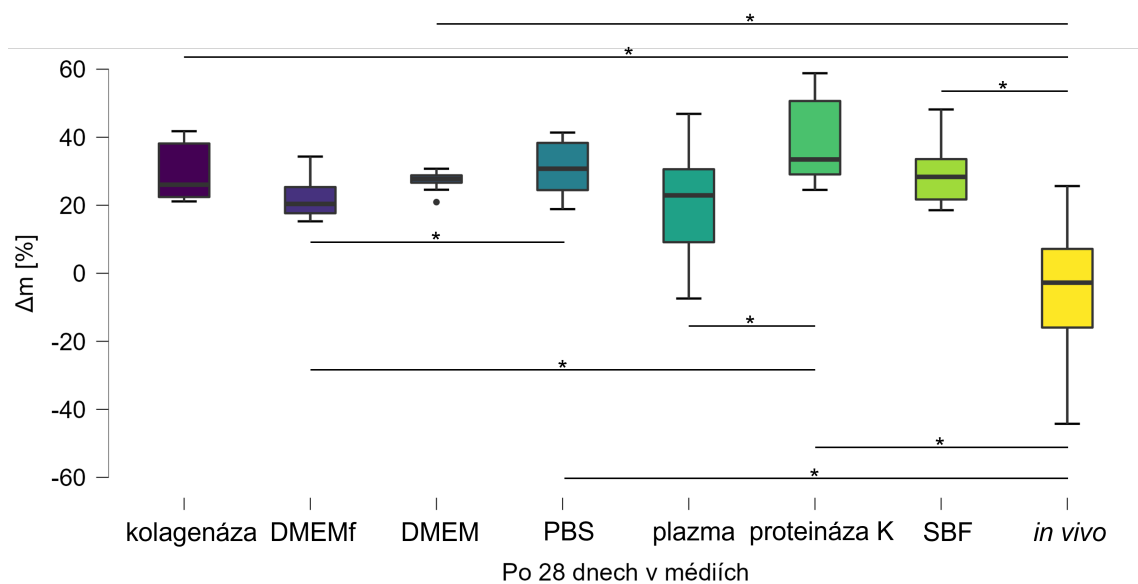
Statistické vyhodnocení hmotnostních úbytků bylo provedeno taktéž metodou mnohonásobného porovnání. Použit byl neparametrický Kruskal-Wallisův test a následně post hoc test podle Dunnové. Statisticky signifikantní rozdíly mezi soubory dat jsou vyznačeny * (viz Obr. 5.7 - 5.9).



Obrázek 5.7: Porovnání hmotnostních úbytků Δm kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, $n=8$)



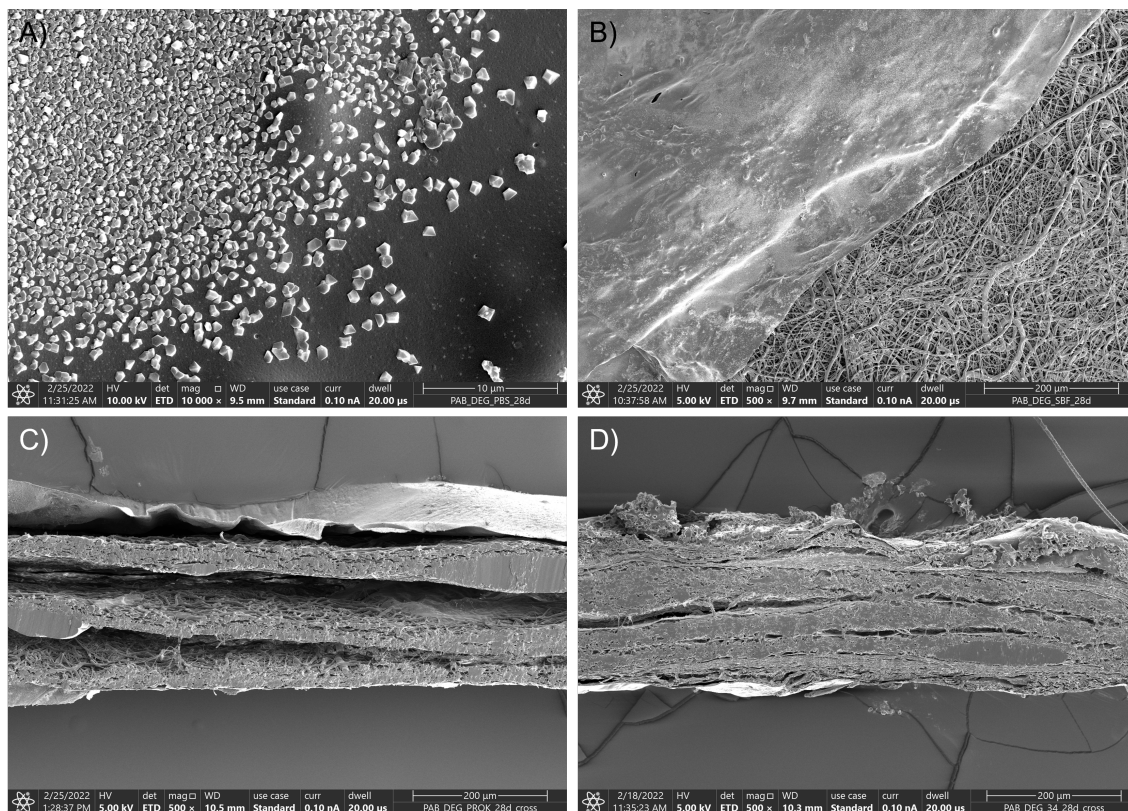
Obrázek 5.8: Porovnání hmotnostních úbytků Δm kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, $n=8$)



Obrázek 5.9: Porovnání hmotnostních úbytků Δm kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, $n=8$)

5.3 Obrazová analýza

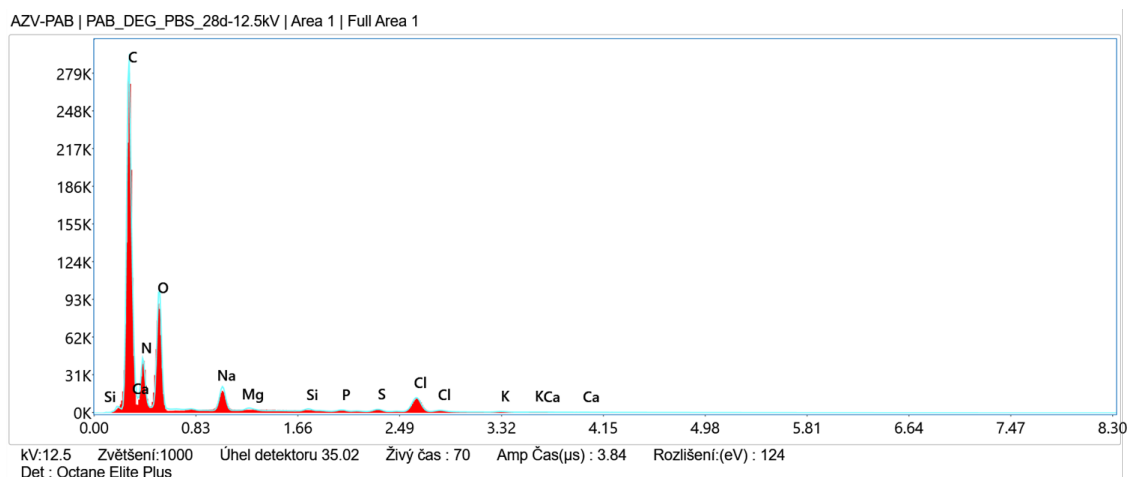
K hodnocení vlivu simulovaných tělních prostředí na strukturní vlastnosti materiálu bylo využito skenovací elektronové mikroskopie. Na základě pořízených snímků bylo možné provést kvalitativní hodnocení vnitřní struktury (příkladem je Obr. 5.10). Snímek *A*) zachycuje precipitáty solí vytvořené na vzorku, jenž byl uložený v roztoku PBS po dobu 28 dnů. K přesnějšímu rozboru byla provedena prvková analýza. Snímek *B*) dokumentuje absenci kolagenu, díky níž lze pozorovat odhalená nanovlákná. Úbytek kolagenu byl doprovázen častou delaminací vzorků v médiích. Vzorky použité při *in vivo* testech byly fixovány stehy, časem je navíc částečně obalila pojivová tkáň. Ze snímků je patrné, že rostla i mezi jednotlivými vrstvami (fotografie *D*)), delaminace se proto vyskytovala v nižším rozsahu. Na snímku *C*) je patrná delaminace vzorku a úbytek kolagenu mezi jednotlivými vrstvami po 28 dnech v PBS s proteinázou K.



Obrázek 5.10: SEM snímky vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů: A) krystalizace solí na vzorku vyňatého z PBS (zvětšeno 10 000x), B) úbytek kolagenu ze vzorku uloženého v SBF (zvětšeno 500x), C) delaminace vzorku uloženého v PBS s proteinázou K (zvětšeno 500x), D) vzorek z prostředí *in vivo* (zvětšeno 500x)

5.4 EDS analýza

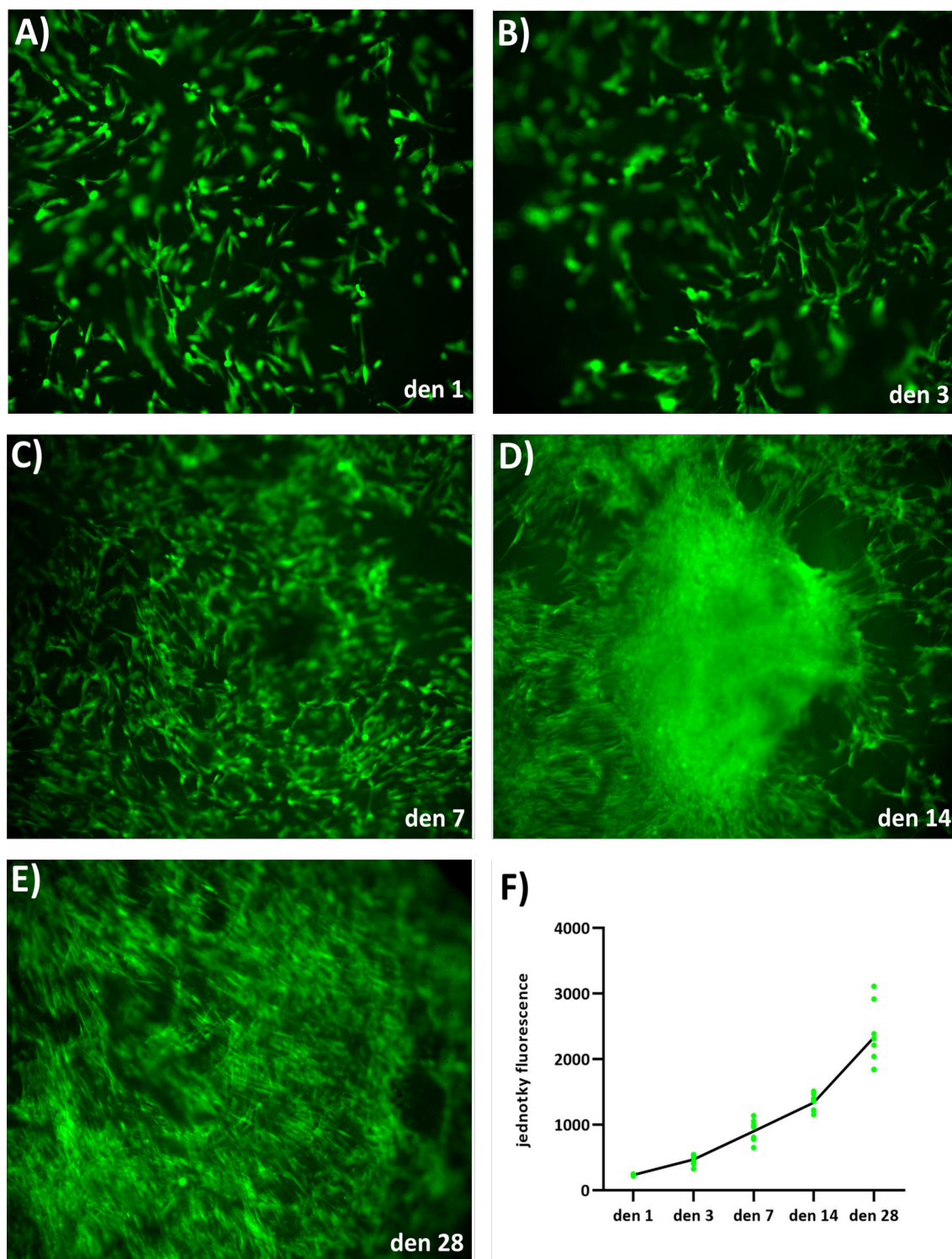
Energiově disperzní analýza potvrdila usazování lehkých prvků na testovaných materiálech (příkladem je Obr. 5.11). U simulovaných tělních prostředí se jednalo především o chlor a sodík. Naopak ve vzorcích explantovaných z peritonea převládá vápník. Hmotnostní podíly prvků z analyzovaných povrchů materiálů jsou zahrnuty v příloze C (Tab. C.1 - C.9).



Obrázek 5.11: Výsledky EDS analýzy vzorku uloženého v PBS po dobu 28 dnů

5.5 Biologické hodnocení

Dermální fibroblasty v čase 1 – 28 dní vykazovaly rostoucí tendenci metabolické aktivity a lze konstatovat, že buňky na materiálu byly po celou dobu experimentu životaschopné (Obr. 5.12 F). Stejně pozorování bylo získáno pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 5.12 A-E). Jejich počet se vizuálně zvyšoval. V časových bodech 14 a 28 dní lze sledovat pravidelnou orientaci buněk dle vláken v materiálech (Obr. 5.12 E) či shlukování většího počtu buněk v jednom místě (Obr. 5.12 D). Z výsledků vyplývá, že buňky byly po celou dobu experimentu aktivní. Materiál lze označit za biokompatibilní.



Obrázek 5.12: Biologické ověření stavu buněk na materiálu. V časových bodech 1, 3, 7, 14, 28 dní byly buňky barveny viabilní látkou demonstrující životaschopné buňky rostoucí na materiálu (A-E) (zvětšeno 10x). Životaschopnost buněk byla ověřena analýzou jejich metabolické aktivity, která v čase také rostla (F).

6 Diskuse

Výsledky tahových zkoušek naznačují, že žádné médium nemělo stejný účinek na materiál jako reálné tělní prostředí, kde kompozity degradovaly (alespoň z pohledu pevnosti) nejrychleji. Nárůst modulů pružnosti v čase mohl být způsoben uvolňováním kolagenu z materiálu. Guidoin a kol. [26] stejně jako Lim a kol. [27] ukazují, že kolagenové impregnace a filmy mohou být (v závislosti na způsobu přípravy a síťování) rozpuštěny už v řádu hodin. Zvolená degradační prostředí mají na polylaktid i polykaprolakton během tak krátké doby minimální dopad. Během času stráveného v médiích docházelo s největší pravděpodobností k postupnému uvolňování kolagenu, který modul pružnosti kompozitů snižoval. Úbytkem kolagenu tedy modul pružnosti stoupl. Hodnota smluvní meze pevnosti po čase opravdu klesá. Počáteční nárůst mohl být způsobený nedostatečnou hydratací vzorků či rychlým úbytkem kolagenu. Nejlépe z testů vyšla komplexnější média na bázi bílkovin. Alespoň co se podobnosti s tělním prostředím týká.

Dále byly stanoveny hmotnostní úbytky. Zarážející okolností může být významný nárůst hmoty u vzorků použitých při *in vivo* testech. Vzorky časem obalila pojivová tkáň, kterou nebylo možné od vzorků oddělit. K úbytkům hmotnosti vzorků vyňatých z médií docházelo především kvůli rozpouštění kolagenu. Jediná proteináza K mohla mít během tak krátké doby vliv i na polylaktid. Zhang a kol. [28] pozorovali degradaci kolagen/PLC scaffoldů. Ačkoliv rychlost degradace byla v časovém rozmezí 21 dnů nízká, zjistili, že výraznější hmotnostní úbytek byl zaznamenán u scaffoldů s vyšším obsahem kolagenu. Během doby strávené ve vybraných prostředích nedocházelo jen k úbytkům, ale i k precipitaci solí z médií a v případě médií na bázi bílkovin, i k usazování bílkovin. To ukázali Suchý a kol. [9] pomocí rentgenové difrakce kolagenových scaffoldů exponovaných v lidské krevní plazmě, SBF a PBS.

Snímky pořízené metodou skenovací elektronové mikroskopie potvrdily domněnky ohledně výsledků tahových zkoušek i stanovených úbytků hmotnosti. Na fotografiích je možné pozorovat precipitáty solí, úbytek kolagenu i z prostoru mezi jednotlivými nanovláčnými vrstvami a v případě explantovaných vzorků prorůstající pojivovou tkáň. Ztráta kolagenu, jakožto spojovacího materiálu, mohla být důvodem časté delaminace vzorků. V prostředí *in vivo* delaminaci ve větším rozsahu zabránila fixace stehy a vazivo.

Práce byla doplněna EDS analýzou, jejíž výsledky dokazují usazování lehkých prvků na povrchu materiálu. Mezi nejhojněji vyskytující se prvky patří chlor a sodík. U vzorků explantovaných z peritonea převládal vápník.

Biologické hodnocení potvrdilo, že buňky jsou na zkoumaném materiálu aktivní po celou dobu experimentu. Kompozit lze označit za biokompatibilní. Fibroblasty vykazovaly rostoucí tendenci metabolické aktivity a jejich počet se na povrchu materiálu vizuálně zvětšoval. Fu a spol. [29] dokumentovali podobné výsledky. Na obdobném materiálu (kolagen/PLCL) kultivovali buňky hladké svaloviny, jejichž počet se zvyšoval s dobou kultivace.

7 Závěr

Byla provedena experimentální analýza mechanických a strukturních vlastností kolagen/PLCL kompozitů vystavených různým simulovaným tělním podmínkám. Účelem bylo porovnání degradace materiálu v simulovaném tělním prostředí s degradací v prostředí *in vivo*. Vzorky uložené v médiích po dobu 2 hodin, 7, 14 a 28 dnů stejně jako explantované vzorky byly podrobeny jednoosým tahovým zkouškám. Struktura byla popsána na základě snímků pořízených skenovací elektronovou mikroskopií. Výsledky byly doplněny hmotnostními úbytky a prvkovou analýzou.

Degradace materiálu je komplexní proces, který může být ovlivněn řadou faktorů, v těle je to např. teplota, pH, aktivita buněk a mechanické namáhání. Proto nemůžeme očekávat, že médium zastane všechny funkce těla. Mechanické zkoušky potvrdily, že degradace v tělním prostředí probíhá alespoň z pohledu pevnosti rychleji než ve vybraných médiích. Tímto byla vyvrácena počáteční hypotéza. Nejlépe, co se podobnosti s tělním prostředím týká, vycházela média na bázi bílkovin (DMEM s fibroblasty, DMEM či krevní plazma). Je však ke zvážení, jak korektní dané výsledky jsou. Materiály po explantaci obsahují pojivovou tkáň, kterou nejsme schopni odstranit. Navíc u takto nehomogenních materiálů nemůžeme s jistotou říci, že výsledky jsou způsobeny pouze vlivy degradačního prostředí a nikoli pouze nehomogenitami v připravených vrstvách, případně v celých kompozitech.

K popsání degradace materiálu v širším rozsahu by bylo vhodné experiment dále rozšířit. Zkoumáním mechanických a strukturních vlastností ve více časových bodech by bylo možné sestavit matematický model, který by sloužil k predikci chování daného materiálu. Následné testy by byly tímto zjednodušeny.

Publikované výsledky

KARBÁNOVÁ, Vendula, et al. The effect of various simulated body environments on mechanical and structural properties of collagen/PLCL composites. In: *23rd International Scientific Conference APPLIED MECHANICS 2022 – Book of Abstracts*. Prague: Czech Technical University in Prague, 2022, s. 55-58. ISBN 978-80-01-06974-5.

Literatura

- [1] CORNO, Antonio F. Pulmonary artery banding. *hSwiss Medical Weekly*, 2005, 135.35/36: 515.
- [2] KLENER, Pavel, et al. *Vnitřní lékařství*. 3.vydání. Praha: Galén, 2006. 1158 s. s. 275-276. ISBN 80-7262-430-X.
- [3] ČEŠKA, Richard, et al. *Interna*. 1.vydání. Praha: Triton, 2010. 855 s. s. 480-481. ISBN 978-80-7387-423-0.
- [4] STARK, Jaroslav; BERRY, Colin L.; SILOVE, Eric D. The evaluation of materials used for pulmonary artery banding: experimental study in piglets. *The Annals of Thoracic Surgery*, 1972, 13.2: 163-169.
- [5] RODRIGUEZ, I. A.; MCCOOL, J. M.; BOWLIN, G. L. Functional nanofibers for tissue engineering applications. In: *Functional Nanofibers and their Applications*. Woodhead Publishing, 2012. p. 171-196.
- [6] RÝGLOVÁ, Šárka; BRAUN, Martin; SUCHÝ, Tomáš. Collagen and its modifications—crucial aspects with concern to its processing and analysis. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2017, 302.6: 1600460.
- [7] FERNÁNDEZ, Jorge; ETXEBERRIA, Agustin; SARASUA, Jose-Ramon. Synthesis, structure and properties of poly (L-lactide-co- ϵ -caprolactone) statistical copolymers. *Journal of the Mechanical Behavior of biomedical Materials*, 2012, 9: 100-112.
- [8] SUCHÝ, Tomáš, et al. Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states?. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2018, 29.2: 1-14.

-
- [9] SUCHÝ, Tomáš, et al. Various Simulated Body Fluids Lead to Significant Differences in Collagen Tissue Engineering Scaffolds. *Materials*, 2021, 14.16: 4388.
- [10] JEONG, Sung In, et al. Morphology of elastic poly (L-lactide-co- ϵ -caprolactone) copolymers and in vitro and in vivo degradation behavior of their scaffolds. *Biomacromolecules*, 2004, 5.4: 1303-1309.
- [11] KOKUBO, Tadashi; TAKADAMA, Hiroaki. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 2006, 27.15: 2907-2915.
- [12] AZEVEDO, Helena S.; REIS, Rui L. Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate. 2005.
- [13] BARRÉ-SINOUSI, Françoise; MONTAGUTELLI, Xavier. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future science OA*, 2015, 1.4.
- [14] NANDIYANTO, Asep Bayu Dani; OKTIANI, Rosi; RAGADHITA, Risti. How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 2019, 4.1: 97-118.
- [15] Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022-07-27]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Infra%C4%8Derven%C3%A1_spektroskopie_s_Fourierovou_transformac%C3%AD
- [16] ZHOU, Weilie, et al. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In: *Scanning microscopy for nanotechnology*. Springer, New York, NY, 2006. p. 1-40.
- [17] EGERTON, Ray F. The scanning electron microscope. In: *Physical principles of electron microscopy*. Springer, Boston, MA, 2005. p. 125-153.
- [18] NGO, Phuc D. Energy dispersive spectroscopy. In: *Failure Analysis of Integrated Circuits*. Springer, Boston, MA, 1999. p. 205-215.

-
- [19] ZHAO, Tianyi; JIANG, Lei. Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 161: 324-330.
- [20] HELLING, A. L., et al. In vitro enzymatic degradation of tissue grafts and collagen biomaterials by matrix metalloproteinases: improving the collagenase assay. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017, 3.9: 1922-1932.
- [21] LU, Weiqiang, et al. The efficient expression of human fibroblast collagenase in *Escherichia coli* and the discovery of flavonoid inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2013, 28.4: 741-746.
- [22] SHIN, Min Kyung, et al. The effects of platelet-rich clot releasate on the expression of MMP-1 and type I collagen in human adult dermal fibroblasts: PRP is a stronger MMP-1 stimulator. *Molecular biology reports*, 2014, 41.1: 3-8.
- [23] MIKES, Petr, et al. Comparison and characterization of different polyester nano/micro fibres for use in tissue engineering applications. *Journal of Industrial Textiles*, 2021, 50.6: 870-890.
- [24] RASBAND, W.S., *ImageJ* [software], US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997–2015, Dostupné z: <http://imagej.nih.gov/ij>
- [25] JASP Team (2022). JASP (Version 0.16.2) [software]. Dostupné z: <https://jasp-stats.org/>
- [26] GUIDOIN, Robert, et al. Collagen coatings as biological sealants for textile arterial prostheses. *Biomaterials*, 1989, 10.3: 156-165.
- [27] LIM, Jin Ik; YU, Bin; LEE, Yong-Keun. Fabrication of collagen hybridized elastic PLCL for tissue engineering. *Biotechnology letters*, 2008, 30.12: 2085-2090.
- [28] ZHANG, Qiang, et al. Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity. *International journal of biological macromolecules*, 2015, 76: 94-101.

- [29] FU, Wei, et al. Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 2014, 9: 2335.

Seznam obrázků

3.1	Bandáž plicní arterie	3
3.2	Struktura kolagenu	5
3.3	Schéma syntézy PLCL, upraveno z [7]	7
3.4	Schéma přisedlé kapky (Youngův model)	13
4.1	Síťování	16
4.2	Sušení kompozitů	16
4.3	A) hydratovaný vzorek, B) pohled na incizi při implantaci, C) explantaci, D) explantovaný vzorek	19
4.4	Ukázky tahových zkoušek	20
4.5	A) vzorek připravený k SEM snímkování, B) vzorek připravený k EDS analýze	22
5.1	Počáteční modul pružnosti kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 2 hodin, 7, 14 a 28 dnů (medián s mezikvartilovým rozpětím, n=9)	24
5.2	Smluvní mez pevnosti kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 2 hodin, 7, 14 a 28 dnů (medián s mezikvartilovým rozpětím, n=9)	25
5.3	Porovnání mechanických vlastností kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, n=9)	26

5.4	Porovnání mechanických vlastností kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, n=9)	27
5.5	Porovnání mechanických vlastností kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, n=9)	28
5.6	Hmotnostní úbytky kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7, 14 a 28 dnů (medián s mezikvartilovým rozpětím, n=8)	29
5.7	Porovnání hmotnostních úbytků Δm kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, n=8)	30
5.8	Porovnání hmotnostních úbytků Δm kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, n=8)	31
5.9	Porovnání hmotnostních úbytků Δm kolagen/PLCL vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů (* značí statisticky významné rozdíly, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallisův test, post hoc test podle Dunnové, n=8)	31
5.10	SEM snímky vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů: A) krystalizace solí na vzorku vyňatého z PBS (zvětšeno 10 000x), B) úbytek kolagenu ze vzorku uloženého v SBF (zvětšeno 500x), C) delaminace vzorku uloženého v PBS s proteinázou K (zvětšeno 500x), D) vzorek z prostředí <i>in vivo</i> (zvětšeno 500x)	33
5.11	Výsledky EDS analýzy vzorku uloženého v PBS po dobu 28 dnů	34

5.12	Biologické ověření stavu buněk na materiálu. V časových bodech 1, 3, 7, 14, 28 dní byly buňky barveny viabilní látkou demonstrující životaschopné buňky rostoucí na materiálu (A-E) (zvětšeno 10x). Životaschopnost buněk byla ověřena analýzou jejich metabolické aktivity, která v čase také rostla (F).	35
A.1	Q-Q grafy naměřených modulů pružnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů	50
A.2	Q-Q grafy naměřených modulů pružnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů	51
A.3	Q-Q grafy naměřených modulů pružnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů	52
A.4	Q-Q grafy naměřených mezí pevnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů	53
A.5	Q-Q grafy naměřených mezí pevnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů	54
A.6	Q-Q grafy naměřených mezí pevnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů	55
A.7	Q-Q grafy hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů	56
A.8	Q-Q grafy hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů	57
A.9	Q-Q grafy hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů	58

Seznam tabulek

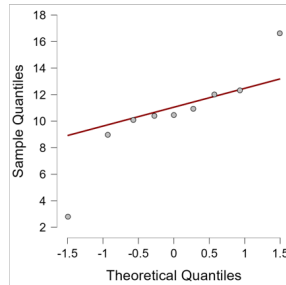
3.1	Nominální iontové koncentrace v SBF ve srovnání s koncentracemi v lidské krevní plazmě [11]	9
4.1	Porovnávaná degradační prostředí	17
B.1	Párové porovnání mechanických vlastností vzorků vystavených vybraným podmínkám s vlastnostmi vzorků vystavených prostředí <i>in vivo</i> po dobu 7 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9	60
B.2	Párové porovnání mechanických vlastností vzorků vystavených vybraným podmínkám s vlastnostmi vzorků vystavených prostředí <i>in vivo</i> po dobu 14 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9	60
B.3	Párové porovnání mechanických vlastností vzorků vystavených vybraným podmínkám s vlastnostmi vzorků vystavených prostředí <i>in vivo</i> po dobu 28 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9	61
B.4	Párové porovnání hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám s úbytky vzorků vystavených prostředí <i>in vivo</i> po dobu 7 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9	61
B.5	Párové porovnání hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám s úbytky vzorků vystavených prostředí <i>in vivo</i> po dobu 14 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9	62
B.6	Párové porovnání hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám s úbytky vzorků vystavených prostředí <i>in vivo</i> po dobu 28 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9	62
C.1	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích materiálu, n=10	63

C.2	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v PBS po dobu 28 dnů, n=10	63
C.3	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v SBF po dobu 28 dnů, n=10	63
C.4	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v PBS s kolagenázou po dobu 28 dnů, n=10	64
C.5	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v PBS s proteínázou K po dobu 28 dnů, n=10	64
C.6	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v DMEM po dobu 28 dnů, n=10	64
C.7	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v krevní plazmě po dobu 28 dnů, n=10	64
C.8	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v DMEM s lidskými fibroblasty po dobu 28 dnů, n=10	65
C.9	Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích explantovaných z peritonea po 28 dnech, n=10	65

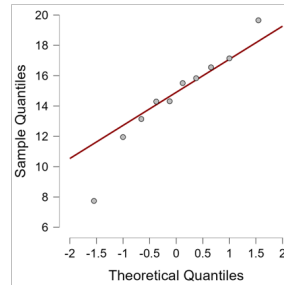
A Q-Q grafy

Přiložené Q-Q grafy (Obr. A.1 - A.9) byly jedním z podkladů k potvrzení/zamítnutí hypotézy, že naměřená data pochází z normálního rozdělení. Dále byl brán v úvahu výsledek Shapiro-Wilkova testu.

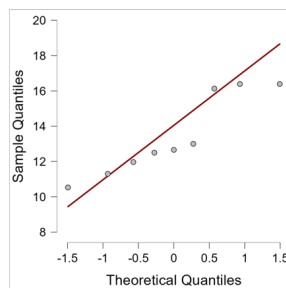
E [MPa] po 7 dnech v médiu



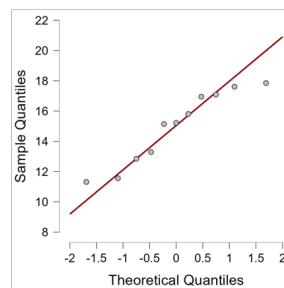
PBS



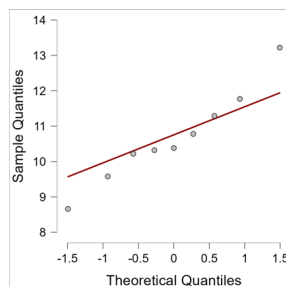
PBS s kolagenázou



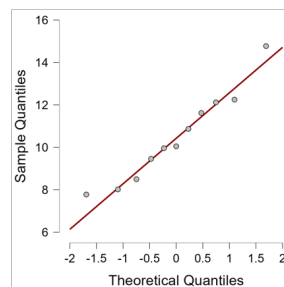
PBS s proteinázou K



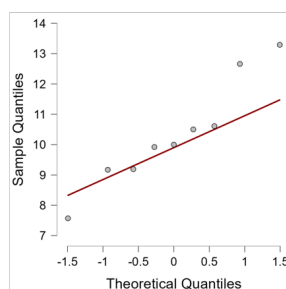
SBF



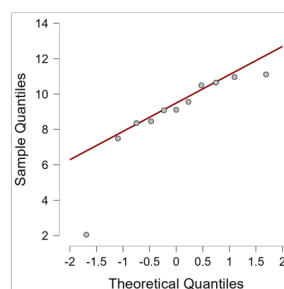
DMEM



DMEM s fibroblasty



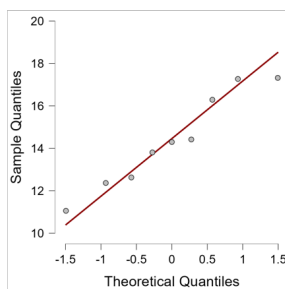
krevní plazma



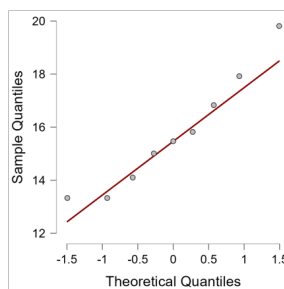
in vivo

Obrázek A.1: Q-Q grafy naměřených modulů pružnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů

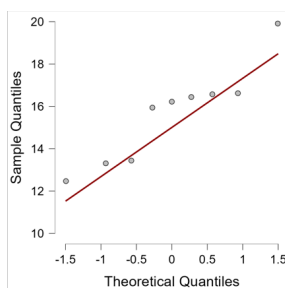
E [MPa] po 14 dnech v médiu



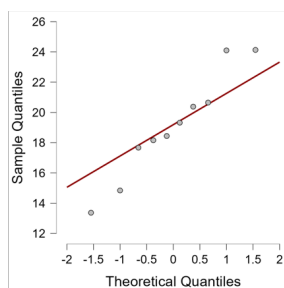
PBS



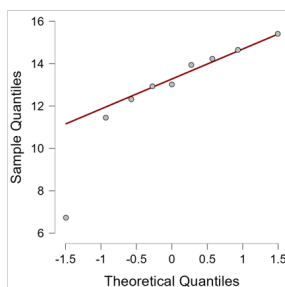
PBS s kolagenázou



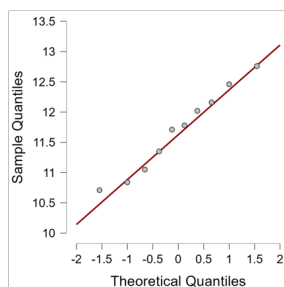
PBS s proteinázou K



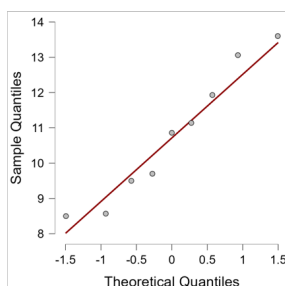
SBF



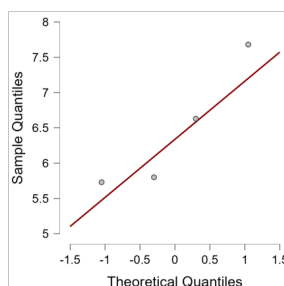
DMEM



DMEM s fibroblasty



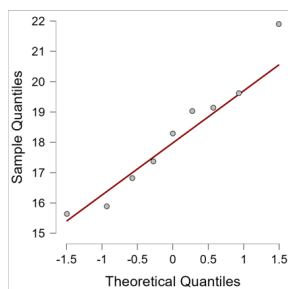
krevní plazma



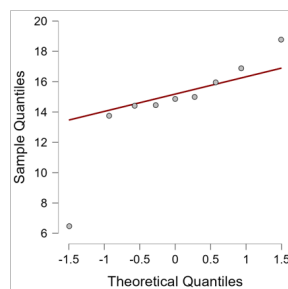
in vivo

Obrázek A.2: Q-Q grafy naměřených modulů pružnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů

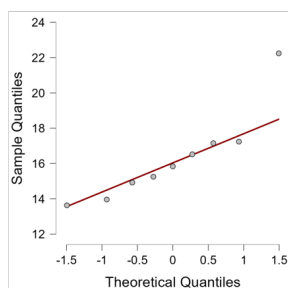
E [MPa] po 28 dnech v médiu



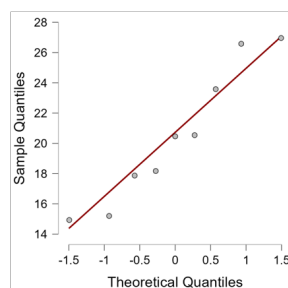
PBS



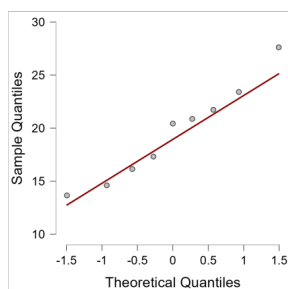
PBS s kolagenázou



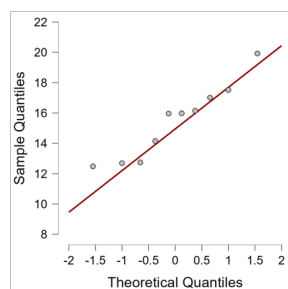
PBS s proteinázou K



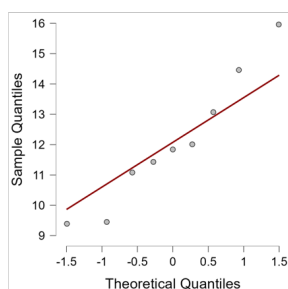
SBF



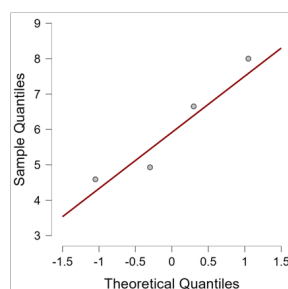
DMEM



DMEM s fibroblasty



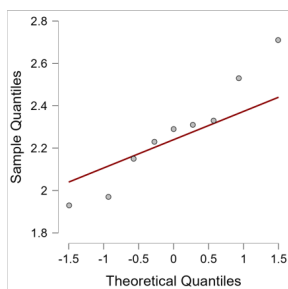
krevní plazma



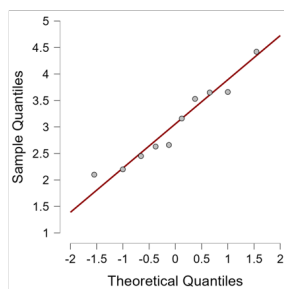
in vivo

Obrázek A.3: Q-Q grafy naměřených modulů pružnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů

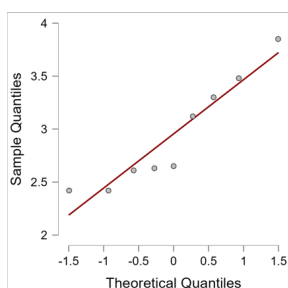
R_m [MPa] po 7 dnech v médiu



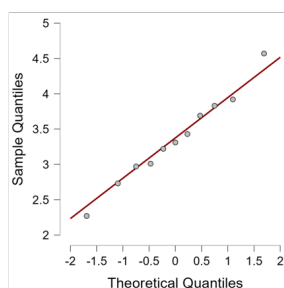
PBS



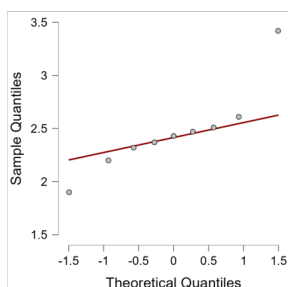
PBS s kolagenázou



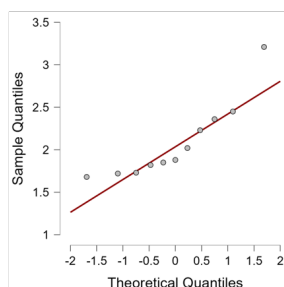
PBS s proteinázou K



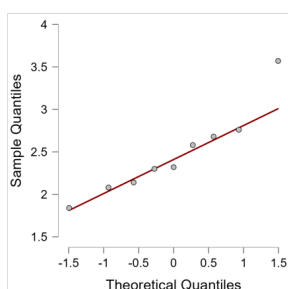
SBF



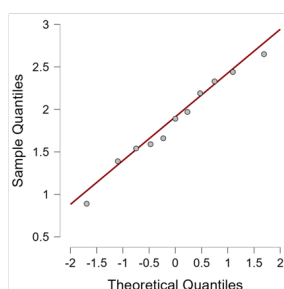
DMEM



DMEM s fibroblasty



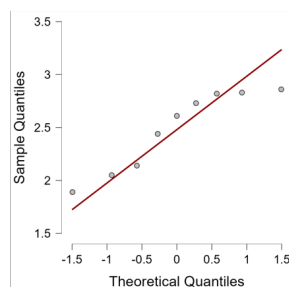
krevní plazma



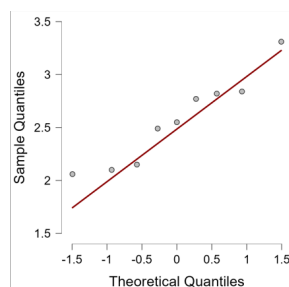
in vivo

Obrázek A.4: Q-Q grafy naměřených mezí pevnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů

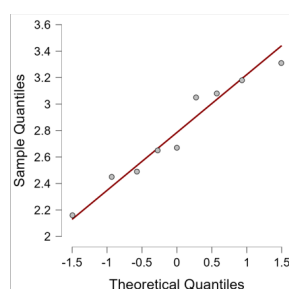
R_m [MPa] po 14 dnech v médiu



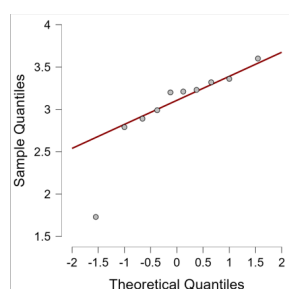
PBS



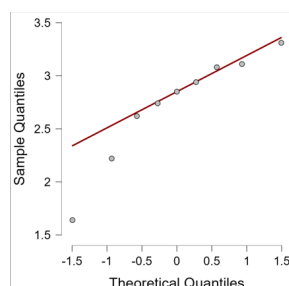
PBS s kolagenázou



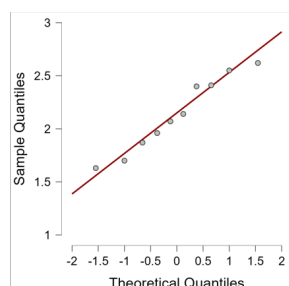
PBS s proteinázou K



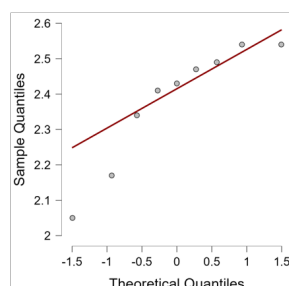
SBF



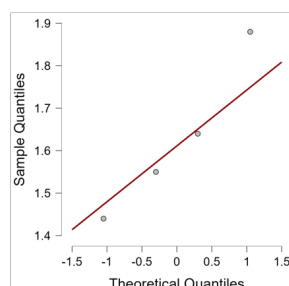
DMEM



DMEM s fibroblasty



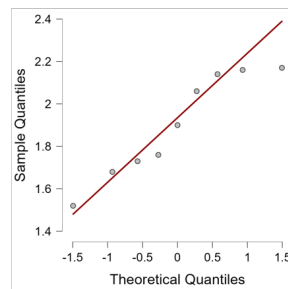
krevní plazma



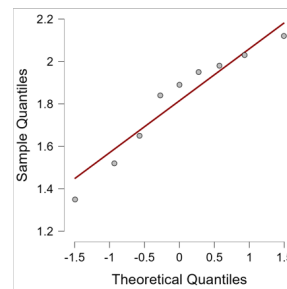
in vivo

Obrázek A.5: Q-Q grafy naměřených mezí pevnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů

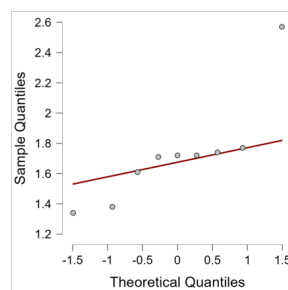
R_m [MPa] po 28 dnech v médiu



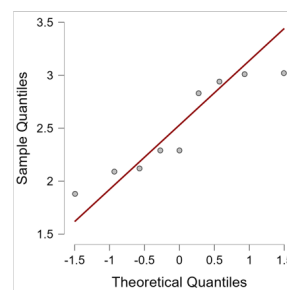
PBS



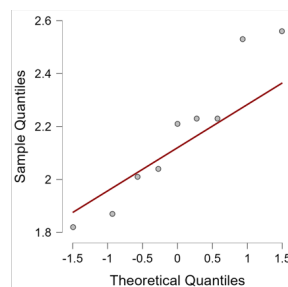
PBS s kolagenázou



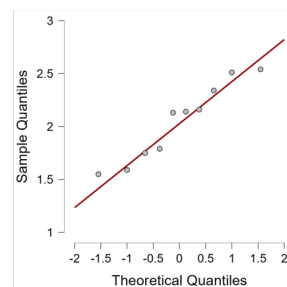
PBS s proteinázou K



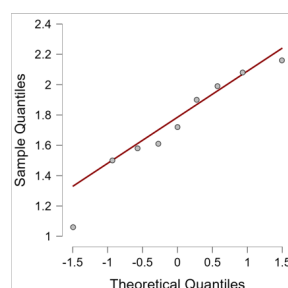
SBF



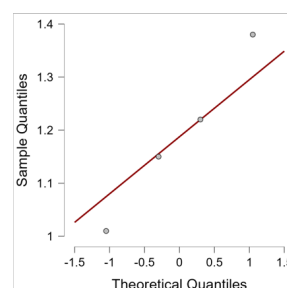
DMEM



DMEM s fibroblasty



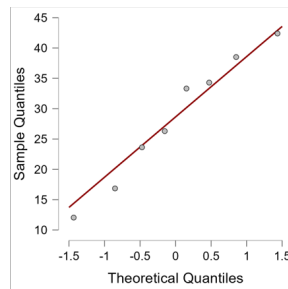
krevní plazma



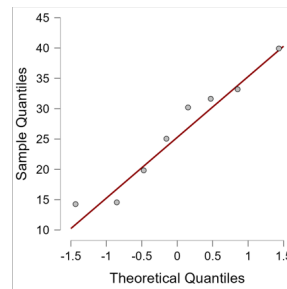
in vivo

Obrázek A.6: Q-Q grafy naměřených mezí pevnosti vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů

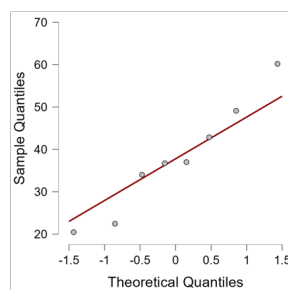
Δm [%] po 7 dnech v médiu



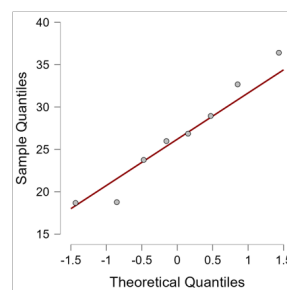
PBS



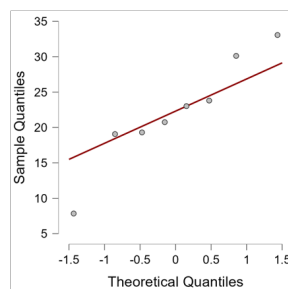
PBS s kolagenázou



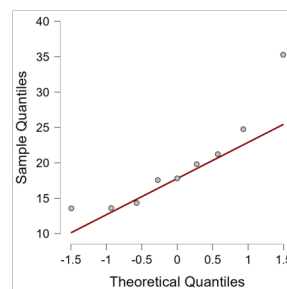
PBS s proteinázou K



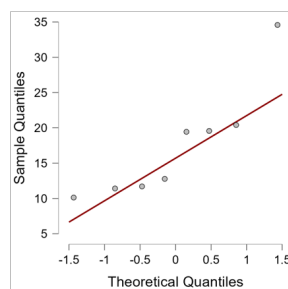
SBF



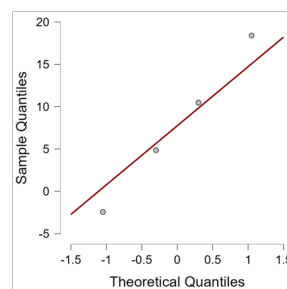
DMEM



DMEM s fibroblasty



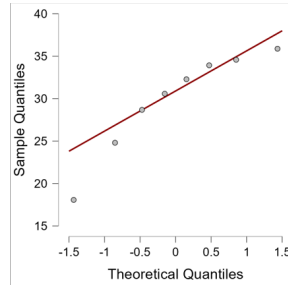
krvní plazma



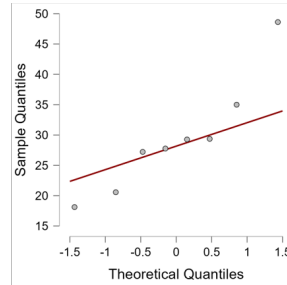
in vivo

Obrázek A.7: Q-Q grafy hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 7 dnů

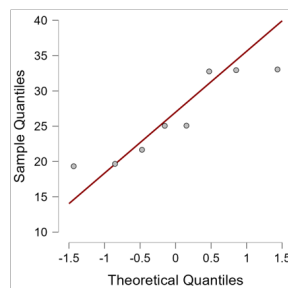
Δm [%] po 14 dnech v médiu



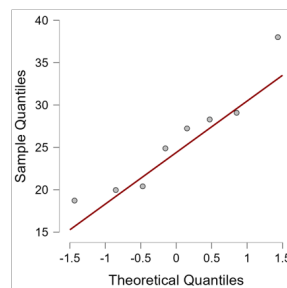
PBS



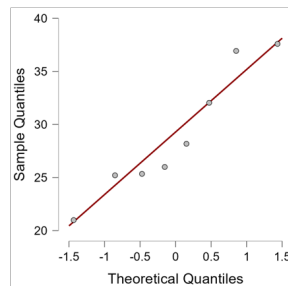
PBS s kolagenázou



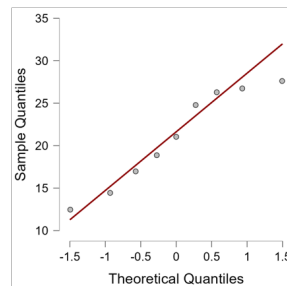
PBS s proteinázou K



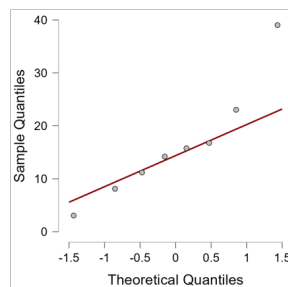
SBF



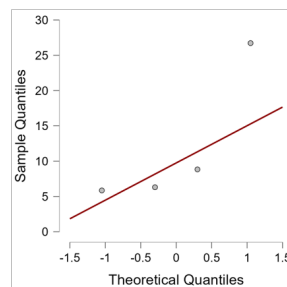
DMEM



DMEM s fibroblasty



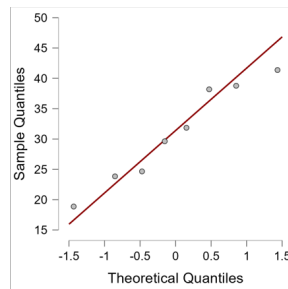
krevní plazma



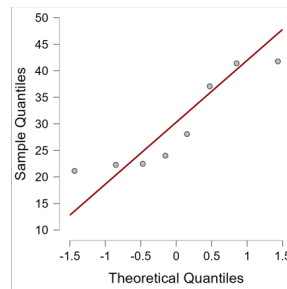
in vivo

Obrázek A.8: Q-Q grafy hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 14 dnů

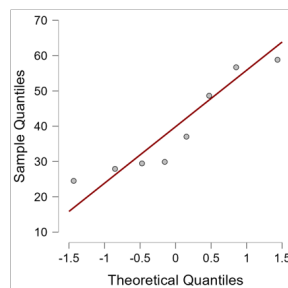
Δm [%] po 28 dnech v médiu



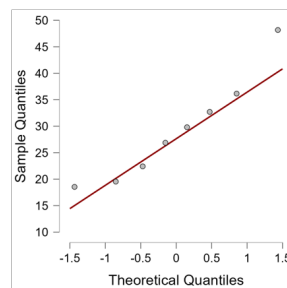
PBS



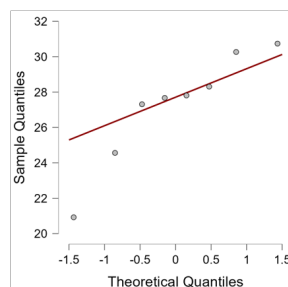
PBS s kolagenázou



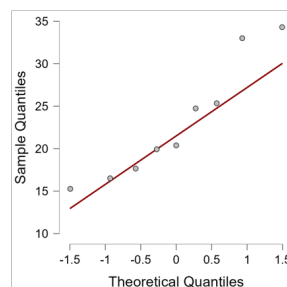
PBS s proteinázou K



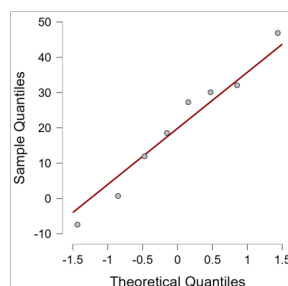
SBF



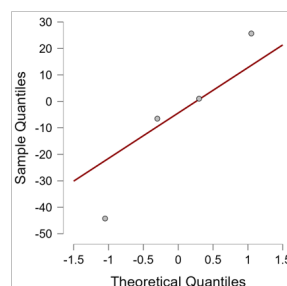
DMEM



DMEM s fibroblasty



krevní plazma



in vivo

Obrázek A.9: Q-Q grafy hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám po dobu 28 dnů

B Statistické vyhodnocení: párové porovnání

Cílem práce bylo porovnat vliv různých simulovaných tělních prostředí na materiál. Středem zájmu je ale rozdíl mezi simulovaným a reálným tělním prostředím. Proto jsou v následujících tabulkách (B.1 až B.6) shrnuty výsledky statistických párových testů porovnávající účinek simulovaných tělních podmínek a prostředí *in vivo* na mechanické vlastnosti a hmotnostní úbytek vzorků.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu JASP [25]. Bylo ověřeno normální rozdělení získaných dat (viz příloha A). Shoda rozptylů byla zkontrolována pomocí Levenova testu. Studentův t-test (parametrický) byl použit v případě potvrzené normality a shodných rozptylů, v opačném případě byl použit (neparametrický) Mann-Whitneyho test.

Tabulka B.1: Párové porovnání mechanických vlastností vzorků vystavených vybraným podmínkám s vlastnostmi vzorků vystavených prostředí *in vivo* po dobu 7 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9

porovnání s	E		R_m	
	test	p	test	p
PBS	Mann-Whitney	0,175	Mann-Whitney	0,080
SBF	Mann-Whitney	<0,001	Student	<0,001
PBS s kolagenázou	Mann-Whitney	<0,001	Student	<0,001
PBS s proteinázou K	Mann-Whitney	<0,001	Mann-Whitney	0,869
DMEM	Mann-Whitney	0,067	Mann-Whitney	0,016
krevní plazma	Mann-Whitney	0,230	Student	0,017
DMEM s fibroblasty	Mann-Whitney	0,193	Mann-Whitney	0,365

Tabulka B.2: Párové porovnání mechanických vlastností vzorků vystavených vybraným podmínkám s vlastnostmi vzorků vystavených prostředí *in vivo* po dobu 14 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9

porovnání s	E		R_m	
	test	p	test	p
PBS	Student	<0,001	Mann-Whitney	0,003
SBF	Mann-Whitney	0,002	Mann-Whitney	0,004
PBS s kolagenázou	Student	<0,001	Mann-Whitney	0,003
PBS s proteinázou K	Mann-Whitney	0,003	Mann-Whitney	0,003
DMEM	Mann-Whitney	0,006	Mann-Whitney	0,013
krevní plazma	Mann-Whitney	0,003	Mann-Whitney	0,007
DMEM s fibroblasty	Student	<0,001	Mann-Whitney	0,024

Tabulka B.3: Párové porovnání mechanických vlastností vzorků vystavených vybraným podmínkám s vlastnostmi vzorků vystavených prostředí *in vivo* po dobu 28 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9

porovnání s	E		R_m	
	test	p	test	p
PBS	Student	<0,001	Mann-Whitney	0,003
SBF	Mann-Whitney	0,003	Mann-Whitney	0,007
PBS s kolagenázou	Mann-Whitney	0,011	Mann-Whitney	0,006
PBS s proteinázou K	Mann-Whitney	0,003	Mann-Whitney	0,013
DMEM	Student	<0,001	Mann-Whitney	0,007
krevní plazma	Mann-Whitney	0,003	Mann-Whitney	0,020
DMEM s fibroblasty	Mann-Whitney	0,002	Mann-Whitney	0,002

Tabulka B.4: Párové porovnání hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám s úbytky vzorků vystavených prostředí *in vivo* po dobu 7 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9

porovnání s	Δm	
	test	p
PBS	Student	0,008
SBF	Student	0,002
PBS s kolagenázou	Student	0,009
PBS s proteinázou K	Student	0,002
DMEM	Student	0,016
krevní plazma	Mann-Whitney	0,073
DMEM s fibroblasty	Mann-Whitney	0,050

Tabulka B.5: Párové porovnání hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám s úbytky vzorků vystavených prostředí *in vivo* po dobu 14 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9

Δm		
porovnání s	test	p
PBS	Mann-Whitney	0,875
SBF	Mann-Whitney	0,048
PBS s kolagenázou	Mann-Whitney	0,016
PBS s proteinázou K	Mann-Whitney	0,073
DMEM	Mann-Whitney	0,048
krevní plazma	Mann-Whitney	0,461
DMEM s fibroblasty	Mann-Whitney	0,106

Tabulka B.6: Párové porovnání hmotnostních úbytků vzorků vystavených vybraným podmínkám s úbytky vzorků vystavených prostředí *in vivo* po dobu 28 dnů, $p \leq 0,05$ značí statisticky významné rozdíly, n=9

Δm		
porovnání s	test	p
PBS	Mann-Whitney	0,028
SBF	Mann-Whitney	0,028
PBS s kolagenázou	Mann-Whitney	0,048
PBS s proteinázou K	Mann-Whitney	0,008
DMEM	Mann-Whitney	0,016
krevní plazma	Mann-Whitney	0,154
DMEM s fibroblasty	Mann-Whitney	0,106

C Výsledky EDS analýzy

Tabulka C.1: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích materiálu, n=10

prvek	C K	N K	O K	S K
medián	60.12	17.76	21.99	0.14
dolní kvartil	59.72	17.52	21.75	0.13
horní kvartil	60.6	17.95	22.37	0.15

Tabulka C.2: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v PBS po dobu 28 dnů, n=10

prvek	C K	N K	O K	Na K	Mg K	Si K	P K	S K	Cl K	K K	Ca K
medián	50,94	18,47	19,51	4,96	0,09	0,21	0,25	0,37	5,38	0,37	0,04
dolní kvartil	49,85	16,92	18,47	4,27	0,03	0,17	0,19	0,33	4,62	0,34	0,03
horní kvartil	51,31	19,10	19,96	6,21	0,13	0,21	0,26	0,38	6,55	0,41	0,05

Tabulka C.3: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v SBF po dobu 28 dnů, n=10

prvek	C K	N K	O K	Na K	Mg K	Si K	P K	S K	Cl K	K K	Ca K
medián	47,51	16,33	18,82	5,94	0,24	0,26	0,23	0,28	10,35	0,47	0,32
dolní kvartil	47,07	14,34	17,30	5,30	0,17	0,22	0,20	0,25	8,17	0,37	0,28
horní kvartil	49,35	17,10	20,00	6,68	0,29	0,27	0,24	0,33	12,12	0,57	0,38

Tabulka C.4: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v PBS s kolagenázou po dobu 28 dnů, n=10

prvek	C K	N K	O K	Na K	Mg K	Si K	P K	S K	Cl K	K K	Ca K
medián	49,65	17,59	18,35	6,35	0,04	0,21	0,21	0,28	6,81	0,51	0,03
dolní kvartil	48,72	15,41	18,07	6,14	0,03	0,17	0,16	0,25	6,60	0,43	0,02
horní kvartil	51,00	18,06	19,39	7,15	0,07	0,23	0,26	0,31	7,16	0,57	0,03

Tabulka C.5: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v PBS s proteínázou K po dobu 28 dnů, n=10

prvek	C K	N K	O K	Na K	Mg K	Si K	P K	S K	Cl K	K K	Ca K
medián	54,43	11,51	18,48	6,33	0,01	0,19	0,38	0,17	5,64	0,32	0,03
dolní kvartil	52,15	9,47	14,67	5,26	0,00	0,10	0,30	0,15	5,19	0,28	0,03
horní kvartil	57,09	14,50	23,77	7,77	0,08	0,24	0,51	0,49	8,24	0,36	0,04

Tabulka C.6: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v DMEM po dobu 28 dnů, n=10

prvek	C K	N K	O K	Na K	Mg K	Si K	P K	S K	Cl K	K K	Ca K
medián	45,02	15,19	21,20	8,05	0,28	0,30	0,69	0,41	6,97	0,38	1,30
dolní kvartil	43,44	14,32	20,16	7,09	0,03	0,10	0,42	0,37	6,18	0,32	0,78
horní kvartil	46,24	16,31	22,40	10,57	0,33	0,33	0,88	0,46	8,58	0,47	1,73

Tabulka C.7: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v krevní plazmě po dobu 28 dnů, n=10

prvek	C K	N K	O K	Na K	Mg K	Si K	P K	S K	Cl K	K K	Ca K
medián	50,78	17,46	20,92	5,04	0,11	0,24	0,17	0,71	4,28	0,27	0,09
dolní kvartil	50,07	16,97	19,96	4,74	0,07	0,23	0,14	0,62	3,32	0,25	0,08
horní kvartil	52,06	18,13	21,70	5,13	0,21	0,26	0,19	0,79	4,44	0,35	0,12

Tabulka C.8: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích uložených v DMEM s lidskými fibroblasty po dobu 28 dnů, n=10

prvek	C K	N K	O K	Na K	Mg K	Si K	P K	S K	Cl K	K K	Ca K
medián	47.74	15.03	22.98	7.03	0.26	0.31	0.33	0.46	5.17	0.50	0.25
dolní kvartil	44.69	13.60	21.97	6.26	0.22	0.27	0.29	0.43	4.74	0.42	0.22
horní kvartil	49.94	15.83	23.48	8.24	0.32	0.32	0.47	0.51	6.13	0.51	0.46

Tabulka C.9: Hmotnostní podíl prvků [%] ve vzorcích explantovaných z peritonea po 28 dnech, n=10

prvek	C K	N K	O K	Na K	Mg K	Si K	P K	S K	Cl K	K K	Ca K
medián	28.03	14.58	16.62	1.45	0.17	0.11	0.35	0.43	1.13	0.62	36.24
dolní kvartil	27.56	14.38	16.20	1.36	0.08	0.10	0.20	0.40	0.77	0.46	35.67
horní kvartil	29.01	15.25	17.08	1.53	0.17	0.13	0.50	0.52	1.39	0.73	36.67