

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE  
FAKULTA STROJNÍ

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Verifikace vybraných *in vitro* modelů tělního prostředí s *in vivo*  
podmínkami**

AUTOR: Bc. Radek Linhart

STUDIJNÍ PROGRAM: Biomechanika

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Linhart** Jméno: **Radek** Osobní číslo: **469570**  
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:

**Verifikace vybraných in vitro modelů tělního prostředí s in vivo podmínkami**

Název diplomové práce anglicky:

**Verification of selected in vitro models of the body environment with in vivo conditions**

Pokyny pro vypracování:

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

Seznam doporučené literatury:

1. Suchý T, et al. 2016 J. Mater. Sci. Mater. Med. 29:20. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-6024-2>
2. Suchý T, et al. 2021 Materials 14:4388. <https://doi.org/10.3390/ma14164388>
3. Yilmaz B, et al. 2020 Microchem. J. 155:104713. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104713>
4. Zhang Z, et al. 2012 Acta Biomater. 8:13-19. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.020>

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:


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


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


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

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

Platnost zadání diplomové práce:

  
Ing. Radek Sedláček, Ph.D.  
podpis vedoucí(ho) práce

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

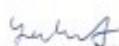
  
doc. Ing. Miroslav Španiel, CSc.  
podpis děkana(ky)

## III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

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

2.5.2022

Datum převzetí zadání



Podpis studenta

## Anotační list

Jméno autora: Bc. Radek Linhart

Název DP: Verifikace vybraných *in vitro* modelů tělního prostředí s *in vivo* podmínkami

Anglický název: Verification of selected *in vitro* models of the body environment with *in vivo* conditions

Ústav, obor: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, obor biomechaniky

Studijní program: Aplikované vědy ve strojním inženýrství

Studijní obor: Biomechanika

Akademický rok: 2021/2022

Vedoucí práce: Ing. Radek Sedláček, Ph.D.

Konzultant práce: doc. Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

Bibliografické údaje:      počet stran:            85  
   počet obrázků:        64  
   počet tabulek:        20

Klíčová slova: kolagen, scaffold, degradace, kostní tkáňové inženýrství, mechanické vlastnosti, strukturní vlastnosti

Keywords: collagen, scaffold, degradation, bone tissue engineering, mechanical properties, structural properties

Anotace: Tato diplomová práce se zabývá analýzou mechanických a strukturních vlastností kolagenních scaffoldů degradovaných v prostředí *in vivo* a v roztocích simulujících tělní prostředí po dobu 1 hodiny až 21 dnů. Scaffoldy byly podrobeny tlakové zkoušce, která byla doplněna sledováním úbytku hmotnosti, skenovací elektronovou mikroskopií, mikro-CT a FTIR analýzou. Bylo zjištěno, že degradace *in vivo* není dobře aproximována žádným ze zvolených médií.

Abstract: This master thesis focuses on analysis of mechanical and structural properties of collagen scaffolds degraded *in vivo* and in solutions which simulate the *in vivo* environment for 1 hour up to 21 days. Scaffolds were mechanically tested in compression, which was accompanied by mass loss monitoring, scanning electron microscopy, micro-CT and FTIR analysis. It was determined that *in vivo* degradation is not properly approximated by any of the selected media.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci zpracoval samostatně s využitím podkladů uvedených v seznamu použité literatury. Souhlasím, že výsledky práce mohou být dále využity dle uvážení vedoucího této práce Ing. Radka Sedláčka, Ph.D. jako jejího spoluautora. Souhlasím také s případnou publikací výsledků diplomové práce nebo její podstatné části, pokud budu uveden jako její spoluautor.

V Praze dne: .....

Podpis: .....

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Radku Sedláčkovi, Ph.D. a konzultantovi doc. Ing. Tomáši Suchému, Ph.D. za vedení, zájem, připomínky a čas, který mi věnovali. Dále bych rád poděkoval své rodině a přátelům za jejich podporu při studiu.

# Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk.....	8
1 Úvod .....	9
1.1 Motivace .....	9
1.2 Cíle práce .....	10
2 Teoretická část .....	11
2.1 Kostní tkáňové inženýrství .....	11
2.2 Klíčové vlastnosti materiálů tkáňového inženýrství.....	12
2.2.1 Biokompatibilita .....	12
2.2.2 Biodegradabilita.....	12
2.2.3 Mechanické vlastnosti.....	12
2.2.4 Struktura scaffoldu.....	12
2.3 Přehled materiálů pro tkáňové inženýrství .....	13
2.4 Kolagen jako biomateriál v tkáňovém inženýrství .....	14
2.4.1 Kolagen.....	14
2.4.2 Molekula kolagenu .....	14
2.4.3 Vlastnosti kolagenu jako biomateriálu .....	15
2.4.4 Využití kolagenu.....	16
2.4.5 Sítování kolagenu.....	16
2.5 Degradace polymerních scaffoldů .....	17
2.5.1 Degradace polymerů <i>in vivo</i> .....	18
2.5.2 Nebuněčná degradační média .....	19
2.5.3 Metody měření degradace kolagenních scaffoldů .....	22
3 Experimentální část.....	24
3.1 Použité materiály a příprava vzorků .....	24
3.2 Použitá média a popis expozice .....	25
3.3 Metodika experimentů .....	27
3.3.1 Tlakové zkoušky .....	27
3.3.2 Hmotnostní úbytky .....	31
3.3.3 Skenovací elektronová mikroskopie .....	32

3.3.4 Počítačová mikrotomografie .....	32
3.3.5 Infračervená spektroskopie .....	33
3.4 Statistické zpracování dat .....	33
4 Výsledky .....	36
4.1 Tlakové zkoušky .....	36
4.2 Hmotnostní úbytky .....	48
4.3 Skenovací elektronová mikroskopie .....	49
4.4 Počítačová mikrotomografie .....	52
4.5 Infračervená spektroskopie .....	54
5 Diskuse.....	57
6 Závěr .....	61
7 Publikované výsledky .....	62
8 Seznam použité literatury .....	63
Seznam obrázků.....	69
Seznam tabulek .....	75
Přílohy.....	77

## Seznam použitých symbolů a zkratk

Symbol	Jednotky	Význam
$A_0$	$\text{mm}^2$	Počáteční průřez vzorku v rovině kolmé na zatížení
$E$	MPa	Elastický gradient
$F$	N	Okamžitá tlaková síla
$g$		Hedgesovo $g$
$h_0$	mm	Počáteční výška vzorku
$m_0$	mg	Počáteční hmotnost vzorku před degradací
$m_L$	%	Hmotnostní úbytek
$m_t$	mg	Hmotnost vzorku na konci degradace
$n$		Rozsah souboru dat
$p$		$p$ -hodnota statistického testu
$P$	%	Míra porozity
$r$		Koeficient pořadové biseriální korelace
$V_c$	$\text{mm}^3$	Celkový objem scaffoldu
$V_k$	$\text{mm}^3$	Objem hmoty ve scaffoldu
$W$	$\text{MJ/m}^3$	Absorbovaná energie
$W_e$	%	Účinnost absorbování energie
$\alpha$		Hladina významnosti statistického testu
$\Delta h$	mm	Změna výšky vzorku
$\varepsilon$		Deformace vzorku
$\varepsilon_0$	%	Horní mez deformace
$\sigma$	MPa	Smluvní tlakové napětí
$\sigma_0$	MPa	Maximální napětí v tlaku do horní meze deformace
$\sigma_{20}$	MPa	Napětí odpovídající 20 % stabilní hladiny napětí
$\sigma_{70}$	MPa	Napětí odpovídající 70 % stabilní hladiny napětí
$\sigma_{pl}$	MPa	Stabilní hladina napětí

Zkratka	Význam
$\mu\text{CT}$	Počítačová mikrotomografie
DHT	Dehydrotermální ošetření
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
FYZ	Fyziologický roztok
NHS	N-hydroxysukcinimid
ORIG	Nedegradovaný scaffold
PBS	Fosfátový pufovaný roztok
PLA	Lidská krevní plazma
PLGA	Poly(mléčná-co-glykolová) kyselina
SBF	Simulovaná tělní tekutina
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie



# 1 Úvod

V lidském těle se nachází více než 200 kostí s různou stavbou a velikostí, které slouží jako stavební prvky, chrání životně důležité orgány a podporují pohyb těla. Jejich správná funkce je tedy zásadní pro kvalitu našeho života. Traumata, degenerativní poruchy a onemocnění kostí často vyžadují chirurgický zákrok, během něhož je do těla implantován biomateriál, který zastupuje funkci původní nativní tkáně [1]. Použití biomateriálů pro fixaci zlomenin a léčbu dalších kosterních poranění lze datovat do období starověké Egyptské a Etruské civilizace, které pro tyto účely používaly kovové implantáty [2], nebo do období před 4 000 lety v Peru, kdy byl pro léčbu traumatického poranění lebky použit tenký plát zlata [3].

V současnosti je pro léčbu traumatických poranění, infekcí, nádorových onemocnění kostí a dalších využíváno autologních (od samotného pacienta), alogenních (od dárce) nebo xenogenních (od jiného živočišného druhu) kostních štěpů. Alternativou je použití syntetických kostních štěpů [4] z kovových, keramických nebo polymerních materiálů [5]. Klíčovými parametry biomateriálů jsou mimo jiné biokompatibilita, biodegradabilita a mechanické a strukturní vlastnosti [6]. Sledování degradace biomateriálu je v ideálním případě prováděno na zvířecím modelu. To není z různých důvodů vždy možné, a proto je snaha degradaci, a s ní související změnou mechanických a strukturních vlastností, v *in vivo* prostředí co nejvěrněji simulovat pomocí roztoků.

Tato diplomová práce se zabývá analýzou mechanických a strukturních vlastností kolagenních scaffoldů degradovaných ve vybraných médiích simulujících tělní prostředí a porovnává je s vlastnostmi kolagenních scaffoldů degradovaných ve skutečném tělním prostředí pokusného zvířete.

Diplomová práce je součástí studie, která byla finančně podpořena grantovým projektem Technologické agentury ČR v rámci projektu č. TP01010055 (program GAMA2), dílčí projekt „Ověření technologie zpracování kolagenové disperze pro impregnaci porézních povrchů kotvicích částí implantátů“. Cílem studie je porovnání celkem jedenácti různých nejčastěji používaných simulovaných prostředí s prostředím *in vivo*. Vlivy jednotlivých prostředí byly ověřovány na modelových vzorcích (kolagenových scaffoldech), které byly vybrány jako zástupce jednoho z nejčastěji používaných biomateriálů v implantologii.

## 1.1 Motivace

Při navrhování nového biomateriálu pro použití v klinické praxi je nezbytné otestovat všechny vlastnosti materiálu – chemické, mechanické i strukturní. Při jejich zjišťování je ovšem

třeba vzít v potaz prostředí, ve kterém budou materiály nakonec použity. Suchý a kol. [7] ukázal, že scaffoldy v suchém, nehydratovaném stavu mají výrazně odlišné mechanické vlastnosti oproti hydratovaným materiálům. Je tedy nutné testovat hydratované biomateriály, protože hydratovaný stav materiálu věrněji simuluje skutečné tělní prostředí.

Testování materiálů na zvířecích modelech je, zejména na počátku vývoje biomateriálu, obtížné kvůli přísným etickým pravidlům a je možné jej použít zpravidla až na konci vývojového cyklu biomateriálu. Proto je vhodné pro experimentální část vývojového procesu využít *in vitro* simulaci tělního prostředí. K tomu prostředí je možné využít řadu různých simulačních roztoků, z nichž každý má jiný vliv na degradaci materiálu a jeho mechanické, chemické i strukturní vlastnosti [8].

Z důvodu, že skutečné tělní prostředí má velmi komplexní chemické složení, je zřejmé, že *in vitro* simulace budou pouze aproximovat interakce mezi živými tkáněmi a materiálem. V této práci bude zhodnocen degradační vliv 4 vybraných anorganických, neenzymatických simulovaných tělních prostředích na kolagenní scaffoldy a bude porovnán s degradací kolagenních scaffoldů v *in vivo* podmínkách zvířecího modelu. Kolagenní scaffoldy budou analyzovány mechanickými zkouškami v tlaku, měřením hmotnostních úbytků, pomocí skenovací elektronové mikroskopie, počítačové mikrotomografie a infračervené spektroskopie.

## 1.2 Cíle práce

Hlavními cíli práce bylo určení a statistické vyhodnocení těchto parametrů získaných z tlakových zkoušek kolagenních scaffoldů:

1. elastický gradient,
2. stabilní hladina napětí,
3. absorbovaná energie a
4. účinnost absorbování energie

a porovnání vlivu simulovaných tělních prostředích na kolagenní scaffoldy se skutečným tělním prostředím.

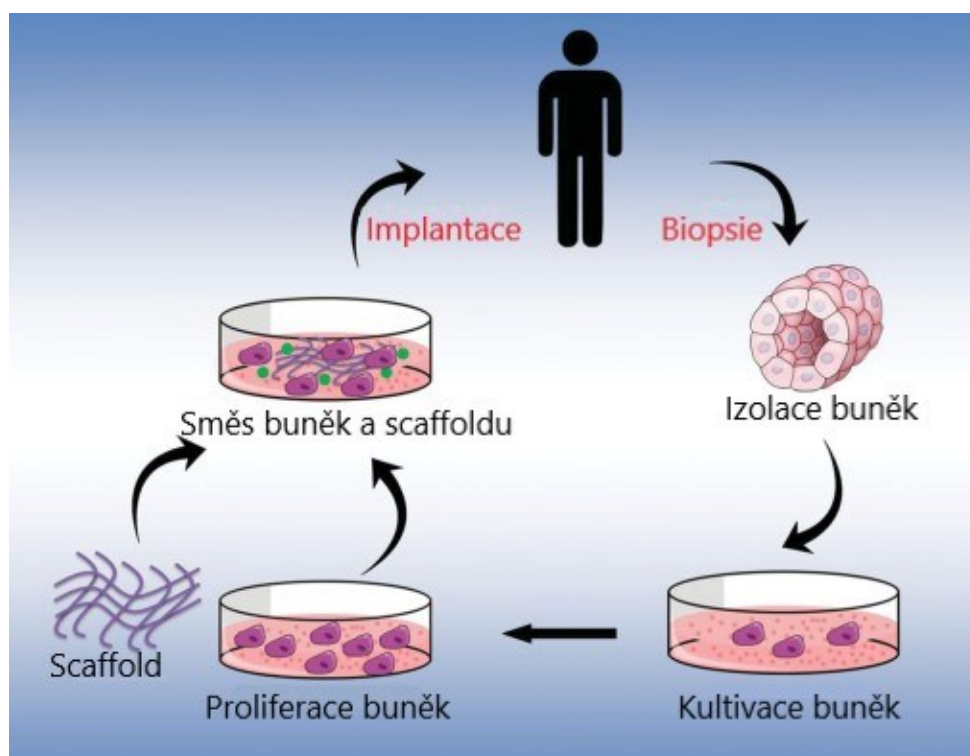
Vedlejšími cíli práce bylo:

1. změřit hmotnostní úbytky testovaných scaffoldů,
2. provést strukturní analýzu pomocí skenovací elektronové mikroskopie a mikro-CT a
3. provést spektrální analýzu pomocí infračervené spektroskopie.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Kostní tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je obor, který využívá biokompatibilní a biodegradabilní materiály k tvorbě struktur, napodobujících lidskou tkáň. Cílem tkáňového inženýrství je vytvořit biologické náhrady, které budou udržovat, opravovat nebo vylepšovat funkci poškozených tkání. Koncept tkáňového inženýrství ukazuje Obrázek 1 [6; 9].



Obrázek 1: Schéma procesu tkáňového inženýrství [6].

Kostní tkáň má regenerativní schopnosti a do určité míry dokáže poranění sama zahojit. V případě poškození tkáně přesahující kritický rozsah, které může být způsobeno například vážným traumatem, vrozenou vadou, osteoporózou nebo nádorovým onemocněním, je nutné provést chirurgický zákrok. V současnosti je při těchto operacích provedena autologní, allogenní nebo xenogenní transplantace kostního štěpu. V některých případech mohou být využity také polymerní, kovové nebo keramické náhrady kostní štěpu [4].

Perspektivním přístupem v léčbě poranění vyžadujícím invazivní zákrok je tkáňové inženýrství. Tímto způsobem je možné pacientovi poskytnout adekvátní a efektivní léčbu a současně snížit zátěž na dárce tkáně. Tkáňové inženýrství také umožňuje provést léčbu

s jediným chirurgickým zákrokem. Mechanické a degradační vlastnosti implantovaného scaffoldu ovlivní integraci implantátu do nativní tkáně [4].

## **2.2 Klíčové vlastnosti materiálů tkáňového inženýrství**

Vhodnost materiálů pro použití v tkáňovém inženýrství se hodnotí podle několika klíčových kritérií, kterými jsou biokompatibilita, biodegradabilita, mechanické vlastnosti, struktura scaffoldu a výrobní technologie [6].

### **2.2.1 Biokompatibilita**

Prvním z požadavků na materiály pro výrobu scaffoldů je biokompatibilita s lidským tělem. To znamená, že použitý materiál musí v hostitelském těle vyvolat požadovanou reakci a nesmí způsobit nežádoucí zánětlivou reakci imunitního systému, která by mohla prodloužit proces hojení nebo způsobit odmítnutí materiálu tělem. Žádný materiál ovšem není univerzálně biokompatibilní, volba materiálu tedy záleží na konkrétní aplikaci [5; 6].

### **2.2.2 Biodegradabilita**

Biodegradabilita neboli rozložitelnost a vstřebatelnost materiálu v těle, patří mezi zásadní faktory při volbě materiálu scaffoldu. Scaffoldy slouží jako podpora pro obnovu přirozené tkáně a pomáhají zachovat strukturu a mechanické vlastnosti regenerované tkáně. Je tedy nutné, aby materiál ideálně degradoval stejně rychle, jako se tvoří nová tkáň a byl postupně resorbován a nahrazen nově vytvořenou tkání [6; 10].

### **2.2.3 Mechanické vlastnosti**

Správné mechanické vlastnosti scaffoldu jsou kritické pro úspěšné implantování scaffoldu. Implantovaný scaffold musí mít mechanické vlastnosti co nejvíce shodné s mechanickými vlastnostmi tkáně v místě implantování. Je také nezbytné, aby si scaffold zachoval své mechanické vlastnosti i po implantaci a mohl podporovat i rekonstrukci tkání přenášející zatížení, jako jsou kosti a chrupavky. Z tohoto důvodu je nutné dopředu znát, jakým způsobem se mechanické vlastnosti scaffoldu mění v průběhu léčby [6; 11].

### **2.2.4 Struktura scaffoldu**

Struktura scaffoldu výrazně ovlivňuje jeho účinnost po implantaci. Jeho porézní struktura s propojenými póry umožňuje migraci buněk do prázdných prostorů ve scaffoldu, jejich rovnoměrné rozložení a vaskularizaci vnitřních oblastí scaffoldu. Dochází tak k prorůstání

scaffoldu tkání a zvyšuje se mechanická stabilita regenerované tkáně. Důležité strukturní faktory při navrhování scaffoldů jsou průměrná velikost pórů, rozložení pórů, tvar a objem pórů, jejich propojení a drsnost stěn pórů. Příliš malé póry brání v penetraci buněk do scaffoldu, tvorbě extracelulární matrice a vaskularizaci. Propojení pórů je kritické pro zajištění, že buňky od sebe nejsou vzdáleny více než 200  $\mu\text{m}$ , umožňující tak přenos kyslíku a živin a odvod produktů metabolické aktivity buněk [6; 11].

## 2.3 Přehled materiálů pro tkáňové inženýrství

Biomateriály jsou materiály využívané v medicíně, u kterých se předpokládá jejich kontakt s živými tkáněmi. Většina lidí se s prvním biomateriálem setká ve formě zubních plomb. Stále více osob se ovšem stává závislými na kloubních implantátech a cévních náhradách. Tyto implantáty bezpochyby zvyšují kvalitu života nejen starších lidí, ale i mladých lidí s vrozenými vadami, srdečními poruchami nebo po zranění [5].

Pro správné použití biomateriálu je nutné brát v potaz vhodnou volbu materiálu, inženýrský návrh a výrobní proces. Materiál je nutné volit s ohledem na jeho mechanické vlastnosti a biokompatibilitu. Při volbě se nesmí zapomenout na fakt, že dopady mechanických a chemických faktorů mohou být fatální. Jedná se například o únavu materiálu, korozi nebo opotřebení. Koroze a degradace mohou vést k uvolnění iontů do tkání a následnému vyvolání alergických reakcí. Také je nutné si uvědomit, že biologické prostředí není konstantní a neustále se v něm může měnit množství kyslíku, volných radikálů a buněčná aktivita [5].

Pro použití v biomateriálových aplikacích jsou voleny kovy, keramika, polymery a kompozitní materiály. Je možné je rozdělit do 3 kategorií podle druhu jejich použití [5]:

- a. Inertní nebo relativně inertní materiály, které mají minimální odezvu od hostitelského prostředí.
- b. Bioaktivní materiály, které stimulují vazbu s okolními tkáněmi.
- c. Biodegradabilní materiály, které se po určitém čase vstřebají do okolních tkání.

Pro své inertní vlastnosti jsou nejčastěji voleny kovy a jejich slitiny, bioaktivní a biodegradabilní vlastnosti mají keramika a polymerní materiály [5].

## 2.4 Kolagen jako biomateriál v tkáňovém inženýrství

### 2.4.1 Kolagen

Kolagen patří mezi nejvíce rozšířené fibrilární proteiny, a především v savčích tkáních plní řadu mechanických funkcí. Tvoří většinou část vazů a šlach, většinu organické matrice kostí a nachází se také v kůži a cévách [12].

Do dnešního dne bylo popsáno 29 různých typů kolagenu a všechny mají typickou trojšroubovicovou strukturu. Kolagen typu I, II, III, V a XI tvoří kolagenní vlákna [13].

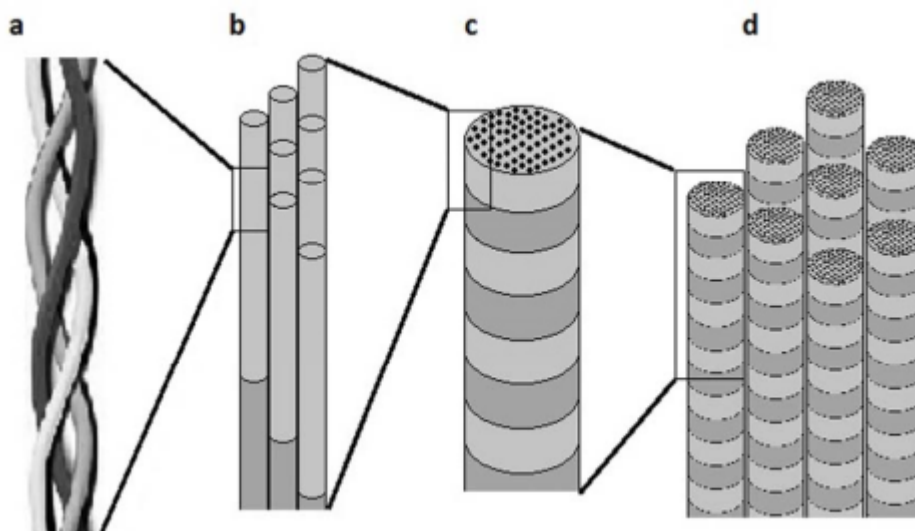
V současnosti se kolagen využívá v hydrogelech nebo kolagenních scaffoldech. Kolagen poskytuje ideální matici pro mnoho typů buněk, nicméně studie ukazují, že kolagenní matrice jsou biologicky aktivní a stimulují migraci buněk v scaffoldech. Přestože je známo 29 typů kolagenu, k výrobě kolagenních biomateriálů se jich využívá pouze několik. V současné době je nejvíce využívaný kolagen typu I [13; 14].

### 2.4.2 Molekula kolagenu

Kolagen se skládá ze tří polypeptidických  $\alpha$  řetězců, které se díky jejich molekulární struktuře skládají dohromady. Každý  $\alpha$  řetězec je složen zpravidla z aminokyselin glycinu, prolinu a hydroxyprolinu. [13; 14].

Existuje asi 25 různých konformací  $\alpha$  řetězce. Kombinací těchto řetězců ve skupinách po třech získáváme právě 29 typů kolagenu, které jsou doposud popsány [13].

Jednotlivé  $\alpha$  řetězce tvoří tropokolagenní molekuly, které se následně spojují do fibril o průměru 10-300 nm. Nahromaděné fibrily poté tvoří kolagenní vlákna o průměru od 0,5 do 3  $\mu$ m. Hierarchickou strukturu kolagenní molekuly zobrazuje Obrázek 2. Pro biomateriálové inženýrství jsou v současné době nejdůležitější kolageny tvořící fibrily a vlákna [13].



Obrázek 2: Hierarchická struktura kolagenu. a) Kolagenní  $\alpha$  řetězce tvořící troj šroubovici. b) Spojené tropokolagenní molekuly. c) Kolagenní fibril. d) Kolagenní vlákno [13].

Kolagen je možné získat z mnoha zdrojů. Lze jej extrahovat z téměř všech zvířat a druhů tkání. Nejčastěji se využívá kůže, šlachy a kosti skotu, vepřová kůže, krysí ocasy, ryby a medúzy. Kolagen získaný z těchto živočichů lze využívat jak v průmyslu (např. potravinářský, kosmetický), tak v klinické praxi [13; 14; 15].

### 2.4.3 Vlastnosti kolagenu jako biomateriálu

Kolagen má řadu výhodných vlastností, které jej dělají vhodným kandidátem pro použití v tkáňovém inženýrství. Díky jeho značné rozšíření v živých organismech se snadno získává ve velkém množství. Je biodegradabilní a snadno vstřebatelný, biokompatibilní a netoxický pro živé organismy. Lze jej vyrobit v mnoha různých podobách, od malých proužků po velké 3D struktury, a je možné upravit jeho materiálové vlastnosti podle potřeb. V neposlední řadě se využívá jeho kompatibilita se syntetickými polymery [16].

Nevýhody kolagenu jako biomateriálu jsou především vysoká cena čistého kolagenu, vysoká variabilita získaného kolagenu (hustota síťování, velikost vláken), hydrofilie kolagenu, která vede k bobtnání, variabilita v rychlosti enzymatické degradace a vedlejší účinky jako mineralizace. Hlavní výhody a nevýhody kolagenu shrnuje Tabulka 1 [16].

Tabulka 1: Výhody a nevýhody kolagenu jako biomateriálu [16].

Výhody	Nevýhody
Velké rozšíření v organismech	Vysoká cena čistého kolagenu
Biodegradabilita a vstřebatelnost	Variabilita získaného kolagenu
Biokompatibilita a netoxičita	Hydrofilie a mineralizace
Kompatibilita se syntetickými polymery	Variabilita v enzymatické degradaci

## 2.4.4 Využití kolagenu

Materiály na bázi kolagenu jsou velmi využívány v rekonstruktivní medicíně a farmacii. Využívají se ve formě tenkých povlaků i jako 3D struktury (hydrogely a scaffoldy). Jejich mechanické vlastnosti jsou ovšem vysoce ovlivněné původem kolagenu a také jeho následným zpracováním [17].

Z kolagenu je možné vyrobit tenké povlaky. Ty jsou následně využívány například k cílenému dodávání léků přímo do postižených tkání. Pomalá degradace povlaků o tloušťce 0,01-0,5 mm způsobí postupné uvolňování léčiv a dalších látek, které jsou v povlaku zakomponované. Tímto způsobem je možné například léčit infekční onemocnění tkáně přímo v místě, kde infekce probíhá nebo podporovat tvorbu kostní tkáně [16; 17].

Kolagenní kryty ran jsou používány pro léčbu vážných popálenin a různých dalších typů zranění. Absorbují velké množství zbytků tkáně, udržují u zranění málo vlhké prostředí a chrání oblast před vnějšími vlivy, čímž zabraňují sekundární infekci [16].

K léčbě kostních a chrupavkových defektů a k podpoře růstu nativní tkáně jsou využívány kolagenní hydrogely a scaffoldy. Kolagenní scaffoldy velmi dobře simulují strukturu kostní tkáně, a navíc jejich porézní a adhezní vlastnosti výrazně ovlivňují regeneraci kosti. Bylo také prokázáno, že kolagenní scaffoldy pozitivně ovlivňují proliferaci, přilnavost a diferenciaci chondrocytů a tím podporují regeneraci chrupavky [14].

## 2.4.5 Síťování kolagenu

Izolovaný kolagen se vyznačuje nízkou mechanickou pevností a rychlou degradací. Pro využití kolagenu v tkáňovém inženýrství jsou mechanické i chemické vlastnosti upravovány fyzikálním a chemickým síťováním. Síťování způsobuje zpevnění kolagenních vláken, a ta se stávají odolnějšími vůči široké škále vnějších vlivů [6; 18].



## **Fyzikální síťování**

Při fyzikálním síťování jsou převážně využívány dvě metody – vystavení teplu a UV záření. Tepelný způsob spočívá ve vystavení zvýšené teplotě alespoň 90 °C ve vakuu. Tento proces se nazývá dehydrotermální ošetření (DHT) a dochází při něm v důsledku vysoké teploty a vakua k odstranění molekul vody z kolagenu a následnému vytvoření mezimolekulárních vazeb [18].

Vystavení UV záření je oproti DHT rychlejší a efektivnější formou fyzikálního síťování. Při procesu dochází ke vzniku volných radikálů, které spolu reagují a tvoří vazby. Stejně jako DHT není k síťování UV zářením třeba využívat další chemické prostředky, které jsou potenciálně cytotoxické. UV záření o vlnové délce 254 nm poškozuje genetický materiál mikroorganismů, díky čemuž dochází ke sterilizaci ozařovaného materiálu [18].

## **Chemické síťování**

K chemickému síťování je možné využít různé chemické sloučeniny. V současné době patří mezi nejvíce využívané například aldehydy (glutaraldehyd), dále se využívá genipin nebo (směs N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochloridu a N-hydroxysukcinimidu) [14; 18].

## **2.5 Degradace polymerních scaffoldů**

Degradabilní polymery jsou takové polymerní materiály, které jsou schopné fungovat v daném prostředí po omezenou dobu a následně se kontrolovaně rozloží na látky, které je metabolický systém těla schopen vstřebat. Tyto materiály výrazně omezují riziko vzniku komplikací způsobených dlouhodobou přítomností cizího tělesa v těle, kompletně odstraňují nutnost druhé operace pro vyjmutí implantátu, ale také díky prorůstání nativní tkáně do materiálu podporují proces hojení [19].

Biodegradace je také úzce spojena s biokompatibilitou. Čím nižší je reakce nativní tkáně na implantovaný materiál, tím dochází k jeho menší degradaci. Také platí, že k čím menší degradaci dochází, tím menší je reakce okolní tkáně. Na druhou stranu, špatná biokompatibilita může vést k vážné reakci nativní tkáně, čímž dojde k sekreci enzymů a dalších látek, které způsobí poškození a velkou degradaci implantátu, což může zapříčinit ještě závažnější reakci okolní tkáně. Tento cyklus je samozřejmě nežádoucí a je třeba mu zabránit. Jeho vznik totiž může vést k závažnému poškození implantátu, morbiditě nebo smrti pacienta [20].

K degradaci biomateriálu může docházet v různých fázích jeho existence. Na degradaci polymeru mají kromě prostředí, kterému je materiál vystaven v konečné fázi jeho používání vliv i podmínky při jeho výrobě, skladování a sterilizaci [19].

Při výběru polymerního materiálu do medicínské aplikace je degradace materiálu na prvním místě seznamu bezpečnostních kritérií. Je tedy důležité najít odpověď na otázku, jak se liší degradace biomateriálu v tělním prostředí od degradace v externím prostředí – v degradačních médiích [20].

### **2.5.1 Degradace polymerů *in vivo***

Mechanismy degradace polymerů *in vivo* jsou z důvodu velkého množství aktivních prvků v buňkách a mezibuněčné tekutině a také kvůli velmi proměnné struktuře polymerů složité. Prvním ze způsobů degradace je případ, kdy je polymeru dodána energie, která způsobí degradaci polymeru sekundárními reakcemi. Druhý typ degradace jsou hydrolytické procesy, které způsobí molekulární rozpad. U materiálů, které jsou hydrolyticky stabilní, dochází také k degradaci, a to složitým procesem buněčné degradace. Posledním způsobem degradace materiálu *in vivo* je degradace způsobená volnými radikály. Obecně platí, že hydrolýza je nejpravděpodobnějším způsobem degradace materiálů *in vivo* [20].

#### **Popis prostředí *in vivo***

Tělní prostředí lze popsat jako izotonický roztok soli, který obsahuje řadu extracelulárních komponent a buněk. Důležitou roli v biodegradačním procesu hrají enzymy, nacházející se jak mimobuněčně, tak i uvnitř přítomných buněk. Pro buněčnou degradaci jsou obzvláště důležité fagocytózní buňky, které tělu slouží k obraně před cizorodými látkami [20].

#### **Degradace hydrolýzou**

Hydrolýza je dobře popsáný a široce přijímaný způsob degradace materiálu v tělním prostředí. Hydrolýzu polymeru je možné zjednodušeně popsat jako rozpad chemických vazeb v důsledku vystavení polymeru vodnímu prostředí. Rychlost hydrolytického procesu je možné ovlivnit přítomností solí nebo enzymů, pH prostředí, přítomností kovových iontů, mechanickým namáháním a dalšími faktory [19; 20].

#### **Enzymatická degradace**

Enzymy slouží v chemickém procesu degradace jako katalyzátory, tedy snižují množství energie potřebné k provedení chemické reakce. Dva typy enzymů jsou hydrolytické enzymy,

které katalyzují hydrolýzu (esteráza, pronáza, peptidáza), a oxidační enzymy, které katalyzují oxidaci (oxidáza, oxigenáza) [20].

### **Degradace oxidací**

Během zánětlivých reakcí vylučují leukocyty a makrofágy řadu vysoce reaktivních sloučenin kyslíku, např. superoxid ( $O_2^-$ ), peroxid vodíku nebo oxid dusnatý. Reakcí peroxidu vodíku s kationtem železa vzniká radikál  $OH^\cdot$ . Oxidační efekt těchto radikálů a molekul následně může způsobit rozpad polymerního řetězce a přispět k jeho degradaci [19; 20].

### **2.5.2 Nebuněčná degradační média**

K předpovídání vlastností degradabilních polymerů v tělním prostředí se běžně využívá degradačních experimentů *in vitro*. Kvůli komplexnímu složení tělních tekutin se často stává, že výsledky *in vitro* studie jsou odlišné od *in vivo* experimentu. Vyšší rychlost degradace *in vivo* může být způsobena buněčnou a enzymatickou aktivitou v těle a proměnným mechanickým zatížením po implantaci. Menší rychlost degradace *in vivo* může způsobit například zabránění přístupu vody do materiálu. Rozdíly mezi *in vivo* a *in vitro* experimenty jsou pravděpodobně způsobeny vnitřními vlastnostmi biomateriálů a prostředí. *In vitro* studie jsou i přes to užitečným nástrojem pro získávání informací o degradaci materiálu v tělním prostředí a informace z nich získané slouží jako návod pro provádění studií *in vivo* [19].

Degradace materiálu je ovlivněna volbou použitého degradačního média, jak ukázal například Suchý a kol. [8]. K simulaci konkrétního místa implantace materiálu je vhodné volit různé degradační roztoky. Nejčastěji se používá fosfátový pufovaný roztok (PBS, *Phosphate Buffer Saline*), dále je využívána simulovaná tělní tekutina (SBF, *Simulated Body Fluid*), fyziologický roztok nebo krevní plazma [8; 19].

#### **Fyziologický roztok**

Fyziologický roztok je vodný roztok obsahující 0,9 % (9 g/l) NaCl. Fyziologický roztok obsahuje pouze ionty sodíku a chlóru, žádné další ionty nejsou zastoupeny.

#### **Simulovaná tělní tekutina**

Simulovaná tělní tekutina (SBF) je roztok obsahující téměř identické koncentrace iontů jako v lidské plazmě. Kokubo a kol. v roce 1991 navrhli, že podmínka pro spojení umělého materiálu s živou kostí je tvorba apatitu na jeho povrchu. Ukázali, že je možné reprodukovat tvorbu apatitu *in vivo* v *in vitro* podmínkách při použití simulované tělní tekutiny. To znamená,

že je možné z tvorby apatitu na povrchu materiálu v SBF předpovídat *in vivo* bioaktivitu materiálu [21]. SBF je kromě testů bioaktivity velmi často využívána i pro testy degradace různých materiálů [8; 22; 23; 24; 25].

Ačkoli principem SBF je, že obsahuje stejné koncentrace iontů jako anorganická složka krevní plazmy, původní SBF vůbec neobsahovala ionty  $\text{SO}_4^{2-}$ . Tento nedostatek následně Kokubo a kol. opravili, a tak vznikla opravená simulovaná tělní tekutina (c-SBF). Koncentrace iontů v SBF upravovali i další autoři a dali tím vzniknout dalším verzím SBF (r-SBF, n-SBF a další). Porovnání koncentrací iontů jednotlivých modifikací SBF s krevní plazmou ukazuje Tabulka 2 [21; 26].

Tabulka 2: Koncentrace iontů krevní plazmy v porovnání s vybranými modifikacemi SBF [21].

	Koncentrace iontů [mM]							
	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}_2^+$	$\text{Ca}_2^+$	$\text{Cl}^-$	$\text{HCO}_3^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$	$\text{SO}_4^{2-}$
Krevní plazma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,0
c-SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,5
r-SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
n-SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	4,2	1,0	0,5

Degradaci kolagenních scaffoldů v roztoku SBF sledoval například Suchý a kol. [8]. Získané mechanické vlastnosti a hmotnostní úbytky uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Hmotnostní úbytek a mechanické vlastnosti kolagenních scaffoldů degradovaných v SBF podle Suchého a kol. Odečteno z grafu v [14]. Záporný hmotnostní úbytek značí nárůst hmotnosti.

Doba expozice [dny]	0	7	14
Hmotnostní úbytek [%]	0	-2	-2
Elastický gradient [MPa]	0,088	0,065	0
Stabilní hladina napětí [kPa]	10,1	10,2	0

## Fosfátový pufovaný roztok

Fosfátový pufovaný roztok (PBS) je jedním z nejrozšířenějších médií pro použití v degračních experimentech. Mezi jeho výhody patří snadná dostupnost, jednoduché složení a fyziologické pH. PBS obsahuje ionty  $\text{PO}_4^{2-}$  a anorganické soli jako NaCl a v některých formulacích také KCl [8; 27].

Degradace kolagenních scaffoldů v roztoku PBS byla provedena a analyzována v pracích Suchého a kol. [8] nebo Nazira a kol. [28]. Suchý a kol. použil kolagen typu I síťovaný činidly EDC a NHS v poměru EDC:NHS = 4:1. Nazir a kol. použil kolagen typu I síťovaný činidly EDC a NHS v poměru EDC:NHS = 2:1. Wu a kol. [29] zkoumal degradaci scaffoldů z PLGA (poly(mléčná-co-glykolová) kyselina) pokryté kolagenní vrstvou. Scaffoldy byly degradovány v roztoku PBS za stálé teploty 37 °C po dobu 0-21 dní. Nazir a kol. a Wu a kol. následně určili hmotnostní úbytky (viz Tabulka 4 a Tabulka 6). Suchý a kol. provedl komplexní analýzu scaffoldů pomocí tlakových zkoušek, hmotnostních úbytků, elektronové mikroskopie a dalších (viz Tabulka 5).

Tabulka 4: Hmotnostní úbytky kolagenních scaffoldů degradovaných v PBS podle Nazira a kol. Odečteno z grafu v [28].

Doba expozice [dny]	1	7	14	21
Hmotnostní úbytek [%]	0	6	11	17

Tabulka 5: Hmotnostní úbytek a mechanické vlastnosti kolagenních scaffoldů degradovaných v PBS podle Suchého a kol. Odečteno z grafu v [8].

Doba expozice [dny]	0	7	14
Hmotnostní úbytek [%]	0	19	48
Elastický gradient [MPa]	0,085	0,018	0,018
Stabilní hladina napětí [kPa]	9,9	2,5	3,2

Tabulka 6: Hmotnostní úbytek PLGA scaffoldů pokrytých kolagenem degradovaných v PBS podle Wu a kol. Odečteno z grafu v [29].

Doba expozice [dny]	0	7	14
Hmotnostní úbytek [%]	0	0	4

## Krevní plazma

Krevní plazma tvoří největší část krve v lidském těle. Zaujímá asi 55 % celkového objemu krve. Lidská krevní plazma obsahuje kromě vody a solí mimo jiné také enzymy, proteiny, hormony a elektrolyty [30].

Degradaci kolagenních scaffoldů v krevní plazmě po dobu 0-14 dní při 37 °C provedli například Suchý a kol. [8]. Získané výsledky hmotnostních úbytků, elastického gradientu a stabilní hladiny napětí uvádí Tabulka 7.

Tabulka 7: Hmotnostní úbytek a mechanické vlastnosti kolagenních scaffoldů degradovaných v krevní plazmě podle Suchého a kol. Odečteno z grafu v [14]. Záporný hmotnostní úbytek značí nárůst hmotnosti.

Doba expozice [dny]	0	7	14
Hmotnostní úbytek [%]	0	-80	-80
Elastický gradient [MPa]	0,091	0,06	0,06
Stabilní hladina napětí [kPa]	10	9,2	7,9

### 2.5.3 Metody měření degradace kolagenních scaffoldů

Po vystavení kolagenních scaffoldů působení okolního prostředí, ať už tělního nebo umělého, dochází ke změně jeho vlastností. Tyto změny mohou způsobit, že implantát přestane dostatečně plnit svou funkci nebo může dojít k nežádoucí reakci od okolní tkáně. Je třeba měřit a kvantifikovat změny, ke kterým v biomateriálu dochází v různých fázích degradace a zhodnotit jejich vliv na odezvu okolní tkáně [19]. Jak ukázal Suchý a kol. [7], hydratovaný stav scaffoldu přesněji aproximuje skutečné prostředí, pro které byl daný materiál navržen, než scaffold v suchém stavu a je tedy nutné mechanické a strukturní vlastnosti analyzovat na hydratovaném scaffoldu.

V počáteční fázi degradace dochází převážně k difuzi vody do polymerní matrice. Téměř nedochází ke změně hmotnosti vzorku, molekulární hmotnosti, ani pevnosti v tahu. Hlavní změny se v této fázi degradace objevují na povrchu vzorku, který se stává drsnějším, zvyšuje se povrchová energie, a nakonec se projevují chemické změny způsobené hydrolyzou [19].

Ve druhé fázi degradace dochází ke zmenšení molekulární hmotnosti z důvodu porušování polymerních vazeb a difuze molekul do roztoku. To vede ke ztrátě hmotnosti, zvětšení porozity a ztrátě pevnosti [19].

Poslední fáze degradace je charakteristická rozpadem polymerní matrice, prudkým poklesem molekulární hmotnosti a velkým hmotnostním úbytkem. Následuje velký propad mechanických vlastností [19].

Měření degradace scaffoldů je možné rozdělit na dva základní typy. Prvním z nich je povrchové měření (infračervená spektroskopie, rentgenová fotoelektronová spektroskopie), které je nejvhodnější pro hodnocení degradace v první fázi, druhým typem je objemová analýza

(hmotnostní úbytek, mechanické vlastnosti) pro popis degradace v pozdějších fázích. Mechanické vlastnosti se vyhodnocují z tlakových, tahových nebo ohybových zkoušek, povrchové mechanické vlastnosti je možné získat pomocí nanoindentace [19; 31].

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité materiály a příprava vzorků

K výrobě scaffoldů byl použit kolagen typu I (VUP Medical, ČR). Kolagen byl ponechán k bobtnání v deionizované vodě po dobu 1 hodiny při teplotě 20 °C a následně 10 minut homogenizován při 10 000 ot./min. Po dalších 60 minutách při 20 °C byla disperze homogenizována 10 minut při 10 000 ot./min. a nalita do laboratorních destiček s válcovými jamkami o průměru 12 mm (48jamkový kultivační plast CELLSTAR, Greiner Bio-One GmbH, Rakousko) (Obrázek 3, vlevo). Finální koncentrace kolagenní disperze byla 4 hm. %.

Laboratorní destičky s kolagenní disperzí byly zmrazeny při -80 °C (suchý led) po dobu 3 hodin a následně lyofilizovány (BenchTop Pro 8Z, VirTis, USA) do dosažení konstantní hmotnosti. Poté byla lyofilizovaná kolagenová pěna máčena v roztoku 95 hm. % ethanolu (Penta, ČR) a vody s N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochloridem (EDC) a N-hydroxysukcinimidem (NHS) (oboje Sigma-Aldrich, USA) v poměru EDC:NHS = 4:1 (hm./hm.) po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Ke dvojitému promytí scaffoldů po dobu 45 minut bylo následně použito 0,1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Penta, ČR). Nakonec byly scaffoldy propláchnuty destilovanou vodou po dobu 30 minut, zmrazeny na teplotu -30 °C a lyofilizovány (Obrázek 3, vpravo).

Z důvodu zamýšleného využití kolagenových scaffoldů jako zdravotnického prostředku a možnému ovlivnění vlastností materiálu byly všechny vzorky sterilizovány metodou, kterou by byly sterilizovány při skutečném použití. Zvolena byla sterilizace gama zářením při standardní dávce 25 kGy (Bioster, ČR).



Obrázek 3: Příprava kolagenních scaffoldů. Vlevo kolagenní disperze ve 48jamkovém kultivačním plastu, vpravo lyofilizovaný scaffold připravený na experimenty.



## 3.2 Použitá média a popis expozice

K simulaci tělního prostředí byla vybrána 4 nebuněčná, neenzymatická média – fyziologický roztok (FYZ), fosfátový pufovaný roztok (PBS), simulovaná tělní tekutina (SBF) a lidská krevní plazma (PLA) (viz Obrázek 4). Pro porovnání byly kolagenní scaffoldy implantovány do peritonea prasat.

Fyziologický roztok byl připraven jako 0,9 hm. % roztok NaCl v deionizované vodě.

Fosfátový pufovaný roztok byl zakoupen od Sigma Aldrich, USA.

Simulovaná tělní tekutina byla připravena podle originálního postupu od Kokubo a kol. [21].

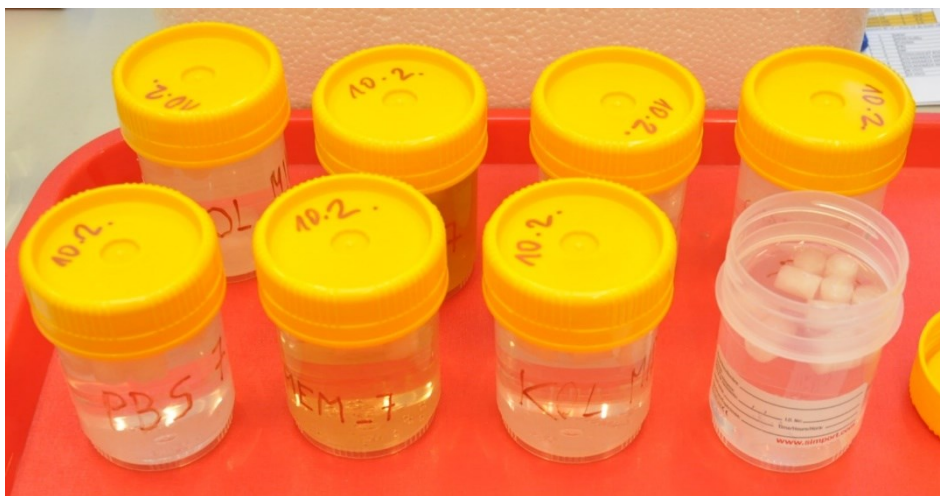
Lidská krevní plazma od 7 dárců s různou krevní skupinou, pohlavím a věkem, s přidanými antibiotiky (penicilin, 20 mg/ml a streptomycin, 20 mg/ml; oboje Sigma-Aldrich, USA) byla oddělena od plné krve podle Doporučení R (95) 15 Evropského řídicího úřadu pro kvalitu léků a vyhlášky 143/2008 Sb., o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek. Plazma byla oddělena od krve centrifugací a do 6 hodin zmrazena na teplotu nižší než  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorky plazmy byly podrobeny vyšetření na přítomnost infekčních chorob (HIV, HBV, HCV, syfilis). Zároveň byly ověřeny požadavky na složení plazmy, tj. faktor VII (minimálně  $70\text{ IU}/100\text{ ml}$ ), zbytkové buňky (červené krvinky  $<6 \cdot 10^9/l$ , leukocyty  $<0,1 \cdot 10^9/l$ , destičky  $<50 \cdot 10^9/l$ ) a obsah bílkovin (minimálně  $50\text{ g}/l$ ).



Obrázek 4: Simulovaná tělní prostředí pro degradaci kolagenních scaffoldů.

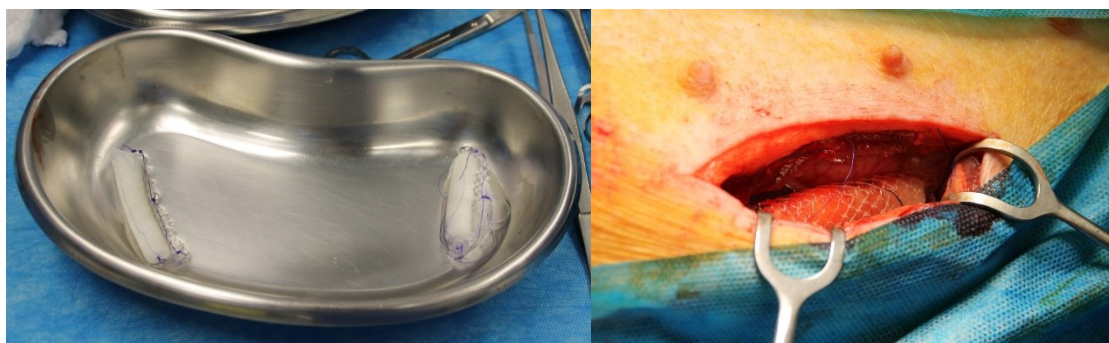
Ve všech případech byly scaffoldy s daným simulovaným tělním prostředím umístěny do 120ml nádoby. Pro dokonalé hydratování všech válečků byl z nádoby opakovaně odsán vzduch, čímž došlo k nasátí roztoku do scaffoldu a celý jeho objem se tak ponořil pod hladinu (Obrázek 5). Nádoby s roztokem a scaffoldy byly následně pevně uzavřeny a umístěny do inkubátoru

s teplotou 37 °C a atmosférickým tlakem. Scaffoldy byly roztokům vystaveny po dobu 1 hodiny, 1, 7, 14 a 21 dnů. Média byla kompletně měněna každý třetí den a po celou dobu experimentu byla rutinně monitorována stabilní hladina pH.



Obrázek 5: Simulované tělní prostředí s plně hydratovanými scaffoldy.

Experimenty *in vivo* byly provedeny na prasatech (*Sus scrofa domesticus*, cca 25 kg, ID schválení projektu pokusů MSMT-33799/2021-4) v Biomedicínském centru Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Válečky ve skupinách po 5 byly nejprve zašity do kýlní síťky, aby bylo zajištěno pevné a bezpečné vští do pokusného zvířete. Následně byly hydratovány po dobu 1 hodiny ve fyziologickém roztoku. Implantace skupin scaffoldů byla provedena do peritonea pokusného zvířete. Scaffoldy připravené pro implantaci do pokusného zvířete a přesnou pozici zašití zobrazuje Obrázek 6. Scaffoldy byly vystaveny tělnímu prostředí po dobu 7, 14 a 21 dnů. Po ukončení experimentu byly scaffoldy explantovány z peritonea a opatrně vystříhány ze síťky, aby nedošlo k jejich mechanickému poškození. Vzorky určené na tlakové zkoušky byly umístěny do fyziologického roztoku, vzorky určené na ostatní experimenty byly zmrazeny.



Obrázek 6: Kolagenní scaffoldy připravené pro implantaci do pokusného zvířete a scaffoldy implantované v peritoneu.

Počáteční počet vzorků, které byly umístěny do degradačního prostředí byl  $n = 10$ . V průběhu experimentu bylo některé ze vzorků nutno vyřadit, zpravidla z důvodu jejich mechanického poškození nesouvisejícího s degradací.

### 3.3 Metodika experimentů

K zajištění korektnosti experimentů a umožnění jejich opakovatelnosti je nutné se řídit předem danou metodikou experimentu. Přesná metodika zároveň umožní kvantifikaci změn, které při degradaci proběhnou v oblasti mechanických vlastností, hmotnostního úbytku a struktury materiálu. Pro vyhodnocení naměřených dat je také třeba navrhnout vhodné použití statistických metod.

Značení vzorků bylo provedeno ve formátu PROSTŘEDÍ\_DOBA\_POŘADÍ, vyjadřující degradační prostředí, dobu degradace a pořadové číslo vzorku. Pro označení prostředí byly použity zkratky, jejichž významy uvádí Tabulka 8. Doba degradace byla uváděna ve dnech, 0 označuje degradaci po dobu 1 hodiny.

Tabulka 8: Zkratky degradačních prostředí používané k označování testovaných vzorků.

Zkratka	Význam
ORIG	Nedegradovaný vzorek
FYZ	Fyziologický roztok
SBF	Simulovaná tělní tekutina
PBS	Fosfátový pufovaný roztok
PLA	Lidská krevní plazma
IN VIVO	Skutečné tělní prostředí

#### 3.3.1 Tlakové zkoušky

Tlaková zkouška bude provedena podle ČSN ISO 13314 Mechanické zkoušení kovů – Zkoušení tvárnosti – Zkouška porézních a pěnových kovů tlakem.

Zkouška se provádí stlačením zkušební vzorku konstantní rychlostí mezi dvěma kovovými deskami při konstantní teplotě 10-35 °C. Počáteční rychlost deformace musí být v rozmezí  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  s<sup>-1</sup>. Během zkoušky je v průběhu celého měření zaznamenávána závislost zatěžující síly na posuvu, ze které jsou následně vyhodnoceny mechanické parametry. Pro vypočítání požadovaných materiálových parametrů z tlakových zkoušek byl využit výpočetní software Matlab (R2021a, The MathWorks, Inc., USA).

## Zkušební vzorky

Válcové vzorky musí mít průměr a výšku minimálně 10x větší, než je průměrná velikost póru a poměrná délka vzhledem k průměru musí být v rozmezí 1-2. Počet zkušebních vzorků musí být minimálně 5.

## Vyhodnocované parametry

Ze závislosti síla-posuv se získá smluvní závislost napětí-deformace, ze které jsou vyhodnoceny následující parametry určující mechanické vlastnosti daného vzorku:

- a) stabilní hladina napětí  $\sigma_{pl}$ ,
- b) elastický gradient  $E$ ,
- c) absorbovaná energie  $W$  a
- d) účinnost absorbování energie  $W_e$ .

## Závislost napětí-deformace

Z počátečních rozměrů vzorku a znalosti pracovní závislosti síla-posuv je možné získat smluvní křivku napětí-deformace.

Tlakové smluvní napětí  $\sigma$  je definované jako poměr okamžité síly a počátečního průřezu vzorku a vypočítá se pomocí vztahu

$$\sigma = \frac{F}{A_0} [MPa], \quad (1)$$

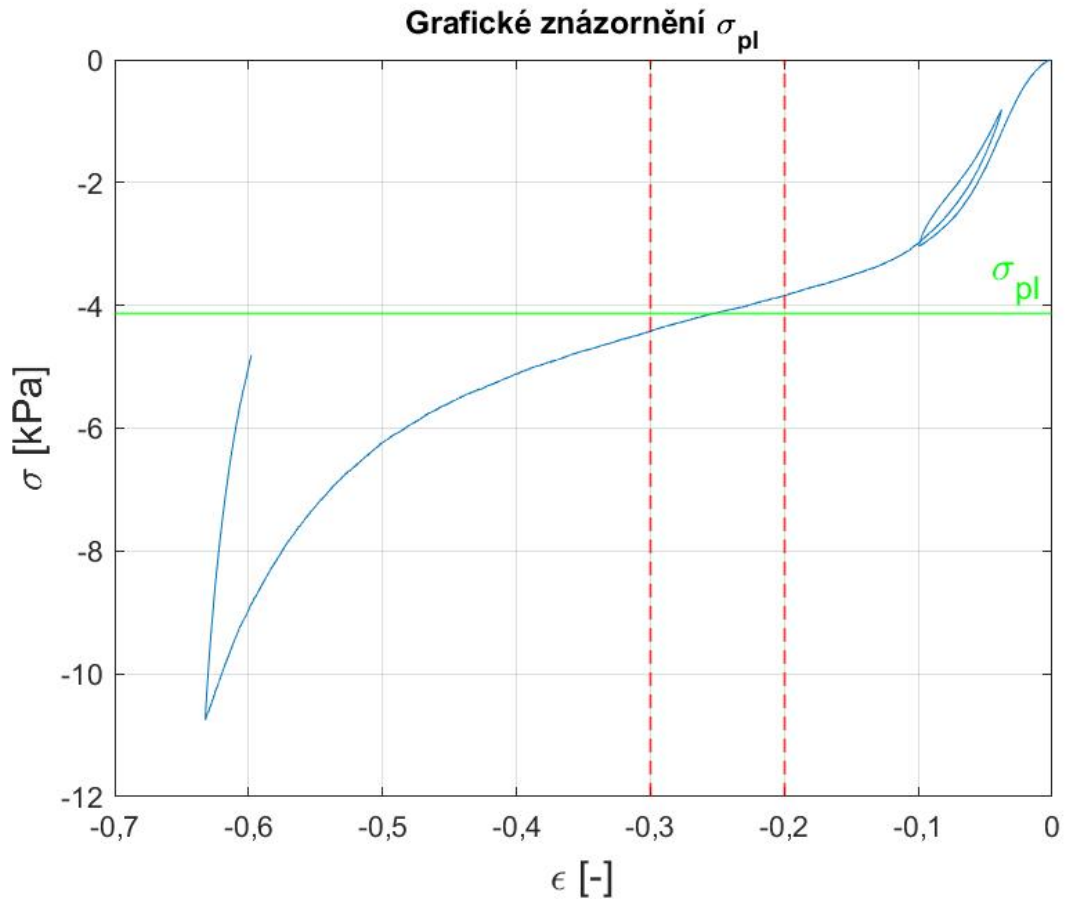
kde  $F$  [N] je okamžitá síla a  $A_0$  [mm<sup>2</sup>] počáteční průřez vzorku v rovině kolmé na osu zatížení.

Deformace  $\epsilon$  je poměr změny výšky vzorku  $\Delta h$  [mm] k jeho počáteční výšce  $h_0$  [mm], tedy

$$\epsilon = \frac{\Delta h}{h_0} [-]. \quad (2)$$

## Stabilní hladina napětí

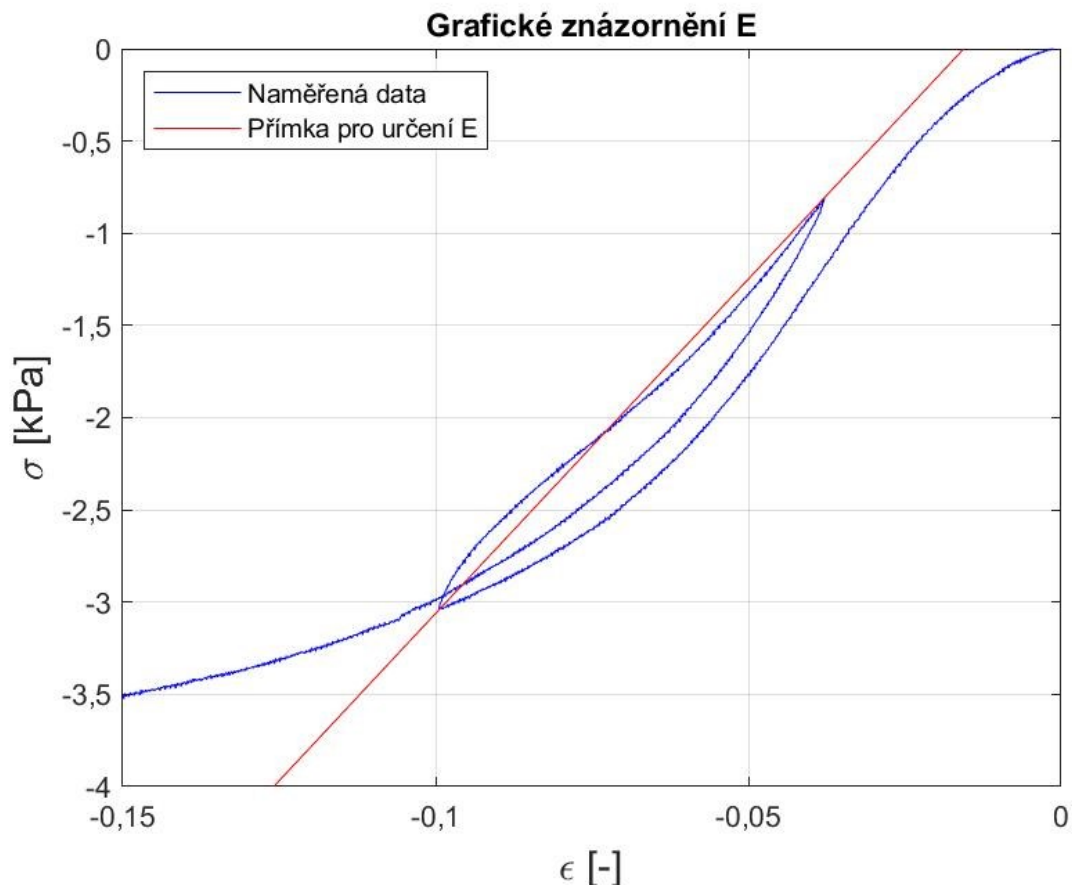
Stabilní hladina napětí  $\sigma_{pl}$  se určí jako aritmetický průměr napětí mezi 20-30 % deformace. Konec stabilní hladiny napětí nastává v okamžiku, kdy smluvní tlakové napětí dosáhne hodnoty  $\sigma = 1,3\sigma_{pl}$  [32]. Obrázek 7 znázorňuje  $\sigma_{pl}$  v reprezentativním grafu závislosti napětí – deformace.



Obrázek 7: Reprezentativní graf napětí – deformace vzorku PLA\_0\_03 s vyznačením stabilní hladiny napětí  $\sigma_{pl}$ .

### Elastický gradient

Elastický gradient  $E$  udává tuhost materiálu závislou na poréznosti a nikoli jeho modul pružnosti. Určuje se z hysterezní smyčky, která se objeví během zatěžování a odlehčování materiálu. Sečna hysterezní smyčky je určena jejími dvěma extrémy –  $\sigma_{70}$  a  $\sigma_{20}$ , značící 70 %, resp. 20 %  $\sigma_{pl}$ . Tato sečna popisuje elastické chování materiálu a její směrnice vyjadřuje elastický gradient [32]. Určení elastického gradientu znázorňuje Obrázek 8.



Obrázek 8: Grafické znázornění určení elastického gradientu vzorku PLA\_0\_03. Modrá křivka jsou naměřené body z tlakové zkoušky, červená přímka je sečna hysterezní křivky, jejíž směrnicí je elastický gradient  $E$ .

### Absorbovaná energie a účinnost absorbování energie

Absorbovaná energie  $W$  je definována jako plocha pod křivkou závislosti napětí na deformaci. Vypočítá se podle rovnice

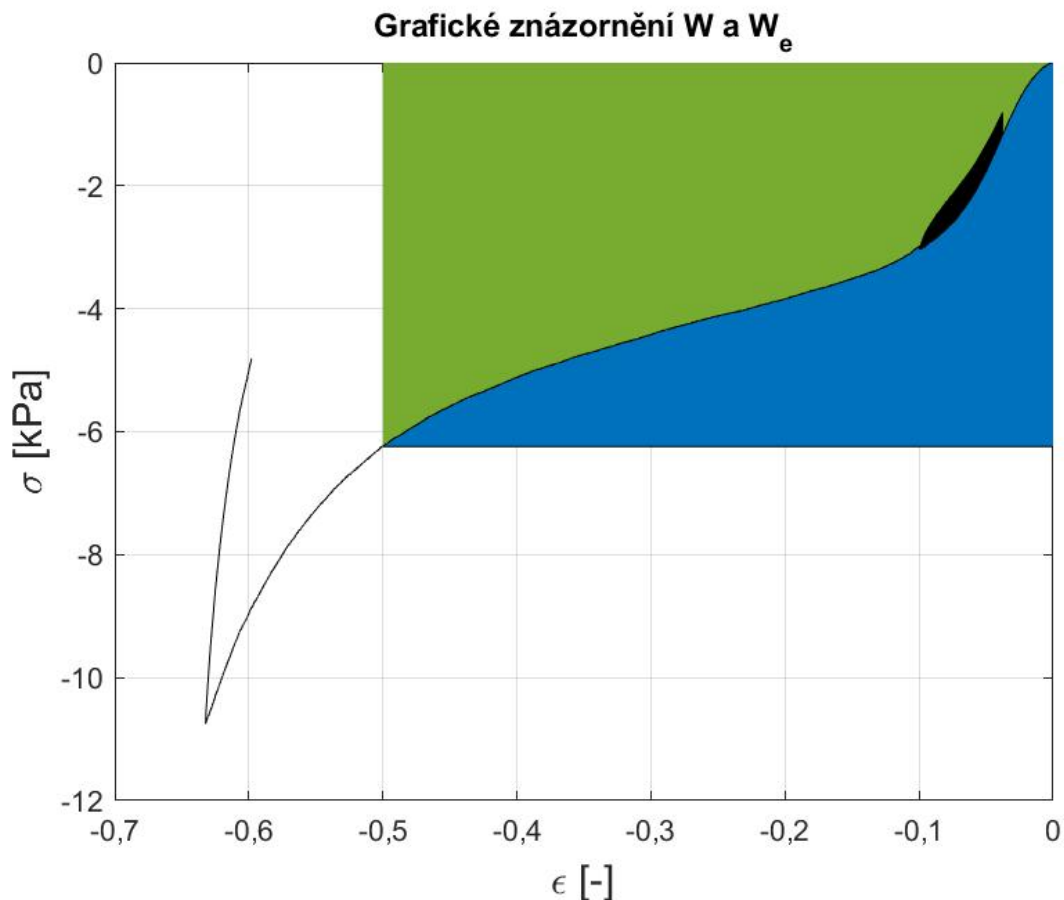
$$W = \frac{1}{100} \int_0^{\epsilon_0} \sigma d\epsilon \text{ [MJ/m}^3\text{]}, \quad (3)$$

kde  $\epsilon_0$  [%] je horní mez deformace, zpravidla 50 %,  $\sigma$  [MPa] je smluvní tlakové napětí a  $\epsilon$  je deformace [32].

Účinnost absorbování energie  $W_e$  se definuje jako podíl absorbované energie  $W$  a součinu horní meze deformace a maximálního tlakového napětí do horní meze deformace. Vypočte se podle rovnice

$$W_e = \frac{W}{\sigma_0 \cdot \epsilon_0} \cdot 10^4 \text{ [%]}, \quad (4)$$

kde  $W$  [MJ/m<sup>3</sup>] je absorbovaná energie,  $\sigma_0$  [MPa] je maximální napětí v tlaku do horní meze deformace a  $\epsilon_0$  [%] je horní mez deformace [32]. Grafické znázornění absorbované energie a účinnost absorbované energie zobrazuje Obrázek 9.



Obrázek 9: Grafické znázornění  $W$  a  $W_e$  v grafu závislosti  $\sigma$  na  $\epsilon$  vzorku PLA\_0\_03. Křivka naměřených dat je černá, zeleně označená plocha znázorňuje absorbovanou energii  $W$ , podíl zelené ku modré + zelené označuje účinnost absorbování energie  $W_e$ .

### 3.3.2 Hmotnostní úbytky

Změny, které v materiálu probíhají během degradace, je možné pozorovat a hodnotit pomocí sledování změny hmotnosti materiálu před a po expozici degradačnímu prostředí.

Scaffoldy byly zváženy před degradací v daném prostředí. Po degradaci byly scaffoldy propláchnuty deionizovanou vodou, zmrazeny na -30 °C a vysušeny do konstantní hmotnosti lyofilizace a znovu zváženy. Vzorky byly váženy na pětimístné analytické váze XSE 105 DualRange (METTLER TOLEDO, USA).

Hmotnostní úbytek  $m_L$  se následně vypočítá podle jednoduchého vztahu

$$m_L = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \cdot 100 [\%], \quad (5)$$

kde  $m_0$  [mg] je počáteční hmotnost vzorku před expozicí prostředí a  $m_t$  [mg] je hmotnost vzorku na konci degradace.

### 3.3.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Před analýzou pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) byly všechny vzorky vysušeny pomocí lyofilizace. Pro snímkování byly vzorky řezu scaffoldy adjustovány pomocí uhlíkového terče na hliníkový stab a na naprašovače Leica EM ACE600 (Specion s.r.o., ČR) v atmosféře Ar pokryty 15nm vrstvou Pt. SEM snímky byly pořízeny ve vysokém vakuu na skenovacím elektronovém mikroskopu STEM Apreo S LoVac (ThermoFisher Scientific, USA), zobrazení na ETD detektoru (Everhalt-Thorney detektor) v sekundárních elektronech za použití standard use case, ve zvětšeních 100x-10 000x. Náhledy celých řezů byly sesazeny s použitím programu Maps (3.13., ThermoFisher Scientific, USA).

### 3.3.4 Počítačová mikrotomografie

Hodnocení struktury vzorků počítačovou mikrotomografií ( $\mu$ CT) bylo provedeno pomocí přístroje SkyScan 1272 (Bruker micro-CT, Belgie) na pracovišti Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN. Vzorek byl v suchém stavu umístěn do plastové zkumavky, ta uložena na nosič vzorku a umístěna do skenovací komory. Po pilotních skenech a rekonstrukcích byly zvoleny skenovací parametry (velikost pixelu 7  $\mu$ m, zdrojové napětí 60 kV, zdrojový proud 166  $\mu$ A, rotace 180°, krok rotace = 0,2°, čas skenování = 1 h, průměrování snímků (2), bez filtrování). Dataset projekčních snímků byl rekonstruován pomocí programu NRecon (Bruker, Belgie) do datasetu průřezových snímků, které byly základem pro vizualizaci a analýzu. Vizualizace (2D i 3D) byly připraveny pomocí programů DataViewer and CTVOx (oba Bruker, Belgie). Analýza struktury byla provedena s využitím programu CTAn (Bruker, Belgie). Stanovení oblasti zájmu (*Volume of Interest*), tedy objemu, ve kterém je analýza provedena a který obecně slouží jako základní referenční objem, bylo provedeno pomocí Shrink-wrap 3D algoritmu.

Jako oblast zájmu pro vyhodnocování kvantitativních parametrů byl zvolen celý scaffold (válec nebo trubka). Z  $\mu$ CT analýzy byla následně v oblasti zájmu vyhodnocena míra porozity a průměrná velikost pórů.

Míra porozity scaffoldu  $P$  se určí podle jednoduché rovnice

$$P = 1 - \frac{V_k}{V_c} [\%], \quad (6)$$

kde  $V_k$  [mm<sup>3</sup>] označuje objem hmoty ve vzorku a  $V_c$  [mm<sup>3</sup>] značí celkový objem naskenovaného vzorku.



Velikost pórů byla získána metodou sphere-fitting a průměrná velikost pórů byla určena jako geometrický průměr velikosti pórů.

### 3.3.5 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektra byla měřena pomocí spektrometru iS50 (Thermo Nicolet Instruments Co., USA) v rozmezí od 4 000 do 400  $\text{cm}^{-1}$  při rozlišení 4  $\text{cm}^{-1}$ . V průměru bylo technikou ATR provedeno 16 skenů. Spektrální rozklad pásma amidu I byl proveden pomocí programu OMNIC 7 (ThermoFisher Scientific, USA). Počáteční parametry pro prokládání dat křivkou byly určeny pomocí kombinace metody druhých derivací a Fourierovy dekonvoluce. Všechny vzorky byly měřeny v 10-20 různých místech.

## 3.4 Statistické zpracování dat

Z důvodu objektivní interpretace dat a jejich porovnatelnosti je nutné naměřené hodnoty statisticky zpracovat. Ke statistickému vyhodnocení se využívají parametrické nebo neparametrické statistické testy. Pro použití parametrických testů je nejprve třeba ověřit předpoklady, které podmiňují jejich korektní použití. Mezi tyto předpoklady patří normální rozdělení dat a homoskedasticita. Využití neparametrických testů není podmíněno splněním těchto podmínek. Všechny statistické testy mohou být použity při splnění podmínek náhodného výběru dat a jejich vzájemné nezávislosti. Tyto podmínky se zpravidla předpokládají automaticky [33].

Pro grafické porovnání dat byly zkonstruovány krabicové grafy. Úsečka uvnitř krabice značí medián datového souboru, horní a spodní okraj krabice vyznačuje horní a dolní kvartil souboru. Vousy uvádí 1,5násobek mezikvartilového rozpětí. V grafech jsou vyneseny také odlehle hodnoty, tedy hodnoty, jejichž vzdálenost od okrajů krabice je větší než 1,5násobek mezikvartilového rozpětí.

Ke statistickému vyhodnocení naměřených dat byl použit statistický software JASP (0.16.2.0, Amsterdamská univerzita, Nizozemsko) a grafické zpracování bylo provedeno v software Matlab (R2021a, The Math Works, Inc., USA). Všechny testy byly provedeny na 95% hladině spolehlivosti ( $\alpha = 0,05$ ) a statistická významnost byla přijata pro  $p$ -hodnoty menší nebo rovny 0,05. Síla zkoumaného jevu byla kvantifikována Hedgesovým  $g$ .

### Normalita

Normální rozložení vstupních dat je důležitou podmínkou pro použití parametrických testů. Pro malé výběry  $3 \leq n \leq 50$  je vhodné použít Shapirův-Wilkův test normality [33].

Pro potvrzení výsledků Shapirova-Wilkova testu normality byly zkonstruovány kvantil-kvantilové grafy (Příloha 1), s jejichž pomocí byla vizuálně ověřena normalita datových souborů.

### **Homoskedasticita**

K testování shody rozptylů výběrů z normálního rozdělení byl využit Levenův test shodnosti rozptylů.

### **Parametrické testy**

V případě, že byly splněny podmínky normality a shodnosti rozptylů všech porovnávaných souborů, byl pro vícenásobné porovnání použit parametrický test ANOVA a standardní post-hoc test (párový t-test) s Bonferroniho korekcí. Pro porovnávání dvou souborů dat byl použit Studentův t-test.

### **Neparametrické testy**

V případě, že rozdělení výběru není normální nebo není splněna podmínka homoskedasticity, je nutné k porovnání dvou výběrů využít neparametrický test. Pro vícenásobné porovnání byl zvolen Kruskal-Wallisův test a post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí. Párové porovnání bylo provedeno pomocí oboustranného Mannova Whitneyova U testu.

### **Velikost věcného efektu**

Pro hodnocení velikosti efektu mezi dvěma statisticky významně odlišnými nezávislými soubory dat je možné využít například Hedgesovo  $g$  nebo alternativně pro data, která nepochází z normálního rozdělení, nabízí JASP pro velikost věcného efektu využít koeficient pořadové biseriální korelace  $r$  (*Rank-Biserial Correlation Coefficient*). Hedgesovo  $g$  bylo použito pro data vyhodnocená parametrickými testy,  $r$  bylo použito pro data vyhodnocená neparametrickými testy. Interpretaci  $g$  uvádí Tabulka 9 [34]. Absolutní hodnota koeficientu pořadové biseriální korelace  $r$  může nabývat hodnot z intervalu (0;1), kdy 0 vyjadřuje zanedbatelný věcný efekt a 1 značí velký věcný efekt [35]. Pro snadnou orientaci ve vyhodnocených datech byl proveden převod z koeficientu pořadové biseriální korelace  $r$  do Hedgesova  $g$  podle vztahu (7) [36]:

$$g = \frac{2r}{\sqrt{1 - r^2}}. \quad (7)$$

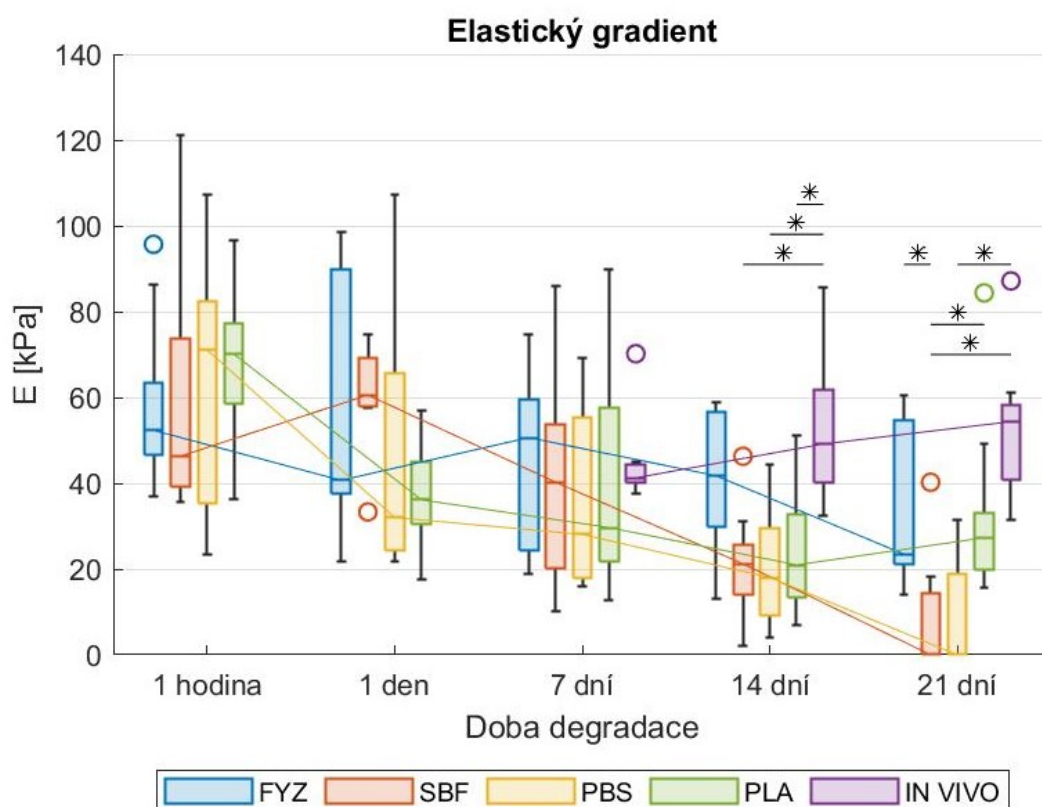
Tabulka 9: Hodnocení velikosti věcného efektu v závislosti na Hedgesově  $g$  [34].

Hedgesovo $g$	Velikost věcného efektu
$g < 0,2$	Žádný efekt
$0,2 \leq g < 0,5$	Malý efekt
$0,5 \leq g < 0,8$	Střední efekt
$0,8 \leq g$	Velký efekt

## 4 Výsledky

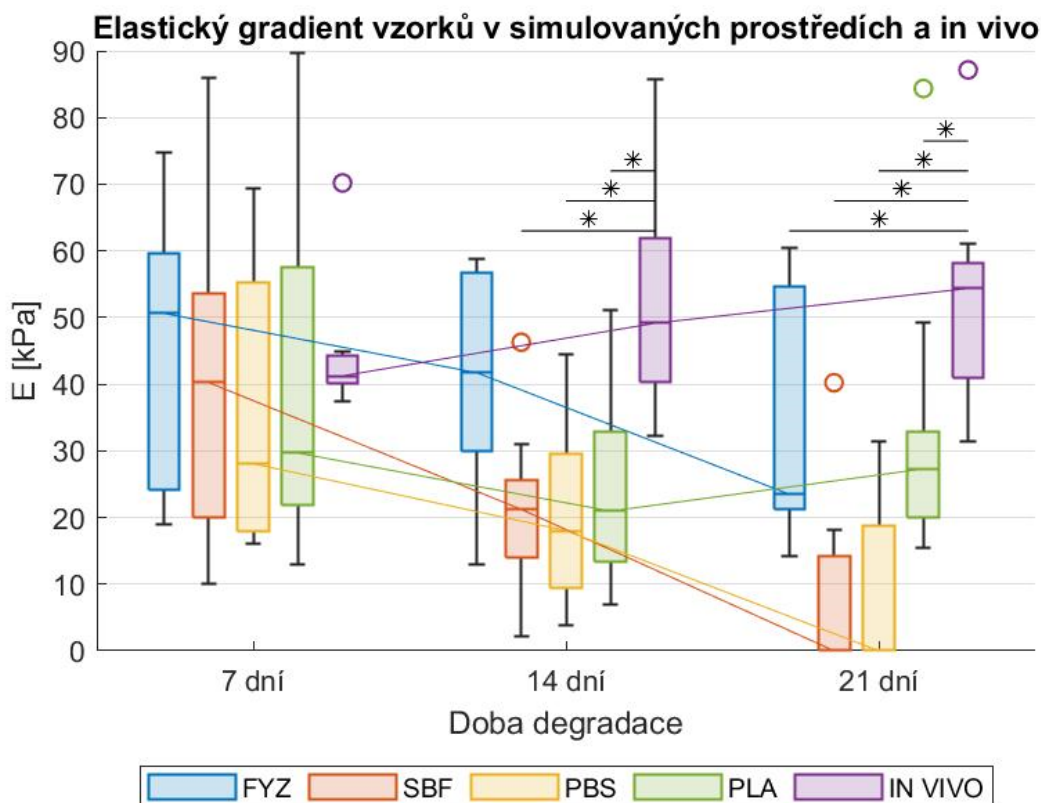
### 4.1 Tlakové zkoušky

Celkem bylo tlakové zkoušce podrobena 201 kolagenních scaffoldů degradovaných v pěti různých prostředích. Ačkoli všechna média mají simulovat tělní prostředí, mechanické vlastnosti vzorků degradovaných v různých prostředí se liší. Elastický gradient vyjadřující tuhost porézního materiálu zobrazuje Obrázek 10.



Obrázek 10: Elastický gradient kolagenních scaffoldů degradovaných v různých prostředích. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí,  $n = 6 \div 10$ ).

Z pohledu elastického gradientu materiálu je skutečné tělní prostředí nejlépe aproximováno fyziologickým roztokem, kdy nebyly statistickým testem zjištěny významné odchylky ve středních hodnotách až do času expozice 21 dní (Obrázek 11). Ostatní média dobře aproximují tuhost porézního materiálu vystaveného prostředí *in vivo* pouze v čase expozice 7 dní.



Obrázek 11: Porovnání elastického gradientu scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 7 \div 10$ ).

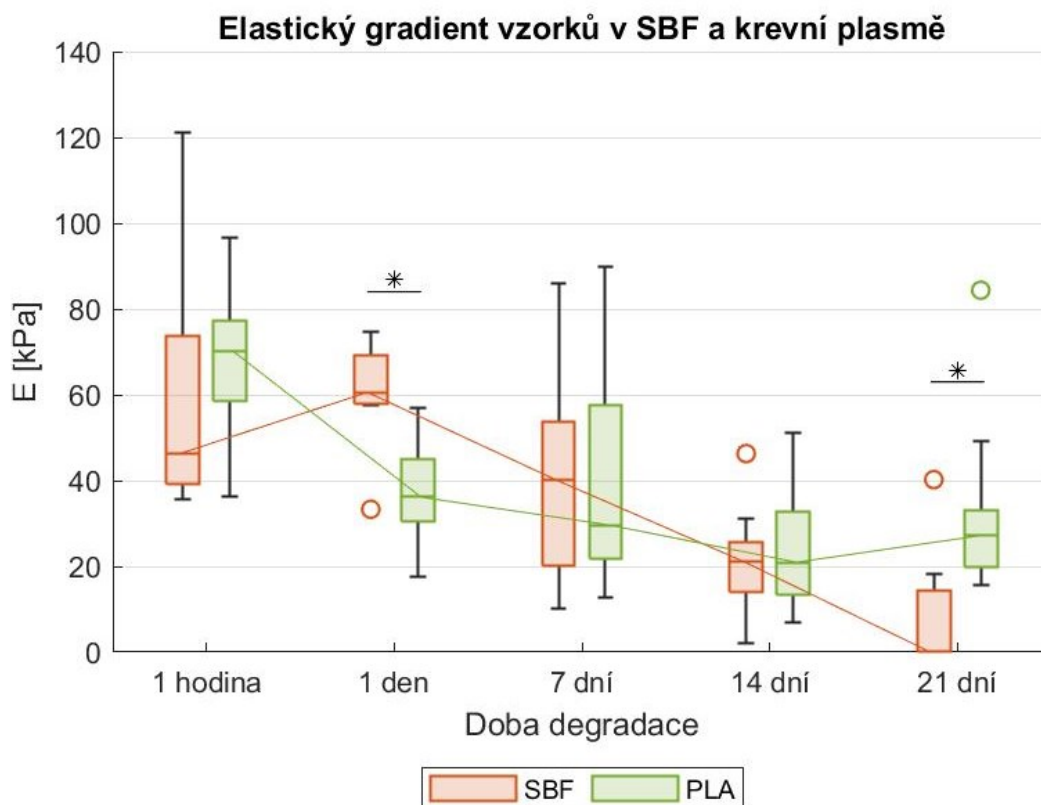
Výsledky, které poskytl statistický test a Obrázek 11 byly zpřesněny výpočtem Hedgesova  $g$  (Tabulka 10). Ze získaných hodnot je zřejmé, že fyziologický roztok poskytuje nejpřesnější aproximaci prostředí *in vivo* v porovnání s ostatními zkoumanými prostředími ve všech časových úsecích.

Tabulka 10: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů elastického gradientu scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

Doba degradace	Degradační prostředí	FYZ	SBF	PBS	PLA
7 dní	IN VIVO	0,17	0,41	0,76	0,40
14 dní	IN VIVO	0,65	5,19	5,19	2,89
21 dní	IN VIVO	1,34	8,78	8,78	2,02

Zajímavé je sledovat rozdíl mezi SBF, která má simulovat krevní plazmu, a skutečnou krevní plazmou (Obrázek 12). U scaffoldů vystavených médiu po dobu 1 dne je elastický gradient materiálu degradovanému v SBF oproti materiálu degradovanému v krevní plazmě

vyšší o 67,6 %. Scaffoldy vystavené SBF po dobu 21 dní mají oproti krevní plazmě nižší elastický gradient až o 100 %.



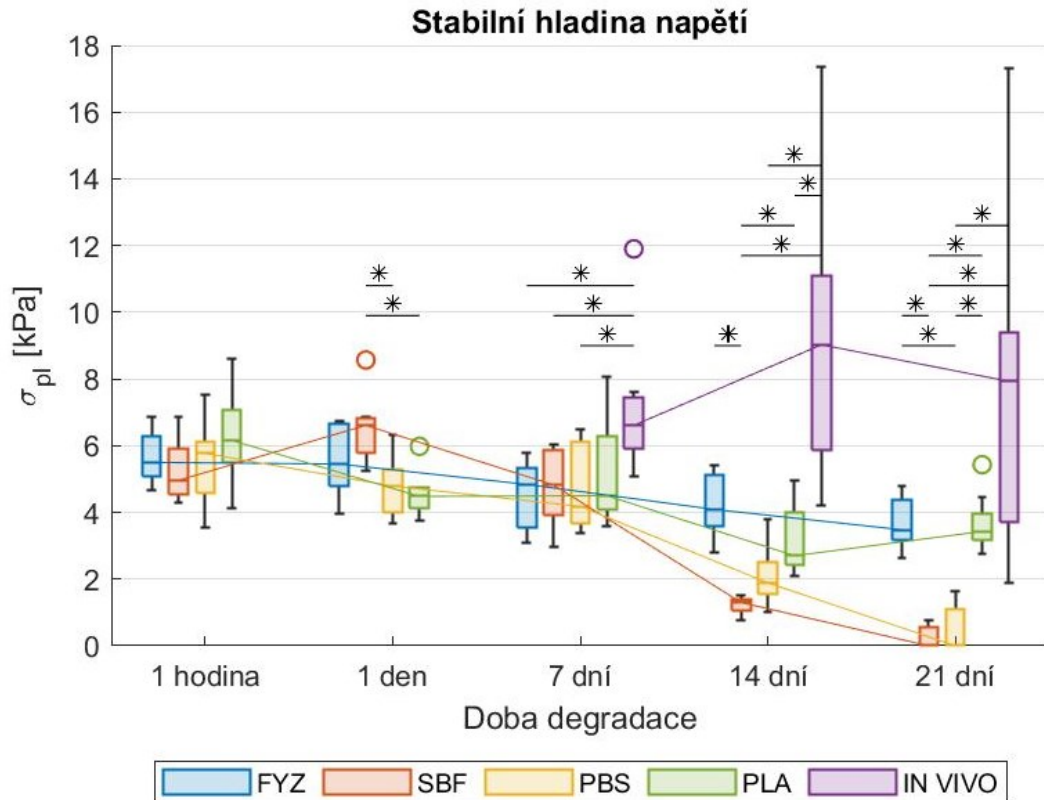
Obrázek 12: Porovnání elastického gradientu vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 7 \div 10$ ).

Tabulka 11 zobrazuje hodnoty Hedgesova g při porovnání elastických gradientů scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Z tabulky je patrné, že SBF a PLA jsou dobře srovnatelná při degradaci scaffoldů po dobu 7 a 14 dnů, kdy je velikost věcného efektu zanedbatelná. Elastické gradienty hydratovaných vzorků vykazují středně velký věcný efekt.

Tabulka 11: Hedgesova g vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů elastického gradientu scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

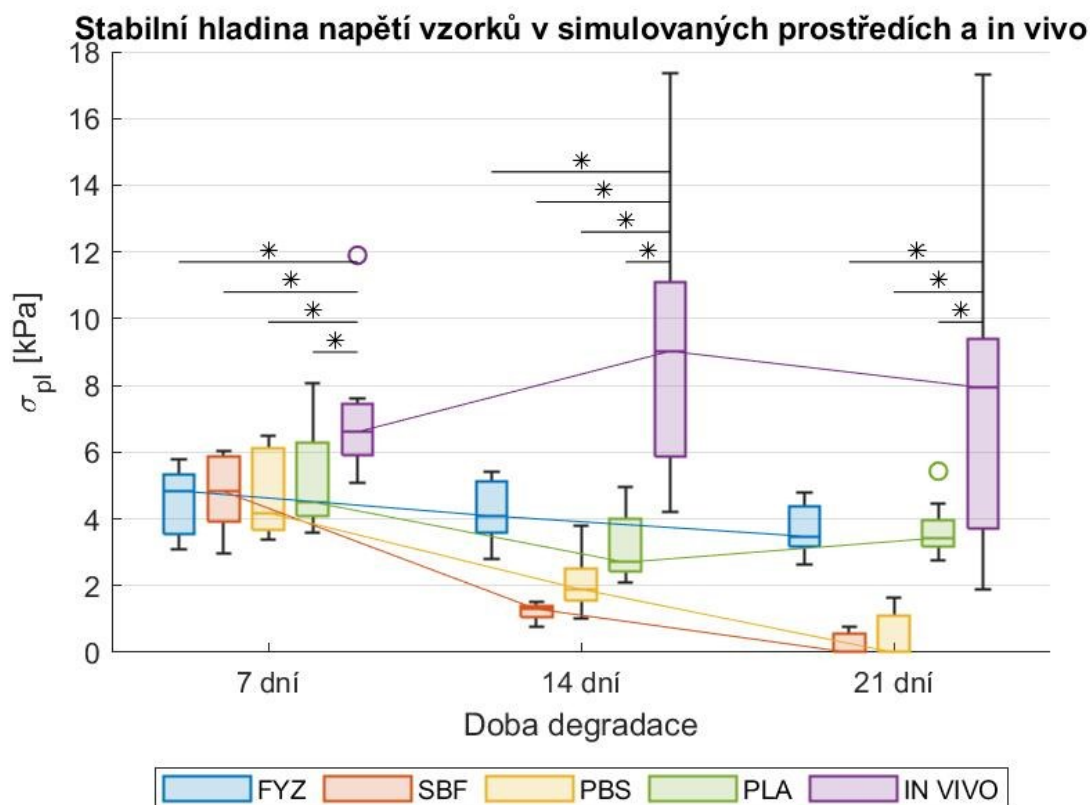
Doba degradace	Degradační prostředí	PLA
1 hodina	SBF	0,71
1 den	SBF	2,41
7 dní	SBF	0,07
14 dní	SBF	0,17
21 dní	SBF	2,67

Obrázek 13 zobrazuje stabilní hladinu napětí degradovaných vzorků, která vyjadřuje pevnost porézních scaffoldů.



Obrázek 13: Stabilní hladina napětí kolagenních scaffoldů degradovaných v různých prostředích. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí,  $n = 6 \div 10$ ).

Je patrné, že pevnost scaffoldů degradovaných *in vivo* není dobře aproximována žádným z použitých simulačních médií (viz Obrázek 14). Medián stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných po dobu 7 dnů v simulovaných tělních prostředí se liší od scaffoldů degradovaných *in vivo* průměrně o 30,6 %. Při vystavení degradačnímu prostředí po dobu 14 dnů je odchylka mediánů stabilní hladiny napětí simulačních médií oproti *in vivo* odlišná průměrně o 72,4 % a při délce expozice 21 dnů se jedná o průměrnou odchylku 78,2 %.



Obrázek 14: Porovnání stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 7 \div 10$ ).

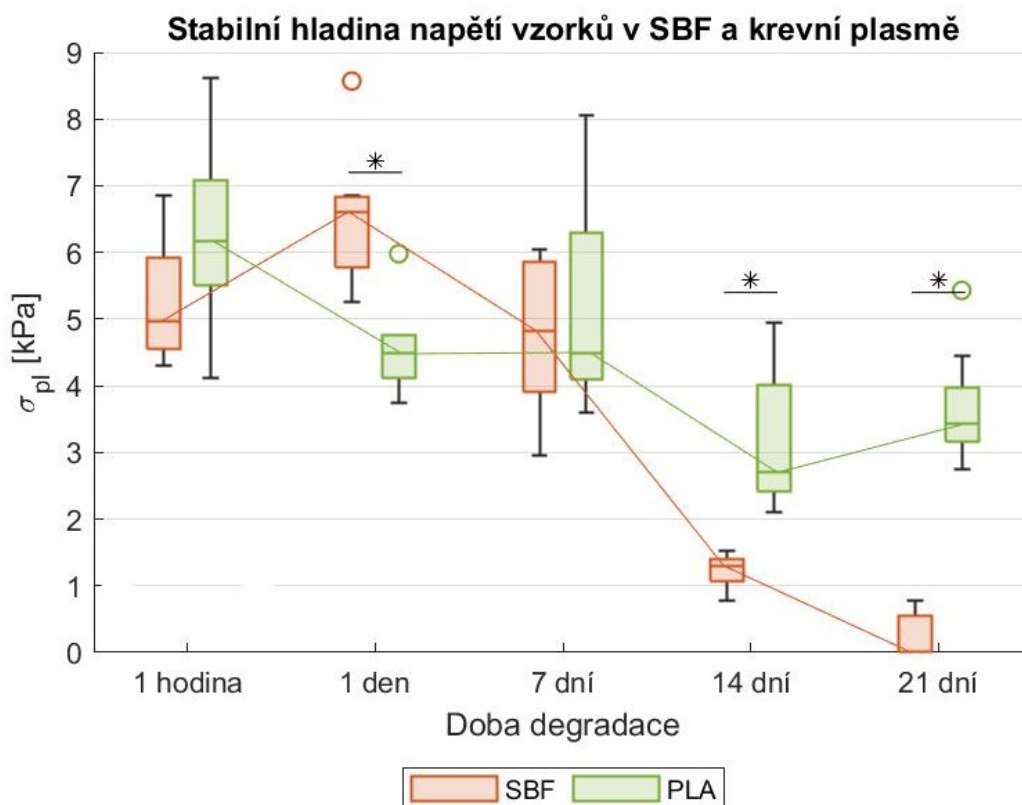
Výsledky získané Mannovým-Whitneyovým U testem byly ověřeny výpočtem Hedgesova  $g$  (Tabulka 12). Je patrné, že hodnoty  $g$  se pohybují nad hranicí 0,8 značící velký věcný efekt, čímž bylo potvrzeno, že pevnost scaffoldů degradovaných v prostředí *in vivo* není dobře aproximována žádným ze zvolených degradačních médií.

Tabulka 12: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

Doba degradace	Degradační prostředí	FYZ	SBF	PBS	PLA
7 dní	IN VIVO	3,82	2,96	2,27	1,44
14 dní	IN VIVO	4,42	>10	>10	6,52
21 dní	IN VIVO	1,25	>10	>10	1,30

Stejně jako u elastického gradientu je i stabilní hladina napětí vzorků degradovaných v SBF oproti vzorkům degradovaných v krevní plazmě po dobu 1 dne výrazně vyšší, v tomto případě se jedná o rozdíl 47,5 %. Statisticky významný rozdíl v pevnosti je i u vzorků degradovaných po dobu 14 dnů (51,9 %) a 21 dnů (100 %) (viz Obrázek 15).





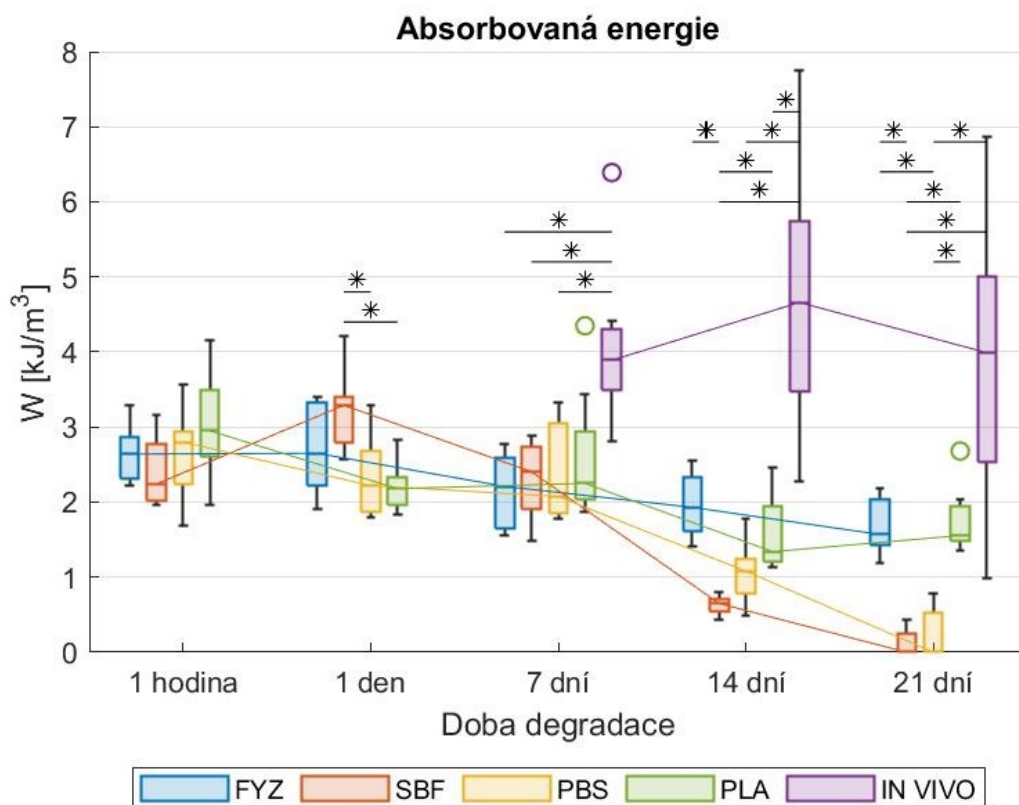
Obrázek 15: Porovnání stabilní hladiny napětí vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 7 \div 10$ ).

Výpočtem Hedgesova  $g$  byla kvantifikována velikost věcného rozdílu mediánů stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných v SBF a plazmě. Bylo zjištěno (Tabulka 13), že velikost věcného efektu je velmi velká pro scaffoldy degradované po dobu 1 hodiny, 1 dne, 14 dnů a 21 dnů. Velikost rozdílu mediánů pevnosti scaffoldů degradovaných po dobu 7 dnů je podle Hedgesova  $g$  malá.

Tabulka 13: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

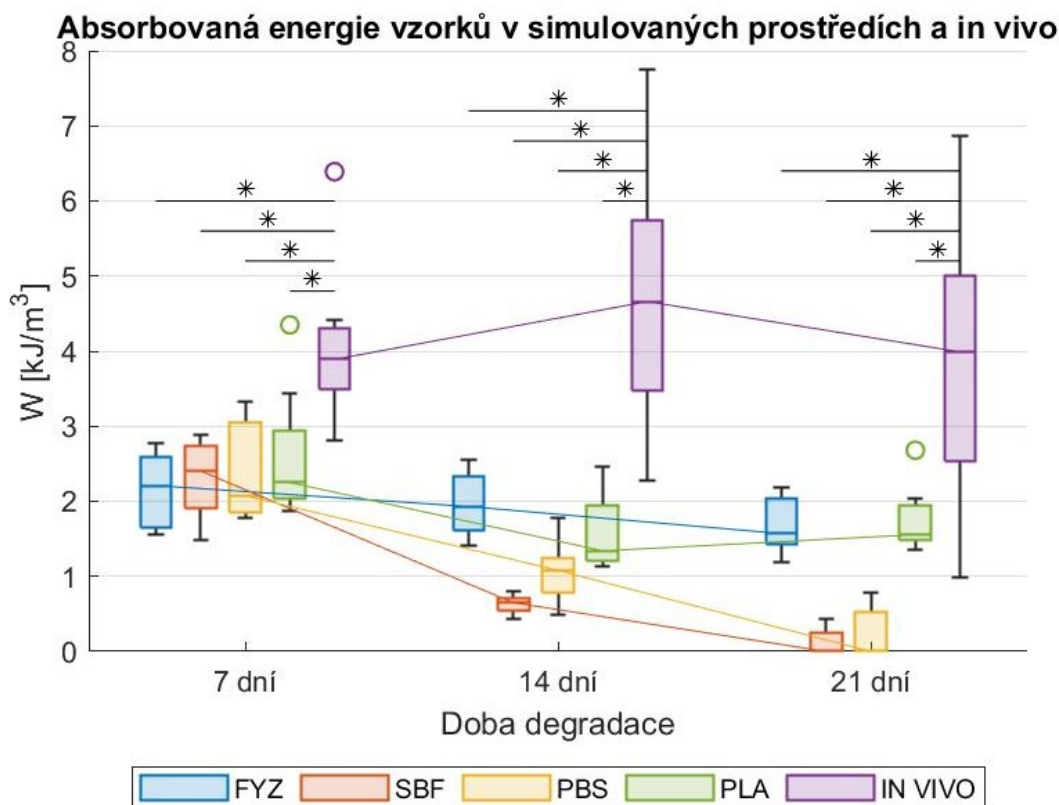
Doba degradace	Degradační prostředí	PLA
1 hodina	SBF	1,03
1 den	SBF	4,63
7 dní	SBF	0,29
14 dní	SBF	>10
21 dní	SBF	>10

Obrázek 16 zobrazuje absorbovanou energii degradovaných kolagenních scaffoldů.



Obrázek 16: Absorbovaná energie kolagenních scaffoldů degradovaných v různých prostředích. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí,  $n = 6 \div 10$ ).

Při porovnávání vzorků degradovaných v simulovaných prostředích a prostředí *in vivo* je patrné, že skutečné tělní prostředí není dobře aproximováno žádným ze simulačních medií (Obrázek 17). Absorbovaná energie scaffoldů degradovaných po dobu 7 dnů v simulovaných prostředích se od scaffoldů degradovaných *in vivo* liší průměrně o 42,5 %, absorbovaná energie scaffoldů degradovaných po dobu 14 dnů se liší průměrně o 73,2 % a u vzorků degradovaných 21 dnů je odlišná průměrně o 80,4 %.



Obrázek 17: Porovnání absorbované energie scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 7 \div 10$ ).

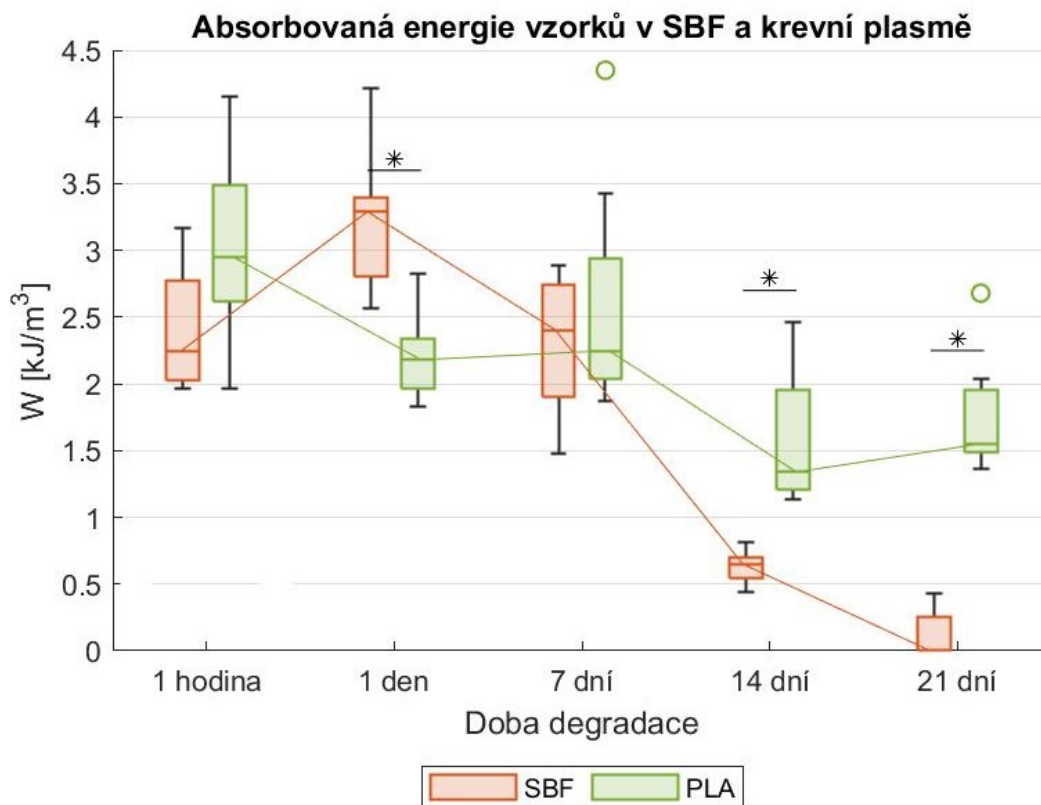
Rozdíly kvantifikované statistickým testem byly podpořeny výpočtem Hedgesova  $g$  (Tabulka 14). Hedgesovo  $g$  se pohybuje nad hranicí 0,8 pro všechny časy degradace i všechna degradační média, značící velký rozdíl v mediánech absorbované energie.

Tabulka 14: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věčného rozdílu mediánů absorbované energie scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

Doba degradace	Degradační prostředí	FYZ	SBF	PBS	PLA
7 dní	IN VIVO	>10	8,12	3,97	2,20
14 dní	IN VIVO	5,19	>10	>10	9,38
21 dní	IN VIVO	1,85	>10	>10	1,90

Rozdíly v absorbované energii scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě ukazuje Obrázek 18. Absorbovaná energie scaffoldů, které byly degradovány po dobu 1 hodiny v SBF je oproti krevní plazmě nižší o 24,1 %, u scaffoldů degradovaných 1 den v SBF je oproti krevní plazmě vyšší o 50,9 %, vzorky degradované 7 dní v SBF mají nižší absorbovanou energii

o 6,9 %, u vzorků vystavených degradačnímu prostředí 14 dnů je rozdíl v absorbované energii scaffoldů v SBF oproti plazmě 51,5 % a při degradaci 21 dnů je tento rozdíl roven 100 %.



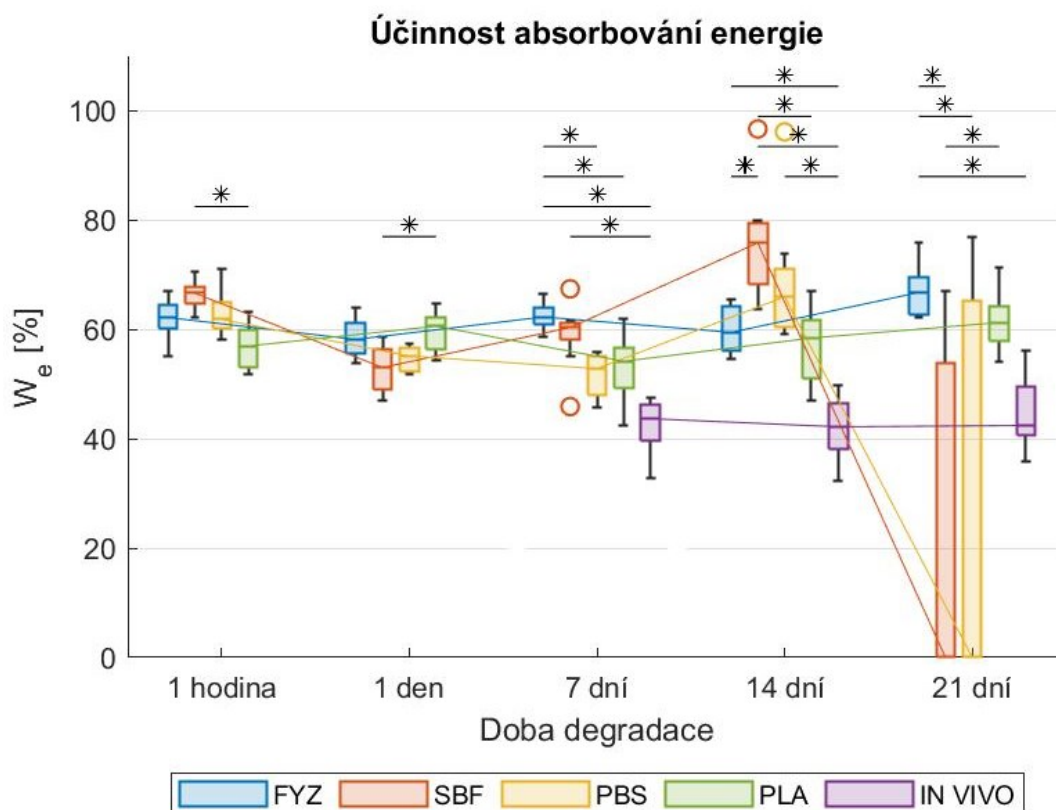
Obrázek 18: Porovnání absorbované energie vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 7 \div 10$ ).

Podle vypočítaných hodnot Hedgesova  $g$  (Tabulka 15) lze říci, že z pohledu absorbované energie je rozdíl mezi SBF a plazmou velký ve všech intervalech degradace, kromě 7 dnů. U vzorků degradovaných po dobu 7 dnů je rozdíl mezi mediány absorbované energie podle Hedgesova  $g$  malý.

Tabulka 15: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věčného rozdílu mediánů absorbované energie scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

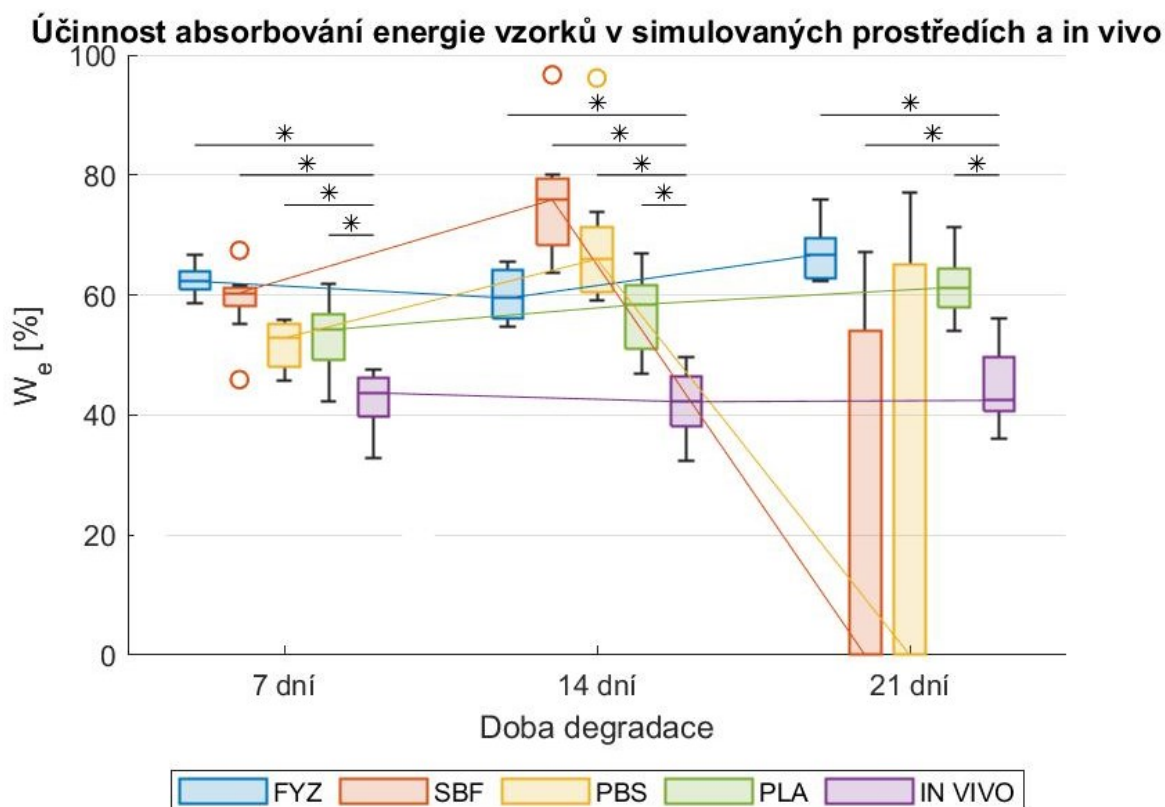
Doba degradace	Degradační prostředí	PLA
1 hodina	SBF	1,29
1 den	SBF	4,63
7 dní	SBF	0,45
14 dní	SBF	>10
21 dní	SBF	>10

Účinnost absorbování energie kolagenními scaffoldy degradovanými v různých prostředích zobrazuje Obrázek 19. Jak je vidět, účinnost absorbování energie je velmi odlišná mezi všemi sledovanými prostředími.



Obrázek 19: Účinnost absorbování energie kolagenních scaffoldů degradovaných v různých prostředích. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí,  $n = 6 \div 10$ ).

Obrázek 20 ukazuje párové porovnání mediánů účinnosti absorbování energie mezi vzorky degradovanými *in vivo* a v simulovaných tělních prostředích. Podle Mannova-Whitneyova testu jsou statisticky významné rozdíly mezi všemi prostředími ve všech časech degradace, kromě prostředí PBS ve 21 dnech vystavení degradačnímu prostředí. Průměrný rozdíl v mediánech účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných po dobu 7 dní v simulovaných prostředích oproti tělnímu prostředí je 31,4 %, v případě vystavení degradačnímu prostředí po dobu 14 dnů je rozdíl 53,9 % a u scaffoldů degradovaných 21 dnů 75,4 %.



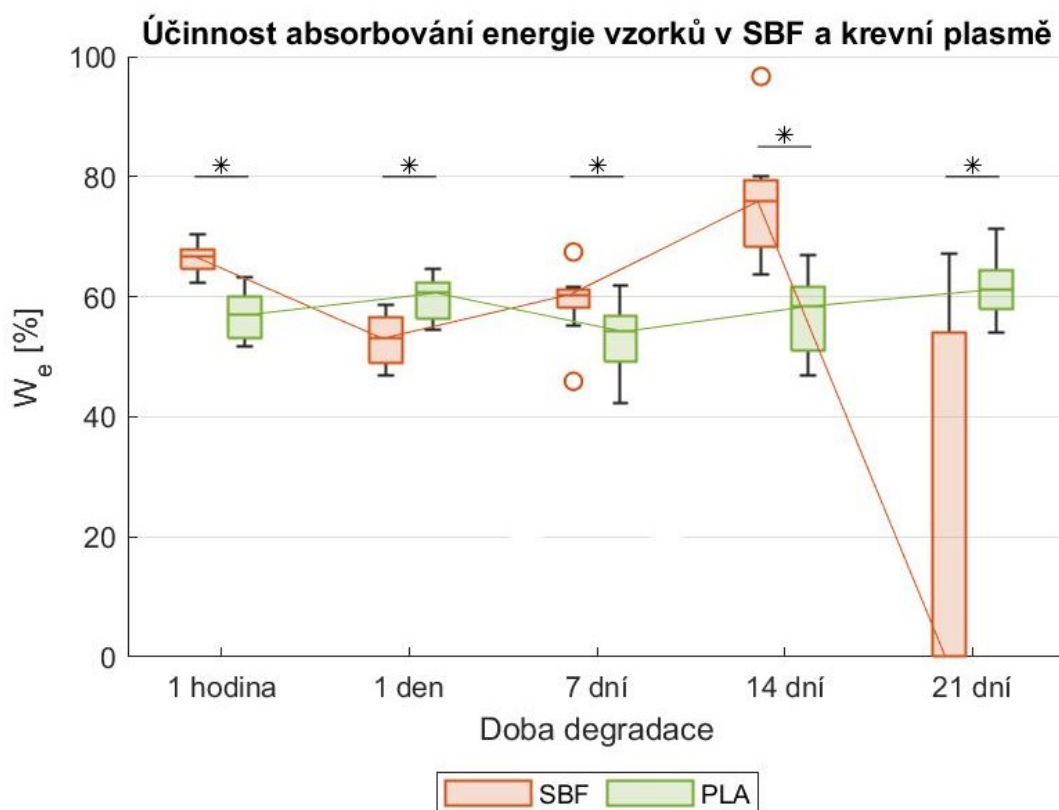
Obrázek 20: Porovnání účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 7 \div 10$ ).

Velikost rozdílu mediánů účinnosti absorbování energie byla kvantifikována Hedgesovým  $g$  (Tabulka 16). Je vidět, že pro scaffoldy degradované v PBS a *in vivo* po dobu 21 dnů je velikost věcného efektu středně velká. Pro ostatní prostředí a doby degradace je velikost věcného efektu větší než 0,8, tedy velká.

Tabulka 16: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

Doba degradace	Degradační prostředí	FYZ	SBF	PBS	PLA
7 dní	IN VIVO	>10	5,67	3,97	3,15
14 dní	IN VIVO	>10	>10	>10	6,52
21 dní	IN VIVO	>10	0,89	0,71	5,19

Párové porovnání účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných v SBF a plazmě zobrazuje Obrázek 21. Je patrné, že účinnost absorbování energie je významně odlišná u scaffoldů degradovaných v těchto simulovaných tělních prostředích pro všechny časy expozice. Průměrný rozdíl mediánů je 34,1 %.



Obrázek 21: Porovnání účinnosti absorbování energie vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 7 \div 10$ ).

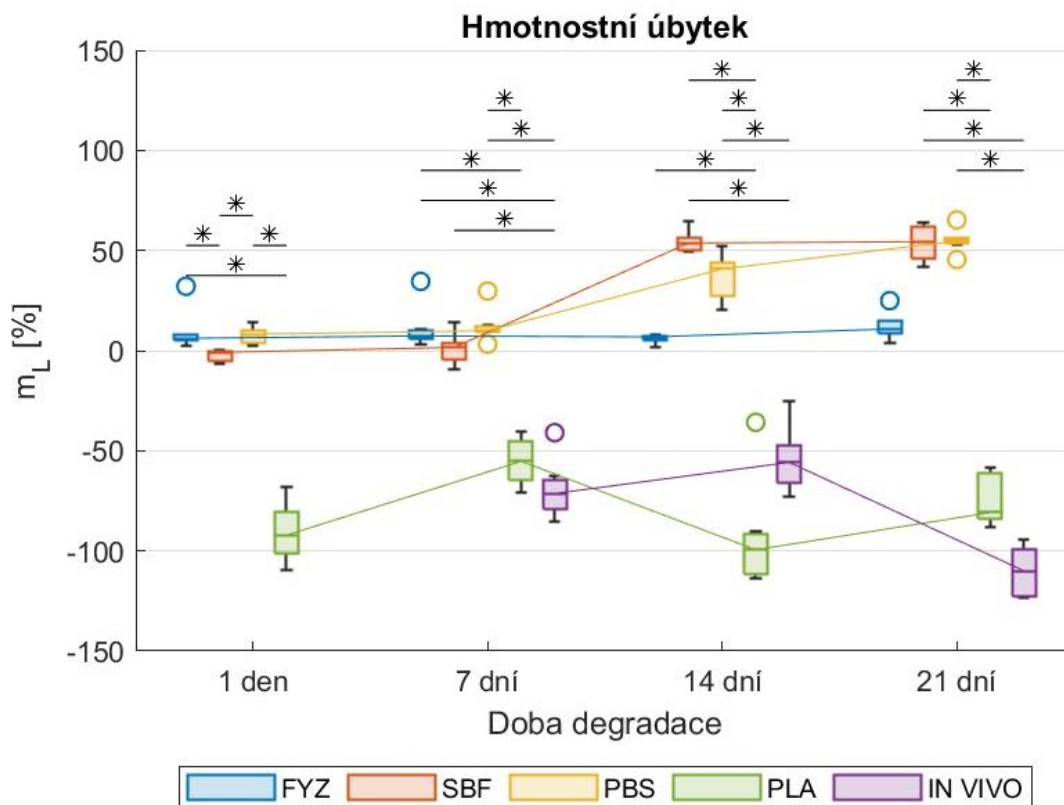
Hedgesovo  $g$  mediánů účinnosti absorbování energie (Tabulka 17) scaffoldů degradovaných v SBF a plazmě vychází pro všechny časy degradace větší než 0,8, tedy značí velký rozdíl mezi mediány vyhodnocované veličiny.

Tabulka 17: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice  $z$  [27] (Tabulka 9).

Doba degradace	Degradační prostředí	PLA
1 hodina	SBF	6,15
1 den	SBF	2,63
7 dní	SBF	1,57
14 dní	SBF	6,15
21 dní	SBF	2,48

## 4.2 Hmotnostní úbytky

Obrázek 22 zobrazuje úbytek hmotnosti scaffoldů degradovaných v různých degradačních prostředích oproti scaffoldům v suchém stavu před degradací. Záporná hodnota hmotnostního úbytku u scaffoldů degradovaných v krevní plazmě a *in vivo* značí nárůst hmotnosti po degradaci.

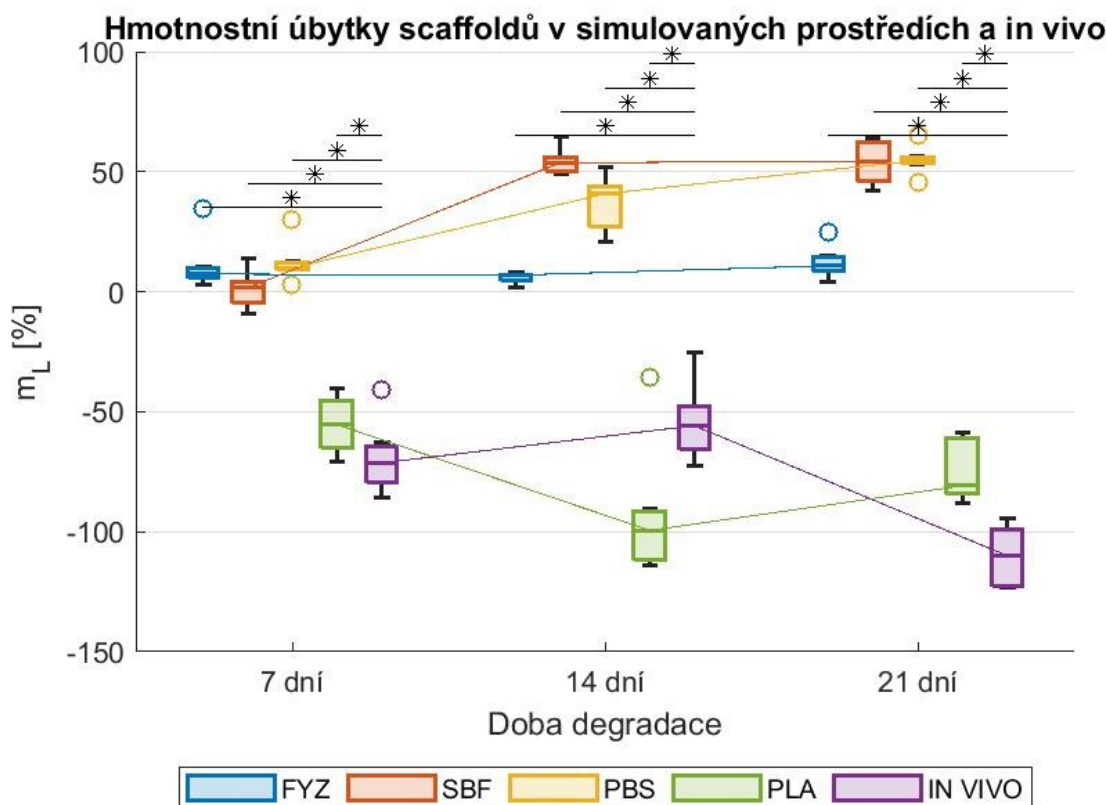


Obrázek 22: Hmotnostní úbytek  $m_L$  scaffoldů degradovaných v různých degradačních prostředích. Záporná hodnota  $m_L$  značí nárůst hmotnosti. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí,  $n = 5 \div 10$ ).

Porovnání úbytků hmotnosti scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích se scaffoldy, které byly degradovány *in vivo*, ukazuje Obrázek 23. Z provedeného statistického testu vyplývá, že se hodnoty  $m_L$  scaffoldů ze simulovaných prostředí statisticky významně liší od scaffoldů degradovaných *in vivo* ve všech časech degradace.

Hmotnostní úbytky byly porovnány i pomocí Hedgesova  $g$ . Z výsledných hodnot  $g$  vychází středně velký věcný efekt při porovnání mediánů hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných v plazmě po dobu 7 a 14 dnů s mediány scaffoldů degradovaných *in vivo*. Pro ostatní kombinace vychází Hedgesovo  $g$  větší než 0,8, značící velký věcný efekt.



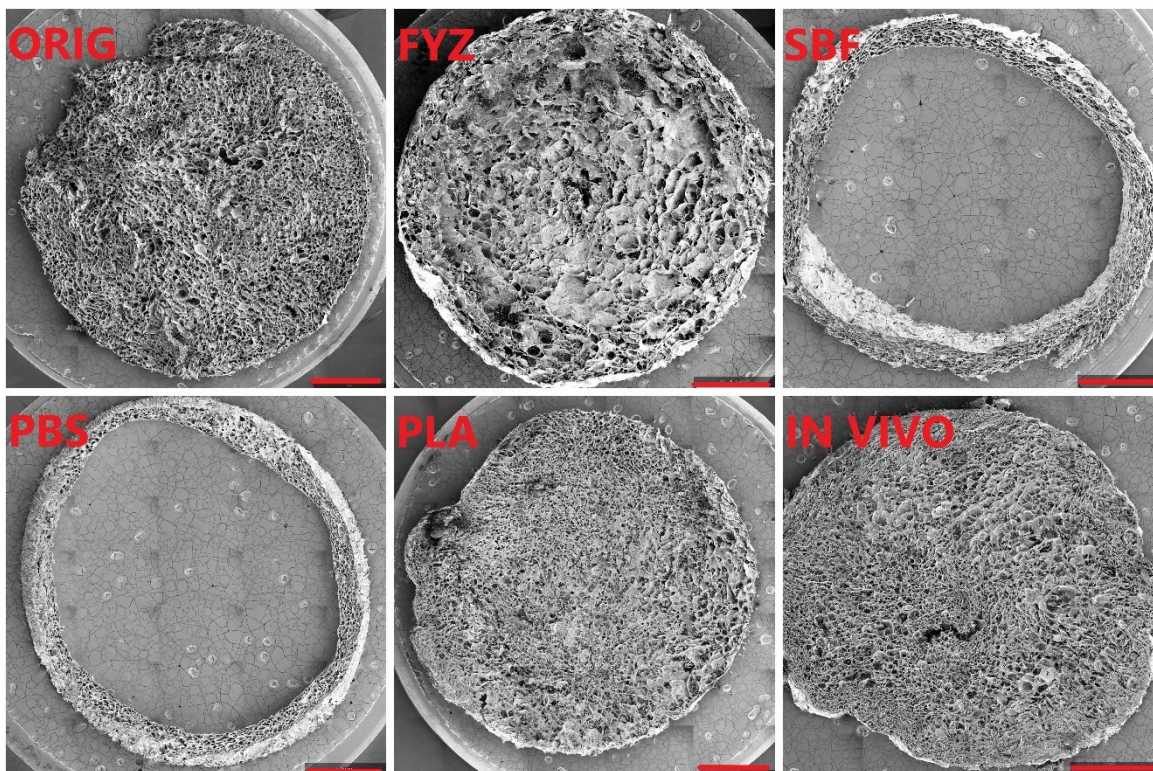


Obrázek 23: Porovnání úbytků hmotnosti scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí *in vivo*. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 5 \div 10$ ).

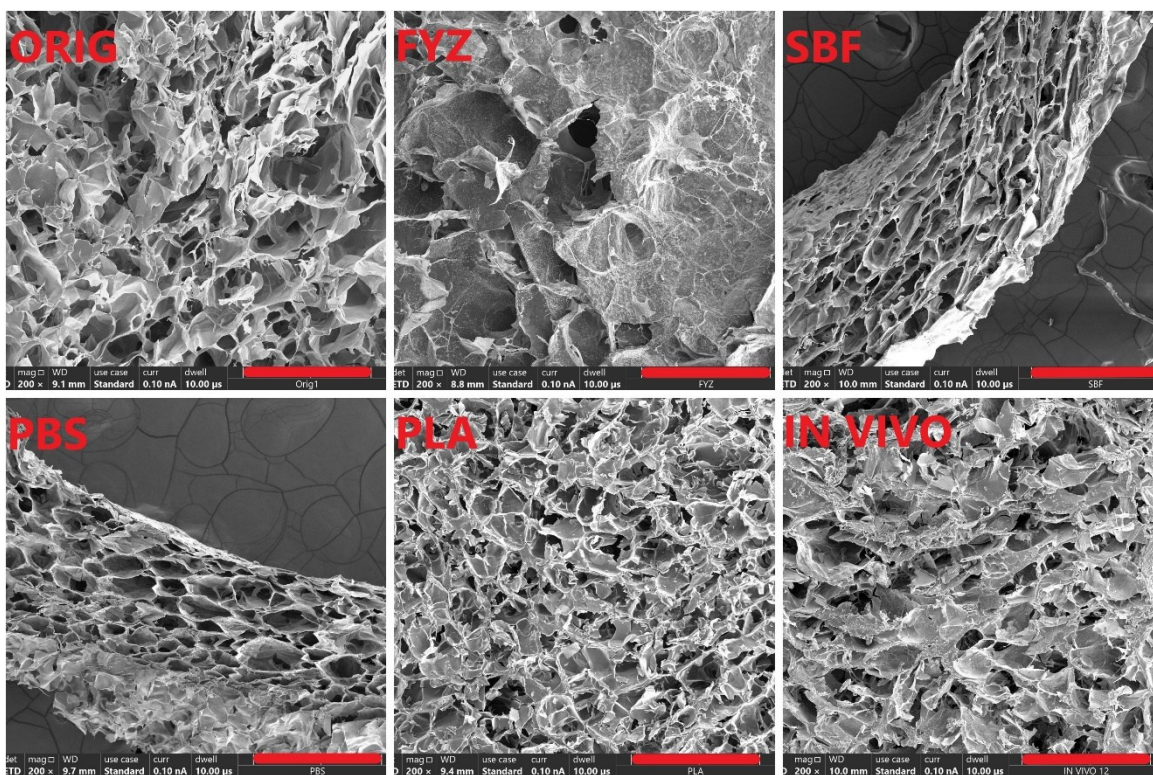
Porovnáním hmotnostních úbytků vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě pomocí Mannova-Whitneyova U testu byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi mediány hmotnostních úbytků ve všech časech degradace. Výpočtem  $g$  byl zjištěn velký věcný rozdíl mezi mediány hmotnostních úbytků pro všechny časy expozice degradačnímu prostředí.

### 4.3 Skenovací elektronová mikroskopie

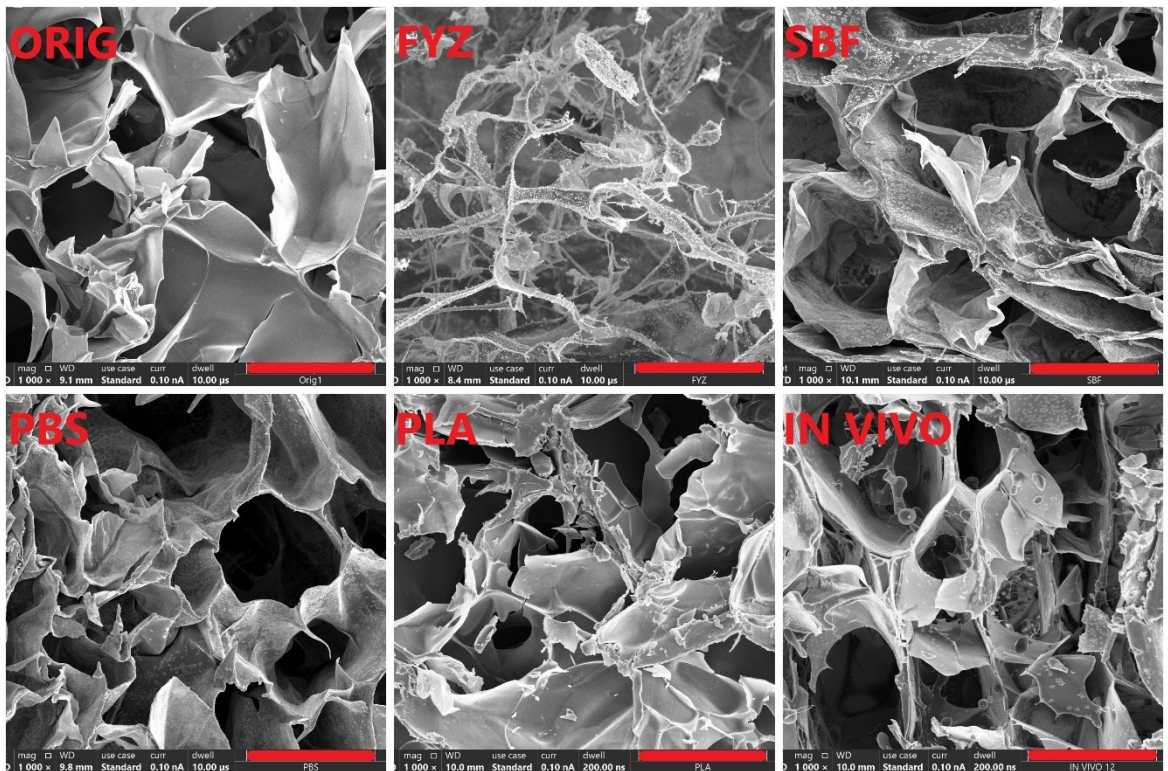
Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byla kvalitativně analyzována vnitřní struktura scaffoldů před degradací a scaffoldů degradovaných po dobu 21 dnů v degradačních prostředích (Obrázek 24 – Obrázek 27). Z obrázků je patrné, že SBF a PBS výrazně narušují vnitřní strukturu válcových kolagenních scaffoldů, ze kterých po degradaci v těchto prostředích zbyl pouze vnější obal. Na snímcích s velkým zvětšením (Obrázek 26, Obrázek 27) je patrné usazování cizorodých látek na kolagenních vláknech ve scaffoldu. Lze si také všimnout změny struktury pórů degradovaných vzorků oproti nedegradovaným.



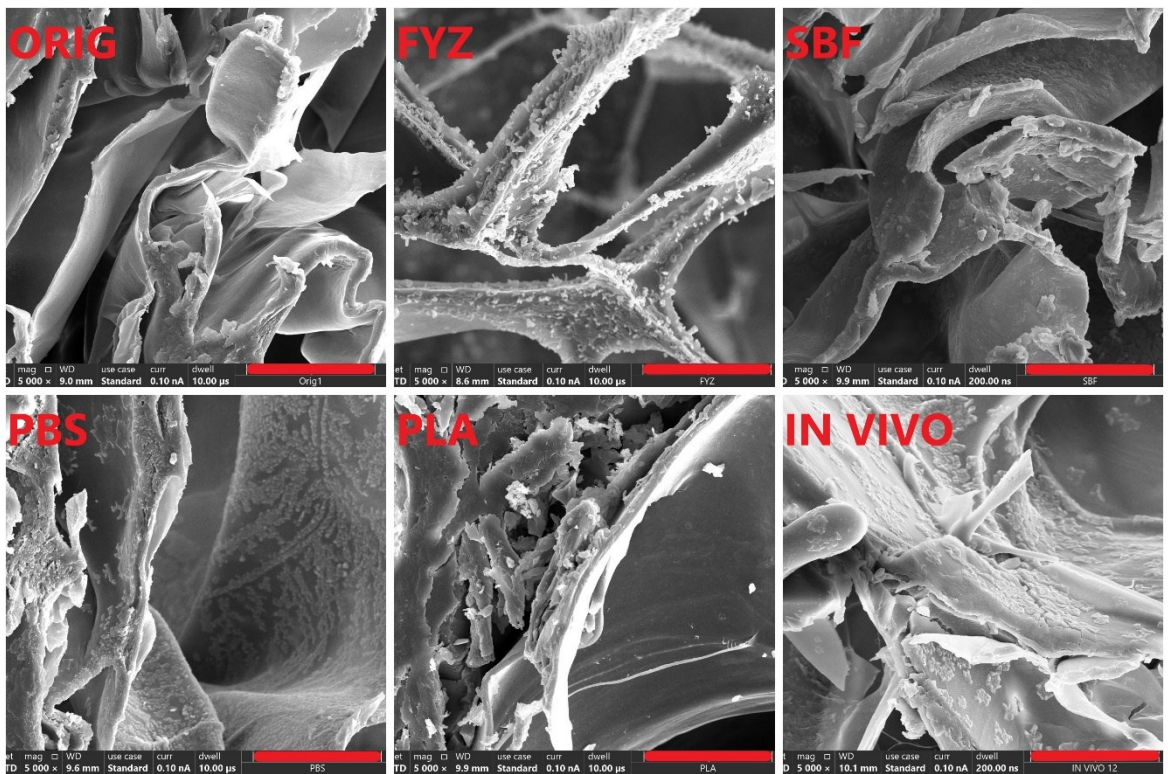
Obrázek 24: Snímky scaffoldů ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a *in vivo*. Zvětšení 50x, měřítko 2 mm.



Obrázek 25: Snímky scaffoldů ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a *in vivo*. Zvětšení 200x, měřítko 500  $\mu\text{m}$ .



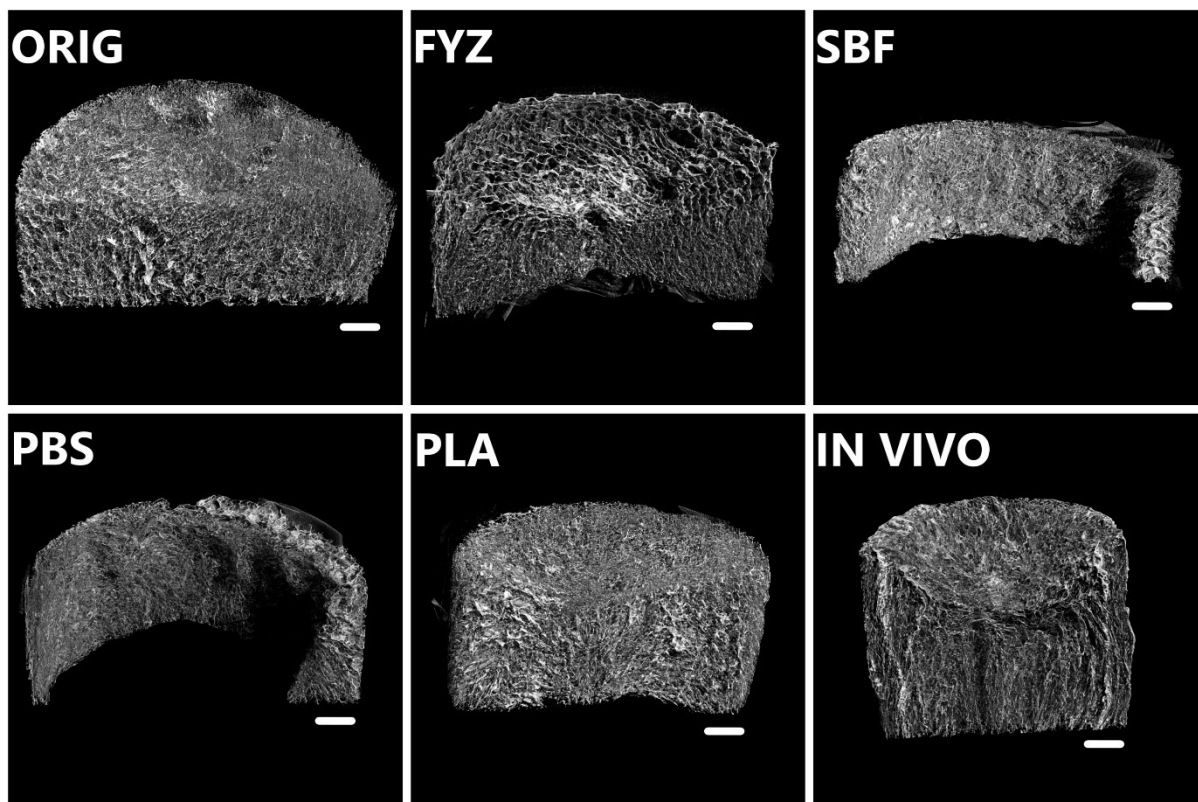
Obrázek 26: Snímky scaffoldů ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a *in vivo*. Zvětšení 1000x, měřítko 100  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 27: Snímky scaffoldů ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a *in vivo*. Zvětšení 5000x, měřítko 20  $\mu\text{m}$ .

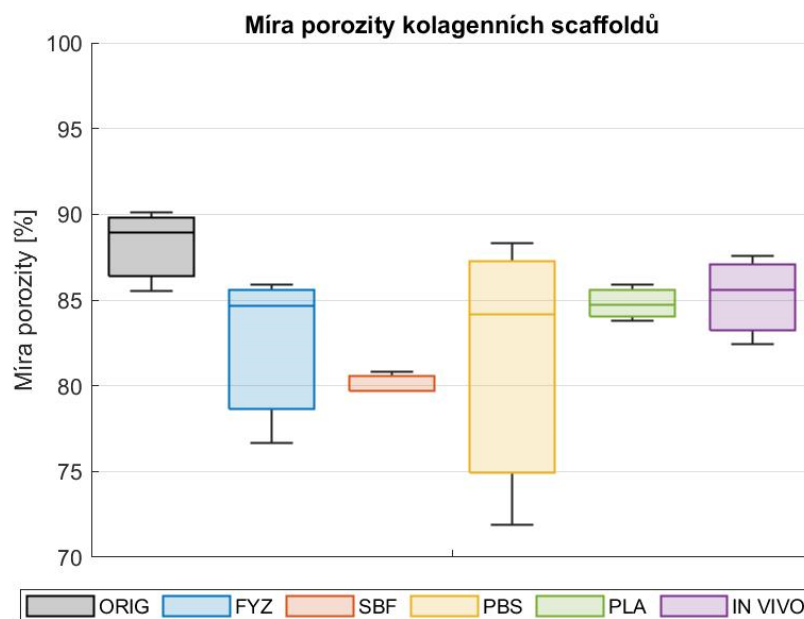
## 4.4 Počítačová mikrotomografie

Ze skenů kolagenních scaffoldů pomocí  $\mu$ CT byly sestaveny 3D vizualizace (Obrázek 28). Na první pohled je zřejmé, že u scaffoldů degradovaných v SBF a PBS došlo k výraznému úbytku hmoty ve středu scaffoldu.

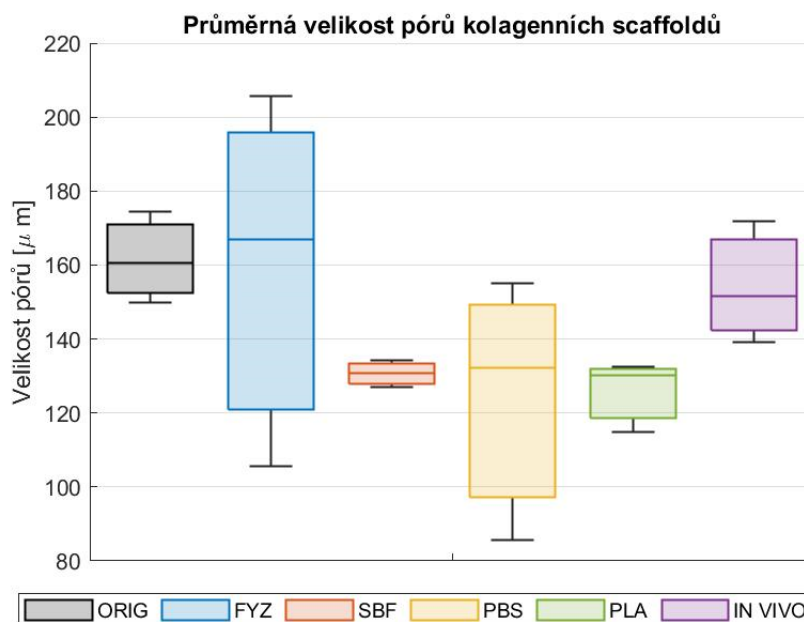


Obrázek 28: 3D vizualizace kolagenních scaffoldů získané z  $\mu$ CT. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a *in vivo*. Měřítka 2 mm.

Pomocí  $\mu$ CT analýzy byla kvantitativně vyhodnocena míra porozity, udávající, jakou část z celkového objemu scaffoldu tvoří póry a průměrná velikost pórů. Získané hodnoty míry porozity uvádí Obrázek 29, průměrnou velikost pórů uvádí Obrázek 30.



Obrázek 29: Porovnání míry porozity v nedegradovaném scaffoldu a scaffoldech degradovaných po dobu 21 dnů. Oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 3$ .



Obrázek 30: Porovnání velikosti pórů v nedegradovaném scaffoldu a scaffoldech degradovaných po dobu 21 dnů. Oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 3$ .

Podle oboustranného párového Mannova-Whitneyova U testu nejsou mezi nedegradovanými a degradovanými scaffoldy v těchto dvou parametrech statisticky významné rozdíly. Dle Hedgesova  $g$  je velikost věcného rozdílu středních hodnot míry porozity mezi nedegradovanými a degradovanými scaffoldy velká (Tabulka 18).

Tabulka 18: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věcného rozdílu středních hodnot míry porozity mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými po dobu 21 dnů v degračních médiích. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

	FYZ	SBF	PBS	PLA	IN VIVO
ORIG	2,48	>10	2,48	2,48	1,34

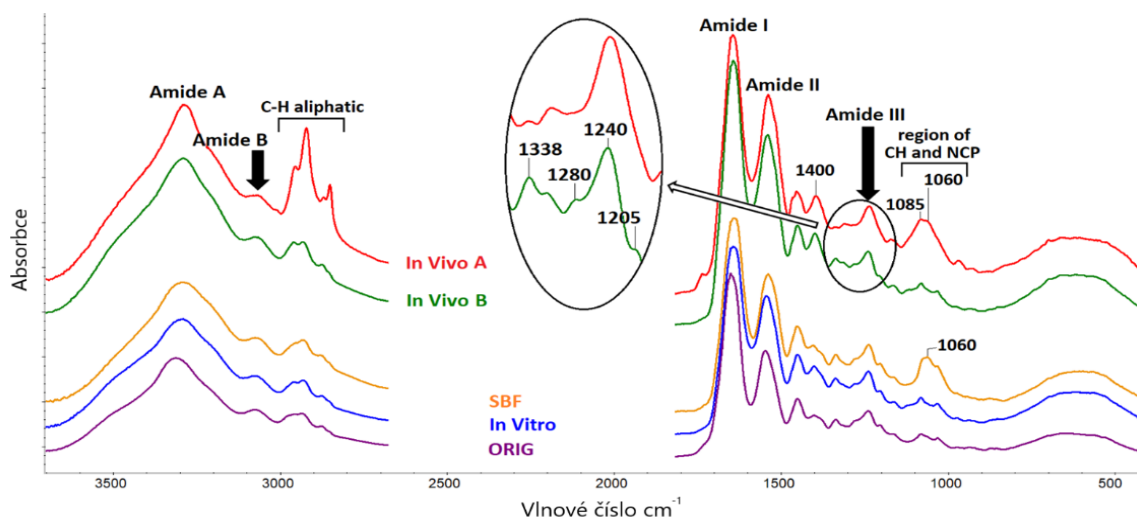
V případě velikosti pórů je podle Hedgesova  $g$  velikost věcného rozdílu středních hodnot mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými ve fyziologickém roztoku malá a mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými *in vivo* střední. Velikost věcného rozdílu velikosti pórů mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými v SBF, PBS a krevní plazmě je velká (Tabulka 19).

Tabulka 19: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věcného rozdílu středních hodnot velikostí pórů mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými po dobu 21 dnů v degračních médiích. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

	FYZ	SBF	PBS	PLA	IN VIVO
ORIG	0,22	>10	2,48	>10	0,71

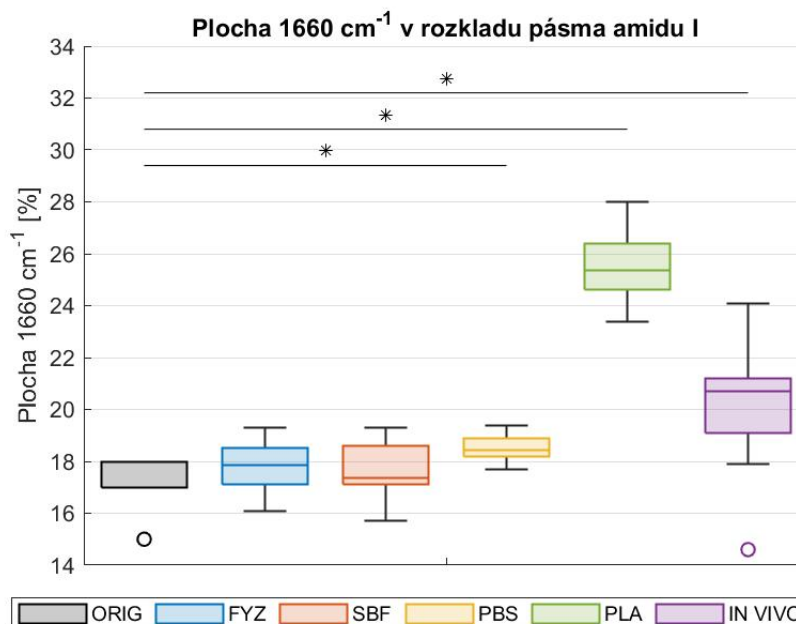
## 4.5 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie (FTIR) byla využita k analýze kolagenní struktury nedegradovaných scaffoldů a scaffoldů degradovaných po dobu 21 dnů. FTIR spektrum kolagenu obsahuje 5 amidových pásem (A, B, I, II, III) (Obrázek 31). Obrázek 31 dále obsahuje spektra vzorků kultivovaných s lidskými dermálními fibroblasty (*in vitro*), které byly součástí prováděné studie, ale nejsou součástí této diplomové práce.



Obrázek 31: Porovnání FTIR spekter kolagenních scaffoldů degradovaných v různých médiích.

Pásmo amidu I bylo rozloženo na několik podpásem. Pásmo na  $1660\text{ cm}^{-1}$  vyjadřuje existenci nativní kolagenní trojšroubovicové struktury [37]. Velikost plochy pásma  $1660\text{ cm}^{-1}$  určuje množství kolagenu v daném vzorku. Statistické porovnání plochy pásma  $1660\text{ cm}^{-1}$  degradovaných scaffoldů s nedegradovanými scaffoldy ukazuje Obrázek 32.



Obrázek 32: Porovnání ploch pásma  $1660\text{ cm}^{-1}$  v pásmu amidu I v nedegradovaném scaffoldu a scaffoldech degradovaných po dobu 21 dnů. Statisticky významné rozdíly mezi soubory jsou označeny \* ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test,  $n = 10$ ).

Statistický test ukázal, že mediány ploch pásma  $1660\text{ cm}^{-1}$  se liší mezi nedegradovanými scaffoldy a vzorky, které byly degradovány v PBS, plazmě a *in vivo*. U scaffoldů degradovaných v PBS se jedná o rozdíl 8,5 %, v plazmě je rozdíl 49,1 % a *in vivo* je rozdíl 21,8 %. Hedgesova  $g$  ukazují velký věcný rozdíl plochy  $1660\text{ cm}^{-1}$  mezi nedegradovanými vzorky a scaffoldy degradovanými ve všech degradačních médiích Tabulka 20.

Tabulka 20: Hedgesova  $g$  vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů ploch pásma  $1660\text{ cm}^{-1}$  v pásmu amidu I mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými po dobu 21 dnů v degradačních médiích. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).

	FYZ	SBF	PBS	PLA	IN VIVO
ORIG	0,95	0,87	5,51	>10	2,20

Krevní plazma obsahuje množství proteinů (albuminy, globuliny, fibrinogeny a další). Možná adsorpce některých proteinů a nízká koncentrace adsorbovaných komponent znemožňuje přesné zdůvodnění významného zvýšení plochy trojšroubovicové kolagenní struktury.

Prostředí *in vivo* má díky přítomnosti buněk, enzymů a hormonů předpoklady k přestavbě a remodelaci původní kolagenní hmoty. Nová kolagenní vlákna pravděpodobně obsahují nevyzrálé bivalentní vazby, které se postupně přemění na trivalentní. Pomocí poměru pásem  $1660\text{ cm}^{-1}/1690\text{ cm}^{-1}$  lze určit podíl trivalentního (vyzrálého) kolagenu a bivalentního (nevyzrálého) kolagenu [38]. Porovnáním tohoto poměru u nedegradovaných scaffoldů s degradovanými scaffoldy *in vivo* byl zjištěn 38,2% nárůst po degradaci *in vivo*. To naznačuje, že v tělním prostředí skutečně dochází k přestavbě kolagenu z nevyzrálého na vyzrálý.



## 5 Diskuse

Ze získaných výsledků je patrné, že každé degradační prostředí má rozdílný vliv na mechanické a strukturní vlastnosti kolagenních scaffoldů.

Elastický modul pružnosti scaffoldů degradovaných 21 dnů ve fyziologickém roztoku je oproti elastickému modulu hydratovaných scaffoldů nižší o 55,1 %. Kvůli velkému rozptylu naměřených hodnot se ovšem nejedná o statisticky významný rozdíl. Se zvyšujícím se časem degradace dochází ke snižování pevnosti i absorbované energie a zvyšuje se účinnost absorpce energie. V průběhu degradace prakticky nedochází k úbytku hmotnosti těchto vzorků ani ke statisticky významné změně množství kolagenu ve scaffoldech. Průměrná velikost pórů scaffoldů je v porovnání s nedegradovanými scaffoldy stejná, ale objevuje se zde větší variabilita velikosti pórů mezi jednotlivými vzorky. Pokles míry porozity naznačuje snížení počtu pórů ve scaffoldu, případně jejich uzavírání. Ze snímků ze skenovací elektronové mikroskopie je zřejmé, že dochází ke změně vnitřní struktury scaffoldu a usazování iontů na vláknech. Kombinaci těchto jevů by se dal přisoudit úbytek absorbované energie, který značí, že se materiál stává méně houževnatým. Změnou vnitřní struktury by bylo možné vysvětlit snížení pevnosti v tlaku až o 36,7 %.

Scaffoldy degradované v PBS vykazují významný pokles všech zkoumaných mechanických vlastností se zvyšujícím se časem expozice v degradačním médiu. Elastický gradient se pohybuje v rozmezí (71,08-18,03) kPa pro dobu degradace 0-14 dnů. To odpovídá elastickému gradientu zjištěnému ve studii Suchý a kol. [8], kde se jeho hodnoty pro stejné časy degradace pohybují v rozmezí (85-18) kPa. Stabilní hladina napětí scaffoldů degradovaných v PBS vychází pro degradační časy 0-14 dnů v intervalu (5,77-1,89) kPa. Suchý a kol. [8] naměřili srovnatelné hodnoty stabilní hladiny napětí ve stejných časech degradace (9,9-3,2) kPa. Hmotnostní úbytky v porovnání s touto studií vychází srovnatelně v rozmezí od 0 do 48 % při degradaci 0-14 dnů [8]. Nazir a kol. v [28] naměřili hmotnostní úbytky v rozmezí 0-17 % při degradaci 1-21 dnů. Mnou získané hodnoty hmotnostních úbytků se pohybují od 1 % do 54 %. Scaffoldy z PLGA pokryté kolagenní vrstvou vykazují hmotnostní úbytky maximálně 4 % při degradaci v PBS po dobu 14 dnů [29].

Při degradaci kolagenní scaffoldů v PBS dochází k statisticky významnému zvětšení podílu kolagenní trojšroubovicové struktury ve scaffoldech o 8,5 % oproti nedegradovaným scaffoldům. Ze SEM snímků 21 dnů degradovaných scaffoldů je patrné usazování cizorodých iontů na kolagenních vláknech. Usazování cizorodých iontů v kolagenní matici pozorovali

i Suchý a kol. v [8] při degradaci v PBS po dobu 14 dnů. Na rozdíl od výsledků v [8] dochází také ke snížení průměrné velikosti pórů i snížení porozity vzorků.

Degradace kolagenních scaffoldů v SBF způsobí, stejně jako ostatní degradační média, postupný pokles všech sledovaných mechanických vlastností. Zajímavý je nárůst elastického gradientu, stabilní hladiny napětí a absorbované energie při degradaci po dobu 1 dne oproti hydratovaným scaffoldům, který není doprovázen žádnou změnou ve hmotnosti a nevyskytuje se u žádných jiných degradačních médií. Elastický gradient i stabilní hladina napětí naměřené v našem experimentu sledují stejný trend jako měření v [8]. Tam ovšem došlo k úplnému rozložení scaffoldů už po 14 dnech degradace. V našem případě k rozpuštění došlo po vystavení degradačnímu prostředí po dobu 21 dnů. Zajímavé je, že nedošlo ke změně hmotnosti scaffoldů při degradaci po dobu 14 a 21 dnů, ačkoli v tomto časovém rozpětí došlo k naprosté ztrátě mechanické stability vzorků. Ze SEM snímků je patrné usazování cizorodých iontů na kolagenních vláknech, ovšem v menším množství než například v případě fyziologického roztoku, plazmy nebo tělního prostředí. Podle  $\mu$ CT došlo k významnému snížení průměrné velikosti pórů i míry porozity. FTIR analýza potvrdila, že při vystavení scaffoldů SBF nedochází ke změně množství kolagenu ve vzorku.

Při degradaci po dobu 21 dnů došlo u většiny vzorků k úplnému rozpuštění v roztoku SBF i v roztoku PBS. Ze vzorků, které nebyly zcela rozpuštěny, zbyly místo válcových scaffoldů vzorky trubkového tvaru, jak ukazují snímky náhledů scaffoldů ze SEM i  $\mu$ CT. To může naznačovat, že síťování scaffoldu bylo dokonale provedeno pouze na povrchu scaffoldů.

Elastický gradient scaffoldů degradovaných v krevní plazmě se pohybuje pro dobu degradace 0-14 dní v intervalu (70,1-21) kPa, což je srovnatelné s hodnotami elastického gradientu, které naměřili Suchý a kol. [8]. Stabilní hladina napětí, která v našem experimentu vychází (6,1-2,7) kPa, je oproti hodnotám v [8] (10-7,9) kPa značně odlišná. Kombinací výsledků měření hmotnostních úbytků, průměrné velikosti pórů, míry porozity a snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu lze konstatovat, že dochází k výraznému usazování cizorodých látek, jako jsou ionty solí nebo proteiny, které jsou v krevní plazmě obsaženy. V průběhu degradace došlo ke zvýšení hmotnosti testovaných vzorků až o 100 %. FTIR analýza ukázala výrazné zvýšení absorpce záření v pásmu  $1660\text{ cm}^{-1}$ , znamenající výrazný nárůst množství kolagenní trojšroubovicové struktury. Jak bylo uvedeno v Kapitole 4, tento výrazný nárůst množství kolagenu není možné spolehlivě zdůvodnit z důvodu adsorpce proteinů, vícesložkového složení plazmy a nízké koncentrace adsorbovaných složek.

Degradace scaffoldů v peritoneu experimentálních zvířat byla prováděna po dobu 7-21 dnů. S prodlužujícím se časem expozice degradačnímu prostředí dochází k nárůstu mediánu

elastického gradientu z 41,3 kPa na 54,4 kPa a nárůstu mediánu stabilní hladiny napětí z 6,6 kPa na 7,9 kPa. Houževnatost materiálu při expozici tělnímu prostředí po dobu 21 dnů je stejná, jako při vystavení působení prostředí 7 dnů. Zlepšení mechanických vlastností je doprovázeno i nárůstem hmotnosti vzorků. Při degradaci po dobu 7 dnů došlo k nárůstu hmotnosti o 71,3 %, při degradaci 14 dnů nárůst hmotnosti činí 55,8 % a vystavení tělnímu prostředí 21 dnů má za výsledek nárůst hmotnosti o 109,9 %. Výrazné zvýšení hmotnosti všech vzorků je možné vysvětlit prorůstáním živé tkáně experimentálního zvířete do scaffoldů nebo usazováním organických i anorganických sloučenin v porézní struktuře scaffoldu. Pokrytí kolagenních vláken cizorodými látkami je patrné ze snímku ze SEM. Také jej naznačuje zmenšení průměrné velikosti pórů i snížení porozity scaffoldů. Analýza FTIR ukázala výrazný nárůst množství kolagenní trojšroubovicové struktury ve scaffoldu o 21,8 % oproti nedegradovanému vzorku. To může být zapříčiněno činností buněk, působením enzymů a hormonů, které se v tělním prostředí přirozeně nachází, a mají potenciál přestavět a remodelovat kolagenní hmotu.

Prostředí *in vivo* je z pohledu elastického gradientu dobře aproximováno v době degradace 7 dní všemi zvolenými médii. V čase 14 dní je dobře aproximováno pouze fyziologickým roztokem a v čase 21 dnů není dobře aproximováno žádným ze zvolených médií. Z pohledu stabilní hladiny napětí, absorbované energie a účinnosti absorbování energie není prostředí *in vivo* dobře aproximováno žádným ze zvolených médií. Hmotnost vzorků degradovaných ve skutečném tělním prostředí je výrazně odlišná od hmotnosti vzorků degradovaných ve všech simulovaných tělních prostředích a ve všech časech degradace. Přítomnost neporušené sekundární struktury kolagenu (trojšroubovice) ve scaffoldu degradovaném v prostředí *in vivo* se statisticky významně liší od obsahu kolagenu ve scaffoldech degradovaných ve všech simulačních prostředích.

Při porovnání mechanických vlastností krevní plazmy a SFB, která má stejné složení iontů jako krevní plazma, je patrné, že prostředí SBF je agresivnější a degraduje kolagenní scaffoldy více. Do doby degradace 7 dnů se dají tato dvě prostředí považovat z pohledu mechanických vlastností za srovnatelná. Od doby degradace 14 dnů dochází k výraznému snížení pevnosti a absorbované energie, které ovšem nejsou doprovázeny tak velkým snížením tuhosti. Ke ztrátě tuhosti kolagenních scaffoldů degradovaných v SBF dochází až při expozici 21 dnů. U scaffoldů degradovaných v SBF byl pozorován výrazný úbytek hmotnosti s prodlužujícím se časem degradace, na rozdíl od scaffoldů degradovaných v krevní plazmě, kde dochází k výraznému nárůstu hmotnosti. Shoda nenastává ani při porovnání množství kolagenu ve scaffoldu, kdy krevní plazma způsobí výrazné navýšení jeho podílu, zatím co ve scaffoldech

degradovaných v SBF nebyl tento jev pozorován. Lze říci, že krevní plazma není při zkoumání degradace kolagenních scaffoldů dobře aproximována SBF v žádné ze sledovaných vlastností.

## 6 Závěr

Tato práce se zabývala analýzou mechanických a strukturních vlastností kolagenních scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a jejich porovnáním s mechanickými a strukturními vlastnostmi scaffoldů degradovaných ve skutečném tělním prostředí. Hlavním cílem práce bylo zhodnotit, jak dobře je možné simulovat skutečné tělní prostředí syntetickým médiem. Pro hodnocení byly vybrány 4 neenzymatické, anorganické a snadno dostupné roztoky – fyziologický roztok, simulovaná tělní tekutina, fosfátový pufovaný roztok a lidská krevní plazma. Ke zkoumání degradace ve skutečném tělním prostředí byly kolagenní scaffoldy voperovány do peritonea prasat, jako pokusných zvířat. Kolagenní scaffoldy byly degradačnímu prostředí vystaveny po dobu 1 hodiny, 1 dne, 7 dnů, 14 dnů a 21 dnů. Degradace *in vivo* probíhala 7, 14 a 21 dnů.

K hodnocení degradace scaffoldů bylo využito mechanických zkoušek v tlaku, ze kterých byly vyhodnocovány 4 mechanické vlastnosti. Dále byl sledován hmotnostní úbytek degradovaných scaffoldů, strukturní vlastnosti byly hodnoceny pomocí skenovací elektronové mikroskopie a mikro-CT a sekundární struktura kolagenu byla hodnocena infračervenou spektroskopií. Diskuse k získaným výsledkům je uvedena v Kapitole 5.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že degradace kolagenních scaffoldů ve skutečném tělním prostředí je velmi složitá a nebyla dobře aproximována žádným ze zvolených simulačních médií. Pro přesnější simulaci tělního prostředí by mohlo být vhodnější využití komplexnějších roztoků, které obsahují například buněčné kultury nebo enzymy.

## 7 Publikované výsledky

Radek LINHART, Radek SEDLÁČEK, Tomáš SUCHÝ, Lucie VIŠTEJNOVÁ a Pavel KLEIN. Verification of the Effects of Various Non-Enzymatic Simulated Body Fluids and in vivo Conditions on Degradation Behaviour of Collagen Scaffolds. *23rd International Scientific Conference APPLIED MECHANICS 2022 – Book of Abstracts*. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2022, s. 65-68. ISBN 978-80-01-06974-5.

## 8 Seznam použité literatury

- [1] RAGHAVENDRA, Gownolla, Kokkarachedu VARAPRASAD a Tippabattini JAYARAMUDU. Biomaterials. *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering* [online]. Elsevier, 2015, s. 21-44 [cit. 2022-06-13]. ISBN 9780323328890. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323328890000029>
- [2] BLACK, M, R NOORT a P DRURY. Medical applications of biomaterials. *Physics in Technology* [online]. 1982, **13**(2), 50-65 [cit. 2022-06-13]. ISSN 0305-4624. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0305-4624/13/2/302>
- [3] RODRÍGUEZ, I., G. ANICETO a J.J. MORENO. Cranial reconstruction with biomaterials. Historical revision and current state. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial* [online]. **2007**(29), 79-89 [cit. 2022-06-13]. ISSN 2173-9161. Dostupné z: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-05582007000200001&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-05582007000200001&script=sci_arttext&tlng=en)
- [4] MANZINI, Bruna, Leonardo MACHADO, Pedro NORITOMI a Jorge DA SILVA. Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. *Journal of Biosciences* [online]. 2021, **46**(1) [cit. 2022-03-25]. ISSN 0250-5991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-020-00122-6>
- [5] Biomaterials. SMALLMAN, R.E. a R.J. BISHOP. *Modern physical metallurgy and materials engineering: science, process, applications*. 6th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999, s. 394-405. ISBN 9780750645645.
- [6] SUNDAR, Gayathri, Josna JOSEPH, Prabhakumari C, Annie JOHN a Annie ABRAHAM. Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 2021, **70**(9), 593-604 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0091-4037. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00914037.2020.1740991>
- [7] SUCHÝ, Tomáš, Monika ŠUPOVÁ, Martin BARTOŠ et al. Dry versus hydrated collagen scaffolds: are dry states representative of hydrated states?. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2018, **29**(2) [cit. 2022-04-26]. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-017-6024-2>

- [8] SUCHÝ, Tomáš, Martin BARTOŠ, Radek SEDLÁČEK, Monika ŠUPOVÁ, Margit ŽALOUDKOVÁ, Grażyna MARTYNKOVÁ a René FOLTÁN. Various Simulated Body Fluids Lead to Significant Differences in Collagen Tissue Engineering Scaffolds. *Materials* [online]. 2021, **14**(16) [cit. 2022-01-30]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/16/4388>
- [9] MHANNA, Rami a Anwarul HASAN. Introduction to Tissue Engineering. HASAN, Anwarul, ed., Anwarul HASAN. *Tissue Engineering for Artificial Organs*. 1. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017, s. 3-34. ISBN 9783527689934. Dostupné také z: [https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527338632\\_c01.pdf](https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527338632_c01.pdf)
- [10] ZHANG, Ziyang, José EGAÑA, Ann RECKHENRICH, Thilo SCHENCK, Jörn LOHMEYER, Jan SCHANTZ, Hans-Günther MACHENS a Arndt SCHILLING. Cell-based resorption assays for bone graft substitutes. *Acta Biomaterialia* [online]. 2012, **8**(1), 13-19 [cit. 2022-04-26]. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111004041>
- [11] DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran, Yasuhiko YOSHIDA, Toru MAEKAWA a D. KUMAR. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2011, **2011**, 1-19 [cit. 2022-01-30]. ISSN 1687-9422. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/>
- [12] FRATZL, P. Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction. FRATZL, Peter, ed., Peter FRATZL. *Collagen* [online]. Boston, MA: Springer US, 2008, s. 1-13 [cit. 2022-01-30]. ISBN 978-0-387-73905-2. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-73906-9\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-73906-9_1)
- [13] PARENTEAU-BAREIL, Rémi, Robert GAUVIN a François BERTHOD. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* [online]. 2010, **3**(3), 1863-1887 [cit. 2022-01-30]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/3/3/1863>
- [14] LI, Youbin, Yuzhe LIU, Ronghang LI et al. Collagen-based biomaterials for bone tissue engineering. *Materials & Design* [online]. 2021, **210** [cit. 2022-01-30]. ISSN 02641275. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264127521006043>
- [15] SILVA, Tiago, Joana MOREIRA-SILVA, Ana MARQUES, Alberta DOMINGUES, Yves BAYON a Rui REIS. Marine Origin Collagens and Its Potential Applications.



- Marine Drugs* [online]. 2014, **12**(12), 5881-5901 [cit. 2022-07-06]. ISSN 1660-3397. Dostępne z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/12/5881>
- [16] LEE, Chi, Anuj SINGLA a Yugyung LEE. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, **221**(1-2), 1-22 [cit. 2022-01-30]. ISSN 03785173. Dostępne z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301006913>
- [17] SIONKOWSKA, Alina, Sławomir SKRZYŃSKI, Krzysztof ŚMIECHOWSKI a Agata KOŁODZIEJCZAK. The review of versatile application of collagen. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 2017, **28**(1), 4-9 [cit. 2022-01-30]. ISSN 10427147. Dostępne z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pat.3842>
- [18] ADAMIAK, Katarzyna a Alina SIONKOWSKA. Current methods of collagen cross-linking: Review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **161**, 550-560 [cit. 2022-01-30]. ISSN 01418130. Dostępne z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020335169>
- [19] AZEVEDO, Helena a Rui REIS. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate. REIS, Rui a Julio SAN ROMÁN, ed. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. CRC Press, 2004 [cit. 2022-01-30]. ISBN 978-0-8493-1936-5. Dostępne z: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/14150/1/file.pdf>
- [20] WILLIAMS, D.F. a S.P. ZHONG. Biodeterioration/biodegradation of polymeric medical devices in situ. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 1994, **34**(2), 95-130 [cit. 2022-01-30]. ISSN 09648305. Dostępne z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0964830594900027>
- [21] KOKUBO, Tadashi a Hiroaki TAKADAMA. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(15), 2907-2915 [cit. 2022-01-30]. ISSN 01429612. Dostępne z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206000457>
- [22] PETER, Mathew, Nitya GANESH, N. SELVAMURUGAN, S.V. NAIR, T. FURUIKE, H. TAMURA a R. JAYAKUMAR. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, **80**(3), 687-694 [cit. 2022-07-06]. ISSN

01448617. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861709006912>
- [23] HE, Qianjun, Jianlin SHI, Min ZHU, Yu CHEN a Feng CHEN. The three-stage in vitro degradation behavior of mesoporous silica in simulated body fluid. *Microporous and Mesoporous Materials* [online]. 2010, **131**(1-3), 314-320 [cit. 2022-07-06]. ISSN 13871811. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387181110000107>
- [24] ROETHER, J.A, A.R BOCCACCINI, L.L HENCH, V MAQUET, S GAUTIER a R JÉRÔME. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications. *Biomaterials* [online]. 2002, **23**(18), 3871-3878 [cit. 2022-07-06]. ISSN 01429612. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296120200131X>
- [25] LI, Zijian, Xunan GU, Siqian LOU a Yufeng ZHENG. The development of binary Mg–Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(10), 1329-1344 [cit. 2022-07-06]. ISSN 01429612. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207010514>
- [26] YILMAZ, Bengi, Ahmet PAZARCEVIREN, Aysen TEZCANER a Zafer EVIS. Historical development of simulated body fluids used in biomedical applications: A review. *Microchemical Journal* [online]. 2020, **155** [cit. 2022-04-26]. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X19330693>
- [27] MEDICAGO AB. *Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 and 7.2* [online]. Uppsala, Švédsko. Dostupné také z:  
[http://www.medicago.se/sites/default/files/pdf/productsheets/PBS\\_Buffer\\_v.\\_01.pdf](http://www.medicago.se/sites/default/files/pdf/productsheets/PBS_Buffer_v._01.pdf)
- [28] NAZIR, Rabia, Arne BRUYNEEL, Carolyn CARR a Jan CZERNUSZKA. Mechanical and Degradation Properties of Hybrid Scaffolds for Tissue Engineered Heart Valve (TEHV). *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2021, **12**(1) [cit. 2022-04-06]. ISSN 2079-4983. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-4983/12/1/20>
- [29] WU, Y, S SHAW, H LIN, T LEE a C YANG. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(6), 896-904 [cit. 2022-04-09]. ISSN 01429612. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205006034>

- [30] ROCHESTER UNIVERSITY. What Is Plasma?. In: *Rochester.edu* [online]. [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=160&ContentID=37>
- [31] EBENSTEIN, Donna a Lisa PRUITT. Nanoindentation of biological materials. *Nano Today* [online]. 2006, **1**(3), 26-33 [cit. 2022-01-30]. ISSN 17480132. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013206700779>
- [32] ČSN ISO 13314. *Mechanické zkoušení kovů – Zkoušení tvářitelnosti – Zkouška porézniých a pěnových kovů tlakem*. 1. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2020, 12 s.
- [33] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vyd. 2., upr. a rozš. Praha: Academia, 2004. ISBN 80-200-1254-0.
- [34] LENHARD, W. a A. LENHARD. Computation of Effect Sizes. In: *Psychometrica.de* [online]. Psychometrica [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: [https://www.psychometrica.de/effect\\_size.html](https://www.psychometrica.de/effect_size.html)
- [35] KERBY, Dave S. The Simple Difference Formula: An Approach to Teaching Nonparametric Correlation. *Comprehensive Psychology* [online]. 2014, **3** [cit. 2022-05-10]. ISSN 2165-2228. Dostupné z: <http://cop.sagepub.com/lookup/doi/10.2466/11.IT.3.1>
- [36] M. COOPER, Harris, Larry V. HEDGES a Jeff C. VALENTINE, ed. *The handbook of research synthesis and meta-analysis*. 2nd edition. Editor Harris M. COOPER, editor Larry V. HEDGES, editor Jeff C. VALENTINE. New York: Russell Sage Foundation, 2009. ISBN 978-0-87154-163-5. Dostupné také z: <https://www.daneshnamehicsa.ir/userfiles/files/1/9-%20The%20Handbook%20of%20Research%20Synthesis%20and%20Meta-Analysis.pdf>
- [37] RABOTYAGOVA, Olena, Peggy CEBE a David KAPLAN. Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2008, **28**(8), 1420-1429 [cit. 2022-06-09]. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493108000581>
- [38] PASCHALIS, E., K. VERDELIS, S. DOTY, A. BOSKEY, R. MENDELSON a M. YAMAUCHI. Spectroscopic Characterization of Collagen Cross-Links in Bone. *Journal*

*of Bone and Mineral Research* [online]. 2001, **16**(10), 1821-1828 [cit. 2022-06-11].  
ISSN 08840431. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1359/jbmr.2001.16.10.1821>

# Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma procesu tkáňového inženýrství [6].....	11
Obrázek 2: Hierarchická struktura kolagenu. a) Kolagenní $\alpha$ řetězce tvořící troj šroubovici. b) Spojené tropokolagenní molekuly. c) Kolagenní fibril. d) Kolagenní vlákno [13].....	15
Obrázek 3: Příprava kolagenních scaffoldů. Vlevo kolagenní disperze ve 48jamkovém kultivačním plastu, vpravo lyofilizovaný scaffold připravený na experimenty. ....	24
Obrázek 4: Simulovaná tělní prostředí pro degradaci kolagenních scaffoldů. ....	25
Obrázek 5: Simulovaná tělní prostředí s plně hydratovanými scaffoldy.....	26
Obrázek 6: Kolagenní scaffoldy připravené pro implantaci do pokusného zvířete a scaffoldy implantované v peritoneu.....	26
Obrázek 7: Reprezentativní graf napětí – deformace vzorku PLA_0_03 s vyznačením stabilní hladiny napětí $\sigma_{pl}$ .....	29
Obrázek 8: Grafické znázornění určení elastického gradientu vzorku PLA_0_03. Modrá křivka jsou naměřené body z tlakové zkoušky, červená přímka je sečna hysterezní křivky, jejíž směrnice je elastický gradient $E$ . ....	30
Obrázek 9: Grafické znázornění $W$ a $W_e$ v grafu závislosti $\sigma$ na $\epsilon$ vzorku PLA_0_03. Křivka naměřených dat je černá, zeleně označená plocha znázorňuje absorbovanou energii $W$ , podíl zelené ku modré + zelené označuje účinnost absorbování energie $W_e$ . ....	31
Obrázek 10: Elastický gradient kolagenních scaffoldů degradovaných v různých prostředích. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí, $n = 6 \div 10$ ).....	36
Obrázek 11: Porovnání elastického gradientu scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 7 \div 10$ ).....	37
Obrázek 12: Porovnání elastického gradientu vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 7 \div 10$ ).....	38
Obrázek 13: Stabilní hladina napětí kolagenních scaffoldů degradovaných v různých prostředích. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí, $n = 6 \div 10$ ).....	39

Obrázek 14: Porovnání stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 7 \div 10$ ).....	40
Obrázek 15: Porovnání stabilní hladiny napětí vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 7 \div 10$ ).....	41
Obrázek 16: Absorbovaná energie kolagenních scaffoldů degradovaných v různých prostředích. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí, $n = 6 \div 10$ ).....	42
Obrázek 17: Porovnání absorbované energie scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 7 \div 10$ ).....	43
Obrázek 18: Porovnání absorbované energie vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 7 \div 10$ ).....	44
Obrázek 19: Účinnost absorbování energie kolagenních scaffoldů degradovaných v různých prostředích. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí, $n = 6 \div 10$ ).....	45
Obrázek 20: Porovnání účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 7 \div 10$ ).....	46
Obrázek 21: Porovnání účinnosti absorbování energie vzorků degradovaných v SBF a krevní plazmě. Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 7 \div 10$ ).....	47
Obrázek 22: Hmotnostní úbytek $m_L$ scaffoldů degradovaných v různých degradačních prostředích. Záporná hodnota $m_L$ značí nárůst hmotnosti. Statisticky významné rozdíly mezi datovými soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , Kruskalův-Wallisův test, post-hoc test Dunnové s Bonferroniho korekcí, $n = 5 \div 10$ ).....	48

Obrázek 23: Porovnání úbytků hmotnosti scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Statisticky významné rozdíly mezi soubory v jednotlivých časových bodech jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 5 \div 10$ ).....	49
Obrázek 24: Snímky scaffoldů ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a <i>in vivo</i> . Zvětšení 50x, měřítko 2 mm. ....	50
Obrázek 25: Snímky scaffoldů ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a <i>in vivo</i> . Zvětšení 200x, měřítko 500 $\mu\text{m}$ . ....	50
Obrázek 26: Snímky scaffoldů ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a <i>in vivo</i> . Zvětšení 1000x, měřítko 100 $\mu\text{m}$ . ....	51
Obrázek 27: Snímky scaffoldů ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a <i>in vivo</i> . Zvětšení 5000x, měřítko 20 $\mu\text{m}$ . ....	51
Obrázek 28: 3D vizualizace kolagenních scaffoldů získané z $\mu\text{CT}$ . Zleva shora nedegradovaný scaffold, degradovaný 21 dnů ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě a <i>in vivo</i> . Měřítko 2 mm. ....	52
Obrázek 29: Porovnání míry porozity v nedegradovaném scaffoldu a scaffoldech degradovaných po dobu 21 dnů. Oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 3$ . ....	53
Obrázek 30: Porovnání velikosti pórů v nedegradovaném scaffoldu a scaffoldech degradovaných po dobu 21 dnů. Oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 3$ . ....	53
Obrázek 31: Porovnání FTIR spekter kolagenních scaffoldů degradovaných v různých médiích. ....	54
Obrázek 32: Porovnání ploch pásma $1660 \text{ cm}^{-1}$ v pásmu amidu I v nedegradovaném scaffoldu a scaffoldech degradovaných po dobu 21 dnů. Statisticky významné rozdíly mezi soubory jsou označeny * ( $p \leq 0,05$ , oboustranný párový Mannův-Whitneyův U test, $n = 10$ ).....	55
Obrázek 33: Kvantil-quantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 1 hodinu v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	77
Obrázek 34: Kvantil-quantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	77

Obrázek 35: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	77
Obrázek 36: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	78
Obrázek 37: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	78
Obrázek 38: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných <i>in vivo</i> . Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.....	78
Obrázek 39: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 1 hodinu v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	78
Obrázek 40: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	79
Obrázek 41: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	79
Obrázek 42: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	79
Obrázek 43: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	79
Obrázek 44: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných <i>in vivo</i> . Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.....	80
Obrázek 45: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 1 hodinu v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	80
Obrázek 46: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	80



Obrázek 47: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	80
Obrázek 48: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	81
Obrázek 49: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	81
Obrázek 50: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných <i>in vivo</i> . Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.....	81
Obrázek 51: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 1 hodinu v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF. ....	81
Obrázek 52: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	82
Obrázek 53: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	82
Obrázek 54: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	82
Obrázek 55: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	82
Obrázek 56: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných <i>in vivo</i> . Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.....	83
Obrázek 57: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	83
Obrázek 58: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	83

Obrázek 59: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	83
Obrázek 60: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.....	84
Obrázek 61: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných <i>in vivo</i> . Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.....	84
Obrázek 62: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot míry porozity kolagenních scaffoldů. Zleva shora nedegradované scaffoldy, scaffoldy degradované ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě, <i>in vivo</i> .....	84
Obrázek 63: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot velikosti pórů kolagenních scaffoldů. Zleva shora nedegradované scaffoldy, scaffoldy degradované ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě, <i>in vivo</i> .....	85
Obrázek 64: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot plochy pásma 1660 cm <sup>-1</sup> v pásmu amidu I. Zleva shora nedegradované scaffoldy, scaffoldy degradované ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě, <i>in vivo</i> .....	85

## Seznam tabulek

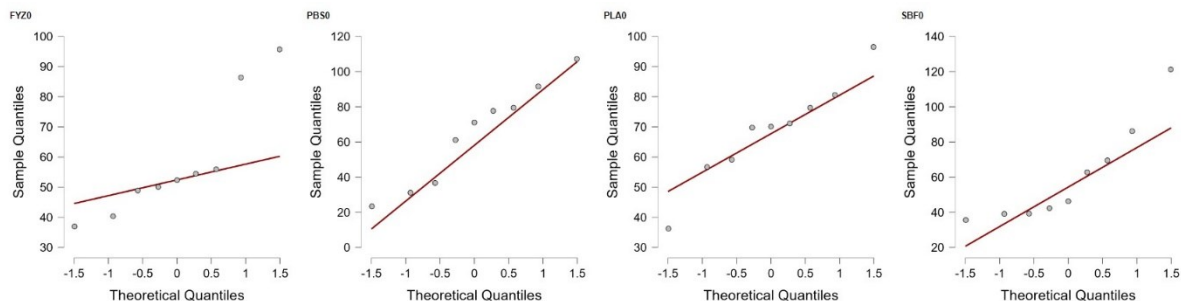
Tabulka 1: Výhody a nevýhody kolagenu jako biomateriálu [16]. .....	16
Tabulka 2: Koncentrace iontů krevní plazmy v porovnání s vybranými modifikacemi SBF [21]. .....	20
Tabulka 3: Hmotnostní úbytek a mechanické vlastnosti kolagenních scaffoldů degradovaných v SBF podle Suchého a kol. Odečteno z grafu v [14]. Záporný hmotnostní úbytek značí nárůst hmotnosti. ....	20
Tabulka 4: Hmotnostní úbytky kolagenních scaffoldů degradovaných v PBS podle Nazira a kol. Odečteno z grafu v [28]. ....	21
Tabulka 5: Hmotnostní úbytek a mechanické vlastnosti kolagenních scaffoldů degradovaných v PBS podle Suchého a kol. Odečteno z grafu v [8].....	21
Tabulka 6: Hmotnostní úbytek PLGA scaffoldů pokrytých kolagenem degradovaných v PBS podle Wu a kol. Odečteno z grafu v [29].....	21
Tabulka 7: Hmotnostní úbytek a mechanické vlastnosti kolagenních scaffoldů degradovaných v krevní plazmě podle Suchého a kol. Odečteno z grafu v [14]. Záporný hmotnostní úbytek značí nárůst hmotnosti. ....	22
Tabulka 8: Zkratky degradačních prostředí používané k označování testovaných vzorků. ....	27
Tabulka 9: Hodnocení velikosti věcného efektu v závislosti na Hedgesově $g$ [34]. ....	35
Tabulka 10: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů elastického gradientu scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).....	37
Tabulka 11: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů elastického gradientu scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).....	38
Tabulka 12: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).....	40
Tabulka 13: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).....	41
Tabulka 14: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů absorbované energie scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).....	43

Tabulka 15: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů absorbované energie scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9). .....	44
Tabulka 16: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných v simulovaných tělních prostředích a prostředí <i>in vivo</i> . Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9). .....	46
Tabulka 17: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných v SBF a krevní plazmě. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9). .....	47
Tabulka 18: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu středních hodnot míry porozity mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými po dobu 21 dnů v degradačních médiích. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).....	54
Tabulka 19: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu středních hodnot velikostí pórů mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými po dobu 21 dnů v degradačních médiích. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).....	54
Tabulka 20: Hedgesova $g$ vyjadřující velikost věcného rozdílu mediánů ploch pásma $1660\text{ cm}^{-1}$ v pásmu amidu I mezi nedegradovanými scaffoldy a scaffoldy degradovanými po dobu 21 dnů v degradačních médiích. Barevné zvýraznění buněk bylo provedeno podle stupnice z [27] (Tabulka 9).....	55

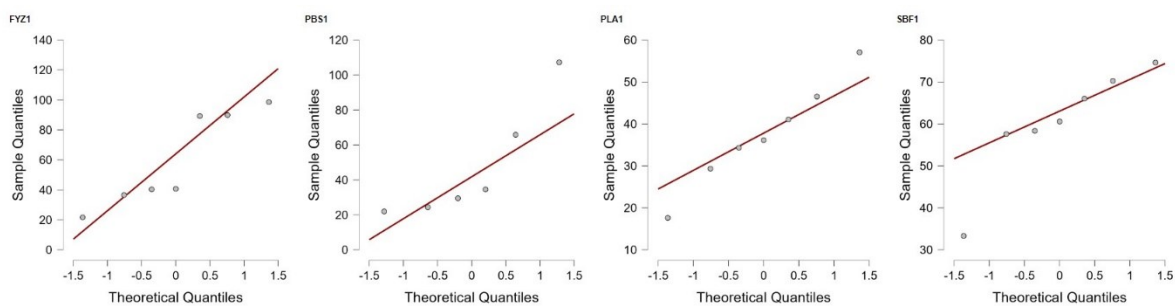
# Přílohy

## Příloha 1: Kvantil-quantilové grafy

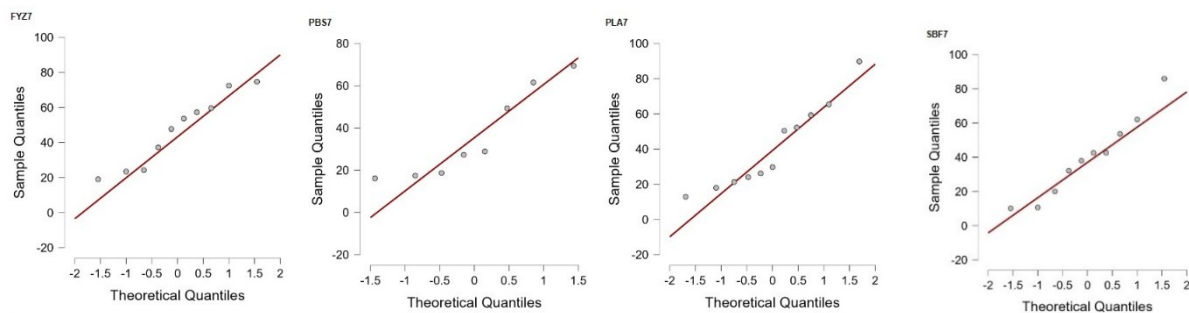
### Elastický gradient



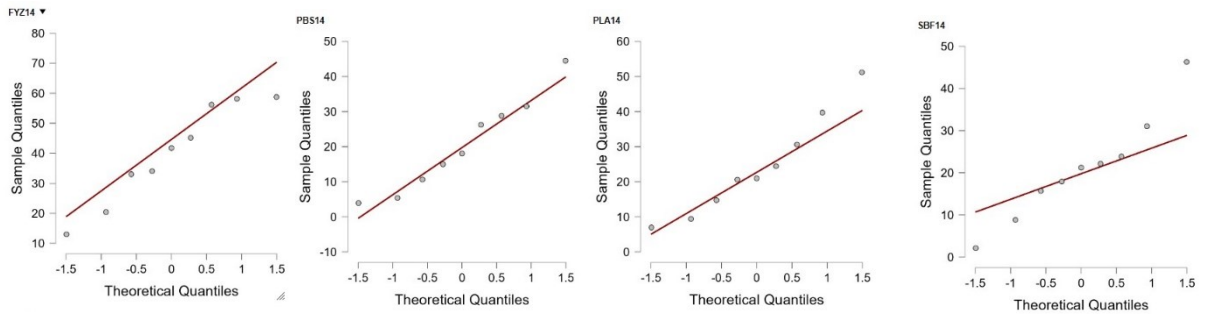
Obrázek 33: Kvantil-quantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 1 hodinu v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



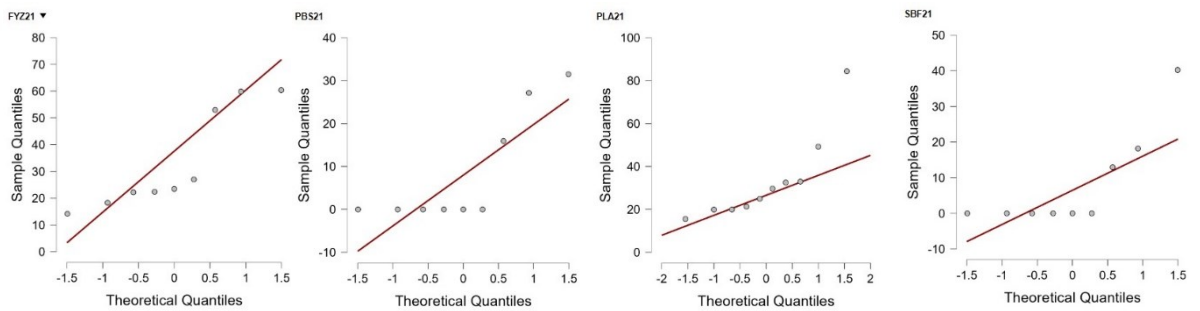
Obrázek 34: Kvantil-quantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



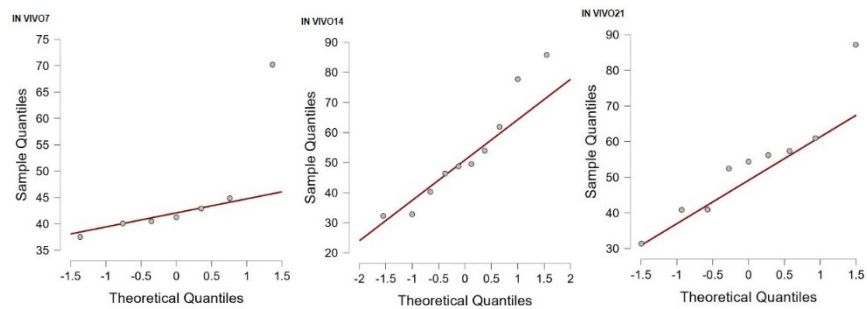
Obrázek 35: Kvantil-quantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



Obrázek 36: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

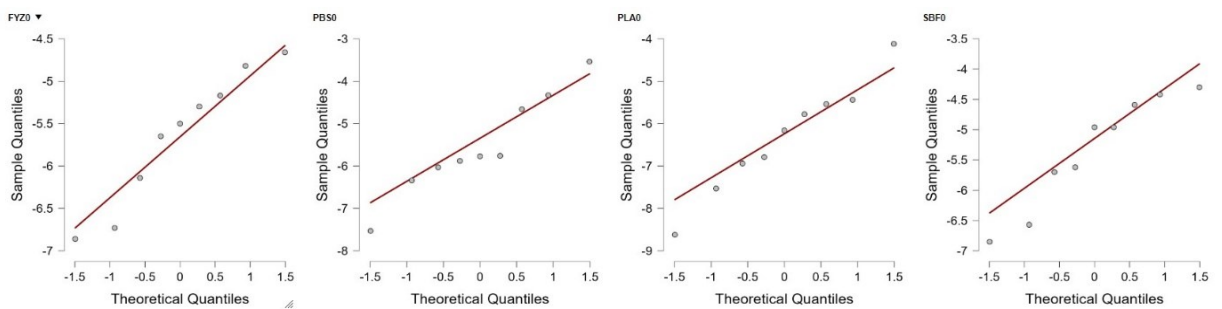


Obrázek 37: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF

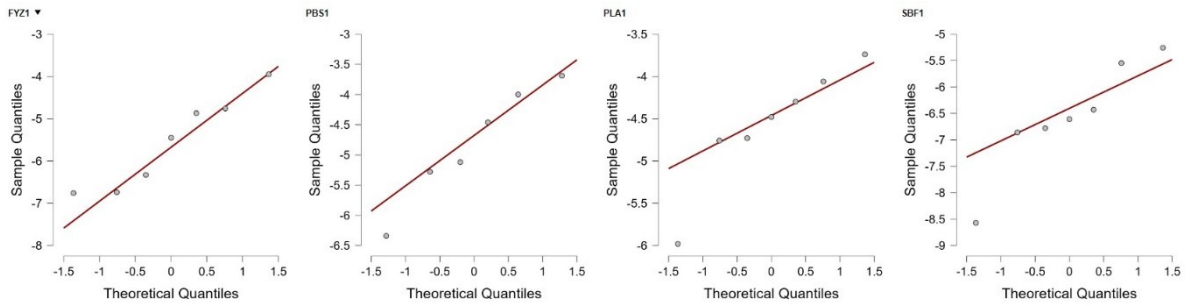


Obrázek 38: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot elastického gradientu scaffoldů degradovaných *in vivo*. Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.

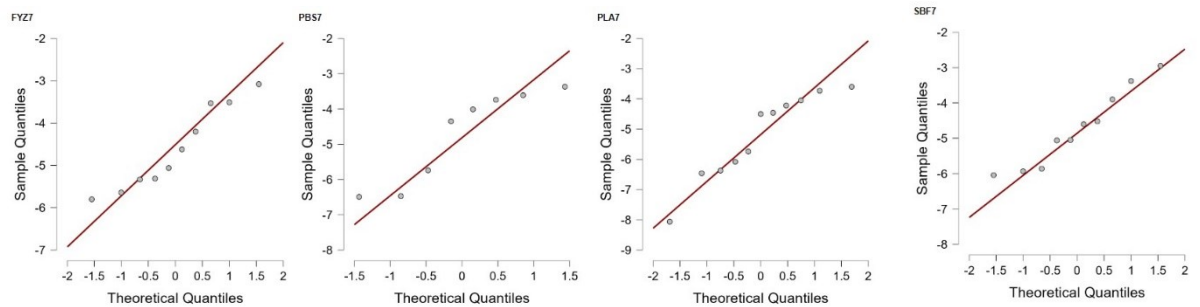
### Stabilní hladina napětí



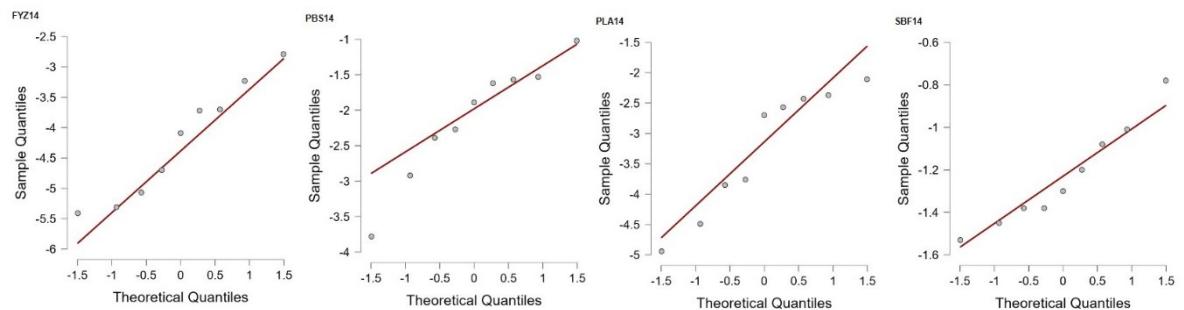
Obrázek 39: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 1 hodinu v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



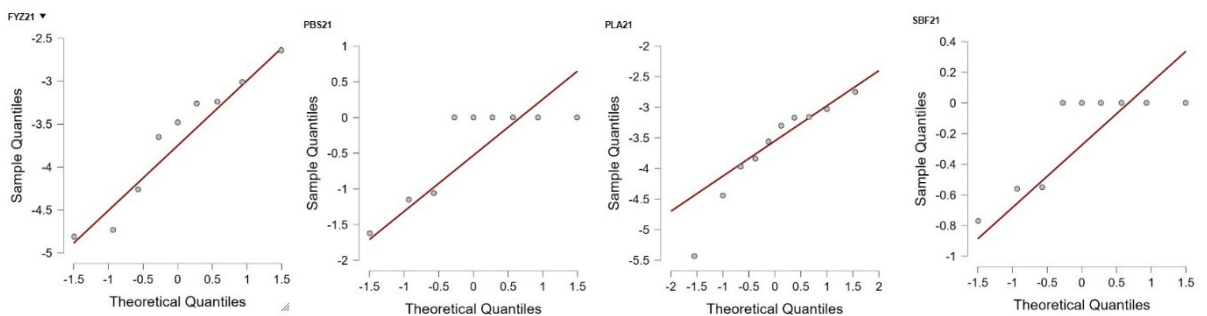
Obrázek 40: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



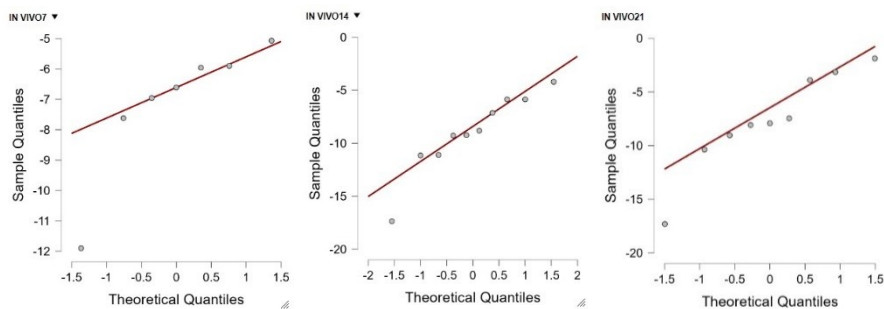
Obrázek 41: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



Obrázek 42: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

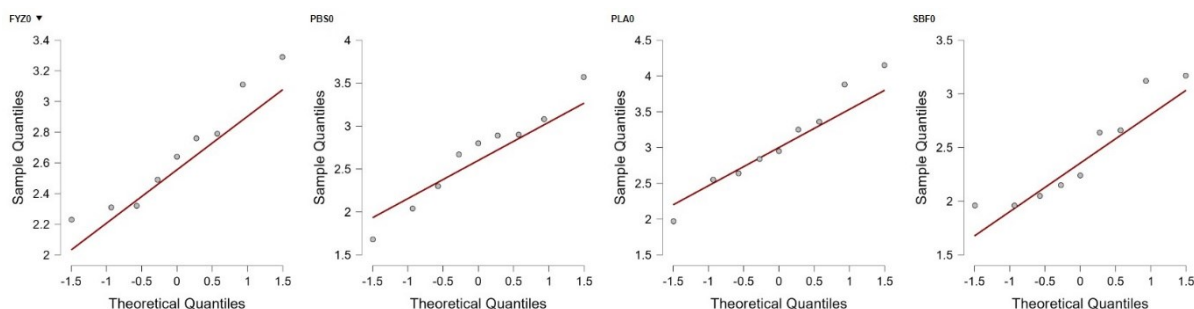


Obrázek 43: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

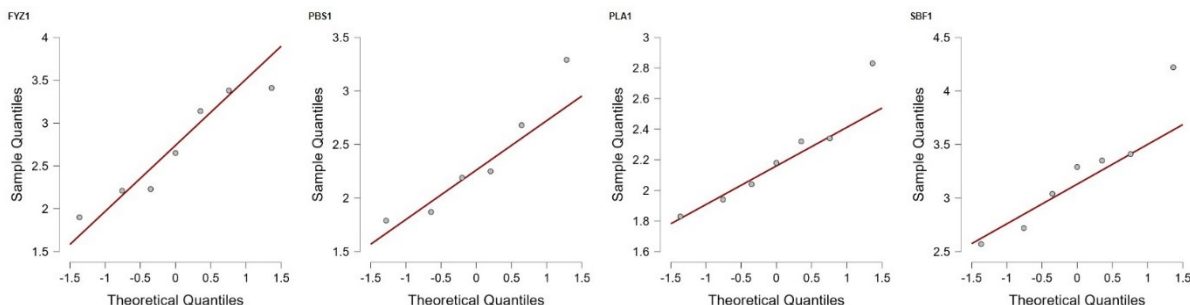


Obrázek 44: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot stabilní hladiny napětí scaffoldů degradovaných *in vivo*. Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.

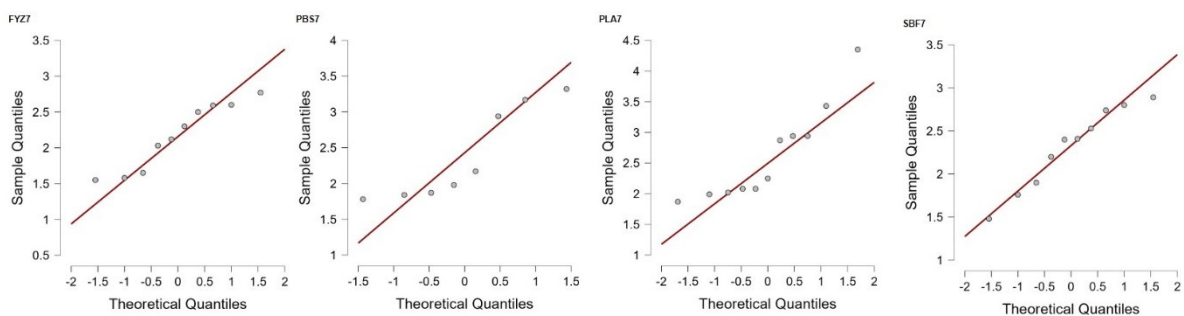
### Absorbovaná energie



Obrázek 45: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 1 hodinu v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

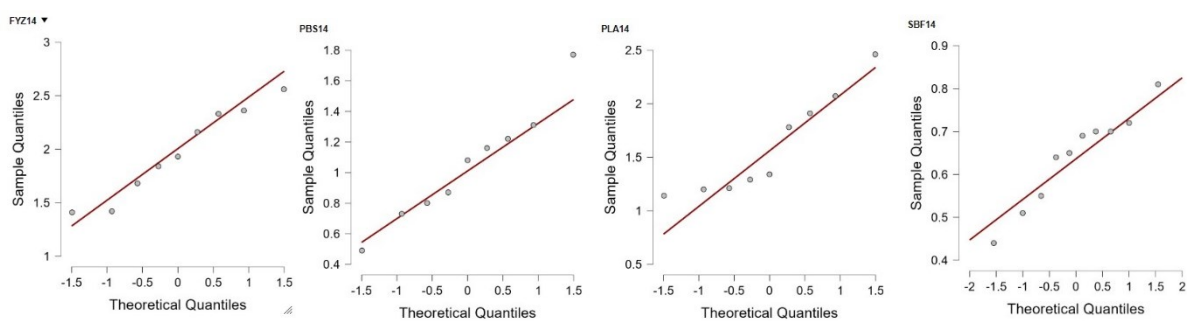


Obrázek 46: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

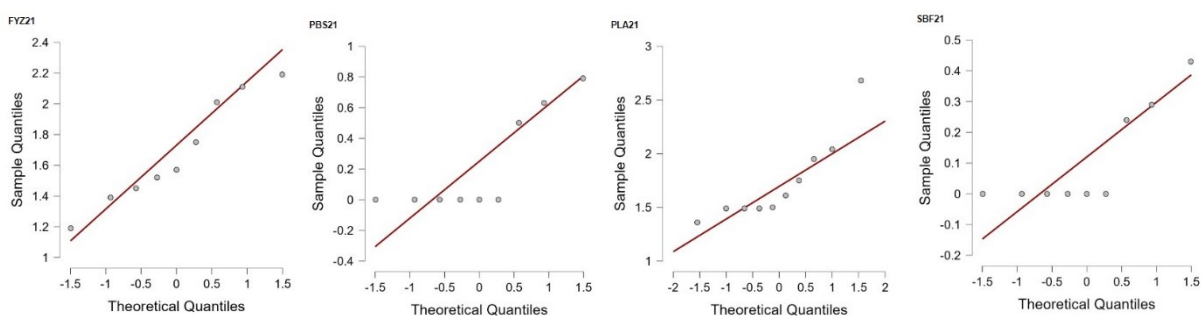


Obrázek 47: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

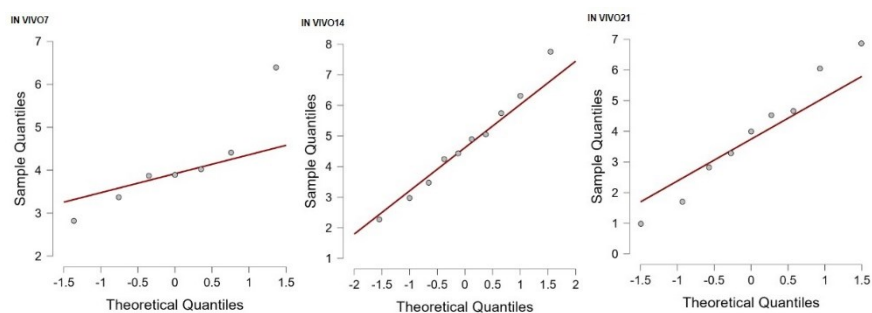




Obrázek 48: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

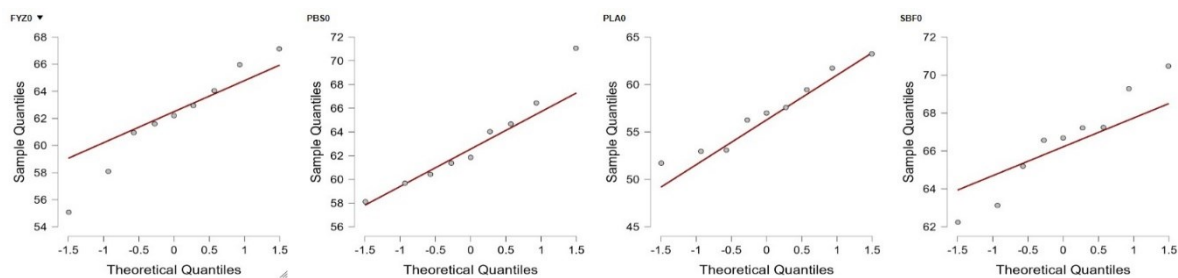


Obrázek 49: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

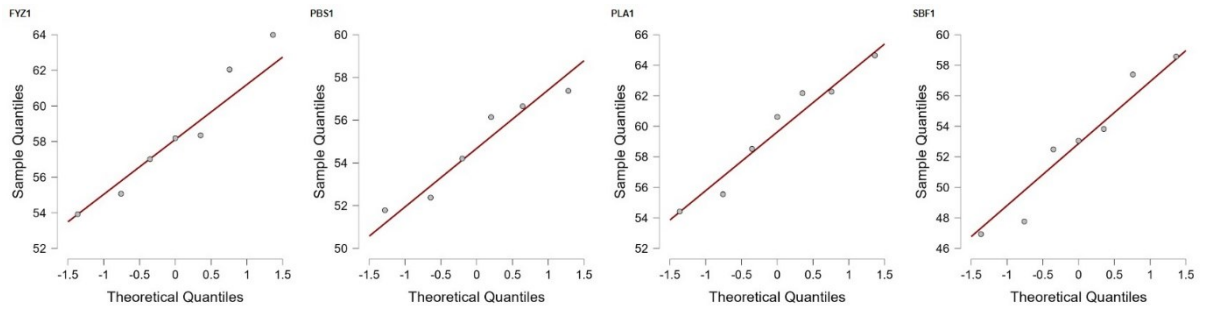


Obrázek 50: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot absorbované energie scaffoldů degradovaných *in vivo*. Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.

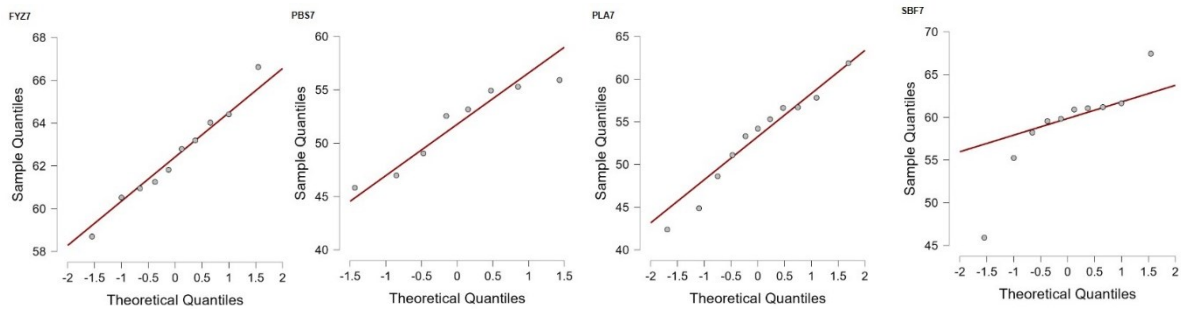
## Účinnost absorbování energie



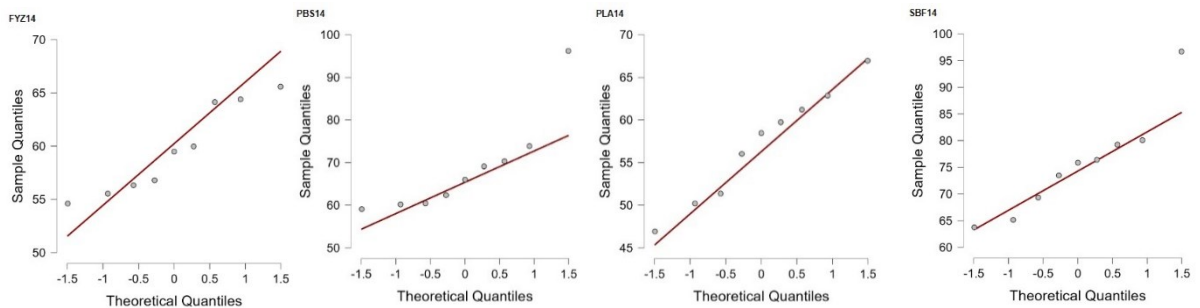
Obrázek 51: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 1 hodinu v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



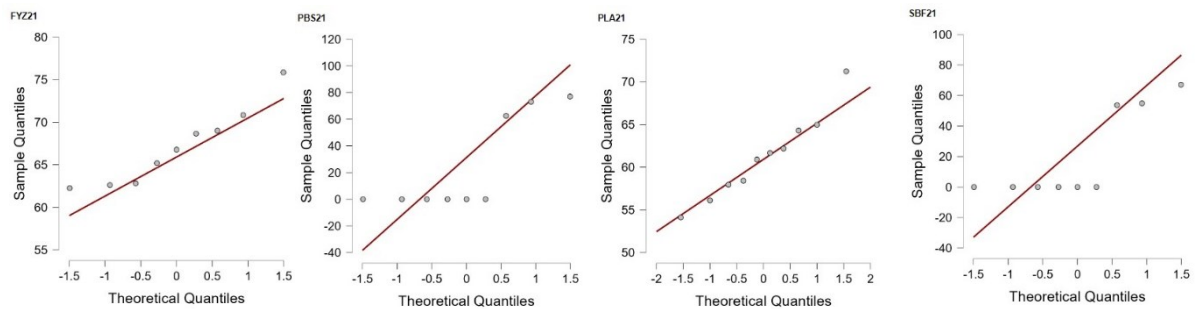
Obrázek 52: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



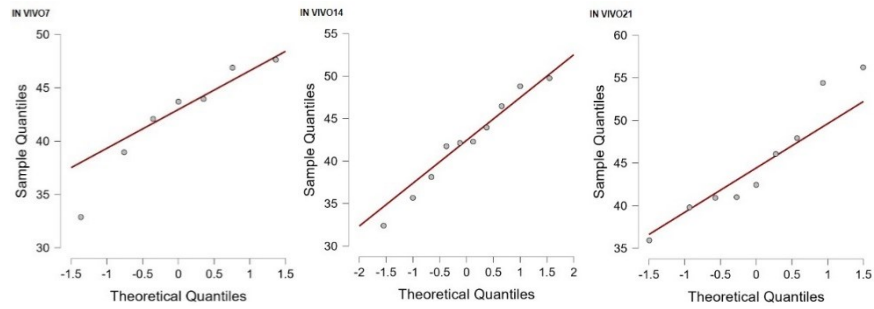
Obrázek 53: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



Obrázek 54: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

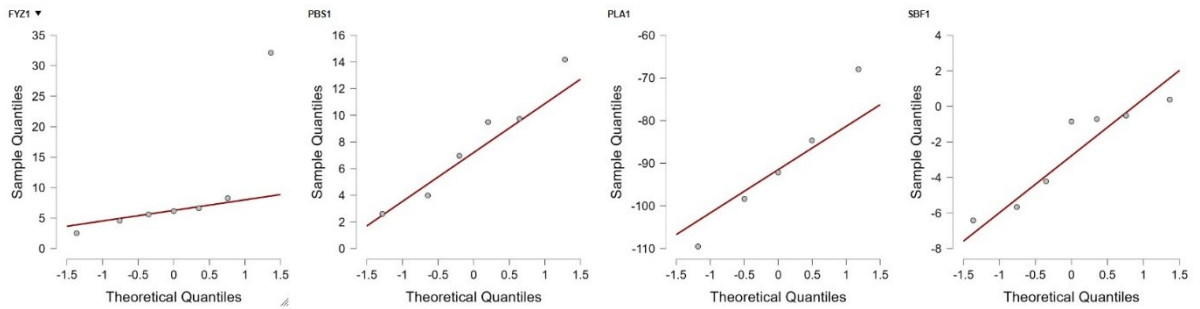


Obrázek 55: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

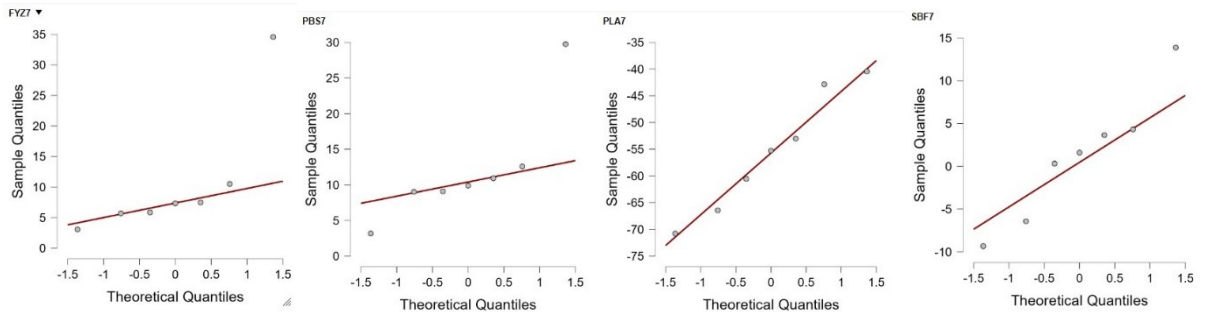


Obrázek 56: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot účinnosti absorbování energie scaffoldů degradovaných *in vivo*. Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.

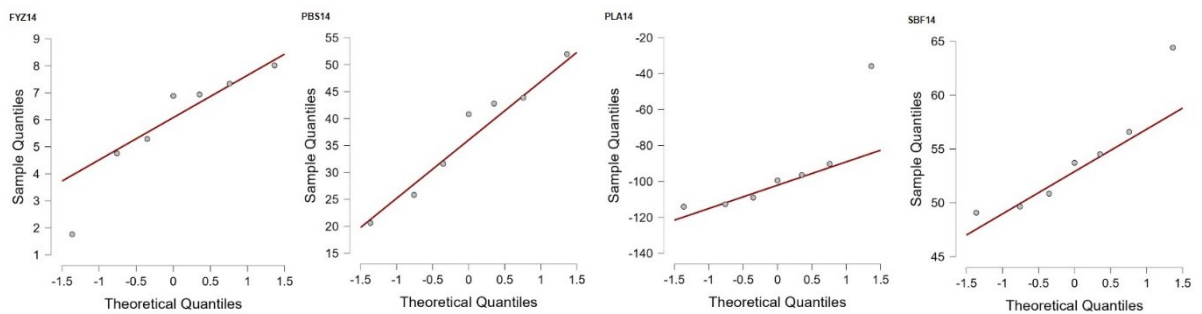
## Hmotnostní úbytky



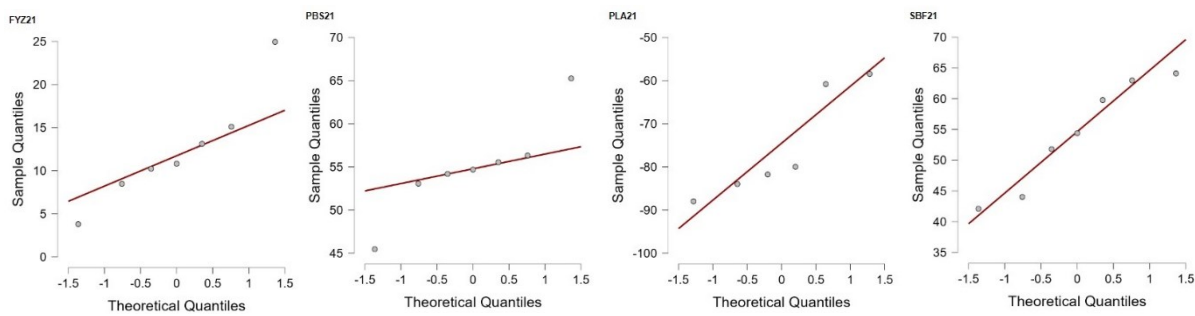
Obrázek 57: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných 1 den v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



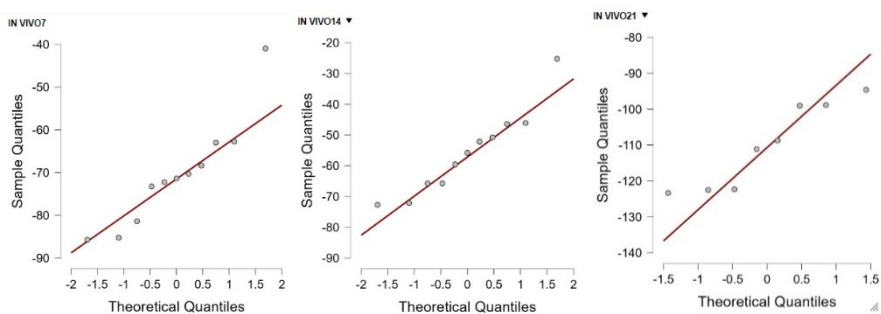
Obrázek 58: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných 7 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



Obrázek 59: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných 14 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.

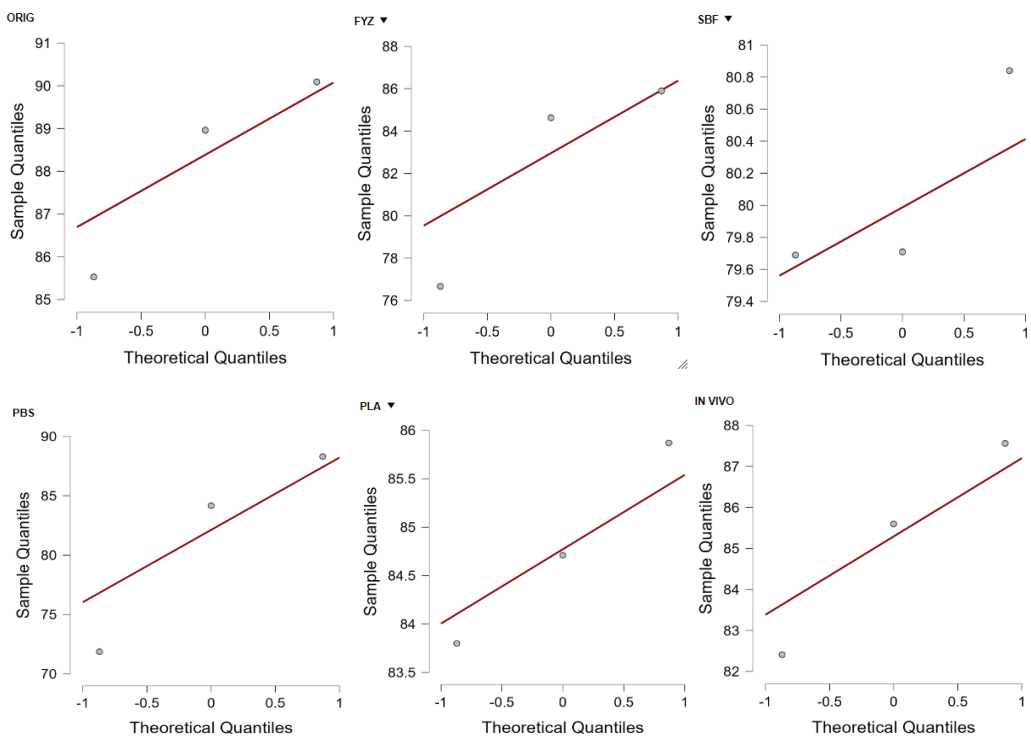


Obrázek 60: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných 21 dní v simulovaných tělních prostředích. Zleva fyziologický roztok, PBS, plazma, SBF.



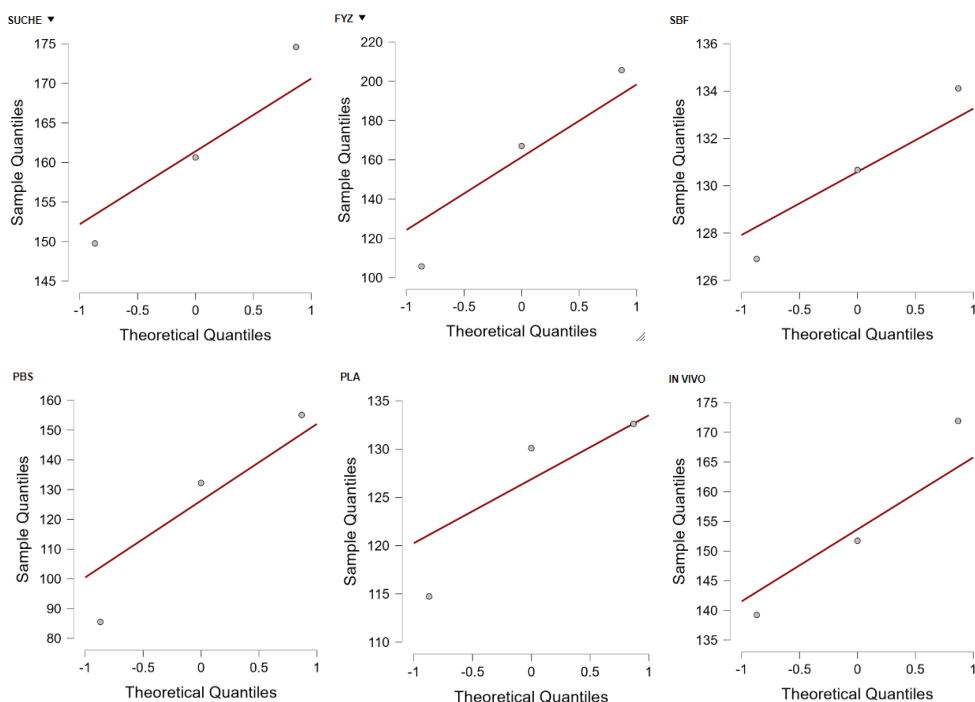
Obrázek 61: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot hmotnostních úbytků scaffoldů degradovaných *in vivo*. Zleva 7 dní, 14 dní, 21 dní.

## Míra porozity



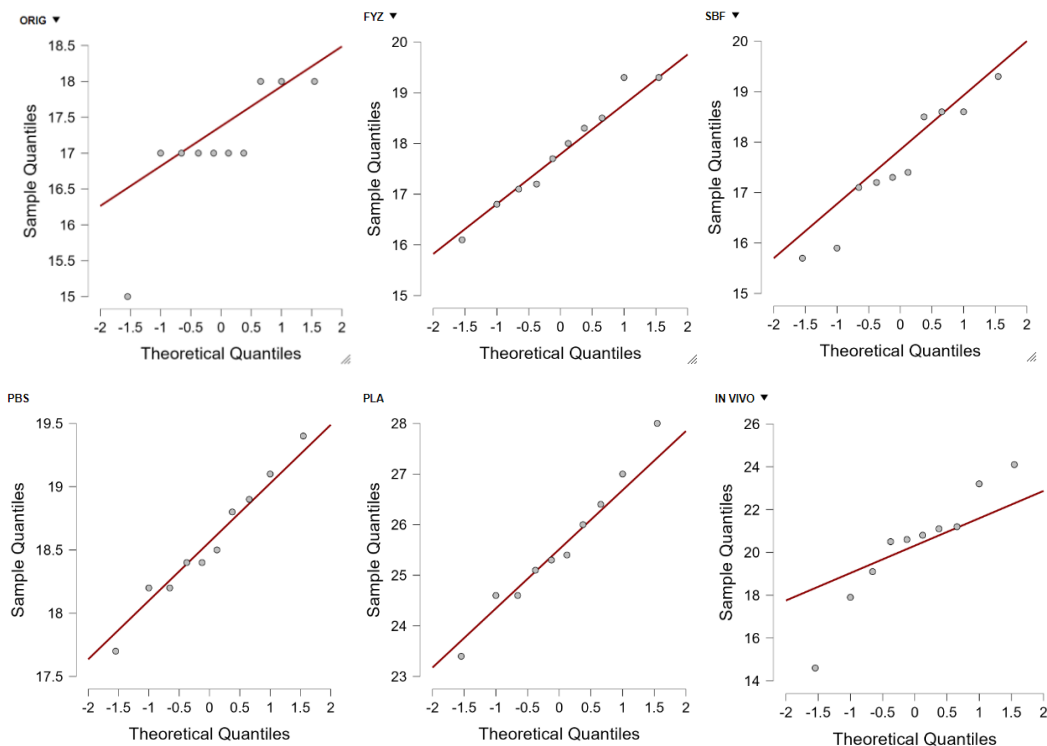
Obrázek 62: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot míry porozity kolagenních scaffoldů. Zleva shora nedegradované scaffoldy, scaffoldy degradované ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě, *in vivo*.

## Velikost pórů



Obrázek 63: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot velikosti pórů kolagenních scaffoldů. Zleva shora nedegradované scaffoldy, scaffoldy degradované ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě, *in vivo*.

## Plocha pásma $1660\text{ cm}^{-1}$ v pásmu amidu I



Obrázek 64: Kvantil-kvantilové grafy naměřených hodnot plochy pásma  $1660\text{ cm}^{-1}$  v pásmu amidu I. Zleva shora nedegradované scaffoldy, scaffoldy degradované ve fyziologickém roztoku, SBF, PBS, plazmě, *in vivo*.