



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta strojní

Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Petr Zvolánek

Praha 2017

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Zvolánek** Jméno: **Petr** Osobní číslo: **423337**
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**
Studijní program: **Teoretický základ strojního inženýrství**
Studijní obor: **bez oboru**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Vliv sterilizace na mechanické a strukturální vlastnosti nanostrukturované vrstvy kolagen-hydroxyapatit

Název bakalářské práce anglicky:

Effect of sterilization on mechanical and structural properties of nano-structured collagen-hydroxyapatite layer

Pokyny pro vypracování:

- (1) Zformulujte motivaci ke studiu kompozitních vrstev na bázi kolagenu a kalcium-fosfátu (Coll-Ca-P)
 - (2) Popište způsob přípravy vzorků Coll-Ca-P
 - (3) Experimentálně ověřte vliv sterilizace na strukturální a mechanické vlastnosti Coll-Ca-P vrstev
- Očekávaný rozsah: cca 35 stran textu a 15 stran grafických prezentací

Seznam doporučené literatury:

- [1] Fratzi P. (2008) Collagen: Structure and Mechanics. Springer
- [2] Fratzi P., Weinkamer R. (2007) Nature's hierarchical materials. Progress in Materials Science, 52:1263-1334.
- [3] Buttafoco L., a kol. (2006) Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. Biomaterials, 27:724-734.
- [4] Suchý a kol. (2016) The Sustainable Release of Vancomycin and Its Degradation Products From Nanostructured Collagen/Hydroxyapatite Composite Layers. J Pharm Sci 105:128871294

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. Ing. Lukáš Horný Ph.D., ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky FS

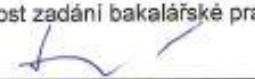
Jméno a pracoviště druhého(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:


Ing. Tomáš Suchý Ph.D., ústav mechaniky, biomech.a mechatr. FS

Datum zadání bakalářské práce: **28.04.2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **18.08.2017**

Platnost zadání bakalářské práce:


Podpis vedoucí(ho) práce


Podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry


Podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

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

22.05.2017

Datum převzetí zadání



Podpis studenta

Anotační list

Jméno autora:	Petr ZVOLÁNEK
Název bakalářské práce:	Vliv sterilizace na mechanické a strukturální vlastnosti nanostrukturované vrstvy kolagen-hydroxyapatit
Anglický název:	Effect of sterilization on mechanical and structural properties of nano-structured collagen-hydroxyapatite layer
Akademický rok:	2016/2017
Ústav:	Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky
Vedoucí bakalářské práce:	doc. Ing. Lukáš Horný Ph.D.
Konzultant bakalářské práce:	Ing. Tomáš Suchý Ph.D.
Bibliografické údaje:	počet stran: 33 počet obrázků: 10 počet tabulek: 6 počet grafů: 6

Klíčová slova:

Kolagen, hydroxyapatit, nanostrukturovaná vrstva, sterilizace, mechanické vlastnosti

Keywords:

Collagen, hydroxyapatite, nano-structured layer, sterilization, mechanical properties

Anotace:

Tato bakalářská práce se zabývá možným vlivem sterilizace na mechanické a strukturální vlastnosti materiálu na bázi kolagenu. Pro ověření informací dohledatelných v odborné literatuře je součástí práce i prezentace jednoosých tahových zkoušek.

Abstract:

This bachelors thesis analyzes possible influence of sterilization on mechanical and structural properties of collagen based material. To verify information found in technical literature, presentation of uniaxial tensile test is included.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pouze za odborného vedení vedoucího práce. Veškeré zdroje informací, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Praze dne.....

Podpis:.....

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce, doc. Ing. Lukáši Hornému, Ph.D., za trpělivost, vedení a za pomoc při zpracování.

Dále bych rád poděkoval mé rodině za obrovskou trpělivost během celého mého studia.

1	Obsah	
1	OBSAH	6
2	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	7
3	ÚVOD	8
3.1	CÍLE PRÁCE	8
4	NANOSTRUKTUROVANÁ VRSTVA KOLAGEN – HYDROXYAPATIT	9
4.1	KOLAGEN	9
4.1.1	<i>Struktura molekuly kolagenu</i>	10
4.1.2	<i>Makromolekulární struktura kolagenu</i>	11
4.1.3	<i>Metody kontrolované tvorby cross-linků</i>	13
4.2	HYDROXYAPATIT	14
4.2.1	<i>Vliv množství hydroxyapatitu na mechanické vlastnosti materiálu kolagen-HA</i>	15
4.3	POSTUP PŘÍPRAVY VZORKŮ VRSTVY KOLAGEN – HYDROXYAPATIT	16
4.3.1	<i>Rozpuštění kolagenu</i>	16
4.3.2	<i>Elektrostatické zvlákňování</i>	17
4.3.3	<i>Sterilizace</i>	18
4.3.4	<i>Možný vliv sterilizačních metod na vrstvu kolagen-hydroxyapatit</i> 20	
5	MĚŘENÍ MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ VZORKŮ KOLAGEN – HYDROXYAPATIT	22
5.1	ZKUŠEBNÍ STROJ	22
5.2	POSTUP MĚŘENÍ.....	22
5.3	POSTUP ZPRACOVÁNÍ DAT.....	23
5.4	VÝSLEDKY MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ DAT	24
5.5	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	27
6	ZÁVĚR	30
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ	31
8	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	33

2 Seznam použitých symbolů a zkratek

A	[mm ²]	plocha průřezu nezatíženého vzorku
ε	[-]	deformace
E	[N/mm ²]	smluvní modul pružnosti
F	[N]	osová síla působící na zkoušený vzorek
l_{0i}	[mm]	délka nezatíženého vzorku (i-té měření)
l_0	[mm]	průměrná délka nezatíženého vzorku
Δl	[mm]	změna délky vzorku během zatěžování
σ	[N/mm ²]	smluvní napětí
t_i	[mm]	tloušťka nezatíženého vzorku (i-té měření)
t	[mm]	průměrná tloušťka nezatíženého vzorku
w_i	[mm]	šířka nezatíženého vzorku (i-té měření)
w	[mm]	průměrná šířka nezatíženého vzorku
α		hladina významnosti

3 Úvod

Pokud je kloub člověka poškozen zánětem, těžkou artrózou, nebo třeba úrazem, je občas potřeba nahradit vlastní kloub umělým. Během a po provedení takového zákroku se může objevit řada komplikací, ale jednou z těch nejzávažnějších je výskyt infekce v místě aplikované kloubní náhrady. Aby se takovéto komplikaci předešlo, jsou již před operací pacientovi podávána antibiotika, ale vyskytují se případy, ve kterých se infekce přeci jen objeví a v takovémto případě je nutná další operace. Během této operace se endoprotéza musí vyjmout a je nahrazena speciální plombou s antibiotiky. Následuje léčba zánětu, která může trvat i 6 týdnů. V této době je pacient velmi omezován, ale novou náhradu nelze zavést, dokud není zánět kompletně vyléčen.

Právě takovéto komplikace byly motivací k vývoji technologie povlakování kloubních náhrad vrstvami na bázi kolagenu a hydroxyapatitu. Tyto vrstvy by samy o sobě zlepšily biokompatibilitu mezi kostí a náhradou, ale dále by bylo možné do nich chemicky vázat antibiotika, která by se postupně uvolňovala přímo do místa styku náhrady s kostí a dokázala by infekci zabránit daleko efektivněji. Vývojem právě takovýchto vrstev se v roce 2014 začalo zabývat oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů z Ústavu struktury a mechaniky hornin Akademie věd České republiky v.v.i. ve spolupráci s firmou ProSpon, spol. s.r.o. a Ústavem mechaniky, biomechaniky a mechatroniky z Fakulty strojní Českého vysokého učení technického v Praze.

3.1 Cíle práce

Jako cíle této práce bylo stanoveno:

1. Zformulovat motivaci ke studiu a vývoji vrstev na bázi kolagenu a hydroxyapatitu.
2. Popsat postup přípravy vzorků kolagen-hydroxyapatit
3. Pomocí jednoosé tahové zkoušky experimentálně ověřit vliv sterilizace na mechanické vlastnosti této vrstvy a výsledky experimentu statisticky zhodnotit a porovnat s výsledky dostupnými v literatuře.

4 Nanostrukturovaná vrstva kolagen – hydroxyapatit

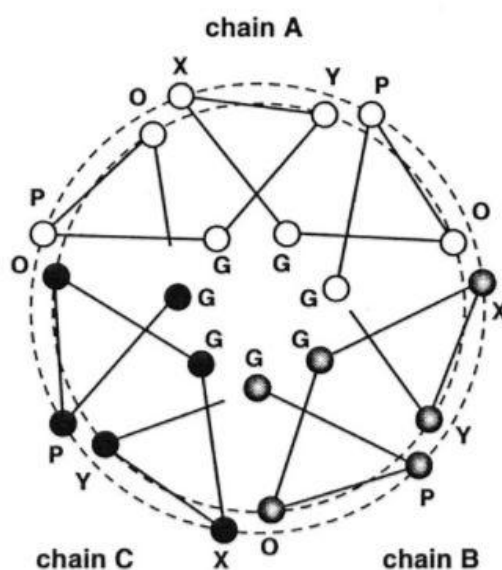
V současné době je ve vývoji a vyvinuto již mnoho druhů materiálů, které by mohly sloužit v oblasti povrchových úprav kloubních implantátů, nebo jako náhrada kostních štěpů podporujících regeneraci kostí. Jako nejslibnější se ukazují kompozity ve složení polymer-keramika, protože polymerní složka dává kompozitu flexibilitu a resorbovatelnost, kdežto keramická složka zajišťuje mechanickou pevnost a osteokonduktivitu. Roli polymeru v těchto kompozitech zastává kolagen, gelatin nebo třeba chitosan. Keramickou složkou bývá nejčastěji hydroxyapatit, ale je možné jej nahradit třeba bioaktivním sklem. Materiál na bázi kolagenu a hydroxyapatitu má nespornou výhodu v tom, že tyto dvě složky jsou zároveň dvěma základními složkami kosti, takže vyniká svou biokompatibilitou. [1]

4.1 Kolagen

Kolagen je nejrozšířenější bílkovinou nejen v lidském těle, ale i v tělech všech ostatních savců. Celkově představuje 25-30% všech bílkovin v těle. Slouží jako mechanická podpora v mezibuněčné hmotě v podstatě všude, kde jsou vyžadovány nějaké mechanické vlastnosti. V lidském těle je známo již 28 druhů kolagenu, ale stále je možné, že se objeví další. Jednotlivé druhy kolagenů se od sebe odlišují jak složením, tak i strukturou. Druhy kolagenu je možné dále rozřadit na fibrilární a nefibrilární. Ve fibrilárním kolagenu se nacházejí jednotlivé molekuly uspořádané dle určitého vzorce (blíže popsáno v kapitole 4.1.2) a jsou vzájemně propojeny. Mezi fibrilární druhy kolagenu patří ty nejhojněji zastoupené a to například: kolagen I nacházející se v kůži, kostech, vazivu a cévách; kolagen II, který je jednou z hlavních součástí chrupavek nebo třeba kolagen III, nacházející se v kůži a cévách. Kolageny typu I, II a III dohromady tvoří 80-90% kolagenu obsaženého v lidském těle. Nefibrilární kolageny jsou obecně méně časté, ale některé druhy také plní nepostradatelné funkce. Například kolageny typů IV a VII jsou nedílnou součástí bazálních membrán. [2]

4.1.1 Struktura molekuly kolagenu

Každá molekula kolagenu se skládá ze tří polypeptidických α -řetězců. Ty mohou být v jedné molekule všechny stejné, dva stejné a jeden odlišný nebo všechny různé. Tři stejné α -řetězce se nacházejí například v molekulách kolagenů typů II a III. Kolagen typu I se skládá z 2 identických a jednoho rozlišného řetězce. Řetězce se zpravidla skládají z opakujících se segmentů – tripeptidů, z nichž jeden je vždy glycin. Dva zbylé peptidy se liší dle druhu kolagenu. Tripeptidy se značí $(\text{Gly-X-Y})_n$, kde n označuje počet opakování tripeptidu v jednom řetězci a pohybuje se od 337 do 343, také v závislosti na druhu kolagenu. Charakteristickým znakem molekul kolagenu je pravotočivá trojšroubovice, do které se α -řetězce stáčíjí, tak, aby molekula glycinu byla orientovaná doprostřed šroubovice. Šroubovice je z obou stran ohraničena oblastí, která zůstává nestočena, skládá se z přibližně 20 aminokyselin a označuje se jako N-koncová skupina nebo C-koncová skupina. Jedna molekula kolagenu měří na délku přibližně 300nm a má průměr 1,5nm. [2]

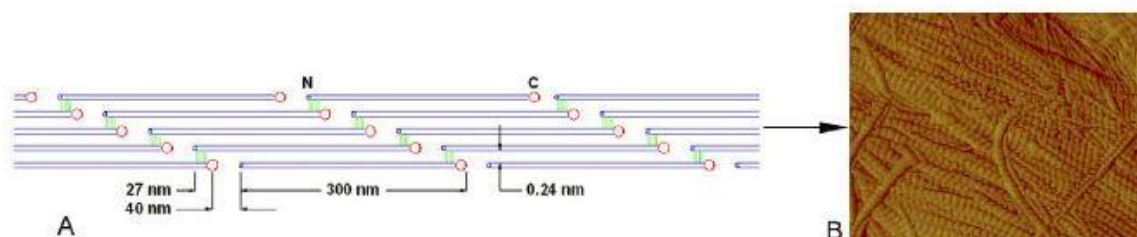


Obr. 2: Schéma trojšroubovice kolagenu. [3]

Obr. 1: Schéma struktury molekuly kolagenu. [4]

4.1.2 Makromolekulární struktura kolagenu

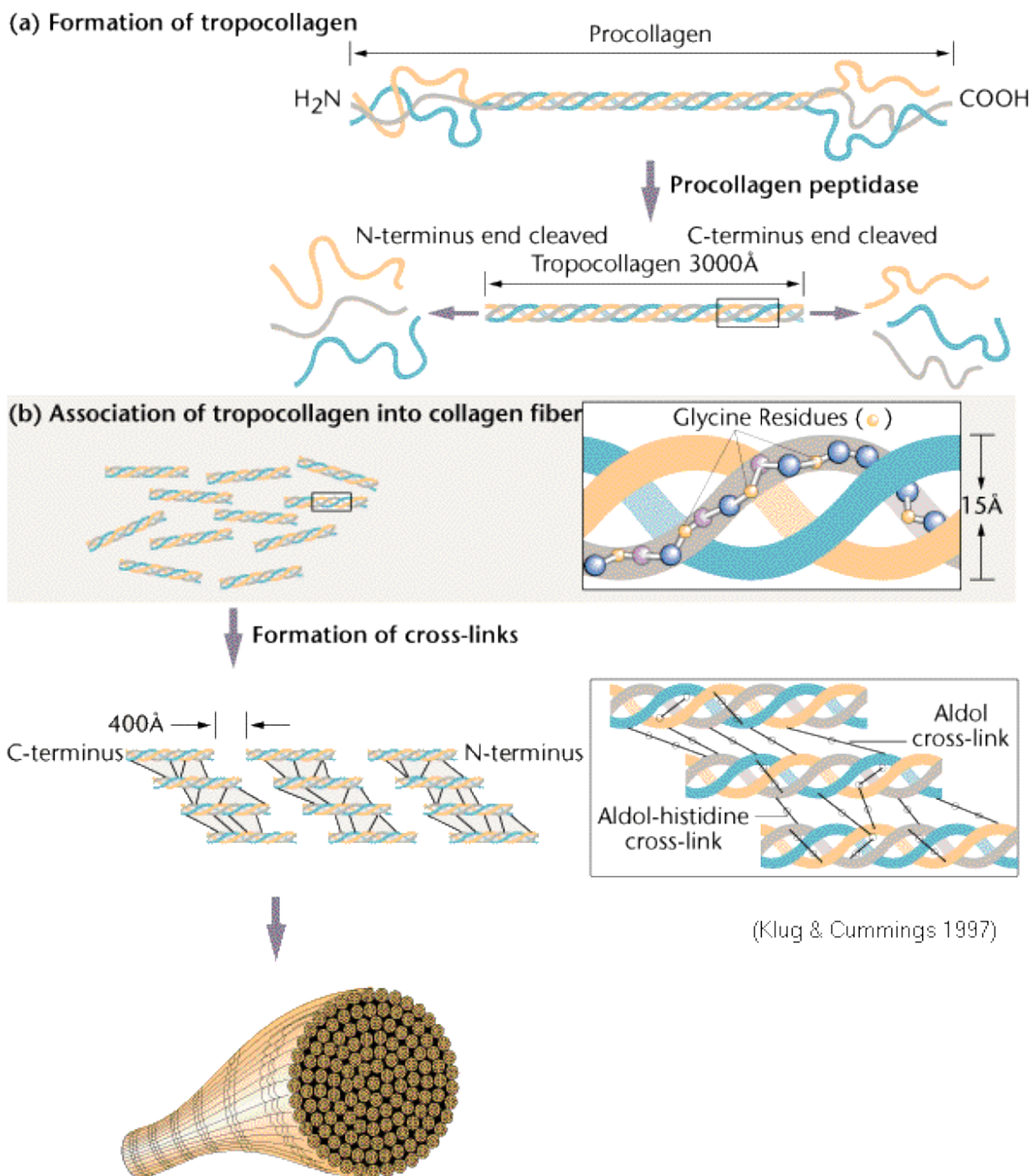
To co dodává kolagenu jeho unikátní mechanické vlastnosti, je právě schopnost jeho molekul se organizovat na makromolekulární úrovni do komplikovaných struktur a navzájem se propojovat pomocí kovalentních vazeb (cross-linků). Nejčastěji se jedná o tzv. fibrily, které se mohou dále organizovat do vláken nebo ploch. Základní způsob vzniku fibril spočívá v tom, že sousedící molekuly kolagenu leží navzájem mírně podélně posunuty tak, aby se navzájem překrývaly. Za přítomnosti enzymu lysyl oxidázy pak oxidační deaminací ϵ -amino skupiny lysinu, nacházejícího se v koncové skupině jedné z molekul vzniká lysin-aldehyd. Ten následně reaguje s ϵ -amino skupinou hydroxylysinu, nacházejícího se v trojšroubovici protější molekuly za vzniku intermolekulárního cross-linku. Právě toto uspořádání molekul ve fibrile, kdy se střídají oblasti překrývajících se molekul s mezerami, zapříčiňuje vznik pruhů, viditelných za pomoci mikroskopie atomárních sil. [2]



Obr. 3: Uspořádání fibril způsobující příčné pruhování viditelné pomocí mikroskopie atomárních sil. [5]

I když jsou enzymatické cross-linky na bázi lysyl oxidázy nejčastější, zdaleka nejsou jediné, které se u kolagenu dají nalézt. V kůži se ve velkém množství vyskytuje trojitý cross-link vzniklý reakcí dehydro-hydrolysinonorleucinu za vzniku histidino-hydroxylysinonorleucinu. Překvapivě se vyskytuje v kůži pouze některých savců, ale v kůži například myši a krys nalezen nebyl. Nalezen tam byl dosud neidentifikovaný cross-link. V kostech, šlachách a chrupavkách se běžně vyskytují cross-linky tvořené hydroxylysyl-pyridinolinem nebo pyrrolem. Přesný způsob tvorby těchto spojení nebyl ještě objasněn. Některé zdroje uvádějí, že se také jedná o trojitý cross-link, jiné, že jde o běžný dvojitý. Současně se však přišlo i na skutečnost, že více než polovina trojitých cross-linků v kostech není založena na pyridinolinu ani na pyrrolu, což značí, že se jedná o další doposud neznámý cross-link. [2]

Dalšími velice častými cross-linky v kostech jsou ty vzniklé za přítomnosti keto-aminu. Ty vznikají reakcí hydroxylysin-aldehydu z koncové části molekuly s ϵ -amino skupinou hydroxylysinu v trojitě šroubovici. Spojení se pak spontánně přeorganizuje na hydroxylysin-keto-norleucin. Výhodou tohoto spojení je jeho odolnost proti kyselému prostředí a teple, kterou předává i celé kosti. Pokud je cílovou skupinou reakce v trojšroubovici lysin, vzniká podobnou reakcí lysino-keto-norleucin s obdobnými vlastnostmi. [2]

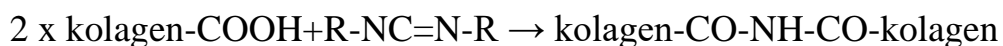


Obr. 4: Struktura kolagenu od molekuly po vlákno.
Dostupné z: https://www.mun.ca/biology/scarr/Collagen_structure.html

4.1.3 Metody kontrolované tvorby cross-linků

Se zvyšující se mírou využívání kolagenu nejprve v kožedělném průmyslu a následně v medicíně a kosmetice se zvyšovala potřeba mít kontrolu nad jeho vlastnosti. Zdokonalením chemického cross-linkování se brzy zvládla manipulace jeho mechanických vlastností, odolnosti vůči různým typům prostředí a imunogenicita. [2]

Velice používaným síťovadlem pro tvorbu cross-linků byl glutaraldehyd, který vykazoval velice stabilní výsledky ve zlepšování fyzikálních vlastností kolagenu. Formoval polymerní komplexy, které vytvářely vazby mezi lysiny jednotlivých molekul. Jeho využití však začalo být kvůli možným cytotoxickým vlastnostem zpochybňováno a postupně se nahradil jinými možnostmi. Jako jednou z možných náhrad se jeví karboiimidy a acyl azidy, které reagují s karboxylovými skupinami za tvorby vazeb, ze kterých se nakonec sami vyloučí. Zjednodušeně se dá reakce této vazby zapsat vzorcem:



Ethyl-3(3dimethylamino)propyl karboiimide (EDC) je jedním ze zástupců karboiimidů a používá se často v kombinaci s N-hydroxysukcinimidem (NHS), který dále zintenzivňuje proces zesíťování. Acyl azidy reagují jak s karboxylovými, tak s ϵ -aminovými skupinami, což zapříčiňuje vysokou intenzitu zesíťování výsledného produktu. [2]

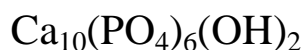
Další z možností, jak docílit zesíťování kolagenu, je použití genipinu. Jedná se o látku pocházející z čínské tradiční medicíny, u které byl objeven velký síťovací potenciál. Přesný průběh reakcí vedoucí ke vznikům cross-linků stále nebyl objasněn, ale za pomoci chromatografu byl objeven přibližně 90% úbytek lysinových a hydroxylysinových zbytků, což by naznačovalo průběh reakce podobný průběhu reakce vazeb vzniklých pomocí lysyl-oxidázy. Při zkoumání vlivu koncentrace genipinu (0,01%; 0,1% a 0,5%) a době, po kterou reakce probíhaly (30min – 24h), se zjistilo, že i když má vzrůstající koncentrace genipinu za následek více cross-linků, hlavním aspektem je právě čas. [6]

Látkou, která svou schopností síťovat kolagen dokonce předčila původně používaný glutaraldehyd, je kyselina nordihydroguaiaretiková. Při testování na kolagenu ze srdeční chlopně konstantně vykazovala vysokou míru zesíťování a cytokompability. Současně má mnoho dalších vhodných biologických vlastností. Působí jako antioxidant, ničí volné radikály a působí protizánětlivě. [7]

Efektu zesíťování lze docílit i jinými procesy než čistě chemickými. Bylo prokázáno, že rentgenové záření a γ -záření se projevuje na kolagenu dvěma možnými výsledky. Pokud je záření vystaven suchý kolagen, následuje rozpad peptidických vazeb a celá struktura degraduje. Pokud je však cílem dostatečně hydratovaný kolagen, je výsledkem převážně vznik intermolekulárních cross-linků. Kompletní podstata těchto vazeb není známa, ale má se za to, že jsou způsobeny volnými radikály rozptýlenými ve vodě. Vliv na strukturu byl prokázán i u UV záření, tam ale záleží na mnoha různých faktorech, které ovlivňují výsledek. Jedná se například o pH prostředí, přítomnost kyslíku, typu kolagenu a vlnové délce záření. Výslednými efekty může být jak vytvoření cross-linků, tak částečná denaturace až úplný rozpad trojitě šroubovice, kdy kolagen přechází do stavu gelu. [2]

4.2 Hydroxyapatit

Hydroxyapatit, také známý jako kalcium-fosfát, je jednou z hlavních složek kostí a dodává jim tuhost. Jeho krystaly mají tvar jehlic o délce 40-60 nm, šířce asi 20 nm a tloušťce 1,5 - 4 nm. Chemický vzorec hydroxyapatitu je:

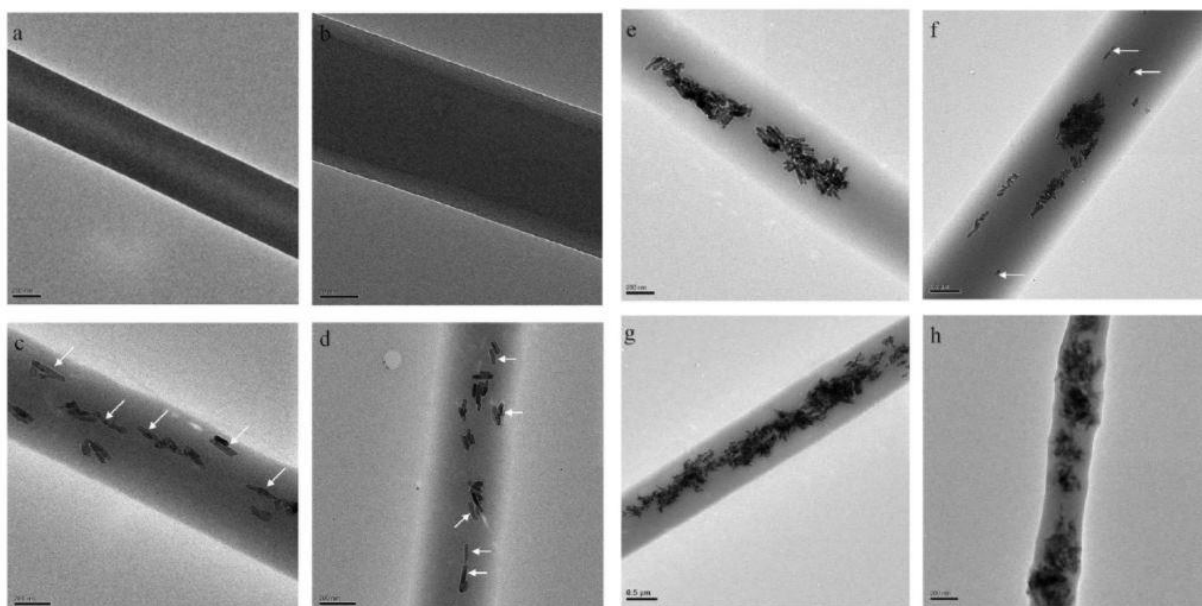


Jednou z důležitých oblastí, kde se dá využít hydroxyapatit a porézní keramiky z něj vytvořené je, vývoj materiálů sloužících jako nosiče léčiv. Hlavní problém s těmito materiály je potřeba, aby léčivou látku uvolňovaly postupně po požadovanou dobu. Často se stávalo, že léčivo bylo uvolněno lavinově již na počátku experimentu, což by mohlo způsobit otravu organismu. Avšak bylo zjištěno, že keramiky na bázi hydroxyapatitu

by byly schopny léčivo uvolňovat po dobu blížící se až jednomu roku v přibližně konstantním množství. Je tomu tak hlavně díky vysoké porositě materiálu. [8]

4.2.1 Vliv množství hydroxyapatitu na mechanické vlastnosti materiálu kolagen-HA

Během vývoje materiálu na bázi kolagenu a hydroxyapatitu již byly provedeny výzkumy zaměřené na zjištění ideálního množství hydroxyapatitu v kompozitu vzhledem k jeho mechanickým vlastnostem. Pomocí jednoosých tahových zkoušek provedených na vláknu vytvořeném pomocí elektrostatického zvlákňování byly porovnávány skupiny vzorků s 0; 6,4; 11,6 a 18,5 hmotnostními procenty hydroxyapatitu. Z výsledků je patrné, že optimální množství leží mezi 6,4 a 11,6 hmotnostními procenty. Vyšší hodnoty hydroxyapatitu vytvářely vlákno nepravidelného průměru s mezí pevnosti velmi blízké čistému kolagenu. [9]



Obr. 5: Vlákna kolagenu s rozdílným podílem hydroxyapatitu vytvořená pomocí elektrostatického zvlákňování. 0 hm%(a, b); 6,4 hm%(c, d); 11,6 hm% (e, f) a 12,5 hm% (g, h). Snímky z elektronového mikroskopu. [9]

4.3 Postup přípravy vzorků vrstvy kolagen – hydroxyapatit

Pro přípravu vzorků nanostrukturované vrstvy kolagen-hydroxyapatit muselo dojít k optimalizaci postupů, kterými se vrstva vyrábí. Výroba vrstvy se sestává z následujících kroků:

- 1) Rozpuštění lyofilizovaného kolagenu
- 2) Přidání hydroxyapatitu a antibiotik
- 3) Výroba nanostrukturované vrstvy pomocí elektrostatického zvláknování
- 4) Dodatečně zesíťování kolagenu
- 5) Sterilizace vzorku

4.3.1 Rozpuštění kolagenu

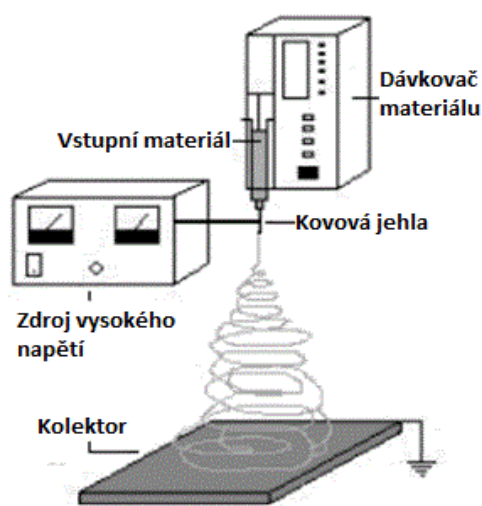
Rozpustnost kolagenu byla nejprve zjištěna ve studeném zředěném roztoku kyseliny octové, kdy pomohla blíže charakterizovat strukturu tropokolagenu. Později se přišlo na možnost rozpouštět kolagen i ve slabě alkalických roztocích solí nebo neutrálních roztocích solí s hypertonicou a fyziologickou iontovou silou. Rozpustnost kolagenu je závislá také na stáří tkáně jedince, z něhož je tkáň, ze které je kolagen extrahován. Kolagen ve tkáních starších jedinců obsahuje intermolekulární příčné kovalentní vazby, které omezují nebo zabraňují rozpuštění. Tyto vazby lze rozštěpit, ale za cenu částečné denaturace kolagenu, kdy se původní trojitá spirála částečně rozpadne na jednotlivé α -řetězce. To je samozřejmě jev nežádoucí, protože takto narušené molekuly kolagenu mají mnohem horší mechanické vlastnosti. [10]

Při studiích věnovaných optimalizaci procesu rozpuštění kolagenu před jeho následným elektrostatickým zvlákněním bylo zjištěno, že do té doby hojně využívaná organická rozpouštědla – 1,1,1,3,3,3 hexafluoropropanol a 2,2,2 trifluoroethanol způsobují přímou denaturaci kolagenu a také výrazně snižují jeho denaturační teplotu. Jako možné řešení bylo navrženo a následně otestováno použití 40% kyseliny octové v neionizované vodě, nebo 40% roztok fosfátového pufru v etanolu. Výsledky potvrdily, že tyto roztoky jsou schopné narušit intermolekulární cross-linky a tím kolagen rozpustit, jejich vliv na vazby trojité šroubovice je ale minimální. [11]

4.3.2 Elektrostatické zvlákňování

Pro výrobu materiálů, které by strukturou a vlastnostmi odpovídaly kosti, se využívá mnoho metod (lyofilizace, solvent-casting particulate-leaching, gas foaming, elektrostatické zvlákňování, elektrostatické rozprašování a další). [12] Pro výrobu nanostrukturovaných vrstev se často využívá právě elektrostatického zvlákňování, které vyniká relativní jednoduchostí, flexibilitou a schopností napodobit mezibuněčnou hmotu. Vznikají vlákna s průměry od jednotek nanometrů po mikrometry, které mezi sebou mohou vytvářet další vazby a tím stvořit vrstvu s velice dobrými mechanickými vlastnostmi. [13]

Princip elektrostatického zvlákňování spočívá v tom, že rozpuštěný materiál se nachází v zásobníku s možností regulace dávkování látky do kovové jehly. V určité vzdálenosti od jehly se nachází kolektor a mezi jehlou a kolektorem je pomocí zdroje vytvořeno napětí. To zapříčiní vznik elektrostatických sil mezi látkou v jehle a kolektorem, které přemůžou síly kapilární. To zapříčiní vznik tzv. Taylorova kužele na konci jehly, ze kterého je vytrhováváno vlákno směrem ke kolektoru. Zpočátku je trajektorie přibližně přímá, ale následuje oblast „bičování“, kde dochází mimo jiné k odpařování rozpouštědla. [14]



Obr. 7: Zjednodušený náčrt procesu elektrostatického zvlákňování (text přeložen). [14]

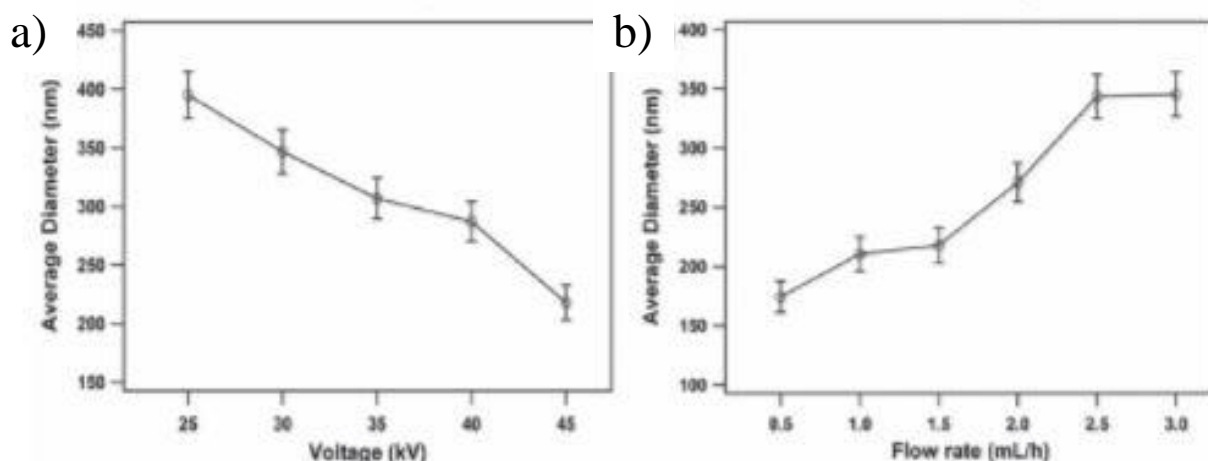


Obr. 6: Přístroj Electrospunra ES-210 (Mikrotools) využívaný na Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů AV ČR

Dostupné z:
https://www.irms.cas.cz/index.php?page=pristroje_detail&id=38

4.3.2.1 Vliv parametrů elektrostatického zvlákňování na výsledná vlákna kolagenu

Proces elektrostatického zvlákňování je možno ovlivnit mnoha způsoby. Jednak složením a koncentrací roztoku vstupujícího do procesu a dále také samotnými parametry procesu, mezi které patří velikost napětí mezi jehlou a kolektorem, vzdálenost mezi jehlou a kolektorem, nebo rychlost dávkování roztoku do jehly. Pakliže se jedná o zvlákňování přírodního materiálu, musí se dát na parametry zvlákňování obzvlášť pozor, protože na rozdíl od syntetických materiálů je kolagen poměrně lehce degradovatelný. Testováním však bylo dokázáno, že pro průtoky od 0,5ml/hod do 5ml/hod a napětí mezi elektrodami od 10kV po 45kV je možno kolagen elektrostaticky zvlákňovat a že použité parametry mají velký vliv na průměr vytvořeného vlákna (viz. grafy 1a, a 1b). Sekundární struktura kolagenu (trojitá šroubovice), se však nezdála těmito parametry v těchto rozsazích zásadně ovlivněna. [15]



Graf 2: Vliv použitého napětí na průměr kolagenového vlákna (napětí konst. 45kV). [15]

Graf 1: Vliv nastaveného průtoku na průměr kolagenového vlákna (průtok konst. 1,5ml/hod).[15]

4.3.3 Sterilizace

Sterilizace je proces, kterým musí projít jakýkoliv objekt, který by měl být později v přímém kontaktu s vnitřním prostředím lidského těla. Má za úkol zničit, deaktivovat nebo odstranit jakékoliv bakterie, viry, plísně nebo jiný škodlivé organismy, který by se mohly na sterilizovaném objektu vyskytovat. Sterilizace lze docílit mnoha různými metodami. Základními druhy sterilizace jsou:

- a) chemická sterilizace: Používá se látek – biocidů, které se dále dělí podle chemické struktury. Různé typy mikroorganismů mají různou citlivost k jednotlivým biocidům, je tedy nutné správně zvolit jeden nebo více biocidů pro danou aplikaci. Častými biocidy bývají: ozón, formaldehyd, kyselina peroctová nebo etylenoxid.
- b) sterilizace zářením: Dala by se dále rozdělit podle druhu záření na dezinfekci ionizačním (β -záření, γ -záření), ultrafialovým zářením a infračerveným zářením.
- c) sterilizace teplem: Do této kategorie spadají sterilizace horkým vzduchem, plamenem, párou, varem nebo pasterizace. Jedná se o sterilizace použitelné pro materiály, které dobře odolávají vysokým teplotám.

Při vybírání použitého sterilizačního procesu se musí brát ohled hlavně na možné účinky procesu na sterilovaný materiál. Jelikož se jedná o sterilizaci bílkoviny, je výběr velice zúžen. Jakákoliv sterilizace teplem pracuje při takových teplotách, které by způsobily denaturaci kolagenu. Není proto možné ji použít. Obdobně je na tom i sterilizace infračerveným zářením, která tepelně ovlivňuje materiál. Pro sterilizaci kolagenu se využívají hlavně metody využívající γ -záření a sterilizace za pomoci etylenoxidu. [16]

4.3.3.1 Chemická sterilizace za použití etylenoxidu

Sterilizace pomocí etylenoxidu patří mezi sterilizace se širokospektrálním účinkem, většinou proto není nutné ji kombinovat s jinými druhy sterilizace. Etylenoxid jako takový je velice nestabilní, bezbarvá, jedovatá kapalina. Tyto vlastnosti se přenášejí i na jeho páry, které se pro sterilizaci využívají. Kvůli těmto vlastnostem a použití za zvýšené teploty a tlaku je nutné jej používat ve speciálních přístrojích. Sama sterilizace probíhá při teplotách mezi 11 a 60°C. Při nižších teplotách již ztrácí své sterilizační schopnosti. Ty se se zvyšující teplotou také zvyšují a to přibližně v poměru 2,74 krát při navýšení teploty o 10°C. Dalším faktorem ovlivňujícím rychlost a účinnost tohoto typu sterilizace je relativní vlhkost prostředí, ve kterém sterilizace probíhá. Tato závislost je nepřímá, tzn. čím nižší je relativní vlhkost, tím více roste rychlost sterilizace. Sterilizace může být ovlivněna i případným zabalením sterilizovaného předmětu do různých plastických hmot. Jelikož etylenoxid velice dobře prochází plastickými foliemi, toto zabalení sterilizaci nezabrání, ale zdatelně ovlivňuje čas, po který proces musí probíhat. Etylenoxid je rozpustný ve vodě, kde se rozkládá na vodík, kyslík a glykol.

Kvůli nebezpečnosti etylenoxidu jako takového musí po sterilizaci následovat proces odvětrávání prostoru uvnitř přístroje, kde sterilizace probíhala, aby se jakýkoliv zbylý etylenoxid zaručeně odstranil. To může být proces trvající třeba i 120 hodin, což je jednou z hlavních nevýhod toho typu sterilizace. [17]

Tento typ sterilizace je velice účinný při likvidaci všech forem mikroorganismů a spor a velice často se využívá pro materiály náchylné na vyšší teploty, které pro tento typ sterilizace nejsou nutné. Dále se velice často využívá ve zdravotnictví. [17]

4.3.3.2 Sterilizace za použití γ -záření

Tento způsob sterilizace funguje na základě prostupu γ -záření sterilizovaným předmětem, kde proniká do mikroorganismů. Tam způsobuje změny v buněčném metabolismu, konkrétně ve struktuře nukleových kyselin, což způsobuje ztrátu jejich reprodukčních schopností a tím i jejich inaktivaci. Zdrojem tohoto záření bývá nejčastěji rozpad radioaktivního izotopu kobaltu ^{60}Co . Intenzita toho způsobu sterilizace je měřena pomocí absorbované látky a jednotkou je 1 Gray (Gy), který odpovídá energii 1 Joulu záření absorbované jedním kilogramem látky. Sterilizační dávky se pohybují v rozmezí mezi 25 a 40 kGy, přičemž dávka 25kGy je ve většině států stanovena jako minimální dávka zajišťující sterilizaci. Sterilizace pomocí γ -záření může probíhat ještě nepřímo, protože γ -záření vytváří ve vodném prostředí volné hydroxylové radikály, které mohou napadat a ničit přítomné mikroorganismy. [18]

Mezi velké výhody tohoto způsobu sterilizace patří schopnost γ -záření snadno procházet většinou materiálů, čímž zaručuje rovnoměrnou sterilizaci nejen na povrchu, ale i ve vnitřních vrstvách materiálu. Proces také probíhá bez zvýšení teploty, což vylučuje tepelné ovlivnění sterilizovaného materiálu. [18]

4.3.4 Možný vliv sterilizačních metod na vrstvu kolagen-hydroxyapatit

V případě, kdy se chystáme sterilizovat bílkovinný materiál, jakým je právě například kolagen, musíme brát v úvahu možné efekty použité metody na výsledný produkt. Struktura kolagenu je poměrně snadno ovlivnitelná jak teplotně, tak chemicky. S přihlédnutím ke kapitole 4.1.3. je jasné, že sterilizací pomocí γ -záření může dojít k rozpadu peptidických vazeb tvořících α -řetězce a výslednou trojšroubovici

nebo k vytvoření dodatečných cross-linků, které by také měly vliv na následné mechanické vlastnosti. Poslední možností zůstává, že dávka použitá pro sterilizaci by nebyla dostatečně velká na to, aby takové změny způsobila a struktura by zůstala nenarušena. Při sterilizaci pomocí par etylalkoholu však také musíme počítat s tím, že kolagenový materiál je vystaven po velice dlouhou dobu vlhkému prostředí za zvýšené teploty, což může vést k narušení některých vazeb. Etylalkohol také reaguje s volnými zbytky aminokyselin, což je další faktor, který by mohl následné vlastnosti ovlivnit [18]. I když byla provedena již řada testů snažících se vliv těchto používaných sterilizačních metod shrnout a objasnit, většinou se velice liší v závěrech. Některé tvrdí, že etylalkohol kolagen téměř neovlivňuje, jiné naopak že způsobuje velké strukturální změny. Poté existují i práce, které tvrdí, že obě ze zmíněných metod, stejně tak jako sterilizace pomocí β -záření a etanolová desinfekce, žádný statisticky pozorovatelný vliv na mechanické vlastnosti kolagenu nemají. [16, 19]

5 Měření mechanických vlastností vzorků kolagen – hydroxyapatit

Pro ověření vlivu sterilizace na mechanické vlastnosti nanostrukturované vrstvy kolagen-hydroxyapatit byly provedeny jednoosé tahové zkoušky na nesterilizovaných i sterilizovaných vzorcích s různými podíly hydroxyapatitu. Měřeny byly vzorky s 0%, 5% a 15% hydroxyapatitu, v sériích po 8 vzorcích. Testovaný materiál byl obdržen od Ústavu struktury a mechaniky hornin AV ČR. Tahové zkoušky byly provedeny v laboratoři biomechaniky na Fakultě strojní ČVUT v Praze.

5.1 Zkušební stroj

Měření proběhlo na víceosém zkušebním stroji od firmy Zwick/Roell se silovými snímači typu U9B od výrobce HBM s rozsahem $\pm 25\text{N}$ a $\pm 250\text{N}$, který byl vybaven bezkontaktním extenzometrem, který pomocí kontrastních značek na vzorcích zaznamenával průběh deformace během zatěžování. Data byla zaznamenávána s frekvencí 20 Hz a ukládána do počítače ve formě tabulky v programu Excel. Měřena byla poloha značek, poloha upínacích čelistí a síla.

5.2 Postup měření

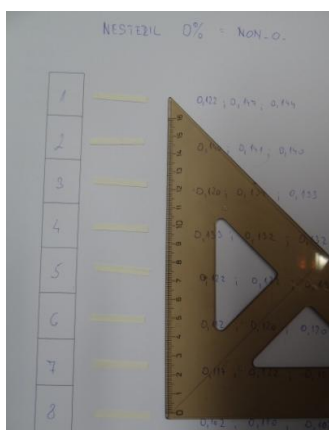
Z dostupných vzorků byly nařezány jednotlivé proužky. Jejich tloušťka t byla opakovaně měřena mikrometrem, šířka w a počáteční délka l_0 byly vyhodnocovány z fotografií v nezatíženém stavu s přiloženým měřítkem za pomoci softwaru QuickPHOTO INDUSTRIAL. Na vzorky byly dále nalepeny kontrastní značky. Po upevnění na zkušební stroj byly vzorky zatěžovány až do mezního stavu pevnosti.

5.3 Postup zpracování dat

Z naměřených dat byly vytvořeny zatěžovací diagramy závislosti smluvního napětí σ a inženýrská deformace ε . Hodnoty pro diagramy byly spočítány ze vztahů:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

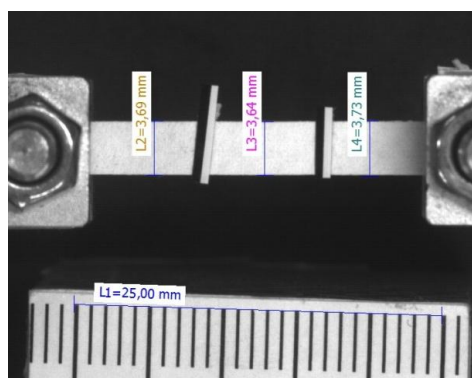
kde F je průměr sil naměřené silovými snímači, A je plocha průřezu nezátíženého vzorku (uvažujeme obdélníkový průřez o tloušťce t a šířce w), Δl je prodloužení vzorku získané ze změny polohy čelistí a l_0 je počáteční délka naměřená z fotografie.



Obr. 9: Jedna sada vzorků kolagenu před měřením



Obr. 10: Zkušební zatěžovací stroj



Obr. 8: Způsob odečtení šířky měřeného vzorku

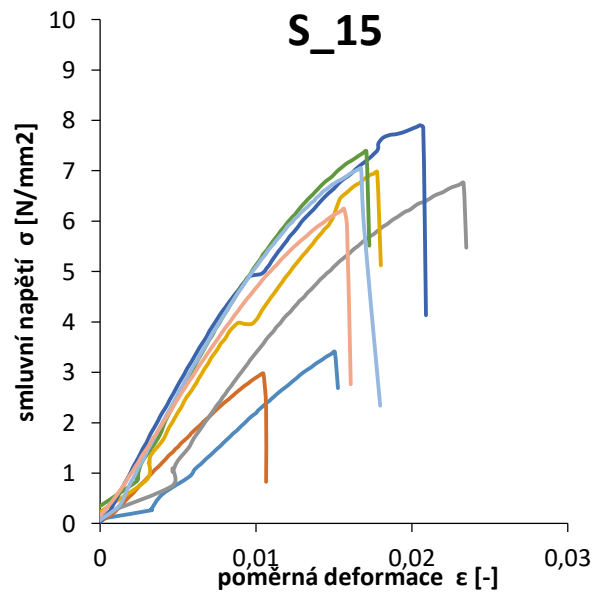
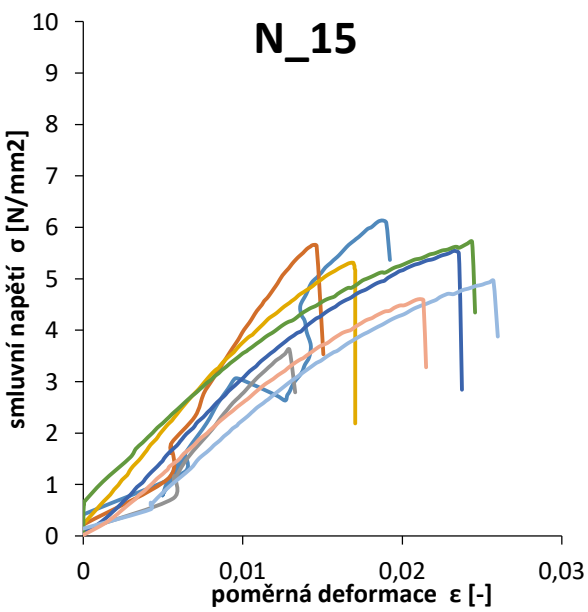
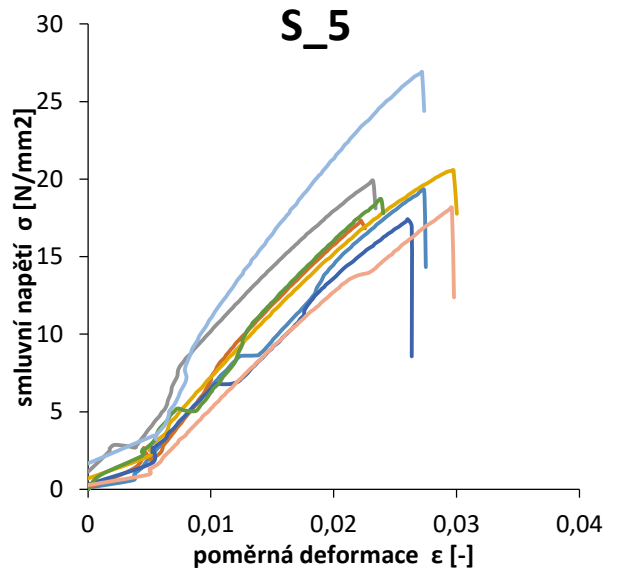
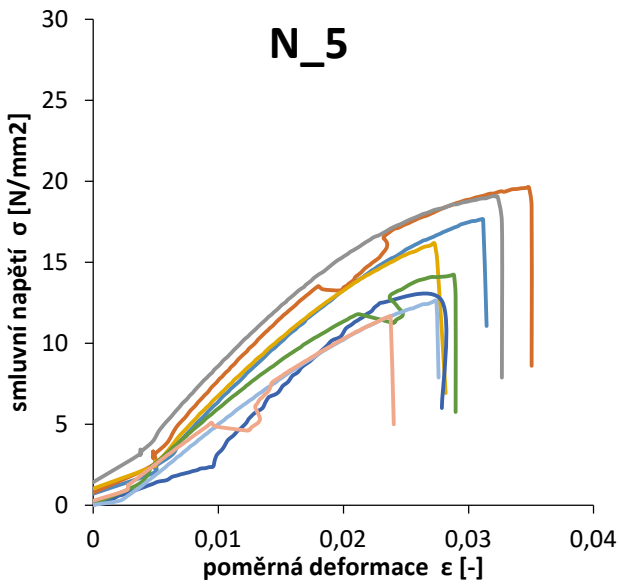
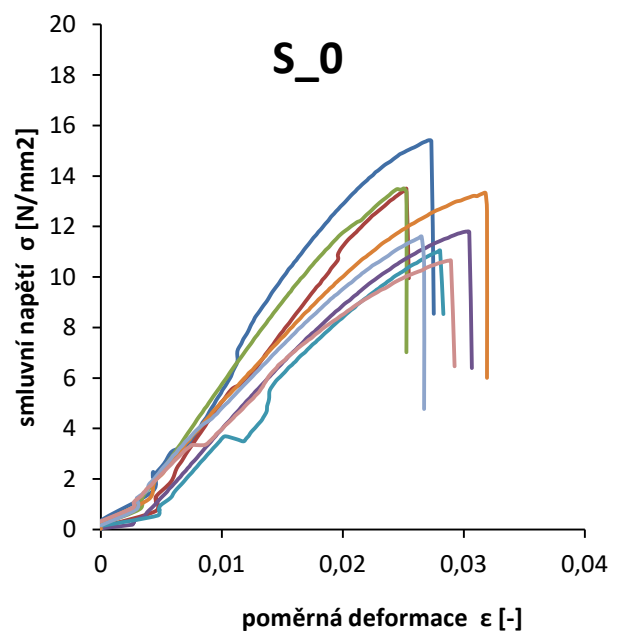
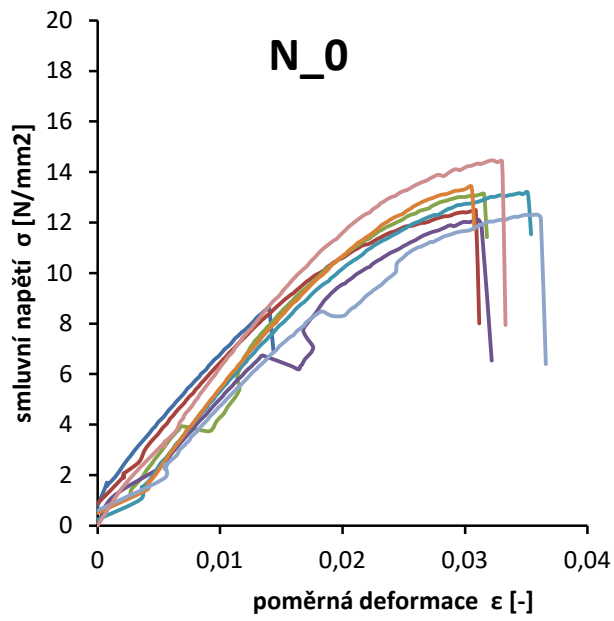
Dále byla ze získaných dat stanovena smluvní mez pevnosti jakožto maximální pozorovaná hodnota smluvního napětí během zatěžování, tažnost jakožto hodnota inženýrské deformace v momentu dosažení mezního stavu pevnosti a smluvní modul pružnosti získaný aproximací zatěžovacího diagramu pomocí lineární regrese v oblasti blízké počátku zatěžování. Regrese byla u všech zkoušek provedena v oblasti $\varepsilon \in [0,005;0,01]$.

Skupiny vzorků/vzorky byly označovány následovně: První písmeno - N nebo S a označuje, zda se jedná o nesterilizovaný nebo sterilizovaný vzorek, následující číslo označuje procentuální podíl hydroxyapatitu ve vzorku a poslední číslo je číslo vzorku ve skupině.

5.4 Výsledky měření a zpracování dat

Vzorek	Tloušťka [mm]				Šířka [mm]				Průřez [mm ²]	Délka [mm]			
	t ₁	t ₂	t ₃	t	w ₁	w ₂	w ₃	w	A	l ₀₁	l ₀₂	l ₀₃	l ₀
N_0_1	0,122	0,147	0,144	0,138	3,47	3,35	3,41	3,410	0,4694	22,37	22,49	22,55	22,470
N_0_2	0,14	0,141	0,14	0,140	3,29	3,17	3,23	3,230	0,4533	23,33	23,33	23,39	23,350
N_0_3	0,12	0,134	0,133	0,129	3,42	3,46	3,42	3,433	0,4429	21,44	21,44	21,48	21,453
N_0_4	0,133	0,132	0,132	0,132	3,69	3,64	3,64	3,657	0,4839	21,21	21,21	21,26	21,227
N_0_5	0,122	0,122	0,13	0,125	3,87	3,78	3,69	3,780	0,4712	21,89	21,89	21,93	21,903
N_0_6	0,112	0,12	0,12	0,117	3,73	3,69	3,64	3,687	0,4326	20,49	20,63	20,58	20,567
N_0_7	0,117	0,122	0,127	0,122	4,04	3,91	3,82	3,923	0,4786	20,94	21,08	21,08	21,033
N_0_8	0,102	0,11	0,102	0,105	3,69	3,69	3,69	3,690	0,3862	21,53	21,53	21,62	21,560
N_5_1	0,103	0,096	0,094	0,098	3,64	3,55	3,55	3,580	0,3496	22,11	22,11	22,16	22,127
N_5_2	0,101	0,097	0,095	0,098	3,73	3,64	3,64	3,670	0,3584	23,15	23,19	23,15	23,163
N_5_3	0,111	0,104	0,105	0,107	3,64	3,60	3,60	3,613	0,3854	22,43	22,57	22,52	22,507
N_5_4	0,119	0,105	0,098	0,107	3,69	3,64	3,73	3,687	0,3957	22,74	22,79	22,70	22,743
N_5_5	0,122	0,113	0,096	0,110	3,78	3,78	3,78	3,780	0,4171	22,47	22,52	22,61	22,533
N_5_6	0,145	0,145	0,123	0,138	3,78	3,78	3,73	3,763	0,5181	23,01	23,10	23,24	23,117
N_5_7	0,144	0,158	0,165	0,156	3,69	3,73	3,73	3,717	0,5786	22,92	22,88	22,97	22,923
N_5_8	0,196	0,202	0,226	0,208	3,91	3,87	3,87	3,883	0,8077	23,69	23,78	23,69	23,720
N_15_1	0,079	0,08	0,095	0,085	3,28	3,37	3,42	3,357	0,2842	21,26	21,26	21,30	21,273
N_15_2	0,087	0,086	0,094	0,089	3,64	3,60	3,51	3,583	0,3189	21,71	21,75	21,75	21,737
N_15_3	0,084	0,09	0,094	0,089	3,64	3,60	3,60	3,613	0,3228	22,25	22,25	22,34	22,280
N_15_4	0,089	0,091	0,099	0,093	3,64	3,64	3,60	3,627	0,3373	21,84	21,84	21,80	21,827
N_15_5	0,098	0,093	0,094	0,095	3,51	3,51	3,42	3,480	0,3306	20,41	20,41	20,45	20,423
N_15_6	0,093	0,092	0,099	0,095	3,55	3,51	3,46	3,507	0,3320	21,21	21,21	21,26	21,227
N_15_7	0,099	0,089	0,097	0,095	3,60	3,51	3,42	3,510	0,3335	21,98	22,02	22,02	22,007
N_15_8	0,093	0,087	0,092	0,091	3,73	3,60	3,46	3,597	0,3261	21,30	21,39	21,39	21,360
S_0_1	0,116	0,099	0,067	0,094	3,64	3,69	3,73	3,687	0,3465	24,81	24,77	24,86	24,813
S_0_2	0,125	0,099	0,084	0,103	3,64	3,55	3,55	3,580	0,3675	25,35	25,39	25,44	25,393
S_0_3	0,137	0,109	0,075	0,107	3,42	3,42	3,37	3,403	0,3642	26,20	26,20	26,47	26,290
S_0_4	0,159	0,131	0,105	0,132	3,46	3,46	3,46	3,460	0,4556	26,07	26,02	26,02	26,037
S_0_5	0,17	0,144	0,111	0,142	3,60	3,55	3,51	3,553	0,5034	25,71	25,75	25,84	25,767
S_0_6	0,143	0,125	0,124	0,131	3,78	3,69	3,64	3,703	0,4839	25,62	25,62	25,66	25,633
S_0_7	0,157	0,147	0,116	0,140	3,46	3,42	3,46	3,447	0,4825	24,45	24,58	24,63	24,553
S_0_8	0,172	0,153	0,13	0,152	3,91	3,78	3,78	3,823	0,5799	24,76	24,81	24,85	24,807
S_5_1	0,119	0,111	0,106	0,112	3,78	3,91	3,87	3,853	0,4316	23,51	23,55	23,64	23,567
S_5_2	0,108	0,116	0,108	0,111	3,82	3,78	3,73	3,777	0,4180	24,45	24,45	24,54	24,480
S_5_3	0,12	0,112	0,111	0,114	3,55	3,60	3,60	3,583	0,4097	25,08	25,12	25,17	25,123
S_5_4	0,131	0,09	0,098	0,106	3,82	3,82	3,82	3,820	0,4062	22,20	22,25	22,29	22,247
S_5_5	0,127	0,13	0,092	0,116	3,96	4,14	4,14	4,080	0,4746	22,07	22,12	22,07	22,087
S_5_6	0,101	0,122	0,113	0,112	3,60	3,64	3,60	3,613	0,4047	24,59	24,67	24,67	24,643
S_5_7	0,071	0,085	0,101	0,086	3,51	3,46	3,51	3,493	0,2993	22,70	22,74	22,74	22,727
S_5_8	0,145	0,133	0,11	0,129	4,00	3,87	3,60	3,823	0,4945	23,46	23,60	23,42	23,493
S_15_1	0,098	0,096	0,101	0,098	3,69	3,60	3,51	3,600	0,3540	24,99	25,03	25,03	25,017
S_15_2	0,098	0,098	0,089	0,095	3,60	3,60	3,51	3,570	0,3392	28,77	28,81	28,90	28,827
S_15_3	0,099	0,129	0,128	0,119	3,87	3,82	3,78	3,823	0,4537	28,36	28,41	28,45	28,407
S_15_4	0,09	0,092	0,114	0,099	3,51	3,42	3,46	3,463	0,3417	25,44	25,53	25,53	25,500
S_15_5	0,08	0,089	0,1	0,090	3,55	3,51	3,46	3,507	0,3144	26,34	26,34	26,34	26,340
S_15_6	0,076	0,082	0,097	0,085	3,55	3,51	3,42	3,493	0,2969	26,83	26,83	26,83	26,830
S_15_7	0,073	0,075	0,086	0,078	3,51	3,42	3,37	3,433	0,2678	26,88	26,88	26,93	26,897
S_15_8	0,077	0,076	0,081	0,078	3,60	3,55	3,42	3,523	0,2748	27,33	27,42	27,42	27,390

Tabulka 1: Hodnoty rozměrů zatěžovaných vzorků



Graf 3: Zatěžovací diagramy testovaných vzorků

Mez pevnosti [N/mm ²]						
N_0	S_0	N_5	S_5	N_15	S_15	
12,489	15,407	17,650	19,308	5,656	3,404	
8,615	13,496	19,625	17,329	6,130	2,973	
13,120	13,504	19,062	19,879	3,621	6,756	
12,100	11,795	16,170	20,572	5,314	6,974	
13,183	11,047	12,610	17,411	5,544	7,901	
13,419	13,318	14,205	18,704	5,716	7,383	
12,309	11,600	12,597	26,821	4,958	7,046	
14,455	10,645	11,675	18,157	4,604	6,240	
Medián	12,804	12,557	15,188	19,006	5,429	6,865
Rozptyl	2,971	2,558	9,691	9,406	0,625	3,435

Tabulka 2: Hodnoty meze pevnosti odečtené z průběhu zatěžování

Tažnost [-]						
N_0	S_0	N_5	S_5	N_15	S_15	
0,0309	0,0271	0,0310	0,0273	0,0144	0,0151	
0,0140	0,0252	0,0348	0,0222	0,0188	0,0105	
0,0316	0,0251	0,0322	0,0232	0,0129	0,0233	
0,0311	0,0302	0,0273	0,0298	0,0169	0,0178	
0,0351	0,0280	0,0279	0,0260	0,0232	0,0205	
0,0305	0,0318	0,0288	0,0239	0,0244	0,0171	
0,0357	0,0265	0,0274	0,0271	0,0257	0,0167	
0,0321	0,0289	0,0238	0,0296	0,0212	0,0157	
Medián	0,0313	0,0276	0,0283	0,0266	0,0200	0,0169
Rozptyl	4,63E-05	5,63E-06	1,17E-05	8,095E-06	2,22E-05	1,45E-05

Tabulka 3: Hodnoty tažnosti odečtené z průběhu zatěžování

Modul pružnosti [N/mm ²]						
N_0	S_0	N_5	S_5	N_15	S_15	
552,35	625,08	824,15	920,18	509,64	291,37	
533,93	720,07	904,54	1090,7	486,97	270,79	
171,05	694,32	859,25	1351,1	374,61	429,28	
552,88	546,48	838,49	923,11	336,02	474,21	
594,56	535,68	774,24	852,02	313,49	452,22	
635,77	571,56	676,51	823,21	264,93	515,81	
552,16	478,24	624,31	1088,8	279,03	502,59	
677,26	320,55	547,27	803,69	277,44	437,56	
Medián	552,6	559,0	799,2	921,6	324,8	444,9
Rozptyl	23900	16116	15962	34378	9100	8451

Tabulka 4: Hodnoty smluvního modulu pružnosti odečtené z průběhu zatěžování

5.5 Statistické zpracování výsledků

Mez pevnosti, tažnost a smluvní modul pružnosti byly dále podrobeny statistické analýze rovnosti rozptylů pro zjištění možné závislosti na sterilizaci. Zpracování dat proběhlo za pomoci softwaru Microsoft Excel 2007 a statistická analýza pomocí doplňku Real Statistics (Realstats).

Byly použity následující statistické testy:

1. Normalita skupin dat byla zjišťována Shapiro-Wilkovým testem
2. Dvouvýběrový t-testu pro zjištění vlivu sterilizace na jednotlivé mechanické vlastnosti
3. Jednofaktorový testu ANOVA a Tukeyho HSD (data řídicí se normálním rozdělením) nebo Kruskal-Wallisův test a test Dunnové (data neřídicí se normálním rozdělením) pro ověření vlivu koncentrace hydroxyapatitu

Pro grafickou interpretaci byly vytvořeny krabicové grafy, kde velikost boxu je dána 25% a 75% kvantilem, medián je znázorněn čarou uvnitř krabice, aritmetický průměr značkou x, vousy udávají polohu minima a maxima nacházejících se v poli o velikost 1,5xIQR (mezikvartilové rozpětí). Odlehlá pozorování jsou znázorněna kolečkem.

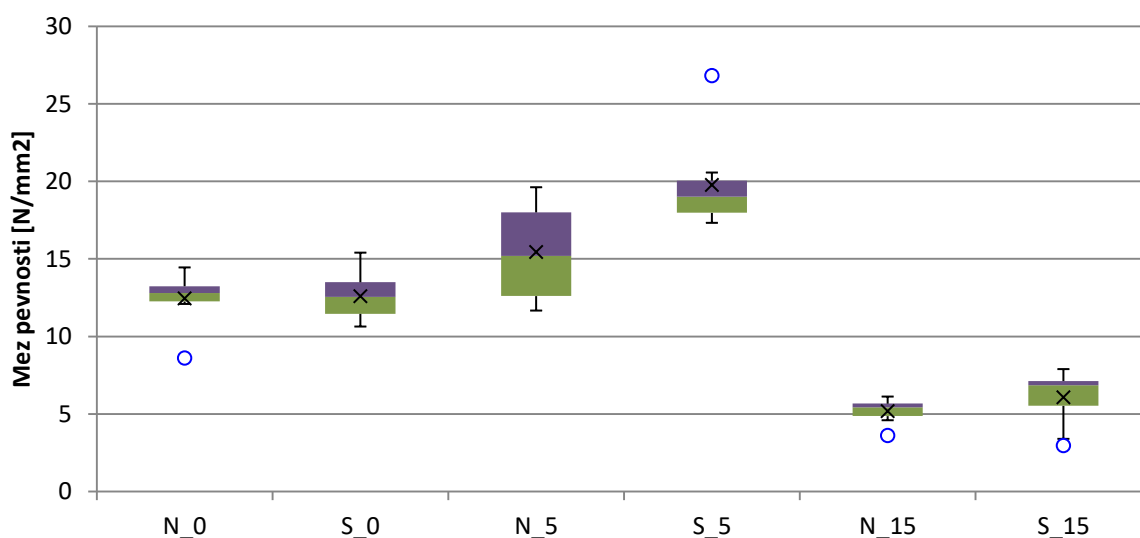
S přesnými postupy použitých statistických analýz je možno se obeznámit ve skriptech „Úvod do statistiky“ – Litschmannová (2011) nebo na webu vydavatele doplňku RealStats pro Microsoft Excel – www.real-statistics.com.

Vliv podílu hydroxyapatitu						
$\alpha=0,05$	Mez pevnosti		Tažnost		Modul pružnosti	
	Statisticky významný rozdíl	p-hodnota	Statisticky významný rozdíl	p-hodnota	Statisticky významný rozdíl	p-hodnota
N_0 X N_5	ANO*	0,0255	NE**	0,0027	NE**	4,52E-04
N_0 X N_15	ANO*	2,316E-06	ANO**			
N_5 X N_15	ANO*	8,682E-09	ANO**			
S_0 X S_5	NE**	3,571E-05	NE*	0,5092	ANO*	1,728E-05
S_0 X S_15	ANO**		ANO*	1,749E-06	NE*	0,1383
S_5 X S_15	ANO**		ANO*	2,076E-05	ANO*	2,46E-07

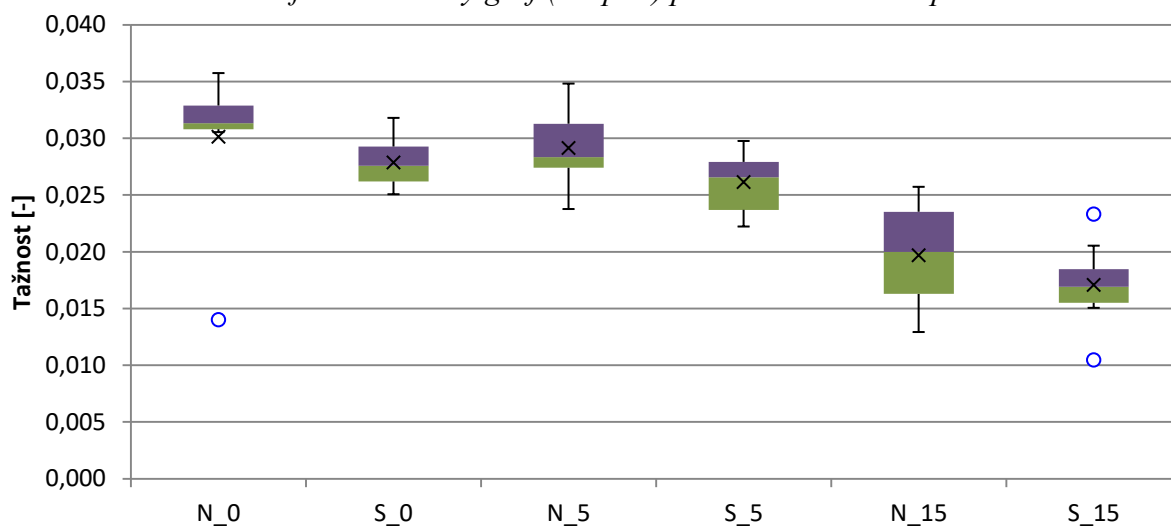
Tabulka 5: Statistická analýza vlivu podílu hydroxyapatitu ve vzorku
*Použit test ANOVA a Tukeyho HSD; **použit Kruskal-Wallisův test a test Dunnové.

Vliv sterilizace						
$\alpha=0,05$	Mez pevnosti		Tažnost		Modul pružnosti	
	Statisticky významný rozdíl	p-hodnota	Statisticky významný rozdíl	p-hodnota	Statisticky významný rozdíl	p-hodnota
N_0 X S_0	NE	0,8682	NE	0,3882	NE	0,7007
N_5 X S_5	ANO	0,0142	NE	0,0770	ANO	0,0148
N_15 X S_15	NE	0,2313	NE	0,2422	NE	0,1778

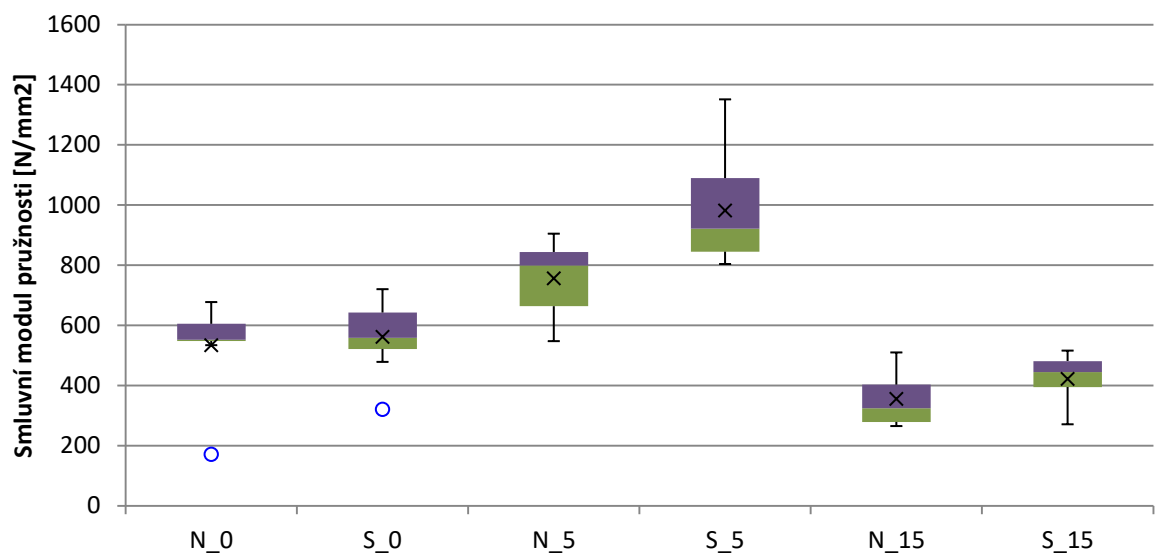
Tabulka 6: Statistická analýza vlivu sterilizace na základě dvouvýběrového t-testu



Graf 4: Krabicový graf (boxplot) pro stanovené meze pevnosti



Graf 5: Krabicový graf (boxplot) pro stanovené tažnosti



Graf 6: Krabicový graf (boxplot) pro stanovené smluvní moduly pružnosti

Tabulky 5 a 6 obsahují výsledky statistické analýzy naměřených dat. Celá analýza je dostupná v příloze této práce. V podstatě každá z použitých analýz směřuje ke stanovení tzv. p-hodnoty, která reflektuje shodu mezi jednotlivými skupinami dat. V případě, že naší hypotézou je: „Sterilizace má vliv na mez pevnosti vzorku s 0% hydroxyapatitu.“ a p-hodnota nám pro tyto skupiny dat vyjde vyšší než hladina významnosti α (v technické praxi nejčastěji $\alpha=0,05$), můžeme hypotézu zamítnout.

6 Závěr

Výběr správné metody sterilizace je při výrobě biomateriálů stěžejní. Nejenže musí daná metoda a postup zajistit vysokou kvalitu sterilizace kvůli pozdější implantaci výrobku přímo do lidského těla, ale současně nesmí mít negativní vliv na původní materiál jako takový. Při sterilizaci bílkovin, konkrétně kolagenu se musí zvažovat možný vliv jak na molekulu (možný rozpad trojitě šroubovice), tak i vliv na makromolekulární strukturu (rozpad nebo naopak tvorba dodatečných cross-linků). V současné době se ke sterilizaci kolagenu využívá především sterilizace pomocí par etylenoxidu, ale i sterilizace pomocí β -záření a γ -záření. Existují práce, které u každé z těchto metod hovoří o patrném vlivu na strukturální a mechanické vlastnosti, ale současně i práce, které tento vliv popírají, nebo zanedbávají.

V rámci této práce se hodnotil možný vliv sterilizace etylenoxidovými parami na mechanické vlastnosti kolagen-hydroxyapatitové vrstvy vyrobené pomocí elektrostatického zvlákňování. Mechanické vlastnosti byly zjišťovány pomocí jednoosé tahové zkoušky a porovnávány byly sterilizované a nesterilizované vzorky s 3 různými podíly hydroxyapatitu (0%, 5% a 15%). Vliv podílu hydroxyapatitu, který do určité hodnoty zlepšuje mechanické vlastnosti (především mez pevnosti a smluvní modul pružnosti), ale při vyšších hodnotách způsobuje rychlé selhávání materiálu pod zátěží, byl již známý a projevil se i v těchto testech. Při pohledu na krabicové grafy sestrojené ze zpracovaných dat by se mohlo zdát, že po sterilizaci se u všech skupin vzorků projevil mírný nárůst meze pevnosti a smluvního modulu pružnosti a naopak mírný pokles tažnosti, což by naznačovalo vznik dodatečných cross-linků, ale statistická analýza na takovýto vliv poukázala pouze u meze pevnosti a smluvního modulu pružnosti skupiny s 5% hydroxyapatitu. P-hodnoty se vyskytovaly blízko zvolené hladině významnosti, což by poukazovalo na pouze malý vliv.

S přihlédnutím na zpracované měření, myslím, že mohu konstatovat, že sterilizace pomocí etylenoxidu nemá významný vliv na mechanické vlastnosti nanostrukturované vrstvy na bázi kolagenu a hydroxyapatitu vyrobené pomocí elektrostatického zvlákňování.

7 Seznam použité literatury a zdrojů

- [1] YUNUS BASHA, Rubaiya, Sampath Kumar T.S. a Mukesh DOBLE. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*: 2015, 57, 452-463. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.016. ISSN 09284931.
- [2] FRATZL, Peter. *Collagen: structure and mechanics*. Springer. ISBN 978-0-387-73905-2.
- [3] Proteins-Fibrous [online]. [cit. 2017-06-02]. Dostupné z: http://chemistry.gravitywaves.com/CHE450/06_Proteins-Structural.htm
- [4] CHAN, Virginia C., et al. Positional Preferences of Ionizable Residues in Gly-X-YTriplets of the Collagen Triple-helix. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272.50: 31441-31446.
- [5] NYMAN, Jeffry S., Michael REYES a Xiaodu WANG. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron*. 2005, 36(7-8), 566-582. DOI: 10.1016/j.micron.2005.07.004. ISSN 09684328.
- [6] NAGAOKA, Hiroko, Hideaki NAGAOKA, Ricardo WALTER, Lee W. BOUSHELL, Patricia A. MIGUEZ, Andrew BURTON, André V. RITTER a Mitsuo YAMAUCHI. Characterization of Genipin-Modified Dentin Collagen. *BioMed Research International*. 2014, 2014, 1-7. DOI: 10.1155/2014/702821. ISSN 2314-6133.
- [7] LÜ, Xiqin, Wanyin ZHAI, Yanling ZHOU, Yue ZHOU, Hongfeng ZHANG a Jiang CHANG. Crosslinking effect of Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on decellularized heart valve scaffold for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010, 21(2), 473-480. DOI: 10.1007/s10856-009-3924-9. ISSN 0957-4530.
- [8] ORLOVSKII, V. P., V. S. KOMLEV a S. M. BARINOV. *Hydroxyapatite and hydroxyapatite based ceramics: Inorganic Materials*. 38(10), 973-984. DOI: 10.1023/A:1020585800572. ISSN 00201685.
- [9] JI, Jing, Benny BAR-ON a H. Daniel WAGNER. Mechanics of electrospun collagen and hydroxyapatite/collagen nanofibers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2012, 13, 185-193. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.04.016. ISSN 17516161.
- [10] PETERKOVÁ, P., LAPČÍK, L. Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické listy*. 94. vyd, 371 – 379 (2000) ISSN 0009-2770.

- [11] LIU, Ting, Wai Keng TENG, Barbara P. CHAN a Sing Yian CHEW. Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: Synthesis, characterization and neural stem cell interactions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010, **95A**(1), 276-282. DOI: 10.1002/jbm.a.32831. ISSN 15493296.
- [12] SACHLOS, E a JT CZERNUSZKA. Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*. 2003, 5, 29-40. DOI: 10.22203/eCM.v005a03.
- [13] BUTTAFOCO, L., N.G. KOLKMAN, P. ENGBERS-BUIJTENHUIJS, A.A. POOT, P.J. DIJKSTRA, I. VERMES a J. FEIJEN. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials* . 2006, 27(5), 724-734 . DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.024. ISSN 01429612
- [14] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. Teo, T. Lim, and Z. Ma, An introduction to electrospinning and nanofibres, World Scientific Publishing Co., Singapor, 2005.
- [15] CASTILLA-CASADIEGO, David A., Heleine V. RAMOS-AVILEZ, Stephany HERRERA-POSADA, et al. Engineering of a Stable Collagen Nanofibrous Scaffold with Tunable Fiber Diameter, Alignment, and Mechanical Properties. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2016, 301(9), 1064-1075. DOI: 10.1002/mame.201600156. ISSN 14387492.
- [16] FARAJ, Kaeuis A., et al. The effect of ethylene oxide sterilisation, beta irradiation and gamma irradiation on collagen fibril-based scaffolds. *Tissue Eng Regen Med*, 2011, 8: 460-470.
- [17] DONDELINGER, Robert M. Sterilizers, Part II: Chemical Sterilization in Healthcare Facilities. *Biomedical Instrumentation & Technology*. 2009, **43**(1), 43-46. DOI: 10.2345/0899-8205-43.1.43. ISSN 0899-8205
- [18] PALMER, Iwan, Susan A. CLARKE, John NELSON, Wolfgang SCHATTON, Nicholas J. DUNNE a Fraser BUCHANAN. Identification of a suitable sterilisation method for collagen derived from a marine Demosponge. *International Journal of Nano and Biomaterials*. 2012, **4**(2), 148-. DOI: 10.1504/IJNBM.2012.050306. ISSN 1752-8933.
- [19] GORHAM, S. D., S. SRIVASTAVA, D. A. FRENCH a R. SCOTT. The effect of gamma-ray and ethylene oxide sterilization on collagen-based wound-repair materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* . 1993, **4**(1), 40-49. DOI: 10.1007/BF00122976. ISSN 0957-4530.

8 Seznam použitých obrázků, tabulek a grafů

Seznam obrázků

<i>OBR. 1: SCHÉMA STRUKTURY MOLEKULY KOLAGENU.</i>	10
<i>OBR. 2: SCHÉMA TROJŠROUBOVICE KOLAGENU.</i>	10
<i>OBR. 3: USPOŘÁDÁNÍ FIBRIL ZPŮSOBUJÍCÍ PŘÍČNÉ PRUHOVÁNÍ VIDITELNÉ POMOCÍ MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL.</i>	11
<i>OBR. 4: STRUKTURA KOLAGENU OD MOLEKULY PO VLÁKNO.</i>	12
<i>OBR. 5: VLÁKNA KOLAGENU S ROZDÍLNÝM PODÍLEM HYDROXYAPATITU VYTVOŘENÉ POMOCÍ ELEKTROSTATICKÉHO ZVLÁKŇOVÁNÍ.</i>	15
<i>OBR. 6: PŘÍSTROJ ELECTROSPUNRA ES-210 (MIKROTOOLS) VYUŽÍVANÝ NA ODDĚLENÍ KOMPOZITNÍCH A UHLÍKOVÝCH MATERIÁLŮ AV ČR</i>	17
<i>OBR. 7: ZJEDNODUŠENÝ NÁKRES PROCESU ELEKTROSTATICKÉHO ZVLÁKŇOVÁNÍ (TEXT PŘELOŽEN).</i>	17
<i>OBR. 8: JEDNA SADA VZORKŮ KOLAGENU PŘED MĚŘENÍM</i>	23
<i>OBR. 9: ZKUŠEBNÍ ZATĚŽOVACÍ STROJ</i>	23
<i>OBR. 10: ZPŮSOB ODEČTENÍ ŠÍŘKY MĚŘENÉHO VZORKU</i>	23

Seznam tabulek

<i>TABULKA 1: HODNOTY ROZMĚRŮ ZATĚŽOVANÝCH VZORKŮ</i>	24
<i>TABULKA 2: HODNOTY MEZE PEVNOSTI ODEČTENÉ Z PRŮBĚHU ZATĚŽOVÁNÍ</i>	26
<i>TABULKA 3: HODNOTY TAŽNOSTI ODEČTENÉ Z PRŮBĚHU ZATĚŽOVÁNÍ</i>	26
<i>TABULKA 4: HODNOTY SMLUVNÍHO MODULU PRUŽNOSTI ODEČTENÉ Z PRŮBĚHU ZATĚŽOVÁNÍ</i>	26
<i>TABULKA 5: STATISTICKÁ ANALÝZA VLIVU PODÍLU HYDROXYAPATITU VE VZORKU.</i>	27
<i>TABULKA 6: STATISTICKÁ ANALÝZA VLIVU STERILIZACE</i>	28

Seznam grafů

<i>GRAF 1: VLIV NASTAVENÉHO PRŮTOKU NA PRŮMĚR KOLAGENOVÉHO VLÁNKY (NAPĚTÍ KONST. 45kV)</i>	18
<i>GRAF 2: VLIV POUŽITÉHO NAPĚTÍ NA PRŮMĚR KOLAGENOVÉHO VLÁNKY (PRŮTOK KONST. 1,5ML/HOD).</i>	18
<i>GRAF 3: ZATĚŽOVACÍ DIAGRAMY TESTOVANÝCH VZORKŮ</i>	25
<i>GRAF 5: KRABICOVÝ GRAF (BOXPLOT) PRO STANOVENÉ TAŽNOSTI</i>	28
<i>GRAF 4: KRABICOVÝ GRAF (BOXPLOT) PRO STANOVENÉ MEZE PEVNOSTI</i>	28
<i>GRAF 6: KRABICOVÝ GRAF (BOXPLOT) PRO STANOVENÉ SMLUVNÍ MODULY PRUŽNOSTI</i>	29