

**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

**FAKULTA STROJNÍ**

**Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**



## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vliv stabilizace chitosanu na mechanické vlastnosti  
kompozitních nosičů pro regeneraci kostní tkáně

Praha 2017

Kristýna Kubášová

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kubášová** Jméno: **Kristýna** Osobní číslo: **437084**  
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**  
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**  
Studijní program: **Teoretický základ strojího inženýrství**  
Studijní obor: **bez oboru**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Vliv stabilizace chitosanu na mechanické vlastnosti kompozitních nosičů pro regeneraci kostní tkáně**

Název bakalářské práce anglicky:

**The Effect of Chitosan Stabilisation on Mechanical Properties of Composite Scaffolds For Bone Tissue Regeneration**

Pokyny pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na téma kompozitních nosičů mezenchymálních kmenových buněk se zaměřením na kompozity na bázi přírodních polymerů. 2. Navrhněte metodiku a realizujte experimentální analýzu mechanických vlastností nosičů v suchém a hydratovaném stavu. 3. Analyzujte vliv stabilizace chitosanu na mechanické vlastnosti a degradabilitu nosičů. 4. Zpracujte a interpretujte získané výsledky, formulujte závěry. Rozsah práce: cca 30 stran A4.

Seznam doporučené literatury:

1. FRATZL, Peter. Collagen: structure and mechanics. New York: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-73905-2.
2. SUCHÝ, Tomáš, et al. The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds - an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells. Biomedical Materials, 2015.
3. VARLEY, M. C., et al. Cell structure, stiffness and permeability of freeze-dried collagen scaffolds in dry and hydrated states. Acta biomaterialia, 2016.
4. ČSN ISO 13314. Mechanické zkoušení kovů - Zkoušení tvářitelnosti - Zkouška poréznicích a pěnových kovů tlakem. První vydání. Praha: ÚNMZ, 2012.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

**Ing. Radek Sedláček Ph.D., ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky FS**


Jméno a pracoviště druhé(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

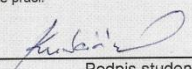
  
Podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

  
Podpis děkana(ky)

## III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Studentka bere na vědomí, že je povinna 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.

26.4.2017  
Datum převzetí zadání

  
Podpis studentky

# Anotační list

**Jméno autora:** Kristýna Kubášová

**Fakulta:** Fakulta strojní

**Zadávací ústav:** Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

**Studijní program:** Teoretický základ strojního inženýrství

**Studijní obor:** bez oboru

**Rok:** 2017

**Název bakalářské práce:** Vliv stabilizace chitosanu na mechanické vlastnosti kompozitních nosičů pro regeneraci kostní tkáně

**Název bakalářské práce anglicky:** The Effect of Chitosan Stabilisation on Mechanical Properties of Composite Scaffolds For Bone Tissue Regeneration

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

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

<b>Bibliografické údaje:</b>	počet stran	53
	počet obrázků	34
	počet tabulek	14
	počet příloh	4

**Klíčová slova:** Tkáňové inženýrství; nosič; chitosan; kmenové buňky

**Key words:** Tissue engineering; scaffold; chitosan; mesenchymal stem cells

**Anotace:** Bakalářská práce se zabývá vlivem stabilizace chitosanu na mechanické vlastnosti kompozitních nosičů buněk. V rámci teoretické části je popsána problematika tkáňového inženýrství a materiálů používaných v této oblasti. V experimentální části jsou z tlakové zkoušky porézních materiálů vyhodnocovány hodnoty poměrných deformací a napětí, z nichž poté stabilní hladina napětí, elastický gradient a smluvní mez kluzu v tlaku.

**Abstract:** This bachelor thesis deals with the impact of stabilization on mechanical properties of composite cell carriers. The theoretical part describes tissue engineering and materials used in this area. Relative deformation and stress values are evaluated within the experimental part. These values are later used to evaluate the plateau stress level, gradient elasticity and compressive yield strength.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala zcela samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

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

V Praze dne 9. 6. 2017

.....

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu Ing. Radkovi Sedláčkovi, Ph.D. za odbornou pomoc při realizaci experimentu a cenné rady při vyhodnocování a zpracování této práce. Poděkování patří také panu Ing. Tomášovi Suchému, Ph.D. za odborné konzultace k teoretické části práce a možnost osobně se účastnit příprav i implantací.

## Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk .....	8
1 Úvod .....	9
2 Teoretická část .....	10
2.1 Tkáňové inženýrství .....	10
2.2 Scaffold .....	10
2.2.1 Materiály vhodné pro přípravu nosičů buněk .....	11
2.2.2 Kmenové buňky .....	14
2.2.3 Vlastnosti ideálního scaffoldu .....	15
3 Experimentální část .....	17
3.1 Použité materiály a příprava vzorků .....	17
3.2 Stabilizace .....	18
3.3 Příprava vzorků pro mechanické zkoušky .....	21
3.4 Metodika experimentu .....	23
3.4.1 Postup zkoušky .....	23
3.4.2 Použitá zařízení testu .....	23
3.4.3 Vyhodnocované parametry .....	25
3.5 Realizace experimentu – měření .....	26
3.5.1 Změření vzorku .....	26
3.5.2 Odhad stabilní hladiny napětí $\sigma_{pl}$ .....	27
3.5.3 Stanovení hodnot pro odlehčovací hysterezní smyčku .....	28
3.5.4 Stanovení maximální zatěžovací síly $F_{max}$ .....	28
3.5.5 Zatěžování s odlehčovací hysterezní smyčkou .....	28
3.5.6 Vyhodnocení stabilní hladiny napětí $\sigma_{pl}$ a ověření, zda byly hodnoty sil $F_{70}$ a $F_{20}$ nastaveny správně .....	29
3.5.7 Stanovení rychlosti deformace .....	30

3.6	Vyhodnocení dat .....	31
3.6.1	Pracovní diagram .....	31
3.6.2	Stabilní hladina napětí $\sigma_{pl}$ .....	35
3.6.3	Elastický gradient $E$ .....	36
3.6.4	Smluvní mez kluzu $\sigma_{kpd}$ .....	37
3.6.5	Stanovení odchylek .....	39
4	Výsledky a diskuse .....	40
5	Závěr .....	44
6	Použitá literatura .....	45
	Seznam obrázků .....	47
	Seznam tabulek .....	49
7	Přílohy .....	50

## Seznam použitých symbolů a zkratek

$t$	[s]	Čas
$\varepsilon$	[–]	Poměrná deformace
$E$	[Pa]	Elastická gradient
$m$	[kg]	Hmotnost
–	[% hmotnostní]	Hmotnostní podíl
$\sigma$	[Pa]	Napětí
$s$	[m]	Posuv
$D$	[m]	Průměr
$S_0$	[m <sup>2</sup> ]	Průřez
–	[s <sup>-1</sup> ]	Rychlost deformace
$F$	[N]	Síla
$\sigma_{kpd}$	[Pa]	Smluvní mez kluzu
$\sigma_{pl}$	[Pa]	Stabilní hladina napětí
$T$	[°C]	Teplota
$p$	[Pa]	Tlak
$h$	[m]	Výška
–	[Pa]	Youngův modul pružnosti

BA	bioapatit
ECM	extracelulární matrix
ESC	embryonální kmenové buňky
HA	hydroxyapatit
MSC	mezenchymální kmenové buňky
SD	standard deviation (směrodatná odchylka)
SEM	standard error of the mean (střední chyba aritmetického průměru)



# 1 Úvod

Pokroky v medicíně vedou k nárůstu průměrné délky života, což s sebou paradoxně přináší nové obtíže, zejména pak nárůst chorob souvisejících s věkem a s tím spojené snížení kvality života. Ztráta kostní tkáně, kterou mohou doprovázet traumata a zranění, zdůrazňuje potřebu nové, více spolehlivé strategie kosterní regenerace. Výzkum v lékařských vědách se v současnosti zaměřuje na zachování nebo podporu funkce nahrazované tkáně nebo orgánů. Proto přichází do popředí vědní obory jako tkáňového inženýrství a regenerační medicína. Současné přístupy využívané pro obnovu nebo tvorbu nových tkání se snaží využívat kmenové buňky, inovativní scaffoldy (v překladu lešení nebo nosiče) a biologické faktory, které slibují rozšířené a více spolehlivé strategie podporující novotvorbu a regeneraci tkání [1, 2].

Cílem tkáňového inženýrství je skloubit biologii (tj. genetiku, biochemii, izolaci a kultivaci buněk aj.) s medicínou (rozvoj transplantace, používání umělých náhrad apod.) a materiálovým inženýrstvím, které se snaží vyvinout co nejlepší materiál, který bude vlastnostmi co nejpřesněji odpovídat nahrazované tkáni. Dalším cílem je z těchto biologicky kompatibilních materiálů vyrobit náhradu nebo scaffold (neboli nosič), který bude v živém organismu napodobovat funkci nahrazené tkáně. Vědci se zaměřují zejména na osazování scaffoldů kmenovými buňkami, které se dokáží v organismu adaptovat a zregenerovat poškozené tkáně [1, 2].

Cílem této bakalářské práce je určit mechanické vlastnosti kompozitního chitosan - bioapatitového nosiče, v závislosti na jeho stabilizaci, která je provedena pomocí dvou různých chemických činidel. Dalším srovnávacím kritériem v této práci je vliv hydratace v podmínkách, které simulují osazování nosičů kmenovými buňkami a vnitřní prostředí organismu. Zkoušené vzorky byly zatěžovány ve 3 stavech – ve stavu suchém a stavech hydratovaných po dobu 24 h a 48 h při 37 °C a v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Z tlakové zkoušky navržené pro porézní materiály byly zpracovány pracovní diagramy a z nich byly vyhodnocovány tři hlavní parametry – stabilní hladina napětí, elastický gradient a smluvní mez kluzu. Cílem prováděných experimentů bylo posoudit vliv různých způsobů stabilizace porézních chitosan - bioapatitových kompozitů a potenciální změny jejich chování během hydratace, která je pro jejich aplikaci v podobě nosičů buněk zásadní.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství jako obor spojující medicínu, biologii a materiálové inženýrství, vzniklo přibližně na počátku 20. století. Rozvíjelo se zejména během první a druhé světové války. V té době zaznamenalo obrovský pokrok a rozvoj především v oblasti transplantací a plastické chirurgie. Velmi důležitým byl pak objev kultivace buněk mimo tělo, tzn. *in vitro*. Až s rozvojem genetiky se začínají používat kmenové buňky k osazování tkáňových nosičů [2].

Těchto metod se využívá hlavně pro urychlení regenerace po nemoci či úrazu, pro rychlejší hojení oslabeného organismu, nebo u pacientů, kteří potřebují úplnou (resp. částečnou) náhradu nebo opravu poškozených orgánů (např. chrupavka, kost, kůže, srdeční chlopeň, cévy apod.) [2].

Na poškozené místo se mohou transplantovat buď jen buňky, nebo jen materiály, tzn. scaffoldy bez buněčného materiálu, avšak nejlepší je kombinace scaffoldů s buňkami, popř. se začleněním biologicky aktivního materiálu [2].

Při transplantaci výhradně buněk, většinou injekční podání, dochází k přesunu buněk z místa vpichu (tj. většinou defektu) na jiná místa v organismu. K efektivnímu začlenění a růstu také potřebují dostatečnou výživu a vhodné prostředí, které poskytuje právě mezibuněčná hmota. Naopak scaffoldy bez buněčného materiálu se využívají v případech, kdy má poškozená tkáň velkou regenerační schopnost nebo v případech, kdy materiál slouží jako dočasná výplň místa poškození. Tato léčba je však velmi omezená a pro mnohé tkáně neefektivní. Právě pro neefektivnost těchto dvou terapií se vyvíjí léčba založená na kombinaci obojího. Spojením živého a neživého materiálu získáme kompozit, který zajišťuje vhodné prostředí pro růst buněk a zároveň nahrazuje chybějící materiál (např. kosti, chrupavky) [2].

### 2.2 Scaffold

Scaffoldy jsou nosiče nahrazující tkáň. Skládají se z neživých i živých, tj. buněčných materiálů. Tento fakt podporuje dostatečné mechanické vlastnosti a zejména pak snazší začlenění do organismu. Scaffoldy můžeme rozdělit na biologické, tj. získané ze zvířecích nebo lidských tkání, nebo na syntetické nosiče, které jsou vyráběny z mnoha různých materiálů. Zvýšeným využíváním rekonstrukčních postupů v ortopedii, v důsledku

traumatu, nádoru, deformity, degenerace a stárnutí populace, se množství těchto nových materiálů rozšiřuje [1].

Scaffoldy se z hlediska struktury dělí na porézní, vlákenné scaffoldy a hydrogely. Porézní scaffoldy strukturou připomínají houbu nebo pěnu. Vlastnosti těchto nosičů závisí na použitém materiálu, na velikosti pórů, jejich hustotě a propojení. Porézní materiály se používají k osazování buňkami a léčivy, protože póry poskytují volnost pro migraci buněk a transport výživných a odpadních látek. Tyto materiály se vyrábí např. lyofilizací (použito i v mé práci). Vhodnými materiály pro výrobu porézních nosičů jsou např. chitosan, kyselina hyaluronová, kolagen aj. Vlákenné nosiče jsou na bázi textilně zpracovatelných materiálů. Pro výrobu těchto scaffoldů jsou využívány většinou polymery, např. kopolymery na bázi kyseliny mléčné (polylaktid). Samotný scaffold může být pak tvořen tkanou nebo netkanou textilií. V závislosti na přesném použití lze kombinovat různé průměry vláken, dále hustotu a velikost pórů. Tyto scaffoldy jsou bohužel velmi nákladné a jejich použití je mnohdy velmi komplikované. Posledním typem jsou nosiče ve formě hydrogelu. Ty se dají snadno tvarovat, a proto jsou vhodné pro výplň defektů nepravidelných tvarů a velikostí. Jejich vlastnosti závisí zejména na koncentraci, molekulové hmotnosti a hustotě zesílení gelu. Tato struktura umožňuje transport látek do i z postižené tkáně. Nevýhodou hydrogelů oproti porézní struktuře jsou nedostatečné mechanické vlastnosti [2].

### 2.2.1 Materiály vhodné pro přípravu nosičů buněk

Tkáňové inženýrství rozlišuje tři základní stavební prvky lidské tkáně – buňky, mezibuněčnou hmotu (pro buněčnou proliferaci a diferenciaci – tzv. přirozený scaffold) a biologicky aktivní látky (např. růstové faktory apod.) [2].

**Biomateriál** lze definovat třemi způsoby, (I) jako neživý materiál použitý v lékařských přípravcích určený k interakci s biologickými systémy; (II) dále jako materiál určený k ochraně, posílení nebo náhradě tkání, orgánů nebo tělesných funkcí, používaný v těsném kontaktu s biologickými systémy; (III) nebo jako syntetický materiál, který je v kontaktu s živou tkání, určený k náhradě části živého systému nebo funkce [1].

Vývoj biomateriálů je poháněn touhou nahradit nemocné tkáně nebo orgány a nahradit novými, uměle vytvořenými. Nový materiál pak nastartuje regenerační procesy, které budou schopny obnovit funkční fyziologii poškozené tkáně. Dalšími důležitými faktory

těchto materiálů, zejména pro klinické aplikace, jsou pak jejich degradabilita a kompatibilita produktů degradace [1].

Tradiční syntetické porézní scaffoldy jsou vyrobeny z polymerů, keramiky nebo kompozitních biomateriálů i kovů [2].

Syntetické scaffoldy se často špatně integrují s buňkami a okolními tkáněmi příjemce, což vede k neuspokojivým chirurgickým výsledkům, které mohou být způsobeny například korozi a opotřebením, nesouladem mechanických vlastností, nepřívětivým povrchem a dalšími nepříznivými vlastnostmi. Právě kvůli těmto obtížím se tkáňové inženýrství snaží nalézt vhodný materiál, který bude co nejpodobnější vlastní lidské tkáni [1].

Zástupci materiálů, které se používají pro výrobu scaffoldů:

- **Biokeramika** – zahrnujících hydroxyapatit nebo fosforečnany vápenaté, které obvykle vykazují dobrou integraci kostní hmoty, jsou osteokonduktivní, mají vysokou pevnost v tlaku, ale jsou křehké [1]
- **Přírodní polymery** – například proteiny extracelulární matrix (např. kolagen, fibrin, elastin, alginát, kyselina hyaluronová), a **xenogenní odvozené materiály**, jsou vnitřně biokompatibilní a dosáhly již klinického využití s minimálně nepříznivými imunologickými reakcemi [1]
- **Syntetické polymery** – paleta makromolekul (např. polyethylenglykol (PEG), polylaktid, polykaprolakton, polyglykolid), modulována na základě jejich monomerních složek, tvoří základ polymerních materiálů pro tkáňové inženýrství [1]
- **Hydrogel** – hydratovaný polymerní řetězec, nabízí značný potenciál v dodávce buněk a růstových faktorů. Tyto materiály podporují adhezi buněk a dalších proteinů, umožňují migraci buněk a usnadňují zabudování bioaktivních molekul a živin, a jejich následné řízené uvolňování v čase a prostoru [1]
- **Kompozitní materiály** – složeny ze dvou nebo více vzájemně oddělených fází, které si ponechávají v materiálu své vlastnosti, avšak do celku se promítají pouze přednosti a nedostatky se potlačují, z toho plyne, že výsledky kompozitu jsou lepší než vlastnosti jednotlivých složek [13]

Níže jsou podrobněji popsány tři přírodní materiály, které se používají pro výrobu scaffoldů nejčastěji. Bioapatit společně s chitosanem tvoří hlavní složky směsi, které byly použity pro výrobu kompozitních nosičů zkoušených v rámci experimentální části této bakalářské práce (viz kapitola 3). Kolagen je uveden především kvůli častým aplikacím v této oblasti tkáňového inženýrství.

**Bioapatit (BA)**, neboli kostní minerál patří do skupiny kalcium fosfátů a vykazuje strukturální i chemické vlastnosti podobné hydroxyapatitu (HA). Lidské kosti neobsahují čistý hydroxyapatit, ve struktuře kostního minerálu se nachází další chemické prvky, např. ionty hořčíku, sodíku, železa, chloru apod. Bioapatit vykazuje vynikající biokompatibilitu s měkkými i tvrdými tkáněmi, což z něj činí ideálního kandidáta pro ortopedické a dentální implantáty nebo složky implantátů. Syntetický HA je široce používán pro regeneraci tvrdých tkání, opravu kosti, pro augmentaci kosti, dále jako povlak implantátů nebo jako plnivo v kosti a zubech. S odkazem na nízkou mechanickou pevnost normálního BA se omezuje jeho použití na aplikace s nízkou únosností. Nedávné pokroky v oblasti nanovědy a nanotechnologií obnovily zkoumání formace BA a jasněji definovaly jeho vlastnosti. To znamená, že BA může být ideálním biomateriálem – zejména kvůli své biokompatibilitě a integračním schopnostech [11].

**Chitosan** patří mezi přírodní polymery typu polysacharidů (poly-D-glukosamin), je odvozený od druhého nejrozšířenějšího polysacharidu (hned po celulóze) chitinu. Vykazuje výborné biologické vlastnosti, je biokompatibilní, biologicky rozložitelný a má nízkou toxicitu. Chitosan je navíc pouze pozitivně nabitý biopolymer a je schopen interagovat se strukturálními molekulami přítomnými v ECM. Kvůli těmto kvalitám se stal vhodným kandidátem v oblasti biomateriálů, používaných nejen v regeneraci kostní tkáně. Jeho pozoruhodná bioaktivita zahrnuje podporu hojení ran, hemostatickou aktivitu a imunitní zesílení. Chitosan je také slibný jako nosný polymer pro dodávání genů, buněčnou kulturu a tkáňové inženýrství [7, 8].

Jeho uplatnění je velmi různorodé, počínaje biomedicínou, přes kosmetiku, fyzikální chemii, agrochemii, čištění vody, až po konzervaci potravin či impregnaci textilií. Dále je široce užíván jako doplněk stravy pro snížení hladiny cholesterolu a k redukci hmotnosti. Chitosan také zjevně podporuje hojení ran a umožňuje vysoce kvalitní kosmetické restaurování [7, 8, 9].

**Kolagen** přírodní polymer, jehož molekula se skládá ze tří polypeptidových řetězců. Jako jeden z univerzálních vzorů biomateriálu, má mnoho jedinečných výhod včetně vynikající biologické kompatibility, žádoucí biologické rozložitelnosti. Kromě toho mechanické vlastnosti a bioaktivita kolagenových materiálů může být účinně zlepšena hybridizací bioaktivní anorganickou fází, například BA. Používá se pro regeneraci kostní tkáně. Jeho nevýhodou je nedostatečná mechanická podpora buňkám a dále pak riziko přenosu patogenů, v závislosti na jeho zpracování. Existuje několik forem, ve kterých je kolagen aplikován, například nosiče, vlákna, filmy, prášky a povlaky, které byly dosud zkoumány [6, 14, 15].

### 2.2.2 Kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) vyvolaly v uplynulém desetiletí velké množství nadšení jako nová terapeutická paradigma pro různé nemoci. Klinická aplikace MSC se přičítá hlavně jejich čtyřem významným biologickým vlastnostem – schopnosti začlenit se na místa zánětu po poranění tkáně při intravenózním podání; schopnost diferenciovat se na různé typy buněk; vylučovat několik bioaktivních molekul schopných stimulovat zotavení poškozených buněk a inhibovat zánět. Kmenové buňky mají schopnost se sebeobnovovat a vytvářet buňky různých linií [2, 5].

Obecně řečeno, existují dva hlavní typy kmenových buněk: embryonální a neembryonální. Embryonální kmenové buňky (ESC) jsou odvozeny z vnitřní buněčné hmoty blastocysty a mohou se diferencovat na buňky všech tří zárodečných vrstev. Mohou být izolovány z různých tkání a jsou v současné době nejčastěji používané buňky v regenerační medicíně [2, 5].

MSC mají schopnost migrovat a najít místa zánětu. Mnohé studie prokázaly, že při různých patologických stavech, se MSC dokáží dostat na místa poškození, která se nachází v odlišných tkáních. Různorodé donorové buňky nahradily prázdné místo, které v tkáni zůstalo po odumřelých buňkách, a tím přispěli k udržení strukturální integrity a předešly tak následné regeneraci tkáně [2, 5].

Během uplynulého desetiletí bylo na MSC zveřejněno velké množství publikací, které popisovali vlastnosti v experimentální a klinické aplikaci nebo jejich základní molekulární mechanismy. Přestože byly provedeny obrovské pokroky v předklinických i klinických studiích, musí být ještě před samotnou léčbou vyřešeny závažné problémy (bezpečnost, konečné účinky na organismus apod.). Dosud bylo zaznamenáno jen málo

nežádoucích účinků po podání MSC, ale relativně malý počet pacientů, kteří jsou MSC léčeni, neumožňuje vyvodit konečné závěry o efektivitě a bezpečnosti [2,5].

### 2.2.3 Vlastnosti ideálního scaffoldu

Tkáňové nosiče pro biomedicínské aplikace by měly mít dobré biologické a mechanické vlastnosti, aby poskytly optimální podmínky pro růst buněk a dostatečnou strukturální podporu. Ideální scaffoldy by měly mít i velmi dobře propojenou makroporézní strukturu, která je podobná přirozené kosti. Tato funkce je nezbytná pro rychlou regeneraci kosti, protože umožňuje prostor pro růst nových buněk a nové tkáně, vhodnou vaskularizaci a okysličování [3, 4].

Vzhledem k potenciálnímu biomedicínskému použití materiálu je také velmi důležité zjistit, jak zvýšit schopnost průtoku tekutiny. Schopnost absorbovat tekutiny zajišťuje totiž dostatečný průtok metabolitů pro růst buněk a je také rozhodujícím faktorem pro aplikace jako například nosiče léčiv [3].

Důležitým faktorem je také změna objemu náhrad po namočení ve fyziologickém roztoku nebo kultivačním médiu. Nabobtnání materiálu může vyvolat zvýšený tlak po implantaci, což může následně vést k degradaci okolní tkáně, současně může docházet ke snížení porozity a snížení permeability, tedy průtoku důležitých tekutin [3].

Ideální lešení by mělo **napodobovat** přirozenou **extracelulární matrix** (ECM), stejně jako v přirozených tkáních. ECM podporuje adhezi buněk, jejich proliferaci a diferenciaci, což naznačuje, že nosiče by měly vykazovat vhodné biochemické vlastnosti a vhodnou topografii povrchu v mikro i nano měřítku, s cílem vytvářet příznivá vazebná místa pro interakci s buňkami. Jinými slovy by mělo být **tzv. biokompatibilní**, což zkráceně znamená, že nesmí být toxické a nesmí jakkoli negativně ovlivňovat jeho buněčné prostředí [2, 4].

Kromě toho se musí pomýšlet na **rychlost rozkladu, tzv. biodegradabilitu** a vedlejší produkty biologicky rozložitelných materiálů. Mechanická integrita scaffoldu je významně snížena v případě, že je rychlost degradace příliš velká, protože vede ke ztrátě stability nosiče ještě předtím, než se tkáň regeneruje. Není příznivá ani opačná situace, kdy se scaffold odbourává moc pomalu, protože může bránit růstu a produkci vlastním buňkám. Dalším problémem je, že se vedlejší produkty při odbourávání mohou měnit v mikroprostředí tkáně, a poté napadat biokompatibilitu implantátu a následně opravované tkáně. Produkty by měly být proto také netoxické a biokompatibilní [2, 4].

Biomateriály pro regeneraci kostní tkáně by měly mít také **mechanické vlastnosti**, které odpovídají vlastnostem nahrazované tkáně. To je velmi důležité pro zátěžové aplikace nosičů buněk, které jsou vystaveny vysokému mechanickému zatížení. Pro správnou funkci scaffoldů je podstatná i stálost mechanických vlastností v hydratovaných stavech, resp. v prostředích s tělní teplotou a atmosférou, pro která jsou tyto materiály navrhované. Bylo zjištěno, že mechanické vlastnosti mohou významně ovlivnit integritu mezi implantáty a okolními tkáněmi, ale stejně tak i buněčné chování. Kostní tkáň, v závislosti na typu nebo umístění, vykazuje hodnoty Youngova modulu v rozmezí 1 – 27 GPa. Aby se předešlo možným pooperačním stresovým ochranným účinkům, které mohou způsobovat selhání implantátu, a aby udržely integritu, dokud se nová tkáň neobnoví, měly by se používat materiály s dostatečnou **pevností v tlaku**, **pevností v tahu** a Youngovým modulem srovnatelnými s kostí [3, 4].

Je však velmi těžké vyrobit nosič, který má vynikající biologickou kompatibilitu a zároveň dobré mechanické vlastnosti podobné přirozené kostní tkáni. Například pórovité kalcium fosfátové lešení, které se běžně v tkáňovém inženýrství používá, má výbornou biokompatibilitu a osteokonduktivitu, ale má špatné mechanické vlastnosti, a proto není vhodné pro aplikaci v nosných oblastech, protože neposkytuje dostatečné strukturální vlastnosti [3].

Dalším aspektem při vývoji je **snadná zpracovatelnost**. Scaffoldy by měly být snadno vyrobitelné ve všech potřebných tvarech a velikostech, aby se daly jednoduše, bez dalších velkých úprav, ihned použít v praxi [2].

Toto je třeba pečlivě zvážit při navrhování nových biomateriálů pro regeneraci. Z tohoto důvodu je řada původních technických postupů a technik řádně zkoumána a diskutována [2, 4].



## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité materiály a příprava vzorků

V rámci experimentu jsou porovnávány dva typy kompozitních materiálů. Jejich složení, tj. zastoupení jednotlivých složek směsi, je stejné, avšak liší se způsobem stabilizace chitosanu (viz kapitola 3.2).

Tabulka 1- Chemické složení testovaných vzorků a složky použité pro jejich přípravu

	CHITOSAN		BIOAPATIT		H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> COOH
	% hm.	[g]	% hm.	[g]	[g]	[g]
<b>0</b>	58,82	4,00	41,18	2,80	98,00	2,00
<b>1</b>	58,82	4,00	41,18	2,80	98,00	2,00

Bioapatit byl izolovaný z chemicky a tepelně upravené hovězí kosti. Nečistoty z měkkých tkání byly odstraněny zahříváním s 2% roztokem chloridu sodného (NaCl) při teplotě 150 °C a tlaku 0,2 MPa v autoklávu. Tento proces změkčil kost natolik, aby mohla být rozmělněna na pastu. Poté následovalo odmaštění ve směsi aceton – etheru po dobu 24 hodin. Dalším krokem byla reakce se zahřátým NaCl po dobu 24 h. Takto chemicky ošetřené vzorky byly kalcinovány při teplotě 500 °C za atmosférického tlaku a vlhkosti prostředí do konstantní hmotnosti. Nakonec byla hmota promyta deionizovanou vodou a sušena při teplotě 105 °C. Po vysušení bylo odvážené množství bioapatitu smícháno s odváženým množstvím vody a homogenizováno po dobu 15 minut homogenizátorem IKA T25 ULTRA – TURRAX (IKA). Do směsi bylo poté přidáno navážené množství chitosanu (Chitosan, C3646, Sigam-Aldrich) a opět homogenizováno. Po smíchání směsi s 2% kyselinou octovou (CH<sub>3</sub>COOH), se roztok ještě několikrát homogenizuje (Obrázek 2). S ohledem na nadměrné zahřívání během homogenizace směsi musí být kontrolována teplota. Výsledná hmota je injekční stříkačkou vpravena do připravených samostatných válcových forem s vnitřním průměrem 6 mm (Obrázek 3). Takto připravené vzorky byly zmrazeny na teplotu -25 °C a následně umístěny do lyofilizátoru, a lyofilizovány při teplotě -105 °C a při tlaku 1,3 Pa (BenchTop, 4KZL, VirTis).



Obrázek 1 - Příprava složek směsi



Obrázek 2 – Postup homogenizace směsi



Obrázek 3 - Plnění forem směsí

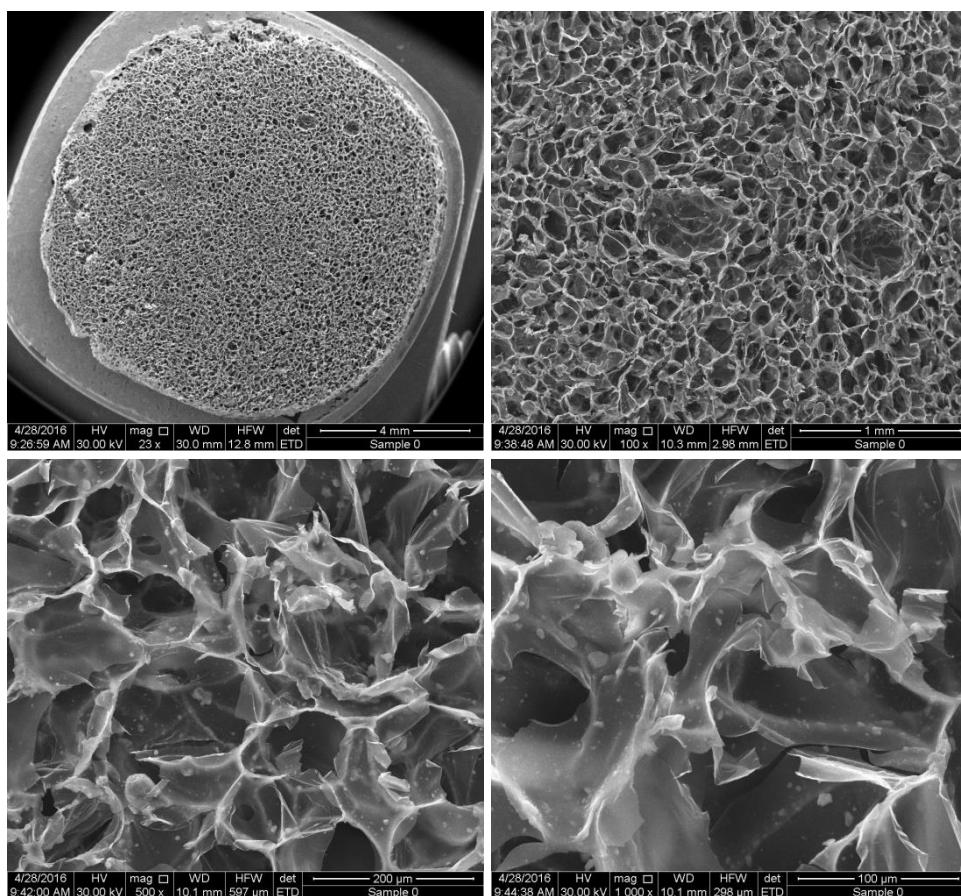
## 3.2 Stabilizace

Chitosanová část nosiče byla zesíťována (stabilizována) dvěma způsoby. Poprvé, za použití chemického ošetření N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochloridem (EDC)/N-hydroxysukcinimidem (NHS). Vzorčky byly zesíťovány 95% roztokem etanolu (Penta, Česká republika) obsahujícího EDC a NHS v hmotnostním poměru 4:1. EDC a NHS (Sigma Aldrich, Německo). Konečné koncentrace EDC na chitosan byly udržovány v hmotnostním poměru 5:8. Konečné množství etanolového roztoku s EDC / NHS bylo 142 ml / 1g chitosanu. Po 24 hodinové reakční době při teplotě 37 ° C byly veškeré scaffoldy promyty v 0,1 M hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (2 x 45 min) (Penta, Česká Republika), poté následovalo oplachování deionizovanou vodou po dobu 30 min. Dále byly vzorky zmrazeny při teplotě -25 °C a opět lyofilizovány.

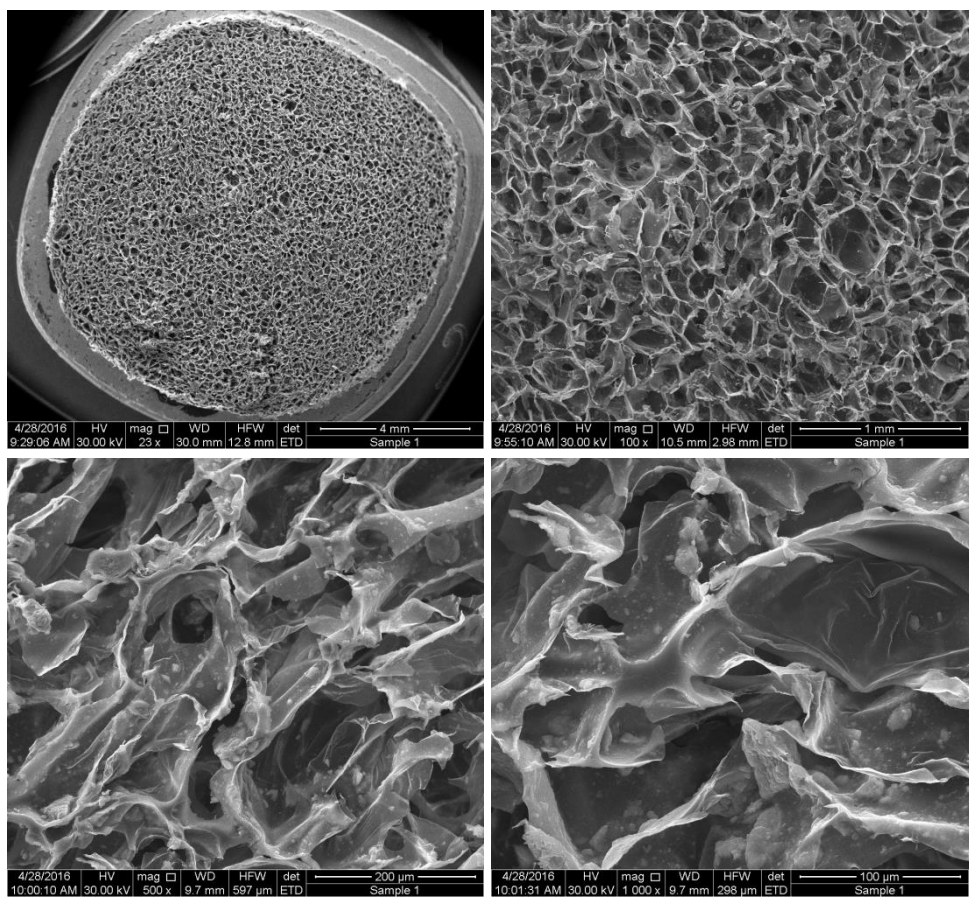
Druhý způsob stabilizace byl proveden dvakrát opakovaným alkalickým zpracováním s použitím 10% roztoku hydroxidu sodného (NaOH) ve vodě po dobu

20 minut a následným opláchnutím deionizovanou vodou taktéž po dobu 20 min. Po tomto postupu byly vzorky taktéž zmrazeny při teplotě  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a lyofilizovány.

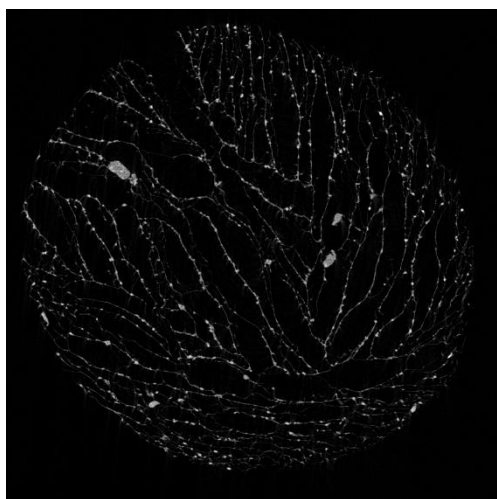
Následující ilustrativní snímky pořízené pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) na Oddělení kompozitních a uhlíkových materiálů ÚSMH AV ČR, a rekonstrukce pořízené pomocí mikro počítačové tomografie (mikro-CT) na pracovišti Ústavu klinické a experimentální stomatologie 1. LF UK a VFN v Praze.



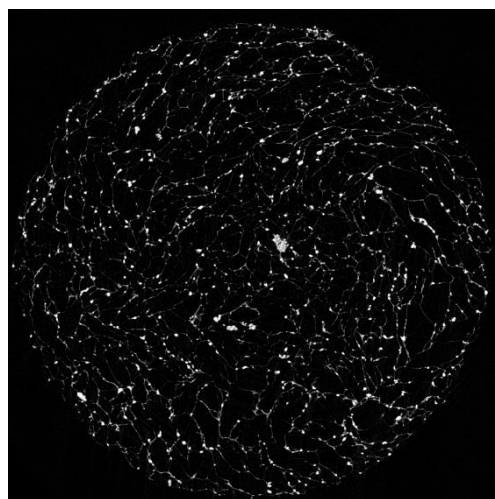
Obrázek 4 – Ilustrativní SEM snímky vzorků skupiny 0 (zvětšení 23x, 100x, 500x, 1000x)



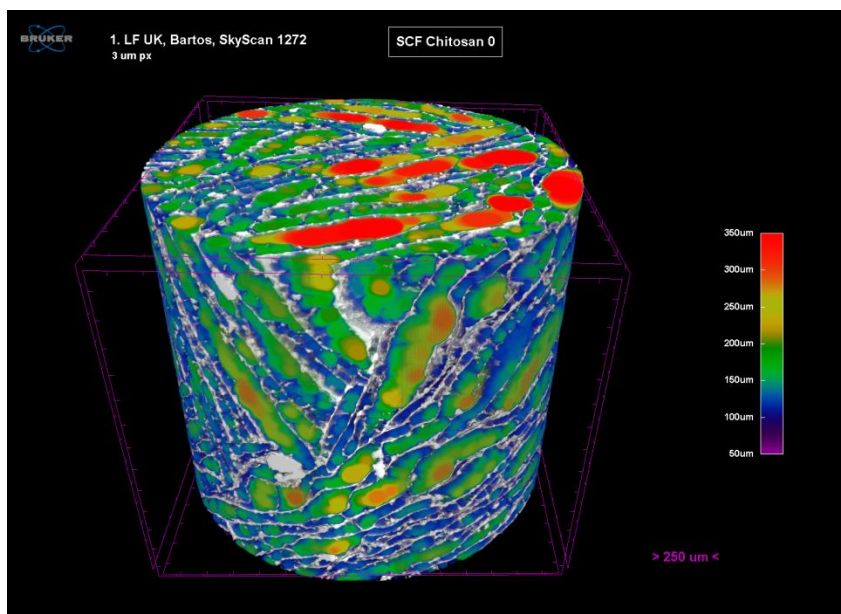
Obrázek 5 - Ilustrativní SEM snímky vzorků skupiny 1 (zvětšení 23x, 100x, 500x, 1000x)



Obrázek 6 - Snímek vzorku skupiny 0 z uCT



Obrázek 7 - Snímek vzorku skupiny 1 z uCT



Obrázek 8 – Mikro-CT rekonstrukce vzorku skupiny 0 s barevně odlišenými různě velkými póry

### 3.3 Příprava vzorků pro mechanické zkoušky

Po přípravě vzorků uvedené v předchozí kapitole se vzorky vyjmou z forem. Projdou vizuální kontrolou, a pokud jsou sešikmené nebo příliš dlouhé, seříznou se, aby nepříznivě neovlivňovaly výsledky experimentu.

Vzorky jsou nejprve rozděleny do skupin označených vždy číslem a písmenem, aby nedošlo k záměně. Číslo (0, 1) označuje, způsob stabilizace chitosanu, který byl u dané skupiny proveden; písmeno (A, B, C) udává, zda je vzorek měřen za suchého nebo hydratovaného stavu (24 h, 48 h). Tabulka 2 popisuje souhrnně označení všech typů vzorků. Pro naše účely slouží pak kombinace čísel a písmen.

Tabulka 2 - Přehled označení jednotlivých skupin vzorků

0	1	A	B	C
stabilizace chitosanu pomocí NaOH	stabilizace chitosanu pomocí EDC	suchý stav	hydratovaný stav po dobu 24 h	hydratovaný stav po dobu 48 h



Obrázek 9 - Rozdělení vzorků do skupin

Suché vzorky (0A, 1A) jsou již připraveny pro měření rozměrů a následné zatěžování. Vzorky určené k hydrataci jsou uloženy, vždy po skupinách, do malé skleněné nádobky, a namočený do kultivačního média McCoy's 5A, medium bez fenolové červeně (Promo Cell, Německo) (MEM). Aby došlo k optimální hydrataci vzorku v celém jeho objemu, jsou vkládány otevřené nádoby do vakuové komory, odkud je odsáván vzduch pro dosažení stupně vakua. Po odejmutí víka exsíkátoru se kontroluje úplné ponoření všech vzorků do média. Pokud jsou všechny ponořeny, uloží se do inkubátoru, kde je nastaveno prostředí 5 % CO<sub>2</sub> a teplota 37 °C, které simuluje podmínky v lidském těle, resp. podmínky, ve kterých jsou nosiče osazovány buňkami. Vzorky jsou namáčeny vždy s časovým odstupem, aby byla zachována přesnost experimentu.



Obrázek 10 - Inkubátor na hydratované vzorky pro udržení stanovených podmínek

## 3.4 Metodika experimentu

Postup experimentu vychází z normy ČSN ISO 13314 – Mechanické zkoušení kovů – Zkoušení tváritelnosti – Zkouška porézních a pěnových kovů tlakem.

Principem je zatěžování zkoušených válcových vzorků vložených mezi dvě kovové desky. Stlačování vzorků probíhá konstantní rychlostí 3,0 mm/min, a dosahuje rychlosti deformace v rozsahu  $10^{-3}$  až  $10^{-2}$  s<sup>-1</sup>. Všechny zkoušky jsou prováděny v laboratorním prostředí při teplotě vzduchu  $23 \pm 5$  °C.

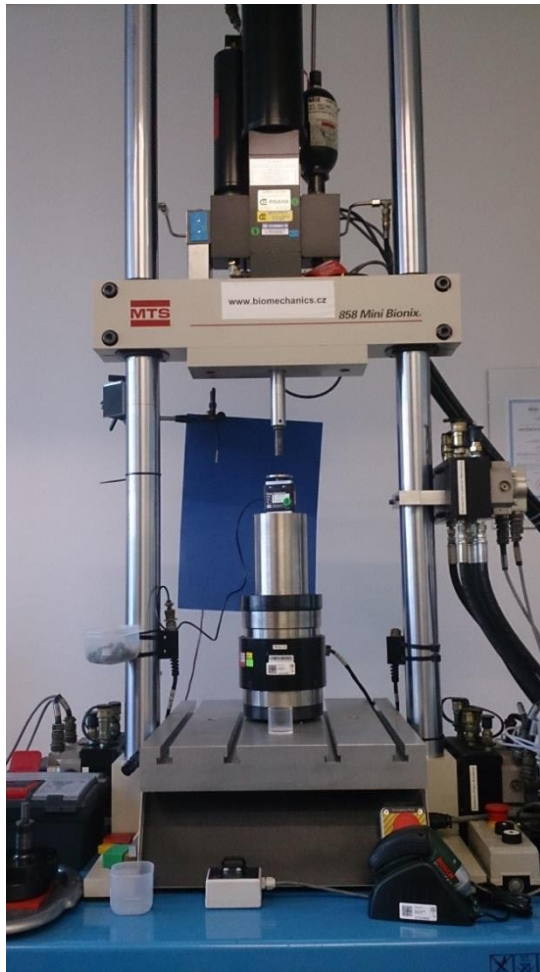
### 3.4.1 Postup zkoušky

- 1) Změření počátečních rozměrů vzorku
- 2) Odhadování stabilní hladiny napětí  $\sigma_{pl}$
- 3) Stanovení sil pro odlehčovací hysterezní smyčku –  $F_{20}$  a  $F_{70}$
- 4) Stanovení maximální zatěžovací síly  $F_{max}$
- 5) Vložení vzorku mezi zatěžovací desky
- 6) Zatěžování spočtenými silami s odlehčovací hysterezní smyčkou
- 7) Vyhodnocení stabilní hladiny napětí  $\sigma_{pl}$  a ověření, zda byly hodnoty  $F_{70}$  a  $F_{20}$  nastaveny správně
- 8) Stanovení rychlosti deformace [s<sup>-1</sup>]
- 9) Ověření zda je rychlost deformace v rozsahu  $10^{-3}$  až  $10^{-2}$  s<sup>-1</sup> [10]

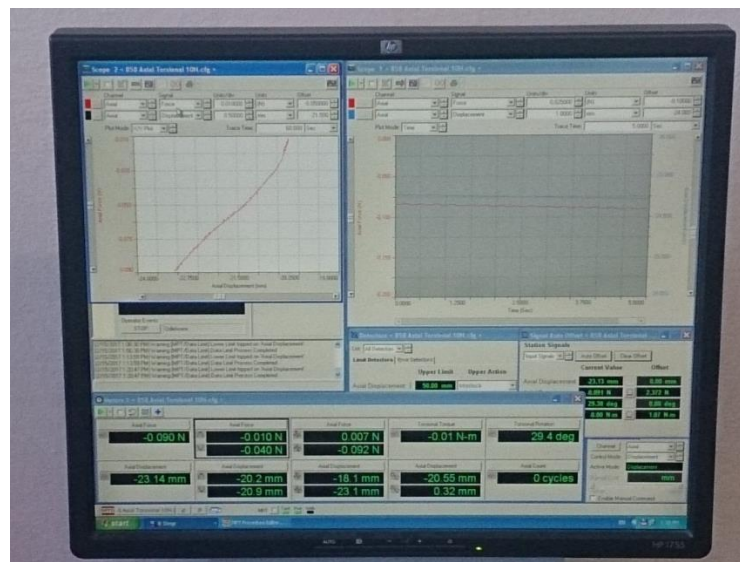
### 3.4.2 Použitá zařízení testu

K testování byl použit systém MTS Mini Bionix 858.02 (metrologické označení PM 00) se silovým snímačem s rozsahem 100 N (metrologické označení PM 00/16), který používáme pro stlačení suchých vzorků a snímačem s rozsahem 10 N (metrologické označení PM 00/08) pro měření hydratovaných vzorků. Pro řízení testu používáme program vytvořený v software FlexTest GT (metrologické označení PM 00/11). Pro měření rozměrů vzorků využíváme digitální mikrometr MAHR 40EX (PM 02). Dále pak pro záznam podmínek prostředí používáme digitální teploměr-vlhkoměr COMET (metrologické označení PM 07).

Všechna měřidla používaná k provádění experimentů v akreditované Laboratoři mechanických zkoušek na ČVUT v Praze, Fakultě strojní jsou navázána nepřerušeným řetězcem na národní etalony a jsou pravidelně kalibrována.



Obrázek 11 - Zatěžovací systém MTS Mini Bionix 858.02



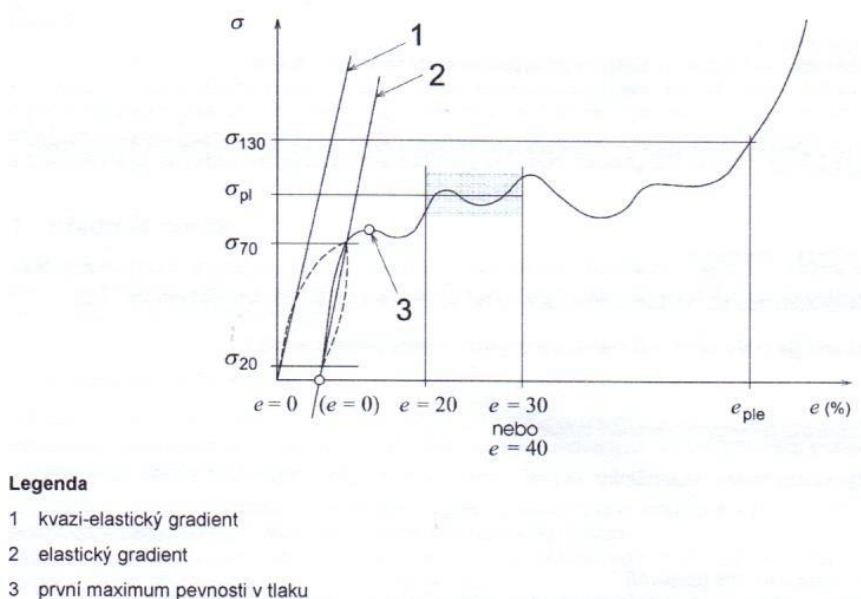
Obrázek 12 - Software pro zaznamenávání dat Flex Test GT



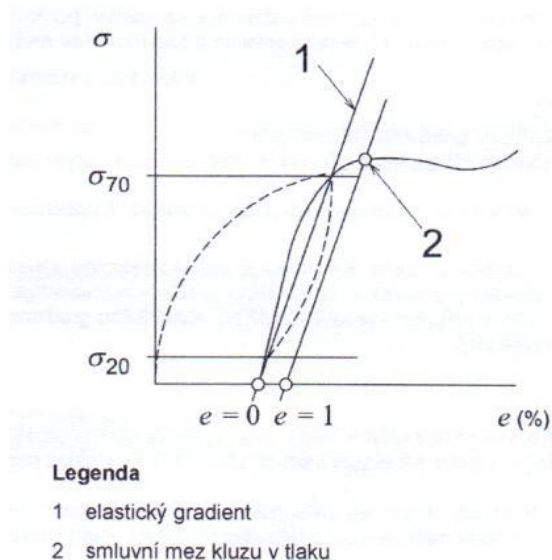
### 3.4.3 Vyhodnocované parametry

Z naměřených dat vyhodnocujeme, pro každý vzorek zatěžovaný tlakem, následující parametry:

- 1) Pracovní diagram – závislost napětí  $\sigma$  [MPa] na deformaci  $\varepsilon$  [–]
- 2) Stabilní hladina napětí  $\sigma_{pl}$  [MPa] (*Plateau stress*) – střední hodnota (aritmetický průměr) naměřených hodnot napětí odečtených v 0,1% intervalech deformace (nebo menších) mezi 20 a 30 % deformace (viz Obrázek 13)
- 3) Elastický gradient  $E$  [MPa] (*Elastic gradient*) – směrnice sečny získané z hysterezní smyčky, která se objeví při odlehčení a následném zatěžování (viz Obrázek 13)
- 4) Smluvní mez kluzu v tlaku  $\sigma_{kpd}$  [MPa] (*Compressive proof stress*) – napětí odečtené při plastickém stlačení o 1,0 %, stanoví se z elastického gradientu jako ekvidistanta směrnice (viz Obrázek 14) [10].



Obrázek 13 – Křivka napětí-deformace pro stanovení charakteristických hodnot [10]



Obrázek 14 – Křivka napětí-deformace pro vyhodnocení elastického gradientu a smluvní meze kluzu [10]

## 3.5 Realizace experimentu - měření

### 3.5.1 Změření vzorku

Vzorek měříme pomocí mikrometru a to vždy  $3 \times$  průměr ( $D$ ) ve třech pootočeních a  $1 \times$  výšku ( $h$ ). Hodnoty zaznamenáváme s přesností na tisícinu milimetru do tabulky. Z aritmetického průměru změřených hodnot průměrů vzorků spočítáme průřez ( $S_0$ ) (viz Tabulka 3).

Tabulka 3 - Příklad zaznamenání a výpočtu rozměrů

Typ zkoušeného vzorku	Číslo vzorku	Průměr vzorku			Ø	Průřez $S_0$ [mm <sup>2</sup> ]	Výška $h$ [mm]
		$D$ [mm]					
0A	033	5,609	5,360	5,625	5,531	24,03	7,745
	034	5,934	5,864	5,959	5,919	27,52	7,039
	035	5,370	6,072	5,266	5,569	24,36	6,940
	036	4,778	5,739	5,122	5,213	21,34	6,795
	037	5,083	5,550	4,496	5,043	19,97	6,765
	038	5,177	5,610	5,684	5,490	23,67	6,851
	039	5,792	5,438	5,708	5,646	25,04	7,579
	040	5,565	5,772	5,466	5,601	24,64	5,637
	041	5,336	5,373	5,351	5,353	22,51	7,039
	042	5,500	5,073	5,257	5,277	21,87	6,920
	043	5,574	5,317	5,820	5,570	24,37	6,815
1A	044	5,603	5,839	5,620	5,687	25,40	6,712
	045	5,268	5,288	5,408	5,321	22,24	7,547
	046	5,639	5,730	5,781	5,717	25,67	6,737
	047	4,428	5,892	5,147	5,156	20,88	6,653
	048	5,933	5,628	5,455	5,672	25,27	7,151
	049	5,378	5,608	5,570	5,519	23,92	6,261
	050	4,888	5,858	5,653	5,466	23,47	7,618
	051	5,513	5,411	5,407	5,444	23,27	7,024
	052	4,901	5,812	5,080	5,264	21,77	7,243
	053	5,589	5,636	5,737	5,654	25,11	6,899



Obrázek 15 - Měření hydratovaného vzorku před zatěžováním

### 3.5.2 Odhad stabilní hladiny napětí $\sigma_{pl}$

Prvotní odhad je proveden dle předchozích zkušeností vedoucího a z měření prvního zástupce dané skupiny. Následující hodnoty jsou odhadovány vždy podle průměrných hodnot dosažených v testované skupině.

### 3.5.3 Stanovení hodnot pro odlehčovací hysterezní smyčku

Hodnoty odlehčovacích sil  $F_{70}$  a  $F_{20}$  jsou počítány dle vzorců (1,2) a zaneseny do tabulky (viz Tabulka 4).

$$F_{70} = 0,7 \cdot \sigma_{pl} \cdot S_0 \quad (1)$$

$$F_{20} = 0,2 \cdot \sigma_{pl} \cdot S_0 \quad (2)$$

Tabulka 4 – Příklad zaznamenávání odhadu stabilní hladiny napětí a výpočtů sil

Typ zkoušeného vzorku	Číslo vzorku	Odhad $\sigma_{pl}$	F70	F20
		[MPa]	[N]	[N]
0A	033	0,25	4,21	1,20
	034	0,30	5,78	1,65
	035	0,20	3,41	0,97
	036	0,25	3,74	1,07
	037	0,20	2,80	0,80
	038	0,35	5,80	1,66
	039	0,38	6,66	1,90
	040	0,40	6,90	1,97
	041	0,38	5,99	1,71
	042	0,40	6,12	1,75
	043	0,40	6,82	1,95
1A	044	0,25	4,45	1,27
	045	0,35	5,45	1,56
	046	0,45	8,09	2,31
	047	0,45	6,58	1,88
	048	0,55	9,73	2,78
	049	0,45	7,53	2,15
	050	0,45	7,39	2,11
	051	0,45	7,33	2,09
	052	0,45	6,86	1,96
	053	0,45	7,91	2,26

### 3.5.4 Stanovení maximální zatěžovací síly $F_{max}$

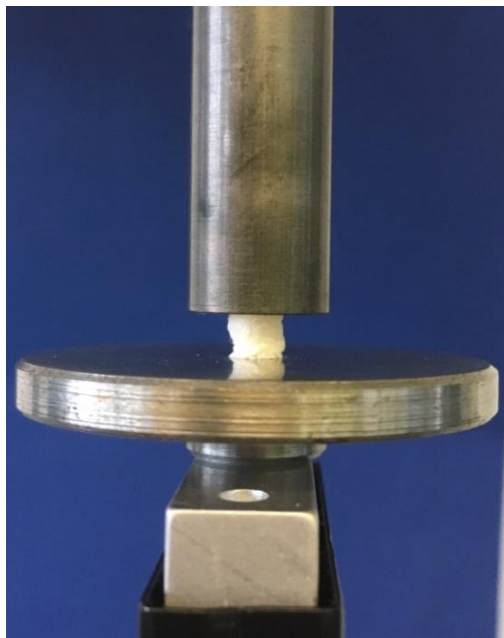
Maximální síla je stanovena ze vztahu 3 (přičemž požadovaná deformace je větší než 50 %). Všechny síly se dosazují do programu v software FlexTest GT, který ovládá zatěžovací systém.

$$F_{max} = 1,3 \cdot \sigma_{pl} \cdot S_0 \quad (3)$$

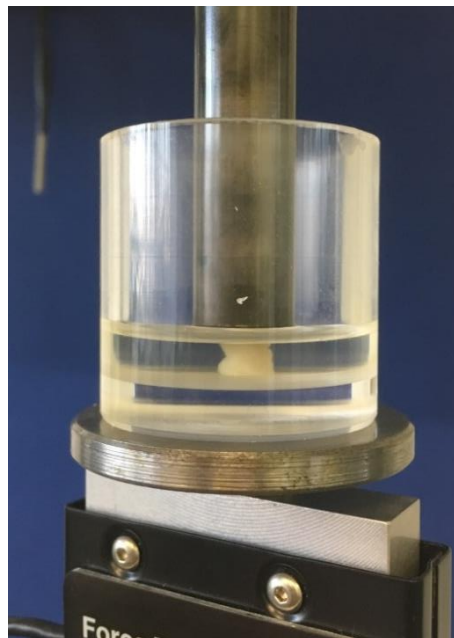
### 3.5.5 Zatěžování s odlehčovací hysterezní smyčkou

Suchý vzorek je vložen rovnou na střed desky, hydratované vzorky do připravené nádoby, která je naplněna médiem tak, aby byl vzorek celý ponořen, ale nedošlo k jeho plavání na hladině.

Po vystředění vzorku na desce je spuštěn zatěžovací program. Vzorek je zatěžován silami spočtenými v kapitolách 3.5.3 a 3.5.4. Zatěžování zkušebních vzorků je ukázáno na obrázcích níže (viz Obrázek 16, Obrázek 17).



Obrázek 16 - Zatěžování suchého vzorku



Obrázek 17 - Zatěžování hydratovaného vzorku

### 3.5.6 Vyhodnocení stabilní hladiny napětí $\sigma_{pl}$ a ověření, zda byly hodnoty sil $F_{70}$ a $F_{20}$ nastaveny správně

Po skončení zatěžování je provedeno vyhodnocení stabilní hladiny napětí  $\sigma_{pl}$  (viz kapitola 3.6.2) a následné porovnání s hodnotou  $\sigma_{pl}$  odhadovanou. Pokud je naměřená hodnota blízká hodnotě odhadované, zvolili jsme rozsahy sil správně a experiment byl proveden v souladu s normou.

Kvůli snazšímu odhadování  $\sigma_{pl}$  pro další vzorky, jsou hodnoty průběžně zaznamenávány do tabulky a průměrovány (viz Tabulka 5).

Tabulka 5 - Příklad zaznamenání naměřených hodnot

Typ zkoušeného vzorku	Číslo vzorku	Odhad $\sigma_{pl}$	F70	F20	Naměřená $\sigma_{pl}$
		[MPa]	[N]	[N]	[MPa]
0A	033	0,25	4,21	1,20	0,267
	034	0,30	5,78	1,65	0,230
	035	0,20	3,41	0,97	0,372
	036	0,25	3,74	1,07	0,474
	037	0,20	2,80	0,80	0,375
	038	0,35	5,80	1,66	0,472
	039	0,38	6,66	1,90	0,509
	040	0,40	6,90	1,97	0,290
	041	0,38	5,99	1,71	0,420
	042	0,40	6,12	1,75	0,365
	043	0,40	6,82	1,95	0,444
1A	044	0,25	4,45	1,27	0,448
	045	0,35	5,45	1,56	0,608
	046	0,45	8,09	2,31	0,488
	047	0,45	6,58	1,88	0,6328
	048	0,55	9,73	2,78	0,380
	049	0,45	7,53	2,15	0,535
	050	0,45	7,39	2,11	0,426
	051	0,45	7,33	2,09	0,523
	052	0,45	6,86	1,96	0,356
	053	0,45	7,91	2,26	0,579

### 3.5.7 Stanovení rychlosti deformace

Rychlost deformace je stanovena z poměru rozdílu deformací  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_2 - \varepsilon_1$  a rozdílu odpovídajících časů  $\Delta t = t_2 - t_1$ , tzn.  $\frac{\Delta\varepsilon}{\Delta t}$ . Pro jednotlivé skupiny, jsou hodnoty zaznamenané do tabulky (viz Tabulka 6) Tabulka 6.

Tabulka 6 - Záznam rychlostí deformací pro vybrané vzorky jednotlivých skupin

Typ – číslo vzorku	Rychlost deformace [ $s^{-1}$ ]
0A – 035	-0,00704
0B – 135	-0,00668
0C – 235	-0,00679
1A – 045	-0,00485
1B – 145	-0,00717
1C – 245	-0,00725

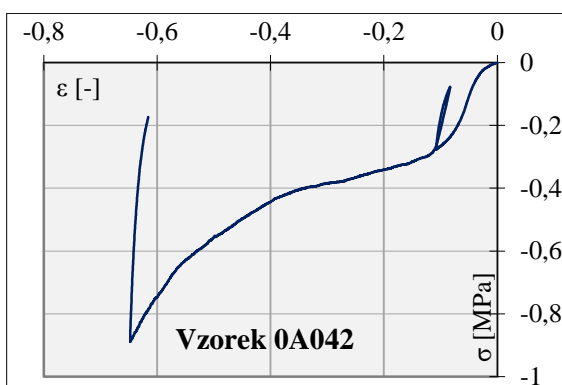
Z tabulky výše (viz Tabulka 6) je patrné, že všechny skupiny vzorků vyhovují podmínce, že rychlost deformace musí ležet v intervalu  $\langle 10^{-3}; 10^{-2} \rangle$ .

## 3.6 Vyhodnocení dat

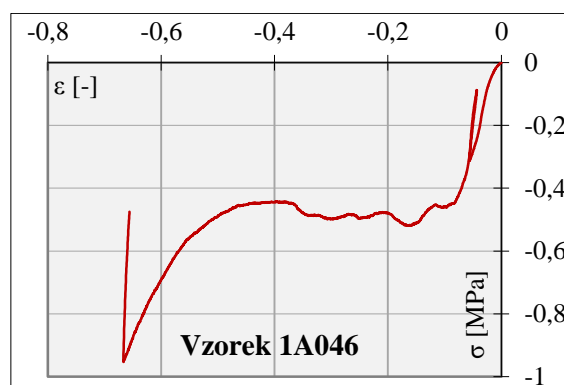
### 3.6.1 Pracovní diagram

Pracovní diagram byl vytvořen pro každý zatěžovaný vzorek. Na vodorovné ose se nachází deformace  $\varepsilon$  [-] a na svislé ose pak napětí  $\sigma$  [MPa]. Vzorky byly zatěžovány tlakem, tudíž se pracovní diagram nachází ve 3. kvadrantu souřadnicového systému, tzn. napětí i deformace jsou záporné hodnoty.

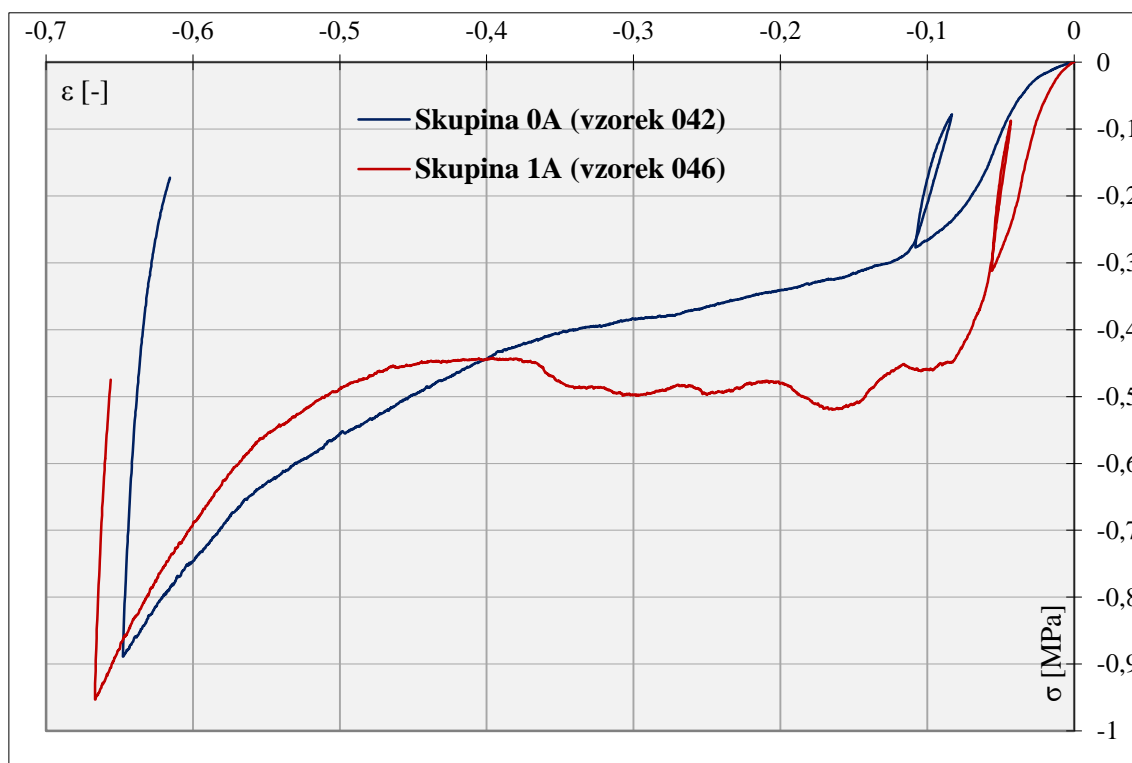
#### 3.6.1.1 Suché vzorky



Obrázek 18 - Pracovní diagram vzorku 0A042



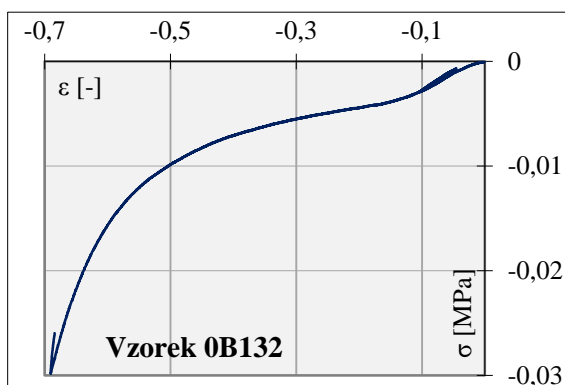
Obrázek 19 - Pracovní diagram vzorku 1A046



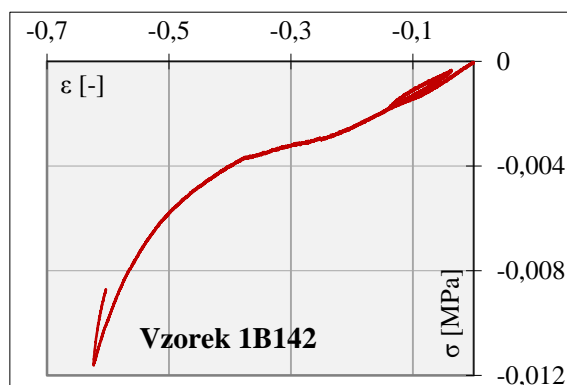
Obrázek 20 - Srovnání pracovních diagramů suchých vzorků

Na obrázku výše (Obrázek 20), který srovnává reprezentativní suché vzorky v obou skupinách, můžeme vidět, že obě skupiny jsou porovnatelné, protože dosahují hodnot deformací i napětí ve stejných řádech. Vzorek skupiny 0A dosahuje maximálního napětí do cca -0,89 MPa, zatímco vzorek 1A do cca -0,95 MPa. Dále je patrné, že směrnice sečny z hysterezní smyčky u skupiny 1A je strmější než u skupiny 0A.

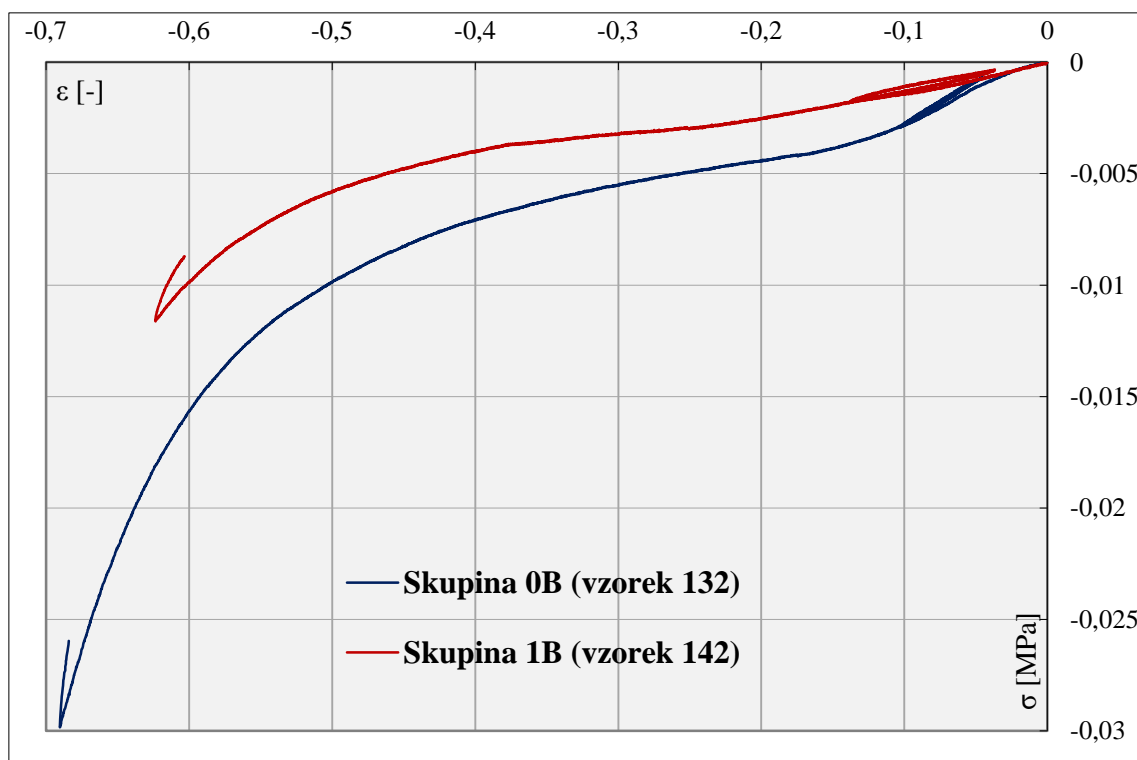
### 3.6.1.2 Vzorky hydratované 24 hod



Obrázek 21 - Pracovní diagram vzorku 0B132



Obrázek 22 - Pracovní diagram vzorku 1B142



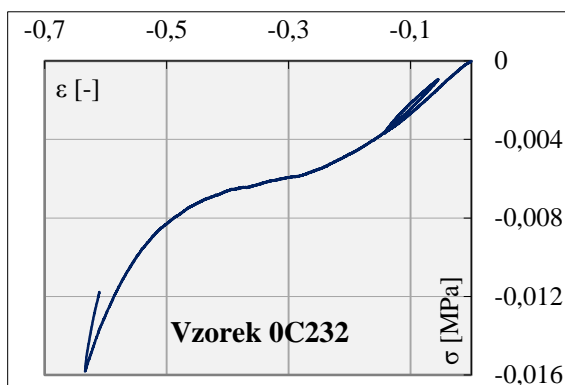
Obrázek 23 - Srovnání pracovních diagramů vzorků hydratovaných 24 h

V grafu (viz Obrázek 23) je vyobrazeno srovnání vzorků skupin 0 a 1 v hydratovaném stavu po dobu 24 h. Na první pohled je patrné, že obě skupiny dosahují

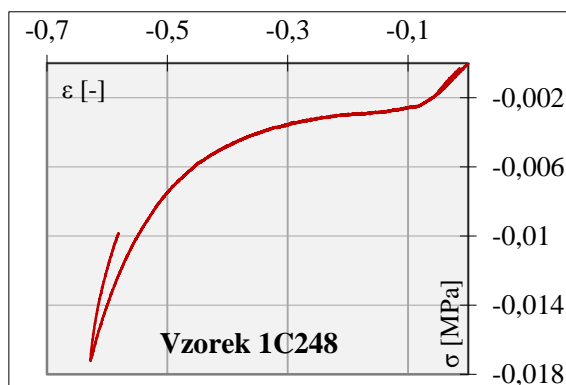


zcela jiných maximálních hodnot napětí, tj. 0B až do cca -0,03 MPa a 1B jen do hodnot cca -0,012 MPa. Směrnicí sečny hysterezní smyčky, tj. elastický gradient, pro skupinu 1B má pozvolnější průběh, tzn. menší hodnotu E než u skupiny 0B.

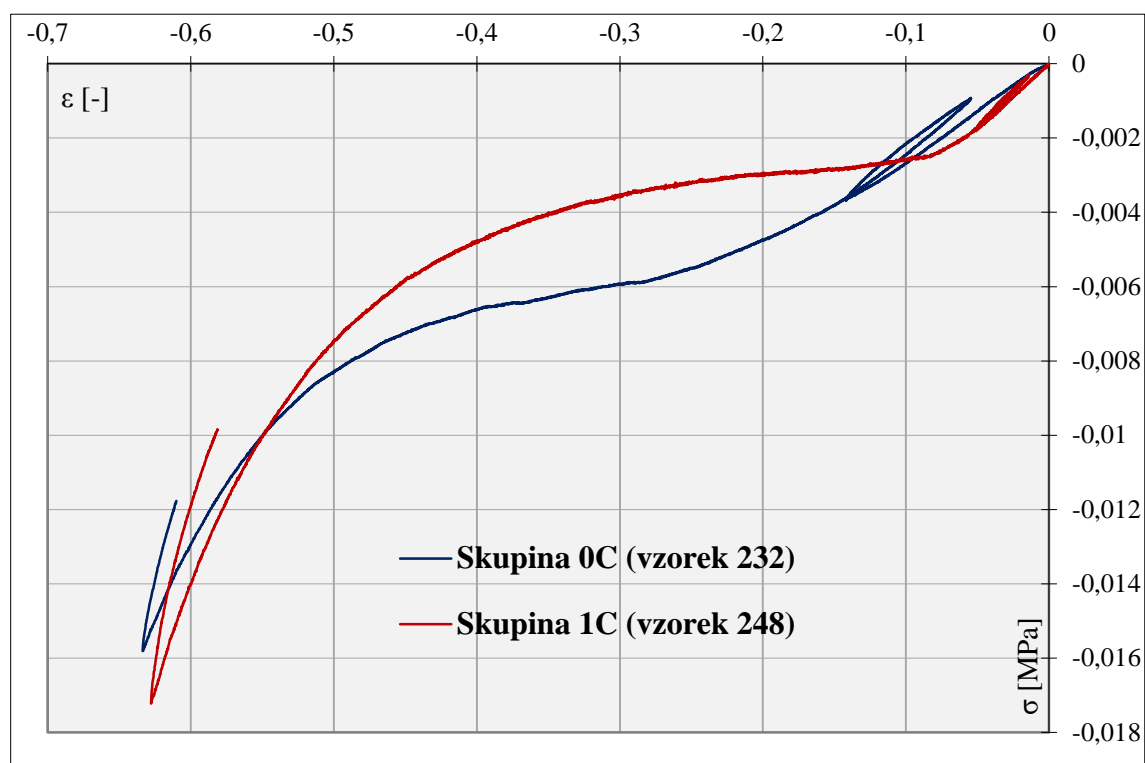
### 3.6.1.3 Vzorky hydratované 48 hod



Obrázek 24 - Pracovní diagram 0C232



Obrázek 25 - Pracovní diagram 1C248

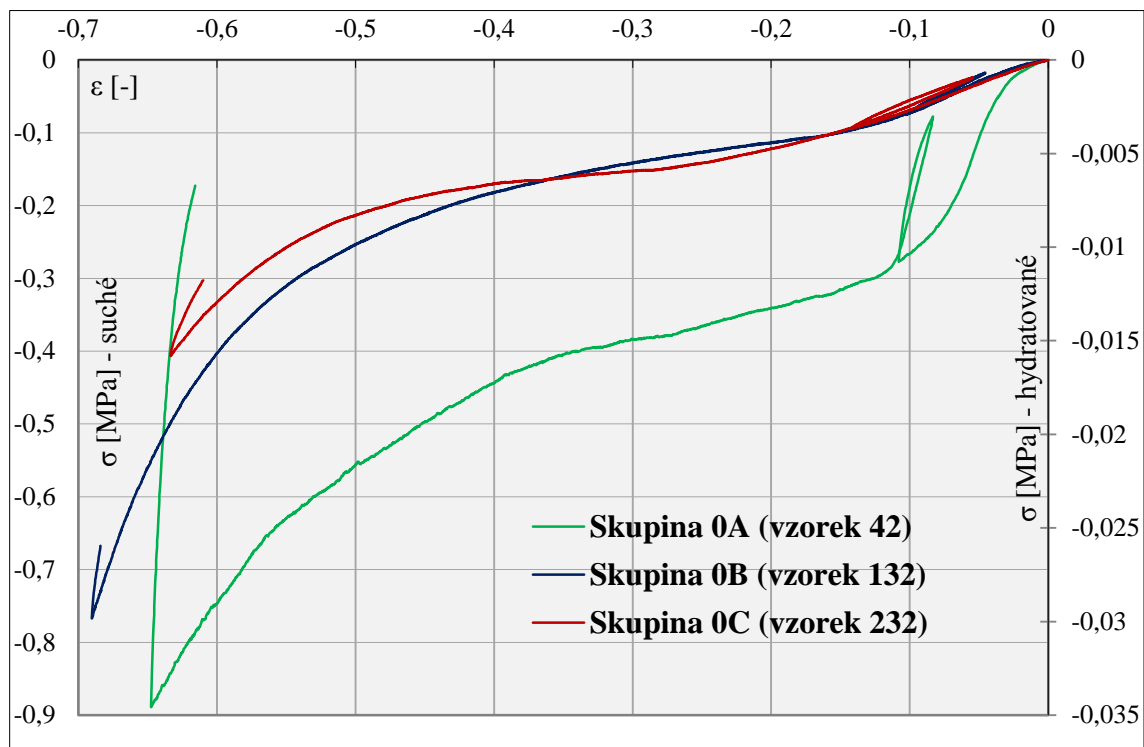


Obrázek 26 - Srovnání pracovních diagramů vzorků hydratovaných 48 h

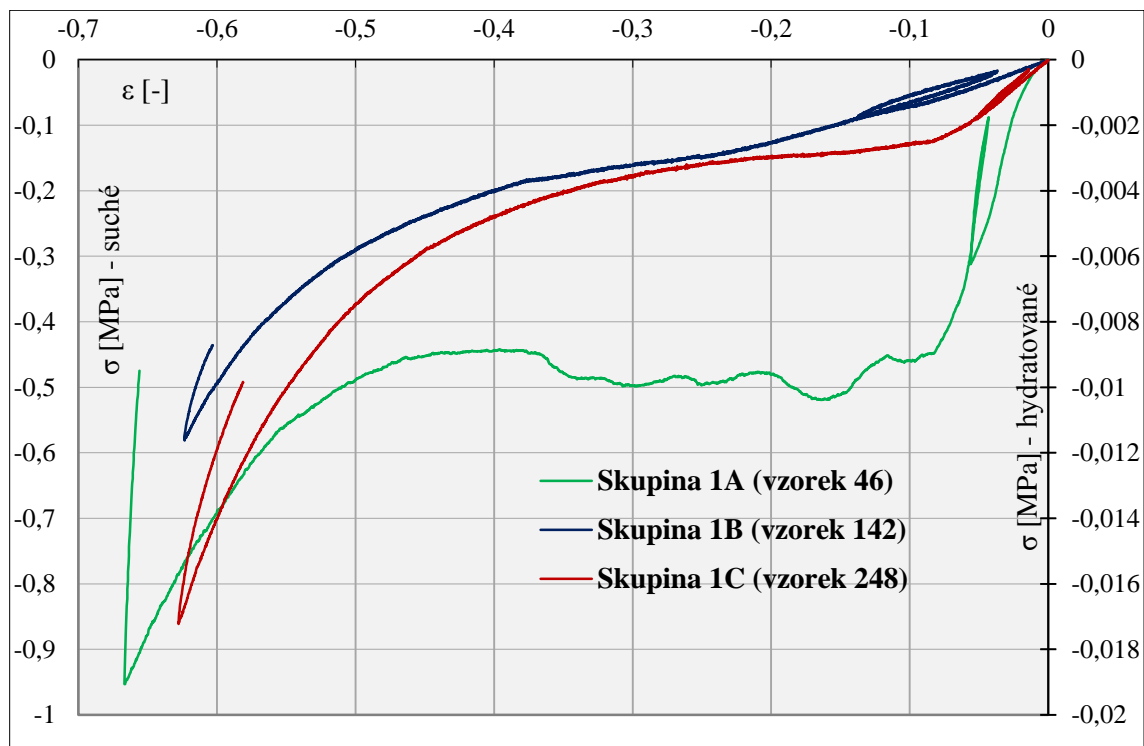
Obrázek 26 znázorňuje pracovní diagramy vzorků skupin 0 a 1 v hydratovaném stavu po dobu 48 h. Hodnoty deformací i napětí se pohybují ve stejných řádech, proto jsou diagramy mezi sebou dobře porovnatelné. Obě skupiny (0C i 1C) dosahují přibližně stejných maximálních napětí i deformací. Průběh zatěžování se v některých intervalech

překrývá, avšak skupina 1C má pozvolnější charakter, tzn. smluvní mez kluzu dosahuje menších hodnot napětí než skupina 0C.

### 3.6.1.4 Vliv hydratace



Obrázek 27 - Pracovní diagram vzorků skupiny 0



Obrázek 28 - Pracovní diagram vzorků skupiny 1

V grafech (viz Obrázek 27, resp. Obrázek 28) jsou vyobrazeny pracovní diagramy vzorků skupiny 0 (resp. 1). Suché vzorky (0A, resp. 1A) dosahují o dva řády vyšších hodnot napětí než vzorky hydratované (0B a 0C, resp. 1B a 1C), proto mají diagramy hlavní a vedlejší osu napětí. Na hlavní ose (vlevo) jsou hodnoty odpovídající suchému stavu (0A, resp. 1A), na vedlejší ose (vpravo) pak hodnoty napětí pro oba hydratované stavy (0B a 0C, resp. 1B a 1C).

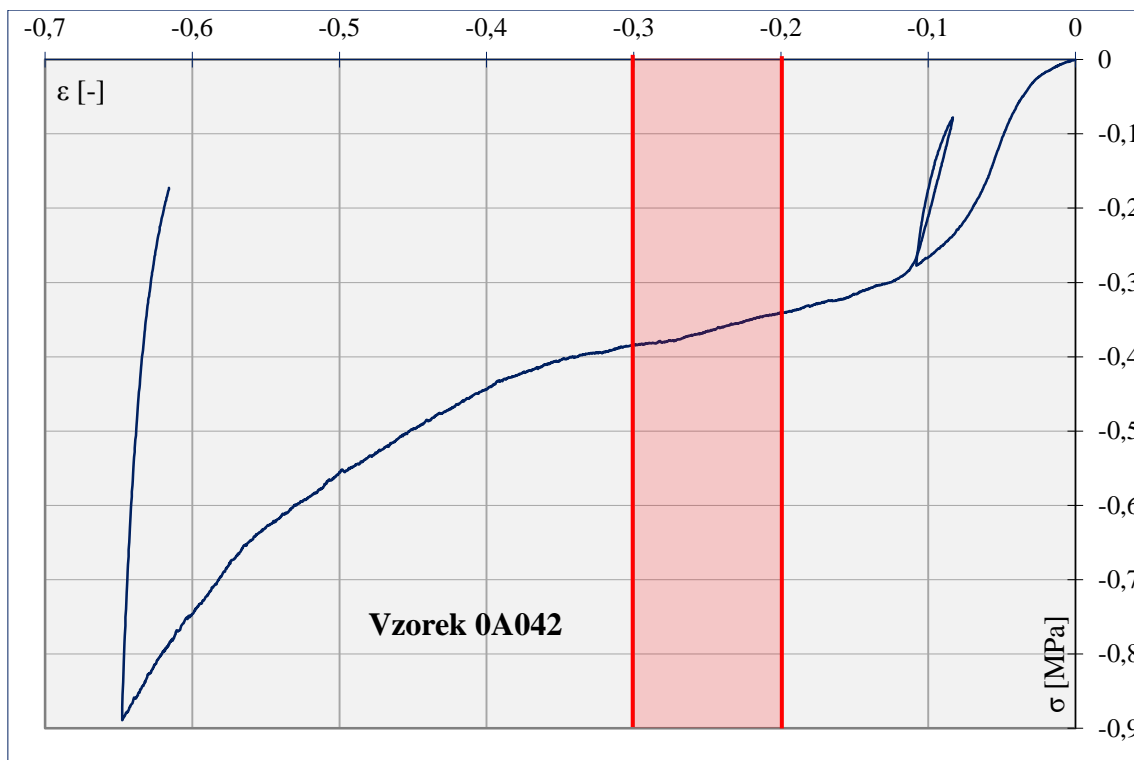
### 3.6.2 Stabilní hladina napětí $\sigma_{pl}$

Po skončení zatěžování jsou naměřená data: čas  $t$  [s], posuv  $s$  [mm], síla  $F$  [N], překopírována do Excelu. Pro přesnější vyhodnocení musí být odfiltrovány šumové hodnoty, případně i kapilární jevy ve vzorku, proto je stanovena tzv. experimentální nula. To znamená, že u suchých vzorků je brána jako počáteční hodnota tlakové síly větší než 0,05 N, u hydratovaných vzorků hodnota síly větší než 0,005 N. Menší hodnoty jsou pro tento experiment zanedbány. Z takto vynulovaných hodnot je spočtena deformace  $\varepsilon$  a napětí  $\sigma$  (viz rovnice 4, 5).

$$\varepsilon = \frac{s-s_0}{h_0} [-] \quad (4)$$

$$\sigma = \frac{F-F_0}{S_0} [\text{MPa}] \quad (5)$$

Skutečná stabilní hladina napětí  $\sigma_{pl}$  je vyhodnocena jako aritmetický průměr vypočtených hodnot napětí odpovídajících 20 až 30 % deformace. Naměřená hodnota je zaznamenána do tabulky a následně porovnávána s odhadovanou (viz Tabulka 5).



Obrázek 29 – Příklad vyobrazení vyhodnocení stabilní hladiny napětí

### 3.6.3 Elastický gradient $E$

Elastický gradient byl vyhodnocován v softwaru Rhinoceros 3D. Ze souboru dat byly izolovány ty body, tj. hodnoty deformace  $\epsilon$  [-] a napětí  $\sigma$  [MPa], které jsou v oblasti odlehčovací smyčky. Ty byly následně rozděleny na 2 soubory bodů, první soubor – od minima (cca poslední hodnota napětí před začátkem odlehčení) do maxima M (maximální hodnota napětí v odlehčovací smyčce); druhý soubor bodů – od maxima M (viz předchozí) do hodnoty napětí, která je jistě za průsečíkem obou křivek.

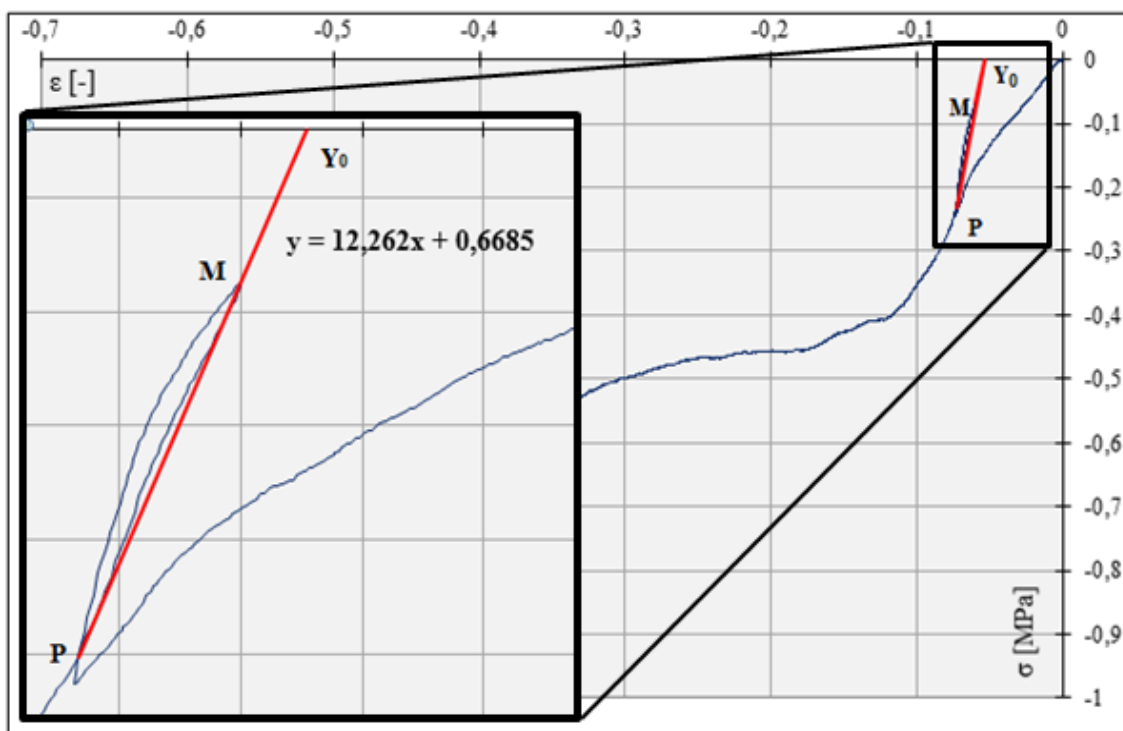
První soubor bodů byl následně importován do programu a proložen polynomem 5. stupně, to samé bylo provedeno pro druhý soubor bodů. Do průsečíku obou křivek byl vložen bod P. Tento bod byl následně spojen úsečkou s maximem M (tj. maximální napětí v odlehčovací smyčce). Prodloužením úsečky až na osu x byl vytvořen další bod  $Y_0$ .

Z předchozího postupu vznikly dva nové body – průsečík proložených křivek P a průsečík prodloužené úsečky s osou x  $Y_0$ ; a jeden stávající – maximum M v odlehčovací smyčce. Tyto body byly poté exportovány do textového souboru a přeneseny do Excelu (viz Tabulka 7).

V Excelu jsou body přidány do pracovního diagramu a propojeny spojnicí trendu, které je vypsána směrnice této úsečky ve tvaru  $y = ax + b$ . Elastickému gradientu  $E$  odpovídá hodnota  $a$  ve směrnici úsečky (viz Obrázek 30).

Tabulka 7 - Příklad zaznamenání význačných bodů pro vyhodnocení elastického gradientu

Body		x = deformace	y = napětí
Maximum	M	-0,060028609	-0,067510632
Průsečík s osou x	$Y_0$	-0,054522757	0
Průsečík 2 křivek	P	-0,073369744	-0,231094469



Obrázek 30 – Příklad záznamu pro vyhodnocení elastického gradientu

### 3.6.4 Smluvní mez kluzu $\sigma_{kpd}$

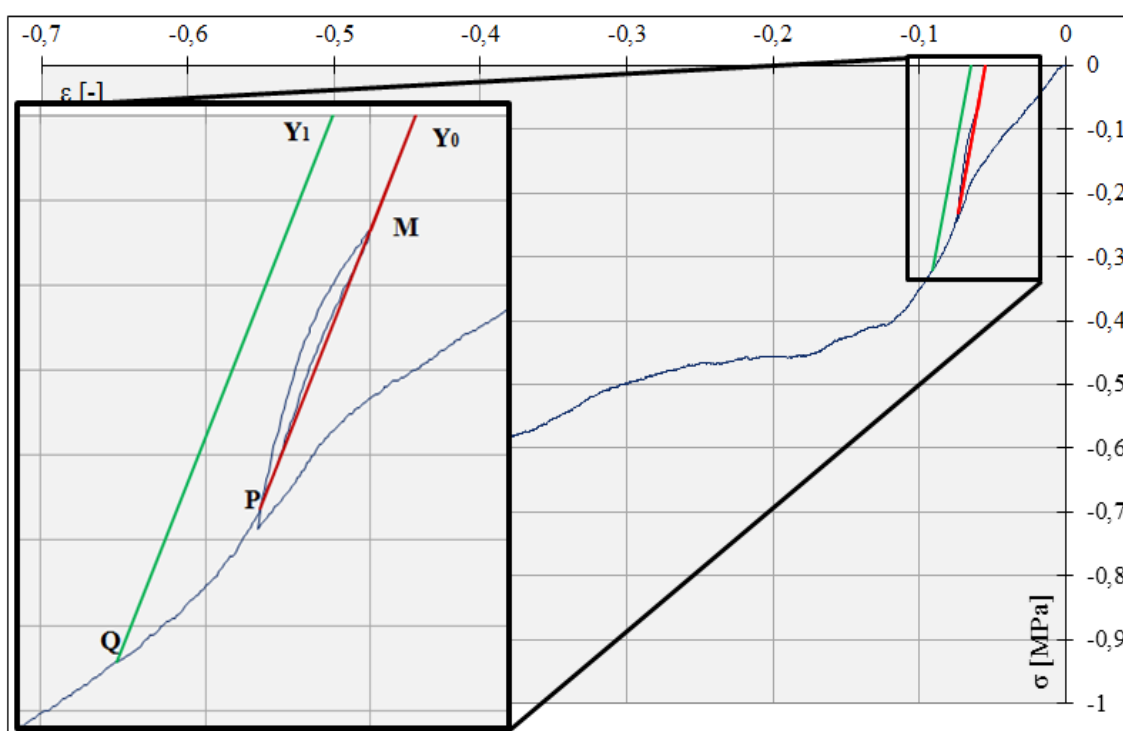
Pro vyhodnocení smluvní meze kluzu musíme vytvořit rovnoběžnou přímku se spojnicí maxima M (tj. maximálního napětí v odlehčovací smyčce) a průsečíku proložených křivek P (viz výše). K tomu je nutné nejprve vytvořit nový bod  $Y_1$ , jenž bude „posunutý“ o 1 % deformace. To znamená, že k průsečíku  $Y_0$  je „přičteno“ 1 % (tzn. 0,01). Protože se však nacházíme ve 3. kvadrantu, tzn. hodnoty na obou osách jsou záporné, musíme od x-ové souřadnice průsečíku odečíst 0,01 ( $Y_0 [x_0; 0] \rightarrow Y_1 [x_0 - 0,01; 0]$ ).

Vznikly nám tedy čtyři body, které jsou importovány do softwaru Rhinoceros 3D. V Rhinu spojíme úsečkou oba průsečíky, jak dvou proložených křivek P, tak s vodorovnou osou  $Y_0$ . Tuto úsečku zkopírujeme do posunutého bodu  $Y_1$ . Následně

importujeme „dolní“ polovinu křivky, tj. od maxima M do konce zatěžování. Úsečku nyní už můžeme prodloužit tak, aby protínala zbytek grafu. Vzniklý průsečík Q exportujeme zpět do Excelu (Tabulka 8) a vložíme do pracovního diagramu (Obrázek 31). Smluvní mez kluzu odpovídá y-ové souřadnici tohoto průsečíku.

Tabulka 8 - Příklad zaznamenání bodů pro vyhodnocení smluvní meze kluzu

Body		x = deformace	y = napětí
Maximum	M	-0,060028609	-0,067510632
Průsečík s osou x	$Y_0$	-0,054522757	0
Průsečík 2 křivek	P	-0,073369744	-0,231094469
Posunutý o 1 %	$Y_1$	-0,064522757	0
Průsečík s rovnoběžkou	Q	-0,090721545	-0,321239409



Obrázek 31 - Příklad pracovního diagramu pro vyhodnocení smluvní meze kluzu

### 3.6.5 Stanovení odchylek

Pro vyhodnocení dat je počítán aritmetický průměr  $\bar{x}$  (6), dále směrodatná odchylka  $SD$  (*standard deviation*) pro jedno měření (7) a střední chyba aritmetického průměru  $SEM$  (8) (*standard error of the mean*).

$$\bar{x} = \frac{1}{N}(x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^N x_i \quad (6)$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (7)$$

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad (8)$$

Tabulka 9 - Příklad zaznamenání statistických odchylek

	Stabilní hladina napětí					Elastický gradient				
	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$\sum_{i=1}^{11} (x_i - \bar{x})^2$	SD	SEM	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$\sum_{i=1}^{11} (x_i - \bar{x})^2$	SD	SEM
<b>0A</b>	-0,116	0,0135	0,083	<b>0,091</b>	<b>0,028</b>	2,047	4,1895	247,39	<b>4,973</b>	<b>1,50</b>
	-0,153	0,0235				-6,996	48,9491			
	-0,011	0,0001				-0,275	0,07572			
	0,091	0,0082				4,401	19,3674			
	-0,008	0,0001				-4,590	21,0669			
	0,089	0,0079				1,020	1,0401			
	0,125	0,0157				6,670	44,4867			
	-0,093	0,0087				-3,381	11,4302			
	0,036	0,0013				-3,695	13,6498			
	-0,019	0,0003				-3,584	12,8477			
	0,060	0,0037				8,384	70,2887			

## 4 Výsledky a diskuse

Tabulka 10 shrnuje průměrné hodnoty pro celé mé měření. Data jsou zaznamenána ve tvaru: aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

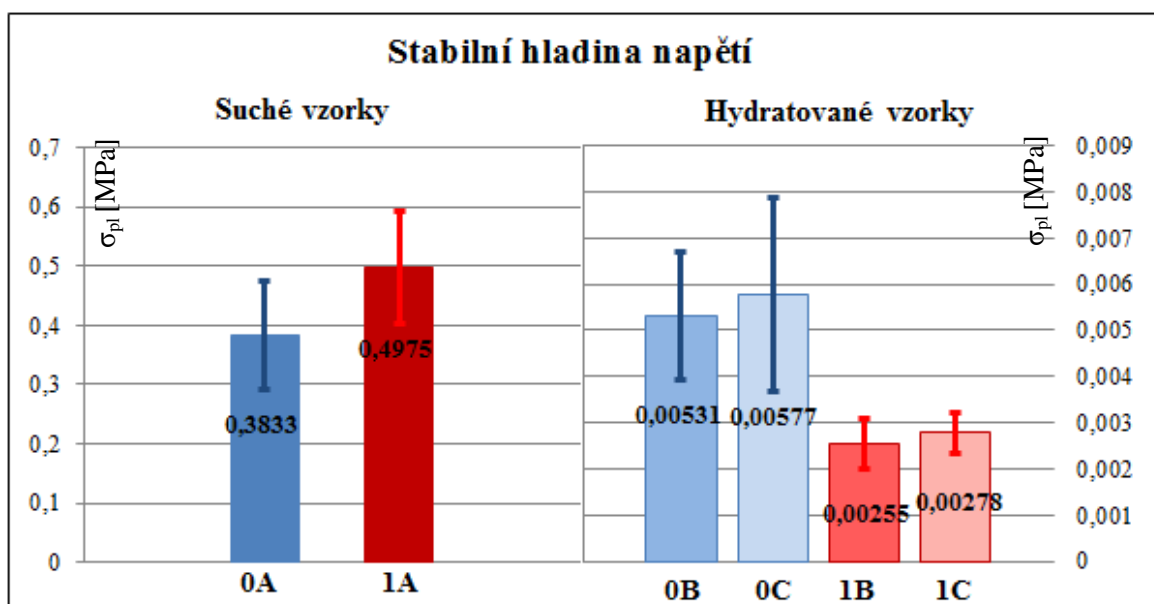
Obrázky (Obrázek 32, 33 a 34) graficky znázorňují výsledná data. Suché a hydratované vzorky se liší o dva až tři řády, proto jsou grafy rozděleny na hlavní osu (data pro 0A a 1A – vlevo) a vedlejší osu (data pro 0B,0C a 1B, 1C – vpravo).

Tabulka 10 - Tabulka všech výsledků (aritmetický průměr ± směrodatná odchylka)

Typ vzorku	Stabilní hladina napětí $\sigma_{pl}$ [MPa]	Elastický gradient $E$ [MPa]	Smluvní mez kluzu $\sigma_{kpt}$ [MPa]
<b>0A</b>	0,383 ± 0,091	11,24 ± 4,97	0,297 ± 0,049
<b>0B</b>	0,0053 ± 0,0014	0,046 ± 0,024	0,00408 ± 0,00069
<b>0C</b>	0,0058 ± 0,0021	0,039 ± 0,016	0,0045 ± 0,0014
<b>1A</b>	0,498 ± 0,095	17,98 ± 5,36	0,414 ± 0,055
<b>1B</b>	0,00255 ± 0,00056	0,0149 ± 0,0047	0,00196 ± 0,00030
<b>1C</b>	0,00278 ± 0,00044	0,0205 ± 0,0077	0,00187 ± 0,00033

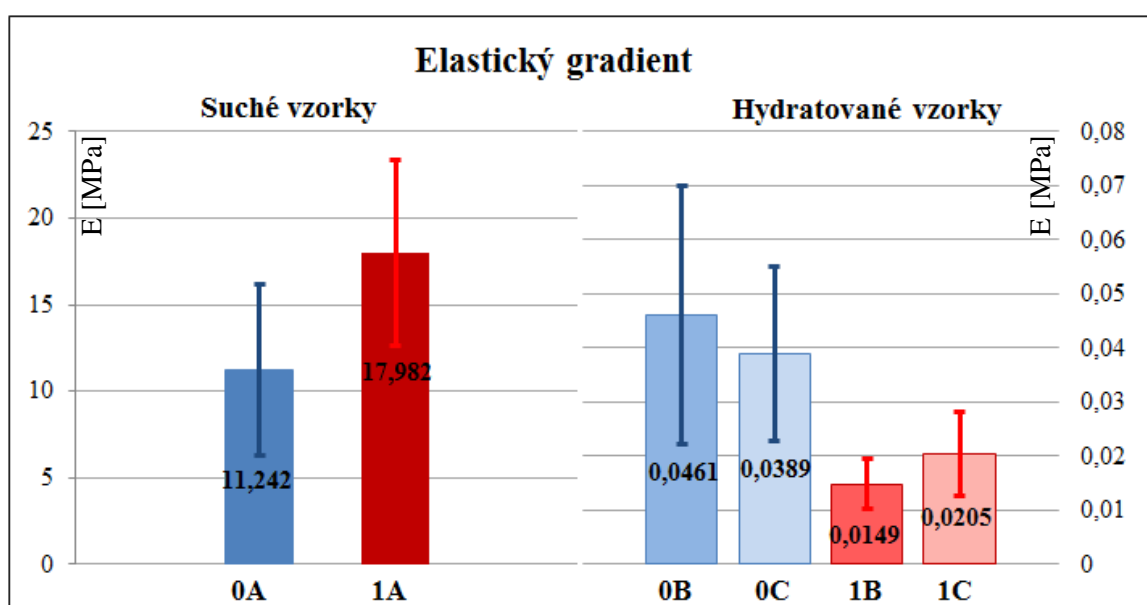


**Stabilní hladina napětí** (viz Obrázek 32) je pro vzorky v suchém stavu (0A, 1A) o dva řády vyšší než v obou hydratovaných stavech (0B, 0C, 1B, 1C), tzn. stabilní hladina napětí se vlivem hydratace snížila o 99 %. Když porovnám jen hydratované stavy (B a C), jsou vždy v jedné skupině přibližně stejné, nicméně stabilní hladina napětí v hydratovaném stavu po dobu 24 h je vždy o něco menší než hydratované 48 h. Porovnáním vlivu stabilizace, tzn. skupin 0 a 1, soudím, že skupina síťována pomocí NaOH (skupina 0) nabývá v suchém stavu nižších průměrných hodnot než skupina 1. Naopak v obou hydratovaných stavech jsou střední hodnoty stabilní hladiny napětí ve stejných řádech, ale skupina 0 je oproti skupině 1 zhruba dvojnásobná. Směrodatné odchylky (SD) pro stabilní hladinu napětí se průměrně pohybují okolo 23 %.



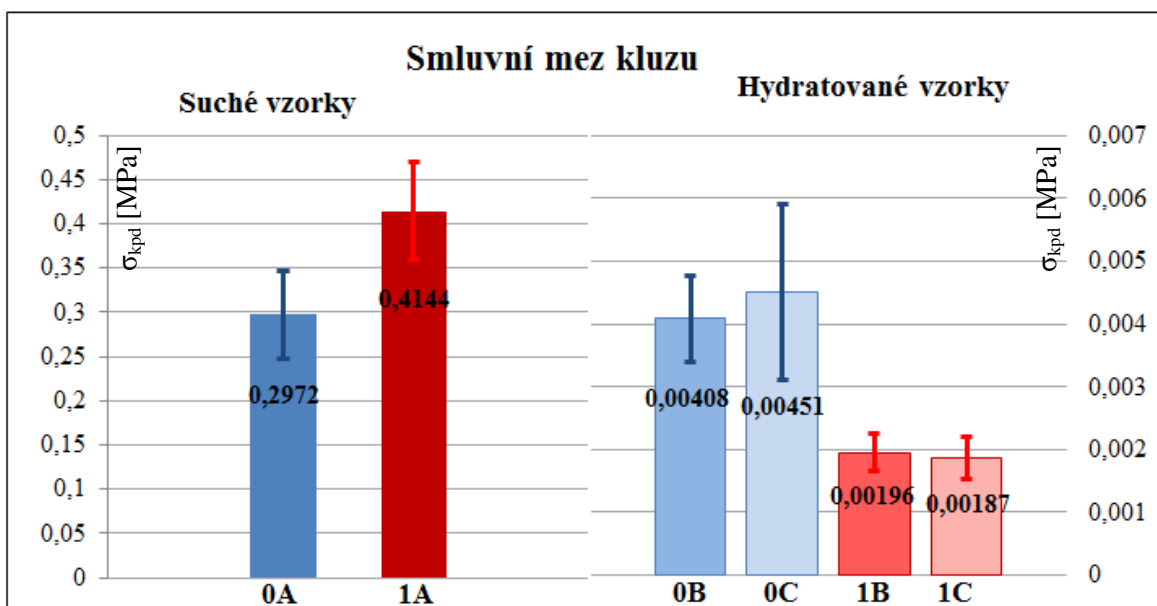
Obrázek 32 - Střední hodnoty stabilní hladiny napětí (aritmetický průměr) vzorků v suchém a hydratovaném stavu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatné odchylky (SD) ( $n=10$ )

**Elastický gradient** (viz Obrázek 33) se také výrazně liší pro suché a hydratované vzorky, a to konkrétně o tři řády. Hodnota gradientu po hydrataci klesla o 99,7 %. Porovnáním hydratovaných vzorků (B a C) soudím, že jsou v jedné skupině přibližně srovnatelné, avšak ve skupině 0 jsou pro hydratovaný stav 24 h (0B) průměrné hodnoty o málo vyšší než pro hydratovaný stav 48 h (0C), naopak je tomu pro skupinu 1, tam je po 24 h hydrataci elastický gradient nižší než po 48 h hydrataci. Mezi skupinami 0 a 1 jsou rovněž velké rozdíly. Elastický gradient skupiny 1A (suchý stav) dosahuje vyšších hodnot než u skupiny 0A, naopak vzorky hydratovaného stavu vykazují opačný trend, skupina 0 výrazně převyšuje střední hodnoty skupiny 1. Směrodatné odchylky (SD) elastického gradientu jsou průměrně 38,8 %. Skupina 0 má však odchylky větší než skupina 1, tj. 45,8 % a 32,9 %.



Obrázek 33 – Střední hodnoty elastického gradientu (aritmetický průměr) vzorků v suchém a hydratovaném stavu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatné odchylky (SD) ( $n=10$ )

**Smluvní mez kluzu** (viz Obrázek 34) se podobně jako předchozí parametry hydratováním snížila o dva řády a to jak po 24h, tak i po 48h namáčení, v tomto případě činil pokles způsobený hydratací 99 % z původní hodnoty (suchý stav). Oba hydratované stavy (B, C) se středními hodnotami pohybují v též řádech a v jedné skupině se hodnoty liší jen nepatrně. Při porovnání vlivu stabilizace (vzorky 0 a 1) je patrné, že pro vzorky v suchém stavu nabývá skupina 1 vyšších hodnot než skupina 0. Avšak rozdíly průměrných hodnot mezi skupinami v suchém stavu nejsou tak velké, jako rozdíly vzorků hydratovaných, to znamená, že průměrné střední hodnoty skupiny 0 jsou více než dvojnásobné oproti skupině 1. Průměrné směrodatné odchylky (SD) smluvní meze kluzu jsou ve srovnání s předchozími parametry nejnižší, činí průměrně 17,5 %. Skupina 0 vykazuje opět větší rozptyl než skupina 1, tzn. SD skupiny 0 jsou průměrně 21,5 % a SD skupiny 1 jsou průměrně jen 15,4 %.



Obrázek 34 - Střední hodnoty smluvní meze kluzu (aritmetický průměr) vzorků v suchém a hydratovaném stavu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatné odchylky (SD) ( $n=10$ )

## 5 Závěr

Cílem mé práce bylo posoudit vliv stabilizace chitosanu na mechanické vlastnosti kompozitních nosičů pro regeneraci kostní tkáně. Mechanické vlastnosti byly zjišťovány pomocí tlakové zkoušky dle normy ČSN ISO 13314. Hodnotila jsem vliv stabilizace, tj. rozdíly mezi skupinou 0 (stabilizace NaOH) a 1 (stabilizace EDC/NHS) a dále vliv hydratace, tj. rozdíly mezi jednotlivými stavy – suchý, hydratovaný 24 h a hydratovaný 48 h (A, B, C) pro 3 vyhodnocované parametry.

Z hlediska mechanických vlastností se v suchém stavu jeví lepší vzorky stabilizované EDC/NHS (skupina 1), ale v hydratovaných stavech vykazují lepší mechanické vlastnosti vzorky stabilizované pomocí NaOH (skupina 0). Mezi oběma hydratovanými stavy jsou hodnoty vyrovnané, ale malé rozdíly jsou patrné ve všech vyhodnocovaných parametrech. Vlivem hydratace všechny tři vyhodnocované parametry klesly o více než 98 %. Nejvíce překvapivé jsou však výsledky stabilní hladiny napětí, kde se po 48h hydrataci průměrné hodnoty oproti 24h hydrataci zvýšily, a to v obou skupinách. Stejně tomu je u průměrných hodnot elastického gradientu skupiny 1 a smluvní meze kluzu skupiny 0, v těchto případech se hodnoty také zvýšily při delší hydrataci.

V lékařské praxi se setkáváme s tkáněmi, které prostředím odpovídají hydratovanému stavu vzorku. Proto si myslím, že s ohledem na naměřené a vyhodnocené parametry, jsou kvalitnější vzorky stabilizované roztokem NaOH, protože v hydratovaných stavech vykazovaly vyšší hodnoty ve všech parametrech než vzorky síťované EDC/NHS. Na základě výše uvedeného se domnívám, že cíle mé bakalářské práce byly splněny.

## 6 Použitá literatura

- [1] BLACK, Cameron R. M., Vitali GORIAINOV, David GIBBS, Janos KANCZLER, Rahul S. TARE a Richard O. C. OREFFO. Bone Tissue Engineering. *Current Molecular Biology Reports*. 2015, **1**(3), 132-140. DOI: 10.1007/s40610-015-0022-2. ISSN 2198-6428. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s40610-015-0022-2>
- [2] WOLFOVÁ, Lucie, Lucy VOJTOVÁ, Lucie JUREČKOVÁ a Lenka KOHUTOVÁ, ed. *Úvod do tkáňového inženýrství*. 1. Brno: MediaBros, 2015. ISBN 978-80-260-9720-4.
- [3] PRZEKORA, Agata, Krzysztof PALKA a Grazyna GINALSKA. Biomedical potential of chitosan/HA and chitosan/ $\beta$ -1,3-glucan/HA biomaterials as scaffolds for bone regeneration — A comparative study: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **58**(3), 891-899. DOI: 10.1016/j.msec.2015.09.046. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115303726>
- [4] CHU, Paul K. Special issue editorial. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2010, **70**(3-6), 29- [cit. 2017-05-19]. DOI: 10.1016/j.mser.2010.06.001. ISSN 0927796x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X1000063X>
- [5] WANG, Shihua, Xuebin QU a Robert ZHAO. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology* [online]. 2012, **5**(1), 19- [cit. 2017-05-19]. DOI: 10.1186/1756-8722-5-19. ISSN 1756-8722. Dostupné z: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-5-19>
- [6] TENG, Shu-Hua, Mian-Hui LIANG, Peng WANG a Yong LUO. Biomimetic composite microspheres of collagen/chitosan/nano-hydroxyapatite: In-situ synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **58**(3), 610-613. DOI: 10.1016/j.msec.2015.09.021. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115303477>
- [7] KURITA, Keisuke. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology* [online]. 2006, **8**(3). DOI: 10.1007/s10126-005-0097-5. ISSN 1436-2228. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10126-005-0097-5>

- [8] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. CHITOSAN A JEHO FARMACEUTICKÉ APLIKACE. *Chemické listy* [online]. Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, 2009, **2009**(103), 56-65 [cit. 2017-05-19]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_01\\_56-65.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf)
- [9] DONG, Chanjuan a Yonggang LV. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers* [online]. 2016, **8**(2), 42- [cit. 2017-05-19]. DOI: 10.3390/polym8020042. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/8/2/42>
- [10] ČSN ISO 13314. *Mechanické zkoušení kovů – Zkoušení tvářitelnosti – Zkouška porézních a pěnových kovů tlakem*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012, 12 s.
- [11] ZHOU, Hongjian a Jaebeom LEE. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, **7**(7), 2769-2781 [cit. 2017-05-20]. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.019. ISSN 17427061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111001310>
- [12] WANG, Shihua, Xuebin QU a Robert ZHAO. Clinical applications of mesenchymal stem cells: In-situ synthesis and characterization. *Journal of Hematology* [online]. 2012, **5**(1), 19-. DOI: 10.1186/1756-8722-5-19. ISSN 1756-8722. Dostupné z: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-5-19>
- [13] Majvald, Jiří. *Analýza mechanických a strukturních vlastností kompozitních nosičů pro regeneraci kostních defektů*. Diplomová práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, 2016.
- [14] CHANJUAN, Dong a Yonggang LV. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers (20734360)*. 2016, **8**(2), 1-20. DOI: 10.3390/polym8020042. ISSN 2073-4360
- [15] LIU, Xiaohua a Peter X. MA. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 2004, **32**(3), 477-486 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1023/B:ABME.0000017544.36001.8e. ISSN 0090-6964.

## Seznam obrázků

Obrázek 1 - Příprava složek směsi .....	18
Obrázek 2 – Postup homogenizace směsi .....	18
Obrázek 3 - Plnění forem směsí .....	18
Obrázek 4 – Ilustrativní SEM snímky vzorků skupiny 0 (zvětšení 23x, 100x, 500x, 1000x) .....	19
Obrázek 5 - Ilustrativní SEM snímky vzorků skupiny 1 (zvětšení 23x, 100x, 500x, 1000x) .....	20
Obrázek 6 - Snímky vzorku skupiny 0 z uCT .....	20
Obrázek 7 - Snímek vzorku skupiny 1 z uCT .....	20
Obrázek 8 – Mikro-CT rekonstrukce vzorku skupiny 0 s barevně odlišenými různě velkými póry .....	21
Obrázek 9 - Rozdělení vzorků do skupin .....	22
Obrázek 10 - Inkubátor na hydratované vzorky pro udržení stanovených podmínek.....	22
Obrázek 11 - Zatěžovací systém MTS Mini Bionix 858.02.....	24
Obrázek 12 - Software pro zaznamenávání dat Flex Test GT.....	24
Obrázek 13 – Křivka napětí-deformace pro stanovení charakteristických hodnot [10].....	25
Obrázek 14 – Křivka napětí-deformace pro vyhodnocení elastického gradientu a smluvní meze kluzu [10] .....	26
Obrázek 15 - Měření hydratovaného vzorku před zatěžováním.....	27
Obrázek 16 - Zatěžování suchého vzorku .....	29
Obrázek 17 - Zatěžování hydratovaného vzorku.....	29
Obrázek 18 - Pracovní diagram vzorku 0A042 .....	31
Obrázek 19 - Pracovní diagram vzorku 1A046 .....	31
Obrázek 20 - Srovnání pracovních diagramů suchých vzorků.....	31
Obrázek 21 - Pracovní diagram vzorku 0B132 .....	32
Obrázek 22 - Pracovní diagram vzorku 1B142 .....	32

Obrázek 23 - Srovnání pracovních diagramů vzorků hydratovaných 24 h .....	32
Obrázek 24 - Pracovní diagram 0C232 .....	33
Obrázek 25 - Pracovní diagram 1C248 .....	33
Obrázek 26 - Srovnání pracovních diagramů vzorků hydratovaných 48 h .....	33
Obrázek 27 - Pracovní diagram vzorků skupiny 0 .....	34
Obrázek 28 - Pracovní diagram vzorků skupiny 1 .....	34
Obrázek 29 – Příklad vyobrazení vyhodnocení stabilní hladiny napětí .....	36
Obrázek 30 – Příklad záznamu pro vyhodnocení elastického gradientu.....	37
Obrázek 32 - Příklad pracovního diagramu pro vyhodnocení smluvní meze kluzu .....	38
Obrázek 32 - Střední hodnoty stabilní hladiny napětí (aritmetický průměr) vzorků v suchém a hydratovaném stavu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatné odchyly (SD) ( $n=10$ ).....	41
Obrázek 33 – Střední hodnoty elastického gradientu (aritmetický průměr) vzorků v suchém a hydratovaném stavu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatné odchyly (SD) ( $n=10$ ).....	42
Obrázek 34 - Střední hodnoty smluvní meze kluzu (aritmetický průměr) vzorků v suchém a hydratovaném stavu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatné odchyly (SD) ( $n=10$ ).....	43



## Seznam tabulek

Tabulka 1- Chemické složení testovaných vzorků a složky použité pro jejich přípravu ....	17
Tabulka 2 - Přehled označení jednotlivých skupin vzorků.....	21
Tabulka 3 - Příklad zaznamenání a výpočtu rozměrů .....	27
Tabulka 4 – Příklad zaznamenávání odhadu stabilní hladiny napětí a výpočtů sil .....	28
Tabulka 5 - Příklad zaznamenání naměřených hodnot.....	30
Tabulka 6 - Záznam rychlostí deformací pro vybrané vzorky jednotlivých skupin.....	30
Tabulka 7 - Příklad zaznamenání význačných bodů pro vyhodnocení elastického gradientu .....	37
Tabulka 8 - Příklad zaznamenání bodů pro vyhodnocení smluvní meze kluzu .....	38
Tabulka 9 - Příklad zaznamenání statistických odchylek.....	39
Tabulka 10 - Tabulka všech výsledků (aritmetický průměr $\pm$ směrodatná odchylka) .....	40
Tabulka 11 - Naměřená data vzorků skupiny 0 .....	50
Tabulka 12 - Naměřená data vzorků skupiny 1 .....	51
Tabulka 13 - Vyhodnocená data vzorků skupiny 0 .....	52
Tabulka 14 - Vyhodnocená data vzorků skupiny 1 .....	53

## 7 Přílohy

V této kapitole jsou uvedeny tabulky, které obsahují všechna naměřená (viz Tabulka 11 a Tabulka 12) a vyhodnocená data (viz Tabulka 13 a Tabulka 14).

**Tabulka 11 - Naměřená data vzorků skupiny 0**

Typ vzorku	Číslo	Průměr vzorku				Průřez	Výška
		D [mm]			Ø	S <sub>0</sub> [mm <sup>2</sup> ]	h [mm]
0A	033	5,609	5,360	5,625	5,531	24,03	7,745
	034	5,934	5,864	5,959	5,919	27,52	7,039
	035	5,370	6,072	5,266	5,569	24,36	6,940
	036	4,778	5,739	5,122	5,213	21,34	6,795
	037	5,083	5,550	4,496	5,043	19,97	6,765
	038	5,177	5,610	5,684	5,490	23,67	6,851
	039	5,792	5,438	5,708	5,646	25,04	7,579
	040	5,565	5,772	5,466	5,601	24,64	5,637
	041	5,336	5,373	5,351	5,353	22,51	7,039
	042	5,500	5,073	5,257	5,277	21,87	6,920
	043	5,574	5,317	5,820	5,570	24,37	6,815
0B	131	6,119	6,040	6,031	6,063	28,87	8,386
	132	6,157	5,836	5,980	5,991	28,19	7,141
	133	6,008	5,757	5,817	5,861	26,98	7,326
	134	5,740	5,698	5,734	5,724	25,73	7,334
	135	5,774	5,707	5,644	5,708	25,59	7,488
	136	6,095	6,132	5,904	6,044	28,69	7,629
	137	6,185	5,242	5,748	5,725	25,74	7,598
	138	6,115	6,064	6,017	6,065	28,89	7,539
	139	5,701	5,778	5,895	5,791	26,34	6,933
	140	5,386	6,088	5,820	5,765	26,10	7,230
0C	231	5,900	5,983	6,165	6,016	28,43	7,276
	232	6,196	6,188	6,164	6,183	30,02	7,076
	233	6,199	5,866	6,042	6,036	28,61	7,880
	234	6,143	6,045	5,953	6,047	28,72	7,427
	235	5,818	6,147	5,931	5,965	27,95	7,372
	236	6,129	6,216	5,729	6,025	28,51	7,361
	237	5,518	5,825	5,806	5,716	25,66	6,688
	238	5,390	5,425	5,695	5,503	23,79	7,762
	239	5,740	5,786	5,174	5,567	24,34	7,351
	240	5,372	5,604	5,746	5,574	24,40	7,435

Tabulka 12 - Naměřená data vzorků skupiny 1

Typ vzorku	Číslo	Průměr vzorku				Průřez	Výška
		D [mm]			Ø	S <sub>0</sub> [mm <sup>2</sup> ]	h [mm]
1A	044	5,603	5,839	5,620	5,687	25,40	6,712
	045	5,268	5,288	5,408	5,321	22,24	7,547
	046	5,639	5,730	5,781	5,717	25,67	6,737
	047	4,428	5,892	5,147	5,156	20,88	6,653
	048	5,933	5,628	5,455	5,672	25,27	7,151
	049	5,378	5,608	5,570	5,519	23,92	6,261
	050	4,888	5,858	5,653	5,466	23,47	7,618
	051	5,513	5,411	5,407	5,444	23,27	7,024
	052	4,901	5,812	5,080	5,264	21,77	7,243
	053	5,589	5,636	5,737	5,654	25,11	6,899
1B	141	6,080	5,561	5,965	5,869	27,05	7,598
	142	5,770	4,476	5,762	5,336	22,36	7,122
	143	6,405	5,709	5,699	5,938	27,69	7,030
	144	6,399	5,115	5,414	5,643	25,01	7,278
	145	5,872	5,898	5,449	5,740	25,87	6,970
	146	5,310	6,293	6,025	5,876	27,12	7,219
	147	6,199	6,033	5,583	5,938	27,70	7,439
	148	6,329	5,759	6,059	6,049	28,74	7,465
	149	5,441	5,935	5,210	5,529	24,01	7,266
	150	6,225	5,373	6,032	5,877	27,12	7,403
1C	241	5,704	5,977	5,497	5,726	25,75	7,447
	242	6,086	6,191	5,632	5,970	27,99	7,505
	243	5,793	5,734	5,788	5,772	26,16	7,836
	244	4,901	5,801	6,119	5,607	24,69	7,558
	245	6,144	5,581	5,357	5,694	25,46	6,896
	246	5,488	5,949	6,054	5,830	26,70	7,464
	247	5,385	6,402	5,134	5,640	24,99	7,597
	248	4,960	5,259	5,012	5,077	20,24	7,127
	249	5,431	5,924	5,279	5,545	24,15	7,799
	250	5,950	5,283	6,032	5,755	26,01	6,904

Tabulka 13 - Vyhodnocená data vzorků skupiny 0

Typ vzorku	Číslo	Odhad stabilní hladiny napětí	F70	F20	Stabilní hladina napětí	Elastický gradient		Smluvní mez kluzu	
		$\sigma_{pl}$ [MPa]	[N]	[N]	$\sigma_{pl}$ [MPa]	$E$ [MPa]	$\sigma_{kpl}$ [MPa]		
0A	033	0,25	4,21	1,20	0,267	0,383	11,24	0,268	
	034	0,30	5,78	1,65	0,230			4,25	0,223
	035	0,20	3,41	0,97	0,372			10,97	0,211
	036	0,25	3,74	1,07	0,474			15,64	0,331
	037	0,20	2,80	0,80	0,375			6,65	0,339
	038	0,35	5,80	1,66	0,472			12,26	0,321
	039	0,38	6,66	1,90	0,509			17,91	0,328
	040	0,40	6,90	1,97	0,290			7,86	0,288
	041	0,38	5,99	1,71	0,420			7,55	0,290
	042	0,40	6,12	1,75	0,365			7,66	0,296
	043	0,40	6,82	1,95	0,444			19,63	0,374
0B	131	0,0025	0,051	0,014	0,0058	0,0053	0,046	0,00272	
	132	0,0045	0,089	0,025	0,0049			0,038	0,00351
	133	0,0035	0,066	0,019	0,0071			0,058	0,00501
	134	0,0050	0,090	0,026	0,0051			0,033	0,00369
	135	0,0050	0,090	0,026	0,0077			0,063	0,00505
	136	0,0050	0,100	0,029	0,0038			0,017	-
	137	0,0045	0,081	0,023	0,0054			0,083	0,00425
	138	0,0050	0,101	0,029	0,0059			0,075	0,00435
	139	0,0050	0,092	0,026	0,0035			0,021	-
	140	0,0050	0,091	0,026	0,0040			0,021	-
0C	231	0,0025	0,050	0,014	0,0074	0,0058	0,039	0,0057	
	232	0,0055	0,116	0,033	0,0055			0,031	0,0043
	233	0,0055	0,110	0,031	0,0045			0,033	0,0037
	234	0,0045	0,090	0,026	0,0067			0,051	0,0038
	235	0,0045	0,088	0,025	0,0032			0,026	0,0030
	236	0,0055	0,110	0,031	0,0041			0,024	-
	237	0,0055	0,099	0,028	0,0084			0,043	0,0056
	238	0,0045	0,075	0,021	0,0042			0,033	0,0033
	239	0,0045	0,077	0,022	0,0044			0,022	0,0037
	240	0,0055	0,094	0,027	0,0094			0,059	0,0076

Tabulka 14 - Vyhodnocená data vzorků skupiny 1

Typ vzorku	Číslo	Odhad stabilní hladiny napětí	F70	F20	Stabilní hladina napětí	Elastický gradient		Smluvní mez kluzu	
		$\sigma_{pl}$ [MPa]	[N]	[N]	$\sigma_{pl}$ [MPa]	$E$ [MPa]	$\sigma_{kpl}$ [MPa]		
1A	044	0,25	4,45	1,27	0,448	0,498	14,66	17,98	0,375
	045	0,35	5,45	1,56	0,608		24,06		0,540
	046	0,45	8,09	2,31	0,488		16,14		0,414
	047	0,45	6,58	1,88	0,633		21,95		0,397
	048	0,55	9,73	2,78	0,380		8,54		-
	049	0,45	7,53	2,15	0,535		14,10		0,355
	050	0,45	7,39	2,11	0,426		25,28		0,425
	051	0,45	7,33	2,09	0,523		15,64		0,366
	052	0,45	6,86	1,96	0,356		23,09		0,466
	053	0,45	7,91	2,26	0,579		16,37		0,390
1B	141	0,0030	0,057	0,016	0,00334	0,00255	0,0193	0,0149	0,00234
	142	0,0030	0,047	0,013	0,00293		0,0142		0,00261
	143	0,0030	0,058	0,017	0,00166		0,0087		-
	144	0,0030	0,053	0,015	0,00233		0,0132		0,00195
	145	0,0025	0,045	0,013	0,00253		0,0162		0,00171
	146	0,0025	0,047	0,014	0,00186		0,0101		0,00167
	147	0,0025	0,048	0,014	0,00259		0,0138		0,00183
	148	0,0025	0,050	0,014	0,00210		0,0101		0,00168
	149	0,0025	0,042	0,012	0,00320		0,0215		0,00188
	150	0,0025	0,047	0,014	0,00293		0,0215		0,00195
1C	241	0,0020	0,036	0,010	0,00281	0,00278	0,0249	0,0205	0,00148
	242	0,0023	0,045	0,013	0,00254		0,0155		0,00157
	243	0,0025	0,046	0,013	0,00342		0,0180		0,00194
	244	0,0030	0,052	0,015	0,00324		0,0185		0,00234
	245	0,0030	0,053	0,015	0,00221		0,0115		0,00202
	246	0,0030	0,056	0,016	0,00217		0,0198		0,00200
	247	0,0020	0,035	0,010	0,00263		0,0188		0,00156
	248	0,0030	0,043	0,012	0,00322		0,0402		0,00234
	249	0,0030	0,051	0,014	0,00253		0,0174		0,00195
	250	0,0020	0,036	0,010	0,00304		0,0201		0,00153